

Células madre humanas: situación actual y aplicaciones en medicina regenerativa

Emilio A. Martínez García

Académico de Número de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia,

Excmos. Sres. Presidentes de las Academias de nuestra Comunidad,

Excmas. e Ilmas. autoridades,

Excmos. e Ilmos. Sres. Académicos,

amigos y compañeros,

señoras y señores:

El estar ocupando hoy esta tribuna y tener el honor de representar a la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia en este solemne Acto no es debido a méritos propios sino a lo establecido en el artículo 11 de los estatutos de nuestra Academia donde se determina que el Discurso Doctrinal en la Apertura del Curso Académico debe ser pronunciado por uno de sus miembros por riguroso orden de antigüedad. En esta ocasión, y tras algo más de 20 años desde mi nombramiento como Académico de Número de esta Academia, me corresponde este enorme privilegio.

Desde el primer momento en que recibí el encargo, mi preocupación fue máxima sobre el tema a elegir. Mi formación y actividad profesional como Veterinario, y no como Médico, me hizo pensar, en un principio, en presentar alguna de las líneas de investigación que desarrollo en la actualidad. Sin embargo, la especificad y

distanciamiento de dichas líneas con la medicina humana me hizo rápidamente desistir de tal intención. Pensé que un tema donde ambas medicinas, la humana y la veterinaria, se inter-conexionaran, tal y como ya realizara en mi discurso de ingreso como Académico de Número de esta Academia con la conferencia titulada “Importancia de la biotecnología de la reproducción animal en la producción ganadera y en la salud humana”, sería más apropiado.

El tema que finalmente seleccioné “Células madre humanas: situación actual y aplicaciones en medicina regenerativa” cumple con la premisa indicada, a pesar de que los avances realizados en la especie humana superan notablemente a aquellos obtenidos en animales domésticos y de que en muchas ocasiones, como veremos más adelante, las investigaciones en ambos campos se realizan de forma totalmente independiente.

Introducción

La investigación sobre células madre ha aumentado de forma exponencial en los últimos años, aunque su utilización terapéutica es muy limitada. Desde el año 1984 se han publicado más de 210.000 artículos científicos sobre este tema, de los cuales el 70% pertenecen a la última década. Sin duda, las investigaciones realizadas en el pasado, las actuales y aquellas que se efectúen en el futuro establecerán nuevos métodos de diagnóstico y nuevas terapias y posibilitarán la regeneración de diferentes tejidos y órganos mediante la utilización de células madre.

En la actualidad, hay una gran confusión social entre lo real y lo puramente puntual o circunstancial sobre las aplicaciones clínicas reales de las células madre. No

es infrecuente leer titulares de prensa que anuncian importantes avances en este campo: “Trasplantes para volver a andar”, “Un trasplante de células madre devuelve la visión a personas ciegas”, “El trasplante de células fetales alivia los síntomas del párkinson”, “Células madre humanas regeneran el corazón infartado de los macacos”, “Convierten células madre humanas en células pulmonares funcionales”, “Creados minirriñones humanos a partir de células madre”, etc. Sin embargo, aunque estos avances pueden ser considerados como extraordinarios, la mayoría de ellos, en opinión de los expertos, son totalmente preliminares. Existen aún numerosas limitaciones técnicas y problemas por resolver antes de que la utilización clínica de las células madre pueda ser una realidad.

Además, hay que discernir entre la investigación científica sobre células madre y el oportunismo de algunos clínicos e investigadores que anuncian de forma fraudulenta determinadas informaciones sobre esta tecnología y que han motivado la aparición de desagradables titulares de prensa: “Acusado de fraude el inventor de una terapia con células madre”, “Retirados por fraude los últimos artículos sobre células madre”, “El último avance en células madre bajo sospecha”, “Se suicida una investigadora japonesa sobre las células madre”. Efectivamente, Yoshiki Sasai era uno de los investigadores más renombrados en su país pero sus últimos trabajos sobre células madre habían sido desacreditados por la comunidad científica debido a la inexactitud de los resultados publicados. También han aparecido determinadas compañías que han comenzado a obtener células madre adultas y a reinyectarlas en los pacientes sin poseer la autorización pertinente y sin evidencias científicas publicadas del beneficio de tales terapias. Estas prácticas contribuyen escasamente al avance de la tecnología de las células madre ya que se encuentran fuera de los procedimientos científicos aceptados para el desarrollo y evaluación de nuevos tratamientos.

El objetivo de este trabajo es determinar cuál es la situación actual de las investigaciones sobre células madre y cuáles son sus posibles aplicaciones en medicina humana.

Qué es una célula madre?

El mejor ejemplo de una célula madre lo constituye el ovocito fecundado, el denominado cigoto. Una vez formado, el cigoto, también conocido como embrión de 1 célula, se divide por mitosis para transformarse en el embrión de 2, 4, 8, 16 células y así sucesivamente hasta constituir el organismo completo, una estructura inmensamente complicada compuesta por miles de millones de células con funciones tan diversas como aquellas referidas a la visión, la contractibilidad cardíaca, el sistema inmune, el cerebro, etc. Todas esas células, con funciones tan diferentes, derivan de una sola célula, el cigoto, una célula madre con potencial para formar todas los tipos de células de un organismo. Por ello, esa célula que constituye el cigoto se dice que es totipotente, ya que tiene la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula de un organismo. Es obvio que dicha diferenciación se encuentra regulada por procesos extraordinariamente complejos que implican, entre otros, la regulación de la expresión génica.

Afortunadamente, la célula que conforma el cigoto no es la única célula madre existente. Se han descubierto otros tipos de células madre que se clasifican en función de su origen y su capacidad de diferenciación. Así, además de las células madre totipotentes, capaces de generar un organismos completo (incluyendo las membranas extraembrionarias), existen células madre pluripotentes, que pueden diferenciarse en múltiples células de las tres capas germinales (mesodermo, ectodermo y endodermo),

células madre multipotentes, con un potencial de diferenciación restringido a dos capas germinales y células madre unipotentes, con capacidad para diferenciarse en un único tipo celular (Sherwood et al., 2004; Jahagirdar y Verfaillie, 2005; Ratajczak et al., 2012). En la actualidad, dichas células pueden obtenerse a partir de líneas celulares del embrión en desarrollo (células madre embrionarias, ESCs), de células maduras aisladas de tejido postnatal (células madre adultas) y por modificación genética de células somáticas maduras postnatales (células madre pluripotentes inducidas; iPSCs). En cualquier caso, las células madre se caracterizan por su capacidad para auto-renovarse de forma indefinida mientras mantienen su capacidad de diferenciación en diferentes tipos celulares.

Breve historia de las células madre

El término células madre fue utilizado por primera vez a finales del siglo XIX por el Dr. Haeckel al describir aquellas células primordiales capaces de diferenciarse en todas las células que componen un organismo multicelular. Posteriormente otros embriologistas, como los Dres. Boveri y Haecker, describieron las características hereditarias de las células germinales, desarrollaron el concepto de pluripotencia y establecieron las características definitivas de una célula madre: la capacidad de auto-renovación y de diferenciación en diferentes células somáticas (revisado por Maehle 2011). En 1917, nuevamente se utilizó este término al indicar que los glóbulos rojos y los glóbulos blancos podrían originarse a partir de una misma célula común (Pappenheim 1917). Durante esos años, también se empleó el concepto de célula madre al detallar algunos aspectos de la formación de tumores y de la leucemia (Pappenheim 1907). Tres décadas más tarde se publicó la primera evidencia sobre la capacidad de

auto-renovación celular, al demostrarse la capacidad de las células cancerígenas de la leucemia para diseminar el cáncer a partir de una célula simple (Furth y Makhn 1937).

Hace más de 50 años, los científicos canadienses Ernest McCulloch y James Till demostraron la presencia de células madre en la médula ósea del ratón, las denominadas células madre hematopoyéticas. Estos investigadores, en 1963, en colaboración con Lou Siminovitch (Siminovitch et al., 1963), observaron que las células madre hematopoyéticas eran capaces de auto-renovarse, un aspecto crucial en la definición funcional de las células madre, y de diferenciarse en los diferentes tipos de células sanguíneas. Desde entonces, y gracias a este descubrimiento, cientos de miles de personas han sobrevivido a la leucemia.

Dos décadas más tarde, concretamente en el año 1981, se consigue por primera vez el aislamiento y cultivo de ESCs a partir de la masa celular interna de blastocistos de ratón (Evans y Kaufman 1981; Martin 1981). A partir de este momento, se produjo una revolución científica para determinar los mecanismos biológicos del fenómeno de auto-renovación de las células madre y del proceso de diferenciación de una célula embrionaria en una célula somática fuera del propio embrión. Pese a dicha revolución, todavía tuvieron que transcurrir más de 10 años hasta que se logró el primer nacimiento de ratones vivos a partir de ESCs (Nagy et al. 1993). Pocos años después se describió por primera vez el aislamiento de ESCs de origen humano y su posible utilidad como fuente de nuevos tejidos y órganos (Thomson et al. 1998). En ese momento, se suscitó una gran controversia científica y social por las implicaciones éticas sobre la utilización de embriones humanos, y su posterior destrucción, para tal finalidad. Todo ello desembocó en políticas restrictivas que limitaron las investigaciones sobre ESCs en la

especie humana. Sin embargo, el intenso debate social establecido entorno a dicho tipo de célula madre se vio interrumpido bruscamente por una serie de descubrimientos fundamentales que dirigieron la atención hacia otros tipos de células madre. En el año 2006, el científico japonés Dr. Shinya Yamanaka y su grupo de investigación descubrieron que las células somáticas adultas, es decir aquellas células que forman el conjunto de tejidos y órganos de un ser vivo y que se encuentran totalmente diferenciadas, podían ser reprogramadas a un estadio pluripotente a través de la re-expresión de determinados genes que son fundamentales en el estadio embrionario y que se encuentran suprimidos en el estadio somático (Takahashi et al. 2007). De ahí surgió un nuevo concepto: las iPSCs. Este descubrimiento brindó la posibilidad de obtener células madre pluripotentes a partir de células somáticas, lo cual, a diferencia de las ESCs, no conlleva ningún tipo de implicación ética o moral. Además, con este tipo de célula madre, se podrían evitar los problemas de rechazo inmunológico, ya que se utilizarían células del propio paciente para los fines terapéuticos propuestos. Este descubrimiento aceleró extraordinariamente el ritmo de las investigaciones en este campo, y sólo tres años después del descubrimiento de Yamanaka se consiguió descendencia viva en ratones a partir de iPSCs (Boland et al. 2009; Kang et al. 2009; Zhao et al. 2009).

Dado el trepidante ritmo de los descubrimientos y la imaginación e inquietud de los científicos se ha producido una expectación social de proporciones gigantescas entorno al campo de las células madre. No obstante, actualmente todavía existen inmensas lagunas científicas sobre las características biológicas, fisiológicas y bioquímicas de las células madre y su entorno. Todos esos aspectos deben aclararse antes de que la utilización terapéutica de estas células pueda ser una realidad.

Tipos de células madre

Células madre de origen embrionario (ESCs)

Durante los primeros estadios de desarrollo embrionario, las células de los embriones permanecen relativamente indiferenciadas y, como se ha mencionado anteriormente, poseen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares que conforman un organismo. Después de unos días de desarrollo, el embrión alcanza el estadio de blastocisto donde se evidencian los primeros signos claros de diferenciación celular. El blastocisto está constituido por dos tipos celulares: las células de la masa celular interna, las cuales son pluripotentes ya que tienen el potencial para diferenciarse en diferentes tipos celulares de las tres capas germinales, y las células que conforman el trofoblasto, a partir de las cuales se desarrollarán las membranas extraembrionarias. A las células de la masa celular interna se les conoce como ESCs. Cuando estas células se cultivan in vitro, pueden dividirse y crecer indefinidamente conservando su pluripotencia, constituyendo lo que se denominan líneas de ESCs.

Una fuente alternativa para obtener células pluripotentes de origen embrionario en etapas más tardías se encuentra en las crestas genitales, son las denominadas células madres epliblasticas (EpiSCs). Mientras que las ESCs se obtienen a partir de la masa celular interna del blastocisto preimplantacional, las EpiSCs derivan del embrión después de la implantación (Koh y Piedrahita, 2014).

El establecimiento in vitro de las primeras líneas de ESCs de ratón se publicó a principios de los años 80 (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Años más tarde se

obtuvieron líneas de ESCs en primates no humanos (Thomson et al. 1995) y en humanos (Thomson et al. 1998; Reubinoff et al. 2000). Las líneas celulares derivadas de esas especies comparten algunas características fundamentales propias de las ESCs, tales como la capacidad ilimitada de auto-renovación, la capacidad para diferenciarse en cualquier tipo celular del organismo adulto, la expresión de factores indicadores de pluripotencia, tales como OCT4, SOX2 y NANOG, una actividad positiva enzimática para la fosfatasa alcalina y telomerasa y la capacidad de formar teratomas cuando se inyectan en ratones inmunodeficientes. Sin embargo, también existen diferencias importantes, tanto morfológicas como de desarrollo, entre las ESCs derivadas del ratón y aquellas obtenidas de primates, especialmente aquellas de origen humano, aunque ambas se denominan ESCs. Las ESCs de ratón son LIF (factor inhibidor de la leucemia)-dependientes, tienen una apariencia multicapa, pueden ser sub-cultivadas por métodos de tripsinización y forman quimeras en la línea germinal cuando se inyectan en el interior de un blastocisto. En contraste, las ESCs humanas son FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos)-dependientes, crecen en monocapas, son sensibles a la tripsina y tienen una reducida capacidad de desarrollo comparada con las de ratón y, hasta el momento, no se han conseguido generar quimeras. Curiosamente, las características de las ESCs humanas y de primates no humanos son similares a aquellas indicadas para las EpiSCs derivadas del embrión post-implantacional del ratón. Esto proporcionado una explicación biológica para las sorprendentes diferencias entre las ESCs de roedores y primates. Ahora se acepta que esas células derivan de dos estados diferentes del desarrollo embrionario: uno ha sido definido como “naïve” epiplasto y puede ser encontrado en el blastocisto de ratón pre-implantación; el otro es definido como “primed” epiplasto y es encontrado en el blastocisto pre-implantación de los primates y en los embriones post-implantación de los roedores (Nichols and Smith

2009, 2011). Por tanto, las ESCs pueden ser clasificadas en “verdaderas” ESCs y EpiSCs, y en “naïve” y “primed” ESCs, respectivamente (Bao et al., 2009; Xu et al., 2010; Hanna et al., 2010).

En la especie humana hay dos fuentes potenciales para la obtención de ESCs; a partir de blastocistos sobrantes de los programas clínicos de fecundación in vitro o a partir de blastocistos derivados de los programas de clonación terapéutica mediante la transferencia nuclear de ovocitos maduros (Sanganalmath y Bolli, 2013; Kramer et al., 2013). En el primer caso, utilizando embriones sobrantes, se han establecido varias líneas de ESCs (Hong y Jeung, 2013). Sin embargo, las diferencias en la histocompatibilidad tisular entre las células derivadas de esos embriones y los potenciales pacientes, los cambios en las propiedades de esas células durante el cultivo, la posibilidad de producción de teratomas tras su administración al paciente y, fundamentalmente, los problemas de tipo moral y ético han motivado una amplia controversia sobre la utilización de esos embriones humanos con fines terapéuticos.

Para evitar alguno de esos inconvenientes, un método alternativo ha consistido en desarrollar ESCs en el laboratorio utilizando la clonación terapéutica. Este proceso requiere un ovocito donante y consiste en crear una célula in vitro, la cual es equivalente, en cuanto a su potencial de desarrollo, al cigoto (McHugh, 2004). Para ello, se extrae el núcleo del ovocito donante y su citoplasma se utiliza como un incubador bioquímico para reprogramar el núcleo de la célula somática inyectada en su interior, la cual se obtiene del propio paciente. Los embriones así generados son totipotentes y constituyen una fuente potencial de ESCs cuando alcanzan el estadio de blastocisto. Lo más importante es que esas células son histocompatibles con el paciente, al utilizar sus

propias células durante el proceso de clonación. Por tanto, esta es una estrategia para generar células madre “por encargo” con fines terapéuticos. Sin embargo, la clonación terapéutica no es ajena a profundos debates éticos. Además, la necesidad de utilizar ovocitos humanos y, como en el caso anterior, la creación de teratomas tras la administración de las ESCs resultantes (Cunningham et al., 2012) son las principales limitaciones para su utilización a gran escala. Por otro lado, si un cigoto obtenido por transferencia nuclear se transfiere en el oviducto de una receptora puede dar lugar al nacimiento de un nuevo individuo, es decir se estaría obteniendo un clon del individuo de la célula donante. En este caso, se estaría hablando de la denominada clonación reproductiva, la cual, al menos en la especie humana, es extremadamente peligrosa y desde un punto de vista ético es ampliamente considerada como inaceptable (Bobbert, 2006). En este punto, es necesario recordar que la utilización de la transferencia nuclear como clonación reproductiva fue la base para crear a la famosa oveja Dolly en el año 1996 (Wilmut et al., 1997).

Células madre adultas

Las implicaciones éticas y las controversias existentes alrededor de las ESCs han forzado a los científicos a ampliar el área de investigación de las células madres para lograr su obtención a partir de fuentes de origen no embrionario.

Células maduras aisladas de tejido postnatal

Durante la vida postnatal, tanto durante la infancia como en el individuo adulto, se pueden obtener células madre adultas, también denominadas como células madre

somáticas. En condiciones fisiológicas, estas células mantienen y reemplazan a las células que mueren o pierden su funcionalidad en el tejido donde se encuentran. En definitiva son células indiferenciadas, localizadas en nichos, presentes en tejidos diferenciados. Se han identificado células madre adultas en numerosos tipos de tejidos del organismo y su denominación depende del tejido donde se aíslan. Así, se habla de células madre hematopoyéticas, neurales, endoteliales, musculares, mesenquimatosas, gastrointestinales, epidérmicas, adiposas, de la pulpa dental, etc. (Barrilleaux et al., 2006; Trounson et al., 2011; Tibbetts et al., 2012; Sanganalmath et al., 2013; Doppler et al., 2013). La mayoría de células madre adultas son unipotentes o multipotentes ya que su potencial de diferenciación está limitado a escasas líneas celulares pertenecientes a tejidos específicos.

El mejor ejemplo de una célula madre adulta es la célula madre hematopoyética o célula madre de la sangre. Desde un punto de vista histórico, las células madre hematopoyéticas fueron las primeras células madre utilizadas en clínica y han sido empleadas con éxito en los trasplantes de médula ósea durante más de 40 años (Ratajczak, 2008). Cuando se habla de un trasplante de médula ósea o un trasplante sanguíneo, las células que se trasplantan son células madre hematopoyéticas. Tradicionalmente se pensaba que esas células madre podían diferenciarse en todos los tipos de células sanguíneas, pero no en otros tipos celulares. Sin embargo, esas células también se emplean en ensayos clínicos para regenerar órganos dañados no hematopoyéticos. En este sentido, existen algunos modelos de trasplante de médula ósea en ratas con hígados dañados en los cuales el hígado se regeneró con células que derivaron de la médula ósea trasplantada. Además, las células madre de la médula ósea se han utilizado para el tratamiento de distintas patologías, tales como lesiones de la

médula espinal (William et al., 2011), cirrosis hepática (Terai et al., 2006), isquemia crónica de las extremidades (Subramaniyan et al., 2011) e infarto de miocardio (Madhusankar et al., 2007). Todo ello originó, hace pocos años, el concepto de que las células madre hematopoyéticas presentan plasticidad suficiente para transdiferenciarse en células de diferentes capas germinales. Sin embargo, el concepto de plasticidad de estas células ha sido abandonado y se han sugerido explicaciones alternativas para justificar su efecto beneficioso en la regeneración de tejidos y órganos no hematopoyéticos, tales como la fusión de estas células con las células dañadas (Eisenberg y Eisenberg 2003; Scott 2004), el efecto paracrino de las células madre hematopoyéticas debido a la liberación de factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas y vesículas extracelulares (Majka et al., 2001; Ratajczak et al., 2013). También hay que considerar que las poblaciones de células madre hematopoyéticas empleadas en terapia pueden estar contaminadas con poblaciones de células madres en un estadio temprano de desarrollo, incluyendo células madre pluripotentes o multipotentes, con un amplio potencial de diferenciación (Suszynska et al., 2014).

Un caso particular de células madre adultas lo constituyen las células madre mesenquimatosas, las cuales se consideran multipotentes ya que pueden diferenciarse en varios tipos celulares, incluyendo células óseas, musculares, adiposas, condrocitos y otros tipos similares.

En el organismo adulto también pueden encontrarse células madre pluripotentes. Estas células se han encontrado en el cordón umbilical y en el líquido amniótico, aunque en un número muy limitado.

Células madre inducidas (induced pluripotent stem cells; iPSC)

Uno de los logros más importantes en la investigación biomédica contemporánea se obtuvo en el año 2006 cuando Shinya Yanamaka logró producir células madre pluripotentes a partir de células adultas, mediante la utilización de cuatro genes. Este descubrimiento fue galardonado con el premio Nobel en el año 2012 y abrió nuevos horizontes para la medicina regenerativa. Las iPSCs se obtienen por modificación genética de células somáticas maduras postnatales usando genes que codifican factores de transcripción fundamentales para el desarrollo de ESCs (Oct-4, Nanog, Klf4, c-myc). Esos genes se introducen en el interior de las células somáticas usando vectores retrovirales (Kramer et al., 2013). Como resultado de esta estrategia, se obtienen células transformadas (iPSC) que pueden diferenciarse en células de las tres líneas germinales, de ahí su nombre de células madre pluripotentes inducidas. Las iPSCs son consideradas como una fuente éticamente aceptable de células madre pluripotentes, es decir como una fuente alternativa a las ESCs, ya que evitan la utilización de ovocitos y embriones humanos y, además, deberían ser histocompatibles con el receptor. Por ello, se han realizado numerosas investigación sobre este tipo de células madre, habiéndose conseguido importantes avances desde que se publicó la creación de las primeras iPSCs (Takahashi and Yamanaka, 2006). Sin embargo, a pesar de los progresos alcanzados, todavía quedan por resolver numerosos aspectos antes de que la aplicación clínica de estas células sea una realidad. Entre los principales factores que limitan dicha aplicación destacan que la eficiencia de esta tecnología es muy baja (Kramer et al., 2013), que el proceso de generar iPSCs es difícil de controlar, que la mayoría de las células diferenciadas in vitro a partir de iPSCs son funcionalmente inmaduras, que existe un potencial evidente para que un número de células pluripotentes indiferenciadas

permanezca en la población, lo cual es un riesgo importante ya que dichas células tienden a generar tumores (Cunningham et al., 2012). Asimismo, se han descrito alteraciones en la estructura y organización del ADN de estas células, lo cual puede conducir a la presencia de mutaciones y creación de células neoplásicas (Ronen y Benvenisty, 2012).

Además, algunas otras cuestiones permanecen sin aclarar: ¿Cuál es el mecanismo para la inducción de iPSCs? ¿Cuáles son los factores óptimos de reprogramación? ¿Cómo se puede reducir el riesgo de mutagénesis en el genoma de las iPSCs? ¿Cómo se puede evaluar la seguridad de las iPSCs en aplicaciones clínicas? La clarificación de estas cuestiones mejorará sin duda la aplicabilidad de la tecnología iPSC. A pesar de los problemas mencionados, las ventajas de la utilización de iPSCs son claras. El uso de estas células evitan problemas éticos e inmunológicos. Por ello, el campo de las iPSCs es uno de los más activos de la investigación biomédica. De forma paralela al perfeccionamiento y refinamiento de la tecnología iPSC, la terapia clínica basada en esta tecnología será posible, sin duda, en un futuro no muy lejano.

Para determinar el verdadero potencial de las iPSCs para su utilización en medicina regenerativa, se está recurriendo a estrategias alternativas mediante las cuales se puedan generar células/tejidos/órganos que cubran la demanda de pacientes cuya curación no es posible en la actualidad. Una de esas estrategias propone la utilización de la técnica de complementación de blastocistos interespecies para generar células funcionales a partir de iPSCs. Esta técnica implica la realización de un “knockout” en determinados genes críticos para el desarrollo de un órgano en particular y en utilizar iPSCs de otra especie para colonizar el “nicho vacío” y generar las

células/tejidos/órganos de interés. La bondad de esta técnica se ha demostrado por primera vez usando iPSCs de rata para complementar blastocistos de ratones PDX1^{-/-}. Los ratones sin el gen PDX1 pueden llegar a nacer pero carecen de páncreas y mueren una semana después del nacimiento. Sin embargo, cuando las iPSCs de rata se inyectan dentro de los blastocistos de ratones PDX1^{-/-} se generan animales con páncreas funcionales que derivan exclusivamente de las células de la rata. Estos resultados claramente demuestran que si se establece un nicho vacío para un determinado órgano, las células derivadas de iPSCs pueden ocupar ese nicho y producir el órgano apropiado en el espacio vacío. La generación de un órgano funcional a partir de células pluripotentes exógenas también se ha conseguido en la especie porcina (Matsunaria et al., 2013), lo cual es de suma importancia para generar órganos humanos en grandes animales, como el cerdo. Para esta finalidad, el cerdo es un animal ideal por su parecido fisiológico, anatómico y de tamaño de órganos a la especie humana. En la actualidad, el grupo dirigido por el Prof. Izpisua en California en colaboración con otros grupos de investigación, entre los que se encuentra nuestro grupo de investigación de la Universidad de Murcia, la UCAM y la Clínica Centro del Profesor Pedro Guillén, intenta desarrollar un páncreas humano en cerdos apancreáticos utilizando dicha técnica. En una segunda fase de este fascinante proyecto se identificarán los genes candidatos para córnea y cartílago en los laboratorios del Salk Institute de California para posteriormente generar córneas y cartílagos derivados de iPSCs humanas usando el sistema de complementación de blastocisto humano-cerdo.

No menos fascinante es la consecución de la reprogramación celular in vivo publicada por científicos españoles del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) (Abad et al., 2013). Estos autores eligieron el ratón como modelo animal y

crearon ratones en los que los cuatro genes de Yamanaka pudieran ser activados a conveniencia. La activación de esos genes resultó en la aparición de teratomas en múltiples órganos, lo que indica que puede ocurrir una reprogramación in vivo. El análisis de estómago, intestino, páncreas y riñón reveló grupos de células dediferenciadas que expresaron el marcador de pluripotencia NANOG, indicativo de reprogramación in situ. Mediante trasplante de médula ósea, esos autores igualmente demostraron que las células hematopoyéticas pueden también ser reprogramadas in vivo. Asimismo observaron la presencia de iPSCs circulantes en sangre y que esas iPSCs generadas in vivo eran más parecidas a las ESCs que las iPSCs producidas in vitro. Más aún, las iPSCs producidas in vivo contribuyeron eficientemente a formar el trofoectodermo, es decir que presentan características de totipotencia, lo que sugiere que dichas células presentan mayor plasticidad que las ESCs. Todos estos descubrimientos podrían ser sumamente importantes para la aplicación futura de esta tecnología en medicina regenerativa.

Aplicaciones clínicas de las células madre

Terapias con células madres aprobadas

En la actualidad, las únicas terapias aprobadas que utilizan células madre son los trasplantes de células madre hematopoyéticas y los injertos de piel para quemaduras.

Los trasplantes de células madre hematopoyéticas, primariamente usados para tratar la leucemia y los linfomas, son en realidad una extensión de los trasplantes de médula ósea que se comenzaron a utilizar hace más de 60 años y ya de forma rutinaria desde la década de los 70. La médula ósea produce diariamente billones de nuevas células

sanguíneas para reponer el sistema circulatorio. Estas nuevas células se forman a partir de células madre hematopoyéticas que pueden convertirse en glóbulos rojos, plaquetas o en las diferentes células de la serie blanca. Hoy en día, en vez de extraer la médula ósea, las células madre hematopoyéticas se filtran directamente a partir de la sangre circulante de un donante compatible o del propio paciente. Una vez inyectadas en el paciente, las células madre hematopoyéticas colonizan el hueso, crecen y forman nuevas células sanguíneas. Cada año, miles de pacientes se benefician de este tratamiento, aunque pueden existir determinadas complicaciones durante su aplicación, incluyendo problemas de rechazo y de infección ya que la médula ósea del paciente debe ser destruida mediante quimioterapia con anterioridad al trasplante.

Las células madre de la piel se están utilizando desde los años 80 para producir in vitro láminas de nueva piel para el tratamiento de quemaduras severas. Los primeros injertos de piel producidos en el laboratorio datan de 1983 en un hospital de Boston para tratar a dos niños que sufrieron quemaduras en el 90% de sus cuerpos. La técnica comienza con la obtención de algunas de las principales células de la piel, los queratinocitos, que son cultivadas en el laboratorio mediante técnicas especiales para producir láminas de nueva piel. No fue hasta varios años después, cuando los investigadores comprendieron que la nueva piel crecía en el laboratorio porque algunos de los queratinocitos utilizados eran realmente células madre de la piel. Sin embargo, esta técnica no carece de inconvenientes: el proceso de regeneración requiere entre dos y tres semanas, las láminas de piel producidas son frágiles y la nueva piel generada carece de folículos pilosos y de glándulas sudoríparas y sebáceas. Todo ello indica que se necesitan más investigaciones para mejorar esta tecnología. En la actualidad, esta

terapia se utiliza principalmente en pacientes con quemaduras de tercer grado en amplias zonas del cuerpo y sólo se realiza en determinados centros hospitalarios.

Terapias en desarrollo con células madre

Mientras el uso clínico de células madre sólo ha sido aprobado para los dos tratamientos indicados anteriormente, algunas terapias con células madre se emplean actualmente en sus primeros ensayos clínicos. Dichas terapias se encuentran en desarrollo y será necesario esperar un tiempo antes de conocer su efectividad y de determinar si pueden llegar a ser de utilidad para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades.

Utilización de ESCs e iPSCs

Como ya ha sido mencionado, las ESCs humanas tienen un potencial ilimitado para producir células especializadas del organismo, lo cual sugiere grandes posibilidades para la investigación de diferentes enfermedades y para su utilización en nuevas terapias. Recientemente, se ha aprobado la utilización en ensayos clínicos de ESCs humanas para el tratamiento de pacientes con degeneración macular o con distrofia macular de Stargardt. Lógicamente, la investigación clínica con ESCs humanas debe superar los obstáculos éticos anteriormente señalados y asegurar que dichas células se encuentran totalmente diferenciadas en el tipo celular escogido antes de su trasplante al paciente. Si los primeros ensayos clínicos son exitosos en términos de seguridad y eficacia, las investigaciones con ESCs humanas pueden pronto ofrecer sus primeras aplicaciones clínicas.

Una alternativa a las ESCs humanas es la utilización de iPSCs, las cuales, como ya se ha indicado, son creadas en el laboratorio por reprogramación genética de células adultas del organismo. La generación de iPSCs presenta enormes posibilidades en la investigación de diferentes enfermedades y para el desarrollo de nuevos fármacos. Por ejemplo, se han generado células cerebrales a partir de iPSCs producidas de células de piel de pacientes con la enfermedad de Parkinson. Esas células cerebrales generadas en el laboratorio muestran signos de la propia enfermedad del paciente, lo cual puede ser fundamental para conocer como evoluciona la enfermedad y para la búsqueda y evaluación de nuevos fármacos. Este ejemplo es suficiente para justificar las numerosas investigaciones que se están realizando a nivel mundial usando este tipo de células. Además, ya que las iPSCs se pueden obtener en cantidades ilimitadas a partir de células somáticas del propio paciente, la terapia con estas células puede representar la única alternativa posible para el tratamiento de algunas enfermedades inmunes, ya que el riesgo de rechazo inmunológico sería mínimo. Sin embargo, hasta el momento, el uso de las iPSCs en terapia celular es exclusivamente teórico. La tecnología es muy reciente y el proceso de reprogramación celular no se conoce suficientemente. Es necesario encontrar la forma de producir las iPSCs de forma segura, ya que su uso puede resultar en la generación de tumores, y se debe garantizar la diferenciación completa de estas células en el tipo celular requerido para cumplir con las exigencias sanitarias de seguridad antes de su utilización clínica.

Hasta ahora, las principales aplicaciones de las iPSCs se circunscriben a tres principales áreas: estudio de enfermedades humanas, medicina regenerativa y descubrimiento de nuevos medicamentos.

La investigación terapéutica de un elevado número de enfermedades genéticas humanas se encuentra limitada por problemas derivados de la ausencia de material experimental. La utilización de las iPSCs puede superar este obstáculo mediante la creación de modelos específicos de una enfermedad determinada. Las iPSCs pueden formar líneas celulares que reflejen los defectos causados por una determinada enfermedad. Estos modelos de enfermedad basados en las iPSCs pueden aportar nuevos conocimientos sobre la patogénesis de la enfermedad así como contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos. Las iPSCs presentan el potencial suficiente para investigar desordenes en la práctica totalidad de los sistemas del organismo, ya que a partir de ellas se puede generar una amplia variedad de tipos celulares. Algunas enfermedades humanas que se han investigado mediante el uso de las iPSCs incluyen entre otras la esclerosis lateral amiotrófica (Dimos et al., 2008), la atrofia muscular espinal (Ebert et al., 2009), la enfermedad de Parkinson (Soldner et al., 2009) y la β -talasemia (Ye et al., 2009).

En el caso del desarrollo de nuevos medicamentos, los efectos de los nuevos fármacos se evalúan generalmente en animales de experimentación (ratones, perros, cerdos), lo cual, a parte de las diferencias entre animales y humanos y la carencia de protocolos estandarizados, supone un elevado coste. Ahora, mediante la utilización de las iPSCs específicas de un paciente se puede valorar eficientemente la eficacia de un nuevo tratamiento o de un nuevo fármaco. Algunos fármacos ya se han evaluado utilizando células iPS derivadas de pacientes con atrofia muscular espinal o con el síndrome LEOPARD (Ebert et al., 2009; Carvajal-Vergara et al., 2010). Esta tecnología

se está aplicando a muchas otras enfermedades y en el futuro, sin duda, beneficiará a numerosos pacientes.

Como es sabido, el rechazo inmunológico es el principal problema en el trasplante de órganos y en la terapia celular. Las células iPS específicas de un paciente tienen los marcadores inmunes del propio paciente y por tanto esas células anulan el problema de rechazo inmunológico. Además, las diferentes mutaciones que causan una enfermedad determinada pueden también ser reparadas mediante la modificación genética dirigida en las iPSCs específicas del paciente. Una vez trasplantadas, las iPSCs pueden aliviar los síntomas de la enfermedad y lograr incluso la curación del paciente. Un claro ejemplo de esta aplicación queda de manifiesto en los estudios de Hanna et al (2007) utilizando el ratón como modelo animal. Estos autores demostraron que las iPSCs pueden curar la anemia falciforme, una alteración genética que provoca la producción de glóbulos rojos no funcionales. Esos autores consiguieron reparar la mutación causante de la enfermedad vía modificación genética dirigida en las iPSCs de los ratones enfermos. Las iPSCs modificadas fueron entonces diferenciadas en células madre de la sangre y trasplantadas a los animales enfermos, donde proliferaron y generaron nuevos glóbulos rojos funcionales, curando la enfermedad.

Pese a las limitaciones actuales mencionadas anteriormente, seguro que en el futuro se alcanzarán nuevos progresos e innovaciones en el campo de las iPSCs que permitirán su aplicación terapéutica generalizada.

Utilización de células madre mesenquimales

Desde el trabajo del grupo dirigido por el Dr. Friednstein, quien describió por primera vez células estromales de la médula ósea con capacidad de diferenciación en osteocitos (Friednstein et al., 1976), se pensó de la existencia de células madre no hematopoyéticas en la médula ósea (Caplan 1991), las denominadas hoy en día células madre mesenquimales (MSCs). En 1999, Pittenger definió las MSCs como células madre multipotentes con capacidad para diferenciarse en tejido adiposo, osteocitos y condrocitos (Pittenger et al., 1999). Originalmente, las MSCs se obtuvieron, en pequeñas cantidades, en los aspirados de médula ósea. A pesar de su limitado número, se comprobó que esas células se multiplicaban fácilmente utilizando técnicas estándar de cultivo. Sin embargo, en los últimos 10 años se ha conseguido aislar MSCs de múltiples tejidos y órganos (Miura et al., 2003; Alhadlaq y Mao, 2004; Nardi y da Silva; le Blanc y Pittenger, 2005; Hoogdujin et al., 2007; Sondergaard et al., 2010). Además, se ha demostrado que, bajo estímulos específicos, las MSCs poseen capacidad de diferenciación en linajes celulares de origen mesodérmico (miocitos, osteocitos, endotelio, adipocitos y cardiomiocitos), endodérmico (células epiteliales del hígado, páncreas y pulmones) y ectodérmico (neuronas) (Sugaya 2003; Chapel et al., 2003), probablemente como resultado de las diferentes fuentes de obtención de dichas células (Izpisua 2014). Las MSCs, además de sus propiedades regenerativas, producen factores bioactivos tales como pequeñas proteínas, quimiocinas, citoquinas y otros reguladores celulares que les confieren propiedades antiinflamatorias, antifibróticas y antimicrobianas, lo cual puede modular la respuesta inmune humoral y celular (Farini et al., 2014). Considerando su potencial regenerativo y efectos inmunoregulatorios, la terapia con MSCs es una prometedora tecnología para el tratamiento de enfermedades

degenerativas, inflamatorias y autoinmunes. Obviamente, todavía se necesitan muchas investigaciones para aumentar nuestro conocimiento sobre los mecanismos que regulan el desarrollo, la homeostasis y la reparación tisular y así implementar la eficacia terapéutica de estas células. A día de hoy no hay tratamientos aprobados usando MSCs, aunque existen numerosos ensayos clínicos en desarrollo para valorar la utilidad de las MSCs en múltiples enfermedades. El primer ensayo clínico se realizó en 1995 con 15 pacientes que fueron tratados con MSCs autólogas (Lazarus et al., 1995). Desde 2011, se han publicado 206 ensayos clínicos con MSCs mostrando un amplio rango de aplicaciones terapéuticas. La mayoría de esos ensayos están en fase I, fase II o una combinación de Fase I/II. Sólo un escaso número se encuentran en Fase III o en Fase II/III. La mayoría de esos estudios demuestran la ausencia de efectos adversos a medio plazo y que las MSCs parecen ser bien toleradas (Wang et al., 2012).

Algunos ensayos clínicos están investigando la seguridad y efectividad de los tratamientos con MSCs para reparar el hueso y el cartílago. Se han obtenido resultados prometedores tras la inyección de MSCs autólogas en pacientes con osteogénesis imperfecta (Horwitz et al., 2002) y con la enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD) (Ringd'en y Uzunel, 2006; le Blanc et al., 2004, 2008). Además, muchos ensayos clínicos han demostrado la eficacia del tratamiento con MSCs en la isquemia aguda de miocardio, esclerosis lateral amiotrófica y en distrofias musculares. También existen resultados prometedores del empleo de estas células para el tratamiento y curación de heridas, en patologías hematológicas, enfermedades pulmonares, fibrosis quística, alergias y asma, enfermedades músculo-esqueléticas, enfermedades cardiovasculares, hepáticas, enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, el lupus eritomatoso o la diabetes tipo I, en enfermedades neurodegenerativas, como la

esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, el Parkinson o el Alzheimer (Sutton y Bonfield, 2014; Farini et al., 2014). Sin embargo, todavía no se ha aclarado suficientemente cuál es la efectividad global de la mayoría de dichos tratamientos.

Principales enfermedades susceptibles de tratamiento con células madre

En la actualidad, las únicas células ampliamente utilizadas en investigación clínica son las células madre adultas. No mencionaremos las aplicaciones clínicas de las células madre hematopoyéticas en los trasplantes hematopoyéticos por ser una técnica bien definida desde hace más de 45 años. A continuación nos centraremos en la utilización de las células madre para la regeneración de tejidos y órganos no hematopoyéticos que, como ya se ha mencionado, se encuentran todavía bajo desarrollo en forma de ensayos clínicos.

Terapia con células madre en patologías neurológicas

El sistema nervioso central maduro presenta una capacidad de auto-reparación muy limitada. Por tanto, las células madre pueden proveer una fuente inagotable de neuronas para terapias encaminadas al reemplazamiento celular o a la neuroprotección en alteraciones que afectan al cerebro y a la médula espinal. La posibilidad de utilizar células madre como una fuente de neuronas que pueden ser implantadas para reemplazar células y circuitos perdidos en distintas alteraciones neurológicas, como en la enfermedad de Parkinson o en la enfermedad de Alzheimer es un campo de investigación clínica sumamente excitante (Sheyn et al., 2010).

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo muy común que afecta a más del 2% de la población de más de 65 años. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de los llamados cuerpos de Levy intraneuronales y una progresiva neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra lo que resulta en la pérdida de dopamina estriatal. Todo ello se manifiesta clínicamente en disfunción motora y rigidez, algunas veces combinada con temblor en reposo y cambios posturales (Fahn 2003). Diferentes ensayos clínicos han demostrado que el trasplante de neuronas dopaminérgicas humanas de origen fetal en enfermos de Parkinson puede producir una importante mejoría, perdurable en el tiempo, en algunos pacientes (Lindvall et al., 2004). Para evitar los inconvenientes de la utilización de tejido fetal como fuente de neuronas se han utilizado células madre derivadas de la médula ósea y de otros tejidos para generar neuronas dopaminérgicas (Sing y Williams, 2008). Tales células pueden ser diferenciadas in vitro en dichas neuronas. El éxito del procedimiento requiere el trasplante de un elevado número de células vivas que secreten una cantidad consistente de dopamina que sea capaz de interconexionar con las células del paciente para reemplazar el circuito neuronal dañado. Por otro lado, también es posible diseñar estrategias que dificulten la progresión de la enfermedad. Una posible estrategia para prevenir la muerte de las neuronas existentes podría radicar en la utilización de células madre humanas modificadas genéticamente para que expresen determinadas moléculas neuroprotectoras (Behrstock et al., 2006).

La enfermedad de Alzheimer es la forma más frecuente de demencia y se caracteriza por la pérdida de memoria y el deterioro cognitivo. En la actualidad, hay dos ensayos clínicos en marcha para evaluar el efecto paracrino de la infusión intracerebral e intravenosas de MSCs derivadas del cordón umbilical.

El infarto cerebral es la tercera causa de muerte y discapacidad en los países desarrollados. Varios ensayos clínicos se encuentran actualmente registrados para disminuir los efectos secundarios del infarto usando MSCs derivadas de la médula ósea y del tejido adiposo que se inyectan al paciente via intracerebral, intraarterial o intravenosa.

En paralelo, también se ensayan terapias con células madre en pacientes con lesiones de la médula espinal. Para esta aplicación se han utilizado células madres autólogas obtenidas de la médula ósea e incluso células madre de la mucosa olfatoria.

Otra enfermedad neurológica candidata a la terapia con células madre es la esclerosis lateral amiotrófica que se caracteriza por la degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores, sin tratamiento clínico en la actualidad (Faravelli et al., 2014). La enfermedad produce una debilidad muscular progresiva, acompañada de pérdida de coordinación, calambres musculares y que suele avanzar hacia una parálisis completa. En la mayoría de los ensayos clínicos actuales se emplean MSCs derivadas de la médula ósea. En la actualidad, todavía es pronto para obtener conclusiones de los efectos a largo plazo de estas terapias.

Terapias con células madre en patologías cardíacas

La patología cardiovascular es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Aproximadamente, cada año mueren alrededor de 17 millones de personas debido a alteraciones cardíacas, lo que representa casi el 30% de todas las muertes en ese mismo periodo (Sheyn et al., 2010). Se han utilizado células madre de forma

experimental para el tratamiento del infarto agudo de miocardio, la insuficiencia cardíaca y la angina refractaria. En la última década se han desarrollado numerosos estudios clínicos, en particular en pacientes con infarto agudo de miocardio. Ya que el infarto conduce a una pérdida sustancial e irreversible de cardiomiocitos, es necesario el ensayo de nuevas terapias que restablezcan la estructura y funcionalidad del miocardio (Sanganalmath et al., 2013; Coulombe et al., 2014), siendo este el objetivo final de las terapias con células madre. En principio dichas terapias deberían mejorar la función cardíaca estimulando la cardiomiogénesis, la neovascularización y previniendo la remodelación post-infarto.

Recientes investigaciones demuestran que tanto las células madre embrionarias como las de origen adulto son capaces de reemplazar las células cardíacas dañadas y establecer nuevos vasos sanguíneos. La capacidad de las células madre para diferenciarse en cardiomiocitos, células endoteliales vasculares y células musculares lisas, los tres tipos más importantes de células para el normal funcionamiento del corazón, en corazones dañados se encuentra ahora bajo investigación como una estrategia para restaurar la función cardíaca post-infarto. Entre los tipos de células madre que se están utilizando para tal finalidad se encuentran las ESCs, las células madre cardíacas, las MSCs y las del cordón umbilical. El principal aspecto para progresar en este campo es estandarizar el tipo de célula a utilizar ya que permitiría comparar los resultados de los distintos ensayos e identificar las células con mayor potencial de reparación.

Terapias con células madre en alteraciones ortopédicas

El campo de la medicina regenerativa está intentando utilizar células madre adultas para el tratamiento de injurias óseas y en el caso de lesiones articulares que requieran la regeneración del cartílago.

A pesar de la capacidad regenerativa fisiológica del hueso, cuando existen alteraciones óseas graves, como sucede tras la resección de un tumor óseo o tras una fractura severa, se suele requerir la utilización de injertos óseos. Después de un traumatismo óseo, varios mecanismos moleculares se encargan de reparar la zona dañada a partir de las células madre existentes. Los factores de inflamación atraen a dichas células, las cuales se expanden y diferencian para construir una estructura ósea altamente similar a aquella existente antes de la injuria. Las células responsables de tal reparación son las MSCs de la médula ósea y los progenitores endoteliales (Deschaseaux et al., 2010). Mientras existen evidencias científicas de que las MSCs expandidas in vivo pueden reparar efectivamente graves defectos óseos, esto todavía no se ha demostrado para el caso de MSCs expandidas in vitro, ni en modelos animales ni en humanos. Por tanto, todavía es necesario realizar numerosas investigaciones para averiguar la efectividad de la terapia con dichas células para la regeneración ósea.

Por otra parte, las MSCs pueden ser una potente fuente celular para la regeneración del cartílago articular. El cartílago articular cubre la superficie de las articulaciones, sirve para disminuir la fricción de las mismas y como amortiguador ante fuerzas mecánicas. Histológicamente, el cartílago articular es hialino con ausencia de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Los defectos en el cartílago se producen como

consecuencia de un trauma agudo, microtraumas repetitivos, en casos de osteoartritis, osteonecrosis, osteocondritis y otras patologías (Madry et al., 2010). Si el defecto del cartílago afecta exclusivamente al cartílago articular se denomina condral y si el defecto afecta al hueso se denomina osteocondral. Es bien conocido que el cartílago articular tiene una escasa o nula capacidad de auto-regeneración, debido principalmente a su naturaleza avascular. Con la ausencia de vasos sanguíneos, se imposibilita la efectividad de los procesos bioquímicos que tienen lugar para reparar el daño sobre el cartílago. Además, la reparación también es prevenida por la densa matriz extracelular del cartílago que disminuye la capacidad migratoria de los condriocitos (Hiraki et al., 2001; Duynstee et al., 2002; Xian y Foster 2006). En general, mientras no se producen procesos de reparación en defectos condrales, en el caso de defectos osteocondrales existe un proceso de reparación que se inicia por las MSCs indiferenciadas de la médula ósea del hueso subcondral (Frenkel y Di Cesare 1999; Dhinsa y Adesida 2012), aunque la reparación de dichos defectos depende de la edad del paciente, y del tamaño y localización del defecto (Vijayan et al., 2010). Uno de los tratamientos regenerativos empleados para los defectos del cartílago articular consiste en la utilización de técnicas de estimulación de la médula ósea. La principal desventaja de tales técnicas es la formación de un tejido más similar a fibrocartílago que a cartílago hialino y que dicho tejido presenta características mecánicas y bioquímicas inferiores a las del cartílago hialino, se puede romper con el tiempo y conducir a osteoartritis secundarias en el cartílago dañado (Hunziker 2002). Otra opción terapéutica para la reparación del cartílago articular es el autoinjerto osteocondral, que consiste en colocar cartílago articular de una zona sana en el área dañada. Esta opción presenta algunos inconvenientes, como la limitación de la fuente de cartílago sano y el espesor del tejido obtenido (Rose et al., 2005; Bartha et al., 2006). Por otro lado, hay dos tipos de terapia

celular para las alteraciones del cartílago: el implante autólogo de condrocitos (IAC) y los tratamientos con células madre (Viste et al., 2012). La técnica del IAC implica dos intervenciones quirúrgicas, una para la obtención de las células y otra para su implantación. Mientras algunos científicos han indicado que esta técnica es aplicable sólo en el caso de pequeños defectos del cartílago, otros han comprobado que algunos defectos del cartílago persisten tras la aplicación de la técnica IAC. Además, ya que la obtención de un número elevado de condrocitos mediante biopsia es difícil, se hace necesario realizar la expansión in vitro de las células, lo cual produce cierto grado de dediferenciación celular con pérdida de las características morfológicas y de especialización (Dehne et al., 2010).

Todas esas limitaciones han determinado la búsqueda de terapias alternativas, entre las cuales la utilización de ESCs, iPSCs y principalmente MSCs han obtenido considerable atención. Durante los últimos años, se han realizado diversas investigaciones para evaluar el potencial de las MSCs para regenerar el cartílago articular con resultados prometedores (Kuroda et al., 2007; Wakitani et al., 2002, 2004, 2007). Además, en la actualidad hay aprobados muchos ensayos clínicos para evaluar la aplicabilidad y eficacia de esta técnica y, probablemente, en un próximo futuro podremos asistir la aplicación rutinaria de las células madre para la regeneración del cartílago articular.

Otras patologías

Además de las descritas anteriormente, el campo de la medicina regenerativa está intentando aplicar terapias con células madre para el tratamiento de enfermedades

oftalmológicas, reproductivas, hepáticas, la enfermedad arterial periférica, diabetes Tipo I, determinados tipos de cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la regeneración de tejido dental, alergia, asma e incluso la alopecia (Nadig 2009; Ramakrishna et al., 2011; Sutton y Bonfield, 2014). La lista de posibles aplicaciones se amplía día a día y puede llegar a ser interminable.

Conclusiones

En conclusión, podríamos aseverar que la obtención de células madre y su posible aplicación en medicina regenerativa es uno de los aspectos más excitantes y de mayor controversia en la biología y medicina contemporáneas. Aunque se ha propuesto la utilización de diferentes tipos de células madre pluripotentes, nadie hasta este momento ha demostrado su seguridad y eficiencia en la clínica. Como una alternativa a corto plazo se están desarrollando ensayos clínicos con células madre multipotentes con resultados prometedores. Sin embargo, como reconocen los expertos en esta materia, aún se está muy lejos de la meta final, aunque la era de la medicina regenerativa está próxima y en los próximos años asistiremos a excitantes descubrimientos que conducirán, sin duda, a una extensa utilización de las células madre en la clínica. Nuestros científicos más relevantes en este campo aseguran que se superarán los obstáculos presentes y otros futuros que puedan interponerse en el camino hacia el objetivo final. Simulando las palabras del Dr. Juan Carlos Izpisua, profesor de investigación en el Laboratorio de Expresión Génica del Instituto Salk de Estudios Biológicos en La Jolla, California, todo avanza tan rápido que puede ser mañana, pero también dentro de diez años. Para el Dr. Serrano, líder del Grupo de Supresión Tumoral del Centro de Investigaciones Oncológicas, aún estamos lejos, pero no es un mensaje

pesimista; dentro de un tiempo algo de todo esto se ofrecerá de forma rutinaria en nuestros hospitales; llegará, eso seguro.

Bibliografía

- Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, et al. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature*, 2013; 502. doi: 10.1038/nature12586
- Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev*. 2004; 13:436–48.
- Bao S, Tang F, Li X, Hayashi K, et al. Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* 2009;461:1292–5.
- Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, et al. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells". *Tissue Eng* 2006; 12: 3007–19.
- Bartha L, Vajda A, Duska Z, et al. Autologous osteochondral mosaicplasty grafting. *J Orthop Sports Phys Ther* 2006; 36: 739–50.
- Behrstock S, Ebert A, McHugh J, et al. Human neural progenitors deliver glial cell line-derived neurotrophic factor to parkinsonian rodents and aged primates. *Gene Ther*. 2006; 13:379–88.
- Bobbert M. Ethical questions concerning research on human embryos, embryonic stem cells and chimeras. *Biotechnol J*. 2006; 1: 1352–69.
- Boland MJ, Hazen JL, Nazor KL, et al. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 461: 91–4.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991, 9:641–50.
- Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D’Souza SL, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 2010; 465:808–12.
- Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multiorgan failure syndrome. *J Gene Med* 2003; 5: 1028–38.
- Coulombe KL, Bajpai VK, Andreadis ST, et al. Heart Regeneration with Engineered Myocardial Tissue. *Annu Rev Biomed Eng*. 2014; 16:1–28.
- Cunningham JJ, Ulbright TM, Pera MF, et al. Lessons from human teratomas to guide development of safe stem cell therapies. *Nat Biotechnol*. 2012; 30: 849–57.

- Dehne T, Schenk R, Perka C, et al. Gene expression profiling of primary human articular chondrocytes in high-density micromasses reveals patterns of recovery, maintenance, re- and dedifferentiation. *Gene* 2010; 462: 8–17.
- Deschaseaux F, Pontikoglou C, Luc S. Bone regeneration: the stem/progenitor cells point of view. *J Cell Mol Med*. 2010; 14:103–15.
- Dhinsa BS, Adesida AB. Current clinical therapies for cartilage repair, their limitation and the role of stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2012; 7: 143–8.
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 321:1218–21.
- Doppler SA, Deutsch MA, Lange R, et al. Cardiac regeneration: current therapies-future concepts. *J Thorac Dis*. 2013; 5: 683–97.
- Duynstee ML, Verwoerd-Verhoef HL, Verwoerd CD, et al. The dual role of perichondrium in cartilage wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2002; 110: 1073–79.
- Ebert AD, Yu JY, Rose FF, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457:277–80.
- Eisenberg LM, Eisenberg CA. Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003; 69: 209–18.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154–6.
- Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann NY Acad Sci*. 2003; 991:1–14.
- Faravelli I, Riboldi G, Nizzardo M, et al. Stem cell transplantation for amyotrophic lateral sclerosis: therapeutic potential and perspectives on clinical translation. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71: 3257–68.
- Farini A, Sitzia C, Erratico S, et al. Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells in Chronic Diseases. *Stem Cells Int*. 2014; Article ID 306573, 11 pages.
- Frenkel SR, Di Cesare PE. Degradation and repair of articular cartilage. *Front Biosci* 1999; 4: D671-D685.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4:267–74.
- Furth J, Makhn MC. The transmission of leukemia of mice with a single cell. *Am J Cancer* 1937; 31: 276–82.

- Hanna J, Cheng AW, Saha K, et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:9222–7.
- Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318:1920–3.
- Hiraki Y, Shukunami C, Iyama K, et al. Differentiation of chondrogenic precursor cells during the regeneration of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9 Suppl A: S102–S108.
- Hong EJ, Jeung EB. Assessment of Developmental Toxicants using Human Embryonic Stem Cells. *Toxicol Res.* 2013; 29: 221–7.
- Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AMA, et al. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev.* 2007; 16: 597–604.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8932–37.
- Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 432–63.
- Izpisua JC. Células madre, reprogramación celular y medicina regenerativa: ¿Realidad o ciencia ficción? UCAM 2014. pp. 17-62.
- Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cell and stem cell plasticity. *Stem Cell Rev* 2005;1:53–9.
- Kang L, Wang J, Zhang Y, et al. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst complemented embryos. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 135–8.
- Koh S, Piedrahita JA. From “ES-like” cells to induced pluripotent stem cells: A historical perspective in domestic animals. *Theriogenology* 2014; 81:103–11
- Kramer AS, Harvey AR, Plant GW, et al. Systematic review of induced pluripotent stem cell technology as a potential clinical therapy for spinal cord injury. *Cell Transplant.* 2013; 22: 571–617.
- Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, et al. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15: 226–31.

- Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transpl.* 1995; 16:557–64.
- le Blanc K, Pittenger MF. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* 2005; 7:36–45.
- le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet* 2004; 363:1439–41.
- Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders—how to make it work. *Nature Med.* 2004; 10:S42–S50.
- Madhusankar N, Vaidyanathan K, Rajesh V, et al. Use of Bone Marrow derived Stem Cells in Patients with Cardiovascular Disorders. *J Stem Cells Regen Med.* 2007; 14:28–9.
- Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2010; 18: 419–33.
- Maehle AH. Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes Rec R Soc.* 2011; 65:359–78.
- Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood.* 2001; 97: 3075–85.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981; 78: 7634–8.
- Matsunaria H, Nagashima H, Watanabe M, et al. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *PNAS* 2013; 110: 4557–62.
- McHugh PR. Zygote and "clonote"—the ethical use of embryonic stem cells. *N Engl J Med.* 2004; 351: 209–11.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5807–12.

- Nadig RR. Stem cell therapy - Hype or hope? A review. *J Conserv Dent.* 2009 12:131–8.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 8424–8.
- Nardi NB, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2006; 174:249–82.
- Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009; 4:487–92.
- Nichols J, Smith A. The origin and identity of embryonic stem cells. *Development* 2011; 138:3–8.
- Pappenheim A. Prinzipien der neuen morphologischen Haematologie nach zytogenetischer Grundlage. *Fol Haematol.* 1917; 21: 91–101.
- Pappenheim A. Zwei Fälle akuter grosslymphozytärer Leukämie *Fol Haematol.* 1907; 4: 301–8.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143–7.
- Ramakrishna IV, Janardhan PB Sudarsanareddy L. Stem Cells and Regenerative Medicine – A Review. *Annual Review and Research in Biology* 2011; 1: 79–110.
- Ratajczak J, Kucia M, Mierzejewska K, et al. Paracrine proangiopoietic effects of human umbilical cord blood-derived purified CD133+ cells--implications for stem cell therapies in regenerative medicine. *Stem Cells Dev.* 2013; 22: 422–30.
- Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, et al. Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Adv Med Sci.* 2012; 57: 1-17.
- Ratajczak MZ. Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol.* 2008; 15: 293-300.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000; 18:399–404.
- Ringd'en O, Uzunel M, Rasmussonet I, al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006; 81: 1390–7.
- Ronen D, Benvenisty N. Genomic stability in reprogramming. *Curr Opin Genet Dev.* 2012; 22: 444–9.

- Rose T, Craatz S, Hepp P, et al. The autologous osteochondral transplantation of the knee: clinical results, radiographic findings and histological aspects. *Arch Orthop Trauma Surg* 2005; 125: 628–37.
- Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res.* 2013; 113: 810–34.
- Scott EW. Stem cell plasticity or fusion: two approaches to targeted cell therapy. *Blood Cells Mol Dis.* 2004; 32: 65–7.
- Sherwood RI, Christensen JL, Conboy IM, et al. Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell* 2004;119:543–54.
- Sheyn D, Mizrahi O, Benjamin S, et al. Genetically modified cells in regenerative medicine and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62:683–98.
- Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Physiol* 1963; 62:327–36.
- Singh P, Williams DJ. Cell therapies: realizing the potential of this new dimension to medical therapeutics. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008; 2:307–19.
- Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 2009, 136:964–77.
- Sondergaard CS, Hodonsky CJ, Khait L, et al. Human thymus mesenchymal stromal cells augment force production in self-organized cardiac tissue," *Ann Thorac Surg* 2010; 90:796–803.
- Subramaniyan R, Amalorpavanathan J, Shankar R, et al. Application of autologous bone marrow mononuclear cells in six patients with advanced chronic critical limb ischemia as a result of diabetes: our experience". *Cytotherapy* 2011; 13: 993–9.
- Sugaya K. Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases. *Int Rev Cytol.* 2003; 228: 1–30.
- Suszynska M, Zuba-Surma EK, Maj M, et al. The proper criteria for identification and sorting of very small embryonic-like stem cells, and some nomenclature issues. *Stem Cells Dev.* 2014; 23: 702–13.
- Sutton MT, Bonfield TL. Stem Cells: Innovations in Clinical Applications. *Stem Cells Int.* 2014; Article ID 516278, 9 pages.

- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861–72.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006, 126:663–76.
- Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy". *Stem Cells* 2006; 24: 2292–8.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145–7.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7844–8.
- Tibbetts MD, Samuel MA, Chang TS, et al. Stem cell therapy for retinal disease. *Curr Opin Ophthalmol.* 2012; 23: 226–34.
- Trounson A, Thakar RG, Lomax G, et al. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med.* 2011; 9: 52.
- Vijayan S, Bentley G, Briggs T, et al. Cartilage repair: A review of Stanmore experience in the treatment of osteochondral defects in the knee with various surgical techniques. *Indian J Orthop* 2010; 44: 238–45.
- Viste A, Piperno M, Desmarchelier R, et al. Autologous chondrocyte implantation for traumatic full-thickness cartilage defects of the knee in 14 patients: 6-year functional outcomes. *Orthop Traumatol Surg Res* 2012; 98: 737–43.
- Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 199–206.
- Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, et al. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant* 2004; 13: 595–600.
- Wakitani S, Nawata M, Tensho K, et al. Repair of articular cartilage defects in the patellofemoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1: 74–9.
- Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol* 2012; 5:19.

- William JB, Prabakaran R , Ayyappan S, et al. Functional Recovery of Spinal Cord Injury Following Application of Intralesional Bone Marrow Mononuclear Cells Embedded in Polymer Scaffold – Two Year Follow-up in a Canine. *J Stem Cell Res Ther* 2011; 1:3.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385, 810–3.
- Xian CJ, Foster BK. Repair of injured articular and growth plate cartilage using mesenchymal stem cells and chondrogenic gene therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006; 1: 213–2.
- Xu Y, Zhu X, Hahm HS, et al. Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:8129–34.
- Ye L, Chang JC, Lin C, et al. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *PNAS* 2009; 106:9826–30.
- Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009; 461:86–90.