

CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

Anna Veiga^{1,2}: Directora del Banco de Líneas Celulares del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB).

Begoña Aran¹: Coordinadora del Banco de Líneas Celulares del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB).

Juan Carlos Izpisua Belmonte^{1,3}: Director del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB).

1.- Banco de Líneas Celulares. Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona

2.- Institut Universitari Dexeus. Barcelona

3. - The Salk Institute for Biomedical Studies. La Jolla. USA

Introducción

Las células madre (CM) son células indiferenciadas que pueden encontrarse en embriones (CM embrionarias), algunos tejidos fetales, cordón umbilical, placenta (CM fetales) y en tejidos adultos (CM adultas). Son células pluri o multipotentes (en algunos casos totipotentes) que pueden dar lugar a distintos tipos celulares, dependiendo de su origen y plasticidad. La terapia celular, a través del trasplante de células madre diferenciadas en distintos tipos celulares, puede representar una alternativa terapéutica en enfermedades tales como las alteraciones neurodegenerativas, los accidentes vasculares, las lesiones de médula espinal, el fallo cardíaco y la diabetes mellitus entre otras (Hoffman et al., 2003; Trounson et al., 2005). Pero la medicina regenerativa es solamente una parte del potencial de las CM. Las CM son una herramienta muy importante para el estudio de la biología del desarrollo, la expresión génica y el desarrollo de nuevos fármacos (Pera et al., 2004).

Objetivos

El objetivo de este capítulo es dar al alumno una visión global sobre los tipos, características y propiedades de las células madre pluripotentes, así como sus potenciales aplicaciones en terapia celular considerando los beneficios y posibles riesgos de las mismas.

Esquema del capítulo

1. Células madre pluripotentes
 - 1.1. Células madre embrionarias
 - 1.1.1. Derivación y cultivo de células madre embrionarias (CME)
 - 1.1.2. Caracterización
 - 1.1.3. Diferenciación
 - 1.2. Transferencia nuclear
 - 1.3. Reprogramación celular. Células madre pluripotentes inducidas
 - 1.4. Otras fuentes de células madre pluripotentes
2. Terapia celular
 - 2.1. Rechazo inmunológico
3. Registros de células pluripotentes
4. Ética y legislación
5. Conclusiones

Resumen

Las células madre embrionarias (CME) proceden de la masa celular interna del blastocisto, es decir del embrión de 5-6 días. Sus características principales son la capacidad de renovarse a si mismas indefinidamente (autorenovación) y la capacidad de diferenciarse en las tres líneas germinales del embrión y, por lo tanto, en cualquier tipo celular. Su importancia terapéutica reside en su posible utilidad en el tratamiento de enfermedades producidas por un déficit en la función celular. Numerosos grupos de investigación en todo el mundo están trabajando para conocer los mecanismos de diferenciación, así como técnicas alternativas a la utilización de embriones, para conseguir una terapia eficaz y segura para este tipo de patologías.

Recientemente, se ha conseguido reprogramar células somáticas adultas humanas y convertirlas en células indiferenciadas y pluripotentes con las mismas características que las CME, mediante la transferencia de determinados genes implicados en la pluripotencia. La reprogramación puede suponer una técnica muy útil para la generación de células pluripotentes genéticamente idénticas a cada paciente evitando el rechazo inmunológico cuando se plantee la posibilidad de llevar a cabo terapia celular y

evitando también la utilización de embriones con los problemas éticos que ello puede comportar.

1. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

1.1. Células madre embrionarias

El año 1978 nace en el Reino Unido el primer individuo de la especie humana resultante de una Fecundación in Vitro (Stephoe y Edwards, 1978). Veinte años mas tarde, Thomson y colaboradores (1998) publican la obtención de células madre embrionarias a partir del aislamiento de la masa celular interna (MCI) de embriones humanos, evidenciando que los embriones humanos pueden representar una fuente indefinida de células indiferenciadas para investigación y, en un futuro, para una posible aplicación clínica. Las dos propiedades principales de estas células, su capacidad de autorrenovación y diferenciación, es decir, la capacidad de diferenciarse en las tres líneas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo)(Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000) y por lo tanto en los mas de 200 tipos celulares que existen en un organismo adulto de la especie humana, las convierten en principales candidatas para el tratamiento de patologías producidas por la pérdida de la función celular.

1.1.1. Derivación y cultivo de células madre embrionarias (CME)

Las células madre embrionarias proceden de la MCI de embriones en estadio de blastocisto. Se trata de embriones de 5-6 días con aproximadamente 150-200 células (Figura 1). La masa celular interna, origen de las CME en condiciones de cultivo *in vitro*, es la que daría lugar al feto en condiciones *in vivo*, si el embrión se implanta y la gestación llega a término. El cultivo de esta estructura in vitro sobre una capa de células sustentadoras (*feeders*) permitirá el crecimiento de las células de la MCI (Figura 2). Dichas *feeders* segregan factores que favorecen, junto con la adición de factores de crecimiento al medio de cultivo, el crecimiento de las células de la MCI en estado indiferenciado dando lugar a una línea de CME (Figura 3).

Se han producido numerosas líneas de CME humanas (Allegrucci et al., 2007; Adewumi et al., 2007; Borstlap et al., 2008)(www.hescreg.eu), la mayoría de ellas a partir de embriones procedentes de los programas de Fecundación In Vitro (FIV),

donados por las parejas que ya desean utilizarlos con finalidad reproductiva, ni donarlos a otras parejas y que optan por destinarlos a investigación. Estos embriones normalmente han sido sometidos a un proceso de congelación después de su donación, han de ser descongelados y cultivados hasta el estadio de blastocisto. La supervivencia tras el proceso de congelación/descongelación suele estar alrededor del 60-70%. Aproximadamente un 35% de los embriones cultivados in vitro alcanzan el estadio de blastocisto (Menezo et al., 1992), pero no todos presentan una buena calidad morfológica, algunos presentan un desarrollo retardado, otros se bloquean, presentan fragmentos o una morfología anormal debido a divisiones irregulares (Menezo et al., 1998; Gardner et al., 2000).

La calidad de los embriones utilizados parece ser un factor importante pero no determinante a la hora de optimizar el proceso. Algunos autores han publicado derivaciones de CME a partir de embriones descartados (Mitalipova et al., 2003), de mala calidad (Cowan et al., 2004; Aran et al., 2007; Lerou et al., 2008; Raya et al., 2008) y a partir de embriones bloqueados (Zhang et al., 2006).

La metodología de derivación de CME actualmente es aún empírica. Se utilizan diferentes protocolos en los diversos pasos del proceso, incluyendo o no, el aislamiento de la MCI, la utilización o no de *feeders*. De hecho, el objetivo final es la derivación de CME en cultivos libres de *feeders* (Amit et al., 2004; Klimanskaya et al., 2005), de componentes de origen animal (Genbacev et al., 2005; Li et al., 2005; Elleström et al., 2006; Rajala et al., 2007) y en condiciones químicamente definidas (Li et al., 2005; Lu et al., 2006; Ludwig et al., 2006). Estas condiciones junto con la derivación y cultivo en condiciones GMP (Good Manufactured Practice) son necesarias para un uso seguro de las CME en terapia clínica (Crook et al., 2007).

Algunos autores han sido capaces de derivar líneas de CME a partir de un única célula de un embrión de 8-10 células (Klimanskaya et al., 2006). Mediante una biopsia embrionaria, técnica utilizada normalmente para el diagnóstico genético preimplantacional, es posible aislar una única célula del embrión que una vez sembrada puede dar lugar a una línea de CME. En principio, el embrión no se ve afectado por la biopsia y mantiene su viabilidad, evitando, de esta manera su destrucción y los problemas éticos que ello puede conllevar.

Por otra parte, la utilización de embriones cromosómicamente anormales y portadores de enfermedades genéticas procedentes de ciclos de Diagnóstico Genético Preimplantacional puede ser de utilidad como modelos de diversas patologías (Pickering et al., 2003; Verlinsky et al., 2005 Mateizel et al., 2006).

1.1.2. Caracterización

Una vez derivada una línea celular es necesario evaluar su capacidad de diferenciación. La mayoría de las metodologías empleadas para caracterizar una línea celular incluyen la valoración de la expresión de factores asociados a la indiferenciación.

Normalmente se usa la inmunofluorescencia para analizar una serie de anticuerpos marcadores de superficie normalmente expresados en embriones preimplantacionales como SSEA-3 y SSEA-4 o en células tumorales TRA-1-60 y TRA-1-80. La actividad fosfatasa alcalina, también específica de células indiferenciadas, puede valorarse también mediante anticuerpos de superficie. Además, las CME pueden ser etiquetadas mediante anticuerpos y seleccionadas mediante FACS (fluorescente-activated cell sorting)(Figura 4).

Se analizan también una serie de factores de transcripción que juegan un papel importante en la autorenovación como Oct3/4, Sox-2, Rex-1 Nanog, Lefty-1. La valoración de la expresión génica puede realizarse mediante inmunofluorescencia, FACS o RT-PCR. Los mecanismos moleculares por los que estos factores regulan la autorenovación y pluripotencia son complejos y aún poco conocidos (Hoffman et al., 2005), aunque se ha demostrado que estas células pueden mantener su estado indiferenciado durante años en cultivo. Se han encontrado diferencias en la expresión génica de las distintas líneas de CME (Adewumi et al., 2007), por ello se ha focalizado la investigación en conocer cuales son los genes que normalmente se expresan en las líneas de CME y cuales son específicos de cada línea. Parece ser que muchas de las diferencias que se encuentran en las distintas líneas de CME están mas asociadas a las condiciones de cultivo que a las diferencias genéticas del embrión del cual proceden (Allegrucci et al., 2007).

Para llevar a cabo una exhaustiva caracterización de las líneas es necesario valorar también la capacidad de diferenciación de una línea celular tanto in vitro como in vivo.

La diferenciación in vivo se valora induciendo la formación de teratomas (tumores que contienen distintos tipos celulares), mediante la inyección de CME en ratones inmunodeprimidos, para evaluar si estas células son capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de las tres líneas germinales. La diferenciación in vitro se induce en el laboratorio eliminando las condiciones de cultivo que mantienen las células en estado indiferenciado y favorecen la diferenciación (ver apartado 1.1.3)(Figura 5).

El análisis del cariotipo de la línea celular también es importante, ya que aunque algunos autores han reportado el mantenimiento del cariotipo normal durante mucho tiempo (Buzzard et al., 2004; Caisander et al., 2006), frecuentemente se han observado alteraciones del cariotipo a lo largo del cultivo (Cowan et al 2004; Baker et al., 2007). Algunas trisomías, como las de los cromosomas 12 y 17, puede resultar ventajosas en cultivo y pueden tener cierta tendencia a fijarse (Draper et al., 2004; Spits et al., 2008). Es recomendable realizar un cariotipo de la línea cada 20 pases aproximadamente.

1.1.3. Diferenciación

La diferenciación es el proceso mediante el cual una célula madre indiferenciada se transforma en células especializadas (diferenciadas) de un determinado tipo celular. Durante la diferenciación, ciertos genes son expresados mientras que otros son reprimidos. Este proceso es intrínsecamente regulado gracias a mecanismos epigenéticos de las células. La diferenciación puede afectar a los cambios de numerosos aspectos de la fisiología de la célula como el tamaño, la forma, la polaridad, la actividad metabólica, la sensibilidad a ciertas señales y la expresión de genes. Todos estos aspectos pueden ser modificados durante la diferenciación.

El proceso de diferenciación que tiene lugar en el feto durante el desarrollo embrionario puede imitarse en el laboratorio. Eliminando los factores que ayudan a mantener el estado indiferenciado, fibroblasts growth factor (FGF) o el co-cultivo con feeders o células sustentadoras, se favorece la diferenciación. Unas u otras condiciones determinadas de cultivo dirigirán la diferenciación hacia una u otra línea germinal (ectodermo, endodermo o mesodermo) y de aquí hacia distintos tipos celulares (fig.3). Por ejemplo, añadiendo ácido retinoico al medio de cultivo se favorece que las CME se

diferencien hacia ectodermo y añadiendo ácido ascórbico se induce la diferenciación hacia mesodermo.

En la especie humana se ha obtenido ya diferenciación a células de músculo liso, músculo estriado, cardiomiocitos, células neuronales, células hematopoyéticas, células pancreáticas, células endoteliales, hepatocitos, adipocitos, condrocitos, queratinocitos, trofodermo, entre otras.

La capacidad de proliferación y la diferenciación son complementarias. La CME tiene una capacidad proliferativa muy alta que decrece gradualmente a medida que se van diferenciando hasta que son incapaces de proliferar. Existen estadios intermedios de células precursoras o progenitoras de los distintos tipos celulares que son capaces de proliferar pero han perdido la capacidad de pluripotencia. En estos estadios hay un equilibrio entre la proliferación y la diferenciación (Mountford et al., 2008). Por ejemplo, los precursores hematopoyéticos pueden producir todos los tipos celulares sanguíneos y los precursores neuronales pueden dar lugar a astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (Joannides et al., 2007). La identificación de poblaciones de precursores en muchos tejidos ha permitido el desarrollo de protocolos en múltiples pasos para la diferenciación de determinados tipos celulares. Por ejemplo, se ha demostrado que el método más eficiente para generar células productoras de insulina se compone de una serie de pasos intermedios en los que se producen sucesivos cambios en las condiciones de cultivo. Consiste en diferenciar las CME a mesodermo, endodermo, tubo digestivo primitivo, tubo digestivo posterior, endodermo pancreático y finalmente generando células endocrinas secretoras de hormonas (D'Amour et al., 2006).

Estos sistemas de cultivo y de identificación de poblaciones celulares no se basan únicamente en los conocimientos de la biología del desarrollo sino también en los conocimientos adquiridos al trabajar con estas células. La investigación en CME avanza rápidamente pero los factores genéticos y/o ambientales que controlan tanto su estado indiferenciado como los procesos que permiten la diferenciación a distintos tipos celulares no están completamente establecidos. El papel de los genes promotores del estado indiferenciado y de la diferenciación es un área de investigación en la que se producen continuos avances. Es imprescindible poder controlar y dirigir la diferenciación celular y obtener poblaciones puras de células diferenciadas para plantear una terapia sin riesgo para el paciente y con posibilidades de éxito.

1.2. Transferencia nuclear

Esta técnica, también conocida como clonación, consiste en la producción de un individuo genéticamente idéntico por transferencia del núcleo de una célula somática a un ovocito del cual se ha eliminado el núcleo. Wilmut et al. la utilizaron en 1997 para conseguir el nacimiento de la oveja Dolly. En el caso de la clonación terapéutica, la finalidad no es reproductiva, como en el caso de Dolly, sino la obtención de embriones clonados con los que derivar células madre embrionarias. Una vez obtenido el embrión clonado, se cultiva hasta el estadio de blastocisto para obtener CME a partir de su MCI. Estas CME serían genéticamente idénticas al donante de la célula somática que ha aportado el núcleo, es decir, el material genético. Cualquier célula generada “personalizada” de esta manera no produciría rechazo al ser transplantada al propio paciente (Figura 6).

Se ha conseguido la derivación de CME a partir de embriones obtenidos por transferencia nuclear en el ratón y otros modelos animales. Sin embargo, la SCNT es aún muy poco eficiente y aunque se han obtenido embriones a partir de transferencia nuclear en la especie humana (Stojkovic et al., 2005; French et al., 2008), no se ha conseguido todavía la derivación de CME a partir de los mismos. Se ha descrito la obtención de dos líneas de CME a partir de SCNT en macaco (Byrne et al., 2007). Estos autores sugieren que la transferencia nuclear y la posterior obtención de CME podrían ser factibles en humanos si se resuelve el problema de la falta de ovocitos y que es solo cuestión de tiempo el mejorar la técnica para obtener CME a partir de embriones clonados humanos.

Por otra parte, esta técnica supondría una herramienta muy útil para conocer los mecanismos celulares y moleculares de determinadas enfermedades y poder ensayar nuevas pautas de tratamiento.

1.3. Reprogramación celular. Células madre pluripotentes inducidas

Recientemente se ha demostrado que es posible convertir células somáticas adultas en células indiferenciadas y pluripotentes con las mismas características que las CME, mediante la transferencia de determinados genes implicados en la pluripotencia. Estas células reprogramadas llamadas iPS (induced Pluripotent Stem Cells) han supuesto una

revolución en el campo de la pluripotencia y podrían ser de gran utilidad en la aplicación clínica si se demuestra que es una técnica eficaz y segura.

Inicialmente se necesitó la transducción de 24 genes distintos para conseguir reprogramar células somáticas de ratón y que adquirieran y mantuvieran el estado indiferenciado. Más tarde se consiguió reducir este pool de 24 factores a únicamente combinaciones de 4 (Oct4, Sox2, c-Myc, Lin28 y Klf4) (Takahashi y Yamanaka, 2006). Se ha demostrado también la reprogramación de fibroblastos humanos con algunas variaciones de estos 4 factores (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). La expresión endógena de ciertos factores ha permitido la exclusión de algunos factores del pool. Por ejemplo, se ha demostrado que los fibroblastos expresan c-Myc y que puede prescindirse de él durante la reprogramación (Nakagawa et al., 2008) aunque la eficiencia es menor. Algunas células se han reprogramado con sólo 2 factores. Por ejemplo, se han reprogramado progenitores neuronales solamente con Oct4 y c-Myc o Oct4 y Klf4 (Kim et al., 2008).

Inicialmente se utilizaron retrovirus o lentivirus como vectores para introducir estos factores en la célula, lo que conlleva una integración permanente en el genoma de la célula. Dicha integración del virus supone un obstáculo para su utilización en posibles trasplantes, ya que la integración del virus en lugares al azar del genoma puede desactivar genes importantes o reactivar factores de reprogramación induciendo la formación de tumores (Nakagawa et al., 2008). Por ello se están estudiando otros sistemas de infección con el uso de adenovirus (Stadtfeld et al., 2008; Okita et al., 2008) o mediante la transfección y expresión temporal mediante plásmidos (Okita et al., 2007; Gonzalez et al., en prensa) demostrando evidencias de no integración, lo que supone una técnica más segura para una futura aplicación clínica.

Los primeros ensayos en reprogramación se realizaron con fibroblastos, ya que es un tipo celular fácil de obtener y cultivar, pero actualmente se ha conseguido reprogramar otros tipos celulares. En el ratón; células estomacales (Aoi et al., 2008), pancreáticas (Stadtfeld et al., 2008), linfocitos (Hanna et al., 2008) y progenitores neuronales (Kim et al., 2008). Se han reprogramado también queratinocitos humanos con una eficiencia mucho mayor que al utilizar fibroblastos (Aasen et al., 2008).

Numerosos grupos están investigando los mecanismos de la reprogramación, los distintos sistemas de infección, factores de transcripción, parámetros de expresión, tipos celulares, condiciones de cultivo, etc, para conseguir optimizar la técnica (Maherali and Hochedlinger, 2008). La reprogramación puede suponer una técnica muy útil para la generación de células pluripotentes genéticamente idénticas a cada paciente (paciente-específicas) evitando el rechazo inmunológico y evitando también la utilización de embriones con los problemas éticos que ello puede comportar.

Por otro lado, la generación de iPS a partir de células de pacientes con determinadas patologías puede representar un modelo excelente para la investigación en dichas enfermedades, desarrollo de nuevos tratamientos o incluso una posible aplicación clínica tras repararlas mediante terapia génica. Las enfermedades monogénicas son los mejores candidatos para la terapia combinada con terapia génica y células pluripotentes. Estas células son inmortales en cultivo lo que facilita la reparación génica y su caracterización (Daley et al., 2008). Se han descrito ya 11 líneas de iPS generadas a partir de pacientes con enfermedades degenerativas, metabólicas o cardiovasculares (Park et al., 2008).

1.4. Otras fuentes de células madre pluripotentes

Debido a la dificultad de obtener ovocitos humanos y a los problemas éticos que puede suponer la utilización de embriones para la obtención de CME, se han desarrollado líneas de investigación que permiten la obtención de CM pluripotentes a través de otros tipos celulares o metodologías. Estas metodologías alternativas presentan ventajas e inconvenientes inherentes a su utilización que las hacen mas o menos reproducibles y aplicables (Green, 2007). La fusión de células somáticas y células madre es una de ellas (Cowan et al., 2005; Skelley et al., 2009). Se ha demostrado que las CME son capaces de reprogramar células somáticas adultas tras su fusión, lo que sería una buena vía para crear líneas de CME paciente-específicas para el estudio y tratamiento de determinadas patologías. Sin embargo, existe un problema técnico para la utilización de estas células con fines terapéuticos, la eliminación de los cromosomas de las CME antes o después de la fusión, ya que el resultado de la fusión de ambos tipos celulares da lugar a células tetraploides.

Revazona et al. (2007) han conseguido CME a partir de ovocitos partenogénéticos, lo que puede suponer una fuente de CME paciente-compatibles en mujeres (no en varones) y sin los problemas éticos que supone la utilización de embriones. Aún así esta es una técnica poco eficiente y comporta algunos problemas epigenéticos.

Se ha descrito también que las células madre espermatogónicas, precursoras de los espermatozoides, pueden llegar a comportarse como CM pluripotentes (Kanatsu-Shinohara et al., 2004; Conrad et al., 2008). Esta podría ser una fuente de CM paciente-compatibles en varones aunque la eficacia de la técnica es baja debido a la dificultad de aislar, cultivar y expandir las espermatogonias a partir de tejido testicular.

2. TERAPIA CELULAR

La terapia celular con CM consiste en el trasplante de células diferenciadas, obtenidas a partir de CM, destinado a reparar tejidos en los que se ha perdido la funcionalidad celular. El número de enfermedades para las cuales esta probada la terapia celular es muy pequeño. Se están tratando patologías sanguíneas y inmunológicas desde hace más de 50 años mediante trasplantes de médula ósea (CM adultas)(Thomas et al., 1957) o de células de la sangre de cordón umbilical (CM fetales)(Gluckman et al. 1989). Recientemente, también están jugando un papel importante en algunos trasplantes de tejidos, como los trasplantes de piel o córnea, otros tipos de CM adultas que se encuentran en estos tejidos y que contribuyen a la regeneración de los mismos.

Cualquier otro tipo de trasplante de CM es aún experimental. Esto significa que aún no está demostrado que se trate de un tratamiento eficiente y seguro.

Como ya se comenta más adelante los trasplantes de células derivadas de CM tienen ciertos riesgos (las CME la formación de teratomas y las CM pluripotentes reprogramadas la transmisión de virus), por ello es imprescindible la optimización y estandarización de la obtención y el cultivo, para que la terapia celular con este tipo de células sea una técnica eficaz y segura (De Sousa et al., 2006).

Es necesaria la supervisión, por parte de comités de expertos externos a los ensayos clínicos, del proyecto, la ejecución de los protocolos, valoración de riesgos, control de calidad, etc. Será necesaria también una monitorización exhaustiva de los pacientes

tratados para evidenciar posibles efectos adversos. Y finalmente, es imprescindible informar al paciente que formará parte del ensayo clínico del potencial real del tratamiento en cuanto a eficacia, posibles efectos secundarios o riesgos y posibles alternativas, antes de firmar el consentimiento y aceptar formar parte del estudio (Hyun et al., 2008). Recientemente la Internacional Society for Stem Cell Research ha publicado unas recomendaciones para la aplicación clínica de las CM. Estas recomendaciones valoran los aspectos científicos, clínicos, legales, éticos y sociales que deben considerarse para asegurar que la investigación básica realizada con CM se aplica a la práctica clínica de forma segura (Guidelines for the clinical translation of Stem Cells, http://www.isscr.org/clinical_trans/pdfs/ISSCRGLClinicalTrans.pdf).

Hay muchos aspectos técnicos a tener en cuenta previos a una terapia celular con CM pluripotentes; la procedencia del material, los métodos de cultivo y preparación, almacenaje y banqueo, transporte, etc. Es necesaria una estandarización de estas metodologías entre laboratorios (De Sousa et al., 2006; Ähr lind-Richter et al., 2009).

Es importante tener en cuenta a la hora de plantear posibilidades terapéuticas que las CM son pluripotentes y por lo tanto, pueden formar teratomas al ser transplantadas. Este es uno de los mayores riesgos de su utilización en terapia celular ya que una sola célula indiferenciada entre la población de células diferenciadas transplantadas puede dar lugar a la formación de un teratoma. Además, también debido a su pluripotencia, una célula indiferenciada transplantada puede diferenciarse al azar y dar lugar a un tipo celular no deseado. Por ejemplo, la diferenciación a hueso o músculo de una o varias células indiferenciadas transplantadas en el cerebro podría tener consecuencias desastrosas. Es importante que los transplantes sean de poblaciones totalmente puras de células diferenciadas previamente *in vitro*, evitando una diferenciación *in vivo* no deseada. La técnica más simple para conseguir poblaciones celulares puras es la utilización de FACS (fluorescent activated cell sorting) para separar tipos celulares en función de los marcadores de superficie que expresen dichas células o de “etiquetas” genéticas como la proteína verde fluorescente (Strulovici et al., 2007). Otro método más complejo sería la utilización de genes suicidas mediante ingeniería genética. La expresión de un gen suicida puede ser dirigida por un promotor de un gen que sólo se exprese en células indiferenciadas (como Oct4, por ejemplo). La activación del gen suicida mediante algún tratamiento produciría la muerte de las células indiferenciadas sin afectar a las

diferenciadas (Mountford et al., 2008). Sin embargo, la eficiencia de estas técnicas debería ser absoluta ya que, como se ha comentado, una sola célula indiferenciada podría provocar la formación de un tumor.

El rechazo inmunológico es otro de los problemas a resolver en el caso de las CME. Como el trasplante de órganos, el trasplante de CME es un alotrasplante que compromete al sistema inmune y requiere que el paciente realice tratamientos inmunosupresores (ver apartado 2.1).

Otro aspecto a tener en cuenta que no podemos ignorar, es el hecho de que pocos tejidos están formados por un único tipo celular. La mayoría de los tejidos y órganos están compuestos de varios tipos celulares distintos. Para regenerar un órgano funcional es necesario desarrollar estructuras complejas. Se están desarrollando protocolos que conllevan el uso de estructuras en 3 dimensiones y mecanismos de soporte para permitir el crecimiento adecuado de las células.

Por otra parte, es imprescindible que las células transplantadas mantengan su funcionalidad. En algunos casos en los que se requiere terapia regenerativa resulta dañado el lugar donde se necesita el trasplante, lo que puede dificultar la funcionalidad del tejido transplantado. Por ejemplo, en los infartos de miocardio, la cicatriz producida durante el infarto impediría la conductividad eléctrica y la contracción coordinada entre las células cardíacas transplantadas y las ya existentes. El trasplante de músculo cardíaco no comportaría ningún beneficio si previamente no se tratan los daños producidos para que el trasplante sea efectivo. Aún así, e incluso cuando el ambiente no es hostil para el trasplante, es necesario que las células transplantadas se integren en el tejido existente y realicen las conexiones necesarias para restablecer la funcionalidad del órgano.

Los problemas técnicos que existen hoy en día para plantear la aplicación clínica de terapia celular hacen necesaria la investigación en profundidad para elucidar los mecanismos que controlan el crecimiento, la migración, el destino y la diferenciación celular para asegurar procesos estables tras el trasplante de las células. Se han realizado ya estudios para valorar la funcionalidad post-trasplante de células derivadas de células madre embrionarias en animales (McDonald et al., 1999; Soria et al., 2000; Bjorklund et al., 2002; Kim et al., 2002). También hay evidencias de restauración de la funcionalidad

tras el trasplante de progenitores neuronales y cardiomiocitos derivados de CME humanas en modelos animales con enfermedad de Parkinson y infarto de miocardio respectivamente (Ben-Hur et al., 2004; Kofidis et al., 2006). Está previsto que en un futuro próximo pueda realizarse los primeros ensayos en humanos.

2.1. Rechazo inmunológico

Se ha estimado que número de líneas de CME sería necesario para cubrir todas las combinaciones posibles del sistema HLA y poder suministrar a toda la población células histocompatibles para evitar el rechazo inmunológico. El número de líneas estimado está alrededor del millón (Hyslop et al., 2005). Actualmente se calcula que hay alrededor de 600 líneas de CME establecidas (www.hescreg.eu), pero muy pocas serían aptas para el trasplante (libres de componentes de origen animal, cultivadas en condiciones GMP, etc). Aunque algunos datos sugieren que las CME son menos susceptibles a la reacción del sistema inmunológico debido a una menor expresión de las moléculas del sistema HLA (Drukker et al., 2006), se están estudiando distintas fórmulas para evitarlo, o al menos disminuir sus efectos.

Entre ellos cabe destacar la inducción de inmutolerancia mediante la administración de células hematopoyéticas generadas a partir de la misma línea de CME que se ha usado para generar las células que se van a transplantar. Esta técnica se ha utilizado en pacientes receptores de órganos a los que se les ha administrado previamente células de la médula ósea del donante. Estos pacientes no necesitaron tratamiento inmunosupresor tras el trasplante (Helg et al., 1994). También se ha propuesto la manipulación genética en las líneas de CME con el fin de conseguir eliminar las moléculas del sistema de histocompatibilidad y por tanto la reacción inmunológica (Hyslop et al, 2005). Todas estas metodologías están aún en fase de desarrollo.

Como ya se ha comentado en los apartados 1.2 y 1.3, otras opciones para evitar el rechazo inmunológico sería producir células genéticamente idénticas al paciente (isogénicas). Esto podría conseguirse produciendo células pluripotentes procedentes de embriones clonados mediante transferencia nuclear (SCNT) o a través de la reprogramación de células somáticas.

3. BANCOS Y REGISTROS DE CÉLULAS PLURIPOTENTES

El número de líneas de CM pluripotentes va en aumento y es necesario crear bancos y registros para disponer de toda la información relativa a las líneas de existentes. Los bancos y registros de líneas pluripotentes están siendo imprescindibles para los investigadores en este campo que necesitan información sobre las líneas existentes y sus características, así como una estandarización de la información.

La función de los bancos de líneas de células pluripotentes es expandir, caracterizar y poner a la disposición de los investigadores que las soliciten, las líneas disponibles existentes con los controles de calidad necesarios para la investigación básica y para el desarrollo de una aplicación clínica. Los bancos de CM también pueden ofrecer apoyo técnico a los investigadores que lo necesiten. Uno de los bancos pioneros de CM es el UK Stem Cell Bank (www.ukstemcellbank.org.uk), con 14 líneas disponibles y 48 líneas más pendientes de finalizar el banqueo y los controles de calidad. El National Stem Cell Bank (USA) dispone de 21 líneas derivadas antes del año 2001, tal como requiere la legislación americana para poder investigar con CM (<http://stemcells.nih.gov>).

Los registros no son depositarios de células. Únicamente recogen la información sobre las diversas líneas. Un registro de líneas pluripotentes debe dar información detallada sobre las líneas en cuanto al origen de los embriones o tipos celulares utilizados para obtenerlas, disponibilidad, métodos de obtención y cultivo, caracterización, pluripotencia in vivo e in vitro e información sobre su uso en investigación.

El Registro Europeo de líneas de CME (hESCreg), colaboración entre el Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona y el Berlin Centre for Regenerative Therapies, proyecto financiado por la Comisión Europea (FP6). Consiste en una base de datos con toda la información sobre aproximadamente 600 líneas de células madre disponible a través de una página web (www.hescreg.eu) que se actualiza continuamente. hESCreg es una plataforma muy útil para la interacción entre investigadores, legisladores y público en general. (Borstlap et al., 2008).

Existen otros registros de líneas de células madre: NIH hESC Registry, Stem Cell Community Registry, International Stem Cell Forum (ISCF, www.stemcellforum.org) y

International Stem Cell Registry (ISCR) at Umass (www.umassmed.edu/iscr/index) (Luong et al., 2008).

4. ÉTICA Y LEGISLACIÓN

Numerosos grupos en todo el mundo están derivando actualmente líneas de CME a partir de blastocistos obtenidos de embriones sobrantes de programas de Fecundación in Vitro. La investigación encaminada a comprender los mecanismos que controlan la autorenovación y la pluripotencialidad se llevan a cabo en aquellos países en que la legislación permite la investigación con embriones humanos y con células madre embrionarias. La legislación en los distintos países incluso dentro de Europa es muy variable. (Figura 7). Mientras en algunos países como España, Reino Unido o Suecia, está permitido derivar líneas de CME e incluso realizar SCNT, en otros como Italia o Alemania está prohibida la derivación y deben importar las líneas para investigar con ellas. En algunos países no hay legislación al respecto o incluso en algunos, como Polonia, esta expresamente prohibido realizar cualquier tipo de investigación con CME.

España se encuentra entre los países en los que se permite realizar este tipo de investigaciones. Las leyes 14/2006 y 14/2007 de Técnicas de Reproducción Asistida y Biomedicina respectivamente establecen el marco legal en nuestro país y regulan la investigación con material embrionario, permitiendo la utilización de técnicas tales como la transferencia nuclear y la partenogénesis para la obtención de CME.

El debate ético gira en torno a la destrucción de los embriones, opción no aceptable para determinados sectores de la sociedad. La adjudicación o no del estatus de persona al embrión ha generado un debate social que permanece aún abierto.

La derivación de líneas de CME a partir de una sola célula comentada en el apartado 1.1.1. Esta técnica evita la destrucción del embrión y es éticamente aceptable para los colectivos que están en contra de la utilización de embriones humanos para la obtención de CME, además de las ya comentadas anteriormente como la obtención de líneas a partir de ovocitos partenogénéticos, espermatogonias o la reprogramación de células somáticas adultas.

Pero no sólo la destrucción del embrión, si no también otros aspectos éticos hay que tener en cuenta en la utilización de embriones para investigación como si la pareja donante ha sido informada sobre el futuro de su embrión, si ha dado su consentimiento para su utilización o si ha recibido alguna compensación o incentivo a cambio de la donación (Lomax et al., 2008).

5. CONCLUSIONES

Las CM pluripotentes representan una oportunidad y un reto para el futuro de la terapia celular y la medicina regenerativa. Se están destinando muchos esfuerzos y recursos en avanzar en la investigación en este campo y en el conocimiento de la biología básica y las características de estas células, para conseguir que muchos pacientes puedan beneficiarse de su amplio potencial. Sin embargo, existen aún muchos obstáculos que superar para que la aplicación clínica a partir de células pluripotentes sea un hecho. Aún así, incluso en el peor de los casos en el que no se consiguiera utilizar estas células para una terapia clínica, su valor en la investigación básica permanecería incuestionable.

BIBLIOGRAFIA

Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes.

Nature Biotechnology 2008; **26**:1276-1284

Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews P, Beighton G et al., Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature Biotechnology* 2007; **25**: 803-816

Ährlund-Richter L, De Luca M, Marshak DR, Munsie M, Veiga A and Mahendra R. Isolation and production of cells suitable for human therapy: Challenges Ahead. *Cell Stem Cell* 2009 **4**: 20-26

Allegrucci C, Young LE. Differences between human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod Update* 2007; **13**: 103-120

Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2004; **70**: 837-845

Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahasi K et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008; **321**: 105-113

Aran B, Rodríguez I, Raya A, Luna M, Barri P, Izpisúa J.C, Veiga A. Derivation of human embryonic stem cells from poor quality blastocysts. 23th Annual Meeting of the European Society Human Reproduction and Embryology. Lyon. 2007

Baker DE, Harrison NJ, Maltby F, Smith K, Moore HD, Shaw PJ et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nature Biotechnology* 2007; **25**: 207-215

Ben-Hur T, Idelson M, Khaner H, Pera M, Reinhartz E, Itzik A et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficits in Parkinsonian rats *Stem Cells* 2004; **22**: 1246-1255

Bjorklund LM and Isacson O. Regulation of dopamine cell type and transmitter function in fetal and stem cell transplantation for Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 2002; **138**: 411-420

Borstlap J, Stacey G, Kurtz A, Elstner A, Damaschun A, Arán B, Veiga A. First evaluation of the European hESCreg *Nature Biotech* 2008; **26**: 859-860.

Buzzard JJ, Gough NM, Crook JM, Coleman A. Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nature Biotech* 2004; **22**: 381-382

Byrne J, Pedersen D, Clepper L, Nelson M, Sanger W, Gokhale S et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007; **450**: 497-502

Caisander G, Park H, Frej K, Lindqvist J, Bergh C, Lundin K, Hanson Ch. Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged in vitro culture. *Chromosome research* 2006; **14**: 131-137

Conrad S, Renninger M, Hannelotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008; **456**: 34-349

Cowan CA, Atienza J, Melton D, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005; **309**: 1369-1373

Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, Wang S, Morton CC, McMahon AP, Powers D, Melton DA. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 2004; **350**: 1353-1356

Crook J, Peura T, Kravets L, Bosman A, Buzzard J, Horne R, Hentze H, Dunn N, Zweigerdt R, Chua F. The Generation of Six Clinical-Grade Human Embryonic Stem Cell Lines *Cell Stem Cell*. 2007; **1**: 490-494

D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 2006; **24**: 1392-1401

Daley G and Scadden DT. Prospects for stem cell-based therapy. *Cell* 2008; **132**:544-548

De Sousa PA, Galea G, Turner M. The road to providing human embryo stem cells for therapeutic use: the UK experience. *Reproduction* 2006; **132**: 681-689

Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J et al. Recurrent gain of Chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells *Nature Biotechnology* 2004; **22**:53-54

Drukker M, Katchman H, Katz G, Even-Tov Friedman S, Shezen E, Hornstein E, Mandelboim O et al. Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells* 2006; **24**: 221-229

Ellerstrom C, Strehl R, Moya K, Andersson K, Bergh C, Lundin K, Hyllner J, Semb H. Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. *Stem Cells* 2006; **24**: 2170-2176

French AJ, Adams C, Anderson L, Kitchen J, Hughes M, Wood S. Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer (SCNT) with adult fibroblasts *Stem Cells* 2008; **26**: 485-493

Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000; **73**: 1155-1158

Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, Brunette E, Powell S, Nath A, Caceres E, McMaster M, McDonagh S, Li Y, Mandalam R, Lebkowski J, Fisher SJ. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil Steril* 2005; **83**: 1517-29

Gonzalez F, Barragan M, Tiscornia G, Montserrat N, Vassena R, Batlle L, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells by transient expression of a single non-viral polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences en prensa*

Green, RM. Can we develop ethically universal en ítem-cell lines? *Nature* 2007 **8**: 480-486

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord-blood from HLA-identical sibling *New England Journal of Medicine* 1989; **321**: 1174-1178

Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey B, Beard C, Wernig M et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 2008; **133**: 250-264

Helg C, Chapius B, Bolle JF et al. Renal transplantation without immunosuppression in a host with tolerance by allogenic bone marrow transplantatio. *Transplantation* 1994; **58**: 1420-1422

Hoffman DI, Zellman GL, Fair CC, Mayer JF, Zeitz JG, Gibbons WE, Turner TG, Jr. Cryopreserved embryos in the United States and their availability for research. *Fertil Steril* 2003; **79**: 1063-1069

Hoffman L and Carpenter M. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 2005; **23**: 699-708

Hysop LA, Armstong L, Stojkovic M, Lako M. Human embryonic stem cells: biology and clinical implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2005; **7**: 1-21

Hyun I, Lindvall O, Ährlund-Richter L, Cattaneo E, Cavazzana-Calvo M, Cossu G et al. New ISSCR Guidelines underscore major principles for responsible translational stem cell research. *Cell Stem Cell* 2008; **3**: 607-609

Joannides Aj, Fiore-Herliche C, Battersby AA et al. A scaleable and defined system for generating neural stem cells from human embryonic stem cells in vitro Stem Cells Development. *Stem Cells* 2007; **25**: 731-737

Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; **119**: 1001-1012

Kim J, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N et al.

Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; **418**: 50-56

Kim J, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V. et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008; **454**: 646-650

Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 2006; **444**: 481-5

Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L, Johnson J, West MD, Lanza R Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet* 2005; **365**: 1636-41

Kofidis T, Lebl DR, Swijnenburg RJ, Greeve JM, Klima U, Robbins RC. Allopurinol/uricase and ibuprofen enhance engraftment of cardiomyocyte enriched human embryonic stem cells and improve cardiac function following myocardial injury. *Eur J Cardiothorac surg* 2006; **29**: 50-55

Lerou P, Yabuuchi A, Huo H, Takeuchi A, Shea J, Cimini T, Ince T, Ginsburg E, Racowsky C, Daley G. Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos *Nature Biotech.* 2008;1-3

Li T, Zhou CQ, Mai QY, Zhuang GL. Establishment of human embryonic stem cell line from gamete donors. *Chin Med J (Engl)* 2005; **118**: 116-122

Lomax G and McNab A. Harmonizing standards and coding for hESC research. *Cell Stem Cell* 2008; **2**: 201-202

Lu J, Hou R, Booth CJ, Yang SH, Snyder M. Defined culture conditions of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 **103**: 5688-93

Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, Crandall LJ, Daigh CA, Conard KR, Piekarczyk MS, Llanas RA, Thomson JA Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 2006; **24**: 185-7

Luong M, Smith K, Stein G. Human embryonic stem cell registries: value, challenges and opportunities. *Journal of Cellular Biochemistry* 2008; **105**: 625-632

Maherali N and Hochedlinger. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; **3**: 595-605

Mateizel I, De Temmerman N, Ullmann U, Cauffman G, Sermon K, Van de Velde H, De Rycke M, Degreef E, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod* 2006; **21**: 503-511

McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 1999; **5**:1410-1412

Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Hum Reprod 7 Suppl* 1992; **1**: 101-6

Menezo Y, Veiga A, Benkhalifa M Improved methods for blastocyst formation and culture. *Hum Reprod 13 Suppl* 1998; **4**: 256-265

Mitalipova M, Calhoun J, Shin S, Wininger D, Schulz T, Noggle S, Venable A, Lyons I, Robins A, Stice S Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. *Stem Cells* 2003; **21**: 521-526

Mountford JC. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfusion Medicine* 2008; **18**: 1-12

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology* 2008; **26**: 101-106

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; **448**: 313-317

Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008; **322**: 949-953

Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008; **134**: 877-886

Pera MF, Trounson AO Human embryonic stem cells: prospects for development. *Development* 2004; **131**: 5515-5525

Pickering SJ, Braude PR, Patel M, Burns CJ, Trussler J, Bolton V, Minger S Preimplantation genetic diagnosis as a novel source of embryos for stem cell research. *Reprod Biomed Online* 2003; **7**: 353-364

Rajala K, Hakala H, Panula S, Aivio S, Pihlajamaki H, Suuronen R, Hovatta O, Skottman H Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures. *Hum Reprod* 2007 **22**: 1231-1238

Raya A, Rodríguez-Pizà I, Arán B, Consiglio A, Barri P.N, Veiga A, Izpisúa J. Generation of cardiomyocytes from new human embryonic stem cell lines derived from poor-quality blastocysts. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 2008; **LXXXIII**; 1-9

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000; **18**: 399-404

Revazova ES, Turovets N, Kochetkova OD, Kindarava LB, Kuzmichev L, Janus J et al. Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning Stem Cells* 2007; **9**:432-449

Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin- induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; **49**: 157-162

Spits C, Mateizel I, Geens M, Mertzanidou A, Staessen C, Vandekelde Y, et al. Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells *Nature Biotechnology* 2008; **26**: 1361-1363

Skelley A, Kirak O, Suh H, Jaenisch J, Voldman J. Microfluidic control of cell pairing and fusion *Nature methods* 2008; DOI: **10.1038**.

Stadtfield M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cell generated without viral integration. *Science* 2008; **322**: 945-949

Step toe, P. C. and Edwards, R. G. Birth after the preimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; **2**: 366

Stojkovic M, Lako M, Stojkovic P, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, Evans J, Herbert M, Hyslop L, Ahmad S, Murdoch A, Strachan T Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells* 2004; **22**: 790-797

Stojkovic M, Stojkovic P, Leary C, Hall VJ, Armstrong L, Herbert M et al. Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005, **11**: 226-231

Strulovici Y, Leopold PL, O'Connor, TP Pergolizzi RG, Crystal RG. Human embryonic stem cells and gen therapy. *Molecular Therapy* 2007; **15**: 850-866

Takahashi K and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663-676

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861-872

Thimas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JM. Intravenous infusion of bone marrow in patients recovering radiation and quemoterapy *New England Journal of Medicine* 1957; **257**: 491-496

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**: 1145-1147

Trounson A. Human embryonic stem cell derivation and directed differentiation. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2005; 27-44

Verlinsky Y, Strelchenko N, Kukharenko V, Rechitsky S, Verlinsky O, Galat V, Kuliev A Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod Biomed Online* 2005; **10**: 105-110

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; **385**: 810-813

Yu J, Vodyanik M, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S et al. Induced pluripotent stem cells lines derived from human somatics cells. *Science* 2007; **318**: 1917-1920

Zhang X, Stojkovic P, Przyborski S, Cooke M, Armstrong L, Lako M, Stojkovic M Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem Cells* 2006; **24**: 2669-76

PÁGINAS WEB DE INTERÉS

Instituto de Salud Carlos III

www.isciii.es

Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona

www.cmr.b.eu

Research Center Príncipe Felipe

www.cipf.es/lineasinvestigacion

CABIMER

<http://www.cabimer.es/es/>

UK Stem cell Bank

<http://www.ukstemcellbank.org.uk/>

NIH stem cells page

<http://stemcells.nih.gov/>

ICSCN International Consortium of Stem Cell Networks

www.stemcellconsortium.org

ISCF International Stem Cell Forum

www.stemcellforum.org

ISSCR International Society for Stem Cell Research

www.isscr.org

Guidelines of Human Embryonic Stem Cell Research

<http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309103657>

Scottish Stem Cell Network

www.sscn.co.uk

Stem Cell Network Réseau de Cellules Souches

www.stemcellnetwork.ca

Stem cells net

www.stemcells.net

Stem cell research portal

www.stemcellscience.org

Stem cell news

www.stemcellnews.com

Stem cell research Foundation

<http://www.iscr.ed.ac.uk/>

California Institute for Regenerative Medicine

<http://www.cirm.ca.gov>

EuroStemCell

<http://www.eurostemcell.org>

London Regenerative Medicine Network

<http://www.regenmednetwork.com>

The New York Stem Cell Foundation

<http://www.nyscf.org>

Explore Stem Cell

<http://www.explorestemcells.co.uk/>

Guidelines for human Embryonic Stem Cells Research

http://books.nap.edu/catalog.php?record_id=11278

Amendments to the National Academies' Guidelines

http://books.nap.edu/catalog.php?record_id=11871

The CIRM Medical and Ethical Standards Regulations

http://www.cirm.ca.gov/reg/pdf/reg100010_compregs.pdf

The Code of Practice

<http://cop.hfea.gov.uk/cop>

The ISSCR Guidelines for Human Embryonic Stem Cells Research

<http://www.isscr.org/guidelines/isscrhescguidelines2006.pdf>

Guidelines for Human Pluripotent Stem Cell Research

<http://www.cihr-irsc.gc.ca/e/34460.html>

GLOSARIO

Autorenovación: Proceso por el cual una célula es capaz de dividirse en dos células idénticas a ella misma

Blastocisto: Estadio particular del embrión de los mamíferos, caracterizados por su pluripotencialidad, y en el cual no se ha producido todavía la diferenciación de tejidos ni se han esbozado órganos. En los humanos el embrión alcanza el estadio de blastocisto a los 5-6 días

Cariotipo: Representación de la dotación cromosómica de un individuo.

Célula madre: Célula indiferenciada que es capaz de autorenovarse o bien diferenciarse en varios o en todos los tipos celulares distintos que componen un organismo.

Células somáticas: Células que forman parte de un individuo pero que no participan en la formación de gametos. Su material genético no pasa a la descendencia. En su mayoría, son células diferenciadas, que ejecutan una función concreta, con lo que sólo parte de su ADN es expresado.

Clonación: Acción de producir un clon, es decir, una o más células derivadas de una única célula original genéticamente idéntica a esta última. En un sentido amplio, la clonación se refiere a la producción de copias genéticas de organismos individuales o células, sin intervención de la reproducción sexual. Ver transferencia nuclear.

Clonación reproductiva: Proceso por el que se genera un embrión somático con el fin de obtener un individuo genéticamente idéntico a otro.

Clonación terapéutica: Proceso por el que se genera un embrión somático que nunca será implantado, sino cultivado *in vitro* para obtener células madre embrionarias genéticamente idénticas a las del individuo donador del núcleo.

Cultivo celular: crecimiento celular in vitro en una solución que contiene nutrientes y factores de crecimiento

Diferenciación: proceso por el cual una célula indiferenciada se transforma en una o más células especializadas.

Ectodermo: la más externa de las tres capas germinales del embrión. Durante el desarrollo embrionario da lugar a la piel, sistema nervioso, lentes del ojo y otras estructuras

Endodermo: la más interna de las tres capas germinales del embrión que durante el desarrollo embrionario dará lugar a los pulmones, intestino, hígado y páncreas.

Inmunofluorescencia: Técnica que consiste en el etiquetado de anticuerpos o de antígenos con colorantes fluorescentes. Esta técnica se utiliza a menudo para visualizar la distribución subcelular de biomoléculas del interés. Las secciones o las Inmunofluorescente-etiquetadas del tejido son estudiadas usando un microscopio de fluorescencia o por microscopia confocal.

Mesodermo: la capa intermedia de las tres capas germinales del embrión. Durante el desarrollo embrionario dará lugar a los músculos, sangre y hueso.

Multipotente: capaz de diferenciarse en varios tipos celulares distintos.

Ovocito: Célula germinal de los mamíferos. Equivalente a óvulo

Partenogenético: Individuo generado exclusivamente a partir del gameto femenino, sin la participación del espermatozoide. Es una forma de reproducción habitual en determinados géneros de insectos.

Pluripotente: capaz de diferenciarse en cualquier tipo celular.

Reprogramación celular: Mecanismo complejo cuyos fundamentos moleculares son aún poco conocidos. Mediante la reprogramación celular una célula somática

diferenciada es capaz de convertirse de nuevo en una célula indiferenciada y pluripotente.

SCNT: Siglas en inglés de Transferencia Nuclear de Célula Somática. Ver transferencia nuclear.

Teratoma: Tumor que contiene muchos tipos celulares distintos.

Totipotente: capaz de dar lugar a cualquier tipo celular, incluso a un embrión

Transferencia nuclear. Proceso mediante el cual el núcleo extraído de una célula somática, es introducido en un ovocito enucleado (sin núcleo) para generar un embrión somático, genéticamente idéntico al individuo dador. Este embrión somático puede ser utilizado en clonación terapéutica o reproductiva.

FIGURAS

Figura 1: Blastocisto expandido en el que se aprecia la masa celular interna (MCI).

Figura 2: Inicio del crecimiento de las células procedentes de la MCI de un blastocisto, 6 días después de ser sembrado sobre una monocapa de fibroblastos.

Figura 3: Colonia de células madre embrionarias

Figura 4: Presencia del antígeno SSEA4 y Oct4 en una colonia de células madre embrionarias humanas indiferenciadas

Figura 5: Diferenciación in vitro a distintos tipos celulares:

5a. Presencia de beta- tubulina tras la diferenciación inducida de células madre a ectodermo (neuronas)

5b. Presencia de alfa-actinina tras la diferenciación inducida de CM a mesodermo (cardiomiocitos).

5c. Presencia de alfa-feto proteína tras la diferenciación espontánea de CM a endodermo (tejido glandular).

Figura 6: Esquema de transferencia nuclear para clonación terapéutica

Figura 7: Legislación sobre la investigación en células madre en Europa.