

Células Madre Adultas

Felipe Prosper

Servicio de Hematología y Area de Terapia Celular. Clínica Universitaria. Universidad de Navarra
Correspondencia: Felipe Prósper. Servicio de Hematología y Area de Terapia Celular. Clínica Universitaria.

I. INTRODUCCION

Aunque los primeros estudios con células madre datan de la década de los 70, los avances realizados en los últimos años han despertado el interés no sólo de la comunidad científica sino de la sociedad en general. Las implicaciones éticas en el uso de las células madre embrionarias y las nuevas evidencias científicas que demuestran un mayor potencial de las células madre adultas que el inicialmente esperado, han reavivado aún más el debate sobre sus posibles aplicaciones terapéuticas.

Una célula madre es aquella que es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas. Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación: las células totipotenciales son capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario; las células pluripotenciales tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias y, por último, las células multipotenciales, que son capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria (Weissman et al., 2001).

Tradicionalmente se han considerado a las células madre embrionarias como células pluripotenciales, a diferencia de las células madre adultas que se han caracterizado sólo como multipotenciales. Sin embargo, trabajos publicados recientemente sugieren existen células madre adultas pluripotenciales. Es importante destacar que para que una célula madre sea pluripotencial tiene que cumplir las siguientes condiciones: en primer lugar, una única célula debe ser capaz de diferenciarse a células especializadas procedentes de cualquier capa embrionaria; en segundo lugar, demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células a las que se han diferenciado y, finalmente, que se produzca un asentamiento claro y persistente de estas células en el tejido diana, tanto en presencia o ausencia de daño. En estos momentos no existe ningún estudio que cumpla todos estos criterios de forma estricta, aunque algunos trabajos indican de manera bastante evidente la posible existencia de células madre adultas pluripotenciales (Jiang et al., 2002).

Las células madre adultas se han identificado en la mayoría de los tejidos, incluyendo hematopoyético, neuronal, epidérmico, gastrointestinal, músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, páncreas y pulmón. En un principio se pensó que

las células madre adultas estaban predeterminadas a diferenciarse a un tipo celular procedente de su misma hoja embrionaria. Sin embargo, esta idea ha sido rebatida por varios grupos de investigación cuyos estudios sugieren que las células madre adultas son capaces de diferenciarse funcionalmente a células especializadas procedentes de capas embrionarias distintas a las de su propio origen. Incluso, algunos de estos grupos han sido capaces de probar la pluripotencialidad de células madre adultas procedentes de la médula ósea o del cerebro. Estos avances han hecho cambiar la idea tradicional que se tenía de las células madre adultas, dándoles un mayor potencial terapéutico del que se pensaba. No obstante, estos avances han sido puestos en tela de juicio por algunos científicos basándose en la observación de que algunas células madre adultas son capaces de fusionarse *in vitro* con células madre embrionarias y por la imposibilidad de reproducir alguno de los experimentos anteriormente citados.

II. CÉLULAS MADRE DE LA MÉDULA ÓSEA

Se han descrito diferentes tipos de células madre en la médula ósea: Hematopoyéticas (HSC), Mesenquimales (MSC), las llamadas "Side Population Cells" (SP) y recientemente el grupo de la Dra. Verfaillie ha publicado un artículo en el que se demuestra la existencia de una población celular llamada MAPC (Multipotent Adult Progenitor Cell).

CELULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS:

Las HSC han sido identificadas tanto *in vitro* como *in vivo* por varios laboratorios. Algunos trabajos han puesto de manifiesto que las HSC además de su potencial hematopoyético pueden contribuir a la angiogénesis y a la vasculogénesis. Experimentos *in vitro* e *in vivo* ponen de manifiesto que las células que expresan el marcador de superficie CD34, no sólo son HSC sino también progenitoras endoteliales (EPC).

Recientemente se han publicado trabajos en los que las HSC han sido diferenciadas a músculo cardíaco. El grupo de Orlic y Anversa (Orlic et al., 2001) han demostrado en un modelo de infarto de miocardio murino que una inyección de células mononucleadas de la médula ósea Lin⁻ y c-kit⁺ (fenotipo de marcadores de superficie típico de HSC) en el corazón dañado, resultó en la colonización de estas células en más de la mitad del área infartada. Estas posibles HSC adquirieron un fenotipo característico de células de miocardio y contribuyeron a la mejora y supervivencia de los animales. Aunque la fracción de las células mononucleadas de la médula ósea Lin⁻ y c-kit⁺ es muy rica en HSC, algunos grupos afirman que estos resultados son insuficientes para asegurar que las células responsables de la regeneración cardíaca son HSC.

Otros grupos, basándose en que las células ovales expresan marcadores de superficie tradicionalmente asociados a HSC (c-kit, flt-3, Thy-1 y CD34), han sugerido que éstas podrían diferenciarse a células ovales y hepatocitos. Hay grupos como el de Lagasse y col que han demostrado que células Lin⁻, c-kit⁺, Thy-1, y Sca-1 son capaces de regenerar un hígado murino en un modelo de daño hepático fulminante (Lagasse et al., 2000). Sin embargo, este estudio no ha sido incapaz de demostrar que esta regeneración se deba a una única célula HSC.

El potencial de las HSC para adquirir características de neuronas adultas así como células de la glia ha sido descrito recientemente *in vitro* e *in vivo* en modelos murinos. Sin embargo algunos grupos discuten estos resultados ya que, al igual que en los casos anteriormente citados, las células utilizadas fueron poblaciones de la médula ósea que aunque tenían

características de HSC era insuficiente para probar que la diferenciación a neurona es debida exclusivamente a las HSC.

CELULAS MADRE MESENQUIMALES

La médula ósea también contiene células madre mesenquimales o MSC. En los últimos años se han ido descrito distintos marcadores de superficie que han sido utilizados para identificar y aislar estas MSC, tales como SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90 y CD106 (Deans and Moseley, 2000). Las MSC no expresan antígenos de superficie típicos de las HSC, como CD34, CD45 o CD14. Experimentos recientes han demostrado *in vitro* que las MSC son capaces de diferenciarse a tejidos mesodérmicos funcionales, como osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos esqueléticos.

Varios grupos afirman haber conseguido diferenciar MSC a células derivadas del neuroectodermo. En estos trabajos, las MSC se diferenciaron *in vitro* a células que expresaban marcadores neuronales, sin embargo los autores no llegan a demostrar que estas células adquieran características funcionales similares a neuronas o células de la glia. A pesar de su probada multipotencialidad mesodérmica y de su habilidad para diferenciarse a neuroectodermo, las MSC no diferencian a tejido derivado del endodermo y, por lo tanto, no se pueden considerar células madre pluripotenciales. Las MSC constituyen un modelo muy útil en aplicaciones clínicas para un número de enfermedades, tanto en terapia regenerativa como en terapia génica.

SIDE POPULATION CELLS

Las llamadas "side population cells (SP)" han sido aisladas de la médula ósea usando técnicas de citometría de flujo (FACS). Se sabe que las SP son capaces de diferenciar a HSC en humanos, roedores y otras especies. Además algunos estudios describen que las SP podrían dar lugar a otros tipos de células especializadas e integrarse en distintos tejidos *in vivo*. Por ejemplo, el grupo de Jackson et al. demostró en 1999 que las SP podían diferenciar a células con características de músculo cardíaco y endotelio en un modelo murino de infarto de miocardio.

MULTIPOTENT ADUL STEM CELLS (MAPC)

Esta población celular de la medula ósea ha sido descrita recientemente por el grupo de la Dra. Verfaillie (Jiang et al., 2002). Su descubrimiento ha suscitado la atención del mundo científico ya que se han descrito como auténticas células pluripotenciales con una capacidad diferenciadora muy similar a las células madre embrionarias. Las MAPC han sido aisladas tanto de médula humana como murina. Estas MAPC son capaces de proliferar *in vitro* más de 120 divisiones celulares sin un aparente envejecimiento ya que mantienen unos niveles altos de telomerasa durante todo el tiempo de cultivo. Se ha descrito que las MAPC no expresan CD34, CD44, MHC I, MHC II, CD45 y c-kit; expresan niveles bajos de Flk-1, Sca-1 y Thy-1, y altos de CD13, SSEA-1 (ratón/rata) y SSEA-4 (humano). Al igual que las células madre embrionarias, en las MAPC se detecta la activación de los factor de transcripción Oct-4 y Rex-1, factores que son necesarios para mantener la célula en un estado proliferativo e indiferenciado. Además se han realizado experimentos de clonaje que prueban que es una única célula la que es capaz de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo o ectodermo). *In vitro*, las MAPC pueden ser inducidas a diferenciar a tejidos derivados del mesodermo como hueso, cartílago, adipocitos, músculo esquelético, estroma hematopoyético o endotelio. Pero de momento no han sido capaces de diferenciar a tejido hematopoyético maduro o cardiomiocitos. Estas células también han sido capaces de diferenciar

a hepatocitos y funcionar como tales, ya que son capaces de producir urea, albúmina, inducir el citocromo p450 con fenobarbital y almacenar glucógeno. La diferenciación de las MAPC a tejidos derivados del ectodermo como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos también ha sido demostrada *in vitro*.

Las MAPC contribuyeron notablemente a la neoangiogénesis y diferenciaron a endotelio funcional. Uno de los experimentos que mejor ha demostrado la pluripotencialidad de las MAPC fue la inyección de tan sólo 1 a 12 MAPC (procedentes de ratones transgénicos ROSA26 que expresan el gen reportero LacZ) en un blastocito de ratón. La contribución de estas MAPC en estos animales quiméricos se observó en prácticamente todos los tejidos: cerebro, retina, pulmón, músculo esquelético, hígado, intestino, riñón, bazo, medula ósea, sangre y piel.

Aunque el proceso de aislamiento de las MAPC todavía es largo y laborioso, y aún no se han publicado experimentos que prueben que no existen fusiones celulares, estos experimentos con MAPC son los que más se han aproximado a la demostración de la existencia de células madre pluripotenciales, mostrando su potencialidad no sólo en el campo terapéutico, sino como un arma de aprendizaje para poder comprender mejor los eventos que inducen a las células madre a la diferenciación.

III. CELULAS MADRE NEURONALES

Uno de los mejores experimentos donde se prueba la existencia de células madre adultas y su potencial diferenciador fue el publicado por el grupo de Clarke y col (Clarke et al., 2000). Este grupo inyectó las células madre neuronales o neuroesferas procedentes de un ratón transgénico para el gen reportero LacZ en embrión de ratón. Aproximadamente el 25% de los embriones presentaban quimerismo no sólo en el tejido neuronal, sino también en tejidos del mesodermo y del endodermo. Cuando estas mismas neuroesferas fueron inyectadas dentro de un blastocito de ratón, la contribución se extendió al sistema nervioso central, corazón, hígado, intestino y otros tejidos. Debido a que los animales no fueron evaluados después del nacimiento, no se pudo realizar una valoración objetiva de la funcionalidad de las células donadas.

IV. CELULAS MADRE MUSCULARES

El grupo de Qu-Petersen y col (Qu-Petersen et al., 2002) ha sido capaz de aislar diferentes poblaciones de células madre musculares murinas basándose en su capacidad de adhesión y proliferación. Estas células fueron mantenidas en cultivo durante más de 60 divisiones celulares sin anomalías cromosómicas. Las células fueron capaces de diferenciarse *in vitro* e *in vivo* a endotelio, músculo, y células del linaje neuronal. Una vez más la crítica que los investigadores hacen es la ausencia de experimentos clonales que prueben que es una única célula y no una población heterogénea la causante del potencial diferenciador.

V. CELULAS MADRE EN LA PIEL

De la epidermis humana y murina se han aislado células madre con capacidad de diferenciarse a células especializadas procedentes de dos capas embrionarias distintas. Estas células se mantuvieron en cultivo durante más de 12 meses sin diferenciarse y se les pudo inducir la diferenciación *in vitro* a neuroectodermo (neuronas y células de la glia) o a linajes mesodérmicos (adipocitos y músculo liso). Su potencial de diferenciación a tejidos derivados del ectodermo y mesodermo fue probado a un nivel clonal. Pero, no existen evidencias de una multipotencialidad *in vivo* y tampoco que los tejidos diferenciados fuesen funcionales. Además el

porcentaje de las células con características morfológicas neuronales o mesodérmicas fue menor al 10%.

VI. CONCLUSIÓN

Gracias a los estudios realizados a lo largo de los últimos años se ha conseguido cambiar la idea que se tenía de las células madre adultas. Antes se pensaba que las células madre adultas estaban predestinadas a un tipo celular especializado procedente de su misma capa embrionaria. Hemos revisado en este artículo algunos de los estudios que sugieren que las células madre adultas tienen un potencial mucho mayor del que se pensaba y que algunos casos muy concretos son capaces de mostrar pluripotencialidad, algo que hasta hace muy poco era territorio exclusivo de las células madre embrionarias. El nuevo campo de las células madre adultas conlleva implicaciones biológicas, clínicas y éticas de gran consideración. Las exigencias en los estudios tanto con células madre adultas como embrionarias son cada vez mayores y contribuyen día a día a unificar más los criterios científicos que sin duda está ayudando al rápido avance en este campo y a poner cada vez menos límites a la potencialidad de las células madre, contribuyendo a las enormes expectativas por parte de pacientes con enfermedades consideradas incurables.

VII. GLOSARIO DE TERMINOS Y CONCEPTOS

¿Qué es una célula madre?

Una célula madre es un tipo especial de célula que posee la capacidad de replicarse y de dar lugar a diversos tipos de células especializadas. La mayoría de las células del organismo adulto, como las células del corazón o de la piel, son células especializadas en desempeñar una determinada función. Una célula madre no está especializada y permanece en ese estado hasta que recibe una señal que la hace especializarse. Lo que la hace única es la capacidad de proliferar dando lugar a células idénticas, unido a la capacidad de especialización o dicho de otra forma de diferenciación hacia células especializadas.

¿Qué tipos de células madre existen?

Desde el punto de vista de su capacidad para generar tipos de tejidos existen diferentes tipos de células madre: células madre totipotenciales: la misma célula es capaz de generar cualquier célula del organismo, tanto somáticas como germinales; células madre pluripotenciales: una célula es capaz de generar diferentes tejidos o células pertenecientes a diferentes tejidos; célula madre multipotencial: aunque estas células pueden diferenciarse a distintos tipos celulares su capacidad es menor y en principio solo son capaces de generar tejidos derivados de la misma lámina embrionaria.

¿Dónde se encuentran las células madre?

Las células madre se encuentran en tejidos adultos y en los embriones, independientemente de su estadio. Por ello se habla de células madre del adulto y células madre embrionarias. Aunque poseen propiedades en común, existen también algunas diferencias significativas.

¿Qué es una célula madre del adulto?

Una célula madre del adulto es una célula no especializada, es decir no diferenciada, que se encuentra en un tejido (especializado) y que posee la capacidad de dar lugar a células especializadas del tejido en el que se encuentra. Las células madre son capaces de auto regenerarse y de dar lugar a células idénticas. Hasta el momento se han encontrado células

madre en la médula ósea, sangre, córnea y retina, cerebro, músculo, hígado, piel, páncreas, tracto gastrointestinal y pulpa dental del individuo adulto.

¿Qué es una célula madre embrionaria?

Una célula madre embrionaria proviene de un grupo de células –denominado masa celular interna- de un estadio temprano del embrión (se trata de la fase de blastocisto). Estas células no son embriones, sin embargo para aislarlas es necesario destruir al embrión. Poseen la capacidad de autoregenerarse y de diferenciarse en muchos tipos celulares, una propiedad que se conoce como versatilidad celular.

¿Cuáles son las fuentes para obtener células madre embrionarias?

Existen tres fuentes para la obtención de células madre embrionarias:

1) La utilización de embriones sobrantes de la fecundación in vitro, congelados en los centros de reproducción asistida; 2) Su creación expresa de nuevos embriones in vitro a partir de donantes de gametos (bancos de espermatozoides y óvulos), con objeto de utilizarlos para el aislamiento de células madre; 3) y la clonación de un nuevo embrión a partir de una célula adulta cualquiera. En los tres casos los embriones humanos han de ser destruidos para obtener las células madre que luego se cultivan en el laboratorio.

¿Cuáles son las aplicaciones terapéuticas de las células madre?

Las células madre pueden servir en el futuro como materia prima para reemplazar muchas células perdidas en enfermedades degenerativas. Por ejemplo, enfermedad de Parkinson, diabetes, enfermedad cardíaca crónica, fallo renal y hepático y cáncer. Algunas de estas dolencias pueden tratarse mediante trasplantes de órganos, pero existe un limitado número de donantes lo que hace necesario desarrollar nuevas estrategias. Especialmente, el uso de estas células para generar tejidos de reemplazo en enfermedades neurodegenerativas las hace especialmente atractivas para el tratamiento de daños en la médula espinal, Alzheimer y esclerosis múltiple. Además podrían utilizarse para restaurar la función inmune en pacientes inmunodeprimidos y servir de vehículos para dirigir tratamientos contra células cancerosas, bien modificándolas o destruyéndolas.

¿Cuáles son las diferencias entre las células madre del adulto y las células madre embrionarias?

Además del origen, las células madre embrionarias son pluripotentes, es decir tienen en teoría la capacidad de diferenciarse en cualquiera de los más de 200 tipos celulares distintos. En el caso de las células madre de adultos aunque existen al menos tres grupos que han demostrado la pluripotencialidad, estos trabajos deben ser confirmados antes de que este concepto sea aceptado. Recientes trabajos señalan la capacidad de diferenciación hacia muchos tipos celulares distintos a los que se encuentran en el órgano que las alberga y por tanto una versatilidad celular equivalente a la de las células embrionarias.

Las células madre embrionarias tienen una capacidad de autoregenerarse casi ilimitada y pueden replicarse con mucha facilidad en cultivo. Uno de los problemas del uso de células madre embrionarias es la frecuente aparición de tumores (teratomas) tras la implantación en animales. Las células madre del adulto poseen quizás una menor capacidad de replicarse, pero no se conoce la formación de teratomas in vivo a partir de ellas.

Las células madre del adulto están en baja frecuencia lo que representa un problema para su uso en terapias humanas, aunque el número total de células obtenido en un protocolo de extracción y aislamiento suele ser mucho mayor que el número de células madre derivadas de un embrión. .

La aplicación de las células madre embrionarias clínicamente se asocia a un problema adicional: la existencia de diferencias en los antígenos de histocompatibilidad entre donante (embrión a partir del cual se han obtenido las células) y receptor (paciente). Es decir son incompatibles y sujetas a rechazo. Por el contrario las células madre adultas pueden aplicarse de forma autóloga (es decir células del paciente para si mismo) y por lo tanto sin riesgo de rechazo.

¿Qué es la fusión celular y que implicaciones tiene de cara a la demostración de la existencia de células madre adultas?

La fusión celular es un fenómeno biológico por el que dos células son capaces de unirse (fusionarse) con la consiguiente transferencia de su material genético. Este fenómeno ya había sido descrito hace mas de 20 años. De forma reciente se he demostrado que las células embrionarias humanas son capaces de fusionarse con células humanas adultas, produciendo un tipo de células que expresan de forma simultanea marcadores de células adultas y características de células embrionarias. Esta fenómeno de fusión se produce se produce con una frecuencia de 1:1.000.000 y genera unas células con dotación tetraploide (doble contenido de cromosomas) y con una desventaja proliferativa.

Este fenómeno de fusión podría justificar hallazgos etiquetados como pluripotencialidad de células madre adultas, sin embargo nunca podría justificar aquellos estudios en los que se demuestra la existencia de pluripotencialidad no solo morfológicamente sino también de forma funcional.

VIII. REFERENCIAS

Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U., and Frisen, J. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288, 1660-3.

Deans, R. J., and Moseley, A. B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28, 875-84.

Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., and Verfaillie, C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*.

Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L., and Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229-34.

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., and Anversa, P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-5.

Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A., and Huard, J. (2002). Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 157, 851-64.

Weissman, I. L., Anderson, D. J., and Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 387-403.