

# SELECCIONES

## Consideraciones científicas relacionadas con la ética y el uso de las células madre embrionarias en la investigación y en la medicina

Martín F Pera<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Monash Institute of Reproduction and Development, Monash University, 246 Clayton Road, Clayton, Victoria 3168, Australia. martin.pera@med.monash.edu.au

Traducido por:  
Carlos A Giraldo E<sup>2</sup> y Lina M Carrillo B<sup>3</sup>

<sup>2</sup>Investigador asociado y <sup>3</sup>Estudiante de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, Grupo de Fisiología y Biotecnología de la Reproducción - Reproducción - BIOGÉNESIS. Universidad de Antioquia. cargiraldo@agronica.udea.edu.co

Con autorización del autor y de:  
Rights & Permissions - CSIRO PUBLISHING  
150 Oxford Street (PO Box 1139), Collingwood, Victoria 3066, Australia  
<http://www.publish.csiro.au/journals/rfd/>

Traducción de un artículo previamente publicado en:  
Reproduction Fertility and Development 2001;13(1):23-9.

### Resumen

*El desarrollo reciente de las células madre a partir de blastocistos humanos (CME), tiene el potencial de revolucionar muchas de nuestras aproximaciones a la biología humana y a la medicina humana. La persistencia de la objeción para el uso de las CME humanas por consideraciones éticas puede impedir el avance o diferir estas oportunidades indefinitivamente. Es esencial que la discusión ética proceda sobre bases científicas sanas. La controversia ética acerca de las CME humanas tiene que ver con el hecho de que se originan en blastocistos humanos y por la percepción de su potencial de desarrollo. Es probable que el requerimiento mundial de CME humanas sea resuelto mediante el desarrollo de un número pequeño de líneas de celulares, como ha sido en el caso del ratón; los índices actuales de éxito para el establecimiento de CME humanas sugieren que solo será requiriendo un número modesto de embriones para alcanzar esta meta. Es de interés público que las líneas de CME humanas se deriven bajo circunstancias que permitan su distribución extensa con mínimas incomodidades para los investigadores de todo el mundo. Para la consideración del potencial de desarrollo de las CME, existe una distinción importante entre la pluripotencialidad, o capacidad de convertirse en una amplia gama de tejidos somáticos y extraembrionarios; y la totipotencialidad, que es la capacidad de una célula o conjunto de células para dar lugar a un nuevo individuo, dada la ayuda materna adecuada. No hay evidencia de que las CME de alguna especie puedan dar lugar a un nuevo individuo, a menos que estén combinadas con las células que son la progenie inmediata de un cigoto. Estas limitaciones de desarrollo de las CME parecen relacionarse con su inhabilidad para dar lugar a la formación del eje y a la generación del plan corporal. Algunas alternativas para las CME derivadas de blastocistos incluyen las células germinales embrionarias, las células madre de tejidos adultos, la transdeterminación de células somáticas diferenciadas, y la clonación terapéutica.*

*Estas áreas de investigación son complementarias y sinérgicas a la de la CME, y es prematuro y contraproducente sugerir que se debe dar preferencia a una de ellas. La combinación de la clonación y la tecnología de las CME tiene el potencial de involucrar muchos temas importantes en medicina de trasplantes e investigación, pero se requiere un mejor entendimiento de la reprogramación de las células somáticas antes de que podamos mirar a las CME derivadas de blastocistos normales como equivalentes a aquellas obtenidas por transferencia nuclear.*

*Copyright permanece con CSIRO PUBLISHING  
© CSIRO 2001 10.1071/RD00077 1031-3613/01/010023*

### **Células madre embrionarias humanas: el potencial y la base de la controversia**

Las células madre embrionarias (CME) son células derivadas del embrión temprano que pueden crecer indefinidamente in vitro en el estado primitivo embrionario y conservan una característica importante de las células de las cuales se originan: la pluripotencialidad o la capacidad de diferenciarse en una amplia gama de tipos celulares somáticos y extraembrionarios. Thomson *et al* (1998) reportaron la derivación de las CET de blastocistos humanos, y Shamblott *et al* (1998) reportaron el aislamiento de líneas celulares pluripotenciales de las gónadas humanas embrionarias o fetales. Reubinoff *et al* (2000) confirmaron los resultados de Thomson *et al* (1998) y demostraron que las células somáticas podrían ser derivadas en gran número, a partir de CME in vitro. Las propiedades biológicas de las CME pluripotentes humanas se han revisado recientemente (Pera *et al* 2000; Thomson y Odorico 2000).

El alcance de las aplicaciones más obvias previstas para las células pluripotentes diploides humanas es impresionante: nuevas aproximaciones al estudio del desarrollo embrionario humano y de sus desórdenes, como son los defectos de nacimiento y los tumores embrionarios; el acceso a territorios hasta ahora explorados de la expresión genética embrionaria humano para la utilización de la genómica moderna; herramientas nuevas para el descubrimiento de factores polipéptidicos de crecimiento y diferenciación que pudieran usarse en la regeneración y la reparación de tejido; nuevos medios para la creación de modelos de enfermedad humana in vitro para la investigación básica, descubrimiento de drogas, y toxicología; una respuesta potencial para el tema de la escasez crónica de tejido para trasplantes en el tratamiento de enfermedades degenerativas, y un final al uso de terapia inmunosupresiva en trasplantes si las técnicas de clonación pudieran ser usadas para derivar las CME de los propios tejidos de los pacientes; nuevos sistemas de aplicación para la terapia génica.

Tanto la derivación como el uso propuesto de las CME humanas en la investigación han sido tema de controversia (Annas *et al* 1999). Las preocupaciones se relacionan con la destrucción necesaria de un embrión en el curso de derivar las células, y con una percepción equivocada de su potencial de desarrollo que ha llevado a algunos a comparar estas células con embriones. Aunque los Institutos Nacionales de la Salud de los E.E.U.U. han recibido asesoría legal que indica que las CME no son embriones y han establecido lineamientos para el uso de fondos para la investigación en CME (National Institutes of Health, 2000). El departamento de la salud del Reino Unido ha recibido asesoría de un grupo de expertos que avalan la práctica de derivación y el uso de estas células y la clonación terapéutica (departamento de salud 2000), la controversia seguramente continuará en los E.E.U.U. y en el Reino Unido y en otros países donde una política clara al respecto todavía no existe. Los temas de la derivación y el uso de las células embrionarias han sido considerados separadamente en los proyectos de normas para el financiamiento e investigación promulgados por los Institutos de Salud de los E.E.U.U., y en ciertas jurisdicciones incluyendo el estado de Victoria en Australia. La legislación presente hace una división de facto entre derivación y uso; el primero prohibido y lo segundo permitido. Aquí discuto brevemente la cuestión de la derivación de las células a partir de blastocistos, y posteriormente la evaluación científica de la capacidad de desarrollo de las células embrionarias madres. Considero alternativas posibles para la derivación de líneas de células madre embrionarias a partir de blastocistos. Finalmente, discuto el potencial de la clonación terapéutica y las posibles dificultades asociadas.

En esta revisión no trato los temas económicos de la salud que seguramente se presentarán a la par con el uso de la tecnología de las CME en la medicina de trasplantes humanos. Hay muchas preguntas con respecto a los costos probables de tales procedimientos,

y los límites potenciales de su disponibilidad con base en éste costo. Éstos son temas serios, pero en la etapa actual de desarrollo de la tecnología, no es posible determinar el costo probable de la medicina regeneradora basada en CME en relación a los costos de las alternativas disponibles en la actualidad.

### **La derivación de otras líneas de células madre embrionarias humanas: un ejercicio limitado**

El uso de embriones humanos sobrantes en los programas de fertilización in vitro (IVF) para derivar CME humanas es controvertido, ya que la capacidad del embrión para implantarse en el útero se ve comprometida en el proceso. La producción de embriones sobrantes sigue siendo una consecuencia inevitable de los protocolos actuales de IVF, a pesar de los esfuerzos por mejorar el cultivo de embriones y de seleccionar los embriones de alta calidad para la implantación uterina. La justificación para el uso de embriones humanos en la investigación con un tiempo límite de 14 días in vitro se ha discutido en otra parte (Departamento de Salud y Seguridad Social, 1984), y hay muchos argumentos biológicos sensatos para escoger este momento (14 días). Algunos han sugerido que las mejoras obtenidas en el crecimiento del blastocisto in vitro y con técnicas sofisticadas de micromanipulación, o quizás con fisión de embriones, llegaría a ser posible realizar una biopsia de una porción de la masa celular interna para obtener el material para iniciar el cultivo de CME, dejando suficiente material que permitiría el desarrollo normal del embrión. Sin embargo, dada esta posibilidad, no es probable que los médicos o sus pacientes elijan transferir estos embriones a una mujer, en lugar de los embriones que no han sido manipulados, y los procedimientos pueden destinarse a el embrión del cual se tomó la biopsia (biopsiado) a la criopreservación y a una eventual destrucción. Dado que millares de embriones serían desechados por las clínicas de IVF de todas maneras, su uso en investigación para alcanzar beneficios significativos en la salud es éticamente preferible al simple descarte.

Un argumento fuerte para la restricción del uso de embriones en la investigación se relaciona con su misma naturaleza como una fase en el ciclo de vida humano. Claramente, el status ético de un blastocisto producido por IVF se relaciona con su potencial para desarrollarse subsecuentemente. Una vez que se decide remover un blastocisto sobrante del ciclo repro-

ductivo, podría argumentarse que su status también cambia, y que su uso en la investigación biomédica es preferible a su destrucción o criopreservación indefinida (Annas *et al* 1999).

Puede haber una cierta opinión que la investigación de CME requerirá del uso cada vez mayor de millares de embriones. Esto no está cerca de la realidad. Gran parte de las investigaciones en ratones en las que se usaban CME pluripotentes se ha basado en un número relativamente pequeño de carcinoma embrionario o de líneas de CME, con pocas líneas celulares claves siendo extensamente distribuidas a través del mundo a investigadores. Es probable que la misma situación prevalezca en la investigación con CME humanas. Las CME humanas derivadas de blastocistos son inmortales, y expresan telomerasa, como se espera de las células inmortales (Thomson *et al* 1998). Actualmente se han desarrollado medios altamente eficientes para la criopreservación y recuperación acertada de CME congeladas (Reubinoff y Pera, datos sin publicar), y las tasas publicadas para el establecimiento exitoso de CME de blastocistos humanos están en el orden de 35% a 50% (Thomson *et al* 1998; Reubinoff *et al* 2000). Por lo tanto, es probable que el total de embriones requeridos por la comunidad académica del mundo para la investigación de CME quizá se pueda resolver con el uso de 20 a 30 embriones adicionales.

Algunos investigadores podrían arguir que, dado el amplio grado de variación genética en la población humana, por una variedad de razones, podría ser útil tener líneas de CME representativas de cada diversidad. Por ejemplo, los cultivos de células diferenciadas obtenidos de CME con orígenes genéticos diversos, podrían permitir estudios in vitro con base en las diferencias individuales a la predisposición a enfermarse. O, para entender mejor el origen de ciertos desórdenes congénitos, puede ser más útil tener líneas de células derivadas de embriones con trisomias o las monosomias. Si uno acepta estos argumentos, entonces podría preverse que una gran cantidad de embriones serían requeridos para satisfacer estas demandas.

Sin embargo, hay otros acercamientos para la generación de CME humanas con un genotipo deseado, que no implican el uso de los embriones producidos por IVF. El verdadero potencial para el desarrollo de líneas CME humanas modificadas estará limitado por la disponibilidad de embriones con genotipos deseados conocidos. Es más probable que los requerimientos

para el estudio de la función de genes específicos sean resueltos por la modificación genética de un panel de líneas de CME humanas, bien a través de tecnología knock-in o knock-out, o transferencia artificial de cromosomas. En algunos casos podría existir un argumento fuerte para la obtención de líneas celulares que representen los rasgos multigénicos implicados, por ejemplo, la susceptibilidad a la enfermedad, un ejemplo clave sería la cepa de ratón NOD (diabético no-obeso). Este requisito en investigación humana sería resuelto lo mejor posible mediante la producción de CME de células somáticas de embriones producidos por transferencia nuclear (ver más adelante), una estrategia a través de la cual se podría, en principio, obtener líneas de CME de individuos con susceptibilidad a una enfermedad definida. Puesto que tales embriones no se derivan de la unión de un espermatozoide con un oocito, y probablemente se diferencian de manera significativa de embriones normales (ej. en su capacidad de desarrollarse a término, y sus patrones de metilación global de ADN y la impronta genómica), los asuntos éticos relacionados con su producción pueden ser menos problemáticos que aquellos asociados al uso de embriones fertilizados normalmente. Sin embargo, muy probablemente estas CME derivadas de blastocistos normales continuarán siendo requeridas, debido a la gran cantidad de anomalías observadas en los animales derivados mediante clonación por transferencia nuclear (ver más adelante).

Otros han señalado las posibles dificultades éticas y filosóficas de separar las consideraciones sobre la derivación de las CME y su uso en la investigación (Annas *et al* 1999). Aunque podrían existir ciertas inconsistencias lógicas en tal estrategia, puede ser la manera más práctica hacia el futuro, particularmente debido a que solamente un modesto número adicional de embriones sean probablemente requeridos para resolver las necesidades de líneas de CME en la comunidad académica. Puesto que hay argumentos biológicos claros para trazar una distinción entre los embriones y las CME, como es discutido más adelante, es racional considerar los asuntos relacionados con la derivación y el uso de forma separada. Sin embargo, es importante comprender que si la derivación de las CME continúa dependiendo solamente del sector privado comercial, podrían existir restricciones inaceptables en el uso de las CME por la comunidad académica. Esto es particularmente importante en un ambiente donde la distinción entre investigación académica y comercial se está haciendo borrosa. No

resulta sincero sugerir que en el mundo de la investigación actual tal distinción pueda hacerse, ya que es cada vez más raro encontrar a trabajadores académicos sin afiliaciones comerciales en su investigación. No es de interés público tener investigación en CME confinada al sector comercial. Una política de financiamiento que limite la ayuda pública para utilizar, más no para derivar CME, engendraría riesgos con resultados indeseables.

### **Las células madre embrionarias no son embriones**

Las preocupaciones acerca de las células madre embrionarias también surgen de aquellos que piensan que estas líneas continuas son iguales a los embriones. No hay justificación científica para tal confusión. Es crítico reconocer la diferencia entre la pluripotencialidad, que es la capacidad de dar lugar a cualquier tipo de célula en el cuerpo, y la totipotencialidad, que es la capacidad de dar lugar a un nuevo individuo, si se diera el soporte materno apropiado. El cigoto, y todas las células de los embriones en estados de división temprana son totipotentes. Después de la compactación, y del primer evento de diferenciación celular en la formación del blastocisto, algunas células individuales del embrión pueden no alargarse y conservarse como totipotentes. Las CME, aún en el ratón, no son totipotentes. No hay ejemplo de una línea de CME en el ratón que de lugar a un nuevo individuo, excepto cuando son combinadas con otras células que sean la progenie reciente de un cigoto (Nagy *et al* 1993).

Las razones por las cuales las CME no pueden desarrollarse en un nuevo individuo por sí mismas son desconocidas, pero algunos nuevos conceptos del desarrollo de los mamíferos podrían dar luz sobre éste asunto. La falla de las CME del ratón para generar un embrión normal por sí mismas, a menudo se le atribuye a su incapacidad de formar el trofoectodermo. Se ha demostrado que las CME humanas pueden secretar *in vitro* la proteína trofoblástica conocida como gonadotropina coriónica humana (hCG) (Thomson *et al* 1998; Reubinoff *et al* 2000), y las líneas del carcinoma embrional humano (EC) son capaces de formar células sincitiales gigantes que producen esta hormona (Pera *et al* 1989). Entonces puede ser que haya una genuina diferencia de especie en la habilidad de las CME para dar lugar al trofoblasto, aunque en el caso de las CME humanas esta vía de diferenciación no ha sido documentada con claridad y se desconoce el grado en el que puede ocurrir; el ensayo de hCG es altamente

sensible y puede detectar unas pocas células con fenotipo trofoblástico en un cultivo.

Las limitaciones en el desarrollo de CME pueden estar relacionadas con otros factores además de la diferenciación del trofoblasto. La pregunta puede ser aclarada examinando la formación del teratoma y del cuerpo embrioide, siendo el último un fenómeno que ha conducido a cierta confusión en su interpretación. Los teratomas puede contener una amplia gama de tejidos, pero su crecimiento es esencialmente desorganizado, careciendo de orientación o de segmentación axial. Aunque puede haber un cierto grado de la organización histotípica, en esencia no hay evidencia de un rudimento planificado del cuerpo en tales estructuras. De igual manera ocurre en los cuerpos embrioides, estructuras formadas por CME de ratón cultivadas bajo condiciones no-adherentes. Estas estructuras consisten en una base interna de células pluripotentes rodeadas por una capa de endodermo extraembrionario, y pueden diferenciarse mucho más para formar una gama de tejido somático in vitro. El término cuerpo embrioide implica una relación estructural entre la entidad que se formó in vitro y el embrión, y realmente proviene de la asociación en el ratón de EC o células madres derivadas de cuerpos embrioides entre las capas del tejido extraembrionario pluripotente, un arreglo similar al que se ve en el embrión murino postimplantación. Sin embargo, como en el caso de teratomas, no hay evidencia de organización axial o de segmentación en estos cuerpos embrioides o en las estructuras derivadas de ellos in vitro, a pesar de que la aparición temporal de la expresión génica durante la diferenciación imita a las de cuerpos embrioides que se observan en el embrión in vivo. En una búsqueda en PubMed el 14 de mayo 2000 se encontraron 312 referencias acerca del cuerpo embrioide, casi todas en ratón, ninguna de las cuales parece tener evidencia de formación de un plan corporal en estas estructuras. Los informes de Thomson *et al* (1998) no demostraron la formación del cuerpo embrioide por las CME humanas o del macaco Rhesus. Gearhart y colegas (Shamblott *et al* 2001) reportaron la formación del cuerpo embrioide por células embrionarias humanas de la línea germinal (EG), pero el uso del término "cuerpo embrioide" fue corregido más tarde para indicar solamente un agregado de CME en diferenciación o, por ejemplo, células sin ninguna semejanza morfológica particular en cualquier etapa de la embriogénesis humana. La misma consideración se aplica a las CME humanas

derivadas de cuerpos embrioides reportados recientemente por Itskovitz-Eldor *et al* (2000), que contienen células diferenciadas pero que no muestran ninguna semejanza con los embriones humanos.

Curiosamente, el único ejemplo publicado de la formación del cuerpo embrioide que parecía proporcionar la evidencia para la formación del eje, fue descrito por Thomson *et al* (1996) en cultivos de CME del tití. Las estructuras observadas eran morfológicamente similares a un estado previo del disco embrionario del primate. Hay preguntas con respecto a la reproducibilidad de este hallazgo, y la identificación exacta de la estructura observada, pero si tales estructuras fueran observadas en los cultivos de CME humanas, habría razón justificada para preocuparse, puesto que tal entidad podría tener una semejanza muy cercana al embrión cerca del límite de 14 días para poder ser observadas in vitro.

En más de 15 años de observación continua de CME humanas, y tres años continuos de cultivo de CME del macaco Rhesus y del humano, nunca hemos observado las estructuras que se asemejan a los cuerpos embrioides del tití descritas por Thomson *et al* (1996), a cualquier otro estado de peri-implantación del desarrollo en el primate. En nuestra experiencia, las manipulaciones que inducen a las CME del ratón a formar los cuerpos embrioides, conducen a la muerte celular en cultivos de CME humanas. Aunque parece que las CME humanas pueden formar el trofoectodermo, no forman este tejido en la relación espacial con las células pluripotentes como se observa en el embrión peri-implantación.

Observaciones recientes en el embrión del ratón y del humano sugieren fuertemente que el oocito mamífero, similar al de la mayoría de los otros tipos de animales, contienen los determinantes citoplásmicos derivados de la madre que tienen la función de dar forma al plan corporal (Gardner 1999a, 1999b). La evidencia a favor y en contra del papel de las proteínas del oocito en la determinación del plan corporal mamífero sigue siendo polémica, ya que se ha conocido ampliamente que los embriones tempranos de los mamíferos pueden estar sujetos a mucha perturbación, mientras que conservan la capacidad para el desarrollo normal. Sin embargo, los datos recientes sugieren que esto es posible. Si los componentes citoplásmicos derivados de la madre desempeñan un papel en el establecimiento del plan corporal en los mamíferos,

tales transcriptos no se esperarían que persistan durante el cultivo prolongado de CME. Su ausencia explicaría la incapacidad de las CME para generar un plan corporal, y para el requisito de combinación con la progenie reciente del cigoto en el ratón para que las CME participen en el desarrollo normal. Cualquiera que sea la explicación, ni las CME del ratón ni de humano ni las CME del macaco, pueden experimentar la formación del eje en ellas mismas, y por lo tanto carecen del atributo clave de cualquier embrión animal.

### **¿Cómo deben ser consideradas las células madre embrionarias por las agencias reguladoras?**

La evidencia actual permite que consideremos a las CME humanas como células pluripotenciales cultivadas solamente. Como dijimos antes, los datos sobre la formación del teratoma o la diferenciación *in vitro*, no demuestran que las células humanas tengan un desarrollo equivalente a las CME del ratón, puesto que hay muchos tipos de células dentro de los tejidos en el embrión y en tejidos del adulto que no se han observado bajo estas circunstancias experimentales. Una posición extrema diría que las CME humanas son simplemente un equivalente diploide de las células EC humanas que se han estudiado por muchos años en el laboratorio. De hecho, en el ratón es difícil distinguir entre una CME y una célula EC con alta capacidad de diferenciación, excepto por el criterio de quimerismo en la línea germinal. Está lejos de aclararse que las células ES humanas, o las CME, tengan una contraparte exacta del embrión peri-implantatorio; y si la tuviesen, no está claro como sería esa analogía. Vale la pena mencionar que si las células equivalentes a las CME existen en el embrión, éstas persistirían sólo brevemente, y su crecimiento continuo *in vitro* implicaría, casi con certeza, que habrían experimentado un cierto grado de adaptación a la presión de crecimiento y al ambiente anormal que la induce. Realmente, aunque las CME y células EC de ratón, y las células EC humanas, todas expresan el factor Gdf-3, que es un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (Caricasole *et al* 1998), no hay una evidencia para la expresión de esta molécula en el embrión mamífero *in vivo* (Jones *et al* 1992). El Gdf-3 puede ser un ejemplo de un gen expresado en células pluripotenciales immortalizadas.

Sin embargo, al considerar las CME humanas, los progresos científicos recientes advierten contra la idea de concederles un status especial en el orden ético o

moral, simplemente sobre la base de su capacidad de diferenciarse en una amplia gama de tipos celulares. En el ratón, para que las CME se conviertan en un nuevo individuo, deben ser combinadas con un embrión hospedero y ser transferidas a una receptora. Es decir, éstos deben ser reintroducidos intencionalmente y deliberadamente en el ciclo reproductivo normal. La reproducción de los mamíferos a partir de una gama de células somáticas con transferencia nuclear, indica que la mayoría de las células corporales, tiene la capacidad de dar lugar a un bebé, si alguien emprende de forma deliberada, los pasos requeridos para reintroducir el material genético de esta célula en el ciclo reproductivo normal con el soporte del citoplasma de un oocito. Nadie sugeriría que las células de la piel tengan el mismo status moral que un niño o un adulto humano. A la luz de estos resultados y de otros datos que revelan la pluripotencialidad de las células somáticas o de núcleos de la célula somática bajo ciertas condiciones experimentales, la aproximación más directa es considerar las CME humanas como células pluripotentes cultivadas, extraídas permanentemente del ciclo vital reproductivo normal. Para asegurarse que los cultivos celulares lleguen a ser totalmente removidos del ciclo reproductivo, el acercamiento más simple sería prohibir la introducción de las CME en el útero de una mujer o de un animal, solas o en conjunto con el soporte de las células embrionarias, con el fin no ético de crear un clon o una quimera humana.

### **¿Necesitamos aún las células madre embrionarias dadas otras alternativas potenciales: tales como las gónadas fetales, células madre somáticas, transdiferenciación, y clonación terapéutica?**

Los que objetan la desagregación de embriones para la generación de las células del ES señalan ciertas alternativas que están actualmente disponibles o que puedan en el futuro reemplazar algunas de las funciones de las CME. Éstas alternativas son CME derivadas de gónadas fetales, CME derivadas de tejidos somáticos de adultos incluyendo las CME con la capacidad de transdiferenciación en nuevos linajes, y las CME derivadas de los embriones producidos por transferencia nuclear. Con respecto a las CME derivadas de gónadas fetales, es difícil ver en términos éticos la razón por la que el uso de tejido sobrante de fetos abortados en el primer trimestre represente una ruta más aceptable para generar líneas de CME, que el uso de un embrión sobrante derivado de un programa de fertilización *in vitro*. En fin, aunque las células ger-

minales embrionarias humanas pueden, al parecer, producir una variedad de derivados diferenciados, no está claro que puedan ser cultivadas indefinidamente o que puedan producir diferentes tipos de células de forma tan extensa como las CME. En el ratón, las diferencias en la impresión genómica entre las CME derivadas de blastocisto y las CME derivadas de las células germinales primordiales, se han mantenido para explicar una variedad de anomalías encontradas en los ratones quiméricos producidos de células EG (Tada *et al* 1998). Aunque la evidencia preliminar indica que los patrones de la impronta en las células EG humanas, se asemejan a los esperados de las células normales (J.D. Gearhart, comunicación personal), este tema requiere de exploración adicional.

Para algunos tipos de tejido, es totalmente cierto que existen poblaciones predestinadas de células tallo, las cuales se podrían utilizar para repoblar y reparar daños causados por lesión o enfermedad. La limitación para el uso de éstas células predestinadas o prediferenciadas incluye una falta de evidencia de éstas células tallo en muchos tejidos del adulto, limitaciones en la capacidad de ampliar estas poblaciones celulares, y la presencia de la patología en curso en las células tallo de pacientes afectados.

Hay evidencia reciente para sugerir que ciertos tipos de células tallo de tejido del adulto, incluyendo las CME neurales (Bjornson *et al* 1999) y las CME hematopoyéticas (Petersen *et al* 1999), pueden en ciertas circunstancias experimentar un proceso de transdiferenciación para producir células diferenciadas de una línea nueva y distinta. De hecho, un estudio reciente demostró que si las CME neurales fueran implantadas en un blastocisto de ratón, podrían contribuir a muchas líneas celulares en un embrión a mediados de la gestación (Clarke *et al* 2000). Si estos acontecimientos de la transdiferenciación fueran entendidos, sería posible producir una gama de tipos celulares deseados de las células tallo de tejido de adulto mejor que de estadios embrionarios intermedios.

Aunque estos resultados son fascinantes, y los opositores del uso de embriones en la investigación pueden citar estos datos para argumentar que el trabajo sobre las CME es innecesario, sin embargo, es muy importante reconocer las limitaciones de los resultados divulgados hasta el momento. Los eventos de la transdiferenciación observados, limitados actualmente al ratón, son eventos de baja frecuencia, las condiciones que les

dan lugar son enfermedades definidas, y en la mayoría de los casos no hay evidencia que las células diferenciadas sean normales y funcionales. Esto contrasta con el trabajo en CME del ratón donde se han descrito condiciones reproducibles para la diferenciación *in vitro* de una gama de células somáticas en poblaciones puras, y la generación exitosa de quimeras adultas luego de que la transferencia de CME en blastocisto demuestran la normalidad de las células diferenciadas. El ejemplo más contundente de transdiferenciación en mamíferos descrito hasta hoy, es el resultado obtenido del trasplante de CME neurales en blastocistos, donde el ambiente embrionario fue todavía necesario para inducir la aparición de una gama de tipos de células diferentes (Clarke *et al* 2000). Es posible que las células tallo neurales en este ensayo sufrieron la dediferenciación a un estado similar al de CME; un factor que muy probablemente acabaría con el entusiasmo de los que proponen este acercamiento como alternativa a las CME. La conclusión mayor es que el fenómeno de la transdiferenciación se conoce tan pobremente, que es imposible especular si este eventualmente suplantaría el uso de las CME.

La derivación de líneas de célula tallo de los embriones generados por la transferencia nuclear de células somáticas (clonación terapéutica) es prometedora para el campo de la medicina regeneradora y para su uso en investigación (Lanza *et al* 1999a). Tales CME producidas por clonación terapéutica tendrían la misma información genética (a excepción del ADN mitocondrial) del donante, y cuando estén diferenciadas en el tipo de célula requerida, se podrían trasplantar sin temor de que sean rechazadas. En el contexto experimental, la generación de líneas de CME por transferencia nuclear de pacientes con susceptibilidad conocida a una enfermedad, particularmente en los casos de rasgos multigénicamente determinados, podría permitir la producción de modelos útiles para la investigación de la patogénesis de la enfermedad y del desarrollo de terapias *in vitro*. Algunos han discutido que los embriones por transferencia nuclear, los cuales no son el producto de la fusión del espermatozoide con el oocito, deben ser distinguidos de los embriones derivados por la fertilización normal. Esto no es novedoso, puesto que la legislación en algunas jurisdicciones otorgan un status especial a los embriones partenogénicos. En términos biológicos, existe una diferencia entre los embriones de transferencia nuclear y los embriones normales, puesto que los primeros no alcanzan el desarrollo normal a término con la frecuencia con

que lo hace el embrión normal. Sin embargo, uno debe recordar que las actuales dificultades en el desarrollo de embriones por transferencia nuclear pueden relacionarse con las dificultades técnicas que pueden ser superadas en un futuro, ya que los embriones por transferencia nuclear son capaces, a veces, de experimentar un desarrollo normal, y que es imposible diferenciar el éxito potencial del fracaso en la etapa de blastocisto antes de la transferencia a una receptora.

En resumen, las investigaciones sobre CME, células EG, células tallo de tejido adulto, transdiferenciación, y la clonación terapéutica son complementarias y sinérgicas. Todas probablemente jugarán un papel en la medicina regeneradora y en la genómica funcional en la era postsecuenciación, y es prematuro y contraproducente discutir que una línea de investigación deba ser preferida con relación a otra.

#### **Asuntos relacionados con la clonación terapéutica**

Las CME ofrecen una fuente renovable de células y de tejidos para el uso en trasplantes. Sin embargo, muchas (mas no todas) las células derivadas de CME o de células EG probablemente expresarían los antígenos de histocompatibilidad del embrión o del feto de los cuales se originan, y por tanto se esperaría que induzcan una reacción inmunológica cuando se injerten a los pacientes. Las soluciones a este problema incluyen el establecimiento de grandes bancos de CME humanas que representen una amplia diversidad de antígenos de histocompatibilidad, de la manipulación genética de los antígenos codificados en los loci de histocompatibilidad en las CME, y de las aproximaciones convencionales a la inmunosupresión ya en uso en terapia de trasplante. Sin embargo, todas estas estrategias tienen limitaciones teóricas y prácticas. La clonación terapéutica, que prevee el uso de la clonación por transferencia nuclear de células somáticas para generar blastocistos secuencialmente, las CME y células diferenciadas requeridas, todas genéticamente idénticas al paciente, ofrecen una solución a las dificultades del suministro de tejido para trasplantes y del apareamiento para antígenos de histocompatibilidad. El concepto de clonación terapéutica se ha comprobado en principio en el ratón. La información, aunque limitada, demuestra que las CME derivadas de los blastocistos obtenidos por transferencia nuclear, creados por transferencia de las células del cumulus del ratón a oocitos enucleados puede contribuir a la generación de varios de los tejidos en crías quiméricas (Munsie *et al* 2000).

Las principales cuestiones científicas relevantes a la ética se relacionan con el suministro de los oocitos para tal procedimiento, con la equivalencia en términos biológicos entre embriones obtenidos por transferencia nuclear y los embriones derivados de la unión entre el espermatozoide y el oocito, y los riesgos de las diferencias bien documentadas en la frecuencia de anomalías en el desarrollo en embriones obtenidos por transferencia nuclear en animales, comparados con los embriones control fertilizados normalmente.

La obtención de un suministro adecuado de oocitos humanos para el uso en este procedimiento puede resultar problemático, incluso dados los avances en la metodología de la criopreservación de oocitos y el potencial para el almacenamiento de oocitos donados. Múltiples oocitos serían requeridos para cualquier procedimiento puesto que la formación del blastocisto por transferencia nuclear puede ser más baja que en los controles, por lo menos cinco blastocistos de alta calidad serían probablemente requeridos para generar las líneas de CTE, y la obtención de oocitos humanos sigue siendo un procedimiento difícil. Las alternativas incluyen el uso potencial de oocitos animales, o el uso de factores definidos del oocito, o mas aún, de factores derivados de otras células pluripotentes tales como CTE cultivadas o células EG, para reprogramar los núcleos somáticos. La última opción es obviamente una aproximación atractiva, que eliminaría cualquier problema ético, la única desventaja es que no hay en la actualidad evidencia científica que indique que tendría éxito.

Con respecto al uso de los oocitos animales, los embriones obtenidos por transferencia nuclear entre especies pueden desarrollarse hasta el estado de blastocisto (Dominko *et al* 1999). Sin embargo, los embriones obtenidos por transferencia nucleares entre especies invariablemente fueron incapaces de desarrollarse en las receptoras. Las razones para la falla en el desarrollo de los embriones obtenidos por transferencia nuclear entre especies son desconocidas pero; podrían incluir incompatibilidad entre la especie donadora y la receptora en muchos niveles, mas que una anomalía natural innata de las células embrionarias o de su progenie. Por tanto, existe la posibilidad de que los embriones obtenidos por transferencia nuclear entre especies puedan producir las CME que den lugar a derivados somáticos perfectamente normales, aunque ésta, se encuentra lejos de aclararse en la actualidad. Comunicaciones preliminares no confirmadas han indicado que células parecidas a ES pueden ser

derivadas de blastocistos formados por el trasplante del núcleo obtenido de células somáticas humanas en oocitos de vaca enucleados (Lanza *et al* 1999b). Es evidente que embriones derivados con esta técnica portarían el genoma mitocondrial del oocito huésped y esto por sí solo podría dar lugar a muchos problemas imprevistos.

He discutido la relación entre los embriones obtenidos por transferencia nuclear y los embriones derivados de procedimientos normales de fertilización. Una diferencia clave es la alta frecuencia con que los primeros fallan para lograr un desarrollo normal a término. La consideración de los datos disponibles indican varias tendencias. Aunque la proporción de fallas y la producción de descendiente anormales son muy variables, la indicación general es que los embriones obtenidos por transferencia nuclear si dan lugar a crías normales en una frecuencia más baja que los embriones derivados de la unión del espermatozoide y del oocito. Las razones para esta falla siguen siendo oscuras. Algunos han señalado que las anomalías del desarrollo observadas en embriones obtenidos por transferencia nuclear son consistentes con las fallas o anomalías en el desarrollo placentario, y si esto fuese correcto, podría sugerirse que, a pesar de los problemas para el desarrollo a término, los embriones obtenidos por transferencia nuclear podrían producir CME que conduzcan a derivados somáticos normales *in vitro*. Sin embargo, no es posible concluir en esta etapa que las dificultades en el desarrollo de los embriones ob-

tenidos por transferencia nuclear puedan ser atribuibles solamente a la falla en la placentación. En resumen, hay muchas preguntas con respecto al desarrollo de los embriones obtenidos por transferencia nuclear de la que necesitarán ser tratados antes de que la clonación terapéutica pueda ser llevada a evaluación clínica.

### Conclusiones

La investigación en las CME humanas ofrece gran potencial en la investigación biomédicas y en la terapéutica. Las ventajas del uso de un número modesto de embriones sobrantes de generar el número requerido de las líneas CME para esta investigación proporcionan la justificación fuerte para proceder; donde consienten los donantes, tal uso es preferible en términos morales al descarte de los embriones. No hay justificación científica para comparar la investigación sobre las CME con la investigación en embriones. La investigación sobre las células germinales embrionarias, las células del adulto, la transdeterminación, y la clonación terapéutica son complementarias a la investigación en las CME, y desde un punto de vista científico es prematuro y contraproducente sugerir que alguna de estas alternativas deba ser preferida con relación a otra. La clonación terapéutica es potencialmente una herramienta muy poderosa en la investigación y la medicina regeneradora, pero la comparación cuidadosa de las propiedades de las CME derivadas de embriones normales con las derivadas de embriones obtenidos por transferencia nuclear es necesaria para evaluar la seguridad de esta estrategia.

### Agradecimientos

A los Doctores Jorge Ossa L y Gabriel Sánchez-Partida por su asesoría en la traducción.

### *Scientific considerations relating to the ethics of the use of human embryonic stem cells in research and medicine*

*Martin F. Pera<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Monash Institute of Reproduction and Development, Monash University, 246 Clayton Road, Clayton, Victoria 3168, Australia. email: martin.pera@med.monash.edu.au

### *Abstract*

*The recent development of embryonic stem (ES) cells from human blastocysts has the potential to revolutionize many of our approaches to human biology and medicine. Continued objection to the use of human ES cells on ethical grounds may inhibit progress or defer this opportunity indefinitely. It is essential that the ethical discussion proceed on a sound scientific basis. The ethical controversy*

*surrounding human ES cells concerns their origin from human blastocysts and the perception of their developmental potential. It is likely that the worldwide requirement for human ES cells will be met by the development of a small number of cell lines, as has been the case in the mouse; current rates of success for human ES cell establishment suggest that only a modest number of embryos will be required to achieve this goal. It is in the public interest that human ES cell lines be derived under circumstances that will enable their widespread distribution with minimum encumbrances to academic researchers throughout the world. In considering the developmental potential of ES cells, an important distinction exists between pluripotentiality, or the ability to develop into a wide range of somatic and extraembryonic tissues, and totipotentiality, the ability of a cell or collection of cells to give rise to a new individual given adequate maternal support. There is no evidence that ES cells from any species can give rise to a new individual except when combined with cells which are the immediate progeny of a zygote. These developmental limitations of ES cells appear to relate to their inability to undergo axis formation and to generate the body plan. Alternatives to blastocyst-derived ES cells include embryonic germ cells, adult tissue stem cells, transdetermination of committed somatic cells, and therapeutic cloning. These research areas are complimentary and synergistic to ES cell research and it is premature and counterproductive to suggest that one avenue should be pursued in preference to another. The combination of cloning and ES cell technology has the potential to address many important issues in transplantation medicine and research, but a better understanding of the reprogramming of somatic cells is required before we can regard ES cells derived from normal and nuclear transfer blastocysts as equivalent.*

## Referencias

- Annas, G. J., Caplan, A., and Elias, S. (1999). Stem cell politics, ethics and medical progress. *Nat. Med.* 5, 1339-41.
- Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C., and Vescovi, A. L. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 534-7.
- Caricasole, A. A., van Schaik, R. H., Zeinstra, L. M., Wierikx, C. D., van Gurp, R. J., van den Pol, M., Looijenga, L. H., Oosterhuis, J. W., Pera, M. F., Ward, A., de Bruijn, D., Kramer, P., de Jong, F. H., and van den Eijnden-van Raaij, A. J. (1998). Human growth-differentiation factor 3 (hGDF3): developmental regulation in human teratocarcinoma cell lines and expression in primary testicular germ cell tumours. *Oncogene* 16, 95-103.
- 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.
- Department of Health (2000). 'Stem Cell Research: Medical Progress with Responsibility'. (UK Department of Health: London.)
- Department of Health and Social Security (1984). 'Report of the Committee of Inquiry into Human Fertilisation and Embryology'. (Her Majesty's Stationery Office: London.)
- Dominko, T., Mitalipova, M., Haley, B., Beyhan, Z., Memili, E., McKusick, B., and First, N. L. (1999). Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.* 60, 1496-502.
- Gardner, R. L. (1999a). Polarity in early mammalian development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 417-21.
- Gardner, R. L. (1999b). Scrambled or bisected mouse eggs and the basis of patterning in mammals. *Bioessays* 21, 271-4.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., and Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 6, 88-95.
- Jones, C. M., Simon-Chazottes, D., Guenet, J. L., and Hogan, B. L. (1992). Isolation of Vgr-2, a novel member of the transforming growth factor-beta-related gene family. *Mol. Endocrinol.* 6, 1961-8.
- Lanza, R. P., Cibelli, J. B., and West, M. D. (1999a). Human therapeutic cloning. *Nat. Med.* 5, 975-7.
- Lanza, R. P., Cibelli, J. B., and West, M. D. (1999b). Prospects for the use of nuclear transfer in human transplantation. *Nat. Biotechnol.* 17, 1171-4.

- Munsie, M. J., Michalska, A. E., O'Brien, C. M., Trounson, A. O., Pera, M. F., and Mountford, P. S. (2000). Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr. Biol.* 10, 989-92.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 8424-8.
- National Institutes of Health (2000). 'National Institutes of Health Guidelines for Research Using Human Pluripotent Stem Cells'. <http://eosl3.cit.nih.gov/news/stemcell/stemcellguidelines.htm> (21 November 2000).
- Pera, M. F., Cooper, S., Mills, J., and Parrington, J. M. (1989). Isolation and characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma cells. *Differentiation* 42, 10-23.
- Pera, M. F., Reubinoff, B., and Trounson, A. (2000). Human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* 113, 5-10.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S., and Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-70.
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 18, 399-404.
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., and Gearhart, J. D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 13726-31.
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Littlefield, J. W., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., Cui, Y., Cheng, L., and Gearhart, J. D. (2001). Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 113-8.
- Tada, T., Tada, M., Hilton, K., Barton, S. C., Sado, T., Takagi, N., and Surani, M. A. (1998). Epigenotype switching of imprintable loci in embryonic germ cells. *Dev. Genes Evol.* 207, 551-61.
- Thomson, J. A., and Odorico J. S. (2000). Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends Biotechnol.* 18, 53-7.
- Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., and Hearn, J. P. (1996). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol. Reprod.* 55, 254-9.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-7.