

Células madre: de dónde vienen, para qué sirven y a dónde van

Enrique Roche Collado

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Alicante

[Bol Pediatr Arag Rioj Sor, 2004;34: 79-87]

RESUMEN

Las células madre han supuesto una revolución en la Medicina Regenerativa por las posibilidades que ofrecen para la futura terapia de numerosas enfermedades, tales como las neurodegenerativas, lesiones osteo-articulares, afecciones cardiacas y diabetes. Estas células se pueden dividir en dos grandes grupos atendiendo a su origen. Las células madre embrionarias, que son extraídas de la masa interna del blastocisto, tienen una gran potencialidad ya que pueden dar lugar a los más de 200 tipos celulares presentes en el organismo. Las células madre adultas se extraen de tejidos diferenciados que conservan cierta capacidad de regeneración y por tanto una potencialidad más reducida hacia un cierto número de tipos celulares. La Bioingeniería celular intenta obtener in vitro tipos funcionales que puedan ser utilizados en protocolos de trasplantes. A finales de octubre de 2004 el Consejo de Ministros aprobó un Real Decreto que permitía la utilización de líneas celulares derivadas de embriones congelados por más de 5 años, previo consentimiento de los progenitores. La aprobación de este Decreto supone la entrada de España en el grupo de países que han apostado en firme por este tipo de investigaciones. Sólo el tiempo y el trabajo de calidad darán la respuesta.

PALABRAS CLAVE

Células madre, Medicina Regenerativa, clonación terapéutica, enfermedades degenerativas.

Stem cells: where do they come from, what are they used for and where are they going.

ABSTRACT

Stem cells have revolutionized the Regenerative Medicine field for the possibilities which they offer in the treatment of a number of diseases, such as neurodegenerative diseases, osteo-articular lesions, cardiac affections and diabetes. These cells can be segregated into two distinct groups depending on their origin. Embryonic stem cells are isolated from the inner cell mass of the blastocyst and possess a great potential for their capacity to differentiate to the more than 200 cell types which exist in the organism. Adult stem cells are extracted from differentiated tissues and possess the ability to regenerate the tissue it originates from, thus possess a more limited capacity of differentiation. The goal of Cell Bioengineering is to obtain in vitro functional cell types which may be used in transplantation protocols. At the end of October 2004, the Ministry Council approved a Royal Decree which allowed the use of cell lines derived from embryos which have been frozen for more than 5 years, prior compliance of the progenitors. The approval of this Decree supposes the entrance of Spain in the group of countries which have placed a firm trust on this type of investigation. Only time and high work quality will give us the answer.

KEY WORDS

Stem cells, Regenerative Medicine, therapeutic cloning, degenerative diseases.

Correspondencia: Enrique Roche Collado.

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, 03550-San Juan (Alicante). Teléfono: 96-591 9408.

Fax: 96-591 9546. e-mail: eroche@umh.es

Recibido en diciembre de 2004. Aceptado para su publicación en enero de 2005.

INTRODUCCIÓN

La Medicina está conociendo sin lugar a dudas una revolución gracias a la contribución de otras ciencias básicas y aplicadas que están abriendo nuevos caminos en el tratamiento de muchas patologías. Los recientes procedimientos para la preservación de órganos, junto con las nuevas técnicas en trasplante y regímenes inmunosupresores están conformando una nueva disciplina con un gran futuro: la Medicina Regenerativa. Todo ello, unido a la mejor infraestructura mundial en materia de donación, hace que España sea un país de referencia en este sentido. Sin embargo, el gran problema del trasplante es la escasez de órganos disponibles, lo que hace imposible cubrir todas las necesidades existentes por el momento. Por ello, es necesario encontrar fuentes alternativas de tejidos y en este sentido las células madre se presentan como sólidos candidatos.

Las células madre son células que poseen 2 propiedades muy interesantes para los propósitos de la Medicina Regenerativa ^(1, 2):

- a) Capacidad de autoproliferar, lo que permitirá obtener suficiente biomasa inicial sin ningún tipo de limitación.
- b) Capacidad para diferenciarse en tipos celulares concretos bajo determinadas condiciones o manipulaciones del cultivo.

También, las células madre tienen la capacidad de repoblar ciertos tejidos, lo que permitiría reparar determinadas lesiones si se pudieran estimular adecuadamente aquellas células residentes en el tejido dañado.

Todo esto presenta un panorama muy interesante y de una gran trascendencia tanto científica, como clínica. La presente revisión se va a centrar por lo tanto en presentar las características de estas células, sus posibilidades cara el futuro en la terapia de enfermedades degenerativas y la situación actual de España en materia de legislación referente a la utilización y experimentación con células madre.

CÉLULAS MADRE: ¿DE DÓNDE VIENEN?

Las células madre se clasifican en 2 grandes grupos de acuerdo con su procedencia: células madre embrionarias y células madre adultas. Las primeras se obtienen de la llamada masa celular interna del blastocisto, estructura que en el desarrollo humano aparece al día 6. Las segundas son células que se encuentran presentes en algunos tejidos del individuo adulto y por lo tanto son las responsables del recambio celular en dicho tejido, por ejemplo el epitelio intestinal ⁽³⁾, o de su reparación en casos de determinadas agresiones, sería el caso del hígado tras una hepatectomía ⁽⁴⁾.

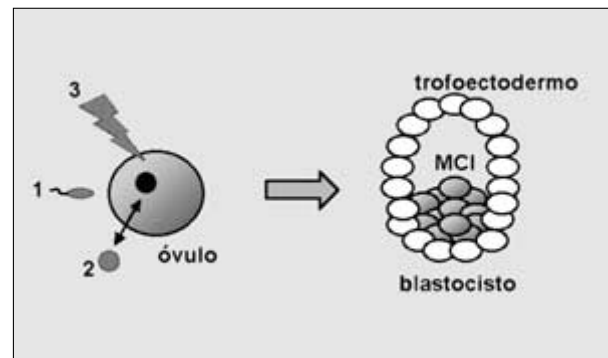


Figura 1. Diversos procedimientos para obtener líneas cultivadas de células madre. Las células madre derivan de la masa celular interna (MCI) del blastocisto. Esta MCI está rodeada por una capa de células que se denomina trofoectodermo. El blastocisto proviene de las divisiones sucesivas del cigoto, resultante de la unión de un óvulo y de un espermatozoide (1). Sin embargo el blastocisto puede obtenerse por otros procedimientos, como por ejemplo a partir de transferencia nuclear a nivel del óvulo (2) o mediante estimulación de su división de forma partenogenética (3).

Las células embrionarias son las que presentan mayor potencialidad o, dicho de otra forma, mayor capacidad para diferenciarse a linajes diferentes. De hecho durante el desarrollo, estas células darán lugar a los más de 200 tipos celulares presentes en el individuo adulto, incluida la línea germinal. Sin embargo, su potencialidad no es total, ya que de ellas no derivan ni la placenta ni los tejidos de sustentación en el útero, que se desarrollarán a partir del trofoectodermo, estructura también presente en el blastocisto y que rodea a la masa celular interna ⁽⁵⁾ (Figura 1).

Existe un tipo celular que alberga la mayor potencialidad, se trata del cigoto, la célula resultante de la fusión del óvulo y el espermatozoide en el momento de la fecundación ⁽⁶⁾. De este tipo celular derivan todas las células del adulto, así como la placenta y los tejidos de sustentación. Sin embargo el cigoto parece que comparte esa potencialidad con el núcleo de las células adultas. Los experimentos de transferencia nuclear a óvulos anucleados parecen confirmar que el núcleo de una célula diferenciada posee una capacidad de diferenciarse mayor que la que exhibe en el tipo celular en donde está ubicado. Efectivamente, el núcleo de una célula de una glándula mamaria de oveja transferido a un óvulo de oveja desprovisto de su núcleo llegó a generar un animal adulto que además era fértil: la oveja Dolly ⁽⁶⁾. Esta oveja era un clon de su progenitor; ya que compartían el mismo material genético. Estos experimentos levantaron un gran revuelo a nivel social y religioso, ya que por primera vez con esta tecnología se abría la posibilidad de generar seres humanos clónicos e incluso «bebés a la carta».

Al margen del debate y la polémica, este hallazgo suponía una auténtica revolución en los cimientos de la

Biología, ya que por primera vez se demostraba que el núcleo de una célula adulta guardaba la potencialidad de generar un ser vivo siempre que fuera transferido al entorno adecuado. Sin embargo, la otra cara de la noticia era que la probabilidad de que eso ocurriera era muy reducida (menos del 1%) ya que existen numerosos problemas técnicos que hacen que hoy en día la técnica completa de clonación no sea afortunadamente una realidad rutinaria en humanos ⁽⁷⁾. En este sentido, Dolly murió sacrificada ya que estaba aquejada de numerosas enfermedades cardiovasculares y osteoarticulares, demostrando que todavía quedan muchos puntos por resolver en este tema y que su aplicación en humanos carece de sentido.

Por otro lado, la transferencia nuclear podría tener una utilidad inmediata en la Bioingeniería de tejidos a partir de células madre embrionarias. El óvulo transferido podría desarrollarse *in vitro* hasta la fase de blastocisto y en ese momento podría aislarse la masa celular interna y generar líneas cultivadas de células madre. La gran ventaja de esto es que las líneas generadas compartirían la misma dotación genética que la del núcleo transferido. Esto permitiría la obtención de tejidos inmunocompatibles con el donante, haciendo por lo tanto innecesaria la administración de inmunosupresores en los protocolos de implantación ⁽⁸⁾.

Sin embargo, para generar blastocistos ni siquiera es necesario el concurso de un espermatozoide o de un núcleo transferido. Mediante diversas manipulaciones se pueden modular los patrones de calcio intracelulares e iniciar las rondas de divisiones celulares. En este caso se estaría hablando de un óvulo partenogenético, es decir, sin la colaboración del progenitor masculino. La partenogénesis es un acontecimiento relativamente normal en especies animales menos evolucionadas, siendo un evento muy raro en organismos superiores, ya que el óvulo resultante no sería viable. De todas formas, un óvulo partenogenético puede ser capaz de llegar a desarrollarse hasta la etapa de blastocisto y nuevamente sería posible aislar de allí la masa celular interna y derivar líneas cultivadas de células madre ⁽⁹⁾. Estas células serían inmunocompatibles con la donante del óvulo, lo que claramente indica que este hipotético caso, las mujeres serían las grandes beneficiadas. Además de que este tipo de manipulación demuestra que «los varones son prescindibles», permitiría realizar Bioingeniería celular sin necesidad de entrar en ningún tipo de debate ético.

Durante el desarrollo embrionario, el blastocisto va sufriendo notables cambios morfológicos y funcionales que van configurando las distintas etapas de la ontogénesis del embrión. Ya en la fase posterior de gástrula, comienzan a diferenciarse las 3 capas embrionarias de las que derivarán los órganos presentes en el adulto, a saber: ectodermo, mesodermo y endodermo ^(5, 10). De la capa

ectodérmica se obtendrán las células del sistema nervioso, los epitelios de las mucosas, el esmalte dental, los epitelios sensoriales y la epidermis con sus glándulas como las sudoríparas, sebáceas, mamarias, entre otros. Del mesodermo derivan el tejido adiposo, conjuntivo, hueso, cartílago, sangre, vasos sanguíneos, bazo y tejido muscular liso y estriado entre otros. Finalmente, de la capa del endodermo derivan los órganos del sistema digestivo y respiratorio.

A medida que van diferenciándose los órganos, el embrión va adquiriendo una estructura más compleja, pero más definida a su vez, dando lugar a lo que se conoce como feto. Los tejidos fetales también poseen células pluripotenciales que permiten la morfogénesis de los futuros órganos del adulto. En este estadio, los primordios gonadales del feto también albergan células madre que pueden ser aisladas y cultivadas *in vitro*, presentando una gran capacidad de diferenciarse a una gran variedad de tejidos ⁽¹¹⁾. En estadios más avanzados del desarrollo, el cordón umbilical también posee células madre que podrían tener una gran utilidad en trasplantes de médula ósea, aunque los científicos creen que estas células albergan una mayor plasticidad, haciéndolas un sistema muy interesante y que merece ser estudiado en el ámbito de la Medicina Regenerativa ⁽¹⁰⁾.

Finalmente, el individuo adulto también posee células madre en determinados tejidos y por esta razón se denominan células madre adultas. Tal y como ya se ha mencionado anteriormente, estas células se encuentran en tejidos que siguen disfrutando de una cierta capacidad regenerativa, como es el caso de la piel, el epitelio intestinal, el hígado y quizás el más estudiado de todos: la médula ósea ⁽¹⁰⁾. A diferencia de las embrionarias, las células madre adultas han perdido una gran parte de su potencialidad, es decir, están comprometidas en un linaje determinado y sólo darán lugar *in vivo* a tipos celulares determinados. Esto limita lógicamente su campo de utilización en Medicina Regenerativa, pero por otro lado presentan una enorme ventaja, ya que son inmunocompatibles con el huésped evitando los problemas del rechazo. Además, la utilización de estas células no plantea ningún problema desde un punto de vista ético.

Al margen de todo esto, quizás un hallazgo muy importante ha sido identificar células madre en determinados tejidos en los que los procesos de división son inexistentes una vez diferenciados, tales como cerebro o corazón ⁽¹²⁻¹⁴⁾. La existencia de estas células «durmientes» traía en «jaque» a la comunidad científica, ya que su aislamiento y cultivo *in vitro* ha resultado extremadamente difícil. Además, su descubrimiento ha abierto una nueva puerta a la Medicina Regenerativa, ya que se albergaría la posibilidad de poder aplicar protocolos para la estimulación de la división y diferenciación de estas células, permitiendo la repoblación de zonas dañadas en estos órganos tan vitales ⁽¹⁵⁾.

Sin embargo, la situación ideal desde un punto de vista científico sería la de poder manipular células madre adultas de tal forma que pudieran ser capaces de ampliar su repertorio de células finales diferenciadas. En otras palabras, la cuestión sería obtener otros linajes celulares de determinadas células madre adultas, además del linaje al que están comprometidas. Esto es lo que los científicos denominan transdiferenciación y ejemplos de ello han sido descritos en varias publicaciones en las que por ejemplo células de la médula ósea podían generar células nerviosas o cardíacas, además de los tipos celulares hacia los que estaban comprometidos ⁽¹⁶⁻²⁰⁾. Por otro lado, muchos de los resultados de estos estudios han sido puestos en «tela de juicio» por la insospechada capacidad fusogénica que presentan las células madre adultas, adquiriendo mediante este proceso el fenotipo del nicho de su nueva ubicación ⁽²¹⁻²⁶⁾. Entre estas 2 situaciones posibles, diferentes autores apuntan a diversas posibilidades que podrían explicar la gran variedad de resultados obtenidos ^(27, 28) (Figura 2).

En una primera instancia se podría hablar de procesos de desdiferenciación, es decir, que la célula madre al cambiar su nicho reciba otro tipo de señales que hagan que de alguna forma modifique su compromiso y sea capaz de generar nuevos tipos celulares. Otros autores apuntan que determinados nichos celulares, como la médula ósea,

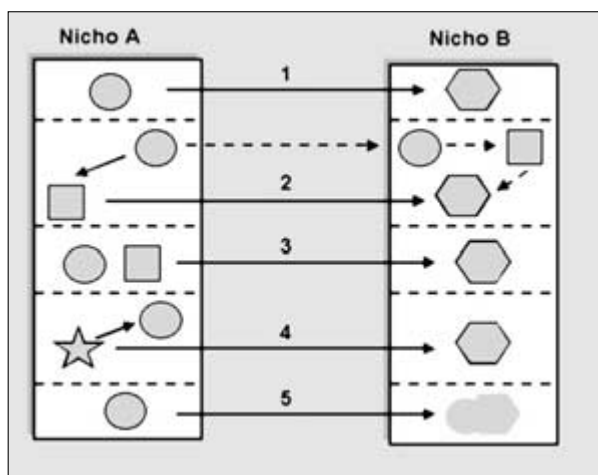


Figura 2. Opciones alternativas que explicarían la plasticidad de las células madre adultas. 1) Una célula madre adulta localizada en un nicho A, al cambiar al nicho B recibe señales de éste que inducen un cambio en su compromiso. 2) En el nicho A la célula sufre un proceso de desdiferenciación rindiendo una célula precursora de la célula presente en el nicho B. Alternativamente, el proceso de desdiferenciación puede producirse en B (líneas punteadas). 3) En el nicho A conviven varias células precursoras y una de ellas tiene la potencialidad de generar células en el nicho B. 4) En el nicho A existe una célula precursora única para las células presentes en el nicho A y en el nicho B. 5) La célula del nicho A puede fusionarse con células en el nicho B y adoptar su fenotipo.

albergan varios tipos de células madre, no sólo las que dan lugar a las células sanguíneas y a las mesenquimales, que derivarán posteriormente a hueso y cartílago, sino que coexisten con otras comprometidas a músculo o sistema nervioso por ejemplo. Sin embargo, otros plantean la situación opuesta indicando que la médula ósea alberga un tipo celular único, algo así como una célula madre adulta totipotencial, capaz de generar cualquier tipo celular presente en el organismo. Cualquiera que sea la situación, ninguno de los diseños experimentales ha logrado definir claramente los supuestos mecanismos que operan en los descritos procesos de transdiferenciación ⁽²⁹⁾. Aunque conceptualmente una amplia plasticidad por parte de las células madre adultas sería lo deseable, las evidencias por el momento siguen indicando que estas células siguen presentando una potencialidad muy limitada y una capacidad proliferativa muy reducida. Son necesarios por lo tanto más experimentos que permitan dilucidar e identificar los mecanismos implicados en los procesos de diferenciación con el fin de encontrar una utilidad en los protocolos de Medicina Regenerativa.

CÉLULAS MADRE: ¿PARA QUÉ SIRVEN?

Por lo expuesto anteriormente, la gran esperanza depositada por la Medicina en las células madre reside en su capacidad para generar «tejidos a la carta» con la esperanza de recuperar funciones perdidas en pacientes afectados por procesos degenerativos. La manipulación *in vitro* de este tipo de células para obtener los tipos deseados no es una tarea fácil. Las células madre adultas presentan en este sentido una mayor facilidad de manipulación si se desea obtener el tejido al que están comprometidas. Así, hoy en día es posible poder obtener piel *in vitro* o cartílago partiendo de las cultivos de las células madre adultas correspondientes ^(10, 30). La cuestión resulta más complicada cuando se trata de células madre embrionarias. En primer lugar los protocolos de diferenciación han sido desarrollados en modelos animales (ratón principalmente) y no toda la tecnología aplicada es susceptible de ser transferida a células madre humanas ⁽³¹⁾. En una segunda instancia, muchos protocolos han mostrado una gran heterogeneidad en los tipos celulares obtenidos, presentando incluso poblaciones remanentes de células indiferenciadas con capacidad de producir teratomas ^(32, 33). Finalmente y en tercer lugar, la mayoría de las líneas de células madre embrionarias presentan en cultivo procesos de diferenciación espontánea hacia linajes ectodérmicos, haciendo que con el tiempo el cultivo pierda su potencialidad ⁽³⁴⁾. Todo esto está indicando que estas células son todavía unas desconocidas y que la investigación básica con ellas es tanto o más necesaria que la investigación de sus posibles aplicaciones ⁽³⁵⁾.

A pesar de todo, los protocolos de diferenciación *in vitro* a partir de células madre embrionarias ya están empezando a definirse, siguiéndose una serie de pasos

que a día de hoy son claves en la Bioingeniería celular. Así, las células madre de ratón son mantenidas en medios de cultivo con alta concentración de glucosa y en presencia de una citokina de la familia de la interleukina-6 denominada LIF (Leukemia Inhibitory Factor)⁽³⁶⁾. La presencia de LIF mantiene el fenotipo desdiferenciado en estas células, permitiendo simplemente su proliferación mediante divisiones simétricas. Sin embargo, las células madre humanas parecen insensibles al LIF humano y para su cultivo es necesario crecerlas sobre capas de fibroblastos inactivados que secretan al medio factores que mantienen la pluripotencialidad de dichas células⁽³⁷⁾.

Para iniciarse los procesos de diferenciación es necesario que las células que están inicialmente creciendo en colonias adheridas a la placa de cultivo formen agregados celulares al ser transferidas a placas bacteriológicas no adherentes. Bajo estas circunstancias, estos agregados denominados cuerpos embrionarios disparan los programas de diferenciación obteniéndose células que expresan marcadores de las 3 capas embrionarias^(38,39) (Figura 3). Los determinantes que inician estos procesos son desconocidos por el momento, pero se piensa que los gradientes en nutrientes y oxígeno establecidos entre el interior y el exterior del cuerpo embrionario, así como las interacciones célula-célula son claves en este sentido⁽⁴⁰⁾.

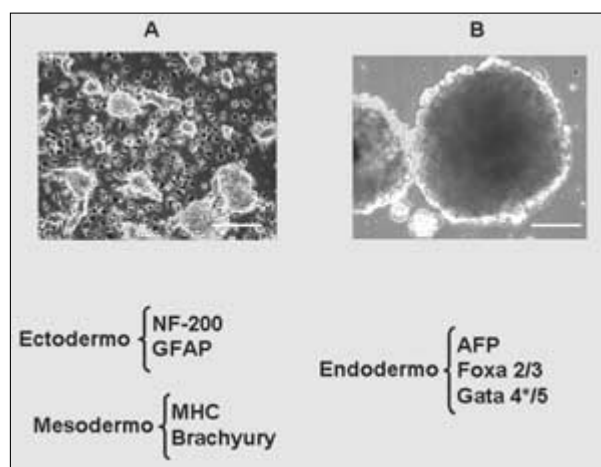


Figura 3. Aspecto de células madre embrionarias RI de ratón en cultivo en monocapa en presencia de LIF (A) y de cuerpos embrionarios derivados de ellas (B). Las células madre embrionarias crecen adheridas a la superficie de la placa formando colonias. En la micrografía puede observarse cómo células que se desprenden de las colonias van adquiriendo una morfología típica de ectodermo. Los procesos de diferenciación se disparan al pasar las células a placas no adherentes y formarse agregados celulares denominados cuerpos embrionarios. En la parte inferior puede observarse un listado de genes marcadores de las 3 capas embrionarias detectados por técnicas de RT-PCR. Gata 4 es también un marcador de mesodermo. Abreviaturas: AFP: alfa-fetoproteína, GFAP: proteína fibrilar ácida de la glía, MHC: cadena pesada de la miosina, NF-200: neurofilamento-200. Las micrografías de transmisión fueron tomadas con un objetivo de 20X.

Una vez pasada la fase de cuerpo embrionario se pueden utilizar diversas estrategias para obtener tipos celulares concretos. Éstas son las siguientes:

- Trampas celulares.
- Métodos coaxiales.
- Métodos direccionales.

Los protocolos existentes hoy en día no se basan en uno solo de estos métodos, sino que utilizan una combinación de varios. Las trampas celulares se basan en transfectar a las células con una construcción que confiere a las células que la expresan una ventaja frente a las restantes. La construcción posee un promotor específico del tipo celular deseado dirigiendo la expresión de un gen de selección como por ejemplo resistencia a un antibiótico o la proteína fluorescente verde. Esta estrategia permite aislar las células que expresan el gen de interés, y el constructo al mismo tiempo, frente al resto de los tipos celulares que son eliminados al añadir el antibiótico al medio de cultivo o son seleccionados en función de la fluorescencia. Las trampas celulares requieren utilizar promotores específicos, ya que de lo contrario se pueden obtener tipos celulares no deseados⁽⁴¹⁾.

Los métodos coaxiales se basan en diseñar medios de cultivo particulares que poseen factores adecuados capaces de inducir procesos de diferenciación hacia tipos celulares concretos⁽⁴²⁾. El problema de estas estrategias es encontrar medios «a la carta» lo suficientemente específicos como para derivar un linaje determinado, misión que no es nada fácil dentro de la gran cantidad existente de factores de crecimiento. En este sentido no sólo hay que considerar la concentración final del factor, sino el momento de la adición al medio de cultivo, el tiempo de exposición de la célula a dicho factor y los efectos sinérgicos en combinación con los restantes factores del medio^(33,43). Con todo esto, los medios diseñados no han permitido todavía el aislamiento de poblaciones celulares puras, por lo que es necesario seguir investigando en este sentido.

Finalmente, los métodos direccionales consisten en inducir de forma constitutiva la expresión de una proteína clave en el proceso de diferenciación de un linaje celular concreto. Por lo general suele ser un factor de transcripción que juega un papel clave in vivo durante el desarrollo embrionario^(10, 44-48). Sin embargo, la existencia de este tipo de proteínas no es evidente en algunas rutas de diferenciación, siendo más bien la combinación de varios factores a distintos niveles los que dirigen el proceso diferenciador en un linaje concreto.

La aplicación de estos sistemas ha generado resultados variables en distintos protocolos de lo que se deduce que todavía hay que seguir diseñando nuevas estrategias para poder obtener tipos celulares precisos. Sin embargo, las células madres abren otras posibilidades adi-

cionales a la generación de tejidos «a la carta». Por ejemplo, las células madre representan un sistema experimental único para poder investigar patrones de expresión génica que ocurren durante el desarrollo, o bien otro tipo de procesos que la Ciencia no ha podido abordar *in vivo*. Las células madre permitirían además probar el efecto de determinadas drogas y/o fármacos sobre células embrionarias, sentando las bases para diseñar sistemas fiables de embriotoxicidad, que a día de hoy no existen. Finalmente, se han acumulado evidencias que apuntan a que determinados tipos de cáncer en ciertos tejidos son debidos a un crecimiento de células madre adultas residentes en el tejido en cuestión.

Por lo tanto, las células madre podrían abrir nuevas posibilidades de investigación no sólo en Bioingeniería de tejidos, sino en otros muchos campos que también se beneficiarían a su vez. Por ello es necesario seguir investigando en este campo para poder sacar el máximo partido dentro de este interesante campo de la investigación biomédica.

CÉLULAS MADRE: ¿A DÓNDE VAN?

El futuro aunque se plantea prometedor no deja de ser incierto. Por un lado están las enormes expectativas despertadas en la terapia de determinadas patologías, por otro está la gran cantidad de trabajo que queda por realizar tanto a nivel básico, como a nivel aplicado. Resulta evidente que la Bioingeniería de tejidos es uno de los retos futuros que tendrán que afrontar los científicos con las células madre. La obtención de tejidos «a la carta» es el desafío, pero no el único. La implantación del tejido obtenido *in vitro* en un organismo adulto y el control de su funcionamiento serán también obstáculos que deberán tenerse en cuenta.

El paso de la placa de cultivo al organismo no es evidente y por ello no puede abordarse en primera instancia. Ensayos preliminares en modelos animales experimentales se van a hacer necesarios. Sin embargo, la cuestión no es fácil, por un lado la fisiología del animal difiere de la humana y muchas aproximaciones en el modelo no podrán extrapolarse al hombre en su integridad. Por otro lado, los modelos animales para algunas enfermedades son todavía muy incompletos sin llegar a reproducir en su totalidad todas las características de la patología^(49, 50).

Otro punto a considerar será la cuestión del rechazo inmunitario. Sólo las células madre adultas plantean un riesgo cero en este sentido, siempre que el donante y el receptor sean la misma persona. En cualquiera de los restantes supuestos, la inmunosupresión será necesaria. Éste es un campo de investigación muy activo y no es de extrañar que en el futuro nuevas moléculas inmunosupresoras aparezcan en el mercado. También se habla de la posibilidad de generar un cierto «quimerismo» al nivel

del sistema inmunitario. En este sentido, se ha observado que las células madre implantadas en animales experimentales pueden de alguna forma alcanzar la médula ósea y allí, por fenómenos desconocidos generar células inmunitarias que permitirían la aceptación del implante por parte del organismo receptor^(51, 52). La transferencia nuclear también permitiría generar tejidos sin problemas de rechazo. En cualquier caso, la inmunosupresión va a ser uno de los «caballos de batalla» en la futura Medicina Regenerativa⁽⁵³⁾.

Otra cuestión a considerar será la referente a la zona de implantación del material generado. En algunos casos la implantación se hará directamente sobre la lesión y se requerirán técnicas quirúrgicas más o menos avanzadas para ello. Ése sería el caso de las patologías neurodegenerativas, las afecciones cardíacas o las lesiones osteoarticulares⁽⁵⁴⁾. En otros casos, el implante se podrá realizar en zonas alejadas del lugar de la afección, como sería el caso de la diabetes, en la que se ha demostrado por protocolos de trasplante de islotes a partir de donantes cadavéricos que la inyección en vena porta e implantación en hígado es factible⁽⁵⁵⁾. En estos últimos casos habrá que buscar los lugares más idóneos para que el implante pueda ejercer su función y restablecer la función perdida en el organismo.

Muy importante será también controlar la supervivencia del implante. Si las células transplantadas mueren por procesos necróticos o apoptóticos, se producirá una pérdida de la funcionalidad y la aparición de nuevo de la patología. En estas circunstancias, habrá que considerar que el lugar de implantación esté bien irrigado y que exista un aporte adecuado de nutrientes y oxígeno. Alternativamente, se podrían dotar a las células de mecanismos antinecróticos o antiapoptóticos que optimizarán la supervivencia del material transplantado.

Otro riesgo con el que hay que contar es con la formación de tumores del tipo teratoma por parte de las células transplantadas. Desde hace bastante tiempo, se sabe que las células madre embrionarias tienen la capacidad de generar teratomas en ratones inmunodeprimidos⁽¹⁰⁾. Este riesgo existiría en potencia en terapias derivadas de ellas y por ello sería importante contar con mecanismos de bioseguridad. Las células pueden ser transfectadas con el gen que codifica la enzima timidina quinasa del Herpes. Esta enzima puede fosforilar análogos de nucleósidos (acidovir, ganciclovir), que no son sustratos habituales de la quinasa eucariótica. La incorporación de estos análogos al ADN en fase de replicación inhibe la ADN-polimerasa y activa la muerte de la célula que está en división⁽⁵⁶⁾.

Finalmente hay que considerar la existencia de procesos de diferenciación *in vivo*. Es muy probable que las células obtenidas *in vitro* tengan un grado de diferencia-

ción incompleto y que pudieran culminar dicho proceso una vez implantadas en un lugar adecuado. Al menos este fenómeno ha sido observado en modelos animales y podría ser tenido en cuenta en protocolos aplicados en humanos⁽⁵⁷⁾.

Sin embargo, para todo esto es necesario crear un marco legal que permita desarrollar este tipo de investigaciones y favorezca la interacción entre los diversos grupos implicados. En este sentido, el pasado 29 de octubre el Consejo de Ministros aprobó el Real Decreto que regula en España la investigación con células madre obtenidas de embriones humanos, ya que las células adultas no plantean tantos problemas éticos. Se puede decir que dicho Decreto supone el punto final de un largo proceso que permitirá definitivamente las investigaciones con células embrionarias dentro de un marco legal razonable. Además, el Decreto supondrá el punto de partida para la nueva Ley de Investigación Biomédica, prevista para 2005, que legislará aspectos tan importantes como la aplicación de tecnología de transferencia nuclear o la posibilidad de generar *in vitro* embriones con determinadas características, de los que se pudieran aprovechar las células madre de cordón umbilical para tratar con ellas enfermedades de familiares cercanos.

De todas formas, la aprobación del Real Decreto sólo quiere decir que ya se puede investigar, pero no que las enfermedades ya estén curadas, cosa que llegará, es de esperar, de la investigación de calidad. Siendo realistas, la obtención de órganos enteros que puedan recuperar una función perdida en el organismo se antoja como un objetivo difícil y a largo plazo. Por el momento es más prudente pensar que la obtención de tipos celulares concretos que realicen una misión determinada podría ser un objetivo más realista a medio plazo.

Una parte clave de este Decreto, tal y como ya se ha comentado, es la que hace referencia a los tipos celulares con los que se puede investigar. Así, se podrá investigar con líneas celulares derivadas de embriones humanos congelados por más de 5 años y sobrantes de los protocolos de reproducción asistida, contando con el consentimiento de los progenitores que decidirán entre su destrucción o a qué proyecto científico donan el embrión. Los progenitores deberán además declinar todos sus derechos, es decir no podrán percibir ningún tipo de compensación por los beneficios que derivaran de los resultados del proyecto.

Otro aspecto importante hace referencia a la articulación de los diferentes proyectos que van a derivar para que su funcionamiento y generación de resultados sean lo más adecuados posible. Para ello, los proyectos de investigación deberán estar perfectamente controlados indicando los nombres de todos los científicos implicados, los objetivos a alcanzar y la tecnología a utilizar. Se deberá

indicar el origen de las células a utilizar, humanas y/o animales, y qué experimentos se van a realizar con cada una de ellas. La investigación se va a articular dentro de una Red Nacional de Centros, sistema que ya funciona en otros países. La idea sería unificar esfuerzos, rentabilizar fondos e infraestructuras y no repetir líneas de trabajo. La futura Red estaría coordinada por el Instituto de Salud Carlos III y contaría ya con la participación de algunas Comunidades Autónomas: Cataluña, Andalucía y muy probablemente Valencia. Entre las líneas de trabajo se piensa en desarrollar tanto proyectos básicos para conocer mejor la biología de las células madre, como aplicados para intentar desarrollar protocolos de Medicina Regenerativa para algunas patologías concretas. Los resultados obtenidos en los estudios básicos son esenciales para poder avanzar en cuestiones más aplicadas. Además será muy importante llevar investigaciones paralelas con células madre adultas, que complementarían además los resultados obtenidos con las embrionarias.

En una primera instancia y para que la maquinaria funcione, lo más inmediato será generar líneas celulares que puedan ser utilizadas por la comunidad científica. Para ello habrá que descongelar algunos embriones que cumplan los requisitos antes señalados. Por la experiencia acumulada, se estima que un número de 20 embriones sería una cifra razonable para obtener una línea celular, teniendo en cuenta que las estadísticas oficiales señalan la existencia de unos 80.000 embriones congelados disponibles. Hay que señalar que no todos los embriones serían viables y en caso de serlo, las líneas generadas no ofrecerían las características mínimas para una investigación fiable. Sin embargo, una vez establecida una línea celular de calidad se podrá disponer de millones de células. Para ello, será necesario crear bancos de células y registros que controlen, entre otros, el laboratorio destinatario de la línea celular, el proyecto a realizar y los resultados obtenidos al finalizar el mismo. Los bancos, además de generar sus propias líneas celulares, podrán intercambiarlas y comparlas con otras provenientes de otros países.

Quedarán sobre la mesa temas tales como la transferencia nuclear o la posibilidad de generar embriones que puedan servir de donantes a familiares cercanos afectados de alguna enfermedad o incluso de seleccionar embriones libres de taras heredables de sus progenitores. Es de esperar que todos estos puntos queden contemplados en la futura Ley de Investigación Biomédica que verá la luz en 2005. El Decreto es tan sólo el primer paso para esta ley, a la vez que es el marco legal para dar una respuesta a los millones de enfermos de múltiples patologías, indicando de una forma fiable y profesional qué esperanzas pueden albergar en estas investigaciones. Por el momento, los resultados obtenidos con células madre adultas dan un margen razonable a la esperanza, por lo que no habría que pensar lo contrario con las embrionarias.

En resumen, desde noviembre de 2004, España ya forma parte del grupo de países que permiten de forma legal el uso de embriones humanos para investigación científica, entre los que se encuentran Australia, Bélgica, China, Corea del Sur, Finlandia, Francia, Grecia, Holanda, Israel, Reino Unido, Singapur y Suecia. Casos particulares son Alemania, que permite la investigación con líneas importadas, y Estados Unidos, que sólo la permite si es financiada con fondos privados.

Con todo lo expuesto, se puede decir que ya existe un marco legal para lanzar las líneas de trabajo, ahora es el momento de que los investigadores comiencen a trabajar; ya que sólo el trabajo en un entorno adecuado permitirá dar respuesta a los millones de afectados de incurables enfermedades. Si las células madre son el principio del fin de algunas patologías sólo lo dirá el tiempo y la investigación bien hecha.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5709-5712.
2. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19: 193-204.
3. Podolsky DK. Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. *Am J Physiol* 1993; 264: G179-G186.
4. Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J* 1996; 10: 1249-1256.
5. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B. *Citología e Histología Vegetal y Animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales*. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill; 1994.
6. Campbell KHS, McWhir J, Richie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 389: 64-66.
7. Cibelli JB, Campbell KH, Seidel GE, West MD, Lanza RP. The health profile of cloned animals. *Nat Biotech* 2002; 20: 13-14.
8. Lanza RP, Chung HY, Yoo JJ et al. Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation. *Nat Biotech* 2002; 20: 689-696.
9. Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB et al. Parthenogenetic stem cells in non-human primates. *Science* 2002; 295: 819.
10. Lanza RP, Blau H, Gearhart J et al. *Handbook of Stem Cells*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2004.
11. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13726-13731.
12. Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF. Purification of a pluripotent neuronal stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 2001; 412: 736-739.
13. Muggli P, Lee S, Katsouleas T et al. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 2001; 411: 42-43.
14. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2003; 92: 139-150.
15. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157-168.
16. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
17. Brazelton TR, Rossi FMV, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-1779.
18. Mezey É, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1779-1782.
19. Alison MR, Poulosom R, Jeffery R et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257.
20. De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymakers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 2003; 160: 807-809.
21. Terada N, Hamazaki T, Oka M et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542-545.
22. Ying Q-L, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416: 545-548.
23. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256-2259.
24. Castro RF, Jackson KA, Goodell MA, Robertson CS, Liu H, Shine HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neuronal cells in vivo. *Science* 2002; 297: 1299.
25. Wang X, Willenbring H, Akkari Y et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901.
26. Vassilopoulos G, Wang P-R, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904.
27. Holden C, Vogel G. Plasticity: Time for a reappraisal? *Science* 2002; 296: 2126-2129.
28. Wells WA. Is transdifferentiation in trouble? *J Cell Biol* 2002; 157: 15-18.
29. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116: 639-648.
30. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Marrow and Joint Surg* 1998; 80: 1745-1757.

31. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 435-462.
32. Pesce M, Schöler HR. Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 2001; 19: 271-278.
33. Soria B. In-vitro differentiation of pancreatic b-cells. *Differentiation* 2001; 68: 205-219.
34. Ying Q-L, Stravridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotech* 2003; 21: 183-186.
35. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease of life. *Cell* 2000; 100: 143-155.
36. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374: 1-20.
37. Richards M, Fong C-Y, Chan W-K, Wong P-C, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotech* 2002; 20: 933-936.
38. Turksen K. Embryonic stem-cells. *Methods and Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2002.
39. Smith AG. Culture and differentiation of embryonic stem cells. *J Tissue Culture Methods* 1991; 13: 89-94.
40. Roche E, Sepulcre MP, Enseñat-Waser R, Maestre I, Reig JA, Soria B. Bio-engineering insulin-secreting cells from embryonic stem cells: a review of progress. *Med Biol Eng Comp* 2003; 41: 384-391.
41. Roche E, Burcin MM, Esser S, Rüdiger M, Soria B. The use of gating technology in bioengineering insulin-secreting cells from embryonic stem cells. *Cytotechnology* 2003; 41: 145-151.
42. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11307-11312.
43. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004; 116: 769-778.
44. Gradwohl G, Dierich A, LeMur M, Guillemot F. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1607-1611.
45. Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 2003; 423: 255-260.
46. Reya T, Duncan AW, Ailles L et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003; 423: 409-414.
47. Merrill BJ, Gat U, DasGupta R, Fuchs E. Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes and Development* 2001; 15: 1688-1705.
48. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000; 102: 777-786.
49. Roep BO, Atkinson M. Animal models have little to teach us about type 1 diabetes: I. In support of this proposal. *Diabetologia* 2004; 47: 1650-1656.
50. Leiter EH, von Herrath M. Animal models have little to teach us about type 1 diabetes: I. In opposition of this proposal. *Diabetologia* 2004; 47: 1657-1660.
51. Drukker M, Katz G, Urbach A et al. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 9864-9869.
52. Drukker M, Benvenisty N. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 136-141.
53. Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med* 2003; 349: 275-286.
54. Klug MG, Soonpa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; 98: 216-224.
55. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a corticoid-free immunosuppressive regime. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238.
56. Culver KW, Blaese RM. Gene therapy for cancer. *Trends in Genet* 1994; 10: 174-178.
57. León-Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, Soria B. In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia* 2004; 47: 1442-1451.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por la Conselleria de Cultura, Educació i Esport de la Generalitat Valenciana (GV04B/666).