

# Investigación con células madre embrionarias: Racionalidad científica y alternativas.

Natalia López Moratalla.

## 1. Introducción

La racionalidad de los trabajos con células madre de origen, o de tipo, embrionario exige dar cuenta no sólo de la lógica de la investigación aplicada a la biomedicina y biotecnología, sino también de la ética de la manipulación de la vida humana y su transmisión que conllevan.

La cuestión fundamental, por ser previa, a todo juicio ético acerca de los procesos y finalidades en juego, es conocer con rigor los datos reales que permitan argumentar con profundidad y verdad:

A) Qué es exactamente el *material* de partida que se manipula; ¿cuál es su entidad real y si el nombre que se le da le corresponde?.

B) En qué consiste la manipulación sobre *ese material* de partida: ¿qué tipo de realidad se obtiene con *ese* proceso sobre *ese* material? ¿La entidad artificialmente obtenida es de una nueva naturaleza y debe, por ello, ser denominada de modo diferente o, por el contrario, se trata de la misma entidad que obtiene la naturaleza por sus propios procedimientos?

C) Puesto que se trata de manipulaciones de la vida incipiente hay que tener presente además de qué especie se trata. Los mecanismos básicos generales son iguales en los procesos biológicos de las diferentes especies de mamíferos; ahora bien, para llevar a cabo una manipulación concreta *lo que se hace* en una especie puede ser necesario pero insuficiente en el caso de otra especie más compleja. Es sabido que en los primates, la misma complejidad del desarrollo orgánico, produce, de forma natural, barreras a las manipulaciones y que estas barreras naturales dificultan la intervención. Sin embargo, tales barreras no existen en otros mamíferos, o al menos son más lábiles y pueden saltarse artificialmente.

Analizadas con rigor estas cuestiones podrá hacerse el juicio ético acerca de cómo afecta una manipulación concreta a la vida humana incipiente y a su transmisión. Las presiones ideológicas, políticas y económicas son muy fuertes en este campo y dificultan conocer de qué se trata; tanto la comunicación científica como la divulgación están sometidas a profundos prejuicios; por ello el rigor de la terminología es fundamental.

En segundo lugar, es preciso tener en cuenta el contexto, por tratarse de un área relacionada con la biomedicina (en concreto en la Medicina regenerativa y en una investigación biotecnológica sobre posibles protocolos o productos terapéuticos), para plantear alternativas reales a aquellos procedimientos que conlleven destrucción o alteración de vidas humanas en su fase inicial, o manipulaciones de la corporalidad de mujeres para obtener sus gametos. Obviamente nunca estará justificado destruir un ser humano, pero hay que tener presente además que tendrían que darse circunstancias muy excepcionales para que fuera éticamente correcto promover la donación de óvulos.

Una precisión, que creo importante hacer desde el inicio, es que con el término “células madre embrionarias” hablamos de dos realidades diferentes. Inicialmente el término se

aplicó a las células extraídas de la masa interna de un blastocisto (embrión humano de cinco días) generado por fecundación. Estas “células madre de origen embrionario” (ES) por su propia naturaleza, han resultado incontrolables y, hoy por hoy, no hay datos que permita afirmar que van a poder usarse para transferirlas a enfermos con el objetivo de que sustituyan a las células que se han dañado, o perdido por enfermedad o accidente. Son inmaduras, tienen gran capacidad de crecimiento y la información genética propia de las células de un embrión temprano.

Actualmente la investigación se dirige a conseguir artificialmente una segunda clase de células. Las “células madre del tipo embrionario” con dotación genética elegida. Estas células tienen en común con las de origen embrionario algunas de las propiedades: inmadurez, capacidad de multiplicación indefinida y de generar una progenie de células especializadas de distintos tipos.

Los procedimientos de fabricación de estas entidades artificiales son en principio tres: a) transferencia nuclear a un óvulo (células ntES); b) activación partenogénica de un óvulo y c) fusión de células que no son gametos.

Pero, y esto es importante, la información genética humana que poseen no es la de un embrión precoz producido por fecundación de un gameto femenino y otro masculino, sino la correspondiente al núcleo que procede de la célula elegida. La información genética no es la de una “célula madre de origen embrionario”. Se requeriría todo un proceso de reprogramación genética para dar lugar a un cigoto que se desarrolle como embrión. Lo que se “reprograma” con los factores del óvulo es la información para organizarse de modo similar a la organización de un embrión temprano, pero no lo es. Una cuestión es que pudiera llegarse a producir artificialmente un embrión humano clónico o partenogénico y otra diferente es que lo conseguido hasta ahora lo sea. Conviene tener presente que una realidad viva (individuo o conjunto celular) no se define ni sólo por los genes ni solo por el medio. El fenotipo resultante depende de ambos. Ahora bien ambos niveles no tienen igual función en la constitución de la realidad viva, sea natural o sea artificial. Los genes aportan la identidad específica, mientras que el medio determina el estado de actualización de la información genética.

Ambos tipos de células madre (de origen o de tipo embrionario) son realidades distintas y tienen propiedades diferentes (no sólo por su origen sino por lo que son) y deben distinguirse tanto para un análisis ético, como en un análisis técnico puesto que las posibilidades de utilidad en investigación y sus aplicaciones son diferentes. En ambos casos son células madre, en cuanto que no están diferenciadas a término.

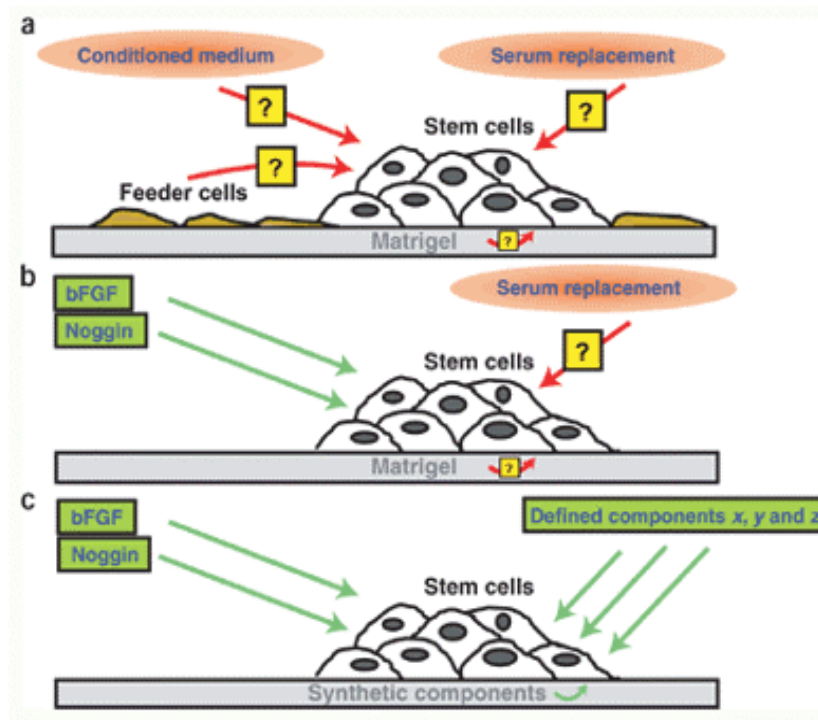
La base del interés científico de los estudios con células troncales embrionarias es la posibilidad de conocer los procesos que gobiernan la diferenciación celular para generar tal variedad de fenotipos celulares. Se pensó, inicialmente, que a partir de esos conocimientos se podrían dirigir estos procesos para originar cultivos celulares, o cultivos de tejidos *in vitro*, que pudieran sustituir *in situ* a los tejidos dañados por procesos patológicos, desarrollando las correspondientes aplicaciones médicas de estas investigaciones. Sin embargo, y como detallaremos a continuación, no se han superado aún las dificultades técnicas para el cultivo *in vitro*, para dirigir la maduración al tipo deseado y mantener sin cambio estas células madre, especialmente de las de origen embrionario, precisamente por el estado inmaduro de su genoma.

## 2. El potencial uso terapéutico de las células troncales de *origen* embrionario (hES) es sólo una hipótesis.

### 2.1. No se ha logrado una tecnología eficiente para aislar, cultivar las células ES y mantener estables las líneas celulares derivadas de ellas.

Varios trabajos ponen de manifiesto las dificultades, hasta ahora invencibles, de “domesticar” las células madre de origen embrionario. Existen una serie de factores que limitan, de hecho, el desarrollo de terapias regenerativas basadas en estas células. El artículo del equipo de Miodrag Stojkovic<sup>1</sup> pone de manifiesto que sigue siendo un reto producir tipos celulares maduros, funcionales y puros de células hES que pudieran ser utilizadas para transplantes.

a) En primer lugar, es necesario poder llegar a sustituir el lecho en el que crecen formado por células inmaduras (generalmente fibroblastos de ratón) ya que se corre el riesgo de transferir agentes patógenos. Al tratar de sustituir el lecho de células por una matriz no biológica faltan componentes para crecer, como se muestra en el esquema siguiente (tomado de Pera MF. Stem cell culture one step at a time. *Nature Methods*, 2,164-165, 2005).



b) En segundo lugar, después de un crecimiento a largo plazo, presentan una diferenciación impredecible; incorporan productos de origen animal (N-

<sup>1</sup> Stojkovic S, Lako M, Strachan T, Murdoch A (2004) Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction* 128, 259–267.

gliconeuránico) a los componentes de la membrana y esta modificación química potencia su capacidad antigénica y con ello la producción de rechazo inmune<sup>2</sup>.

c) Expresan moléculas que activan la respuesta inmune durante su diferenciación por desregulación de las moléculas del sistema HLA-I<sup>3</sup>.

d) Además, las líneas celulares ES humanas han demostrado tener una gran inestabilidad genética<sup>4</sup>. Tras un número alto de divisiones sufren alteraciones cromosómicas y mutaciones en el material genético. Un estudio, publicado por el equipo de Araminda Chakraverti, aporta nuevos datos acerca de la inestabilidad de las líneas de células madre de origen embrionario cuando se mantienen en cultivo durante períodos prolongados de tiempo: adquieren alteraciones genéticas y epigenéticas, asociadas en algunos casos con el desarrollo de tumores, como son las alteraciones en el número de copias de genes o de la metilación de genes<sup>5</sup>.

## **2.2. Los experimentos realizados en modelos animales ponen de manifiesto que las células troncales de *origen* embrionario no son aptas para uso terapéutico.**

Es posible estimular las células madre de origen embrionario humano a diferenciarse en tipos específicos como neuronas<sup>6</sup>, células hematopoyéticas<sup>7</sup>, endoteliales<sup>8</sup> y cardiomiocitos<sup>9</sup>. Diversos estudios con modelos animales han sugerido que las ES pudieran ser usadas para terapia<sup>10</sup>. Sin embargo, ese potencial uso está impedido por la

<sup>2</sup> Martin MJ, Montri A, Gage F, Varki A (2005) Human embryonic stem cells express an immunogenic non-human sialic acid. *Nature Methods* 2, 164-165; Martin et al. (2005) Stem cell culture shock. *Nature Medicine*, 11, 228-232; Ebert J (2005) Human stem cells trigger immune attack. *News Nature*. Published online: 24 January 2005; doi:10.1038/news050124-1.

<sup>3</sup> Drukker M, Benvenisty N (2004) The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends in Biotechnology* 22, 136-141; Kim JY, Kim D, Choi I, Yang JS, Lee D-S, Lee JR, Kang K, Kim S, Hwang WS, Lee JS, Curie A (2005) MHC expression in a human adult stem cell line and its down-regulation by hCMV US gene transfection. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 69-78.

<sup>4</sup> Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, Itskovitz-Eldor J (2003) Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biology of Reproduction*, 68 2150-2156; Carpenter MK, Rosler ES, Fisk GJ, Brandenberger R, Ares X, Miura T, Lucero M, Rao MS (2004) Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Developmental Dynamics* 229, 243-258.

<sup>5</sup> Maitra A, et al. (2005) Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature Genetic* 37, 1099-1103.

<sup>6</sup> Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, et al. (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12543-12548; Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, et al. (2001) Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19: 1134-1140; Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA (2001) In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19: 1129-1133.

<sup>7</sup> Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA (2001) Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10716-10721.

<sup>8</sup> Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R (2002) Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4391-4396.

<sup>9</sup> Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, et al. (2003) Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: Role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107: 2733-2740.

<sup>10</sup> Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963-970; Björklund A, Lindvall O (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 3, 537-544; Isacson O, Deacon TW, Pakzaban P, Galpern WR, Dinsmore J, Burns LH (1995) Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth

posibilidad de que inducen la formación de tumores cuando se transfieren al organismo y por la posibilidad de rechazo inmune.

Las células ES obtenidas a partir de embriones tempranos, y las líneas celulares derivadas de ellas, retienen la capacidad de generar teratomas *in vivo*<sup>11</sup>. El potencial tumorigénico de las ES se reduce cuando se prediferencian *in vitro*. Precisamente, por su intensa capacidad de crecimiento se hace muy difícil manipularlas; no hay seguridad de poder inducir la diferenciación a término de todas ellas y si permaneciera presente alguna de las indiferenciadas, entre las células que se transplantan directamente a un animal, inducirían el crecimiento de tumores<sup>12</sup>. Por ello, aunque se ha abordado la posibilidad de emplear células troncales de origen embrionario para probar tratamientos en animales de experimentación, la utilización terapéutica de células troncales embrionarias es, en estos momentos, sólo una hipótesis de investigación<sup>13</sup>.

a) El área en que se han llevado a cabo los experimentos en modelos animales es fundamentalmente neuronas o precursoras de ellas. Se ha descrito la obtención de células neurales derivadas de ES que, transplantadas a modelos murinos de enfermedad de Parkinson, han permitido recuperar la función perdida<sup>14</sup>; sin embargo, los datos no son extrapolables a humanos.

En la actualidad hay un sólo trabajo publicado<sup>15</sup> de transferencia de células de origen embrionario a primates (un modelo de la enfermedad de Parkinson). En él se pone de

---

patterns of glial and axonal fibres. *Nat Med* 1, 1189–1194; McKay R (2000) Stem cells—hype and hope. *Nature* 406:361–364; Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD (1996) Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*. *Mech Dev* 59, 89–102; Savitz SI, Rosenbaum DM, Dinsmore JH, Wechsler LR, Caplan LR (2002) Cell transplantation for stroke. *Ann Neurol* 52, 266–275.

<sup>11</sup> Erdö F, Bührle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Föcking M, Küstermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA, Trapo T (2003) Host-Dependent Tumorigenesis of Embryonic Stem Cell Transplantation in Experimental Stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23,780–785.

<sup>12</sup> Arnhold S, Lenartz D, Kruttwig K, Klinz FJ, Kolossov E, Hescheler J, Sturm V, Andressen C, Addicks K (2000) Differentiation of green fluorescent protein-labeled embryonic stem cell-derived neural precursor cells into Thy-1-positive neurons and glia after transplantation into adult rat striatum. *J Neurosurg* 93:1026–1032; Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RDG (1999) Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants. *Science* 285, 754–756; Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T (2001) Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1134–1140; Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418, 50–56; Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA (2001) In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1129–1133.

<sup>13</sup> Se han dado directrices por parte de la Unión Europea para asegurar que el uso terapéutico de las ES tenga los requisitos estándar de calidad (2004/23/EC; más información en <http://europa.eu.int/eur-lex/en/>). Después de derivar las líneas celulares es necesario confirmar que no han sufrido alteraciones cromosómicas y que mantienen la adecuada capacidad de diferenciación.

<sup>14</sup> Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen L, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2344–2349; Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418, 50–6.

<sup>15</sup> Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, Fukuda H, Okamoto Y, Koyanagi M, Ideguchi M, Hayashi H, Imazato T, Kawasaki H, Suemori H, Omachi S, Iida H, Itoh N, Nakatsuji N,

manifiesto que las células transferidas tienen un efecto positivo a breve plazo pero no se puede descartar la posibilidad de formación de tumor.

En modelos murinos<sup>16</sup> se han realizado diversos trabajos. En rata se han conseguido neuronas motoras derivadas de ES modificadas genéticamente con la introducción del gen MASH1, que codifica un factor de transcripción requerido para el desarrollo de neuronas. La transferencia de estas neuronas modificadas a animales denervados (hemipléjicos) restaura la función<sup>17</sup>. Se desconoce la estabilidad del injerto, pero en este caso claramente no se ha observado producción de teratomas.

El trasplante de ES murinas heterólogas, incluso no prediferenciadas, permite que las ES migren a la zona cerebral con infarto de una rata, se diferencien a precursores y que no induzcan formación de tumores. Estos resultados no se dan en el caso de trasplante homólogo (ocurren tumores malignos en el sitio del implante y las células no migran<sup>18</sup>) por lo que se supone que sea debido a un efecto supresor de tumor por parte de la región dañada del huésped<sup>19</sup>.

b) Se había descrito por diversos autores la posibilidad de inyectar a ratones células productoras de insulina, derivadas de las ES, capaces de realizar la corrección de la diabetes<sup>20</sup> en ratón, durante un breve periodo de tiempo. Sin embargo, las células secretoras de insulina derivadas de ES no son productoras de la hormona; como se puso posteriormente de manifiesto estas células captaban la insulina del medio de cultivo<sup>21</sup>.

c) Recientemente, se ha conseguido corregir parcialmente la falta de factor IX de coagulación en ratón con células ES cultivadas *in vitro* para dar precursores endodérmicos putativos<sup>22</sup>. Sin embargo, algunos de los animales desarrollaron teratomas.

d) En 2005 el equipo de Barberi ha logrado la producción de un ilimitado número de precursores mesenquimales (hESMPC) que podrían ser útiles para conocer como se

---

Sasai Y, Hashimoto N. (2005) Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* 115, 102–109.

<sup>16</sup> McDonald, JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW (1999). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.* 5, 1410–1412; Chiba S, Iwasaki Y, Sekino H, Suzuki N (2003). Transplantation of motoneuron-enriched neural cells derived from mouse embryonic stem cells improves motor function of hemiplegic mice. *Cell Transplant* 12, 457–468.

<sup>17</sup> Ikeda R, Kurokawa MS, Chiba S, Yoshikawa H, Hashimoto T, Tadokoro M, Suzuki N (2004) Transplantation of motoneurons derived from MASH1-transfected mouse ES cells reconstitutes neural networks and improves motor function in hemiplegic mice. *Experimental Neurology* 189 280–292.

<sup>18</sup> Erdö F, Bührle Ch, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Föcking M, Küstermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA, Trapp T (2003) Host-Dependent Tumorigenesis of Embryonic Stem Cell Transplantation in Experimental Stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23, 780–785.

<sup>19</sup> Hoehn M, Küstermann E, Blunk J, Wiedermann D, Trapp T, Wecker S, Föcking M, Arnold H, Hescheler J, Fleischmann BK, Schwandt W, Bührle C (2002) Monitoring of implanted stem cell migration *in vivo*: a highly resolved *in vivo* magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16267–16272.

<sup>20</sup> Soria, B., Roche, E., Berna, G. et al. (2000) Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 49, 157–162.

<sup>21</sup> Rajagopal J, Anderson J., Kume S, Martinez OI, Melton DA (2003) Insulin Staining of ES Cell Progeny from Insulin Uptake. *Science* 299, 363.

<sup>22</sup> Fair J et al. (2005) PNAS. DOI: 10.1073/pnas.0409840102.

diferencian y para evaluar la aplicación práctica<sup>23</sup>. Usaron dos líneas de ES indiferenciadas del registro de EE.UU. y las cultivaron en un lecho de células de ratón para dar cinco líneas policlonales. El cultivo de estos precursores policlonales produjo células de la grasa, hueso, cartílago, y músculo. Expresan genes, antígenos de superficie y proteínas típicas del tejido y no se han encontrado marcadores de células inmaduras; parece, por tanto, que no quedan células residuales con potencial tumoral.

### **2.3. Los embriones preimplantatorios como fuente de obtención de las “células madre de origen embrionario”.**

a) Para la obtención de células ES se han usado blastocistos humanos de unos 5 a 8 días fecundados *in vitro*, e inicialmente excedentes de la práctica de estas técnicas. Estos embriones (vivos o muertos) se desintegran para tomar de ellos las células que componen la masa interna celular. Las células hES se han immortalizado como líneas celulares<sup>24</sup>. La tasa de producción de células hES y sus características han resultado ser dependientes de la calidad de los blastocistos, de las condiciones de aislamiento y de la experiencia del grupo. El equipo de Stojkovic, ya citado, ha tratado de cultivar blastocistos para obtener embriones tempranos con una masa celular interna bien formada, modificando el protocolo de cultivo de los embriones vivos. Cambiando el medio en el día 3 y pasándole, en el día 6, a un medio condicionado (cuyos componentes desempeñan un importante papel en la embriogénesis temprana), se produce la eclosión en el día 8 y el embrión de esa edad posee células maduras. En el día 9 comienza a formar un polo similar al cono de implantación aunque la masa interna no forma la estructura bilaminar en disco propia de un embrión en su segunda semana de desarrollo<sup>25</sup>.

Las células hES se han obtenido también de embriones de menos de 5 días, concretamente en el estado de mórula<sup>26</sup>.

Generalmente no se tiene en cuenta si los embriones están vivos o muertos, o en que momento se han destruido. Tanto si han estado crioconservados, o no, se cultivan en medios adecuados para permitir que continúe su desarrollo *in vitro* y posteriormente, por diferentes procedimientos, se desagrega el embrión y se cultivan las células. El cultivo del embrión crioconservado incluye la reanimación de la vida detenida por efecto de la temperatura. Toda investigación, sea cual sea el fin que persiga, que parta de embriones carece de justificación ética. Los embriones generados *in vitro* no mueren de forma natural ya que no están en el entorno adecuado, la madre, para la óptima supervivencia y desarrollo. Se tratará siempre de un riesgo de muerte consentido, aunque no sea ni buscado ni querido directamente.

No obstante, desde el punto de vista moral no tiene la misma gravedad aprovechar los cadáveres de embriones injustamente muertos, que destruir embriones vivos. En el primer caso es una cooperación voluntaria a un mal, no asimilable sin más al uso de

---

<sup>23</sup> Barberi T, Willis LM, Socci ND, Studer L (2005) Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Medicine* | www.plosmedicine.org 2, 6| e161 0559.

<sup>24</sup> cfr. por ejemplo Cowan C A et al. (2004) Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N. Engl. J. Med.* 350, 1353-1356.

<sup>25</sup> Fong CY, Sathananthan H, Wong P C, Bongso A. (2004) Nine-day-old human embryo cultured *in vitro*: a clue to the origins of embryonic stem cells. *Reproductive BioMedicine Online* 9, 321–325.

<sup>26</sup> Strelchenko N, et al. (2004). Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod.BioMed.* 9, 623-629.

cadáveres humanos como fuente de órganos para transplantes. Es un mal menor a la destrucción directa de los embriones vivos, pero un mal.

Esta cuestión remite a otras dos. En primer lugar, al criterio para detectar si ha acaecido la muerte. El concepto de muerte para el embrión, como para el adulto, es obviamente la pérdida irreversible de la capacidad de funcionamiento armónico y coordinado como unidad. En el embrión precoz la muerte se pone de manifiesto en la pérdida de la capacidad de continuar el ritmo de división celular y el crecimiento unitario siguiendo la organización estructural correspondiente al tiempo de vida.

En segundo lugar, se plantea la duda acerca de si las blastómeras, aisladas del embrión precoz, pudieran adquirir con el cultivo y manipulación *in vitro* carácter totipotencial y generar un nuevo individuo. Es decir, si se da en las condiciones de la manipulación una gemelación múltiple artificial que genere un nuevo embrión, que sería destruido a continuación. Los datos existentes de experimentos con animales permiten conocer las condiciones necesarias para que produzca una gemelación múltiple. Las blastómeras se multiplican *in vitro*<sup>27</sup> y una blastómera puede hacerse totipotente y desarrollarse como embrión<sup>28</sup>, e incluso proseguir un desarrollo postimplantatorio<sup>29</sup> en condiciones muy precisas; concretamente se ha conseguido en animales con un lecho con proteínas de matriz extracelular. Las condiciones requeridas son muy diferentes a las condiciones en las que esa célula crece en cultivo y se multiplica con posibilidad de madurar hacia célula ES. Son dos procesos bien diferentes.

b) Se ha propuesto usar embriones deficientes, concretamente triploides, como fuente de obtención de células ES humanas. A veces una fecundación acaba en un cigoto triploide y, tanto si el pronúcleo en exceso proviene de gameto materno como si proviene del paterno, la gestación no llega a término por un cúmulo de malformaciones; los fetos son abortados espontáneamente ya que de suyo no son viables<sup>30</sup>. En la práctica de la FIV, el 4% de los óvulos inseminados tienen esta anomalía; se han llevado a cabo experimentos encaminados a eliminar el pronúcleo excedente, restaurando de esta forma el estado diploide heteroparental de la fecundación normal; argumentan que dado que *legalmente* no se puede implantar en el útero un embrión manipulado, estos embriones humanos “desechables” una vez normalizados (es decir, curados) podrían usarse como fuente de células ES.

---

<sup>27</sup> Wilton L, Trounson A (1989) Biopsy of preimplantation mouse embryos: development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres *in vitro*. *Biol. Reprod.* 40, 145-152.

<sup>28</sup> Tao T, Niemann H (2000) Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4-, 8- and 16-cell embryos and isolated blastomeres cultured *in vitro*. *Hum. Reprod.* 15, 881-889; Saito S, Niemann H (1991) Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. *Biol. Reprod.* 44, 927-936

<sup>29</sup> Rossant J (1976) Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 36, 283-290; Moore NW, Adams CE, Rowson LE (1968) Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J. Reprod. Fertil.* 17, 527-531; Willadsen S M (1981) The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 15, 165-172; Menino AR, Wright RW (1983) Effect of pronase treatment, microdissection, and zona pellucida removal on the development of porcine embryos and blastomeres *in vitro*. *Biol. Reprod.* 28, 433-446. Niemann H, Reichelt B (1993) Manipulating early pig embryos. *J. Reprod. Fertil.* 48, 75-94; Chan AWS, et al (2000) Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science* 287, 317-319.

<sup>30</sup> Daniel A, et al. (2001) Karyotype, phenotype and parental origin in 19 cases of triploidy. *Prenat Diagn* 21, 1034-1048.

## 2.4 Obtención de las “células madre de *origen* embrionario” de una biopsia del embrión.

La tecnología utilizada para obtener una muestra con la que hacer el diagnóstico genético preimplantatorio (PGD) ha mostrado que es posible sacar una o dos blastómeras del embrión de 3 días y que éste prosiga posteriormente su desarrollo<sup>31</sup>. Este análisis de PGD pretende detectar embriones bien genéticamente ‘anormales’, o que presenten predisposición genética a algún tipo de tara, para desecharlos.

Algunos datos apuntan a que de los embriones desechados como anormales, se puedan obtener células ES normales. De hecho algunas alteraciones parecen corregirse en el desarrollo temprano<sup>32</sup>. Un trabajo reciente<sup>33</sup> muestra la obtención de células ES desde una sola blastómera sacada de un embrión de ratón de ocho células y que esa manipulación no afecta al desarrollo. El trabajo lo dirige Robert Lanza y la difusión a los medios de comunicación se sitúa de pleno en la línea de lo que se ha llamado la “obsesión por las células madre embrionarias”. Forma parte de las campañas dirigidas a conseguir fondos públicos de la administración Bush de las que Robert Lanza es uno de los promotores. Esta propuesta ni tiene utilidad ni resuelve el problema ni técnico ni ético del uso de embriones para terapia regenerativa. La técnica de obtener células madre embrionarias desde una sola célula sacada al embrión de ocho no está validada, ni está asegurado que la biopsia no afecte al embrión. Más aún ¿puede pensarse seriamente que una clínica de FIV ofrezca biopsias de los embriones en cultivo preparados para transferirlos a su madre?

Es obvio que una intervención de riesgo, como ésta, para investigar un potencial beneficio futuro de terceros no puede estar justificada ni legal ni éticamente. Incluso, si se plantease como objetivo guardarlas en un banco de células autólogas por si el propio embrión las necesitara después, no deja de formar parte de esa gran falacia vertida a la sociedad: las células madre de origen embrionario ni sirven para curar ni son necesarias para curar.

*En conclusión, una investigación que parta de embriones humanos, sea cual sea el estado de éstos, no está justificada éticamente puesto que no va en beneficio de la vida y salud del propio embrión.*

## 3. Obtención y potencial uso terapéutico de células madre del tipo embrionario.

Inicialmente se planteó la obtención de células madre de origen embrionario con dotación genética del paciente mediante la tecnología de clonación a fin de evitar los problemas de rechazo inmunológico cuando las células fuesen transferidas al enfermo<sup>34</sup>.

---

<sup>31</sup> Handyside A H, et al. (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344, 768–770; Staessen C, et al. (2004). Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 19, 2849-2858.

<sup>32</sup> Check E (2005) Biologists forced to reassess embryo test. *Nature* 437, 1075.

<sup>33</sup> Cheng Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Jonson J, Meisner L, Lanza R (2005) Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature*, doi:10.1038/nature04277.

<sup>34</sup> Rhind SM, Taylor JE, De Sousa PA, King TJ, McGarry M & Wilmut I (2003) Human cloning: can it be made safe? *Nature Review Genetics* 4, 855–864.

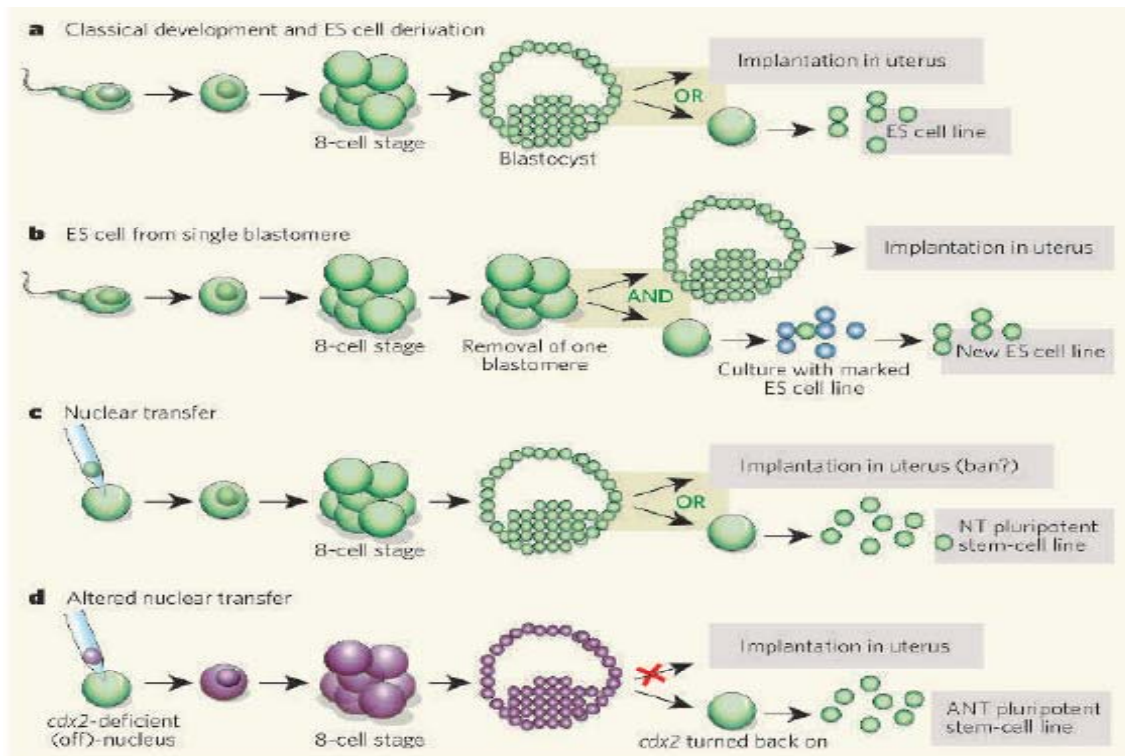
Más tarde se ha visto que no es necesario obtener un clon humano en estado embrionario para ello.

### 3.1. Obtención de las células madre del tipo embrionario desde óvulos reconstruidos por transferencia nuclear.

Distinguimos el término *embrión gamético* (generado por fecundación de gametos) de *embrión partenogénico* (obtenido por activación de un óvulo) y de *embrión somático* (obtenido por transferencia del núcleo de una célula somática a un óvulo desnucleado). El primero es un individuo de la especie sea cual sea el origen, natural o artificial, de la fusión de los gametos. El segundo no es un verdadero embrión, sino lo que se ha denominado “mola” o “huevo huero”. La realidad del tercero depende de que se haya conseguido, o no, una reprogramación del material genético desde el estado maduro de la célula somática donadora hacia el estado totipotente del genoma del cigoto. Del “producto” obtenido en los dos últimos casos por manipulación del gameto femenino es posible aislar “células madre del tipo embrionario”, con características de célula inmadura y con dotación genética de óvulo o de célula somática. Y en ambos se requieren óvulos humanos como material de partida.

#### 3.1.1. Transferencia nuclear

Se trata de conseguir células madre del tipo embrionario mediante la tecnología de transferencia nuclear desde una célula somática, más o menos indiferenciada, a un óvulo desnucleado. La figura (tomada de un artículo de opinión de Weissman) compara el uso de embriones gaméticos para obtener ES, con dos técnicas de producción de embriones somáticos por transferencia nuclear, para obtener ntES.



**Figure 1 | Producing pluripotent stem-cell lines.** **a**, The classical derivation of embryonic stem (ES) cells destroys the embryo from which they are derived. **b**, Lanza and colleagues<sup>1</sup> have used a modified method that does not compromise the embryo, but is not donor-specific. **c**, Donor-specific pluripotent stem cells can be made using nuclear transfer (NT) techniques. **d**, An altered nuclear transfer (ANT) method developed by Meissner and Jaenisch<sup>2</sup> blocks expression of the *cdx2* gene until the blastocyst stage, making it unable to implant.

En este tipo de manipulación es esencial distinguir de qué especie se trata, para conocer cual es la entidad del “artefacto” conseguido. Una clonación requiere la transferencia nuclear más la reprogramación para alcanzar un individuo en estado embrionario o a término del desarrollo. Tal reprogramación es muy diferente según la especie de mamífero de que se trate.

Por el momento se han obtenido clones desde células de adulto de siete especies de mamíferos, con la notable excepción de primates<sup>35</sup>. En primates no humanos y en humanos, sin una reprogramación adecuada, no se ha llegado a obtener un individuo sino agrupaciones celulares o *estructuras embrioides*. Algunas de las células que forman esas agrupaciones expresan los genes propios de las células madre de origen embrionario puesto que derivan de la multiplicación de un óvulo activado, que se comporta en algunos aspectos de forma semejante a un óvulo fecundado. Sin embargo, carece de la organización unitaria de un individuo. No hay en marcha un principio vital que integre de forma coordinada el desarrollo; no se ha puesto en marcha el programa de desarrollo debido al estado del genoma procedente de la célula somática.

La eficacia de la clonación de un mamífero es muy baja. La falta de éxito se debe a pérdidas en las etapas tempranas de desarrollo y también a pérdidas en los estadios pre- y perinatal, debidas a anomalías en la placenta, y problemas inmunológicos, respiratorios o renales<sup>36</sup>.

La razón principal, tanto de la baja eficiencia en el desarrollo como de la presencia de anomalías, es la expresión alterada de una serie de genes por fallo del proceso de metilación del DNA<sup>37</sup> que origina una incompleta reprogramación del DNA del núcleo donante; esto es, la transferencia de un núcleo a un oocito no logra en muchos casos la reprogramación del mensaje genético. La activación de un óvulo reconstruido o un nucleóvulo no siempre acaba en un cigoto; y por ahora no se ha logrado que ocurra en ninguno de los más de mil intentos realizados con primates.

*Por ahora, la técnica de transferencia nuclear sin reprogramación aplicada a primates supone la obtención de células madre del tipo embrionario sin clonación del individuo. Ahora bien, esta tecnología no pasa otros exámenes técnicos ni éticos.*

---

<sup>35</sup> National Academy of Sciences (2002) *Scientific and Medical Aspects of Human Reproductive Cloning* Natl. Acad. Press, Washington, DC

<sup>36</sup> Renard JP, Chastant S, Chesne P, Richard C, Marchal J, Cordonnier N, Chavatte P, Vignon X (1999) Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 353, 1489-1491; Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME (2000) Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biology of Reproduction* 63, 1787-1794; Kubo M (2001) Pathology of diseases in calves cloned by nuclear transfer. *Proceedings of the International Workshop on Current Status and Perspectives in Cloning and Related Studies*, Tsukuba, pp. 8; Tanaka S, Oda M, Toyoshima Y, Wakayama T, Tanaka M, Yoshida N, Hattori N, Ohgane J, Yanagimachi R, Shiota K (2001) Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biology of Reproduction* 65, 1813-1821.

<sup>37</sup> Rideout WM, Eggan K, Jaenisch R (2001) Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293, 1093-1098; Lee J. (2002) Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* 129, 1807-1817; Mager J, Montgomery ND, Pardo-Manuel de Villena F, Magnuson T (2003) Genome imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein Eed. *Nature Genetics* 33, 502-507; Rideout WM, Eggan K, Jaenisch R (2001) Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293, 1093-1098.

1) En primer lugar la tasa de obtención de células ntES es muy baja, como se muestra en la tabla. Un total de 2.560 oocitos reconstruidos (a partir de un número mucho más elevado de óvulos usados) aportan un total de 39 líneas celulares ntES. Es decir la eficacia de línea producida por transferencia nuclear lograda es del orden de un 0.15%.

Table 1. Efficiency of n+ES cell derivation

Ref.	Reconstructed oocytes	Blastocysts	ntES cell lines	Efficiency, %	
				Per oocyte	Per blastocyst
7	362	10	1	0.3	10
9	1,016	398	35	3.4	8.8
10	980	41	2	0.2	5
11	202	27	1	0.5	4
Total	2,560	476	39	0.15	8.2

Los datos se refieren a las tres especies en que se ha realizado transferencia nuclear a fin de obtener ntES: ratón, mono y humanos. Esto conlleva además de problema técnico un problema ético: el uso en cantidades desproporcionadas de óvulos humanos. Nos referiremos después a esta cuestión.

2) Los datos disponibles no permiten garantizar un posible uso terapéutico de estas células. Nos situamos pues en un campo de investigación interesante sin duda, pero no en la órbita de tratamientos a un plazo razonable. Por otra parte el precio de un tratamiento basado en células ntES con la dotación genética del paciente lo hace implantable.

a) En ratón, un mamífero que pudo ser clonado en 1998<sup>38</sup>; se ha aislado células ntES tras una transferencia nuclear<sup>39</sup> y se han usado para tratamiento terapéutico en animal modelo<sup>40</sup>, pero que no es extrapolable a humanos. En ratón el equipo de Ruddolf Jaunisch ha conseguido en 2004 clones derivados del núcleo de una neurona olfatoria (Nature 2004, DOI: 10.1038/nature02375).

b) En primates, tras cerca de 800 intentos, no se ha conseguido la reconstrucción del embrión, ni del oocito<sup>41</sup>.

c) Un primer experimento de transferencia de núcleos procedentes de fibroblastos de la piel o de células del *cumulus oophorus* a oocitos humanos<sup>42</sup> no tuvo eficacia: ninguna

<sup>38</sup>Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998) *Nature* 394, 369–374; Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry ACF, Studer L, Mombaerts P (2001) Differentiation of Embryonic Stem Cell Lines generated from Adult somatic Cells by Nuclear Transfer. *Science* 292, 740–743.

<sup>39</sup>Munsie MJ, Michalska A E, O'Brien CM, Trounson A O, Pera MF, Mountford PS (2000) *Curr. Biol.* 10, 989–992.

<sup>40</sup>Hochedlinger, K. & Jaenisch, R. (2003) *N. Engl. J. Med.* 349, 275–286; Mombaerts P (2003) Therapeutic cloning in the mouse. *PNAS*, 100, 11924–11925; Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, Studer L (2003) Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nature Biotechnology* 21, 1200–1207.

<sup>41</sup>Simerly C, Dominko T, Navara C, Payne C, Capuano S, Gosman G, Chong KY, Takahashi D, Chace C, Compton D, Hewitson L, Schatten G (2003) Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science* 300, 297.

<sup>42</sup>Cibelli JB, Kiessling AA, Cunniff K, Richards C, Lanza RP, West MD (2001) Somatic cell nuclear

de las células obtenidas mostró capacidad de desarrollo embrionario<sup>43</sup>. Se partió de 71 óvulos de 7 mujeres jóvenes, que tuvieran al menos un hijo biológico y de ellos usaron 57 que eran maduros.

El equipo de investigadores de Corea del Sur, en asociación con Cibelli de la ACT, consiguieron en 2004 una línea celular de células madre del tipo embrionario de mujer<sup>44</sup>. En el segundo experimento, publicado en mayo de 2005, mejoran la técnica al usar óvulos de chicas más jóvenes y consiguen un mayor rendimiento<sup>45</sup>: 11 líneas celulares algunas de ellas con el núcleo de célula somática de varón con alguna enfermedad. La capacidad de que algunas células alcancen características de célula del tipo embrionario es dependiente de la “calidad” del óvulo usado; ello es debido a que el constructo resultante de la transferencia nuclear requiere componentes del citoplasma para multiplicarse y expresar genes de células embrionarias con independencia del núcleo.

### 3.1.2. Transferencia nuclear alterada (ANT)

La idea de modificar la técnica de transferencia nuclear (un procedimiento conocido como “Transferencia nuclear alterada”, ANT) fue sugerida por Hurlbut<sup>46</sup> como una forma “éticamente aceptable” de conseguir células madre del tipo embrionario creando un embrión clónico deficiente y por ello incapaz de implantarse en la madre. La premisa de esta propuesta es inactivar un gen crucial para el desarrollo del trofoectodermo. Jaenisch aceptó la propuesta de comprobar si de un ratón clónico deficiente podrían obtenerse células ntES capaces de diferenciarse y madurar. La prueba en ratón ha tenido éxito.

La estrategia ha consistido en: 1) modificar el material genético del núcleo de una célula de ratón recién nacido, en concreto de una célula inmadura de la piel, mediante lo que se denomina “interferencia con RNA”; es decir, han introducido un RNA que es copia complementaria de un gen, el gen llamado Cdx2, con lo que se consigue bloquear su expresión; 2) a continuación ese núcleo alterado, con un gen que no puede expresarse, se transfiere a un óvulo desnucleado y se activa el óvulo reconstruido para que inicie el proceso de desarrollo de un clón que será “deficiente”. La deficiencia consiste en que cuando llega a la fase de ocho células necesitaría usar ese gen que le han bloqueado a fin de producir las células que forman la envoltura (el llamado trofoblasto) imprescindible para anidar en un útero y formar la placenta. Sin embargo, las otras células que van a dar la masa interna, y de las que pueden derivarse las células madre embrionarias no necesitan este gen y son normales. De un total de 526 óvulos a los que se les ha transferido un núcleo, 61 han avanzado el desarrollo hasta los estados en que poseen las células deseadas, el estado de mórula y de blastocisto, de las que es posible

---

transfer in humans: Pronuclear and early embryonic development. *J. of Regenerative Medicine* 2, 25-32.

<sup>43</sup> Adam D (2001) First human clones get a cool response. *Nature* 414, 477.

<sup>44</sup> Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB, Moon SY (2004) Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 303, 1669–1674.

<sup>45</sup> Wang. et al. (2005) Patient-Specific Embryonic Stem Cells Derived from Human SCNT Blastocysts. *Science* 308, 1777-1783. Al mismo tiempo el equipo de Miodrag Stojkovic describía en la revista *Reproductive&Biomedicine Online*, una transferencia nuclear dirigida a obtener células ntES humanas.

<sup>46</sup> Hurlbut WB (2005) Altered nuclear transfer as a morally acceptable means for the procurement of human embryonic stem cells. *Perspect. Biol. Med.* 48, 211-228.

obtener células madre del tipo embrionario con la dotación genética del ratón elegido como donador del núcleo.

La tecnología de ANT es una simple variante de la transferencia nuclear y no una alternativa que resuelva el dilema ético de una posible clonación humana para destruir el clón y usar sus células. Es decir, si hipotéticamente los procedimientos actuales de transferencia nuclear dieran accidentalmente en algún caso un verdadero embrión humano clónico, la alteración nuclear no impediría que se generase, sino sólo conseguiría malformar al embrión haciéndolo inviable. Si la tecnología de ANT diera un embrión enfermo e inviable pero embrión tendría la misma carga moral que la clonación terapéutica. La cuestión ética respecto a la transferencia nuclear sigue siendo la misma<sup>47</sup>.

Como el propio Jaenisch ha publicado<sup>48</sup>, y repite en este artículo, los datos disponibles muestran que la simple transferencia nuclear no es suficiente en el caso de humanos, y de los demás primates, para generar un verdadero embrión clónico. En efecto, los pasos, que han sido suficientes para crear un clon (la oveja Dolly y unos pocos animales, ratones, etc.) es sólo un primer paso necesario pero no suficiente para organismos tan complejos como los primates. En este sentido, alterar el núcleo a transferir sería poner una barrera además de las que ya pone la naturaleza en el caso de que alguna vez pudiera arrancar a vivir un verdadero individuo. Ahora bien, la cuestión no es tan sencilla, porque si alguna vez se produjera un verdadero embrión humano clónico la alteración, por ATN, le convertiría en un embrión clónico de ocho células enfermo o malformado; es decir, vivo pero inviable.

Más a más, no se sabe si el bloque de un gen como el CDX2 tiene en humanos el mismo efecto de impedir la implantación que en el ratón<sup>49</sup>. Habría que comprobarlo en primates ¿o se va a probar la implantación de embriones deficientes, o rarezas celulares, en mujeres? También habría que asegurar que no se corre el riesgo de que la manipulación genética conlleve otros riesgos añadidos. Las características biológicas y moleculares con relación a su posible uso terapéutico son las mismas que las de las células derivadas de embriones procedentes de una fecundación<sup>50</sup>. Sin embargo, en este caso aparece un nuevo factor de riesgo: el uso de vectores retrovirales para la inserción del gen da la posibilidad de mutagénesis y activación de oncogenes que induzcan leucemia<sup>51</sup>, aunque la posibilidad sea realmente remota.

---

<sup>47</sup> The President's Council on Bioethics. Alternative sources of human pluripotent stem cells. [Online] <http://www.bioethics.gov> (2005); Melton DA, Daley GQ, Jennings CG (2004) Altered nuclear transfer in stem-cell research—a flawed proposal. *N. Engl. J. Med.* 351, 2791-2792.

<sup>48</sup> Jaenisch R (2004) Human cloning, the science and ethics of nuclear transplantation. *N. Engl. J. Med.* 351, 2787-2791.

<sup>49</sup> Adjaye J, et al. (2005) Primary differentiation in the human blastocyst: Comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells. *Stem Cells* doi:10.1634/stemcells.2005-0113; Hyslop LA et al. (2005) Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* 23, 1035-1043.

<sup>50</sup> Brambrink T, Hochedlinger K, Jaenisch R (2005) Gene expression in embryonic stem cells from cloned and fertilized embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (submitted).

<sup>51</sup> Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma I M (2002) Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2140-2145; Hacein-Bey-Abina S, et al. (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.

### 3.2. La activación partenogénica de un óvulo permite producir células del tipo de las madre embrionarias.

Los óvulos de mamíferos pueden activarse artificialmente<sup>52</sup> empleando una variedad de estímulos y originar células diploides, por inhibir la eliminación del segundo cuerpo polar, o induciendo su entrada después de la expulsión. Se conoce que los óvulos partenogénicos de mamíferos no llegan a desarrollarse a término como un embrión: no lo son de hecho. La activación de un óvulo se distingue de la realidad cigoto principalmente en que carece de la impronta paterna del genoma. Esto ha quedado claramente esclarecido cuando ha llegado a nacer un ratón de una “partenogénesis más reprogramación”: reconstruyen un cigoto sobre la base de mezclar la dotación genética haploide normal de un óvulo y la de otro al que modifican la impronta para cambiarla de materna a paterna<sup>53</sup>.

Sin embargo, las células partenogénicas son capaces de diferenciarse hacia células madre del tipo embrionario. Así, la división de oocitos activados ofrece una vía de obtención de células madre embrionarias. En el año 2002 se realizó el experimento de inducir a división oocitos de Macaco y las células obtenidas, del tipo ES se immortalizaron como líneas celulares y posteriormente se convirtieron en neuronas, células musculares o grasas<sup>54</sup>.

### 3.3. La cuestión de los óvulos humanos y alternativas.

En cualquier caso estas tecnologías, que pueden aportar células madre embrionarias sin crear ni destruir embriones, parten de óvulos humanos, lo que supone una manipulación injustificada de mujeres, sometidas a un tratamiento de hiperovulación para ser donantes. Además una investigación, o posibles procedimientos terapéuticos, partiendo de tal material es muy poco realista<sup>55</sup>.

Para obviar esta dificultad el equipo de Guisen Sheng de China ha hecho la transferencia del núcleo de una célula somática humana al oocito desnucleado de coneja<sup>56</sup>. Sin embargo, y aunque no se trate de una célula híbrida y mucho menos de un híbrido hombre-animal, para algunos, mezclar material humano con el de otra especie, resulta ofensivo. En todo caso, está por averiguar si las células crecen a largo plazo y si el material genético mitocondrial del óvulo animal es compatible con el nuclear humano.

Los esfuerzos se concentran en desarrollar oocitos humanos desde otras células. Se han propuesto dos sistemas. Uno consiste en fusionar una célula somática con otra inmadura

---

<sup>52</sup> Ozil JP (1990) The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development* 109, 117-127; Vitullo AD, Ozil JP (1992) Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Developmental Biology* 151, 128-136; Ozil JP, Huneau D (2001) Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca<sup>2+</sup> signal regime on development. *Development* 128, 917-28.

<sup>53</sup> Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Sung Park E, Seo Jeong-Sun, Ogawa H (2004) Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature* 428 860-864.

<sup>54</sup> Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB et al. *Science* 295, 819, 2002; Vrana KE, Hipp JD, McCool BA et al. (2003) Nonhuman primate parthenogenetic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100, 11911-11916;

<sup>55</sup> Birmingham K (2003) The move to preserve therapeutic cloning. *Journal of Clinical Investigation* 112 1600-1601.

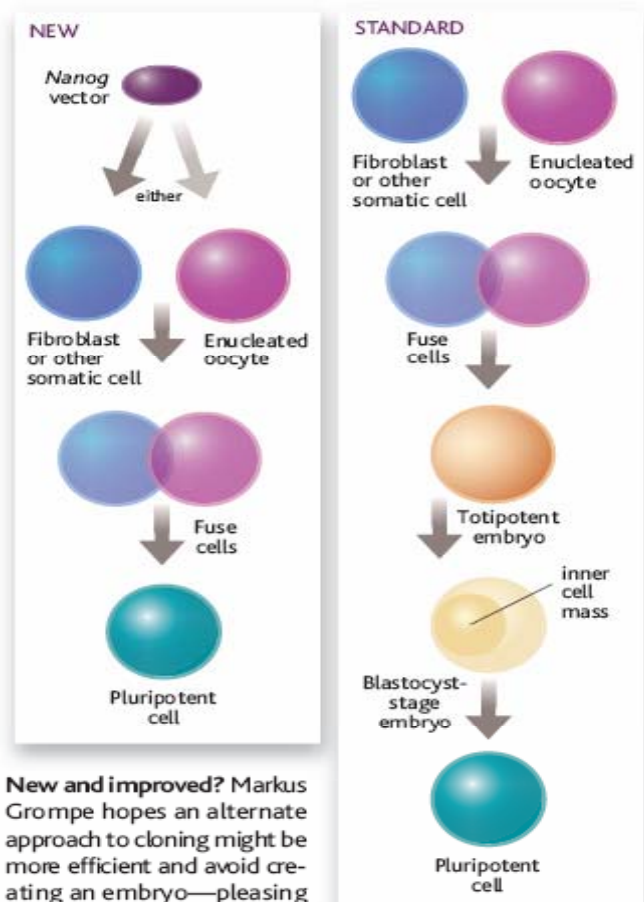
<sup>56</sup> Chen et al. (2003) *Cell Res* 13, 251-263; Solter D. (2003) New paths to human ES cells? *Nature Biotechnology* 21, 1154-1155.

desnucleada del tipo ES. La técnica se ha probado con éxito en ratón<sup>57</sup>. Las líneas ES crecen en principio de forma indefinida pero remite de nuevo a la cuestión del origen de éstas en la destrucción de embriones.

Por otra parte, se busca diferenciar a oocitos células madre pluripotenciales de la médula ósea. El equipo de Jonathan Tilly, en Boston, ha conseguido producir óvulos desde células de la medula ósea de ratón (Cell, 122, 303-315, 2005).

#### 4. La fusión celular como sistema de rejuvenecimiento de células somáticas al tipo embrionario.

La fusión celular se sitúa en la línea de investigación que tiene como primer objetivo conseguir células madre que lleven los genes de un enfermo. De esta manera se podría estudiar en qué medida defectos de algunos genes causan la enfermedad y en qué momento del desarrollo embrionario del paciente se manifiestan. Un segundo objetivo, a más largo plazo, es conseguir esas células madre compatibles, a fin de que pudieran hipotéticamente transferirse al paciente para sustituir a las destruidas por la enfermedad. En este sentido se presenta como alternativa a la transferencia nuclear sin usar óvulos, como muestra la figura.



<sup>57</sup> Hubner K, Fuhrmann G, Christenson L K, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, Boiani M, Schöler H R (2003) *Science* 300, 1251–1256.

Se ha logrado “rejuvenecer” células de la piel mediante su fusión con células madres obtenidas a partir de embriones<sup>58</sup>. La célula híbrida formada mantiene la dotación genética de las dos. El análisis muestra que el material genético de la célula de la piel se reprograma con los componentes de la célula embrionaria de manera que la célula mixta adquiere propiedades de célula madre del tipo embrionario. La curiosa célula se multiplica, adquiere el carácter pluripotente, forma conglomerados celulares iguales cuando crecen en el laboratorio que maduran y se diferencian hacia células de los tres tejidos que constituyen un embrión en desarrollo. Esto es debido a que expresa los genes de la pluripotencialidad, que avisan a la célula para que permanezca joven y con posibilidad de seguir el camino que se le marque desde fuera, a diferencia de las células de la piel.

El trabajo es aún preliminar, ya que no se ha podido retirar el DNA de la célula madre embrionaria. Habrá que ver si es factible y, si una vez eliminado, la célula mixta conserva el estado reprogramado. La fusión celular no es fácil desde el punto de vista técnico; en este experimento se han requerido varios millones de células madre embrionarias, que a su vez proceden de embriones destruidos. No estaría por tanto, justificado como procedimiento ya que sigue siendo una investigación consumidora de embriones. En esta misma línea se han reprogramado células inmaduras NSCs por fusión con ES mediante fusión<sup>59</sup>.

Ahora bien, los experimentos de fusión abren otras perspectivas. Se podría tratar de rejuvenecer la célula introduciendo en ella los componentes moleculares que efectúan la reprogramación y que están presentes en otras células madre muy jóvenes de adulto. De hecho, con anterioridad se había conseguido reprogramar fibroblastos humanos<sup>60</sup> inyectándoles el citosol de linfocitos T; las células reprogramadas responden y funcionan como linfocitos T.

*Las técnicas que permitan obtener células madre del tipo embrionario y con dotación genética específica, sin usar embriones ni óvulos humanos, se presentan como los únicos métodos justificables éticamente. En principio, serían tanto la fusión celular entre una célula somática y otra indiferenciada, como la inyección a la célula somática del citoplasma de una célula indiferenciada, o los componentes reprogramadores aislados.*

## Conclusiones

1. Las “células madre de origen embrionario” (hES) por su propia naturaleza, tienen gran capacidad de crecimiento y la información genética de las células de un embrión temprano. Los experimentos realizados en modelos animales ponen de manifiesto que no son aptas para uso terapéutico. No se ha logrado una tecnología eficiente para aislarlas, cultivarlas y mantener estables las líneas celulares derivadas de ellas, por lo que carecen también de interés para investigación.

---

<sup>58</sup> Cowan Ch A, Atienza J, Melton DA, Eggan K (2005) Nuclear Reprogramming of Somatic Cells After Fusion with Human Embryonic Stem Cells. *Science* 309, 1369-1372.

<sup>59</sup> Do JT, Schöler HR (2004) Nuclei of Embryonic Stem Cells Reprogram Somatic Cells. *Stem Cell*, 22, 941-949.

<sup>60</sup> Hakelien AN, Landsverk HB, Robl JM, Skalhogg BS, Collas P (2002) Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nature biotechnology* 20, 460-466.

2. No tiene justificación ética el empleo de embriones preimplantatorios humanos como fuente de obtención de estas células. A) Es un grave mal destruirlos tanto si son viables como si están enfermos. B) Es un mal tomar una biopsia, incluso si no supusiera un riesgo para el embrión, de la cual derivar células hES porque es una manipulación que no va en beneficio de la vida y salud del propio embrión. C) Es un mal, aunque de grado menor, usar con este fin los embriones muertos. Al haber sido generados *in vitro*, sin el entorno adecuado –la madre– para la óptima supervivencia y desarrollo, se trata de un riesgo de muerte que es consentido, aunque no sea querido directamente.
3. Actualmente la investigación se centra conseguir artificialmente “células madre del tipo embrionario”, que no proceden de embriones pero adquieren las características de crecimiento y diferenciación pluripotencial de las de origen embrionario y su dotación genética es elegida. Las células con dotación genética de un enfermo pueden ser de utilidad para investigación sobre los mecanismos de la enfermedad. En el caso de que tuvieran algún tipo de utilidad terapéutica, y fuera factible producirlas para cada enfermo, podrían obtenerse en las cantidades adecuadas y al ser autólogas no conllevarían rechazo inmunológico.
4. Existen problemas técnicos y éticos para la obtención de este tipo de células que pueden ser solucionados, por lo que debería avanzarse más con los estudios en animales. A) Un tipo de procedimientos se dirige a conseguir óvulos reconstruidos con dotación genética de un enfermo bien por transferencia nuclear sin reprogración genética –diverso de una clonación– bien por transferencia nuclear alterada, o por activación partenogénica de un óvulo. En todos los casos se requieren óvulos humanos lo que supone una manipulación injustificada de mujeres, por lo que hay que solucionar la fuente de material de partida. B) Como alternativa al uso de óvulos se plantea la fusión entre una célula somática del enfermo y otra inmadura –por ahora se ha usado una ES- que le permita rejuvenecer su estado maduro y crecer y diferenciarse. La técnica no está validada aún y tendría que poder sustituir la ES por una célula madre que no fuera de origen embrionario, para que fuera éticamente justificable. C) Una alternativa al uso de embriones y de óvulos, como material de partida para obtener células de este tipo, es el rejuvenecimiento de la célula somática introduciendo en ella los componentes moleculares que efectúan la reprogramación; es una vía poco explorada aunque hay datos positivos de sustitución del citoplasma de una célula por el de otra.