

EL CULTIU DE TEIXITS COM A FORMACIÓ DE NOUS ORGANISMES

ANTONI CASTELLS i RODELLAS

Hospital Clínic Universitari. Catedràtic de Dermatologia de la Universitat de València

Remy Chauvin en el seu llibre *La biologie de l'esprit* ens diu que el metge és un bon coneixedor de la fisiologia i més encara de la patologia, però ignora totalment el món animal i l'evolució, ja que hi ha un interès molt limitat malgrat que la seva cultura bàsica sigui de llarg suficient per a informar-se'n. Això és ben bé realitat i l'única justificació es troba en el nombre i en la importància dels avenços de la dita ciència bàsica, que ocasionen un allau d'informació. Per dir-ho d'alguna manera, tracto de justificar la seva desinformació fent palesa la conveniència de contractar, com ara estem fent, amb persones que viuen de prop els problemes que una investigació biològica va plantejant, i d'ací la necessitat de mantenir i augmentar aquestes trobades.

Odón de Buén defineix la vida com «el resultat d'actes i fenòmens lligats uns als altres que tenen com a base la dinàmica mineral i que fan referència a la vida cel·lular, individual, específica i social». Young en *An introduction to the study of Man* ens diu que «un sol enzim no pot considerar-se un ésser viu; com a tal només ho seran quan es reuneixin de manera integrada en una unitat de funció totes aquelles parts necessàries per a la vida, és a dir quan provenint de fora s'integren en reaccions homeostàtiques i proveïdes de mecanismes de defensa i de reparació de parts o de tot l'individu, capaç d'autoreplicar-se i destinat a morir». Això implica la complexitat d'un ésser viu i la capacitat que el fa disposar d'un marge molt ample de seguretat, en el sentit que davant de les variacions que el medi que l'envolta pugui sofrir, aquell disposa, no d'un sol mecanisme d'adaptació, sinó de nombroses respostes per poder sobreviure, només, com diu Remy Chauvin *L'étroitesse de l'adaptation, c'est la mort*.

Un fet inherent a la vida és l'evolució, entenent com a tal els canvis morfològics, estructurals, i definitius que progressivament van sofrint alguns dels éssers vius i que vénen condicionats per mutacions en el seu codi genètic. Dues teories evolucionistes han arribat fins avui, la de Lamarck i la de Darwin. El primer admet que és la funció la que crea l'òrgan, i que fa responsable l'organisme dels canvis evolutius; per al segon serien els canvis en el medi ambient els que determinarien l'aparició o la modificació de qualsevol òrgan, sobrevivint el més apte, però Waddington ens diu que el més apte no és el més fort, sinó que és aquell que té la descendència més nombrosa: solament éssers vius que es reproduïen més són els que sobreviuran i podran evolucionar.

Un ésser viu ve caracteritzat per un bon nombre de qualitats: així sabem que ha d'ésser format per unes unitats bàsiques que es troben programades pel DNA, que és el codi que determina l'especificitat i la personalitat de cadascun d'ells. Són capaços d'assimilar elements externs i convertir-los en substància pròpia. Es reproduïxen i donen individus semblants als pares i susceptibles de canviar modificant-se.

En el DNA es troba contingut tot el codi d'un ésser, i aquest programa es desenvoluparà completament en una sola cèl·lula, com és el cas dels organismes unicel·lulars, o bé ho farà a partir d'una cèl·lula totipotent, com succeeix en els organismes pluricel·lulars. L'energia la capten del medi exterior i gairebé no l'alliberen, cosa que fa que, essent uns sistemes oberts, no s'hi compleixi la segona llei de la termodinàmica; la seva entropia no augmenta, per la qual cosa van al revés que l'univers, que és un sistema tancat on el desordre va en augment. La reproducció origina éssers semblants als pares i aquí, segons Albert Jacquard, cal establir la diferència entre divisió i procreació: en la primera, d'un sol individu en surten dos, i en la segona entre dos en fan un.

En un cultiu d'un teixit qualsevol, es parteix d'un nombre limitat de cèl·lules que per divisió aniran augmentant el seu nombre, servant les seves característiques inicials. És possible, doncs, d'obtenir individus complets a partir d'un cultiu de cèl·lules?. Abans de contestar aqueixa pregunta cal establir unes diferències entre allò que hom entén per un conglomerat de cèl·lules i un organisme (farem referència a cèl·lules eucariotes puix que solament elles formen veritables teixits).

En la natura hi ha cèl·lules i organismes, i aquests poden ésser unicel·lulars o pluricel·lulars: les cèl·lules poden trobar-se aïllades o bé agregades, però, quan considerem que una cèl·lula o un conjunt d'elles és un organisme?. Al meu entendre un organisme és aquell ésser viu que disposa de:

- Un nivell de complexitat alt, enfront dels elements cel·lulars que el componen considerats isoladament
- Autonomia en el sentit expressat per P. Vendryès: que ell mateix condiciona, dintre d'uns límits, les relacions envers el medi extern, capaç de trencar les relacions deterministes amb l'exterior i poder controlar, mitjançant mecanismes reguladors, l'ús de les reserves.
- És capaç de defensar-se desenvolupant mitjans o bé químics, com en les plantes i també en els animals, o bé de captació de partícules, com en els organismes unicel·lulars i en les reaccions d'immunitat tardana, les quals vindrien a representar l'aspecte més evolucionat de la funció de nodriment dels protozoos.
- Solament els organismes són capaços d'evolucionar.
- Els agregats cel·lulars manquen d'un programa d'inducció que integri tot el conjunt amb un determinisme preconcebut, i hi manca també que cada cèl·lula estigui al servei de les restants.

Una agregació cel·lular és un conjunt de cèl·lules que es troben reunides, però els manca el sentit i el comportament d'estar cadascuna d'elles al servei de les restants: hom havia cregut que els mesozous podrien tractar-se d'un conglomerat de protozoos, però avui en dia són considerats per uns com animals molt primitius i per altres com animals que, a causa del seu parasitisme, s'han quedat reduïts a unes quantes cèl·lules, que tanmateix formen totes una unitat i fins i tot amb especialització. Algunes esponges es poden disso-

ciar i les seves cèl·lules, quan tornen a posar-se en contacte, s'ordenen i tornen a reconstruir l'animal. Això és possible gràcies a l'alliberament d'un factor d'agregació que en presència d'ions de Ca^{++} les uneix. Entre els fongs s'ha comprovat en el *Dictyostelium discoideum* que la formació d'espores té lloc quan el nodriment es ressenteix, però abans passa per una etapa en què és talment un conglomerat cel·lular gràcies a l'alliberament extracel·lular del 3,5 cAMP. Tots sabem que l'ou fecundat en les primeres etapes de la seva evolució és aparentment un agregat de cèl·lules però que segueix un pla prèviament establert en el qual aquelles van diferenciant-se per formar els teixits, òrgans i altres substàncies de l'organisme.

Això condueix a comprovar que hi ha diferents qualitats de cèl·lules amb referència al seu grau de determinació i diferenciació. Diem que una cèl·lula és *totipotent* quan és capaç per ella mateixa d'originar un individu complet: aquest és el cas de l'ou fecundat. Una cèl·lula és *pluripotent* quan d'ella s'originen tots els elements que constitueixen un òrgan o un sistema, com passa en els glòbuls blancs de la sang. Parlem de cèl·lula *unipotent* quan donarà lloc a un sol tipus de cèl·lules. Recentment Potten ha definit clarament el concepte de *stem cell* o *cèl·lula mare* com aquella que és capaç d'autoreplicar-se: així es dona en l'epidermis i en l'epiteli del budell. Si seguim aquesta escala veurem com des de la cèl·lula totipotent comença un procés de diferenciació que fineix amb les cèl·lules que componen els teixits i els òrgans d'un individu.

Cada cèl·lula eucariota té tota la dotació completa dels gens, però no tots s'expressen a l'ensem: d'aquests uns són completament imprescindibles, i es troben constantment activats, puix que d'ells depenen la formació de les membranes, ribosomes i alguns enzims que es troben presents constantment en qualsevol cèl·lula eucariota, els altres tot i estar continguts en el DNA, no es manifesten, solament l'ou fecundat és capaç d'expressar-los completament, per més que sigui d'una manera seqüencial. Així doncs, la formació d'un organisme pluricel·lular segueix un pla que es desenvolupa en dues fases:

—*Determinació*, que té com a finalitat cobrir els primers estadis embrionaris seguint directrius generals i definides en cada tipus d'organisme.

—*Diferenciació*, adreçada a la formació dels teixits, òrgans i sistemes del nou organisme així com a controlar el volum i la forma de cadascun d'ells i adaptar-los a la grandària del cos.

Durant la fase de la determinació, en la qual l'ou conserva la totipotència, bé que progresivament vagi perdent-la, i d'una manera especial en la gastrulació, hi ha diversos moviments cel·lulars la causa dels quals encara no s'ha arribat a aclarir completament, però se sospita que tant les superfícies cel·lulars com el citosquelet tenen un paper molt destacat en la seva producció. Així podem veure com hi ha fenòmens de:

—Adhesió diferencial de cèl·lules mitjançant proteïnes que afavoreixen la fixació; tal és el cas de les *cell adhesion molecules* (CAM).

—Elongació diferencial d'algunes cèl·lules específiques.

—Moviments de plans cel·lulars ocasionats per diverses proteïnes contràctils.

La diferenciació, al revés de la determinació, té com a característica més important la seva estabilitat, és a dir, que una cèl·lula, quan ha entrat en aquesta fase, donarà lloc

durant una sèrie de generacions a altres cèl·lules, cada vegada més madures, fins arribar a produir-ne d'altres, totes elles iguals; això no vol pas dir que una cèl·lula per arribar al seu estat més diferenciats hagi de passar cada vegada per tota aquesta sèrie de canvis i de generacions. Al mateix temps començarà la síntesi de proteïnes específiques que solament té lloc quan la cèl·lula ha emprès definitivament el camí de la diferenciació.

Una pregunta que es fan els biòlegs, i encara la resposta no és definitiva, és si els gens de la determinació són els mateixos que els de la diferenciació. Sembla ésser que tant en una fase com en l'altra intervenen diferents mecanismes de regulació de l'expressió gènica que possiblement facin entrar en joc d'una manera seqüencial els diferents gens, gràcies a l'actuació sobre el DNA, i entre els quals podem assenyalar:

- Formació d'heterocromatina condensada que augmenta la seva estabilitat i que podria incloure els gens inactius.
- Metilació del DNA; s'ha demostrat que els gens inactius es troben més metilats.
- Síntesi de proteïnes reguladores que modifiquin la transcripció del DNA.
- Amplificació gènica, en el sentit que alguns gens es repliquen més que els altres i això fa que puguin expressar-se millor.
- Reordenaments del DNA amb transposició dels gens des d'un lloc silent fins a un altre d'expressiu.
- Altres, com el contingut del propi citoplasma de la cèl·lula i els contactes intercel·lulars, poden ocasionar un canvi tant en el comportament com en la maduració de les cèl·lules. Possiblement, i durant la determinació, siguin aquests mecanismes els que controlen les divisions cel·lulars.

El que no sembla probable és que hi hagi una deleció de gens. En l'experiència efectuada per Gurdon, els ous de granota privats de nucli als quals s'injecta un nucli procedent d'un teixit diferenciats arriben a formar nous individus, i també el fet de que a partir de cèl·lules meristemàtiques, en determinades ocasions poden reconstituir tota la planta completa, la qual cosa bé a dir que qualsevol cèl·lula en tant conservi intacte el seu nucli pot esdevenir totipotencial.

Però a nosaltres el que ens interessa és si a partir d'un cultiu d'un teixit o d'un òrgan podem arribar a obtenir un nou organisme. D'antuvi hem d'assenyalar que partim sempre de cèl·lules diferenciades, per això el seu comportament està ja determinat. Aquestes cèl·lules han sofert ja les modificacions en els seus gens que les incapaciten per a actuar com a totipotents. Per tant necessitaran, per dur a terme les seves funcions, un estimul extern de naturalesa química que gràcies a receptors adients marcarà en tot moment el seu comportament, en l'aspecte de la multiplicació, en la formació de proteïnes estructurals, i, en definitiva, de la seva diferenciació.

El cultiu de cèl·lules eucariotes és un procediment que permet realitzar tot un món d'estudis i gràcies als avenços científics es poden cultivar un bon nombre de cèl·lules que poden arribar a formar teixits i fins i tot rudiments d'òrgans.

Entenem per cultius de teixits, segons Murrell, aquells treballs en què les cèl·lules, els teixits i àdhuc els òrgans de plantes o d'animals es mantenen en un estat viable fora del donador durant períodes de 24 hores o més. Per regla general els cultius d'òrgans acostu-

men a tenir una durada curta, els tissulars poden ésser cultivats durant un temps mitjà i els cel·lulars, si la cèl·lula ha sofert una transformació, poden ésser pràcticament immortals. L'objecte dels cultius és molt variat: tant poden emprar-se per a estudis de diferenciació, de genètica, de metabolisme, de farmacologia, de toxicitat, de manteniment d'òrgans o de teixits, de transformació, com per a obtenir una gran quantitat de cèl·lules viables.

Hem de convenir que una gran majoria de les cèl·lules i teixits animals, i alguns vegetals, poden ésser cultivats. Les cèl·lules que procedeixen d'un òrgan o d'un teixit normal permeten obtenir una quantitat de subcultius que varia entre 3 i 8; després, les cèl·lules envelleixen i acaben morint-se. Però aquelles que procedeixen d'una neoplàsia maligna poden continuar reproduint-se en cultiu gairebé indefinidament: és l'anomenada línia cel·lular continua. En alguns casos pot ésser del nostre interès conèixer l'origen d'una línia cel·lular i això es pot fer mitjançant l'aplicació de diversos marcadors, però el que ja no és tan fàcil és poder saber la posició que les cèl·lules cultivades ocupen dintre els diferents nivells de diferenciació del teixit, atès que les cèl·lules molt diferenciades quasi no es divideixen i per tant allò que es cultiva són, més aviat, elements no del tot diferenciats, és a dir, que es tracta de precursors. Això és fàcil de comprovar en els cultius d'epidermis, en què solament proliferen algunes d'aquelles cèl·lules que en el teixit normal constitueixen la capa basal. Per altra banda els cultius d'òrgans ofereixen una sèrie de dificultats, algunes d'elles encara no superades; així és fàcil poder observar que l'òrgan acostuma a necrosar-se en el centre, cosa que ocasiona una inviabilitat a partir de les 24-48 hores de la seva extracció, i a més sempre hi ha un tipus cel·lular que prolifera més de pressa que la resta, i que acaba per a envair el cultiu.

Hi ha dos tipus principals de cultiu, els primaris i els secundaris, també anomenats subcultius.

Cultius primaris: són aquells en què els elements a cultivar són presos directament del donador i introduïts en el medi de cultiu. La procedència de les cèl·lules pot ésser d'un embrió o d'un adult, d'un teixit normal o d'un teixit neoplàstic. Les cèl·lules embrionàries tenen una viabilitat i capacitat de divisió més gran que les obtingudes a partir d'un animal adult normal i molta més, encara, les que procedeixen d'un tumor maligne. No obstant això, cal tenir en compte que en un cultiu primari no totes les cèl·lules d'un teixit conserven la mateixa facilitat per dividir-se, i només la mantenen una proporció entre un 10% i un 40% de totes elles.

Els cultius primaris poden ésser organotípics o explants, molt indicats quan es disposa de poca qualitat de material, o bé de cèl·lules en suspensió, en què el teixit és dissociat mecànicament bé per mitjà d'enzims com la tripsina, l'EDTA o la pronasa.

Cultius secundaris o subcultius: són aquells obtinguts a partir de cèl·lules procedents d'un cultiu primari o secundari. La importància que tenen és perquè en els teixits de natura epitelial la major part de les cèl·lules que formen colònies en el cultiu primari, una vegada subcultivades, mantenen la capacitat de divisió, amb la qual cosa el nombre de cèl·lules que poden dividir-se ve a ésser de l'ordre d'entre 50% i 80%; així passa ràpidament a ésser un cultiu confluent.

Totes les cèl·lules que entren en cultiu han d'adherir-se al substrat; algunes ho fan directament sobre el vidre o el plàstic però l'epidermis i altres teixits epitelials necessiten una *feeder layer* viva, com els fibroblasts, o inerta, com el col·lagen, fibronectina, plasma coagulat, agar, etc.

El tercer element important són els medis de cultiu, que actualment trobem en gran part comercialitzats. Però si no hi afegim estimulants per al creixement, aquest seria molt lent. Aquests factors de creixement són unes molècules que en contactar amb el seu receptor adequat estimulen la divisió cel·lular i en l'epidermis de mamífers sembla ésser que al mateix temps que augmenten el nombre de mitosis orienten envers la diferenciació. De factors de creixement n'hi ha de molts tipus més o menys específics per a cada cèl·lula d'un teixit i gairebé, de segur, molts més encara desconeguts però que formen part del sèrum d'animals, que per aquesta raó s'ha d'afegir com un element gairebé imprescindible. També, en el viu, hi ha pèptids capaços d'inhibir el creixement cel·lular i que possiblement es trobin en el sèrum. A més d'aquests factors hi ha d'altres substàncies que modulen el metabolisme cel·lular i, encara que sigui a través d'una via indirecta, poden afectar llur divisió, com és el cas de la toxina colèrica, la insulina, la transferrina, la hidro cortisona i d'altres. Però tots aquests factors el que no aconsegueixen és provocar una regressió cap a un estat embrionari de la cèl·lula, la qual cosa suposaria convertir la cèl·lula diferenciada en una altra quasi totipotent. Només en cultiu una cèl·lula neoplàstica és capaç d'autoreplicar-se sense l'estímul exterior, i això és a causa dels canvis que s'han donat en els seus gens: uns quants d'ells, els oncogens cel·lulars, s'han activat, o bé han estat modificats per la introducció de parts de DNA que des de l'exterior han estat incorporats en el seu genoma. I aquesta cèl·lula ha estat transformada de tal manera que ella mateixa sintetitza els seus propis factors de creixement i els receptors adients. Recentment es parla de si aquesta hiperproliferació desordenada és ocasionada per la manca de factors inhibidors i així se sap que el TGF- β induïx els fibroblasts a la divisió cel·lular; en canvi, en la resta de cèl·lules actua com un inhibidor. De tota manera en el laboratori és més fàcil poder detectar els oncogens que no pas els gens que controlen la síntesi d'aquests pèptids. En les plantes també és possible obtenir la formació d'un nou individu quan es cultiven cèl·lules prou diferenciades en medis adients que contenen fitohormones.

Per això voler comparar el que succeeix en el viu amb el que s'observa en el laboratori és molt arriscat. En el viu hi ha molts factors que influeixen en el desenvolupament d'un teixit o òrgan: només cal tenir en compte la importància dels contactes cel·lulars, la influència del mesoderm sobre els epitelis, la gran munió de molècules, algunes encara desconegudes per bé que se sospita la seva existència, amb activitats biològiques evidents i que continuen essent encara un misteri.

Un aspecte prou important és la immortalitat de les cèl·lules mantingudes en cultiu. Un treball de recull històric que va publicar Witkowski ens diu que la creença d'Alexis Carrel en la immortalitat de les cèl·lules cultivades no és veritat, que només poden viure indefinidament aquelles que s'han transformat i cita els treballs de Hayflick y Moorhead que demostraren que les cèl·lules cultivades envelleixen i acaben morint-se. En el món dels procariotes i també entre els eucariotes hi ha canvis en el DNA que permeten perllongar indefinidament la vida. Els mecanismes pels quals això és possible són:

- Conjugació: dos bacteris s'uneixen formant un pont pel qual un d'ells emet un fragment de DNA que s'incorpora en l'altre.
- Transducció: mitjançant aquest procediment un bacteriòfag capta d'un bacteri un tros de DNA, l'incorpora al seu genoma i tot seguit infecta un altre bacteri alliberant el DNA que entra a formar part de la dotació d'aquest últim.

—Transformació: ve a ésser la incorporació a un bacteri d'un DNA genèticament diferent i que li conferirà propietats distintes. En els llevats es poden incorporar fragments de DNA que siguin de la mateixa espècie, però de distinta varietat.

—Fusió: la fusió de dues cèl·lules amb la mateixa dotació genètica és factible i ocorre espontàniament en el món animal. Aquest és el cas de les cèl·lules sincitials i de les gegants, d'alguns protozous, etc. Si les cèl·lules que es fusionen són d'espècies diferents, els nuclis poden quedar separats i així tindrem els *heterocarionts*, o bé si s'adjunten els cromosomes de les dues cèl·lules sota un únic nucli, donen lloc al que en diem *hibridoma*. Aquesta fusió es pot aconseguir gràcies a l'ajut d'un virus en l'embolcall del qual hi hagi lipoproteïnes, o bé amb el polietilenglicol, que permet una fusió de les membranes. En un hibridoma de cèl·lules de ratolí amb cèl·lules humanes, que creix en un medi de cultiu apte per a les cèl·lules de ratolí, s'observa que els cromosomes humans van desapareixent progresivament i només persisteixen aquells cromosomes que contenen els gens que codifiquen proteïnes o enzims necessaris per al creixement i que manquen en les cèl·lules de l'animal.

Però arribem ja al final i la pregunta subsisteix, és possible obtenir nous organismes en el laboratori mitjançant el cultiu de teixits?

Hem vist que el codi genètic marca el comportament cel·lular, i que és altament específic per a cada ésser viu. Una modificació qualsevulla en els gens alterarà la dinàmica cel·lular i transformarà la cèl·lula i per bé que aquesta es divideix activament no podrà arribar, almenys per ara, a donar un nou organisme, ja que li manca un pla d'organització en quant a divisions i síntesi progressiva i ordenada dels diversos enzims i substàncies pròpies de cadascuna de les cèl·lules d'un ésser viu, perquè, en aquest cas, solament uns quants gens mantenen la repressió, mentre que resten actius tots aquells que obliguen la cèl·lula a proliferar. Només en cas de poder convertir les cèl·lules d'un teixit en totipotents podríem obtenir nous organismes i això, al meu entendre, fóra possible sempre i quan s'aconguís un equilibri entre la dotació dels gens, l'activitat o repressió d'aquests, la síntesi de factors d'estimulació i d'inhibició, de tal manera que, tant en els heterocarions com en els hibridomes, el conjunt total dels gens hauria d'anul·lar-se o potenciar-se d'una manera harmònica de tal forma que fos un ésser complet, amb tots els òrgans i teixits d'acord amb el codi genètic contingut en els cromosomes i que a més reunís les propietats que més amunt hem assenyalat com definitòries d'un organisme. El dia en que s'arribi a poder convertir una cèl·lula diferenciada en totipotent i això s'acompanyi d'un coneixement més aprofundit dels gens que intervenen en la determinació i en la diferenciació, juntament amb els mecanismes que els controlen, i aquests puguin ésser modificats a voluntat, haurem arribat al domini de l'obtenció de nous organismes *in vitro* a partir de cultius de cèl·lules diferenciades. Una cèl·lula neoplàstica no arriba mai a formar un organisme, no passa d'ésser un conglomerat cel·lular, ja que al cap i a la fi s'estableix un conflicte entre la dotació genètica, capaç d'expressar qualsevol qualitat de l'ésser d'on procedeix aquesta cèl·lula transformada, i que mai pot arribar a fer-ho en tota la seva amplitud i amb la seqüència adient; per més que es divideixi sense parar i per més que sigui indiferenciada, li manquen els mecanismes de regulació harmònica de la determinació i de la diferenciació.

És que un ésser viu no és res més que una espiral de DNA embolcallada per molècules i molècules?. Amb aquesta pregunta que resta en l'aire acabo la meua intervenció. Moltes gràcies.