Globethics Repository



¿Resucitan al inicio del 2009 las células troncales procedentes de embriones? [Does 2009 mark a revival of embryonic Stem cells?]

This page was generated automatically upon download from the Globethics Repository. More information on Globethics see https://www.globethics.net. Data and content policy of Globethics Repository see https://repository.globethics.net/pages/policy.

Item Type	Article
Authors	López Moratalla, Natalia
Publisher	Asociación Española de Bioética y Ética Médica
Rights	Creative Commons Copyright (CC 2.5)
Download date	2026-11-20 01:10:29
Link to Item	http://hdl.handle.net/20.500.12424/203553

¿*RESUCITAN* AL INICIO DEL 2009 LAS CÉLULAS TRONCALES PROCEDENTES DE EMBRIONES?

DOES 2009 MARK A REVIVAL OF EMBRYONIC STEM CELLS?

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

Resumen

La posibilidad legal en USA, desde marzo de 2009, de usar fondos federales para la investigación que crea y destruye embriones, no está relacionada con la Terapia Regenerativa sino con el interés de creación de bancos de células humanas. Sólo unos pocos científicos, involucrados en las empresas de biotecnología, y en íntimo consorcio con los centros de reproducción asistida, siguen potenciando la vía de conseguir embriones humanos *ad hoc* para generar materiales de investigación biomédica. Por otra parte, existe un sentir bastante general de la necesidad de usar las líneas celulares derivadas de embriones, e incluso de crear otras nuevas, para validar las células pluripotenciales reprogramadas desde células somáticas, sin destrucción de embriones ni uso de óvulos. Estas células conocidas como iPS (células troncales con pluripotencialidad inducida) son de gran valor en la investigación biomédica y se plantea un posible uso en Terapia Celular en un futuro cercano. Se analizan los datos de la literatura de los últimos meses sobre el conocimiento alcanzado acerca de las células troncal de adulto y su reprogramación a pluripotenciales y se pone de manifiesto las alternativas racionales a la evaluación de las iPS con células procedentes de embriones.

Palabras clave: reprogramación, células troncales embrionarias, células con pluripotencialidad inducida, terapia celular.

Abstract

The legal possibility of using federal funds to work with embryonic cells and destroy embryos started on March 2009 in the USA. It has nothing to do with regenerative therapies. It is directed to create banks with human cells, banks directed by a few scientists involved in biotechnology enterprises connected with centers of in vitro reproduction. They pursue the use of *ad hoc* human embryos for biomedical research. The idea of using cell lines derived from embryos is quite spread, and even the idea of obtaining new lines of this type to validate reprogrammed somatic pluripotential cells, the so called iPS cell (induced pluripotent stem), without destroying embryos or using ovules. This type of cells is indeed of great value in medical research and it is opening new possibilities in Cell Therapy. Recent data are analyzed and considerations are advanced encouraging rational alternatives to eliminate embryonic cells in the evaluation of iPS cells.

Key words: reprogramming, embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, cell therapy.

1. El contexto de la Terapia Celular Regenerativa en el año 2009

En marzo de 2009, el presidente Barack Obama[1] da la orden de levantar la prohibición (enmienda Dickey–Wicker de 1996) de usar fondos federales para la investigación que crea y destruye embriones. El 9 de agosto de 2001 el Presidente George W. Bush había limitado el empleo de fondos federales por parte de los NIH (National Institutes of Health) a la investigación que se realizara solamente con las líneas celulares derivadas de embriones humanos existentes hasta entonces.

Esta orden del Presidente de USA ocurre un año después de que las células de adulto *rejuvenecidas* marcaron una nueva era a la investigación en Terapia Regenerativa o Celular.

El pasado 23 de enero, después de una previa negativa rotunda, la FDA (Food and Drug Administration) otorgó permiso a la empresa Geron Corporation, situada en Menlo Park de California, para un restringido y muy imperfecto ensayo en fase I en el que se usarán células derivadas de embriones para lesiones de la médula espinal[2]. A unas diez personas con parálisis se les inyectará, en el plazo de una o dos semanas después de ocurrir la lesión, precursores de los oligodendrocitos, células clave para la maduración y funcionamiento del sistema nervioso.

1 Cfr. Entre otros comentarios: «Embrionic education». Editorial de *Nature* del 26 March 2009, vol 458, pág. 385; Holden, C. (2009) «CIRM close-hauled, seeks bonds to sustain headway» and «Most state stem cell efforts staying afloat» *Science* 323, 1660-1661.

2 Wadman, M. (2009) «Stem cells ready for prime time» *Nature* 457, 516.

Las pruebas previas en animales han sido sólo moderadamente positivas para esa lesión y Thomas B. Okarma, ejecutivo de Geron, afirma que el propósito de este primer ensayo es validar la seguridad del procedimiento, no comprobar su eficacia. Entre otras cuestiones han usado en los animales una concentración de millones de células y no se conoce la dosis adecuada para personas. En un comentario, publicado el 5 de marzo en Nature[3], se pone de manifiesto la falta de prudencia de comenzar este ensayo. Dos compañías más Advanced Cell Technology (ACT) de Los Angeles, California y Novocell de San Diego trabajan en la preparación de células derivadas de las embrionarias.

Las declaraciones acerca del interés de la acción de Barack Obama (más allá de las implicaciones políticas que puedan tener) ponen de manifiesto dos cuestiones. En primer lugar, la existencia de unos pocos científicos involucrados en las empresas de biotecnología y en intimo consorcio con los centros de reproducción asistida que siguen potenciando la vía de crear embriones humanos *ad hoc* para usarlos como material terapéutico y de investigación. Su interés por crear más líneas celulares y proseguir la investigación con células troncales embrionarias tiene, en cierto sentido, poco que ver con la ya clásica Terapia Celular Regenerativa, basada en la sustitución de las células dañadas por la enfermedad, o por lesiones. Se sitúa, mas bien, en el maridaje de conveniencia realizado entre el lobby del uso de embriones humanos como material biológico y la tecnología de fecundación artificial, no estrictamente procreativa, que genera los embriones.

En segundo lugar, la existencia de un sentir más común de que —con independencia de que los fondos federales puedan usarse legalmente para derivar nuevas líneas desde embriones humanos— se podrían éticamente crear nuevas líneas de modo «temporal y limitado», en cuanto sean necesarias para validar las pluripotenciales reprogramadas desde células somáticas —sin destrucción de embriones ni uso de óvulos—, y en la medida en no sean suficientes para ello las que ya existen. Se plantea así una *complicidad ética* con el empleo de embriones, en unas condiciones muy rigurosas y durante un tiempo puente, imprescindible para el avance de la prometedora y legítima Terapia Celular con células de adulto[4].

3 Barde, Y. (2009) «Caution urged in trial of stem cells to treat spinal-cord injury». *Nature,* 458, 29. Por el momento, las únicas células que han mostrado beneficio en el control de las lesiones medulares son las estromales de la médula ósea, que incluyen progenitores hematopoyéticos. De hecho, ya hay ensayos en marcha con células autólogas de la médula ósea y por ahora se han probado en 38 pacientes con lesión medular. Los datos disponibles muestran que diez pacientes pudieron caminar en paralelo, siete lo hicieron sin apoyo y cinco con muletas. Por otra parte, el equipo de Jeffery Toretski publicó en julio en la edición digital de *PLoS One* que han localizado una población de células troncales en la médula espinal que podrían resultar útiles como tratamiento de las lesiones medulares.

4 Brown, M.T. (2009) «Moral complicity in induced pluripotent stem cell research» *Kennedy Institute of Ethics Journal* 19, 1-22; Byrnes, W.M. (2008) «Direct Reprogramming and Ethics in Stem Cell Research». *National Catholic Bioethics Quarterly* 8, 277-290.

2. Creación y destrucción de embriones humanos para investigar en el contexto de los centros de FIV

Algunos centros, como la Universidad de Stanford, que colaboran con las clínicas de FIV en el diagnostico de defectos genéticos de embriones, se habían quejado de que la falta dinero les estaba restringiendo la investigación que usa estos embriones con defectos genéticos que de ninguna forma van a ser implantados -y siempre y cuando los padres los donen- para derivar de ellos líneas celulares. Se promete con esta investigación estudiar la enfermedad que aflige, en muchos casos, a las familias de los embriones destruidos para convertirlos en donantes, precisamente por ser portadores de un defecto genético. Es decir, se usarían para investigación los embriones rechazados para procreación, y ligada al diagnóstico genético preimplantacional (DGP), a la obtención de líneas celulares con un genoma portador de errores.

Justamente los NIH, que trabajan con las líneas celulares derivadas de embriones que ya existían antes de que el Presidente George W. Bush pusiera la limitación de fondeos federales, habían elegido entonces 21 líneas derivadas de embriones sin defectos genéticos. Se calcula que actualmente existen entre 400 y 1.000 líneas, muchas de las cuales se han generado de embriones con predisposición genética específica a algunas enfermedades, tras análisis genético de una biopsia del embrión. Además, estás líneas más recientes se obtuvieron en un medio de cultivo sin material procedente de animales, que fue uno de los problemas técnicos iniciales. Son, por tanto, objetivamente más aptas para la investigación preclínica que las primeras líneas que se obtuvieron de la destrucción de embriones.

Robert Lanza, de la empresa ACT, lleva varios años anunciando que se pueden obtener células embrionarias (ES) sin destruir el embrión, para evitar el rechazo social (y además poder acceder a fondos federales en USA) que genera la creación y destrucción de embriones humanos para investigación. Se conoce que estas células troncales embrionarias no sirven para curar, a diferencia de las de adulto, y además su «utilidad» para investigar ha sido superada por las de adulto reprogramadas. La técnica consiste en quitarle al embrión una célula en su día tres de vida[5]; el resto del embrión retiene su capacidad de desarrollo, aunque obviamente no se les va a dar la oportunidad de desarrollarse y llegar a nacer. En España, el representante de este curioso empeño es el equipo de Carlos Simón del Centro Príncipe Felipe de Valencia y acaba de anunciar en abril que ha conseguido la línea Val 10B, «sin dañar el embrión». Si ya la biopsia de dos células del embrión en estado de ocho células para el diagnóstico preimplantacional tiene sus problemas y mueren parte de ellos ¿alguien piensa que los padres de los sometidos a esta prueba van a aceptar que se les quite «de paso» otra célula

5 Klimanskaya, I., et al. (2006) «Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres,» *Nature* 444, 481-485.

más para los intereses biotecnológicos del centro de investigación, si desearán que ese hijo llegue a nacer? No. Simplemente en honor a la verdad, al anuncio de «células embrionarias sin dañar al embrión» falta añadir «embrión, tal vez vivo, pero sin opción a ser implantado en útero y desarrollarse».

¿Tienen utilidad científica estas líneas celulares, tan difíciles, por otra parte, de obtener? Obviamente cualquier muestra biológica humana es material para estudio. Pero una vez más, también en la investigación, las células embrionarias (pluripotenciales obtenidas a partir de embriones) con dotación genética conocida por el DGP realizado en el embrión, han sido desbancadas por las células somáticas de un individuo con la dotación genética deseada a las que se les induce pluripotencialidad, las ya famosas iPS. Son células pluripotenciales, en estado semejante al embrionario.

Ambos tipos celulares pluripotenciales —las ES y las iPS— pueden convertirse en cualquier tipo de células maduras y son útiles para hacer la «disección» de los mecanismos de enfermedades, para probar fármacos y nuevas terapias.

Y de nuevo, como ocurrió con las células troncales de adulto, los partidarios de la destrucción de embriones repiten que las iPS pueden tener el defecto de no ser exactamente iguales a las ES. Habría que decir que es deseable, al menos, que no sean tan iguales a las indómitas derivadas de embriones. Un comentario sutil se desliza siempre que se reintenta desprestigiar a las de adulto: las procedentes de embriones son «naturales» y las somáticas reprogramadas son «artificiales» y pueden estar alteradas ¿Nos van a hacer olvidar las manipulaciones de la obtención, cultivo y biopsia, de los embriones *in vitro*?

3. Creación y destrucción de embriones con fines terapéuticos en el contexto del cultivo de embriones *in vitro*

De forma paralela se creó el eco de que la enmienda Dickey-Wicker necesitaba una puesta al día para adecuarse a la realidad de la investigación de científicos, por cierto muy pocos, ligados a los intereses de empresas biotecnológicas norteamericanas, como Geron y ACT. Empresas empeñadas en crear embriones, o aprovechar sobrantes, y mantenerlos *in vitro* más allá de esos 5-6 días, por el procedimiento de añadir nuevos factores, e incluso células del endometrio de la madre, al medio en que se desarrollan.

Están tratando de alcanzar en el laboratorio el final de la *mítica* segunda semana de vida. En el *mítico* «día después del 14» las incontrolables células embrionarias de la masa interna celular del embrión de unos seis días, el blastocisto, se han convertido ya en células en un estado pluripotencial, diferente, y diferente entre ellas según el sitio que han ocupado a lo largo y ancho de los ejes dorsoventral y antero-posterior del embrión. La aparición de la línea primitiva desde la región posterior hacia la anterior del embrión pone de manifiesto el rápido y espectacular avance del desarrollo embrionario en esos días: las células aún pluripoten-

ciales dan su primer paso de compromiso hacia el linaje que corresponde al lugar que ocupan[6].

Es bien conocido que las células troncales embrionarias no sirven para la Terapia Regenerativa[7] por dos motivos técnicos: son indómitas y no son del paciente por lo que generarían rechazo inmunológico. El primer problema podría «solucionarse» con el cultivo *in vitro* de los embriones durante más tiempo. Se establece así una nueva forma de maridaje con la reproducción artificial. Sin embargo, antes de conseguirlo las iPS ya las han desbancado. Incluso las desbancarían en el caso de que hubiesen resultado también indómitas y generaran tumores, puesto que en tal caso ambas compartirían el problema. Y el segundo problema lo es sólo para las procedentes de embriones, inmunologicamente ajenas al paciente.

La principal estrategia seguida para solucionar la cuestión del rechazo inmune para poder usar las células troncales procedentes de embriones fue el intento de construir un embrión clónico del paciente. Se inició así la poco razonable idea de la «clonación terapéutica», que tuvo su punto final con un gran fraude[8]. Las codiciadas células con dotación genética elegida, obtenidas por transferencia nuclear (las SCNT), fallan en los experimentos con animales y no hay pruebas de que se haya conseguido un embrión clónico humano[9]. Otra dificultad insalvable en el intento de la llamada clonación terapéutica ha sido la necesidad de usar óvulos para realizar la transferencia nuclear[10]. El debate ha sido extenso y una vez más Lanza, de la ACT, insiste y propicia la sustitución de los oocitos humanos por los de animal, para construir así lo que se denominó erróneamente embriones híbridos y muy recientemente se ha mostrado que tampoco son eficaces[11].

6 Cfr Murry Ch.E., Keller G. (2008) «Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development» *Cell* 132, 661–680; Rossant J. (2008) «Stem Cells and Early Lineage development» *Cell 132*, 527-531.

7 López-Moratalla, N. (2008) «Ética de la investigación en terapia regenerativa». *Cuadernos de Bioética* 66, 195-210; López-Moratalla, N. (2008) «Células troncales de adulto. Estrategias de investigación» *OFFARM* 92-99; López-Moratalla, N. (2008) «La racionalidad científica de la utilización de células troncales embrionarias en la medicina regenerativa». *Relación Médico-Paciente*. Comisión de Ética y Deontología Médica del Colegio Oficial de Médicos de Valladolid, pp.59-172; López-Moratalla, N. (2006) «Racionalidad de la investigación con células troncales embrionarias». *Cuadernos de bioética*, 61, 327-347; López-Moratalla, N. (2004) «Uso terapeútico e investigacion con células troncales humanas: racionalidad científica» *Cuadernos de bioética* 58, 77-100.

8 López-Moratalla, N. (2004) «Clonación Terapéutica». *Persona y Bioética* 2,16-23; López-Moratalla, N. (2007) ¿Qué hay de nuevo sobre las células troncales? La utopía de la clonación terapéutica» *Cuadernos de Bioética* 64, 367-385; López-Moratalla, N. (2005) «El lobby de las células embrionarias, telón de fondo del fraude de la clonación». *Cuadernos de Bioética* 58, 419-439.

9 Byrne, J. A., Pederson, D. A. Clepper, L. L., et al. (2007) «Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 450, 497-502.

10 Baylis, F., McLeod, C. (2007) «The stem cell debate continues: the buying and selling of eggs for research». *Journal of Medical Ethics* 33, 726–731.

11 Chung, Y., Bishop, C.E., Treff, N.R., Walker, S.J., Sandler, V.M., Becker, S., Klimanskaya, I. Wun, W-S., Dunn, R., Hall, R.M., Su, J., Lu, S-J., Maserati, M.,

Más aún, en definitiva la idea[12] de conseguir líneas celulares con características de una enfermedad concreta mediante la transferencia del núcleo de una de sus células a un ovulo e intentar que se desarrolle durante unos días, queda anulada con la reprogramación de células somáticas. El consorcio empresas biotecnológicas-centros de reproducción artificial camina ahora en la línea de crear embriones sometibles a diagnóstico genético previo a la implantación (DGP) y «criar» embriones humanos algo más maduros por cultivo *in vitro* a fin de conseguir los bancos de células troncales a la carta.

4. Las capacidades reales de las células iPS para investigación y para terapia

La obtención de células pluripotenciales inducidas, iPS, a partir de células adultas tuvo en sus inicios el lastre el empleo de vectores virales, con los que se insertaron los genes que las reprograman a pluripotenciales. Estos vectores podían comprometer la seguridad en caso de posibles aplicaciones clínicas. En el último año, gran parte de las investigaciones en este campo se han centrado en perfeccionar la tecnología y en 2009 está superada[13]. Se ha logrado inducir la pluripotencialidad sin vectores virales[14] mediante plásmidos y transposones[15], que se eliminan una vez que expresados los genes de la pluripotencialidad que portan. Se han usado moléculas[16], e incluso micro RNA.

Choi, Y-H., Scott, R., Atala, Dittman, A.R., Lanza, R. (2009) «Reprogramming of human somatic cells using human and animal oocytes» *CLONING AND STEM CELLS*, 11, OI: 10.1089/clo.2009.0004; López-Moratalla N. (2008) «La falacia de los embriones híbridos». *Nueva Revista* de política, cultura y arte. 118, 78-82.

12 López-Moratalla, N. (2007) «Células humanas rejuvenecidas y el final de la clonación humana». *Cuadernos de Bioética*, 64, 387-392.

13 Pera, M.F. (2009) «Low-risk reprogramming» *Nature* 458, 715-716.

14 Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., Hochedlinger K. (2008) «Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration» *Science* 322, 945–949. Okita, K., Nakagawa, M. Hyenjong, H., Ichisaka, T., Yamanaka, S. (2008) «Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors» *Science*, 322, 949-953. Osafune, H.D., Maehr, K., Maher; R. et al. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only oct4 and sox2» *Nature biotechnology* 26, 1269-1275.

15 Kaji, K., Norrby, K., Paca A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., Woltjen, K. (2009) «Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors» *Nature* 458, 771-775; Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H.K., Nagy, A. (2009) «*PiggyBac* transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells». *Nature*, 458, 766-770; Zhou, H. et al. «Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cel.l* doi:10.1016/j.stem.2009.04.005 (online 23 abril 2009); Yu, J. et al. «Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences» *Science,* doi:10.1126/science.1172482 (online 26 marzo 2009).

16 Huangfu, D. Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., Melton, D.A. (2008) «Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds» *Nat. Biotechnol*. 26, 795–797. Shi, Y. et al. (2008) «A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells» *Cell Stem Cell* 2, 525–528. Wernig, M. Lengner, C.F., Hanna, J., Lodato, M.A., Steine, E., Foreman, R., Staerk, J., Markoulaki, S., Jaenisch, R. «A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types». *Nat. Biotechnol* 26,

También se ha avanzado, con rapidez y eficacia, en reprogramar a pluripotenciales diversos tipos de células somáticas[17] y por diversos sistemas técnicos.

Recientemente, se ha logrado convertir células troncales/progenitoras (espermatogonia troncal unipotente y /o sus progenitoras) de una biopsia de testículo de adulto en pluripotenciales sin usar genes adicionales[18], cuando se sacan de su nicho y se le adicionan factores de crecimiento y otros agentes. Una vez reprogramada hacia atrás puede diferenciarse a todos los tipos celulares de las tres capas germinales. Esto plantea el uso futuro de estas troncales del testículo autologas para tratamiento de diversas enfermedades degenerativas.

Se han obtenido cardiomiocitos funcionales desde iPS humanas[19], utilizando transgenes de LIN28, NANOG, OCT4 y SOX2 para caracterizar la diferenciación respecto a las ES, por el método de crear cuerpos embriodes. Los cardiomiocitos adquieren estructura sarcomérica, sugiriéndose su posible uso terapéutico.

De especial interés, es el hecho de que se ha logrado inducir pluripotencialidad a células somáticas procedentes de enfermos[20], lo que aporta un material insustituible para conocer los mecanismos moleculares y diseñar y probar terapias y fármacos. Cuatro laboratorios han conseguido generar células iPS desde células de pacientes con una variedad de enfermedades con origen genético[21] y enfermedades degenerativas. Frank Soldner y Rudolf Jaenisch reprograman fibroblastos de la piel de cinco pacientes con enfermedad de Parkinson y desde ellas que se obtienen neuronas productoras de dopamina[22].

916–924; Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Arauzo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M., Scholer, H.R. (2008) «Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors». *Nature* 454, 646-650.

17 Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., et al. (2008) «Efficient and Rapid Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Keratinocytes». *Nature Biotechnology* 26, 1276–1284. Recientemente el equipo de Martin Dym publica en la edición digital de *Stem Cells and Development* de abril de 2009, que ha usado las células progenitoras de testículos humanos, según la propuesta hecha por el equipo de Thomas Skutella a fin de que por ser antólogas pudieran derivarse de ellas células para terapias (*Nature* 456, 344-349).

18 Gallicano, G.I., Golestaneh, N., Kokkinaki, M., Pant, D., Jiang, J., Destefano, D., Fernandez-Bueno, C., Rome, J.D., Haddad, B.R., Dym M. (2009) «Pluripotent stem cells derived from adult human testes». *Stem Cells Dev*.; Conrad S., Renninger M., Hennenlotter, J., Wiesner,T., Just, L., Bonin, M., Aicher, W., Buhring, H.J., Mattheus, U., Mack, A., Wagner, H.J., Minger, S., Matzkies, M., Reppel, M., Hescheler, J., Sievert, K.D., Stenzl, A., Skutella T. (2009) «Generation of pluripotent stem cells from adult human testis» *Nature*, doi:10.1038/nature07404

19 Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al. (2009), «Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells». *Circ Res*. 104, 30-41.

20 Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., Daley, G.Q. (2008), «Disease-specific induced pluripotent stem cells» *Cell* 134, 877-886.

21 Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., and Daley, G.Q. (2008) «Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors» *Nature* 451, 141-146.

22 Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., et al. (2009). «Parkin-

El estudio de la enfermedad de Alzheimer, o la esclerosis lateral amiotrófica (ASL), se ve potenciado ahora por el trabajo del equipo de Dimos[23], que ha reprogramado fibroblastos de una biopsia de dos enfermas de ALS. Las iPS conservan el carácter de neuronas y células de la astroglía de las pacientes: una mutación en el gen que codifica la superoxido dismutasa y que generó en una de ellas un trastorno neurodegenerativo. También se han logrado iPS de un enfermo con atrofia muscular medular[24], a partir de las células cutáneas, lo que supone disponer de un modelo específico para estudiar la patología de esa grave enfermedad hereditaria autosómica recesiva, que origina la muerte en la infancia temprana.

El equipo de Izpusua[25] ha logrado iPS tras corregir células somáticas de pacientes de anemia de Fanconi, capaces de dar progenitores hematopoyeticos de los linajes mieloide y eritroide normales, con futuro potencial teapeútico.

Un último ejemplo que comentamos, son los trabajos de Douglas A. Melton que convierten células exocrinas adultas del páncreas de ratón en células beta secretoras de insulina, sirviéndose de tres factores de transcripción (Ngn3, Pdx1 y Mafa). Melton busca una terapia regenerativa espectacular: la reprogramación in vivo de las células exocrinas del páncreas a células beta, lo que ha conseguido ya en el modelo animal[26].

Se inicia la creación de bancos de líneas celulares derivadas de estas células reprogramadas para uso en investigación de los mecanismos de la enfermedad, las pruebas de fármacos y de nuevas terapias. Son promesas con futuro de las que, como es lógico, no se deben crear expectativas de futuro inmediato. No obstante, la investigación biomédica da un gran paso al poder tener acceso a modelos humanos de la enfermedad a nivel celular y es de esperar que los resultados salten pronto a la clínica. El problema fundamental como refleja los trabajos publicados por Yamanaca en junio y julio es el escaso número de células que se reprograman[27].

son's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors». *Cell* 136, 964-977.

23 Dimos, J.T., Rudolfa, K.T., Niakan, K.K., Niakan, L.M., Weisenthal, H.M., Chung,W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., Wichterle, H., Henderson, C.E., Eggan, K. (2008). «Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons». *Science* 321, 1218-1221.

24 Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., Svendsen, C.N. (2009), «Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient». *Nature*, 457, 51-61.

25 Raya, A., Rodríguez-Piza, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, Consiglio, A., Castella, M., Río, P., Sleep, E., González, F., Tiscornia, G., Garreta, E.,T.A., Veiga, A., Verma, I.M. Surralles, J., Bueren, J., Izpisua, J.C. (2009), Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*, doi:10.1038/nature08129.

26 Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., Melton, D.A. (2008) «In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to b-cells». *Nature* 455, 627-633.

27 Yamanaka, S. (2009) «Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation» *Nature* 460, 49-50; Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., Ogawa, D., Ikeda, E., Okano, H., Yamanaka, S. (2009), «Variation in the safety of induced pluripotent stem

En resumen, a corto plazo la reprogramación de células somáticas —en que se retiene la pluripotencialidad de una línea celular y a su vez pueden diferenciarse a otros tipos celulares— supone en primer lugar disponer de modelos para la investigación terapéutica de esperables beneficios médicos. A más largo plazo es posible que puedan usarse en Terapia Regenerativa. Y es posible que estos conocimientos precisos puedan generar terapias para el rejuvenecimiento *in vivo* de células somáticas a células progenitoras, por ejemplo las productoras de insulina.

A largo plazo, se piensa en la posibilidad de que estas células del enfermo, reprogramadas, crecidas y convertidas en un tipo concreto de célula troncal o progenitora, pudieran usarse para transferirlas al tejido dañado al modo clásico de la Terapia Regenerativa con células de adulto.

En este sentido, el equipo japonés de Yamanaka[28] ha analizado el poder regenerativo adipogénico de 4 líneas de iPS humanas y lo ha comparado con el de ES[29]. Las iPS podrían usarse para lograr terapias contra las lipodistrofias (de origen congénito o adquirido, caracterizadas por la falta de tejido adiposo y que conduce a una diabetes resistente a la insulina, hipertrigliceridemia e hígado graso) por conocimiento de la génesis de este tejido y la clarificación de las patogénesis y fisiopatología de la obesidad y del síndrome metabólico. Existían dificultades para el estudio debido a que el modelo de ratón no es idéntico a la enfermedad humana[30], y a que no se ha tenido, hasta ahora, un modelo celular.

Existe, por tanto, uso a dos niveles: a) líneas celulares para estudio de enfermedades y b) explorar el potencial regenerativo para uso terapéutico. En ambos casos se necesita algún sistema riguroso de evaluación de las células.

5. ¿Se requiere necesariamente revalidar las células iPS con las ES, procedentes de embriones, para uso en investigación biomédica y posterior uso terapéutico?

La semejanza, en cuanto a pluripotencialidad, entre las iPS y las ES procedentes de embriones humanos plantea algunos interrogantes. Existen discrepancias acerca de cual es el criterio que permita evaluar las iPS[31]. De forma rutinaria, los

cell lines». *Nature biotechnology,* online 9 July 2009; doi:10.1038/nbt.1554.

28 Taura, D., Noguchi, M., Sone, M., Hosoda, K., Mori, E., Okada, Y., Takahashi, A., Hommaa, K., Oyamada, N., Inuzuka, M., Sonoyama, T., Ebihara, K., Tamura, N., Itoh, H., Suemori, H., Nakatsuji, N., Okano, H., Yamanaka, S., Nakao, N. (2009) «Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. Comparison with that of human embryonic stem cells» *FEBS Letters* 583, 1029–1033.

29 Xiong, C., Xie, C.Q., Chen, Y.E., et al. (2005) «Derivation of adipocytes from human embryonic stem cells» *Stem Cells Dev.* 14, 671–675.

30 Arner, P. (2005) «Resistin: yet another adipokine tells us that men are not mice». *Diabetologia* 48, 2203–2205.

31 Daley, G.Q., Lensch, M.W., Jaenisch, R., Meissner, A., Plath, K., and Yamanaka, S. (2009) «Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs» *Cell Stem Cell 4*, 200-201; Ellis, J., Bruneau, G.B., Keller, G., Lemischka, I.R., Nagy, A., Rossant, J., Srivastava, D., Zandstra, P.W., and Stanford, W.L. (2009). «Alternative induced

científicos que trabajan con células troncales recomiendan estrategias comparativas entre las células troncales de adulto —ahora las iPS— con las procedentes de embriones[32], consideradas el estándar de oro. Las ES se han estudiado a lo largo de 10 años, y origen común de todas ellas en los embriones hace que de hecho sean menos variables que las iPS derivadas desde diferentes tejidos de adulto. Más aún, es posible que algunos métodos de obtener iPS no sean adecuados.

5.1. Evaluación de la pluripotencialidad

Es preciso establecer una «línea base» desde la que se puedan medir los avances en las iPS, puesto que su pluripotencialidad es artificial y mimetiza la pluripotencialidad natural de las ES. La precisión y rigor de los conocimientos del desarrollo embrionario y de las células troncales es esencial para refinar los modelos celulares sobre los que «diseccionar» la enfermedad, pergeñar terapias, probar fármacos, etc. y más aún, para avanzar en su potencial uso en el reemplazamiento de las células de los tejidos afectados por la enfermedad.

¿En que se parecen y en que se distinguen ambos tipos celulares pluripotenciales? Son semejantes en morfología, proliferación y expresión de algunos marcadores y en la formación de teratomas de ratón[33], que no forman algunas células troncales multipotenciales de adulto, como las mesenquimales y hematopoyéticas. Las iPS tienen un patrón diferente de expresión global de genes y no todas forman quimeras de ratón cuando se inyectan a un blastocito. Es obvio que falta mucho por conocer sobre estas células rejuvenecidas. La duda principal es si se ha realizado una verdadera reprogramación epigenética ¿qué factores específicos de tejido requieren para ello? ¿Han podido, incluso, cambiar las moléculas de superficie de modo que pudieran ser incompatibles inmunológicamente con el propio donante?

Dos criterios han servido para evaluar la pluripotencialidad de las ES. El requerimiento mínimo fue su capacidad de formar teratomas y el criterio estándar de que son pluripotenciales ha sido la capacidad de formar quimeras. El procedimiento de la formación de quimeras de ratón, en un modelo de ratón inmunosuprimido, que sirvió para evaluar la pluripotencialidad de las ES humanas es largo y costoso. No obstante, es necesario conocer qué regula en las iPS la capacidad proliferativa de forma que no haya riesgo de que generen tumores de igual forma a como ocurre con las ES; existe un riesgo de que induzcan tumores si no estuvieran todas ellas diferenciadas por completo. Para ello ¿habría que pasar la prueba de generar una quimera insertándolas en un embrión de ratón en estado de blastocisto?

pluripotent stem cell characterization criteria for in vitro applications» *Cell Stem Cell 4*, 198-199.

32 Cfr. Gearhart, John. (2007) «Pluripotency Redux: Advances in Stem Cell Research» *New England Journal of Medicine* 37, 1469-1472.

33 Li, J.Y., Christophersen, N.S., Hall,V., Soulet, D., and Brundin, P. (2008). Trends Neurosci. *31*, 146-153.

Como pone de manifiesto Yamanaka[34], en un artículo de abril de 2009, a corto plazo hay que iniciar el análisis comparativo entre las iPS obtenidas por diversos métodos en diversos laboratorios, para ver qué línea asegura la diferenciación total y poder avanzar en su uso en Medicina Regenerativa. Se trata de purificarlas bien[35] y en definitiva de desarrollar métodos sencillos y sensibles para evaluar la efectividad y seguridad de los miles de clones y subclones de iPS generados por las diferentes técnicas de inducir pluripotencialidad que se están utilizando. El avance en esta investigación no está condicionado a su comparación con las ES. Para que sean útiles en la primera fase de la investigación —como modelos celulares para el estudio de enfermedades, pruebas de fármacos, etc.— y como garantía de su reprogramación no es necesario que pasen la prueba de dar quimeras, ni siquiera que formen teratomas. Basta con que regulen su capacidad autogenerativa: se dividan y den otra célula troncal. Más aún para su posible futuro uso en terapia regenerativa es imprescindible, obviamente, que no formen los teratomas.

La evaluación acerca de si nuevas técnicas de generar células iPS producen una plena o una parcial reprogramación podrán ser evaluadas, en primer término, por criterios de morfología, presencia de marcadores, expresión de genes y diferenciación *in vitro*. Con un sentido científico práctico esto es suficiente en el inicio. Con ello se seleccionarían los mejores clones y se asegura que se estabilizan en un estado uniforme.

5.2. Evaluación del potencial de diferenciación

Para las aplicaciones clínicas, además de la selección de los clones iPS, se requiere un segundo criterio para evaluar el potencial real de madurar hacia el tipo deseado y así poder reemplazar a las células dañadas del propio enfermo. Una vía fácil de evaluación es comparar el proceso de diferenciación con ES diferenciadas. Ahora bien ¿es imprescindible la comparación directa o puede simplemente usarse el conocimiento del proceso que se tiene ya por los experimentos con las células ES?

Ciertamente, el conocimiento adquirido con el estudio de las células procedentes de embriones es conocimiento, con independencia en que algunos lo hayan conseguido destruyendo embriones humanos[36]. Como conocimiento verdadero es un bien, aunque esté «contaminado» por el camino empleado en alcanzarlo; es, obviamente, legítimo apoyarse en él para avanzar.

34 Yamanaka, S. (2009) «A Fresh Look at iPS Cells». *Cell 137*, 13-17.

35 Zhu, Y., Liu, T., Song, K., Fan, X., Ma, X. and Cui, Z. (2008) «Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC». *Cell Biochem. Funct.* 26, 664-675; Taura, D., et al. (2009). *FEBS Letters* 583, 1029-1033 1033.

36 Como afirma Thomson, «These new iPS cells would not have been derived successfully in human materials unless we had the last ten years of human embryonic stem cell work.» (Thomson, J. 2008. Reprogramming—A New Vision for Creating Patient Specific Cells. Keynote Presentation, 2008 World Stem Cell Summit, Madison, Disponible en *www.worldstemcellsummit.com*, 16 January 2009.

Una cuestión bien distinta es si es o no legítimo usar las células que otros han obtenido a partir de embriones humanos como controles de la investigación. Algunos piensan, como se refirió más arriba, que está justificada esta cooperación por el beneficio médico que se derivará de esta investigación. Se plantea si con las líneas celulares ya existentes sería suficiente, o se requiere un acuerdo para crear nuevas líneas durante un periodo «puente» de evaluación de las iPS; y siempre y cuando se establecieran condiciones, que limiten la producción e impidan un renacer del negocio biotecnológico consumidor de embriones, con motivo de este uso. Es un caso de complicidad (o cooperación) que atañe especialmente a los que dirigen la política científica y los directores de investigación. Tiene de dirimente el convencimiento de muchos[37] de que es la ultima batalla a ganar para que la Terapia Regenerativa se base exclusivamente en las células de adulto, acabando con la destrucción de embriones y la utilización de óvulos para conseguir este tipo de material biológico.

Ahora bien, no hay que renunciar a la exigencia de la ética de la investigación, en cuanto cooperación. La comunidad científica, y los científicos en particular, tienen que potenciar, cueste lo que cueste, la creatividad para buscar las alternativas a la necesidad de validar la capacidad de las iPS de diferenciarse al nivel deseado. Yamanaka usó ES ya existentes en el ultimo control de las iPS diferenciadas a troncales adiposas, como se refiere más arriba; habían realizado toda la experimentación rigurosa en animales; se carecía de otra posibilidad y había que evitar que se hicieran pruebas en múltiples laboratorios, sin los experimentos previos en animales y se generase la «necesidad» de crear nuevas líneas desde embriones; unas semanas después la generación de células de la retina desde iPS basándose en el conocimiento de la diferenciación de las ES[38] —sin usarlas de control fáctico— con uso posible para Terapia Regenerativa; continua estableciendo controles en ratón[39] y comparando con ES[40]. Marca así los limites correctos de evaluación del potencial diferenciador.

6. El reto a la racionalidad de los programas de investigación con las iPS

La lógica de la investigación científica, y la experiencia acumulada a lo largo de generaciones de brillantes científicos, nos aportan siempre las vías de ir a por la

37 Baker M. (2009) «Fast and furious» *Nature*, 458, 271-272.

38 Hiramia, Y., Osakadaa, F., Takahashic, K., Okitac, K., Yamanakac, S., Ikedab, H., Yoshimurab, N., Takahashia, M. (2009) «Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells». *Neuroscience Letters*. Online 23 abril; doi:10.1016/j.neulet.2009.04.035.

39 Taura, D., Sone, M., Homma, K., Oyamada, N., Takahashi, K., Tamura, N., Yamanaka, S., Nakao, K. (2009) «Characterization of Dendritic Cells and Macrophages Generated by Directed Differentiation from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells» *Arterioscler Thromb Vasc Biol*., 29, (en prensa).

40 Senju, S., Haruta, M., Matsunaga, Y., Fukushima, S., IKEDA,T., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., Nishimura, Y. (2009) «Induction and Isolation of Vascular Cells From Human-Induced Pluripotent Stem Cells» *STEM CELLS* 27, 1021-1031.

alternativa no destructiva, la que menos invada en el organismo, la más parecida a la natural… Y siempre agotando las pruebas en animales tanto para las pruebas de terapias como para conocer el funcionamiento natural.

Así lo están haciendo los «grandes». Nada más conocerse la reprogramación de células de adulto Rudolf Janisch, con su profundo conocimiento de la clonación en ratón, pudo comprobar que al menos en ratón las iPS propias podían ser utilizadas para curar una anemia[41].

Por su parte, Douglas Melton, de la Universidad de Harvad, que inicialmente pensó en las células embrionarias para curar la diabetes, creó un sistema de trazado de las células que le ha permitido generar *in vivo* células capaces de convertirse en productoras de insulina en los ratones. Él pensó que las células beta no se formarían después del nacimiento. Y, sin embargo, la vía que abrió ha servido para que poco después el equipo de Susan Bonner-Weir de Boston encuentren, nada menos, que existe una población de células en el páncreas que pueden estimularse dentro y fuera del organismo para convertirse en las beta productoras de insulina (PNAS, doi: 10.1073/pnas.0805803105). La regeneración del páncreas en los diabéticos podrá hacerse de la forma menos invasiva: simplemente ayudando al rejuvenecimiento celular. Esto es, es posible un bypass a la pluripotencialidad pasando las células directamente de un estado a otro.

El gran reto de esta área es conocer la diferenciación natural, la expresión de los diferentes grupos de genes específicos de tejido en cada linaje celular a lo largo del desarrollo y maduración. Conocer donde y cuándo se expresan los genes y aparecen los factores reguladores. El hecho de que la obtención de las iPS por diferentes grupos se haya llevado a cabo con la expresión de distintos grupos de genes muestra que hay diversas rutas de programación y que las células pluripotenciales existen en diferentes estadios. Recientemente, el equipo de Yamanaka ha podido trazar en ratón el mapa de las trayectorias que siguen las ES vivo para avanzar en su diferenciación[42] hacia los tres linajes propios del desarrollo de mamíferos: el endodermo primitivo, el trofoblasto y el ectodermo primitivo/ectodermo neural. Las posiciones de las células a lo largo de esas trayectorias reflejan el potencial de desarrollo y puede usarse como una escala de tal potencial. Conocidos así los marcadores, e incluso la morfología celular, resulta posible evaluar el estado de diferenciación de las células pluripotenciales conseguidas *in vitro*. Es un método semicuantitativo de medida de la diferenciación celular y del potencial de diferenciación. El trazado de estas trayectorias hace posible conocer los pasos

41 J. Hanna et al. (2007) «Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin» *Science* 318, 920-923.

42 Aiba, K., Nedorezov, T., Piao, Y., Nisiyama, A., Matoba, R., Sharova , L.V., Sharova, A.A. Yamanaka, S., Niwa, H., Ko, M.S.H. (2009) «Defining developmental potency and cell lineage trajectories by expression profiling of differentiating mouse embryonic stem cells» *DNA RESEARCH* nline 26 diciembre de 2008.

que dan las células pluripotenciales en el camino a multipotenciales, progenitoras y maduras. Es un buen sistema de evaluar la capacidad de las células pluripotenciales de iniciarse en las vías de diferenciación y de los diferentes estados por el que pasa naturalmente.

Realmente hay alternativas al procedimiento de evaluar las iPS con células de embriones. Más aún, las proceden de embriones *in vitro* muestran diferencias significativas en su «estado pluripotencial» debido a la manipulación de los gametos de los que proceden, al cultivo *in vitro* y a las biopsias sacadas en el día tres de su vida para el diagnóstico genético preimplantacional. Son estas ES «a la carta» las que requieren validación en caso de que se tomara la vía de generar líneas desde embriones con defectos genéticos para investigar en enfermedades. La era del uso de embriones para obtener células pluripotenciales ha fracasado en su inicio mismo.

Recibido: 16-04-2009
Aceptado: 06-05-2009