

## EL CULTIVO DE LAS CÉLULAS EMBRIONARIAS PARA FINES DE INVESTIGACIÓN

Patricia OSTROSKY\*

Las células madre, troncales o primordiales son células que combinan el potencial de autorreplicación con el potencial de poder generar células diferenciadas. Estas células se encuentran en el embrión, en el feto, en el cordón umbilical, en la placenta y también en el adulto.

Las células troncales fetales son células primordiales en el feto que eventualmente se pueden desarrollar en varios órganos. La investigación con células fetales ha sido limitada a unos cuantos tipos de células, como son las troncales de neuronas, las troncales hematopoyéticas y las progenitoras de islas pancreáticas.

Las células troncales en el adulto son células indiferenciadas que se encuentran en tejidos diferenciados, como en la médula ósea o en el cerebro del individuo adulto. Pueden renovarse haciendo copias idénticas de sí mismas a lo largo de la vida del organismo o especializarse en células del tejido de origen. Las fuentes de células troncales en el adulto son la médula ósea, la sangre, el ojo, el cerebro, el músculo esquelético, la pulpa dental, el hígado, la piel y el páncreas. La células troncales del adulto son raras, difíciles de identificar y purificar; cuando se cultivan difícilmente se mantienen en estado indi-

\* Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

ferenciado. Las evidencias indican que son multipotenciales, y es necesario seguir evaluándolas.

En el adulto, las células que han demostrado el gran potencial de las células troncales son las células hematopoyéticas. Los trasplantes de médula ósea han incrementado la sobrevida de los pacientes con leucemia y otros tipos de cáncer. Desde hace más de 40 años se identificó a la célula troncal hematopoyética (CTH), que tiene la capacidad de renovarse y diferenciarse en los diversos tipos de células sanguíneas. Las CTH se encuentran en la médula ósea, el hígado fetal, el bazo, el cordón umbilical y la placenta. Existe cada vez más evidencia de que la CTH puede dar origen a células de hígado, corazón, tejido muscular y células similares a neuronas. Quizá, la gran utilidad de las células hematopoyéticas sea la responsable de la esperanza que se tiene de que las células troncales puedan ser usadas para muchas enfermedades. Sin embargo, son las células embrionarias las que por su naturaleza tienen el mayor potencial de desarrollo.

El desarrollo del embrión se inicia con la fertilización del óvulo por el espermatozoide, dando origen al zigoto. El cual, a su vez, dará origen a aproximadamente  $10^{14}$  células; es difícil pensar en billones de células todas con un origen común. Las primeras ocho células que se producen son capaces de generar un embrión y por ello se consideran totipotenciales. Durante la primera polarización se forma el blastocisto, que es un estado que dura del día cuatro al día siete después de la fertilización, y en el que se diferencia en una capa externa generando el trofoblasto, que da origen a la placenta y a una masa interna que después del día siete dará origen a las tres capas de tejido embrionario: endodermo, mesodermo y ectodermo, que formaran todos los tejidos del embrión.

Las células que forman la masa interna de células en el blastocisto pueden extraerse y cultivarse en el labora-

torio para dar origen a las líneas celulares embrionarias, que dependiendo de las condiciones pueden proliferar *in vitro* ilimitadamente o diferenciarse en cualquier tipo de célula. Pero ya no pueden formar un embrión, y en contraste con las células de los primeros estadios se les considera solo pluripotenciales.

La investigación con células embrionarias está en el centro del debate ético, ya que por un lado está su enorme potencial para la regeneración de tejidos, sin embargo por el otro está que en la obtención de células troncales se destruye al embrión.

La historia de las líneas celulares embrionarias (LCE) es reciente. De hecho, las primeras líneas celulares embrionarias fueron obtenidas de ratón en 1881, por Evans y Kaufman; después se lograron obtener de pollo, hámster y cerdo. En 1995, el grupo de James Thomson reporta la obtención de líneas embrionarias de marmoseta, y en 1996 del *mono rhesus*. La obtención de las primeras líneas embrionarias humanas derivadas de blastocistos se reporta el 6 de noviembre de 1998 en la revista *Science*.

Thomson y sus colaboradores, en 1998, reportan haber usado embriones humanos producto de la fertilización *in vitro* con fines reproductivos, que fueron donados por los pacientes. Los embriones fueron cultivados hasta el estadio de blastocisto, se aislaron las masas de células internas logrando obtener cinco líneas celulares. Las líneas mostraron cariotipos normales, una alta actividad de telomerasa, que es una ribonucleoproteína encargada de adicionar los telómeros que tienen programada la vida replicativa de la célula. La actividad de la telomerasa se correlaciona con la inmortalidad de las células. Las LCE crecieron indiferenciadas durante cinco meses y conservaron su potencial de desarrollarse para formar trofoblastos y derivados de las tres capas embrionarias.

Las LCE expresan marcadores de superficie, como son la fosfatasa alcalina y antígenos específicos embrionarios (SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60 TRA1-81 y no expresan SSEA-1), diferentes de los antígenos embrionarios que expresan las LCE de ratón (expresan SSEA-1 pero no expresan el 3 y el 4). Reportes más recientes señalan que las LCE se han replicado más de 400 veces y durante dos años no han mostrado alteraciones cromosómicas, en contraste con los cultivos de líneas embrionarias cancerosas que se usan en los laboratorios y que muestran múltiples alteraciones cromosómicas.

Cabe señalar que aun los métodos para la obtención de las líneas son poco efectivos; por ejemplo, en un estudio reportado en el 2001 se obtuvieron 162 óvulos donados por 12 voluntarias, 110 se pudieron fertilizar y 50 llegaron al estado de blastocisto, pero sólo se establecieron 3 LCE.

Dado que las líneas humanas son tan recientes, gran parte del conocimiento que se tiene acerca de LCE se deriva de los estudios en ratón. Las LCE derivadas de blastocistos de ratón han sido estudiadas por dos décadas. Las LCE humanas crecen más lento que las de ratón, el tiempo de doblaje es de 36 horas vs. 12 horas, respectivamente.

Pocos son los factores que se conocen regulan la autorreplicación de las LCE humanas. Éstas, para mantenerse indiferenciadas, requieren crecer en una capa de fibroblastos que no proliferan, y se considera que proveen de un factor que suprime la diferenciación o promueve la renovación de las células pluripotenciales. El factor inhibidor de leucemia (LIF) es una citoquina relacionada con la interleucina 6, que inhibe la diferenciación de las LCE murinas y puede sustituir a la capa de fibroblastos. Las LCE humanas para proliferar sin diferenciarse requieren la capa de fibroblastos y el 20% de suero fetal o medio con-

dicionado obtenido de estas células, en el que se encuentra el factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGFb). Cuando se remueven las células de la capa de fibroblastos y se crecen en suspensión, las LCE se agregan formando aglomerados de células que se llaman cuerpos embriodes, que parecen ser capaces de diferenciarse en tipos variados de células; cabe señalar que los reportes se basan en diferencias morfológicas y activación de ciertos genes que producen proteínas específicas de los diferentes tipos celulares. Se ha reportado la expresión de genes asociados con la función hepática y pancreática, y que de los cuerpos embriodes se han obtenido cardiomiositos que se contraen rítmicamente, células epiteliales pigmentadas y no pigmentadas y células neurales con dendritas.

Las LCE mantienen el potencial de formar las 3 capas germinales embrionarias; al ser inyectadas a ratones inmunodeficientes forman teratomas, que tienen epitelio gastrointestinal que se deriva del endodermo; cartílago, hueso y músculo liso y estriado derivados del mesodermo, y epitelio neural, ganglio embrionario y epitelio escamoso estriado derivado del mesodermo. Cabe señalar que la formación de todos estos tipos celulares pone en evidencia la complejidad del programa genético que depende también del ambiente biológico. Así también se pone en evidencia el peligro potencial de la generación de tumores en ciertos ambientes.

El usar LCE obtenidas de parejas con problemas de esterilidad, plantea algunas dudas acerca del material genético de los donadores. Las LCE también pueden obtenerse por transferencia nuclear, lo que implica la transferencia del núcleo de una célula somática a un óvulo cuyo núcleo ha sido removido. La célula reprogramada inicia la división de manera similar a la que describimos en la formación del embrión, y puede ser utilizada para lo que se ha

llamado clonación reproductiva, o la mal llamada clonación terapéutica, en la que se han cifrado muchas esperanzas al plantearse que se podrán producir células propias de un individuo para ser utilizadas en la reposición de tejidos, y que no producirán un rechazo inmunológico, ya que serán histocompatibles. Sin embargo, existen riesgos que no han sido evaluados, como el hecho de que al usar el núcleo de una célula somática de un individuo ésta pueda portar la mutación que generó la enfermedad, o simplemente por ser un adulto es probable que su DNA tenga una cierta cantidad de mutaciones.

La mayoría de las células contienen el mismo juego de genes, sin embargo son completamente diferentes en forma y función. La regulación epigenética de la activación y represión selectiva de los genes determina las propiedades específicas de cada uno de los alrededor de 200 tipos histológicos de células que tenemos. Sin embargo, no importa cuan diferenciada esté una célula, pues ésta puede ser reprogramada para volver a ser totipotencial. El conocer los mecanismos que regulan esta plasticidad genómica tendrá posiblemente más aplicaciones que la del trasplante de tejidos, ya que nos permitirá manipular las células troncales que tiene el individuo adulto.

Muchas preguntas podrán ser contestadas con estos modelos:

¿Cuáles son los factores genéticos y ambientales dentro del cuerpo que regulan la diferenciación de las células? ¿Qué genes se prenden o se apagan en las diferentes etapas? ¿Qué sustancias se producen que inducen la diferenciación para que las células migren a los sitios que necesitan reparación y cómo las células se ajustan a un determinado tejido?

Tanto la genética como la teratogénesis lograrán grandes avances cuando se pueda contestar, mediante los estudios en las LCE, cómo se producen las malformaciones

e identificar y conocer los mecanismos de teratogénesis. El conocimiento de la biología básica de la célula pluripotencial establecerá el camino para un gran numero de aplicaciones clínicas futuras.

Si bien los estudios de LCE implican la frontera de las ciencias biológicas, aún están en su infancia. Sin embargo, es evidente que nuestra sociedad tiene diversos criterios acerca de cuándo se inicia la vida y del uso de los embriones para investigación, por ello deben también realizarse esfuerzos para investigar plenamente todas las fuentes de células troncales. Sin embargo, dadas las enormes potencialidades que tienen las líneas embrionarias cabe preguntarse ¿cuán ético es no utilizarlas?

## BIBLIOGRAFÍA

- ADVISERS TO THE PRESIDENT OF THE EUROPEAN COMMISSION, "Ethical Implications of Biotechnology. Ethical Aspects of Cloning Techniques", *Journal of Medical Ethics*, 23, 1997.
- AMIT, M. et al., "Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potencial for Prolonged Periods of culture", *Dev Biol*, 15, 2000.
- BURLEY, J., "The Ethics of Therapeutic and Reproductive Human Cloning", *Cell and Developmental Biology*, 10, 1999.
- COMMITTEE ON THE BIOLOGICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS OF STEM CELL RESEARCH, *Stem Cells and Future of Regenerative Medicine*, Washington, National Academy Press, 2002.
- DONOVAN, P. y GEARHART, J., "The End of the Beginning for Pluripotent Stem Cells", *Nature*, 414, 2001.

- LANZENDORF, S. et al., "Use of Gametes Obtained from Anonymous Donors for the Production of Human Embryonic Stem Cell Lines", *Fert Sterl*, 76, 2001.
- LOVELL-BADGE, R., "The Future for Stem Cell Research", *Nature*, 414, 2001.
- MCLAREN, A., "Ethical Considerations of Stem Cell Research", *Nature*, 414, 2001.
- ODORICO, J. et al., "Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines", *Stem Cells*, 19, 2001.
- SOLTER, D., "Mammalian Cloning: Advances and Limitations", *Nature Reviews Genetics*, 1, 2000.
- SURANI, A., "Reprogramming of Genome Function Through Epigenetic Inheritance", *Nature*, 414, 2001.
- THOMSON, J. et al., "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts", *Science*, 282, 1998.
- WOLF, D. et al., "Nuclear Transfer Technology in Mammalian Cloning", *Arch of Medical Res*, 32, 2001.