

ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN EN TERAPIA REGENERATIVA

ETHICAL PRINCIPLES IN RESEARCH RELATED TO REGENERATIVE THERAPY

Natalia López Moratalla

Departamento de Bioquímica

Universidad de Navarra

E-mail: natalialm@unav.es

Resumen

Se recogen y analizan los nuevos datos acerca de la función natural de las células troncales. Estos conocimientos suponen un avance en la comprensión del desarrollo humano: la maduración de las células troncales es jerárquica, en el tiempo y el espacio, del desarrollo embrionario humano y forman parte de los mecanismos de la simbiosis madre-feto durante la gestación. Estos datos no apoyan la idea de la existencia de etapas temporales tempranas en que el carácter personal del embrión esté en duda. Se ha sugerido que carezca de suficiente entidad y autonomía ontológica y que la suficiencia sólo se adquiriría más tarde con el avance de la organogénesis. Es un deber ético de la comunidad científica la divulgación de aquellos conocimientos que dan información rigurosa acerca de ámbitos de la vida humana sobre los que se deben tomar decisiones legales. Es no menor el deber ético de informar de forma rigurosa de los avances, dificultades y soluciones de la Terapia regenerativa. El uso de células humanas autólogas o heterólogas en este campo exige el avance de las directrices acerca de su uso y de su comercialización. La reprogramación inducida en células al estado embrionario (iPS) abre perspectivas importantes tanto a la investigación básica como a la clínica. El compromiso ético de Yamanaka, creador de esta tecnología, en relación al uso de la misma hacia otros fines es un ejemplo de la

responsabilidad del investigador, y supone asumir que la ciencia triunfa al servicio del hombre sólo desde la ética.

Palabras clave: ética de la investigación biomédica, terapia regenerativa, células iPS, células troncales en el desarrollo embrionario; microquimerismo maternal.

Abstract

Recently published data on the function and properties of stem cells are examined and analyzed. This knowledge enhances our understanding of human development: stem cells follow a precise hierarchical pattern both in time and space, and they are part of the symbiosis of fetus and mother. The data do not support the idea of the existence of an early stage of the embryo development lacking a personal character. It has been suggested that an early embryo lacks an entity of sufficient ontological autonomy, which would be acquired with organogenesis at later stages. It is an ethical commitment of the scientific community to provide serious and precise information about the advances, problems and solutions involved in regenerative therapy. The use of autologous or heterologous human cells in this field demands of rules which determine their use and commercial potential. The induced reprogramming of adult cells to an embryonic stage (iPS) opens up new important perspectives both in basic research and for clinical treatments. The ethical commitment of Yamanaka, developer of this technology, with regard to its use in clinical treatments, is an example of the researcher's responsibility of the researcher, and, at the same time, an illustration of how that science may render a service to mankind only through ethical principles.

Key words: Ethics in biomedical research, regenerative therapy, iPS cells, stem cells in embryo development, maternal microchimerism.

1. Introducción

«Un nuevo año y una nueva era», titula Pera un artículo publicado en el número de 10 de enero de 2008, en *Nature*¹. La investigación en Terapia regenerativa ha dado un giro al poder manipular células humanas de adulto y generar células con pluripotencialidad inducida (iPS)

que poseen así el mismo potencial de crecimiento y diferenciación de las células troncales embrionarias. Por ello, el 2008 promete ser espectacular en la investigación, y definitivo en la «competencia» entre la obtención de células troncales humanas a partir de embriones o a partir de tejidos de adulto. Hasta el punto de que Thomson, el científico que aisló por primera vez las células desde embriones humanos generados por Fecundación *in vitro*, comenta en *The New York Times*

1 Pera M. «A new year and a new era». *Nature* 451, 135-136, 2008.

que probablemente «dentro de un decenio la guerra de las células madre será sólo una nota al pie de una página curiosa de la historia de la ciencia».

Sin embargo, no todas las cuestiones éticas en relación con la medicina regenerativa están resueltas. Ciertamente, es una página curiosa de la historia de la ciencia, ya que las ideologías y los intereses económicos y políticos han perturbado la información, que la comunidad científica tiene obligación de dar a la sociedad, cuando, como ocurre ahora, se abre un área de conocimiento auténticamente espectacular. Todo conocimiento es siempre un bien; ahora bien los procesos usados para alcanzarlo y sus aplicaciones son también, de suyo y siempre, éticamente ambivalentes.

En un campo, en que la aplicación terapéutica se adelanta al conocimiento básico de los mecanismos implicados en los procesos de desarrollo embrionario, y maduración y regeneración celular y tisular, las opciones no son siempre neutras. Como toda intervención con fines terapéuticos, exige que los protocolos se asemejen lo más posible al proceso funcional y al mismo tiempo, y por ello, sean lo menos invasivos y destructivos posible. Tampoco son siempre neutras las opciones para la obtención de muestras biológicas humanas tanto para su uso médico como de investigación.

La exposición de motivos de la ley española de Investigación Biomédica (LIB) recoge la falacia que asegura que por ser «imprescindible» la investigación con gametos, embriones o células embrionarias, se autoriza la utilización de

cualquier técnica de obtención de células troncales humanas. Nunca puede ser aceptable éticamente la destrucción de embriones humanos vivos, ni cualquier método de obtención de gametos humanos, por muy grandes que pudieran ser los beneficios que se derivaran de una investigación. Ciertamente lo que se planteó como imprescindible pasó, rápida y sutilmente, a necesario-conveniente-útil... Ha caído, por el peso de su propia irracionalidad, el uso terapéutico de células humanas provenientes de embriones generados por fecundación, o células humanas provenientes de la transferencia nuclear a óvulos. Sin embargo, está en activo la idea de continuar empleándolas para investigación y para obtener productos biotecnológicos, de interés sanitario.

Hay una cuestión gravemente inmoral que la sociedad no quiere plantearse, y acepta, como si de un mal menor se tratara: que cada día se generan embriones humanos destinados a morir, sin opción a que su madre les geste. El planteamiento de que sean útiles para investigar en medicina no es una mera opción pragmática, sino un intento de aligerar, aún más, la conciencia ante los hechos de la práctica de la Reproducción Asistida. Por eso sigue presente la «tentación de los embriones sobrantes» y el camuflaje del comercio de óvulos humanos so capa de donación generosa al bien de la felicidad de una mujer que los necesite para conseguir la felicidad un embarazo deseado.

Este trabajo pretende informar de los logros, los retos, las dificultades y las soluciones que se van encontrando en la

investigación en Terapia Regenerativa, desde la perspectiva ética.

2. Un nuevo paradigma sobre la ontología del embrión humano

El debate, con frecuencia cargado de acritud, acerca del sentido biológico de las etapas temporales de la vida del embrión humano, y con ello de la naturaleza de la vida incipiente, su dignidad y la exigencia de un respeto absoluto o relativo, ha quedado superado, por el avance del conocimiento científico.

El desarrollo embrionario y fetal en que se construye el organismo es un proceso dinámico, ordenado en el espacio y jerárquico en el tiempo, de formación de los diversos tipos de células troncales². Se inicia en el tiempo «cero» en que queda constituido el cigoto, la única célula madre *totipotencial*, producto de la fecundación de los gametos. El desarrollo avanza con la creación de células *pluripotentes*, capaces de ir comprometiéndose a un tipo de células madre *multipotentes*, *progenitoras* y finalmente diferenciadas como constitutivas de un tejido concreto. Algunas células pluripotenciales, multipotenciales o progenitoras quedan en reserva en el organismo, en localizaciones precisas, denominadas células madre de *adulto*.

Toda célula troncal es capaz de proliferar, diferenciarse y autorenovarse a través

de divisiones múltiples y secuenciales que son *asimétricas* y por ello dan lugar a dos células hijas desiguales entre sí. Una de ellas sigue siendo igual a la original, y por ello mantiene la población, y la otra se diferencia a un estado más maduro. Cada uno de estos procesos, sean dirigidos a la formación de un órgano, o a su crecimiento, maduración, o regeneración, tiene una ventana de tiempo para iniciarse y para terminar la maduración de las células madre de partida; y cada célula troncal, que crece y madura, lo hace desde su *nicho* propio.

Cada nicho es una organización espacial de células y material extracelular; un microambiente que mantiene las células y aporta las señales de proliferar, madurar o autorenovarse a la célula troncal³. Las señales se generan en la etapa temporal previa de la vida embrionaria o de la vida adulta, y la célula recibe, internaliza y procesa la información, y responde eficazmente al inducir, o reprimir, la expresión de genes concretos. La represión de la expresión de los genes implica también la acción de moléculas pequeñas de RNA que mantienen la pluripotencialidad de las células⁴.

Vivir es crecer y desarrollarse, construirse y madurar, renovar las células y regenerar los órganos, y envejecer y morir. El hilo conductor de toda la trayectoria

2 Cfr. revisiones: Rossant J. «Stem Cells and Early Lineage development». *Cell*, 132, 527-531, 2008. Murry CE, Keller G. «Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development». *Cell*, 132, 661-680, 2008.

3 Morrison SJ, Spradling AC. «Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life». *Cell*, 132, 598-611, 2008.

4 Stadler BM, Ruohola-Baker H. «Small RNAs: Keeping Stem Cells in Line». *Cell*, 132, 563-566, 2008.

vital es unitario: lo hace posible el constante cambio ordenado y jerarquizado de las células troncales desde la totipotencialidad del inicio al envejecimiento del final. A medida que el organismo crece y madura, disminuye la necesidad de restringir el potencial de diferenciación, y, por ello, la mayoría de los tejidos contienen poblaciones heterogéneas de células con una gama de maduración, que abarca desde células madre pluripotenciales, multipotentes, progenitoras y diferenciadas a término.

Sea cual sea el proceso que genere una célula totipotencial, se ha iniciado una trayectoria vital unitaria; se ha constituido un individuo nuevo, y las etapas de confección o construcción del organismo son etapas con una jerarquía precisa espacio-temporal de continuidad sin que ninguna de ellas adquiera un sentido biológico propio. La lección magistral de las células troncales es explicarnos la unidad de la vida de cada individuo desde la constitución como cigoto, al desarrollo, maduración, regeneración y recambio, al envejecimiento y muerte.

Otros dos nuevos aspectos de las características del proceso de desarrollo se conocen ahora con precisión. En primer lugar, que este proceso es irreversible. Es decir, ninguna célula del organismo, aunque esté en un estado embrionario, es totipotente. Las células embrionarias pueden ser artificialmente incorporadas a un blastocisto y formarán una quimera, pero no son totipotenciales: ellas, por sí mismas, no dan lugar a un blastocisto, ya que la formación del trofoblasto exige la división asimétrica de una célula

totipotencial. Las únicas células capaces de generar un nuevo organismo son las germinales⁵. Estas células, en su nicho propio en el embrión temprano, adquieren las especificaciones sexuales y sufren la meiosis para generar los gametos. Tras una fecundación producen un nuevo organismo, el cigoto totipotente, y en el desarrollo de este nuevo individuo vuelven a generarse. En este sentido las células germinales escapan a la mortalidad que sufren todas las células somáticas. Y esto se debe a que al ejecutar su diferenciación a gametos retienen la capacidad de totipotencialidad: reprimen la expresión de los genes de la diferenciación a somáticas, interaccionan con el microambiente especializado del nicho y usan en su linaje RNA específicos de la diferenciación. Estas tres características les permiten crear, proteger y promover este carácter que les diferencia de las demás células: retener la totipotencialidad necesaria para la concepción de un nuevo organismo completo.

En segundo lugar, el debate a que nos hemos referido acerca del carácter personal del hombre (desde que es hombre, o hasta que alcance un grado determinado de desarrollo), tiene otro aspecto en relación con la autonomía respecto a la madre que le gesta. El conocimiento del proceso que generan entre ambos de tolerancia inmunológica, ya había situado la gestación como una simbiosis de dos vidas en una interrelación precisa. El conocimiento de la función de las células troncales aporta

5 Cinalli RM, Rangan P, Lehmann R. «Germ Cells Are Forever». *Cell* 132, 559-562, 2008.

a la simbiosis materno-fetal el hecho del mutuo beneficio.

En efecto, la investigación ha puesto de manifiesto el *microquimerismo maternal*. Durante el embarazo pasan a la circulación materna células troncales (denominadas progenitoras celulares asociadas al embarazo, PAPC). Son células que expresan el marcador CD34+, que expresan en alta proporción genes de la pluripotencialidad (Oct-4, Nanog y Rex-1), y genes correspondientes a la diferenciación en varios tejidos, y, que, por tanto, poseen un amplio potencial de diferenciación. Tanto la sangre fetal como la placenta contienen varios tipos de células troncales que pueden darles origen; y pueden proceder también de las mesenquimales, MSC. Cuando pasan a la circulación de la madre persisten en nichos (tales como la médula ósea) durante decenios y colonizan una variedad de órganos maternos (piel, tiroides, corazón hígado, riñón, glándula suprarrenal, pulmón y bazo). Aunque inicialmente se asociaron a enfermedades autoinmunes, y posteriormente la atención se centró en su uso para el diagnóstico de posibles anomalías en el feto, hoy se sabe que participan en la reparación de tejidos de la madre. Esto es, más que disparar la enfermedad, estas células instan a combatirla: por su origen fetal tienen una gran capacidad proliferativa y más plasticidad que sus equivalentes, las adultas maternas⁶.

6 Cfr. entre otros los trabajos de Bianchi: Bianchi DW. «Fetomaternal cell trafficking: a story that begins with prenatal diagnosis and may end

Es una exigencia ética la divulgación de los conocimientos que enriquecen la comprensión racional de la vida humana incipiente, especialmente cuando la intervención tecnológica en esa etapa pueda quedar dominada por criterios pragmático-economicistas. Es un deber de la comunidad científica dar a conocer los avances en este campo.

3. La investigación con células troncales de adulto con fines terapéuticos

La investigación en la Medicina regenerativa busca conocer la capacidad de las células madre de adulto (AS) de autorrenovarse, proliferar o diferenciarse, con el objetivo de que puedan suplir a las células destruidas, o comunicarles los factores necesarios para una nueva génesis celular in vivo. Supone abrir una vía terapéutica para enfermedades degenerativas, y también su manipulación, permitir disponer de modelos animales o celulares de la enfermedad y, con todo ello, un reto al diseño de fármacos.

El principal esfuerzo, en orden al uso terapéutico de las células madre, ha pasado de la identificación del potencial de cada tipo celular al desarrollo de sistemas que aseguren su incorporación al tejido afectado. De ahí que se estén probando⁷

with stem cell therapy». *J Pediatr Surg.*, 42, 12-18, 2008. Khosrotehrani K, Johnson KL, Cha DH, Salomon RN, Bianchi DW. «Transfer of Fetal Cells with Multilineage Potential to Maternal Tissue». *JAMA*, 292, 75-80, 2008.

7 Mooney DJ, Vandenburgh H. «Cell Delivery Mechanisms for Tissue Repair». *Cell Stem Cell*, 2, 207-213, 2008.

sofisticadas manipulaciones, previas al trasplante, y el empleo de materiales para el transporte de las células y la utilidad clínica de estos procedimientos.

3.1. Las células troncales de adulto

En 1999, se describió la existencia de células neuronales capaces de transdiferenciarse a sanguíneas⁸. Desde entonces se han aislado células AS en todos los órganos y tejidos. La mayoría de las células AS⁹ son multipotenciales, capaces in vivo de regenerar su propio tejido, u otro. El organismo contiene diversos tipos de células troncales. Las células AS presentes en los tejidos son reservas de células mantenidas inmaduras y aisladas en la organización espacial de un nicho específico, en el que maduran¹⁰, al recibir señales inductivas concretas.

Algunas de las AS, presentes en la médula ósea, gozan de una gran plasticidad ya que poseen capacidad de adquirir in vivo el destino de tipos celulares distintos de los de su origen. Constituye una reserva general ya que contiene progenitoras,

multipotentes y un tipo de célula madre mesenquimal pluripotente, la MACP, capaz de madurar a los diversos tipos celulares del organismo¹¹. En proporciones mínimas estas células están presentes en el torrente circulatorio, y, obviamente, la sangre del recién nacido, que puede recogerse del cordón umbilical, contiene estas células en mayor proporción que en la sangre del adulto. Dos conocimientos acerca de estas células madre son clave en la terapia regenerativa. Uno de ellos, el hecho de que circulan y se quedan en tejidos, como cerebro y corazón, contribuyendo a su regeneración, y otro, que pueden ser movilizadas desde la médula ósea a fin de aumentar el número de las que circulan¹².

Otras células troncales, con carácter ampliamente multipotencial, se han encontrado en testículos de neonatal¹³ y adulto¹⁴, y en las muestras de líquido amniótico, recogidas para realizar el diagnóstico prenatal¹⁵. Recientemente se

8 Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. «Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo». *Science*, 283, 534-537, 1999.

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

10 Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. «Stem cells find their Niche». *Nature*, 414, 98-104, 2001. Scadden DT. «The stem-cell niche as an entity of action». *Nature*, 441, 1075-1078, 2006. Morrison SJ, Al C. «Spradling Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life», *Cell*, 132, 598-611, 2008.

11 Jiang Y *et al.* «Rare multipotential or pluripotent stem cells have also been isolated from cultured bone marrow cells». *Nature*, 418, 41-49, 2002.

12 Cfr. Cancelas JA, Williams DA. «Stem cell mobilization by beta2-agonists». *Nature Medicine*, 12, 278-279, 2006. Orkin SH, Zon L. «Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology». *Cell*, 132, 631-644, 2008. Laird DJ, von Andrian UH, Wagers AJ. «Stem Cell Trafficking in Tissue Development, Growth, and Disease». *Cell*, 132, 612-630, 2008.

13 Kanatsu-Shinohara M. *et al.* «Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis». *Cell*, 119, 1001-1012, 2004.

14 Guan K. *et al.* «Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis». *Nature*, 440, 1199-1203, 2006.

15 De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC,

han encontrado y aislado células AS en el intestino delgado y colon¹⁶, en los discos intervertebrales degenerados¹⁷ y en el endometrio¹⁸. De especial interés ha sido poder comprobar que el páncreas contiene células progenitoras específicas que se diferencian a las que forman los islotes¹⁹. Estas AS de los conductos pancreáticos expresan la Neurogenina 3 (Ngn3), el primer factor de transcripción específico de los islotes en el desarrollo embrionario.

3.2. Los órganos, y las lesiones degenerativas, son muy diversos

Es obvio que según sea el tejido a reparar y el tipo de lesión, el proceso

regenerativo será más o menos complejo. Hay tejidos, como la glándula mamaria²⁰ o el epitelio²¹, que se regeneran a partir de un solo tipo celular. Las AS del epitelio de la cornea son un buen ejemplo²². Hay procesos de diferenciación celular bien conocidos, como el de hematopoyesis, que permite autotransplantes de células en enfermedades de la sangre²³, como las leucemias²⁴.

Hay lesiones que se remedian transfiriendo, al lugar afectado, un tipo celular que aporta los materiales necesarios en el sitio adecuado, incluso en forma de una prótesis. Es el caso, por ejemplo, del uso de las AS autólogas de la médula ósea en necrosis óseas y en lesiones del cartílago articular; incorporadas en soportes adecuados sirven para tratar fracturas no consolidadas, o pseudoartrosis hipotrófica²⁵.

Snyder EY, Yoo1 JJ, Furth1 ME, Soker S, Atala A. «Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy». *Nature Biotechnology*, 25, 100-106, 2007.

16 Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Clevers PJH. «Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5». *Nature*, 449, 1003-1007, 2007.

17 Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT, Lee JY, Danielson KG, Vaccaro AR, Albert TJ, Gazit Z, Gazit D, Shapiro IM. «Evidence for Skeletal Progenitor Cells in the Degenerate Human Intervertebral Disc». *Spine*, 32, 2537-2544, 2007.

18 Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, Wang H, Ge W, Bogin V, Chan KW, Thébaud B, Riordan NH. «Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population». *Journal of Translational Medicine*, 5, 57, 2007.

19. Xu X, D'Hoker J, Stange G, Bonne S, De Leu N, Xiao X, Van De Castele M, Mellitzer G, Ling Z, Pipeleers D, Bouwens L, Scharfmann R, Gradwohl G, Heimberg H. «Beta Cells Can Be Generated from Endogenous Progenitors in Injured Adult Mouse Pancreas». *Cell*, 132, 197-207, 2008. Voltarelli JC, Couri CE, et al. «Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus». *JAMA*, 297, 1568-1576, 2007.

20 Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GS, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE. «Generation of a functional mammary gland from a single stem cell». *Nature*, 439 (5), 84-88, 2006.

21 Clayton E, Doupe DP, Klein AM, Winton DJ, Simons BD, Jones PH. «A single type of progenitor cell maintains normal epidermis 1». *Nature*, 446, 185-189, 2007

22 Li W, Hayashida Y, Chen YT, Tseng SCG. «Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus». *Cell Research*, 17, 26-36, 2007.

23 Bordignon C. «Stem-cell therapies for blood diseases». *Nature*, 441, 1100-1102, 2006.

24 Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. «Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells». *Nature Medicine*, 12, 1167-1174, 2006. Krause DS, Lazarides K, von Andrian UH, Van Etten RA. «Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells». *Nature Medicine*, 12, 1175-1180, 2006.

25 Cfr. *Diario Médico* 10/01/2007.

En modelos animales se ha comprobado que las células madre adultas procedentes de grasa humana son capaces de adquirir las funciones propias de las de la córnea, al regenerar el estroma de la cornea. Parece posible realizar una ingeniería celular en la que se pueda implantar directamente la prótesis con estas células²⁶.

El cerebro tiene múltiples sistemas de diferenciación específica y diversificada²⁷, lo que hace difícil cualquier tipo de reemplazamiento de neuronas. Más aún las neuronas que se alteran, y el mecanismo patológico, es diferente en las diversas enfermedades neurodegenerativas. Así, las neuronas motoras degeneran en la atrofia espinal muscular y en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA); en la enfermedad de Huntington mueren las neuronas espinales del estriado medio; en la enfermedad de Parkinson se pierden las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, mientras que el Alzheimer es un desorden neurodegenerativo global que afecta a poblaciones de neuronas corticales. Los abordajes terapéuticos requieren además tener en cuenta qué causa la destrucción celular en cada caso²⁸. Es decir, no basta

estimular la formación de neuronas y células de la glía endógenas, sino que hay al mismo tiempo que impedir la muerte celular; para ello se ensaya el trasplante de células madre manipuladas para expresar moléculas neuroprotectoras como el factor neural derivado de la glía (GDNF)²⁹.

En general, los tejidos requieren sus propias células precursoras para regenerar lesiones. Para regenerar la lesión del infarto de miocardio se han empleado precursores del propio enfermo, como los mioblastos, o células de la médula ósea que aportan factores esenciales para el desarrollo de cardiomiocitos. Recientemente se ha comprobado que el corazón no está diferenciado a término, sino que residen en él AS capaces de madurar a los diversos tipos celulares que constituyen el corazón³⁰. Ahora bien, no es fácil asegurar la funcionalidad cardiaca tras un infarto.

La distrofia muscular de Duchenne, a pesar de tener un origen genético, cuenta ya con modelo en perro en que ha dado resultado la infusión de mesoangioblastos corregidos con el gen que codifica la proteína muscular distrofina³¹. La implantación de células multipotentes derivadas

26 Arnalich-Montiel F, Pastor S, Blazquez-Martinez A, Fernandez-Delgado J, Nistal M, Alio JL, De Miguel MP. «Adipose-Derived Stem Cells are a Source for Cell Therapy of Theoretical Stroma». *Stem Cells*, 26, 570-579, 2008.

27 Muotri AR, Gage FH. «Generation of neuronal variability and complexity». *Nature*, 441, 1087-1093, 2006.

28 Taupin P. «Adult Neural Stem Cells, Neurogenic Niches, and Cellular Therapy». *Stem Cell Reviews*, 2, 213-219, 2006. Lindvall O, Kokaia Z. «Stem cells for the treatment of neurological disorders». *Nature*, 441, 1094-97, 2006.

29 Behrstock S. et al. «Human neural progenitors deliver glial cell line-derived neurotrophic factor to parkinsonian rodents and aged primates». *Gene Ther.*, 13, 379-388, 2006.

30 Segers VF, Lee RT. «Stem-cell therapy for cardiac disease». *Nature*, 451, 937-942, 2008

31 Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, et al. «Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs». *Nature*, 444, 574-579, 2006.

de la médula ósea (MAPC) en ratones con enfermedad vascular periférica consigue recuperar la isquemia de los miembros inferiores. Las AS son eficaces y contribuyen a aumentar la cantidad de arterias y venas que se generan regeneran el músculo como consecuencia de la liberación de una serie de factores³².

Incluso, de algunos órganos, como es el hígado, los mecanismos de su construcción durante el desarrollo embrionario difieren de los que posteriormente usa para su regeneración³³. El conocimiento de los mecanismos de regeneración de la nefrona está siendo crítico en el diseño de posibles intervenciones terapéuticas en la enfermedad renal. El riñón ha sido considerado un órgano de simple duplicación por división de células diferenciadas³⁴; no obstante, parece que la regeneración del epitelio de los túbulos renales es más que un mecanismo de reparación³⁵.

En la etapa inicial de la Terapia regenerativa es necesario aislar las células, activarlas *in vitro* y transferirlas de nue-

vo al órgano dañado; sin embargo, para el futuro próximo se trata de inducir y potenciar *in vivo*, la función que ya naturalmente poseen.

Un aspecto importante para la eficacia a largo plazo de la medicina regenerativa es conocer el envejecimiento de las células troncales. Se ha avanzado el conocimiento sobre cómo el nicho promueve el mantenimiento, regula la homeostasis y contribuyen al envejecimiento o a la transformación en célula troncal tumoral. Las células troncales tienen su proceso de envejecimiento³⁶. En estudios con células troncales hematopoyéticas (HSCs) de ratones mutados muestran que las HSCs tienen una «marca molecular», definida por un patrón distinto de expresión de genes que no parece mimetizar las características del envejecimiento normal. La conclusión general es que, con la edad, las células de adulto HSCs declinan en su función pero no en su número y que el daño del DNA y las modificaciones epigenéticas pueden limitar el potencial regenerativo de estas células. Ahora bien, desde el punto de vista de la Medicina regenerativa lo más importante es saber si el envejecimiento es reversible.

El conocimiento, muy parcial por ahora, de los procesos básicos no significa que la clínica actual con células troncales de adulto tenga que esperar para ir avanzando a que se haya entendido todo lo que ocurre *in vivo*. Significa que no se puede dejar atrás la investigación básica sobre el desarrollo y la construcción de los

32 Aranguren XL, McCue JD, Hendrickx B, Zhu XH, Du F, Chen E, Pelacho B, Peñuelas I, et al. «Multipotent adult progenitor cells sustain function of ischemic limbs in mice». *J. Clin. Invest.*, 118, 505-514, 2008.

33 Fürst G, Schulte am Esch J, Poll LW, Hosch SB, Fritz LB, Klein M, Godehardt E, Krieg A, et al. «Portal Vein Embolization and Autologous CD133+ Bone Marrow Stem Cells for Liver Regeneration: Initial Experience». *Radiology*, 243 (1), 171-179, 2007.

34 Little MH. «Tracing the Life of the Kidney Tubule—Re-Establishing Dogma and Redirecting the Options». *Cell Stem Cell*, 2 (3), 191-192, 2008.

35 Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, Mugford JW, Soeung S, Duffield JS, McMahon AP, Bonventre JV. «Intrinsic Epithelial Cells Repair the Kidney after Injury». *Cell Stem Cell*, 2, 284-291, 2008.

36 Brunet A, Rando TA. «From stem to stern». *Nature*, 449, 288-290, 2007.

órganos y los mecanismos para la regeneración del tejido. El avance es necesariamente lento, ya que requerirá conocer el proceso de maduración: las señales moleculares que lo ponen en marcha y las vías de señalización requeridas, etc.

La expectativa con que se recibieron las células troncales, y el hecho de que desde el inicio las células de adulto tuvieran que competir con las obtenidas de embriones humanos, como alternativas a la gran promesa de curación de graves enfermedades, ocasionó que la divulgación de los avances se viera presionada por una cierta prisa en que mostraran su eficacia. Ciertamente, mostrar que pueden funcionar en la regeneración de los tejidos, es no solo un derecho de la verdad sino una forma racional de mostrar que la medicina es esencialmente ayudar al buen funcionamiento de lo alterado, sin invasiones ni destrucciones. Pasado ese periodo es preciso el esfuerzo por rodear a esta investigación de la serenidad que toda investigación requiere. Es una exigencia ética de la investigación dar una información veraz a la sociedad y que pueda decidir con conocimiento los aspectos de la política científica que le atañen; entre otros que pueda incentivar o frenar la dedicación de recursos a un campo prometedor, al tiempo que se evite crear expectativas irreales ante determinadas enfermedades, al menos a corto plazo.

3.3. Los ensayos clínicos de transferencia celular

Estos nuevos tratamientos para enfermedades degenerativas, para las que en

la mayor parte de los casos no se dispone todavía de otros tratamientos efectivos, presuponen que, una vez satisfechas las fases preclínicas en el laboratorio, incluyendo el modelo animal, se ha de pasar a la comprobación de su eficacia en el hombre. Estos ensayos tienen que cumplir los requisitos de rigor en un campo nuevo.

Los ensayos e con células troncales en el hombre pueden encajar en la definición legal de ensayo clínico de un medicamento; en ese caso se requiere la evaluación experimental para poner de manifiesto sus efectos farmacodinámicos, establecer su eficacia para una indicación terapéutica, conocer sus reacciones adversas y establecer su seguridad. Y también esos ensayos tienen similitud y deben seguir las normativas sobre extracción y trasplante de órganos y tejidos humanos. Las células troncales de origen humano son tejido humano.

Pues bien, como toda investigación clínica debe estar sometida a los principios, reglas, límites y controles, marcados por el ordenamiento jurídico, con el fin de prevenir los riesgos que pueden comportar. Están implicados derechos humanos que no pueden ser conculcados: el derecho fundamental a la vida, el derecho a la integridad física y a que el trato no pueda ser inhumano, o degradante. Surge de ahí la obligación de respetar una serie de principios y condiciones básicas para la experimentación clínica: a) que no exista un método alternativo al experimento con seres humanos de eficacia comparable; b) que los riesgos no sean desproporcionados con respecto

a los beneficios potenciales; c) que el proyecto haya sido examinado de modo independiente; d) que la persona que se preste a un experimento esté informada de sus derechos y las garantías para su protección y haya otorgado el consentimiento libre, y pueda libremente retirarlo en cualquier momento.

Son pautas que se aplican normalmente en relación con los ensayos clínicos de medicamentos y de otros productos similares. Ahora bien, en este caso se presenta una peculiaridad: son productos biológicos, generalmente de origen humano, autólogo o heterólogo, manipulados in vitro y que requiere el avance de normativas referentes a su obtención, estándares terapéuticos, comercialización, etc.

Un principio informador de las investigaciones preclínicas con material humano es la no explotación económica de las estructuras biológicas en cuanto tales, y la protección de la información genética que contienen. Los procedimientos son de suyo patentables, pero no es igual la comercialización del material humano, especialmente el que procede de donación, como los óvulos, o los embriones. De hecho, la posibilidad de patentar células embrionarias humanas ha producido una de las situaciones más infrecuentes y cargadas en la historia de la ciencia, la ética y el derecho³⁷. No hay un acuerdo internacional que regule estas patentes.

37 Plomer A, Taymor KS, Scott CT. «Challenges to Human Embryonic Stem Cell Patents». *Cell Stem Cell*, 2, 13-17, 2008; Hayden ECh. «Stem-cell patents confirmed». *Nature*, 452,265, 2008.

Por otra parte, el hecho de que las células sean la pieza central de la Medicina regenerativa, tanto aisladas como en soportes sintéticos para ingeniería de tejidos, y que se vayan conociendo los mecanismos de autoregeneración de células troncales de adulto, ha puesto en marcha muchas compañías que ofrecen células más o menos «a la carta». Por ejemplo, entre otras, Cellerant Therapeutics de San Carlos, California, ha desarrollado progenitores mieloides para restaurar la médula ósea. Otras ofrecen preparación de células troncales del tejido adiposo para cartílago, neuronas, hueso o tejido muscular; para implantes dentales, piel, etc. Vet-Stem de Poway, California, para tratamientos de tendones y ligamentos de caballos desde células troncales de tejido adiposo. Venture en Radnor, Pennsylvania, aísla y cultiva las células progenitoras de la retina. Cooperan también varias pequeñas compañías, resultado de alianzas entre académicos y clínicos.

4. La tecnología de la inducción de pluripotencialidad a células maduras

La Terapia regenerativa centrada en el reemplazamiento de las células afectadas por la enfermedad, o la lesión, ha dado un giro debido a los acontecimientos científicos de finales del año 2007, que aportaron la posibilidad de «rejuvenecer» las células de adulto: la tecnología de reprogramación o desdiferenciación celular. La dificultad técnica y ética de conseguir células embrionarias con dotación genética elegida por transferencia nuclear a un óvulo (clonación) se ha superado con

la reciente creación de células madre con pluripotencialidad inducida (iPS).

De esta forma el papel que se pretendía para las células de tipo embrionario con dotación genética elegida, la tecnología de la transferencia nuclear a óvulos, pierde la relevancia que se le quería asignar. No obstante, perdura un cierto debate acerca de la conveniencia, o inconveniencia, de continuar con esta técnica de la transferencia nuclear, y con la obtención de líneas celulares embrionarias obtenidas de embriones humanos³⁸. Se discute de nuevo sobre el pago de los óvulos frescos donados para investigación³⁹, la creación de células híbridas mediante la transferencia de un núcleo de célula humana a un oocito animal; se discute si todavía se necesitan o no nuevas líneas embrionarias y si los embriones deben ser sobrantes de los ciclos de reproducción asistida, o generados ex profeso para biotecnologías.

En 2006 se supo que las células de adulto de ratón pueden ser inducidas a adquirir el estado embrionario pluripotencial⁴⁰, mediante la incorporación de los genes Oct4, Sox2, c-Myc, y Klf4. También las células humanas de la piel, con estos genes, o con los que codifican los factores OCT4, SOX2, NANOG, y LIN2; incluso sin

necesidad del gen Myc que puede operar como oncogén⁴¹. Varios laboratorios avanzan hacia el rejuvenecimiento de las células de otros tejidos⁴², mostrando que la integración de los genes no tiene un sitio específico en los diversos tipos celulares.

Se ha especulado sobre el posible uso terapéutico. Se conoce que la expresión de los factores Oct4, Sox2, c-Myc, y Klf4 es suficiente para conferir el estado pluripotencial, pero es preciso conocer si la reprogramación nuclear inducida por estos factores no borra globalmente las diferencias epigenéticas entre las células diferenciadas y las pluripotentes. Un estudio⁴³ de la inactivación del cromosoma X

38 Holden C, Cogel GA. «Seismic Shift for Stem Cell Research». *Science*, 319, 560-563, 2008.

39 Lyerly AD, Faden RR. «Willingness to Donate Frozen Embryos for Stem Cell Research». *Science*, 317, 46-47, 2007.

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

41 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. «Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells». *Nature*, 448, 313-317, 2007. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochizuki Y, Takizawa N, Yamanaka S. «Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts». *Nature Biotechnology*, 26, 101-106, 2008. Takahashi K. et al. «Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors». *Cell*, 131, 861-872, 2007. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. «Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells». *Science*, 318, 1917-1920, 2007.

42 Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi AA, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. «Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors». *Nature*, 451, 141-147, 2008. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. «Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells». *Science*, Epub ahead February 2008.

43 Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K.

ha puesto de manifiesto que estos factores inductores de reprogramación conducen a una reversión global del estado somático a estado embrionario. Estos resultados además de ofrecer un material para el estudio de las modificaciones epigenéticas que acompañan a la reprogramación nuclear, sugieren que la reprogramación inducida no sería un problema para un uso terapéutico de las células iPS. Pero ese no sería probablemente el único problema para un uso terapéutico.

Es éste un nuevo campo que nace con la presión de publicar los resultados rápidamente, con errores que los revisores no detectan por la misma prisa y lo novedoso del trabajo y también por la competencia entre las revistas⁴⁴. Se han señalado cinco cuestiones que deberían tenerse en cuenta «antes de subirse al carro»⁴⁵ de las iPS, si se quisieran emplear en terapia regenerativa. En primer lugar, aunque parezca una tecnología que pueda llevarla a cabo cualquiera, sin embargo, la eficacia real es baja: sólo una proporción, un 5%, de las células entran en estado pluripotencial. Por otra parte, puede pensarse que con ellas cada uno podría hacer sus propias células «a la carta», la utopía que fue la pretensión de la clonación terapéutica. Pero se requiere aún conocer mejor la expresión de los

genes de la pluripotencialidad y también avanzar en las técnicas de establecimiento de líneas celulares. No se puede pensar en un tratamiento individualizado con células procesadas para cada paciente, por tiempo y por costos. Habría que establecer líneas celulares inespecíficas, con un amplio perfil de compatibilidad inmunológica, útiles para una amplia población.

En tercer lugar, en algunos laboratorios (como el de Rudolf Jaenisch, en el Massachusetts Institute of Technology en Cambridge) se han empleado células progenitoras de la sangre, reprogramadas, para crear ratones como modelos de una anemia humana (Science 318, 1920-1923, 2007); se perfila la expectativa del uso clínico de estas células pluripotenciales. No obstante es lógico pensar que estas células reprogramadas hasta el estado embrionario pudieran tener los mismos problemas que impiden el uso terapéutico de las embrionarias. Es demasiado pronto para saberlo. Hay que tener en cuenta también si realmente las iPS son idénticas o no a las embrionarias. En principio, no lo son y podrían ser más «dóciles» a ser diferenciadas posteriormente, ya que tienen la dotación genética en el estado específico que corresponde a la célula de la que proceden.

Por último, Yamanaka señala que esta tecnología puede emplearse para otras aplicaciones con serios problemas éticos, como derivar ambos gametos, femenino y masculino, de iPS de un hombre y usarlos para una mutua fecundación in vitro. El resultado sería como un clon en tanto que los dos gametos serían de

«Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution». *Cell Stem Cell*, 1, 55-70, 2007.

44 «A reprogramming rush». Editorial de *Nature*, 452, 388, 2008.

45 Cfr. Cyranoski D.. «Stem cells: 5 things to know before jumping on the iPS bandwagon». *Nature*, 452, 2008.

una sólo persona, también podría proceder de la función de gametos formados de iPS de dos sujetos del mismo sexo. Cabe pensar que se pidieran gametos generados de iPS para tratamientos de infertilidad. Y que alguien intentara hacer quimera de dos seres humanos, mediante la incorporación de iPS de una persona a un blastocisto obtenido in vitro. Es evidente que toda técnica puede usarse en dos direcciones. Y es alentador desde el punto de vista ético y humano que precisamente el mismo científico que crea la tecnología se presente, consciente y preocupado, frente a otros usos que imprudentemente pudieran hacerse. Yamanaka siente la responsabilidad de haber generado esta tecnología y ha asumido, él mismo, la dirección ética del grupo regulador del gobierno de su país, Japon. El 21 de Febrero el ministro de Ciencia japonés envió a todas las universidades y centros de investigación una notificación que específicamente prohíbe «la implantación de embriones hechos con iPS en úteros humanos o de animales, la producción de un individuo a partir de iPS, la introducción de células iPS en un embrión o un feto y la producción de células germinales desde iPS».

5. Aplicación de la tecnología de inducción de pluripotencialidad a la investigación biomédica

—Estas células pluripotenciales, que pueden obtenerse de biopsias de diferentes tejidos, permiten hallar y validar vías terapéuticas, al poder estudiar los mecanismos de la enfermedad.

—Permiten probar sustancias que sean posibles fármacos⁴⁶, capaces de actuar de forma exógena al nicho de la célula AS, o de activarla de forma endógena. Más del 90 % de los fármacos ensayados no se aprueban para su uso en las fases clínicas, lo que encarece enormemente el proceso. Un factor clave es la falta de un sistema suficientemente eficaz para determinar y prever la toxicidad. Las células rejuvenecidas a pluripotenciales y procedentes de pacientes de una determinada enfermedad pueden usarse para probar la eficacia de fármacos, como modelos de la enfermedad y estudios de toxicidad⁴⁷.

Por ejemplo, se sabe que la autoregeneración de las células AS neurales (NSC) son la base celular de la neurogénesis; el nicho de las NSC incluye células vasculares y de la glía, que segregan factores de crecimiento como el vascular endotelial (VEGF) y el básico de fibroblastos (bFGF); ambos estimulan la proliferación de las NSC. La estimulación por VEGF se inhibe por ZM323881⁴⁸, un inhibidor específico de un receptor del factor VEGF. También, como señalamos más arriba (Bradford M., et al, 2008) los RNA de interferencia (iRNA) participan en la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario

46 Daley GQ, Scadden DT. «Prospects for Stem Cell-Based Therapy». *Cell*, 132, 544-548, 2008.

47 Rubin LL. «Stem Cells and Drug Discovery: The Beginning of a New Era?» *Cell*, 132 (4), 549-552, 2008.

48 Xiao Z, Kong Y, Yang S, Li M, Wen J, Li L. «Upregulation of Flk-1 by bFGF via the ERK pathway is essential for VEGF-mediated promotion of neural stem cell proliferation». *Cell Research*, 17, 73-79, 2007.

y están implicados en la regulación de la expresión de los genes de la pluripotencialidad; se están probando, como medio de control de la pluripotencialidad de las células madre. Este control es esencial, y se van identificando los factores de transcripción específicos y reguladores, como citoquinas y factores de crecimiento, y se trata de identificar los elementos intracelulares de las vías de señalización. Se buscan, por ejemplo, inhibidores de la tirosinofosfatasa plasmática Shp2⁴⁹, que dirige la autoregeneración de las células embrionarias promoviendo su diferenciación a través de la vía Erk-Stat3.

—Es posible que en el futuro pueda usarse en el caso de enfermedades causadas por mutación de un solo gen un reemplazamiento de las células afectadas

por células autólogas corregidas; se han realizados con éxito pruebas en animales⁵⁰; y por otra parte se ha conseguido introducir genes y que se expresen en líneas de células humanas pluripotenciales procedentes de embriones, que de suyo tienen capacidad de diferenciarse a los tipos celulares de las tres capas germinales⁵¹.

—Se han conseguido modelos animales para el estudio de enfermedades mediante la técnica de quimeras. Se produjeron líneas celulares de iPS procedentes de fibroblastos de un ratón mutante. Estas iPS se introdujeron en blastocistos de ratón normal y se comprobó que contribuyen a todos los tipos celulares incluidos los gametos. El cruce de este tipo de ratones dio una cepa derivada de iPS⁵².

Recibido: 25-03-2008

Aceptado: 04-04-2008

49 Feng GS «Shp2-mediated molecular signaling in control of embryonic stem cell self-renewal and differentiation». *Cell Research*, 17, 37-41, 2007.

50 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. «Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin». *Science*, 318, 1920-1923, 2007.

51 Thyagarajan B, Liu Y, Shin S, Lakshmipathy U, Scheyhing K, Xue H, Ellerström C, Strehl R, Hyllner J, Rao MS, Chesnut JD. «Creation of Engineered Human Embryonic Stem Cell Lines Using phiC31 Integrase». *Stem Cells*, 26 (1), 119-126, 2008 (Epub 2007, Oct.25).

52 Rossant J. «Stem Cells: the magic brew». *Nature*, 448, 260-262, 2007.