

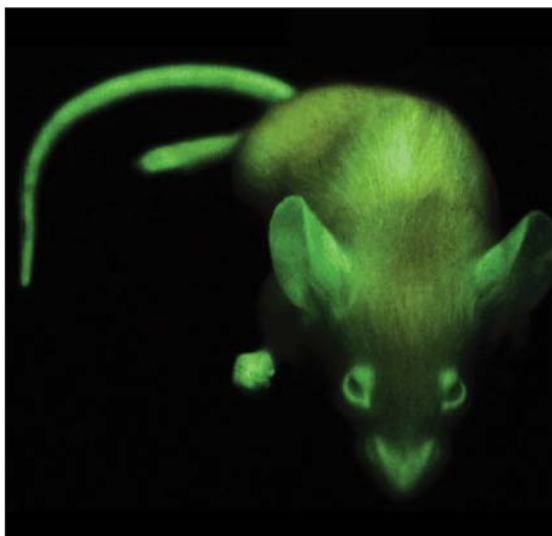
Panorama da investigación con células nai

LLUÍS MONTOLIU

As células nai son obxecto constante de noticias científicas que superan as habituais canles de comunicación académicas e aparecen decotío en xornais, radio e televisión. A sociedade afíxose a escoitar promesas sobre os posibles beneficios da utilización terapéutica das células nai. Canto de todo iso é unha realidade?

Para comezar, deberíamos facer un pouco de memoria e lembrar que, de xeito público, a sociedade comezou a falar sobre células nai (ou troncais, como en realidade deberíamos chamalas, de acordo co nome empregado noutras linguas¹) apenas hai uns doce anos. Foi en 1998 cando dous laboratorios norteamericanos, liderados por Thomson e Gerhart, respectivamente, describíron por vez primeira as células nai embrionarias humanas. Porén, a nivel científico, o noso coñecemento das células nai animais, en mamíferos, data de moito máis atrás, de 1981, cando o laboratorio británico dirixido por Martin Evans describiu estas mesmas células no embrión de rato.

Que fai ás células nai tan especiais, tan singulares, motivo permanente da nosa atención? Para responder a esta pregunta debemos formularnos outra, de grande interese en bioloxía do desenvolvemento. Como pode desenvolverse un organismo complexo, un animal adulto, como un polo ou unha galiña a partir dun ovo? Ou, trasladando a mesma pregunta aos embrións humanos, como podemos desenvolvernos calquera de nós a partir dun embrión que, en orixe, consta dunha soa célula? A resposta está nas células nai



Rato verde obtido a partir de células nai embrionarias modificadas xeneticamente cunha proteína fluorescente dunha augamar

e no desenvolvemento embrionario dos organismos, un proceso complexo pero fundamental, que require división e diferenciación celular, é dicir, medre do número de células mediante a súa duplicación sucesiva e especialización, para dar lugar aos diversos tipos de células que temos no corpo. Hai organismos aparentemente sinxelos, como o verme nematodo *Caenorhabditis elegans* que, en apenas unhas horas, completa o seu desenvolvemento embrionario e pasa de unha a pouco máis dun milleiro

de células, as que necesita para realizar todas as súas funcións vitais. E todo iso grazas ás células nai.

Outro organismo modelo, mamífero coma nós, os humanos, que reproduce mellor o noso desenvolvemento embrionario é o rato, o modelo animal por excelencia en biomedicina e para o estudo da bioloxía humana. Aínda que en aparencia moi distinto a nós, cando menos en tamaño, en realidade compartimos gran parte do desenvolvemento embrionario, o proceso básico polo que se xera un organismo adulto a partir dunhas poucas células, a partir de células nai, polo que o estudo de ratos serve eficazmente para entender a bioloxía e fisioloxía humanas, para comprender a razón de ser e o destino das células nai humanas.

Para definir as células nai o mellor é describir as súas dúas características fundamentais. En primeiro lugar, as células nai poden automanerse, isto é, dar lugar a outras células con idénticas características, outras células nai. Esta propieda-

de fainas virtualmente inmortalas. En segundo lugar, as células nai poden optar, en determinadas circunstancias, en resposta a sinais do contorno ou medio no que se atopan, por dar lugar a outros tipos celulares distintos, diferentes, máis especializados. É dicir, por unha banda, poden seguir a producir outras células nai de xeito indefinido e, por outra, poden producir células especializadas, específicas da calquera dos órganos que temos no corpo.

Desde un punto de vista evolutivo, se fixamos a nosa atención en organismos máis sinxelos, como os unicelulares, como as bacterias, calquera delas podería considerarse unha célula nai, pois pode dar lugar indefinidamente a outras semellantes e, nalgúns casos, pode orixinar variantes máis especializadas. En organismos máis complexos, como os multi ou pluricelulares, o corpo está formado por dous tipos de células: as células somáticas, que conforman o organismo pero que perecerán e desaparecerán con el, e as células nai, formando parte da liña celular xerminar a través das súas diferentes presentacións, como por exemplo en forma de gametos, espermatozoides e oocitos, que darán lugar a un embrión que se converterá noutro individuo, demostrando a súa inmortalidade, mediante a súa capacidade de trasladar os xenes dunha xeración á seguinte. Cando aparecen por vez primeira as células nai no desenvolvemento embrionario? Tras a fecundación, o embrión unicelular divídese sucesivamente varias veces (dúas, catro, oito, dezaseis, trinta e dúas células) até que ese grupo de células aparentemente uniforme, ao que chamamos mórula (pola súa forma de pequena amora), se converte nun blastociste, o estadio destinado á implantación do embrión no útero ou matriz para continuar o desenvolvemento. No blastociste aparece unha cavidade (o blastocele) e un grupo de células, que se sitúan asimetricamente, a un lado do embrión. Estas células, denominadas masa celular interna, son as células nai embrionarias, pluripotentes, pola súa capacidade de dar lugar a todos e cada un dos tipos celulares que forman un organismo adulto,

Lluís Montoliu é doutor en Ciencias Biolóxicas pola Universidade de Barcelona. De 2004 a 2006 foi director do Departamento de Bioloxía Molecular e Celular do Centro Nacional de Biotecnoloxía (CNB), en Madrid, onde actualmente dirixe o seu grupo de investigación. É presidente da International Society for Transgenic Technologies (ISTT) e membro do Comité de Bioética do CSIC.

Tradución Daniel Soutullo

O texto deste artigo procede dunha conferencia titulada *Promesas e realidades da investigación biomédica: Cantos tipos de células nai existen e para que serven?*, impartida polo autor o 26 de abril de 2010 na *Domus* da Coruña, dentro das actividades "Os luns con ciencia", programadas polos Museos Científicos Coruñeses.

1. As células "nai" (ou troncais) chámanse *Stem cells* (en inglés), *Stammzellen* (en alemán) ou *Cellules souches* (en francés). En todos estes idiomas subliñábase o feito de que son células tronco ou troncais.
2. En 2007, os científicos norteamericanos Mario Capecchi e Oliver Smithies, e o científico británico Martin Evans compartiron o premio Nobel en Fisioloxía ou Medicina polos seus descubrimentos dos principios para a introdución de modificacións xenéticas específicas en ratos a través do uso das células nai embrionarias.

Este primeiro tipo de células nai chámase embrionarias, pluripotentes, precisamente por poder dar lugar a moitos tipos celulares.

Son as primeiras que se describiron, as fundamentais, as que permiten obter, de xeito natural, calquera tipo celular

incluíndo, de novo, a liña xerminal, as gónadas (testículos e ovarios) que formarán novos gametos e, a partir deles, un novo individuo. E así sucesivamente, de xeito indefinido, demostrando a súa inmortalidade e a súa versatilidade, a súa capacidade de dar lugar a células tan distintas.

Estas propiedades, que fan as células nai tan interesantes, puideron demostrarse, de forma directa, en ratos. De embrións de rato poden extraerse células nai, manterse en cultivo no laboratorio e empregarse para introducir un novo xene marcador, mediante modificación xenética, que, por exemplo, codifique para unha proteína procedente dunha augamar do Pacífico, que produce unha luz verde fluorescente moi intensa ao ser excitada por outra luz dunha determinada lonxitude de onda. Estas células nai fluorescentes, así modificadas, se son introducidas noutro embrión de rato (noutro blastociste), darán lugar, debido á súa pluripotencialidade como células nai, a individuos cuxas células serán todas verdes, un rato verde fluorescente!, demostrando que son capaces de se converter en todos e cada un dos tipos celulares que son propios do rato.

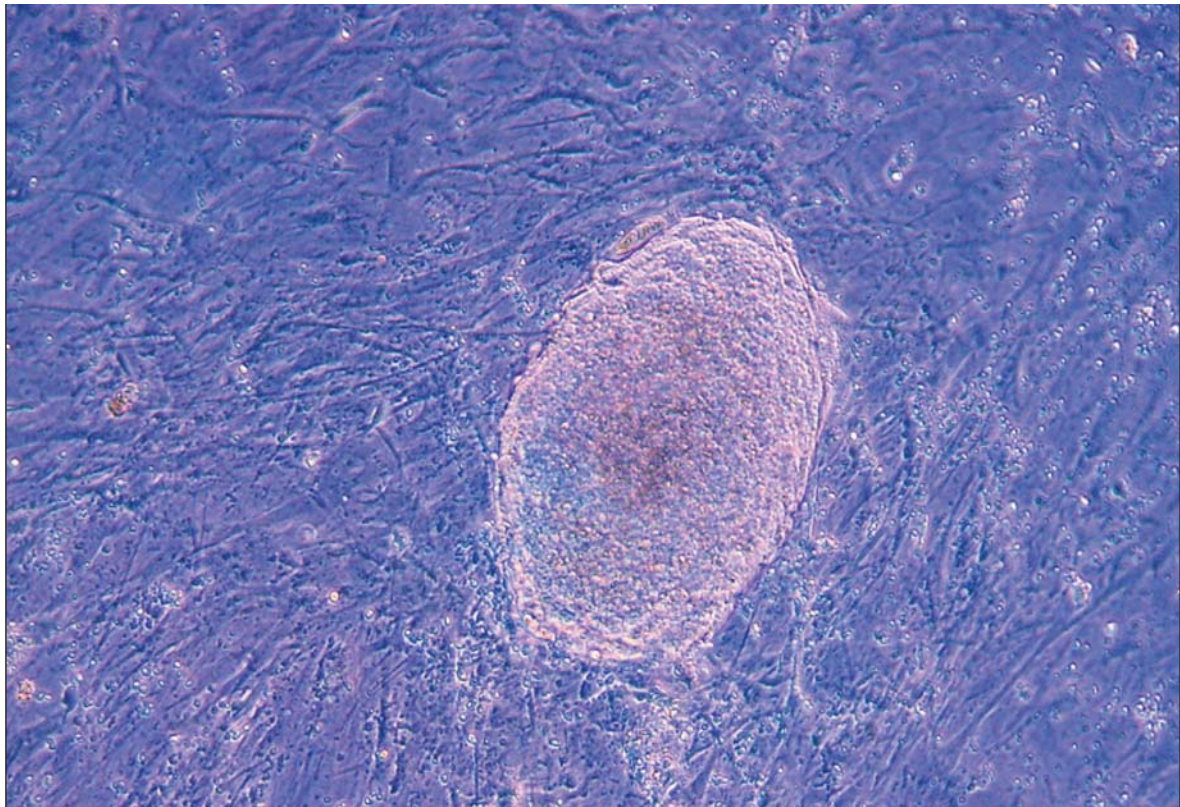
Este primeiro tipo de células nai chámase embrionarias, pluripotentes, precisamente por poder dar lugar a moitos tipos celulares. Son as primeiras que se describiron, as fundamentais, as que permiten obter, de xeito natural, calquera tipo celular (células musculares, glandulares, neuronais, sanguíneas, etc.). Aparecen por vez primeira no blastociste, posteriormente desprázanse ás gónadas e, nos adultos, en determinados casos patolóxicos poden dar lugar a tumores específicos de células nai embrionarias, chamados teratocarcinomas, que aparecen en testículos ou ovarios. Estas células nai embrionarias pluripotentes de rato e a súa capacidade para seren modificadas xeneticamente á vontade do investigador, dando lugar a milleiros de modelos animais que reproducen fielmente enfermidades humanas, recibiron o recoñecemento máximo da comunidade científica en 2007, cando tres científicos que foron os primeiros en estudalas — Capecchi, Evans e Smithies — recibiron o premio Nobel en Fisioloxía ou Medicina².

Que outros tipos de células nai existen? Nos órganos do organismo adulto existen células con

capacidade de automanterse e de dar lugar a un reducido número de tipos celulares, que son esenciais para ese órgano. Son as células nai multipotentes, por dar lugar a varios tipos celulares. O exemplo máis característico son as células nai da medula ósea, capaces de automanterse e de orixinar todos os tipos celulares que existen no sangue (glóbulos vermellos, os diferentes tipos de glóbulos brancos e plaquetas). Son, xa que logo, células nai adultas e a súa función natural e repoboar os tecidos do órgano ao que pertencen. Un subtipo destas células, cunha menor facultade de diferenciación aínda, capaz de dar lugar soamente a un tipo celular especializado, son as células nai adultas unipotentes, como por exemplo as células nai do tecido graxo, que dan lugar esencialmente aos adipocitos ou células graxas.

Ademais destes tipos naturais de células nai apareceron outros, produto da investigación científica. Todos lembramos a ovella *Dolly*, que coñecemos en 1997, e a súa singularidade como primeiro animal “clonado”, obtido por científicos escoceses dirixidos por Ian Wilmut mediante transferencia nuclear, a partir de núcleos de células adultas³. En realidade, o experimento de Wilmut demostraba, 60 anos despois, o que diagnosticara outro eminente investigador alemán, Hans Spemann, en relación coa pluripotencialidade dos núcleos das células dun organismo⁴. A substitución do núcleo dun embrión polo núcleo dunha célula adulta permitía, en determinadas condicións, que o embrión resultante, reconstruído mediante transferencia nuclear, orixinase outro individuo moi semellante a aquel que fornecera a célula inicial. É dicir, tras a reconstrución embrionaria, o embrión resultante daba lugar, de novo, a todos e cada un dos tipos celulares do individuo adulto, reproducindo as propiedades das células nai embrionarias. Este proceso foi chamado clonación reprodutiva e, aínda que os primeiros éxitos, parciais, tiveron lugar en anfibios, durante os anos 50 e 60 do século pasado⁵, non foi até o nacemento da ovella *Dolly*, acontecido en 1996, cando se popularizou e difundiu tanto en ambientes académicos como en toda a sociedade.

Da fusión do proceso de transferencia nuclear coa versatilidade das células nai rapidamente



Célula nai embrionaria pluripotente de rato en cultivo

xurdiu a idea da clonación terapéutica. Esta proposta de terapia celular rexenerativa xerou un profundo debate social. En detalle, a clonación terapéutica propoñía a reconstrución dun embrión humano a partir de células dun paciente, por exemplo dunha persoa afectada por algunha doenza incurábel, co obxecto de desenvolver o embrión até a fase de blastociste, na que aparecen as células nai embrionarias, extraelas no laboratorio e inducilas a especializarse ao tipo celular que podería tratar ou substituír as células afectadas pola doenza. Para iso requiríase demostrar que era posíbel reconstruír un embrión humano a partir de células dun doador e obter, dese embrión, de novo células embrionarias pluripotentes coa identidade do doador celular. Esta proposta ficou seriamente danada cando se demostrou que os experimentos dun investigador surcoreano, coñecidos en 2004 e 2005, foran fabricados e fraudulentos⁶. En realidade, o único experimento de clonación terapéutica realizado con éxito abordouno o laboratorio de Rudolf Jaenisch, en 2002, cando conseguiu tratar e curar a inmunodeficiencia xenética duns ratos mediante novas células nai sanguíneas derivadas de embrións reconstruídos e modificados xeneticamente no laboratorio⁷.

Outro tipo de células nai adultas ou, mellor dito, de aplicacións terapéuticas das células nai adultas, xurdiu cando se constatou que, en determinadas circunstancias, as células nai dun órgano semellaban contribuír ao desenvolvemento

3. I. Wilmut, A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind e K. H. Campbell, "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells", *Nature* 385 (6619), 27-II-1997, 810-3.

4. Hans Spemann, embriólogo alemán, premio Nobel en Fisioloxía ou Medicina en 1935 polos seus descubrimentos en bioloxía do desenvolvemento, predixo en 1938 que calquera célula adulta dun organismo retiña a totalidade da información xenética necesaria para gobernar un novo proceso de desenvolvemento embrionario, podendo ser capaz de dar lugar a un individuo completo.

5. John Gurdon demostrou en 1966 que podía clonar ras a partir de células procedentes de larvas, de cágados, non totalmente especializados aínda.

6. Woo Suk Hwang pretendeu enganar a comunidade científica anunciando, en dous artigos sorprendentes, publicados en *Science* en 2004 e 2005, que fora capaz de conseguir células embrionarias humanas a partir de embrións reconstruídos por transferencia nuclear, obtidos de núcleos de células somáticas. Todo resultou unha fraude, os artigos foron retirados e o científico procesado e condenado.

7. Rideout, W. R. 3rd, K. Hochedlinger, M. Kyba, G. Q. Daley e R. Jaenisch, "Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy", *Cell* 109 (1), 5-IV-2002: 17-27.

doutro se eran inxectadas nesta nova localización. Houbo moitos tipos de células nai adultas que foron utilizadas, con éxito variábel, con este fin. Dous exemplos diso témolos no noso país. En primeiro lugar, os experimentos do equipo de Damián García Olmo (Hospital Universitario de La Paz de Madrid), que demostraron a sorprendente capacidade das células nai procedentes da graxa para cicatrizar fistulas perianais que afectan tanto a pacientes da enfermidade de Crohn como a outros pacientes⁸. Esta proposta de utilidade terapéutica foi realizada pola empresa biotecnolóxica española Cellerix. Esta terapia celular xa foi designada como medicamento orfo pola EMEA⁹ e o ensaio clínico superou, con éxito, as fases I e II, estando en proceso de completarse a última fase III. Neste caso, as células nai da graxa proceden do mesmo paciente a tratar, polo que se garante a compatibilidade inmunolóxica. En segundo lugar, en Valladolid, un equipo científico liderado por Ana Sánchez (IBGM¹⁰, Universidade de Valladolid) está explorando o uso de células nai da medula ósea de pacientes para reparar e reconstruír o corazón danado despois dun infarto agudo de miocardio¹¹.

Outro dos tipos de células nai non naturais, obtidas no laboratorio, apareceu en 2006, cando un científico xaponés, Shinya Yamanaka¹², demostrou que un reducido número de xenes, apenas catro deles, era capaz de transformar células adultas somáticas, do corpo, en células que tiñan todas as características das células nai embrionaria pluripotentes, coa extraordinaria diferenza de que non se requirían embrións para obtelas! Estas células nai pluripotentes embrionarias obtidas deste xeito directamente doutras células somáticas, sen mediar embrións, foron chamadas inducíbeis¹³ (ou iPS¹⁴, nas súas siglas en inglés) e representan un dos campos de investigación máis interesantes hoxe en día en medicina rexenerativa celular. Como tales, estas células embrionarias pluripotentes inducidas poden dar lugar a todos e cada un dos tipos celulares do organismo, e así ficou demostrado en ratos. Porén, a súa posíbel utilidade terapéutica é outra, dado que, una vez convertidas en células nai embrionarias pluripotentes poden derivarse, no laboratorio, mediando as transformacións oportunas, ao tipo celular que se desexe, o que sexa necesario para restaurar o tecido afectado pola enfermidade. En España, o éxito no uso das células nai embrionarias pluripotentes en ratos foi demostrado por Sagrario Ortega, do Centro Nacional de Investigacións

Oncolóxicas, en Madrid. Igualmente, nas súas variantes humanas, entre outros experimentos publicados, os equipos liderados por Juan Carlos Izpisúa-Belmonte (CMRB¹⁵) e Juan Antonio Bueren (CIEMAT¹⁶, Madrid) demostraron que son capaces de obter células nai pluripotentes embrionarias humanas de pacientes afectados pola anemia de Fanconi, logrando corrixir o defecto xenético que as caracteriza, para o seu estudo e eventual aplicación terapéutica¹⁷.

O último dos tipos celulares que apareceu na literatura científica de células nai provén, sorprendentemente, dun método que precisamente evita o uso de células nai para obter células con características determinadas. Este técnica, de reprogramación celular, investigada xa hai algúns anos, permitiu inducir a conversión directa dun tipo celular a outro, sen mediar o paso a través das células nai, simplemente pola adición de un ou varios xenes responsábeis da transformación celular. Con esta técnica, coñecida a principios deste ano 2010, conseguiuase transformar células da pel en neuronas¹⁸. En Barcelona, no Centro de Regulación Xenómica, o laboratorio de Thomas Graf tamén tivo éxito¹⁹ ao demostrar a conversión directa de linfocitos B, produtores de anticorpos, en macrófagos, células que fagocitan e atrapan, por exemplo, as bacterias en procesos infecciosos, polo tanto, moi diferentes entre si, soamente mediante a introdución do só xene.

Todas estas células son, en definitiva, as que coñecemos hoxe en día como diferentes tipos de células nai. En todos os casos, en maior ou menor medida, mantense a definición orixinal de seren células que se autopropagan e que, á vez, son capaces de orixinar outras distintas, máis especializadas.

O proceso de diferenciación celular podería ilustrarse como unha grande estación de esquí. No cumio, onde chegan todos os remontes, é onde estarían as células nai embrionarias. Dependendo da ladeira pola que descendesen, as células chegarían a un val ou a outro (a un tecido ou a outro). A comunicación entre diferentes ladeiras sería difícil, mais non imposible. Algúns remontes permitirían chegar a estacións intermedias polas que descender pola ladeira veciña (o uso de células nai adultas en tecidos distintos dos que inicialmente estaban destinadas). Finalmente, algunhas estradas de acceso directo poderían permitir a conexión entre vales afastados (os métodos de reprogramación celular directa, para transformar unha célula noutra) sen ter que

ascender de novo ao cumio (sen necesidade de recorrer ás células nai embrionarias).

A modo de resumo, resaltando as vantaxes e inconvenientes de cada tipo xeral de células nai, podería concluírse que as células nai embrionarias teñen como vantaxes a pluripotencia, a inmortalidade e a alta proliferación, ademais de seren relativamente doadas de illar e cultivar. Pola contra, os inconvenientes hoxe en día son a imposibilidade de orientar a especialización de xeito eficaz, evitando posteriores riscos de tumoroxénese, se non se consegue desactivar a proliferación inicial. Á súa vez, xeran problemas éticos na sociedade e requiren dunha lexislación específica, para regular o uso de embrións, ademais de non garantir a identidade celular (a non ser que se reintentase o proceso de clonación terapéutica). As células nai presentes en tecidos adultos teñen como vantaxes o feito de que non requiren embrións, suscitando menores problemas éticos, e son inmunocompatíbeis, ao provir decote do mesmo doador e xa ter sido empregadas na clínica con éxito. Os seus inconvenientes van asociados ao pouco coñecido fenómeno da transdiferenciación, é dicir, a indución, nos órganos que se usan como diana delas, da diferenciación de tipos celulares distintos dos que adoito son o seu destino. Son, por outra parte, difíciles de illar e de cultivar e fican moitos aspectos biolóxicos aínda por estudar. As células nai embrionarias pluripotentes inducíbeis comparten os mesmos inconvenientes potenciais de direccionabilidade e tumoroxenicidade que as iniciais células nai embrionarias, mais, pola contra, teñen como vantaxes a súa pluripotencia, os menores problemas éticos que suscitan, ao non requirir embrións, e a compatibilidade inmunolóxica, ao derivarse tamén do mesmo paciente a tratar. Finalmente, a proposta de reprogramación celular directa, moito máis recente, xera actualmente enormes expectativas. Non require o uso de células nai e polo tanto tampouco de embrións, aínda que os mecanismos de conversión celular, de transformación, estean aínda pouco estudados e sexan, polo momento, de difícil aplicación na práctica clínica.

Son moitos os tipos de células nai que se coñecen e enormes as expectativas terapéuticas que se espera poidan derivarse delas. Na maioría dos casos descritos como, por exemplo, as células pluripotentes embrionarias inducíbeis, fica aínda un longo camiño de investigación básica por percorrer antes de poder poñer en práctica aplica-

cións de medicina rexenerativa. Pola contra, noutros como, por exemplo, o uso terapéutico de células nai adultas, xa se puxeron en marcha ensaios clínicos moi prometedores. O tempo e os avances científicos que poidan producirse irán indicándonos as posibilidades de éxito e as garantías terapéuticas de cada unha destas aplicacións das células nai ■

8. Damián García Olmo e Mariano García Herranz (2009), "Células progenitoras multipotentes obtenidas del tejido adiposo y su aplicación clínica", en Flora de Pablo Dávila e María Cascales Angosto (ed.), *Células madre y terapia regenerativa*, Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España, Monografía XXVII, pp. 197-221.
9. Axencia Europea de Medicamentos, regulada pola Unión Europea (n. do t.).
10. N. do t. Instituto de Bioloxía e Xenética Molecular, centro mixto da Universidade de Valladolid (UVA) e do Consello Superior de Investigacións Científicas (CSIC).
11. Ana Sánchez García e Javier García Sancho (2009), "Reparación cardíaca con células madre", en Flora de Pablo e María Cascales (ed.), en Flora de Pablo Dávila e María Cascales Angosto (Ed.), *Células madre y terapia regenerativa*, Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España, Monografía XXVII, pp. 259-275.
12. K. Takahashi e S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors", *Cell* 126 (4), 25-VIII-2006, 663-76.
13. Lluís Montoliu (2009), "Células pluripotentes inducidas", en Flora de Pablo Dávila e María Cascales Angosto (ed.), *Células madre y terapia regenerativa*, Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España, Monografía XXVII, pp. 83-99.
14. N. do t. As siglas iPS derivan da denominación inglesa *induced pluripotent stem cells*.
15. N. do t. Centro de Medicina Rexenerativa de Barcelona.
16. N. do t. Centro de Investigacións Enerxéticas, Medioambientais e Tecnolóxicas, dependente do Ministerio de Ciencia e Innovación.
17. A. Raya, I. Rodríguez-Pizà, G. Guenechea, R. Vassena, S. Navarro, M. J. Barrero, A. consiglio, M. Castellà, P. Río, E. Sleep, F. González, G. Tiscornia, E. Garreta, T. Aasen, A. Veiga, I. M. Verma, J. Surrallés, J. Bueren e J. C. Izpisua Belmonte, "Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells", *Nature* 460 (7251), 2-VII-2009, 53-9.
18. T. Vierbuchen, A. Ostermeier, Z. P. Pang, Y. Kokubu, T. C. Südhof e M. Wernig, "Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors", *Nature* 463 (7284), 25-II-2010, 1035-41.
19. L. H. Bussmann, A. Schubert, T. P. Vu Manh, L. De Andres, S. C. Desbordes, M. Parra, T. Zimmermann, F. Rapino, J. Rodríguez-Ubrea, E. Ballester e T. Graf, "A robust and highly efficient immune cell reprogramming system", *Cell Stem Cell* 5 (5), 6-XI-2009, 554-66.