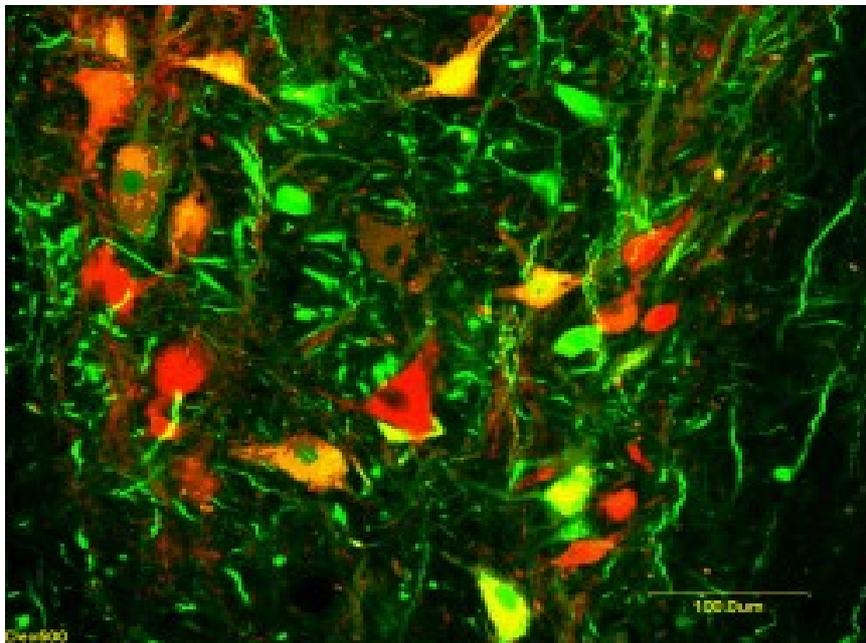


# TERAPIA CELULAR Y GÉNICA EN LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA



Células madre neurales humanas se transforman en neuronas colinérgicas cuando se transplantan a médula espinal intacta de ratas adultas, en rojo se marca la ChAT (Colinacetil transferasa) (Wu, et al., 2002, Nat Neurosci 5 (12):1271-1278).

ICÍAR GÁRATE PÉREZ  
FRANCISCO ZAFRA GARCÍA

## ÍNDICE:

● Esclerosis Lateral Amiotrófica	4
● Células Madre	12
-Introducción	12
-Historia	12
-Clasificación	17
-Aplicaciones Terapéuticas, Generalidades	21
● Terapia Génica en ELA	26
● Terapia Celular en ELA	29
● Conclusiones	34
● Bibliografía	37
● Anexo: Bioética y células madre embrionarias	42

# ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)



Dr. J.M. Charcot

El médico francés Jean-Martin Charcot (1825-1893) fue el primero en describir la ELA en 1869. Relacionó la parálisis y atrofia muscular progresiva que presentaban algunos pacientes con la pérdida de neuronas a nivel de los núcleos motores del asta ventral de la médula espinal, y a nivel de los fascículos anterolaterales también en la médula. Denominó a esta enfermedad Esclerosis Lateral Amiotrófica. Este nombre se debe a las características anteriormente citadas: amiotrófica en relación con la pérdida de la función muscular; y esclerosis lateral por la degeneración de las neuronas del fascículo lateral de la médula espinal, en donde se produce una cicatrización glial o esclerosis.

La ELA además se conoce por muchos otros nombres puestos en honor de personas que la padecieron, o del descubridor, pues en Francia se denomina enfermedad de Charcot.

En EEUU se conoce como ALS que son las siglas en inglés de *Amiotrophic lateral sclerosis*, pero también como Enfermedad de Lou Gehrig por un famoso jugador de béisbol que padeció la enfermedad y murió a causa de ella en 1939. Siendo el primer caso que aparecía en los medios de comunicación de EEUU.



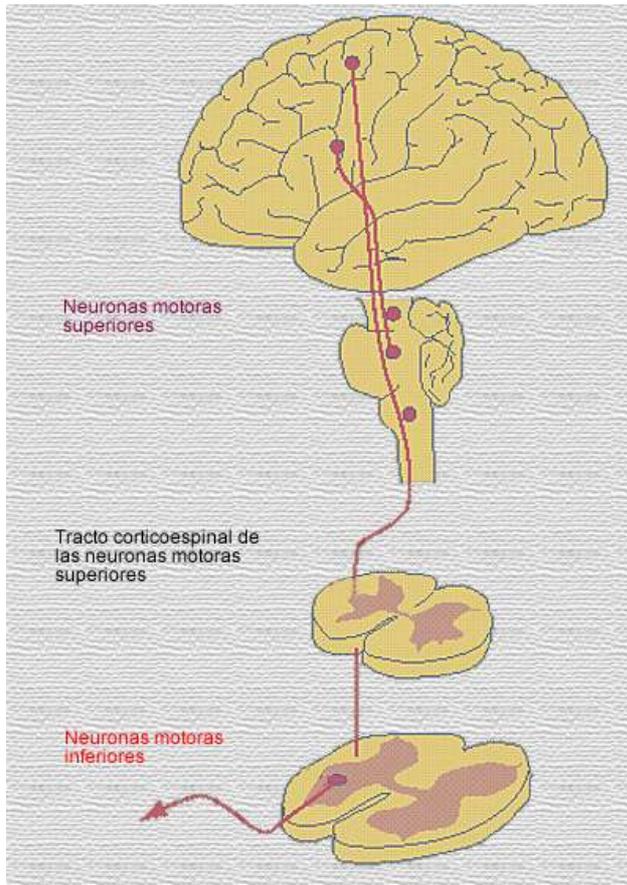
Lou Gehrig



Stephen Hawking

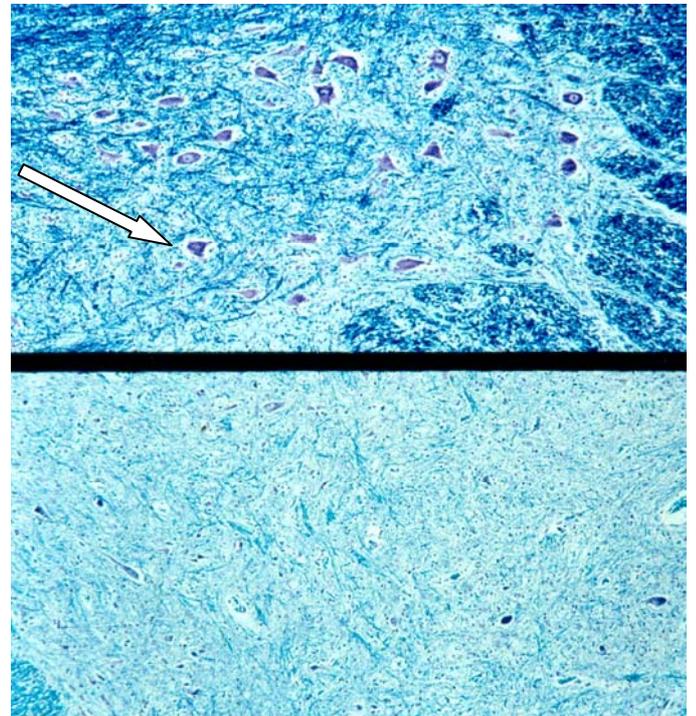
El caso de Stephen Hawking, que destaca por el insólito número de años que ha sobrevivido a la ELA, ha dado la vuelta al mundo. Su popularidad ha hecho que mucha gente conozca esta enfermedad y la llame Enfermedad de Stephen Hawking.

Algunos prefieren hablar de Enfermedad de la Motoneurona (EMN) para referirse a la ELA, englobándola con otras patologías de las neuronas motoras como la Atrofia Muscular Espinal, la Esclerosis Lateral Primaria y la Enfermedad de Kennedy.

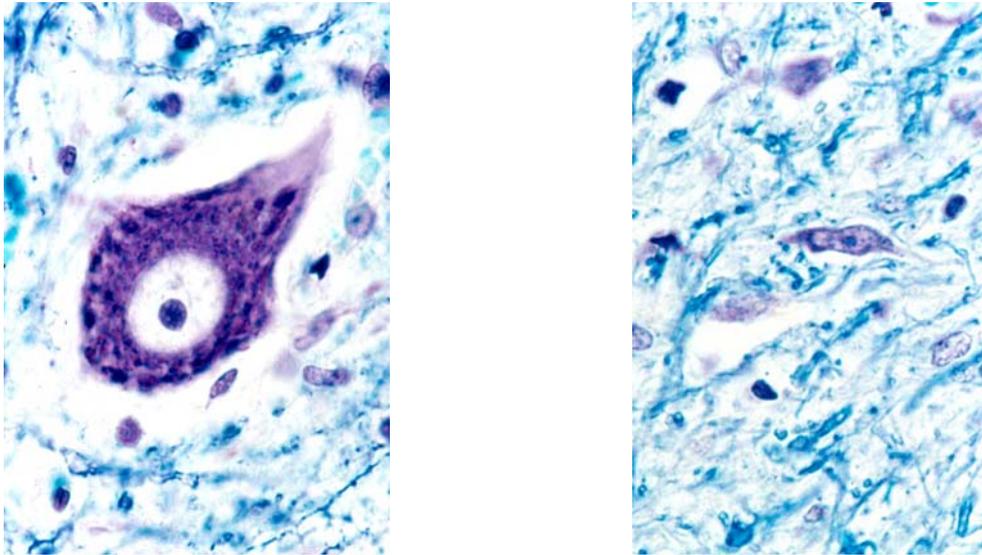


La ELA es una enfermedad degenerativa que afecta a un único tipo de célula nerviosa: la motoneurona (MN). Estas células son las responsables del movimiento del músculo estriado esquelético que es de naturaleza voluntaria, salvo en el caso de los reflejos. La degeneración celular se da a varios niveles: en corteza cerebral, en tronco encefálico y en el asta ventral de la médula espinal. Las neuronas motoras que tienen sus cuerpos celulares en la corteza cerebral envían sus axones a médula a través de la vía corticoespinal o piramidal que viaja por el cordón lateral de la médula, por eso la degeneración de las neuronas en corteza conlleva la degeneración de esta vía.

En esta imagen se pueden apreciar las diferencias que hay entre la médula espinal de un individuo sano (fotografía superior) y de otro que padeció ELA (fotografía inferior). Se puede observar el asta anterior de la médula a la altura de la región cervical en ambos casos. La diferencia en el número de MN (señalada con una flecha en la fotografía) es muy superior en el individuo sano, mientras que el que padeció ELA apenas quedan unas pocas muy atrofiadas.



A continuación mostramos con más detalle el aspecto que presenta una neurona normal (izquierda) frente a una degenerada (derecha) a causa de la ELA.



La muerte de las MN da lugar a una inactivación crónica de los músculos al dejar de recibir impulsos nerviosos. Esto provoca una debilidad muscular y atrofia progresiva, que da lugar a una parálisis cada vez más importante con pronóstico letal en 3-5 años.

El inicio de los síntomas es muy variable de una persona a otra, pero en general suele ser focal, en las extremidades superiores o inferiores. Estos síntomas pueden ser debilidad o dificultad en la coordinación de alguna extremidad, dificultades en el habla, la deglución, espasmos, sacudidas y calambres entre otros.

La progresión de la enfermedad es normalmente asimétrica, es decir que progresa de forma distinta cada parte del cuerpo. La enfermedad cursa sin dolor, pero con gran malestar por la pérdida de movilidad y los demás síntomas.

Al no verse afectados otros tipos celulares del sistema nervioso las demás funciones cerebrales apenas se ven alteradas en la mayoría de los casos. Se han descrito, sin embargo, alteraciones neuropsicológicas, sin llegar a ser demencias, como egocentrismo, irritabilidad, comportamiento desinhibido y falta de introspección.

En general la ELA aparece de forma espontánea, ELA esporádica (ELAe), oficialmente no existen factores de riesgo asociados conocidos.

El 5-10% de los casos de ELA tienen carácter familiar, es decir origen genético. En 1993 se descubrió la mutación del gen que codifica **la cobre-zinc superóxido dismutasa (SOD1)** en 21q22.1-q22.2 y su relación con la ELA familiar (ELAf), que presenta una herencia autosómica dominante.

Parece que la alteración genética de este enzima está relacionada con el 20% de los casos de ELAf que también se conoce como ALS1.

Además se conocen otras mutaciones que se heredarían de forma autosómica recesiva en los genes 22q12.2, 21q22.1, 14q11, 12q12-q13, 2p13. Estas mutaciones también desencadenarían ALS1.

Este descubrimiento permitió la creación por manipulación genética de animales transgénicos que presentan una enfermedad neuromuscular equiparable a la ELA humana. Esto supone un gran avance en el estudio del tratamiento de la ELA al permitir ensayar agentes potencialmente terapéuticos. Debería servir tanto para la ELAf como para la esporádica pues es posible que ambas compartan gran parte de los mecanismos patogénicos por la gran similitud clínica, epidemiológica y patológica. De hecho estas dos formas de ELA son indistinguibles en estos aspectos.



Modelo animal de ELA.

Existe además otra forma de ELA familiar, la ALS2, que presenta una herencia autosómica recesiva y se encuentra en 2q33. Esta enfermedad aparece en edad más temprana (adolescencia) y tiene una progresión muy lenta. Se conocen la mutación y la proteína afectada, pero no se sabe cuál es la función exacta de esta proteína a la que se ha llamado alsina. También se ha creado un modelo animal para su estudio.

La ELAe es de carácter idiopático aunque es posible que esté relacionada con la mutación espontánea de algún gen.

La ELA afecta en la mayoría de los casos a adultos entre 40 y 70 años, aunque existen casos en personas más jóvenes. En España la incidencia de la enfermedad es de 2-2,5 por cada 100.000 habitantes, aunque si nos centramos en la franja de edad 60-69 pasamos a 15 casos por 100.000 habitantes, lo que supone un aumento considerable. Cada año se diagnostican 900 casos nuevos de ELA, hoy en día hay un total de 4000 personas afectadas en nuestro país. La incidencia mundial es de 0,5-3 casos por cada 100.000 habitantes, el margen es más amplio por que engloba a países donde la esperanza de vida es muy dispar y puesto que se trata de una enfermedad que afecta a adultos, su incidencia está relacionada con la edad de la población. También es posible que la falta de medios para diagnosticarla en muchos países falsee los datos. Aún así la incidencia está dentro del rango que hace que se considere a la ELA una enfermedad rara.

Aunque no existen factores de riesgo asociados con la enfermedad reconocidos oficialmente, se han observado mayores incidencias en determinados grupos: excombatientes americanos de la guerra del golfo, futbolistas (estudio de la Universidad de Turín) o deportistas profesionales y

personas expuestas a grandes concentraciones de metales pesados, disolventes, o pesticidas. Existen teorías que relacionan la ELA con los cambios en los hábitos de vida ya que la edad de aparición de los síntomas está disminuyendo. También se ha observado una relación con el parkinson y demencia en la isla de Guam (islas Marianas) donde la incidencia de ELA es muy elevada, probablemente sea hereditaria.

**El único diagnóstico** que existe por el momento es clínico, y se realiza por exclusión de todas las demás patologías con síntomas similares. Por ello, para diagnosticar ELA, se deben realizar numerosas pruebas que descarten todo lo demás. Los criterios de diagnóstico se establecieron en 1990 en la reunión de la Federación Mundial de Neurología que se celebró en el Escorial, y fueron revisados en 1998. De este modo se establecieron unas pautas para homogeneizar los criterios de diagnosis y darles más consistencia. Se han creado grupos según la certeza con la que se diagnostica la ELA, habiendo cuatro categorías diagnósticas: sospechada, posible, probable y definida. Es muy importante, desde el momento en el que es sospechada, seguir la evolución del paciente para poder aumentar la certeza del diagnóstico.

**La etiología** es desconocida pero los distintos descubrimientos realizados plantean diversas teorías.

Entender el por qué de la degeneración selectiva de las MN y no de las demás neuronas, podría ser fundamental para determinar alguna posible causa de la ELA. Existen varias hipótesis pero ninguna está realmente probada. Podría deberse a alguna de las características particulares de estas células como su repertorio de receptores, el notable tamaño de su soma, la gran extensión de su axón, la organización del citoesqueleto o su escasa capacidad para soportar alteraciones del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Esto se debe a que apenas presentan proteínas fijadoras de  $\text{Ca}^{2+}$ , de modo que no soportan sobrecargas de  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo éstas letales para la célula. Existen ciertos grupos de MN más resistentes al proceso degenerativo de la ELA, como por ejemplo las MN que controlan los movimientos extrínsecos de los ojos, parece que estas células contienen cantidades elevadas de paralbúmina o calbindina, que ayudan a neutralizar los excesos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Los enfermos de ELA conservan hasta las fases más graves de la enfermedad el movimiento ocular.

Otra hipótesis de esta resistencia se basa en las diferencias en la transmisión inhibitoria sináptica. Se ha visto recientemente que existe una fuerte correlación entre la vulnerabilidad de las MN y la organización de los receptores inhibitorios, tanto en las subunidades que los componen, como en la proporción de los distintos tipos de receptores y su localización. Estas diferencias contrastan con la uniformidad que se ve en otros núcleos motores. Parece que la organización de los receptores inhibitorios puede reflejar diferencias funcionales que podrían ser relevantes en la patogénesis de la ELA.

La teoría del estrés oxidativo como causa posible de la ELA está relacionada principalmente con la ELAf. El estrés oxidativo es el daño celular que se da por las especies reactivas de oxígeno: superóxido, hidroxilo o peroxinitrito. Estos radicales pueden dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos,

pero en situaciones normales la célula tiene mecanismos de defensa que consisten principalmente en enzimas antioxidantes. Si estos mecanismos se ven sobrepasados es cuando se produce daño por estrés oxidativo.

Las mutaciones de la SOD1 están estrechamente vinculadas a la ELAf. Esta enzima antioxidante cataliza la conversión de superóxido ( $O_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno molecular ( $O_2$ ). Se han descrito más de cien mutaciones de la SOD1 asociadas a la ELAf: en algunos casos disminuye la actividad de la enzima, en otros no se ve afectada, y en otros está aumentada. Lo más probable es que el efecto nocivo de la mutación se deba a la ganancia de una propiedad tóxica de la molécula. La mutación de SOD1 se expresa en todas las células pero sólo afecta a las MN. Algunos autores opinan que la mutación podría repercutir en la funcionalidad de los astrocitos que serían menos eficaces en el transporte de glutamato facilitando la excitotoxicidad selectiva de las MN. Este efecto podría ser causa de la enfermedad, pero no es el único a tener en cuenta.

La SOD1 tiende a formar agregados en el citoplasma provocando un efecto tóxico, aunque no está muy claro el modo en el que los agregados inducen la citotoxicidad, se ha observado que aparecen en neuronas y astrocitos y que a menudo contienen chaperonas (proteínas con actividad restauradora de la estructura proteica) o ubiquitina. La fuerte tendencia a la formación de agregados satura pronto la capacidad de los sistemas de digestión proteosomal. Además las chaperonas quedan secuestradas en el agregado de modo que en vez de actuar como proteínas reparadoras, generan estrés y toxicidad. Recientemente se ha visto que también se forman agregados en el interior de las mitocondrias afectadas por la ELA, esto provoca disfunción mitocondrial. Así se explicaría las alteraciones estructurales observadas en las mitocondrias de la MN en etapas tempranas de la enfermedad en ratones transgénicos.

Otros estudios muestran que los agregados secuestran la proteína antiapoptótica bcl-2. Por último se ha visto que las MN de los ratones mutantes para SOD1 son especialmente sensibles a un sistema de señalización de muerte celular: la vía de señalización intracelular del sistema Fas-Fas ligando que conduce a la apoptosis.

El glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitador del SNC. Pese a ser muy abundante en el SNC, apenas encontramos Glu en el espacio extracelular, existe un sistema de transportadores muy eficaz que lo recaptura rápidamente. Esto es fundamental porque si se descontrola su concentración causa muerte neuronal por excitotoxicidad.

La relación entre el Glu y la ELA se conoce desde hace tiempo pero es difícil determinar si las alteraciones del Glu son origen o consecuencia de la enfermedad. Lo que se ha visto es que existen niveles anormalmente altos del neurotransmisor en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de enfermos de ELA. También se ha constatado que la actividad transportadora de Glu en las membranas de neuronas de médula espinal y de corteza motora es inferior a la normal, pero no en las membranas celulares de otras regiones de corteza. Esta disminución se debe a la presencia de RNAm aberrante del transportador de Glu astrogial GLT1 o EAAT2 que da lugar a una pérdida selectiva de este transportador. Esto es una causa del aumento de Glu extracelular. Estas observaciones son comunes a la ELAe y a la ELAf. La concentración de Glu que encontramos no es muy elevada. Se ha demostrado que en estas

concentraciones el daño excitotóxico producido por el Glu es moderado de modo que en vez de darse una necrosis rápida del tejido neuronal, se da una degeneración crónica de las MN (que como ya vimos son más sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$ ) que es lo que sucede en la ELA.

En todas las células del organismo el citoesqueleto proporciona el soporte mecánico para mantener la forma celular, lo que es de especial importancia en las neuronas pues su función depende de su morfología. Además es el responsable del transporte axonal, también clave en la funcionalidad neuronal. Las alteraciones del citoesqueleto se han descrito en las MN de enfermos de ELA. Se ha observado una acumulación anormal de neurofilamentos hiperfosforilados en el soma neuronal y en los axones. Se han podido alterar los neurofilamentos de ratones transgénicos lo que ha dado lugar a una enfermedad similar a la ELA en estos animales. La hipótesis con más adeptos para explicar como esta alteración intervendría en la ELA, sería que la desorganización de los neurofilamentos interrumpiría el transporte axonal produciendo degeneración axonal.

La existencia de acumulación de neurofilamentos determinados casos de ELAe y ELAf que presentan mutaciones en SOD1 sugiere una relación entre SOD1 y neurofilamentos. Pero no sería la única relación con la ELAf. La ALS2 provoca una disfunción de una proteína que interviene en procesos de señalización relacionados con el transporte vesicular y con la organización del citoesqueleto. Parece que estas acumulaciones podrían tener un efecto positivo. En realidad el hecho de que estén hiperfosforiladas se debe a la hiperactividad de las enzimas responsables de la fosforilación de proteínas. Estas enzimas fosforilan los neurofilamentos en vez de otras proteínas cuya activación puede tener consecuencias más nocivas para la célula. Los neurofilamentos actúan como “trampas” de fosforilación.

Se han observado además otras alteraciones en los enfermos de ELA, pero al igual que todas las anteriores es difícil determinar si se trata de una causa o una consecuencia de la enfermedad.

Se ha detectado, por ejemplo, disfunción mitocondrial. Las células de los pacientes de ELA presentan en sus mitocondrias alteraciones morfológicas, anomalías en la cadena respiratoria, aumento de radicales libres y una alteración en la homeostasis del calcio. Debido a la importancia de las mitocondrias en los procesos metabólicos que garantizan el aporte energético necesario al SNC, y su papel en la formación de radicales libres, la disfunción mitocondrial produce un importante daño celular.

Algunos estudios sugieren que algunas formas de ELA podrían estar relacionadas con una infección viral, probablemente por infección de poliovirus o de retrovirus. Ambos virus presentan tropismo por las MN y podrían infectarlas directamente. La ausencia de pruebas hace que la infección directa parezca poco probable. Lo que podría suceder es una infección que desencadene respuestas inmunológicas que acaben destruyendo las MN; o que estos virus contengan genes inductores o reguladores de la apoptosis.

Otra teoría que se ha propuesto aunque carece de datos que la apoyen sería el déficit de algún factor neurotrófico que alterase la supervivencia de las MN. Aunque no se ha demostrado su implicación, los factores neurotróficos están estudiándose como posible tratamiento por sus características.

Pese a conocer una gran cantidad de alteraciones observadas en pacientes de ELA y ratones transgénicos hoy por hoy se desconoce la etiología de la enfermedad. Por ello se sigue investigando, de hecho la última teoría se basa en unos descubrimientos publicados en abril de este mismo año. Según estos, los astrocitos jugarían un papel clave en la degeneración específica de las MN espinales. El experimento que apoya esta teoría consistió en hacer cultivos de MN de roedores a partir de células de la médula espinal embrionaria, y ponerlas luego en contacto con neuronas que expresasen la mutación de SOD1, o astrocitos, o los distintos tipos de células gliales. La única vez que se desencadenó la muerte específica de las MN derivadas de la médula espinal fue cuando se añadieron astrocitos que presentaban una mutación en el gen de SOD1. Sin embargo no causan la muerte de otros tipos celulares medulares. Se cree que la degeneración se debe a factores tóxicos que liberarían los astrocitos. Si este descubrimiento se confirma con otros experimentos podría tener grandes repercusiones, no sólo en el conocimiento de la patogenia, sino también en el desarrollo de futuras terapias.

La ELA no tiene **tratamiento** curativo por el momento, sin embargo se puede tomar multitud de medidas que mejoren la calidad de vida del paciente. Los fármacos utilizados sirven en su mayoría para tratar los síntomas: calambres, espasmos, problemas de salivación, etc. Existe también toda una serie de terapias y ayudas para mantener el mayor tiempo posible la independencia del paciente en lo que respecta respiración y movilidad por ejemplo.

El único tratamiento aprobado que trata uno de los fenómenos que suceden a nivel del SNC es el Riluzol. Se trata de un antagonista del glutamato que reduciría la excitotoxicidad. Su uso parece prolongar la vida del paciente en dos meses de media, actualmente se está investigando sobre posibles vías de administración que podrían aumentar su eficacia.

**Las perspectivas terapéuticas** son elevadas pues hay muchas líneas de investigación abiertas sobre posibles tratamientos, aunque los resultados no nos permiten ser demasiado optimistas por ahora.

Quizás el primer gran avance en cuanto al desarrollo de estrategias para disminuir el progresivo avance de la enfermedad fuese la creación del modelo de ELA en ratones como ya vimos antes. La creación de ésta variante de la enfermedad dio a los investigadores un sistema para probar las distintas vías de estudio sin necesidad de experimentar con humanos.

Estos ratones transgénicos presentan una mutación que les hace expresar niveles elevados de la proteína SOD1. Muchas han sido las líneas de ratones transgénicos creadas con ésta característica.

Una de estas líneas es la G93A (utilizada por Albert Clement en sus experimentos) que expresa una mutación de SOD1 que lleva la Gly93Ala y que desarrolla una enfermedad motoneuronal parecida a la ELA (Gurney et al, 1994). Estos animales exhiben la enfermedad en un periodo de 90 días, con temblor de piernas, con decremento de la movilidad y de la fuerza muscular y, después de 3 días, la muerte.

Estas características hicieron de la SOD1 Gly93Ala una herramienta muy útil para probar nuevas estrategias terapéuticas teniendo siempre en cuenta las limitaciones que supone un modelo animal.

Se está estudiando, como ya se mencionó, el uso de factores neurotróficos. No existe una evidencia que los relacione con la ELA, sin embargo se sabe que inducen el crecimiento o la supervivencia de las células por su capacidad protectora frente a agentes dañinos como radicales libres. Uno de los más estudiados es el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF.1). Los primeros estudios no dieron los resultados esperados, apenas era efectivo administrado mediante inyección subcutánea. Recientemente se han publicado resultados más esperanzadores de nuevas investigaciones. Se están estudiando por ejemplo: otras posibles vías de administración como la intratecal; combinar la administración con la realización de determinados ejercicios; y, el bloqueo de una proteína a la que se liga el IGF.1 perdiendo su actividad. No es el único factor de crecimiento estudiado, también el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) entre otros, los resultados también han sido mediocres.

Dada la importancia que parece tener el estrés oxidativo en la degeneración neuronal se están testando muchos fármacos antioxidantes. De nuevo los frutos de estas investigaciones no son los esperados. Al igual que con los factores neurotróficos, se está investigando como aumentar su efectividad, por ejemplo modificando las vías de administración. Algunos ejemplos de fármacos son: la vitamina E, "Selegiline hydrochloride" (inhibidor de MAO con propiedades antioxidantes), N-acetil-cisteína (precursor del glutathione), co-enzima Q-10, o el AEOL 10150 (SOD mimético).

También existen varios estudios sobre el tratamiento con antiinflamatorios. En la ELA, por sus características, se creía que los fenómenos inflamatorios no serían relevantes. Sin embargo los resultados de distintos estudios cuestionan esa creencia. Parece que la neuroinflamación es de hecho un fenómeno de gran importancia. Se ha visto que en un paciente de ELA las áreas afectadas por la neurodegeneración se caracterizan por una acumulación de células microgliales y astrogiales hipertróficas. Además se da una moderada infiltración de leucocitos, y aparecen mediadores de la inflamación.

La gran esperanza terapéutica es la terapia celular. Muy relacionada con ella está la terapia génica por ello vamos a explicar primero qué son las células madre con sus usos terapéuticos en ELA y a continuación comentaremos qué vías de investigación se están realizando actualmente y los resultados obtenidos.

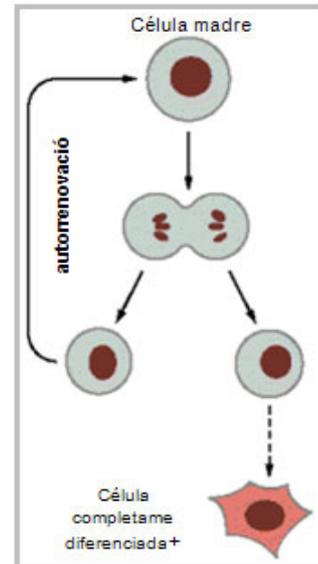
# CÉLULAS MADRE

## INTRODUCCIÓN

Denominamos células madre a un tipo especial de células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin perder sus propiedades y pudiendo llegar a producir células especializadas tras un proceso de diferenciación.

La mayoría de las células de un individuo adulto (refiriéndonos a los mamíferos superiores) no suelen multiplicarse, salvo para mantenimiento de algunos tejidos como la sangre y la piel.

Las células madre muestran un importante potencial para convertirse en distintos tipos celulares en el organismo, sirviendo como medio para reparar tejidos dañados debido a su capacidad de división sin límite. Cuando una célula madre se divide, cada nueva célula tiene la capacidad de dar lugar a otra célula madre o diferenciarse hasta convertirse en otro tipo celular con una función más especializada. La investigación sobre éstas ha proporcionado un conocimiento avanzado sobre el desarrollo de un organismo partiendo desde una única célula. Otro de los conocimientos que ha aportado ha sido la posibilidad de reemplazar células saludables por otras dañadas en el organismo de individuos adultos. Esta prometedora área de la ciencia ha llevado a los científicos a investigar posibles tratamientos o terapias basadas en el uso de células madre.



## HISTORIA

Aunque el concepto de células madre fue introducido hace casi un siglo por Alejandro Maximow (1909), las investigaciones modernas sobre células madre tienen su comienzo en 1963, cuando James Hill, Ernest McCullough y Lou Siminovitch establecieron ensayos para descubrir las células madre hematopoyéticas (HSCs). El grupo las encontró en la médula ósea de ratones. Sus experimentos demostraron que las células de la médula ósea podrían reconstituir hematopoyesis y por lo tanto sanar animales letalmente irradiados. Usando una serie de trasplantes, establecieron la habilidad de autoregeneración de las células originales de la médula ósea.

(Cuando células de colonias esplénicas de médula ósea eran trasplantadas en otros animales que habían recibido una dosis letal de radiación, se observaban colonias de glóbulos blancos y rojos).

En las bases de estos experimentos, el grupo definió las HSCs como células que tenían “habilidades de libre regeneración así como diferenciación multinlinear”. Este descubrimiento marcó el principio de la investigación sobre

células madre de la actualidad. Solo en años recientes han sido identificadas otras células madres somáticas en tejidos con capacidades regenerativas más limitadas.

Los científicos descubrieron hace más de 20 años el modo de obtener células madre de embriones de ratones. Sin embargo, la primera vez que se obtuvieron células madre embrionarias humanas fue en 1994. Se aislaron a partir de un blastocisto procedente de una fecundación "in vitro" (FIV).

Como ya se mencionará más adelante, blastocisto es el nombre que recibe el embrión de entre una y dos semanas antes de implantarse en el útero materno.

Entre los primeros hallazgos y los más recientes han transcurrido infinidad de sucesos que han colaborado con el continuo desarrollo de la investigación.

A continuación se refleja de forma seriada la evolución histórica de los principales avances obtenidos en el campo de las células madre:

## **Inicios**

Aunque hemos mencionado la labor de Alejandro Maximow como padre del término que da nombre a las células, debemos remarcar la dificultad de poner un inicio puntual al comienzo de las investigaciones que podríamos abarcar en el amplio campo de las citadas.

Quizás algo más cercano, desde el punto de vista de la investigación, a la inicialización podrían ser los primeros intentos (datados) para fertilizar óvulos de mamíferos fuera del cuerpo, los cuales están fechados en 1878.

Si bien éste hecho resulta francamente remarcable por su interés de cara al posterior desarrollo de los acontecimientos, debemos aclarar que la lógica sucesión que cabría esperar queda postergada hasta unos 80 años después.

## **Década de los 50**

No es hasta 1959 hasta cuando aparecen evidencias factibles de animales producidos a través de fertilización "in vitro" (FIV) en Estados Unidos. Los animales en cuestión eran conejos.

## **Década de los 60**

Los años sesenta suponen un despertar para la investigación encaminada al desarrollo y conocimiento de los potenciales de las células madre.

El ya mencionado trabajo de Till y McCulloch (1963) ilustrando la presencia de las células autoregenerativas en la médula ósea de ratón es un punto y a parte dentro de ésta escala histórica.

También en ésta década destacan los trabajos de Joseph Altman y Gopal Das, los cuales presentan evidencias de neurogénesis en adultos,

demostrándose así la actividad de células madre en el cerebro (y refutando la teoría de Cajal sobre la no regeneración neuronal).

En 1968 Edwards y Bavister fertilizan el primer óvulo humano “in vitro” y, en este mismo año, se produce el primer trasplante exitoso de médula ósea entre dos hermanos como tratamiento para su SCID (Severe Combined Immunodeficiency) .

Durante éste periodo también aparecen estudios de tetracarcinomas en testículos de varias muestras de ratones indicándose que estos carcinomas se originaron a partir de células germinales embrionarias. El trabajo establece que las células de carcinoma humano son un tipo de células madre.

## **Década de los 70**

Durante los años setenta, las células de carcinoma embrionario inyectadas en blastocistos de ratones producen ratones quimera. Cultivos celulares de células madre se exploran como modelos de desarrollo embrionario (aunque su complemento cromosómico es anormal).

En 1978 se descubren las células madre hematopoyéticas en la sangre del cordón umbilical humano. También en éste año nace Louise Brown, el primer bebe concebido por fertilización “in vitro”. Esto ocurre en Inglaterra.

## **Década de los 80**

En 1980 nace Candace Reed, el primer bebé australiano concebido por FIV, nace en Melbourne.

En 1981, Evans, Kaufman y Martín diferencian células madre embrionarias de ratón a partir de la masa celular interna de blastocistos. Establecen las condiciones de cultivo para el crecimiento pluripotente de células madre embrionarias de ratón ‘in vitro’. Las líneas celulares derivadas de células madre embrionarias que presentan cariotipo diploide y normal, generan derivados de todas y cada una de las tres primeras capas germinales como células germinales primordiales. Inyectando las células madre embrionarias en ratones induce la formación de teratomas. También en éste año nace Elizabeth Carr, el primer bebé concebido por FIV que nace en EE.UU.

Entre 1984 y 1988, Andrews y col. desarrollan células pluripotentes, idénticas genéticamente (clones), llamadas ‘células de carcinoma embrionario’, a partir de Tera-2, una línea celular de tetracarcinoma humano testicular. Las células clonadas a partir de teratoma humano exponían una diferencia en cuanto a ácido retinóico, en células ‘tipo neuronas’ y otros tipos celulares.

En 1989, Pera et al., diferencian una línea clonada a partir de células de carcinoma humano embrionario, cuyos tejidos derivan a partir de las tres primeras capas germinales. Las células son aneuploides (no presentan una poliploidia clara o su número de cromosomas es múltiplo impar del número básico) y su potencial para diferenciarse espontáneamente “in vitro” es

típicamente limitado. El comportamiento de células clonadas a partir de carcinoma humano embrionario difiere de las de los ratones.

## **Década de los 90**

La década de los noventa nos va dejando intervalos de tiempo menores entre los sucesos a destacar dentro de nuestro repaso.

En 1992, células madre neurales son cultivadas “in vitro”.

En 1994, blastocistos humanos creados para fines reproductivos usando FIV y donados por pacientes para la investigación se generan a partir del estadio 2 pronuclear. La masa celular interna del blastocisto mantenida en cultivo, genera agregados con células “tipo trofoblastos” en SNP y “tipo células madre embrionarias” en SNC. Las células presentan un completo juego de cromosomas (cariotipo normal); la mayor parte de los cultivos presenta células con morfología similar a las células madre, sin embargo algunas masas celulares internas se diferencian a fibroblastos. Los cultivos se mantuvieron durante dos generaciones.

En 1995, el presidente de los Estados Unidos Bill Clinton firma “the Dickey Amendment”, una enmienda que prohíbe usar los fondos federales para investigaciones que impliquen la creación o destrucción de embriones humanos.

Entre los años 95 y 96, células madre embrionarias (CME) de primates no humanos se diferencian y mantienen “in vitro”, primero a partir de la masa celular interna de mono Rhesus y después a partir de marmotas. Las CME de primates son diploides y tienen cariotipos normales. Son pluripotentes y se diferencian en tipos celulares derivados de las tres primeras capas germinales. Las CME de primates se asemejan a las CME de humanos e indican que debería ser posible el mantenimiento de CME humanas “in vitro”.

Dos años más tarde, se descubre que la Leucemia está originada por una célula madre hematopoyética, la primera evidencia sobre las células madre cancerosas.

Durante el año posterior, Thompson et al. (Universidad Madison de Wisconsin), derivan CME humanas a partir de la masa celular interna de blastocistos humanos normales donados por parejas bajo tratamiento de fertilidad.

(El poder hacer crecer y mantener estas células “in vitro” supuso el comienzo del boom de las células madre. A partir de ese momento, grupos de investigación de todo el mundo han estudiado las características moleculares de estas células y han desarrollado sistemas más eficaces para cultivarlas “in vitro”. Además, se han hecho avances muy importantes a la hora de dirigir estas células hacia un tipo celular concreto. Esto ha originado que las células madre hayan adquirido un gran potencial terapéutico por sus aplicaciones en la

regeneración de tejidos dañados y restablecimiento de funciones afectadas del cuerpo.)

## **Siglo XXI**

Durante ésta primera década de siglo han sido cuantiosos y variados los acontecimientos que se han desarrollado en torno a la células madre. Los más destacados hacen referencia a las capacidades plásticas de las células madre adultas y a las distintas vías de investigación abiertas en torno a las posibles utilidades terapéuticas derivadas de las mismas.

En el mismo año 2000, Científicos en Singapur y Australia dirigidos por Pera, Trounson y Bongso derivan CME humanas desde la masa celular interna de blastocistos (donadas por parejas bajo tratamiento de fertilidad). Las células madre embrionarias proliferaron durante extensos períodos “in vitro”, mantienen sus cariotipos normales, se diferencian espontáneamente a linajes celulares somáticos derivados de las tres primeras capas germinales, y formaron teratomas cuando se inyectaron en ratones inmunodeficientes.

Como las líneas celulares embrionarias humanas están compartidas y las nuevas líneas son derivadas, en 2001 la mayor parte de grupos de investigación apuesta por métodos para la diferenciación directa de las células “in vitro”. Muchos métodos están siendo priorizados para generar tejidos humanos orientados a transplantes, incluyendo células del islote pancreático, neuronas dopaminérgicas y células musculares cardíacas.

En el año 2003, el doctor Songtao Shi descubre una nueva fuente de células madre adultas en los dientes de leche de los niños.

Entre los años 2004 y 2005, el investigador coreano Hwang Woo-Suk afirma haber creado varias líneas de células madre embrionales a partir de oocitos humanos.

En noviembre de 2004, el estado de California (EE.UU) aprueba la Proposición 71, la cual destina 3 millones de dólares como fondos para la investigación de células madre embrionales durante 10 años. Durante el año siguiente, unos investigadores de la Universidad Kingston de Inglaterra afirman haber descubierto una tercera categoría de células madre, derivadas de la sangre del cordón umbilical (CBEs). El grupo afirma que estas células pueden diferenciarse en más tipos de tejidos que las adultas.

Mientras todo ésto ocurría, entre los años 2001 y 2006, el Presidente de los Estados Unidos George W. Bush aprueba en el congreso la destinación de fondos federales para la investigación de células madre embrionales (aproximadamente 100 millones de dólares) y células madre adultas (250 millones). También promulga leyes que restringen los fondos para la investigación de las células madre embrionales de las líneas celulares ya derivadas.

La noticia con la cerramos ésta inacabada (e imposiblemente actualizable gracias al continuo desarrollo de proyectos) lista de acontecimientos es la que acaeció el siete de Enero de éste mismo año, la cual

anunciaba el hecho de que científicos de la Wake Forest University, dirigidos por el doctor Anthony Atala, informan sobre el descubrimiento de un nuevo tipo de célula madre en el fluido amniótico. Este descubrimiento puede ofrecer una alternativa potencial al uso de células madre embrionales en investigaciones y terapias.

## CLASIFICACIÓN

La primera clasificación a la que debemos hacer referencias es la que las diferencia por su capacidad de división:

### **CÉLULAS MADRE TOTIPOTENTES**

En los instantes posteriores a la fecundación, el embrión unicelular (la primera célula del nuevo individuo), tiene la capacidad de empezar a desarrollar todo un individuo humano. El ADN de ese embrión está absolutamente legible, se puede expresar toda la información, se pueden leer todos los genes.

Este tipo de células madres son las más versátiles. Éstas tienen el potencial necesario para convertirse en cualquier célula humana (cerebrales, hepáticas, sanguíneas, cardíacas...). Podrían dar lugar a un organismo funcional completo. Las primeras divisiones celulares en el desarrollo embrional producen más células totipotentes. Después de cuatro días de divisiones, las células comienzan a especializarse en células madre pluripotentes.

### **CELULAS MADRE PLURIPOTENTES**

A medida que el embrión sigue su desarrollo y se van produciendo más divisiones celulares, las células embrionarias se van diferenciando hacia funciones y estirpes celulares determinados. Esta diferenciación se consigue a través de los plegamientos en el ADN celular, que dejan ilegibles los genes que no va a necesitar expresar esa célula. De esta forma, cuando el embrión ya está en fase de blastocisto (7-14 días postfecundación), si extrajéramos artificialmente las células de su Masa Celular Interna y las cultiváramos, nunca darían lugar a un embrión completo, sino a estirpes celulares determinadas por los genes que en ese momento se pueden leer. Estas células que tienen capacidad para dar lugar a cualquier estirpe celular, pero no a un embrión completo, las denominamos células pluripotenciales. En el caso descrito, estas células pluripotenciales se llamaría también células madre embrionarias o stem cell embrionarias. En sus sucesivas divisiones, la célula madre embrionaria va perdiendo su capacidad de dar lugar a todos los distintos tejidos, al tiempo que empiezan a diferenciarse, a especializarse hacia un tejido u otro.

Las células en su desarrollo poseen dos cualidades básicas: la pluripotencialidad y la diferenciación, que se contraponen: cuanto más pluripotencialidad posee una célula, menos grado de diferenciación tiene, y al revés. La pluripotencialidad, propia de la célula inmadura o indiferenciada, es la capacidad de una célula para convertirse en todas las posibles estirpes celulares. La diferenciación sin embargo es la cualidad por la cual la célula adquiere ya una especialización dentro de un tipo celular concreto que le hace no poder convertirse en otro tipo celular distinto.

En el embrión existen gran cantidad de células pluripotenciales que se multiplican a gran velocidad para ir dando lugar las diferentes partes y órganos del individuo. A medida que proliferan esas células, se van diversificando hacia un órgano y otro corporal, produciéndose la especialización: esa célula está ahí con una ubicación, y con una función concreta.

Así pues, cuando el feto se encuentra aproximadamente en el 3 mes de vida (fin de la etapa de organogénesis), la mayor parte de sus células ya se hallan diferenciadas según el tipo celular que se necesita para cada órgano. Tras el nacimiento, prácticamente todos los tejidos, sobre todo aquellos que más se renuevan, conservan una cantidad pequeña variable de células pluripotenciales capaces de multiplicarse y poder así proporcionar células con el fin de renovar y reparar los tejidos en los que residen. Esas células formadoras de múltiples células hijas, que están programadas para regenerar el tejido donde residen, se llaman célula multipotenciales. Son otro tipo de células madre o progenitoras (stem cells).

## **CELULAS MADRE MULTIPOTENTES**

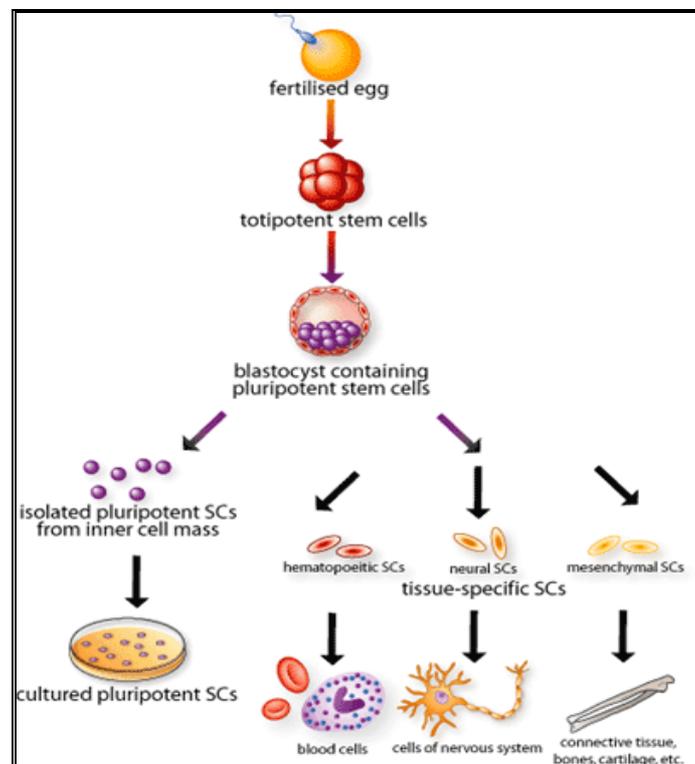
La multipotencialidad se define como la capacidad de generar células, pero sólo del tipo celular del tejido al que pertenecen o residen. Estas células existen, y están presentes en la mayoría de los órganos de la economía corporal del adulto, y conviviendo en su órgano con el resto de las células diferenciadas, tiene una propiedad única: dar lugar a los distintos tipos celulares que componen el órgano en el que residen con el fin, por ejemplo, de renovar las poblaciones de células que van envejeciendo.

Un ejemplo que refleja el potencial de éstas células es el siguiente: El corazón está compuesto por millones de células de distintas estirpes: células musculares, células endoteliales de revestimiento de los vasos del corazón, células de conducción del impulso nervioso... Muchas de esas células citadas, no pueden dividirse, y si se llegaran a dividir, sólo darían lugar a células iguales a ellas. Ahora bien, se ha descubierto recientemente que existen células en el corazón –células madre cardíacas-, que conviviendo con las antes citadas, tienen la capacidad de dividirse y dar lugar a células de las tres estirpes citadas. Estas células algunos las llaman multipotenciales, por su capacidad para dar regenerar células del órgano en el que residen. Algunos autores han llamado a estas células madre de adulto, células madre organo-específicas, para diferenciarlas de las embrionarias. En el caso que se produzca un infarto

de pequeño tamaño, esas células pueden cubrir esa zona infartada con células cardíacas y endoteliales generadas por ellas. Estas células madre también se han encontrado en muchos otros órganos: cerebro, hígado, piel, retina, médula ósea... La capacidad de estas células madre de adulto para regenerar zonas dañadas es muy limitada, y se ciñe sólo a zonas de pequeños infartos. Grandes áreas de infarto no son susceptibles de ser regeneradas por estas células.

De manera natural, los tejidos del cuerpo a lo largo de la vida sufren un desgaste, del que se defienden desarrollando la capacidad intrínseca de autorenovar esos tejidos que se desgastan. De no existir esta renovación, se reduciría considerablemente la esperanza de vida de los seres vivos. Por otro lado, gran parte del amplio elenco de las enfermedades que afectan al ser humano, se basan en la degeneración y muerte de los distintos tejidos que conforman nuestro cuerpo, ya sea de manera aguda (infartos) o crónica (degeneración-envejecimiento). El avance de la medicina ha desarrollado técnicas que consiguen reparar los tejidos a través de los trasplantes. Sin embargo se abren ahora nuevas posibilidades: es la nueva medicina regenerativa, que se propone reparar los tejidos dañados utilizando mecanismos similares a los que de forma natural usa el organismo para este fin, y que por razón de la rapidez de la instauración del daño, no es capaz de hacer eficazmente. Entran en escena las células madre.

Las células madre multipotentes son las menos plásticas y más diferenciadas.



La segunda clasificación hace referencia al origen de las mismas:

## CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Como ya se ha mencionado, el cigoto formado tras la fecundación de un óvulo por un espermatozoide es una célula capaz de generar un nuevo individuo completo. Se trata, pues, de una célula totipotente: capaz de producir un espécimen completo con todos sus tejidos.

Entre los días primero al cuarto del desarrollo embrionario, la célula original va dividiéndose en varias células más.

A partir del **cuarto día** del desarrollo embrionario humano se forma el **blastocisto**. El blastocisto está formado por dos tipos de células y una gran cavidad interior:

Capa externa: forma la placenta y las envolturas embrionarias. Es el trofoblasto.

Masa celular: formará todos los tejidos del cuerpo humano. Se denomina embrioblasto.

Las células de un blastocisto ya no son totipotentes, puesto que una sola de estas células ya no es capaz de generar un individuo completo. Las células de la masa celular interna del blastocisto son células **pluripotentes**.

Estas células pluripotentes del interior del blastocisto son las células madre embrionarias, y tienen capacidad de originar cualquier tipo de tejido. Son el tipo más flexible de células madre.

## CÉLULAS MADRE GERMINALES

Células madre germinales o fetales, que tienen parecidas potencialidades que las embrionarias y que pueden encontrarse en la llamada cresta gonadal de los fetos humanos de 5 a 10 semanas. De ellas se derivarán las células gaméticas durante la vida fértil del individuo.

## CÉLULAS MADRE ADULTAS

También se llaman órgano-específicas. Se originan por la división de las células madre embrionarias. Se encuentran repartidas por gran cantidad de tejidos del organismo como cerebro, médula ósea, músculo, piel, intestino, hígado, páncreas y retina. Su principal función es reemplazar las células que mueren dentro de un órgano o tejido. Su actividad varía mucho de unos órganos a otros: las que están en la médula ósea y forma las células de la sangre son muy activas y se dividen continuamente mientras que las que están, por ejemplo, en el intestino delgado son más inactivas.

Existe una gran controversia sobre si estas células son multipotenciales (sólo originan las células del órgano en el que se encuentran) o pluripotenciales. Hoy en día parece que estas células tienen también, al igual que las embrionarias, la capacidad de originar cualquier célula de cualquier tejido y por tanto son pluripotenciales.

## APLICACIONES TERAPEÚTICAS , GENERALIDADES.

La Neurodegeneración se define como el deterioro estructural o funcional de células o tejidos nerviosos. Las enfermedades neurodegenerativas (END) incluyen gran parte de las patologías que cursan con pérdida de neuronas, como la ELA.

Las END afectan a millones de personas en el mundo y su incidencia aumenta con el envejecimiento de la población. Por ello encontrarles cura se ha convertido en un objetivo prioritario en nuestra sociedad. Tras años de investigación sobre los posibles tratamientos los resultados no son demasiado optimistas, ni en la ELA, ni en las END más comunes (Alzheimer, Parkinson...). Las células madre han despertado un enorme interés, por su capacidad de división y de transformación en distintos tipos celulares, de este modo pueden dar nuevos tejidos, como explicamos previamente.

Durante años se pensaba que en el SNC adulto no se podían crear circuitos con nuevos elementos celulares. Sin embargo, se fueron encontrando ejemplos que ponían en entredicho esta idea de que la regeneración de los circuitos era imposible: en los peces existen regiones del cerebro - concretamente el cerebelo- que crean nuevas neuronas y dan lugar a nuevos circuitos neuronales para el control del movimiento; en los pájaros cantores, el núcleo del canto del cerebro, responsable del aprendizaje de nuevos trinos, va recibiendo nuevas células precursoras de neuronas que se convierten en neuronas que se integran en la red del cerebro adulto; y en los mamíferos existe una continua creación de neuronas en el cerebro que acaban integrándose en los circuitos olfativos. De esta manera, podemos pensar también que las END se pueden solventar con terapias celulares, buscando células totalmente compatibles y haciendo que se integren en los tejidos enfermos de forma que cumplan las funciones de las que desapareciesen.

El tratamiento de una enfermedad injertando células madre se denomina **terapia celular**. El interés por estas terapias para desórdenes del SNC tiene unos 30 años. A finales de los setenta se demostró que injertos intraestriatales de tejido mesencefálico fetal, rico en neuronas dopaminérgicas, inducía una recuperación funcional en ratas con lesiones provocadas por una neurotoxina que afecta únicamente a las neuronas dopaminérgicas de la ruta Nigro-Estriatal (es un modelo animal de la enfermedad de Parkinson) . Estas observaciones constituyen la primera evidencia de la capacidad que tienen los implantes celulares en el SNC adulto de revertir los daños causados por la degeneración. Desde entonces la terapia celular constituye la gran esperanza de las END, incluida la ELA.

A posteriori se ha demostrado la existencia de células madre en el SNC adulto de todos los mamíferos incluido el hombre. La existencia de células madre en el SNC ofrece nuevas posibilidades en la terapia celular, por lo que se ha desarrollado mucho su investigación.

Parece que en el SNC adulto se están generando constantemente nuevas neuronas que además de renovar el tejido del bulbo olfativo o crear

nuevos circuitos en el hipocampo, reemplazan a las neuronas dañadas. Pero a diferencia de muchos tejidos la capacidad de autorreparación del SNC es muy limitada, y cuando el daño es grande no consigue compensarlo. Existen distintas hipótesis sobre las razones por las que no es capaz de reparar grandes lesiones:

1. El número de células madre neuronales no es suficiente para llevar a cabo la reparación.
2. Las células madre neurales no consiguen alcanzar determinadas regiones.
3. El microambiente que se crea en torno a la lesión no es favorable para que las células se desarrollen.

Ninguna de estas hipótesis excluye a las demás, de hecho parece probable que sea la suma de las tres lo que impide la autorreparación. Y la terapia celular de reemplazo se basa en corregir estos problemas, es decir: injertar en la zona de la lesión un número suficiente de células madre neuronales junto con factores neuroprotectores que faciliten su supervivencia.

El trasplante de células madre ofrece una estrategia única para disminuir la progresión de la ELA al promover la recuperación funcional por el potencial de estas células de reemplazar a las células neuronales perdidas. Pero la terapia celular de reemplazo no es la única. A veces no se requiere una reconstrucción de los circuitos o esto no es suficiente. Las células transplantadas podrían liberar neurotransmisores de manera tónica y no regulada, o pueden producir (normalmente tras terapia génica) factores neurotróficos o neuroprotectores que contrarresten la degeneración, movilicen precursores neuronales endógenos o promuevan la supervivencia de las células que aún no han degenerado.

Se ha observado que las células madre son capaces de diferenciarse en tipos neuronales específicos cuando se injertan en un SNC en desarrollo o en uno adulto pero sólo en zonas neurogénicas. Sin embargo estas células permanecen indiferenciadas o se transforman en su mayoría en células gliales cuando el trasplante se realiza en áreas no neurogénicas de un cerebro adulto. En estas regiones las células sobreviven y crecen correctamente tras el trasplante sólo si son inmaduras, es decir, si están completamente diferenciadas en neuronas pero todavía no han formado extensiones axonales. Las neuronas implantadas son capaces de establecer conexiones funcionales y recíprocas con las células del huésped, incluso en un cerebro adulto. Esta capacidad disminuye con la edad pero se ve aumentada en los individuos con zonas dañadas. Esto sugiere que los mecanismos que regulan la diferenciación y conectividad durante el desarrollo pero se pierden en el adulto, pueden reactivarse por lesión o daño en el SNC. Se cree que las células que pierden las conexiones aferentes podrían liberar factores que estimulen el crecimiento axonal promoviendo la reinervación por las células implantadas.

Las células madre neuronales pueden transformarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. La transformación se realiza *in vitro*, previa al implante. Si se dejan crecer las células en un medio permisivo se transforman de manera espontáneo en cualquiera de los tipos mencionados. Lo que

interesa es tener tipos específicos de células por lo que hay que controlar rigurosamente los distintos pasos de la diferenciación.

Uno de los límites de esta terapia es la fuente de células madre. En los distintos ensayos que se han realizado en estos años, se han utilizado prioritariamente CME, pero también células madre adultas. Si, como hemos descrito, lo que necesitamos son células adultas plenamente funcionales que sustituyan a las dañadas y que sean compatibles con cada individuo propiamente dicho, la mejor manera será conseguir células que tengan su origen en el mismo individuo a tratar y sean, por tanto, no susceptibles de rechazo. Tras algunos intentos de obtener células del individuo adulto y reintroducirlas después de su cultivo, con o sin modificación (por ejemplo, introduciendo un gen para que segreguen ahora una sustancia de la que carece el individuo) para obtener un mayor número de células funcionales, se dirigió la investigación a obtener células precursoras de las células adultas, que se podrían cultivar, obtener en cantidades muy considerables, manipular y diferenciar hasta tipos celulares adultos con las características que teóricamente se precisan. La mirada se dirigió a las células embrionarias más indiferenciadas, ya que ellas son las que poseen las mayores capacidades de formación de distintas células.

Las complicaciones más frecuentes que surgen con la terapia celular son las infecciones, los rechazos cuando las células no son del propio individuo y la degeneración de las células implantadas. Además, según el tipo celular existen otros inconvenientes. Las CMEs plantean muchos problemas éticos y morales, y en muchos casos se da un crecimiento incontrolado de las células provocando teratomas. Estas células tienen una gran capacidad proliferativa pero no es fácil controlar su crecimiento, y además los resultados en cuanto a su diferenciación son bastante impredecibles. Por otra parte las células madre adultas no generan tumores pero no parecen tener tanto potencial como las embrionarias a la hora de liberación de neurotransmisor o en sus propiedades eléctricas.

No podemos hablar de terapia celular sin hacer mención a la terapia génica, ya que en muchas ocasiones se realizan conjuntamente. Por ello explicaremos brevemente en que consiste esta terapia.

La terapia génica es el proceso por el cual se inserta material genético en una célula, con el fin de hacer que esta produzca una proteína normal. Las utilidades van desde curar enfermedades unigénicas hasta modificar el equilibrio del sistema inmune, permitiendo la modulación de la respuesta contra cualquier antígeno. En esencia es cambiar la secuencia del genotipo de un organismo para que tenga implicaciones fenotípicas.

Desde el descubrimiento de las enzimas de restricción en el año de 1.970 por Arber y Hamilton se sentaron las bases para transferir genes entre diferentes células u organismos, inclusive pertenecientes a diferentes especies. En 1.978 se realizó la primera hormona recombinante insertando el gen de la insulina en una bacteria *E. coli*. De allí en adelante se afianzaron los conocimientos necesarios para transferir genes a células humanas con el fin de

alterar el fenotipo patológico y generar una nueva forma terapéutica. La primera transferencia se realizó en el año de 1.989 en un paciente con una inmunodeficiencia. Aunque no se encontraron efectos clínicos se explicitó que tampoco había efectos deletéreos como muchos apocalípticamente habían pronosticado. En 1.990 se trató con terapia génica un paciente que padecía de la deficiencia de la enzima adenosina-deaminasa presentando infecciones bacterianas a repetición. Aunque la mejoría fue temporal, con este ensayo se comprobó que la terapia génica tenía posibilidades terapéuticas reales.

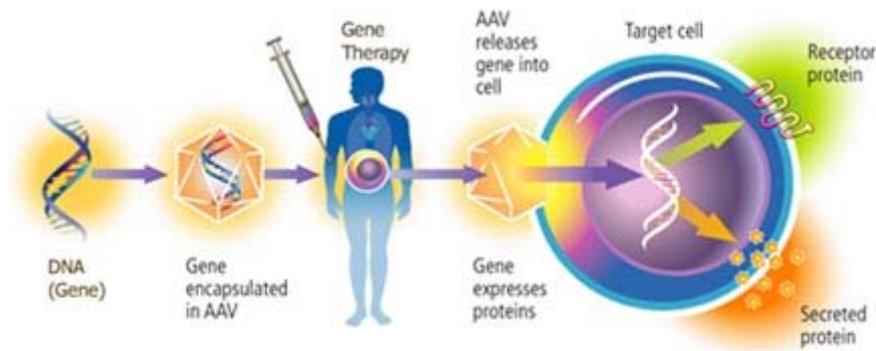
La terapia génica es un método que puede ser usado para el manejo de trastornos hereditarios, así como de enfermedades adquiridas. En las de origen puramente genético están todas las alteraciones unigénicas, principalmente las que presentan un mecanismo de herencia recesivo, en donde se ha demostrado la relación entre un gen y una proteína. Las patologías adquiridas como neoplasias o enfermedades infecciosas tienen un abordaje curativo y otro preventivo, ya que si pudiéramos cambiar la susceptibilidad genética de un individuo a una cierta patología podríamos prevenir la aparición de ese fenotipo y estaríamos “vacunando” a las personas contra padecimientos multifactoriales.

Para introducir un gen en una célula eucariota se utilizan vectores que transportan normalmente material genético a las células como virus o fagos. El DNA o RNA de estos organismos es cortado con enzimas de restricción con el fin de quitar las regiones patógenas e insertar en estas zonas de su genoma el gen de interés médico. Una vez recombinado el genoma del vector con el nuevo material genético, este se ensambla de forma fisiológica y se le deja “infectar” o transfectar la célula blanco. El vector, al realizar sus procesos de incorporación al genoma humano y a sus mecanismos de transcripción y traducción de proteínas terminará finalmente generando cantidades importantes de la proteína normal que seguramente va a tener efectos terapéuticos en el paciente.

La terapia génica se divide según la metodología utilizada en terapia *In vivo* o *Ex vivo*. En la primera se realiza la transfección del material genético directamente a las células del tejido del paciente. Un ejemplo de este sistema es infectar por inhalaciones con virus modificado, la mucosa respiratoria de los pacientes con fibrosis quística. La segunda estrategia muy utilizada para el tejido hematopoyético se trata de extraer parte de las células afectadas del paciente para realizar la modificación en el laboratorio y posteriormente introducir este tejido modificado (“curado”) nuevamente en el paciente. Otra forma de clasificar la terapia génica es utilizando el tipo de célula blanco: Germinal o somática. La terapia sobre células germinales ha sido ampliamente rechazada en vista de que estaríamos influyendo sobre individuos aún no nacidos y sin los conocimientos suficientes para comprender las posibles implicaciones deletéreas que se podrían producir en un genoma pluripotencial.

Los vectores que transportan material genético dentro de las células son de tipo viral o no viral. En los primeros se ha trabajado principalmente con Adenovirus, Herpes virus y Retrovirus. Estos son modificados para disminuir su capacidad replicativa haciéndolos inocuos para la célula. Los métodos no

virales incluyen transporte del DNA en liposomas, electroporación, inyecciones de DNA desnudo o bombardeo con partículas de oro.



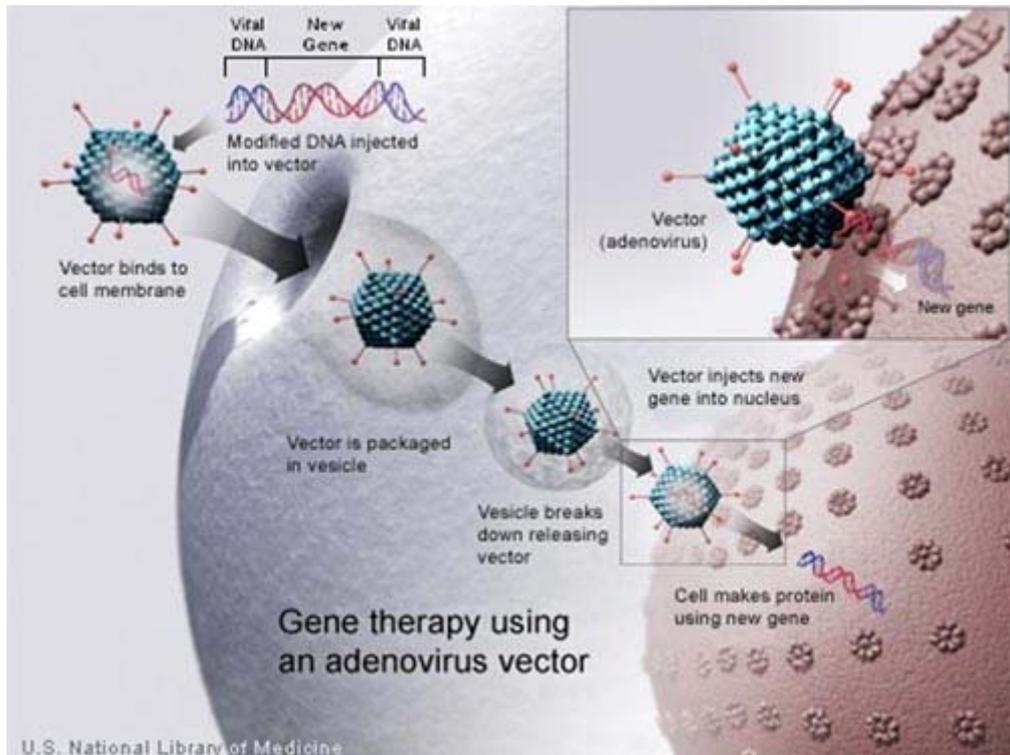
En la actualidad la terapia génica se utiliza para el tratamiento de enfermedades unigénicas, cáncer, enfermedades infecciosas y otras como la ELA, la artritis reumatoide o la diabetes mellitus. La mayoría de esfuerzos se han dirigido hacia patologías del tejido hematopoyético o neoplasias. Las neoplasias dependientes de tejido nervioso son unas de las más prometedoras para su curación, ya que las células son infectadas con virus que generan muerte celular solo en las zonas donde el vector se incorpora y por lo tanto las células normales de tejido nervioso no se verán afectadas por el tratamiento.

El principal obstáculo que afronta la terapia génica es la imposibilidad técnica de introducir el material genético en el mismo sitio donde están los genes anómalos. La mayoría de vectores deja los nuevos genes extracromosómicos por lo que el efecto se pierde rápidamente por digestión del DNA o por que en las mitosis sucesivas el nuevo material no se incorpora a los cromosomas. La farmacocinética de los vectores virales o no virales es un elemento importante para un adecuado tratamiento y hasta ahora se han empezado a hacer las primeras consideraciones sobre la mejor manera de abordar el problema. En la mayoría de trabajos realizados hasta ahora, la limitación principal es el corto tiempo de expresión de la proteína nueva. Por múltiples razones la célula termina evitando la transcripción y traducción del gen modificado y el efecto terapéutico desaparece. Otros efectos secundarios que se han visto son la reacción inmune contra el nuevo producto o la activación de otros sistemas génicos que por ignorancia en la fisiología de la genética es imposible prever su disregulación.

En el momento actual se han descrito en la literatura 425 protocolos para realizar terapia génica en humanos y se han intervenido más de 3.400 pacientes en el mundo. El 70% de las terapias realizadas han sido para intervenir procesos neoplásicos, un 12 % sobre enfermedades infecciosas y un 9% sobre patologías unigénicas. Los métodos más utilizados como vectores son el retrovirus, los liposomas y los adenovirus.

A continuación veremos brevemente como se ha desarrollado la investigación sobre la terapia celular y génica para tratar la ELA.

# TERÁPIA GÉNICA EN ELA



## DOS VÍAS

La primera vía sería usando el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que mejora sustancialmente la supervivencia en ratones con esclerosis lateral amiotrófica, según un estudio publicado en "Nature".

Los autores, de la compañía británica Oxford BioMedica comprobaron que el tratamiento con el citado factor de crecimiento aumentó la esperanza de vida de los animales en un 30% sin causar efectos secundarios tóxicos. Algunas investigaciones recientes han relacionado los bajos niveles de VEGF con la ELA, tanto en ratones como en seres humanos, sugiriendo que el factor de crecimiento ayuda a proteger los nervios frente a la degeneración. En el presente estudio, los investigadores decidieron explorar los efectos de la terapia génica con VEGF.

Una sola inyección retrasó el inicio de la enfermedad en el modelo experimental y frenó la progresión. Además, señalan que la terapia se mostró útil incluso cuando se administró la inyección cuando los ratones ya no podían moverse.

En otro centro (segunda vía) se ha descubierto otra novedosa forma de terapia génica que también ha retrasado los síntomas y ha doblado la esperanza de vida de ratones con una enfermedad equivalente a la ELA.

En experimentos con ratones destinados a desarrollar la afección, inyecciones del gen para el factor de crecimiento IGF-1 en las células nerviosas protegidas por músculos, prolongan la supervivencia y mejoran la fuerza. Sus descubridores afirman estar planeando ensayos clínicos y también esperan tener preparado el tratamiento para el próximo año.

Sus descubridores afirman que es el tratamiento más beneficioso jamás visto en el ratón, y que es también el primero que aumenta la supervivencia de los animales cuando es aplicado antes de que los síntomas se desarrollen.

La ELA es una enfermedad terrible y los pacientes tienen muy pocas opciones de tratamiento hoy día. Incluso en ratones, la progresión de la enfermedad es tan rápida que sólo se pueden probar los posibles tratamientos antes de que el ratón enferme. Es muy esperanzador que esta terapia génica pueda frenar la progresión incluso cuando los síntomas se han desarrollado.

Las terapias génicas usan virus para trasladar instrucciones específicas genéticas a células y normalmente tienen que estar ubicadas directamente donde el gen es necesitado. Pero en vez de inyectar este virus “adeno-asociado” en el nervio específico en el cerebro y médula espinal (hazaña que es probablemente imposible) investigadores del Instituto Salk descubrieron la habilidad del virus para migrar desde el músculo hasta los nervios que lo controlaban. Las células nerviosas entonces producían la proteína IGF-1.

La proteína IGF-1 ha sido usada en ensayos clínicos, pero con resultados menores, según Fred H. Cage, Ph.D., profesor de genética en el instituto Salk. El mayor descubrimiento ha sido lograr llevar la proteína a través de la barrera hematoencefálica en el SNC.

Estudiando una versión marcada del virus adeno-asociado, descubrieron que podría viajar desde los músculos a los nervios. Una vez en los núcleos de las células nerviosas, la maquinaria celular produciría la proteína.

Los investigadores mostraron que cuando IGF-1 es solo producida en músculo, los beneficios son mínimos.

La clave del trabajo es un modelo de ELA de ratón, desarrollada en parte en el instituto John Hopkins. Sin ningún tratamiento, estos ratones, están modificados genéticamente para producir de forma elevada la superóxido dismutasa-1 (SOD-1). Desarrollan los primeros síntomas de debilidad a los noventa días de edad y sucumben a la parálisis en los 45 días posteriores.

La inyección de IGF-1 se aplica en ambos cuádriceps y en los músculos de entre las costillas que ayudan a controlar la respiración manteniéndoles fuertes y prolongando su vida.

Los ratones que reciben IGF-1 a los sesenta días de edad, desarrollan los síntomas 31 días después que los ratones no tratados (por ejemplo a los 121 días) y viven, de media, 40 días más. Los ratones tratados viven 265 días, mientras que los ratones control sólo 140 días. Los ratones que reciben inyecciones de IGF-1 en los noventa días de vida viven una media de 22 días más que sus homólogos no tratados.

Además de planear el ensayo clínico, los investigadores continuarán investigando como IGF-1 protege los nervios para aumentar sus conocimientos sobre la enfermedad e incrementar el potencial terapéutico de IGF-1.

Cuando hay un exceso de SOD-1 en ratones se estimulan los efectos de la enfermedad.

Los autores del artículo en el que se expone el avance son Kaspar, Cage y Nushin Sherkat del Instituto Salk para Estudios Biológicos, y Rothstein y Jeronía Llado de la Escuela Universitaria de Medicina John Hopkins.

## TERÁPIA CELULAR EN ELA

La utilización de células madre es un campo temático muy amplio. Dentro del contacto con la enfermedad podemos tener distintos tipos de participación así como distintos tipos de administración (eso sin contar con las distintas vías de adquisición de las mismas).

Quizás las participaciones principales de estas células en la ELA sean las de regenerar las motoneuronas perdidas (ya sea mediante la generación *de novo* a través de la transdiferenciación o mediante la fusión celular) y la creación de más células de apoyo (células gliales) que impidan las pérdidas.

- Bajo la primera forma de actuación, destacamos el trabajo de unos investigadores de la Universidad de Wisconsin que consiguieron producir motoneuronas humanas a partir de células madre. Este hecho desembocó en un proyecto de investigación en el que algunos científicos del centro Waisman procedieron a transplantar esas neuronas motoras procedentes de células madre embrionarias humanas en médula espinal de embriones de pollos. Con esto se pretendía determinar los posibles cambios morfológicos e histológicos en la médula de pollos y extrapolarlo al caso humano, al mismo tiempo que se evaluaba la supervivencia de dichas motoneuronas y los posibles cambios que experimentaba la enfermedad del animal. Y a partir del mejor conocimiento de las señales que permiten la diferenciación de células madre a motoneuronas, se pretende reemplazar en un futuro las motoneuronas perdidas.

- Con respecto al segundo tipo de actuación, cabe destacar la labor de Albert Clement y colaboradores. En el año 2003, éstos investigadores demostraron en ratones quimera (generados por la inyección de células madre embrionales “wild-type” en los blastocistos SOD1) que las células no neuronales (células gliales) pueden mejorar la degeneración y supervivencia de los ratones SOD1.

En cuanto al mecanismo por el cual se hacen llegar las células madre a las zonas afectadas pasa por distintas técnicas:

- El trasplante de células madre es una estrategia potencial para el tratamiento de ELA (normalmente el trasplante se realiza con células de la médula ósea aunque no siempre sea así).

Por parte de la técnica de trasplante cabe destacar la labor de unos cuantos científicos del centro John Hopkins en Mariland (EEUU) los cuales han llevado a cabo una investigación en la que mediante el trasplante de células embrionarias de ratón procedentes del bulbo olfatorio de un cerebro de ratón adulto han comprobado que se retardan los síntomas y la muerte neuronal en pacientes afectados por ELA. Las células madre del bulbo olfatorio de un individuo adulto son una fuente potencial de células madre no embrionarias (adultas) que podrían usarse en el reemplazo de células nerviosas perdidas como consecuencia de la ELA.

- También ha sido descrito que la administración intravenosa de una alta dosis de células madre (del cordón umbilical) en ratones SOD1 aumenta su esperanza de vida (Ende *et al.*, 2000; Garbuzova-Davis *et al.*, 2003).

Uno de éstas investigaciones de administración intravenosa se realizó en el departamento de neurocirugía de la Universidad del Sur de Florida. Como principal objetivo se planteó determinar los efectos a largo plazo de la administración intravenosa de células sanguíneas mononucleares derivadas del cordón umbilical humano, sobre la progresión de la enfermedad en modelos de ratones con una sintomatología bien definida de ELA.

Además de esto, se examinó la distribución de las células administradas tanto dentro como fuera del sistema nervioso, la migración de las células transplantadas hacia áreas degeneradas de cerebro y médula espinal, así como también, su correspondiente inmuno-fenotipo.

Las fuentes de obtención de las células madre también ha sido un importante objeto de estudio de cara a la investigación. Ya se ha hablado de las de la médula ósea, las del bulbo olfatorio y las del cordón umbilical, pero en éste respecto también cabe destacar algunas investigaciones:

Quizás pasando por encima de toda forma de ética, el investigador coreano Hwang Woo Suk llevó a cabo la que posiblemente sea la primera extracción de células madre de embriones humanos clonados. Éste científico trazó acuerdos con otros investigadores para en un futuro no muy lejano combinar conocimientos a favor de la investigación sobre la ELA.

Al margen de las formas de actuación y de las vías de administración, queda patente que el efecto de estas células es positivo casi de cualquiera de las maneras. Los estudios que reflejan las amplias capacidades de las células a la hora de reducir el progresivo deterioro de la enfermedad se repiten a lo largo del tiempo:

- En el año 2004, el trabajo de Stefania Corti y colaboradores (Universidad de Milán) establecía la contribución positiva de las células madre de la médula ósea al fenotipo de la ELA. Habían generado ratones quiméricos SOD1 por trasplante de células de la médula ósea en todos los tejidos (Okabe *et al.*, 1997).

(Con éste modelo, también se quería evaluar si la contribución de las células del Sistema Nervioso Central y los tejidos mesodermaleicos estaban asociadas con la generación *de novo* o con la fusión celular).

- En la Universidad del Estudio en Milán, se experimentó con el fin de evaluar el potencial de células derivadas a partir de células madre de médula ósea procedentes de un fenotipo 'wild-type', para modificar el fenotipo de la ELA.

Los investigadores Silani y colaboradores produjeron una quimera de médula ósea Cu/Zn-SOD en ratones transplantando células obtenidas de médula ósea de ratones que: Primero expresan fluorescencia verde de la GFAP en todos los tejidos y segundo expresan la proteína Thy1-YFP (espectro variante de la GFAP) que emite fluorescencia amarilla sólo en neuronas. En el recipiente que contenía la corteza cerebral, se observaron unas neuronas poco habituales que expresaban GFAP+ e YFP+, las cuales se habían generado probablemente por fusión celular. Las células de microglía GFAP+ estaban representadas tanto en el cerebro como en la médula espinal de los animales afectados.

El ratón quimera SOD1-médula ósea 'wild-type' mostró un significativo retraso de la enfermedad y un incremento en la esperanza de vida, probablemente debido a un efecto positivo del "ambiente no neuronal" que hay en la neurogénesis.

- En España, un grupo del Instituto de Neurociencias de Alicante dirigido por el investigador Salvador Martínez ha desarrollado modelos experimentales en los que demuestran la capacidad que tienen las células madre de la médula ósea para generar células neurales. Este equipo acaba de comenzar un ensayo clínico en el que tratarán a diez afectados de ELA de toda España mediante el transplante de células madre de la médula ósea del propio enfermo.

Salvador Martínez ha desarrollado con distintos grupos de trabajo innovadores experimentos que ponen de manifiesto las terapéuticas cualidades de éstas células, así como importantes avances encaminados al retraso de la progresión de la ELA.

En uno de sus últimos trabajos (Neuroprotective effect of adult hematopoietic stem cells in a mouse model of motoneuron degeneration), se pone de manifiesto que la inyección de células madre en modelos animales retrasa la progresión de la ELA unos dos meses, el equivalente a 10 años en humanos, según ha informado Salvador Martínez en Barcelona.

El investigador forma parte de la Red de Terapia Celular, que está financiada por el Ministerio de Sanidad y Consumo a través de las Redes Temáticas de Investigación Cooperativa. Las conclusiones de sus estudios de ELA en modelos animales aún no se han publicado.

Martínez ha utilizado ratones con la ya conocida enfermedad genética parecida a la ELA en humanos. La investigación experimental ha consistido en tomar células hematopoyéticas de la médula ósea de ratones donantes y trasplantarlas a la médula espinal de los ratones con ELA.

Así han visto que las motoneuronas no se mueren, sino que ejercen un efecto neuroprotector, que se produce por trofismo celular.

En los ratones, este efecto neuroprotector se manifiesta porque los animales se muestran más vivos, se mueven más y se observa una mejora de la función motora mediante electromiografía. El número de ratones en que se ha constatado este alivio de los síntomas es "muy significativo".

La mejoría que experimentan dura un promedio de uno o dos meses -lo que representaría unos diez años en la vida humana- por lo que actualmente el grupo de Martínez está ensayando el trasplante de las células madre adultas en pacientes.

Se debe tener en cuenta que los pacientes con ELA mueren entre cinco y siete años después del diagnóstico. Con esta terapia celular se conseguiría proporcionarles más calidad de vida durante diez años y aún más si fuera posible retrasplantarlos. Sin embargo, todavía no hay datos sobre los ratones retrasplantados.

En este sentido, Martínez ha explicado que su equipo trabaja en paralelo a los ensayos que están haciendo en humanos en Italia, bajo el liderazgo de la investigadora Letizia Mazzini.

El trabajo de Leticia Mazzini (Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans) trata de demostrar la viabilidad y seguridad del proceso de trasplante de las células madre en humanos. Éste trabajo se fundamenta en el éxito obtenido en el modelo animal de la enfermedad, en el significativamente lenta progresión que aparece tras la implantación.

Las células fueron suspendidas en un volumen dado de líquido cefalorraquídeo autólogo y trasplantado a la médula espinal mediante una micropipeta.

Se determinó que ningún paciente manifestó mayores efectos adversos tales como fallos respiratorios o muerte. Los efectos secundarios minoritarios que se detectaron fueron: irradiación de dolor intercostal que fue reversible tras un periodo de tiempo significativo de 3 días, y disestesia sensorial en la pierna que fue reversible en unas seis semanas. No se observó ningún cambio en el volumen de la médula espinal u otros signos anormales que pudieran derivar de la proliferación celular.

Las conclusiones de su trabajo parecen dejar constancia de que los procedimientos de expansión de las células madre mesenquimáticas autólogas (*ex vivo*) y su trasplante en la médula espinal de humanos es seguro y está bien tolerado por los pacientes de ELA.

En éste punto cabe destacar la falta de datos obtenidos con pacientes humanos. El miedo a empeorar la situación de los enfermos y la dura carga ética que supone experimentar con ellos (además de la complejidad de las posibles intervenciones) ha ralentizado el avance lógico de la ciencia.

A pesar de todo esto, en el año 2004, el investigador Huang declaró haber tratado a 40 pacientes de ELA usando inyecciones tanto intraespinales como en el tronco encefálico.

Cada inyección suponía un millón de células procedentes del bulbo olfatorio.

No hay datos presentados todavía sobre los efectos que se han observado tras la exposición en esos pacientes (ni positivos ni negativos). Lo único que se ha demostrado son unos vídeos en los que aparecen 8 pacientes afectados por ELA antes y después del tratamiento. Dos de los pacientes no parecían mostrar ningún cambio en su condición tras del tratamiento. Los datos referentes al resto de los pacientes todavía se encuentran ausentes.

El Dr. Huang ha explicado que dentro de cada grupo de pacientes (tanto aquellos que presentan sólo daño medular como aquellos que se encuentran afectados por la ELA) hay un rápido incremento de la función parcial. Sin embargo, no se han aportado datos todavía sobre los efectos a largo plazo del tratamiento.

El tono oscurantista que rodea los hechos y la falta de publicaciones o datos oficiales al respecto hacen pensar que o bien no se han obtenido resultados concluyentes o bien los protocolos de administración no cumplen las medidas necesarias para que un tratado público pueda ser considerado de forma significativa.

Aunque los resultados mostrados en los distintos experimentos destacan los beneficiosos efectos de las células madre sobre las distintas afecciones de la enfermedad, queda claro que su acción no formará parte de una solución de la enfermedad sino de una forma de amortiguación de sus efectos.

De cara al futuro, los distintos investigadores de ésta y otras ramas referidas al tratamiento de la ELA apuestan por la utilización de terapias combinadas.

## **CONCLUSIONES**

Después de contrastar la información que aparece en los distintos artículos que hablan de la terapia celular y su posible aplicación a la ELA, se nos queda un sabor agri dulce en la boca. Mientras algunos parecen estar convencidos de que no sólo será efectiva, sino que ya estamos listos para aplicarla en pacientes otros se muestran cautelosos, incluso escépticos. No se sabe bien que creer, pero parece sensato ser prudentes. Sin duda estamos ante una terapia con una potencialidad increíble, pero queda mucho por investigar antes de poderla aplicar de modo seguro.

Si creemos esto es por varios motivos. Primero hay que tener en cuenta que han pasado más de treinta años desde el primer ensayo clínico de trasplante celular que se realizó en enfermos de Parkinson, y desde entonces los resultados no han convencido a la comunidad médico-científica como para usarlo como tratamiento. Esto se debe a la heterogeneidad de los resultados que se han obtenido no sólo en pacientes de ELA, sino en los enfermos de cualquier END tratados. No se sabe por qué hay pacientes que responden mucho mejor que otros, y este desconocimiento hace que esta terapia sea inaplicable. Posiblemente hasta que no se conozcan mejor el desarrollo y la funcionalidad del SNC, la ELA, y las características de las células madre, no se podrá controlar como es debido la terapia celular, ni la génica.

Dada la complejidad que presentan los circuitos neuronales y sus funciones, resulta complicado pensar cómo van a conseguir su reconstrucción. Por lo que muestran muchos artículos, sí que existen evidencias de esta reconstrucción de modo parcial. Pero lo que no se sabe es como se ha llevado a cabo. Es muy posible que sean factores endógenos los que controlen la reinervación correcta, pero saber qué factores y de qué modo es fundamental para progresar en este tratamiento.

Otros problemas relacionados con esta terapia son la aparición de teratomas debido a un crecimiento incontrolado de las células madre, o la diferenciación a tipos celulares no deseados, pues todavía no se conocen bien todos los factores que interviene en este proceso. Sin duda estos problemas se solucionarían en el momento en el que se entiendan todos los mecanismos que se dan en las células madre.

Es lógico pensar que si no se sabe qué desencadena una enfermedad ni cuál es exactamente su patogenia, es prácticamente imposible curarla. Esto es exactamente lo que sucede con la ELA.

Además la terapia celular no tiene por qué ser buena para todos los tipos de daño celular. Por ahora parece que la Enfermedad de Parkinson y la de Huntington son los mejores candidatos para conseguir buenos resultados, ya que la degeneración afecta a una zona bien delimitada, no muy extensa y donde predomina un sólo tipo de neuronas. Sin embargo, en enfermedades como la ELA o la enfermedad de Alzheimer, donde el daño celular abarca extensiones mayores, la terapia celular de reemplazo parece más complicada, unos resultados más mediocres así lo muestran. Por ello sería tal vez mejor

centrarse en la terapia celular combinada con la génica en la que en vez de reemplazar las neuronas dañadas se busque neuroprotección.

Además, debemos conocer mejor la ELA, y aplicarse la terapia en el momento preciso para obtener un efecto óptimo, ya que, por una parte, es una patología cambiante, y por otra parte, cualquier intervención sobre elementos o mecanismos del SNC, aunque sea muy localizada, tiene importantes repercusiones generales debido a la alta capacidad de adaptación y plasticidad de las neuronas y a la alta conectividad que hacen funcionar al SNC como un todo.

Según muchos investigadores, con los que estamos plenamente de acuerdo, la prisa en aplicar esta terapia está llevando a realizar ensayos clínicos científicamente infundados que se basan en ensayos pre-clínicos poco rigurosos. Antes de llegar a una aplicación clínica no sólo debemos obtener datos convincentes de los ensayos, si no llegar a comprender qué mecanismos subyacen a cualquier mejora que se observe. Hay que llegar a entender los mecanismos moleculares y celulares necesarios para la adecuada integración estructural y funcional de las células implantadas.

Es evidente que esta enfermedad es un grave problema a nivel social y que urge encontrar una cura o al menos un tratamiento que sea más efectivo que los actuales. Además existe una gran presión por parte del sector farmacéutico por los beneficios económicos que supondría este descubrimiento. Estos ensayos prematuros han dado en ocasiones resultados terribles, ocasionando más sufrimiento en los pacientes del que les provoca la propia enfermedad. Pero por otra parte la prisa está resultando beneficiosa ya que se está invirtiendo mucho dinero en estas investigaciones y están trabajando científicos muy cualificados, de los mejores del mundo.

También resulta problemático encontrar la fuente de células óptima para esta terapia. Como vimos antes tanto las embrionarias como las del adulto tienen inconvenientes. De los problemas éticos que derivan del uso de células madre embrionaria hablaremos en un anexo, pues es sin duda un tema esencial a la hora de discutir la validez de esta terapia.

Otro paso necesario para que estas terapias avancen, sería una mayor comunicación en la comunidad científica para unificar protocolos, tanto de la intervención quirúrgica como de los procesos de diferenciación y proliferación de las células madre, así será más fácil comparar los datos obtenidos. Parece que en este sentido se está progresando ya que existen por ejemplo los CAPIT que son las siglas en inglés de: "protocolo de valoración esencial estandarizada para trasplantes intracerebrales", y se han establecido tanto para la enfermedad de Parkinson como la de Huntington.

Queremos señalar que, a veces, los medios de comunicación se hacen eco de resultados, transmitiendo a la sociedad una información a menudo parcial, poco rigurosa y lo más importante, con un excesivo grado de optimismo en la aplicación de estos resultados, primando explicaciones sencillas sobre la complejidad real de estos experimentos. Es muy importante no generar falsas esperanzas en la sociedad.

Aún así no pretendemos ser pesimistas, al contrario, estamos convencidos de que se encontrará el modo de aplicar correctamente la terapia celular, pero sin duda dentro de varios años, todavía es una meta lejana. Hasta el momento se trata sólo de expectativas fundadas sobre el progreso terapéutico que el uso de células madre puede significar para el tratamiento de la ELA. El uso de células para el tratamiento de esta enfermedad es una posibilidad cada vez más clara. Esto supone la necesidad de incrementar los esfuerzos de investigación para acotar de forma precisa sus posibilidades y esfuerzos sociales para encontrar el equilibrio entre las expectativas de las personas enfermas y sus allegados, y el respeto necesario a los principios de la ética biológica.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Almeida-Porada G, Porada CD, Chamberlain J, Torabi A, Zanjani ED (2004) Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep. *Blood* **104**: 2582–2590
- Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J (2004) Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* **70**:837–845
- Barber S. C., Mead R.J., Shaw P. J. Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1051-67. 2006.
- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE (1963). "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells". *Nature* **197**: 452-4.
- Björklund A., Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nature neuroscience* **3**(6):537-44. 2000..
- Charcot, J. De la sclerose laterale amyotrophique. *Prog Med* **2**, 325-327, 341-342, 453-455 (1874).
- Dunnett S., Rosser A. Cell therapy in Huntington Disease. *The American society for experimental neurotherapeutics*. **1**:394-405. 2004.
- Esquerda Colell J. E. Esclerosis Lateral Amiotrófica. *Mente y cerebro*, **17**. 2006.
- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Ruadkow IA (1974). "Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method". *Exp Hematol* **2** (2): 83-92.
- Gage FH Mammalian neural stem cells. *Science* **287**: 1433–1438
- Gahrton G, Björkstrand B. Progress in haematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *J Intern Med* **248** (3): 185-201. 2000
- Gardner RL. "Stem cells: potency, plasticity and public perception". *Journal of Anatomy* **200** (3): 277-82. 2002
- Goldman S. Stem and progenitor cell based therapy of the human central nervous system. *Nature Biotechnology*. 2005
- Gregory A., Elder M. D., Gasperi R., Gama M. Neurogenesis in adult brain and neuropsychiatric disorders. *The Mount Sinai Journal of medicine*. **73**(7):931-940
- Jackson C.E., Bryan W. W. Amyotrophic lateral sclerosis. *Seminars in Neurology*, **18**(1): 27-39. 1998.
- Kaspar BK, Frost LM, Christian L, Umapathi P, Gage FH Synergy of insulin-like growth factor-1 and exercise in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*. **57**(5):649-55. 2005.
- Kim S.U. Genetically engineered human neural stem cell for brain repair in neurological diseases. *Brain and development* **29**: 193-201. 2007
- Lindvall O., Björklund A. Cell replacement therapy: helping the brain to repair itself. *The American society for experimental neurotherapeutics* **1**(4):379-81. 2004.

- Lindvall O., Kokaia, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nature medicine*. 2004
- Lorenzo L. E. Barbe A. Expresión diferencial de los receptores GABA<sub>A</sub> y de glicina en motoneuronas resistentes y vulnerables a ELA: una posible explicación de la vulnerabilidad selectiva de las motoneuronas en la ELA. *European Journal Neuroscience*. 2006
- Maximow A Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leber der Säugetiere. *Folia Haematol (Leipzig)* **8**: 125–141 1909
- Miller R. G., Mitchell J. D., Lyon M., Moore D. H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders*. **4** (3):191-206. 2003.
- Mitchell J. D., Wokke J. H., Borasio G.D. recombinant human insulin-like growth factor 1 for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane database system review*. 2002.
- Nagai M., Re D. B., Nagata T., Chalazonitis A. Jessell T. M., Wichterle H., Przedborski S. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factor selectively toxic to motor neuron. *Nature Neuroscience* **10**(5):615-22. 2007.
- Nagano I, Shiote M, Murakami T, Kamada H, Hamakawa Y, Matsubara E, Yokoyama M, Moritaz K, Shoji M, Abe K. Beneficial effects of intrathecal IGF-1 administration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurological research*. **27**(7):768-72. 2005.
- Orrell R.W., Lane R. J., Ross M. Antioxidant treatment for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane database system review*. 2002.
- Pluchino S., Zanotti L., Martino G. Neural Stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain Research Reviews*. 2004.
- Shoosmith C. L., Strong M. J., Amyotrophic lateral sclerosis. *Canadian Family Physician*. **52**:1563-69. 2006.
- Shostak S. (Re)defining stem cells. *Bioessays* **28** (3): 301-8. 2006.
- Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE (1963). "The distribution of colony-forming cells among spleen colonies". *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **62**: 327-36.
- Tuch B. Stem cells--a clinical update. *Aust Fam Physician* **35** (9): 719-21. 2006.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** (4): 663-76. 2006.
- Terada N *et al*. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**: 542–545. 2002
- Thomson JA *et al*. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145–1147. 1998.
- Wilzac N. Keyser J. Insuline-like growth factor system in ALS. *Endocrinology Development*. **9**:160-9. 2005.

- Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* **416**: 545–548. 2002.

**Enlaces de interés:**

[www.fundela.info](http://www.fundela.info)

[www.alscenter.org](http://www.alscenter.org)

[www.allsg.org](http://www.allsg.org)

[www.adela-cv.org](http://www.adela-cv.org)

[www.projectals.org](http://www.projectals.org)

<http://www.alsa.org>

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002188.htm>

[www.ugr.es/eianez/biotecnologia](http://www.ugr.es/eianez/biotecnologia)

[www.biotech.bioetica.org](http://www.biotech.bioetica.org)

<http://www.diariomedico.com/grandeshist/numero2000/reportaje3.html>

<http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics1.asp>

<http://www.news.wisc.edu/packages/stemcells/>

<http://scitechdaily.com/>

<http://www.sciam.com/>

<http://www.stemcellresearchnews.com/>

<http://www.med.nyu.edu/nyuci/patients/services/stemcell/>

<http://www.diariomedico.com>

<http://www.unav.es/cun/html/noticias/n138.htm>

<http://www.diariomedico.com/normativa/debateclonacion27.html>

## **Centros:**

**American Association for the Advancement of Science (AAAS),** [AAAS Policy Brief: Stem Cell Research](#).

**Boston Globe,** ["Countries developing new stem cells,"](#) June 2, 2004.

**Center for American Progress,** [State Progress: Stem Cell Research](#), May 2005.

**EuroActiv: EU News & Policy Positions.** [EU funding for stem cell research continues](#), July 25, 2006.

**European Commission,** Directorate General: Research. ["Survey on opinions from National Ethics Committees or similar bodies, public debate and national legislation in relation to human embryonic stem cell research and use,"](#) Volume I: EU Member States, July 2004.

**European Commission,** Directorate General: Research. ["Survey on opinions from National Ethics Committees or similar bodies, public debate and national legislation in relation to human embryonic stem cell research and use,"](#) Volume II: Countries associated to FP6 and Third Countries, July 2004.

**International Society for Stem Cell Research - ISSCR.** [The ISSCR Guidelines for the Conduct of Human Embryonic Stem Cell Research](#), Feb. 1, 2007.

**James A. Baker III Institute for Public Policy, Rice University.** [World Human Cloning Policies](#) [PDF file]

**Javitt, Gail H., Kristen Suthers and Kathy Hudson.** ["Cloning: A Policy Analysis."](#) Genetics and Public Policy Center, Washington, DC, May 18, 2005.

**Knowles, Lori.** "A regulatory patchwork - human ES cell research oversight." [Nature Biotechnology](#): 22 (2): 157-163, 2004. (Lori Knowles has been a consultant to the President's Council on Bioethics, USA)

**Knowles, Lori.** ["Stem cell policy: Where do we draw the lines?"](#) [New England School of Law - Law Review](#): 39 (3): 623-634, 2004-2005.

**The National Academies.** [Guidelines for Human Embryonic Stem Cell Research \(2005\)](#).

**The National Academies.** [Human Embryonic Stem Cell Research Advisory Committee](#).

**The National Academies.** [Scientific and Medical Aspects of Human Reproductive Cloning \(2002\).](#)

**The National Academies.** [Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine \(2002\).](#)

**National Institutes of Health.** ["NIH's Role in Federal Policy"](#)

**Owen-Smith, Jason and Jennifer McCormick.** "An international gap in human ES cell research." [Nature Biotechnology](#): 24 (4):391-392, 2006.

**The President's Council on Bioethics.** ["Alternative Sources of Pluripotent Stem Cells."](#) May 2005.

**The Royal Society,** [Science Issues: Stem cells and Cloning.](#)

**UNESCO,** ["National Legislation Concerning Human Reproductive and Therapeutic Cloning."](#) July 2004 [PDF].

**Walters, LeRoy.** "Human Embryonic Stem Cell Research: An Intercultural Perspective." [Kennedy Institute of Ethics Journal](#) 14 (1): 3-38, 2004.

**Walters, LeRoy.** ["Public Policies on Human Embryonic Stem Cell Research: An Intercultural Perspective."](#) National Academy of Sciences, 9 am., Oct. 12, 2004.

**Wang, Yanguang.** ["Chinese Ethical Views on Embryo Stem \(ES\) Cell Research,"](#) In: Song, SY, Koo, YM & Macer, DRJ. Eds. [Bioethics in Asia in the 21st Century](#) (Eubios Ethics Institute, 2003), pp. 49-55.

## ANEXO

### **Bioética y células madre embrionarias.**

Algunos problemas bioéticos atraen de manera especial la atención de la opinión pública en todo el mundo. Por lo general, son los que tienen más directamente que ver con el respeto a la vida y a la dignidad de los seres humanos como, por ejemplo, el aborto o la eutanasia. El uso científico y terapéutico de las células madre embrionarias se ha incorporado recientemente a esa lista de cuestiones bioéticas debatidas por la opinión pública mundial. La razón radica en que nos encontramos ante unas células con un enorme potencial terapéutico pero cuya obtención resulta éticamente controvertida al exigir la destrucción de embriones humanos.

Las fuentes para obtener células madre además del adulto son: las células precursoras de las gónadas de fetos abortados y los embriones cuando están en la fase de blastocisto, es decir, entre los días cinco a catorce desde su concepción. La primera de las fuentes nos remite a los problemas sobre el uso de tejidos fetales para fines de investigación o de terapia. Existe una clara diferencia entre la licitud moral de utilizar tejidos de fetos abortados espontáneamente y la ilicitud de emplear los resultantes de abortos voluntarios. La segunda es más problemática pues supone acabar con la vida de los embriones de los que se obtiene las células. Esos embriones, a su vez, pueden tener diversas procedencias. Pueden ser embriones sobrantes de fecundaciones artificiales; embriones fecundados *in vitro* con la única finalidad de experimentar con ellos; o embriones creados por clonación, utilizando óvulos humanos o de animales (ya se ha hecho con el de una vaca).

Las células madre fetales nos sitúan ante el problema del uso de los fetos abortados deliberadamente. Aquí todos coinciden en que se tomen medidas para evitar que los abortos se realicen con el fin de proveer de material para la investigación. La controversia se plantea entre quienes no ven problemas en utilizar este material si se garantiza lo anterior y quienes, de todos modos, sí los encuentran. Más allá de los problemas morales que plantea el uso de esos materiales, está la cuestión de quién es la persona competente para consentir en el uso de los mismos. La misma persona que autoriza la muerte del feto no puede ser idónea para consentir el uso de los tejidos fetales para la investigación, salvo que se considere que el feto es propiedad de la madre. Pero, si no es ella, ¿quién entonces? Esta ausencia de un sujeto legitimado para consentir en el uso de los tejidos fetales constituye ya una razón para dudar de la licitud de esta práctica.

Otra de las objeciones planteadas con el uso de fetos para investigación, tiene que ver con el consentimiento prestado por los padres a este destino de los embriones. Puede decirse que sea el consentimiento de una persona que tiene la patria potestad sobre otra porque, en ese caso, el consentimiento siempre está sometido al interés del sujeto, lo que en absoluto es así cuando aquello en lo que se consiente es en la destrucción del embrión. Habrá que pensar, entonces, que se trata del tipo de consentimiento que da el dueño de

una cosa para que se disponga de esa cosa. Pero, entonces, nos encontramos con la reducción del embrión a objeto de libre disposición. Las legislaciones de todo el mundo luchan para que el ser humano no actúe sobre su propio cuerpo como si fuera un objeto de libre disposición, prohibiendo para ello el comercio de órganos. No se puede prohibir la venta de un riñón y permitir, en cambio, la disposición sobre los embriones que, desde luego, son menos “propiedad” que el riñón.

La consecuencia de reducir el embrión a cosa trae otro problema: ¿Habría que pagar a quien dona los embriones para investigación? Casi nadie se atreve a sostenerlo. Ahora bien, el laboratorio podría vender las líneas celulares obtenidas de esos embriones. Desde luego, no parece que los laboratorios estén dispuestos a actuar “altruistamente” sino, más bien, a rentabilizar las inversiones realizadas en el desarrollo de esos “productos”. Es chocante que los laboratorios, y los accionistas que los sostienen, se enriquezcan gracias a unos embriones que, por evitar su comercialización, exigimos a sus progenitores que donen y no vendan.

Salvo sonadas excepciones, los ordenamientos jurídicos vigentes prohíben la investigación con embriones. Existen tres razones por las que parece que el Estado debería, por ahora, dejar las cosas como están. En primer lugar, las normas básicas que regulan la investigación con células madre en España son muy recientes: el Código penal es de 1995, y el Convenio Europeo de Derechos Humanos y Biomedicina, de 1996, que España ratificó dos años después. El primero prohíbe fecundar un óvulo con un fin distinto del reproductivo. El segundo también prohíbe crear embriones con fines distintos de la reproducción. De entrada, sería chocante pensar que un Código penal que tardó más de quince años en elaborarse y un Convenio sobre Bioética que fue discutido durante seis años por más de 30 países de Europa contengan de pronto normas obsoletas. Antes de proponer su reforma, habría que analizar a fondo las razones por las que hace tan poco tiempo se decidió legislar en ese sentido y ahora, sin embargo, se presiona para cambiar esas leyes.

La segunda razón para la moratoria es la abundancia de incertidumbres que convendría despejar antes de tomar decisiones. ¿Cada célula totipotente es un embrión? ¿Cuál sería la condición de una célula de adulto totalmente desprogramada y susceptible, en consecuencia, de convertirse en una célula de cualquier tejido u órgano, e incluso en un embrión? ¿El cigoto obtenido mediante transferencia nuclear de célula somática es un embrión y es acreedor a la misma consideración que el embrión fruto de una fecundación? Estas, y muchas otras, son preguntas filosóficas que exigen importantes conocimientos científicos para ser respondidas, y cuyas respuestas condicionan por completo el juicio sobre la investigación con células madre embrionarias.

La última, y más importante, razón es el mismo estado de la ciencia de las células madre. En el último año, las células madre de adultos se han podido cultivar en el laboratorio en grandes números; han acreditado una versatilidad insospechada, transformándose en una gran variedad de tejidos del cuerpo humano; obvian cualquier problema de rechazo en el trasplante; y han

empezado a ofrecer resultados terapéuticos positivos. Ante esta fuente de células madre, cuyo uso no plantea problemas éticos y cuya utilidad salta a la vista, me parece que una decisión respetuosa con todos y no perjudicial para nadie consistiría en centrarse en las células madre de adultos y no en otras células madre éticamente controvertidas y científicamente menos contrastadas hasta el momento, que además parecen más difíciles de controlar en su diferenciación y crecimiento.

Sería una temeridad aprobar una investigación que desencadena tantos dilemas bioéticos, sin haberlos discutido y resuelto primero; sobre todo, si tenemos presente lo ya dicho: que existen alternativas científicas satisfactorias.

## **CONCLUSIÓN:**

El embrión es un ser completamente desprotegido, incapaz de defender sus intereses por sí mismo y con una apariencia nada semejante a la de un ser humano adulto. Esas tres circunstancias han conducido a muchos a considerar que el embrión no es todavía un ser humano y que, por tanto, puede ser utilizado al servicio suyo. Pero, si consideramos al embrión como un ser humano, no puede ser lícito, en ningún caso, su instrumentalización al servicio de otros seres humanos. Si no existiesen fuentes alternativas para obtener las células madre que no plantean problemas éticos, nos encontraríamos ante un dilema cuya respuesta no admitiría dudas pero que resultaría bastante trágico. Pero lo cierto es que la ciencia ha provisto de unas alternativas más que satisfactorias, que permiten desarrollar la investigación con células madre sin sacrificar vidas humanas.