

Actualidad en terapia regenerativa: Células madre embrionarias y pluripotenciales inducidas, factor de crecimiento angiogénico y terapia génica

Current regenerative therapy: Induced embryonic and pluripotent stem cells, angiogenic growth factor and gene therapy

Dr. José R. Hidalgo Díaz^{1✉}, Dr. Juan C. Chachques² y Dr. Ángel Paredes Cordero³

¹ Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, Cuba, y Hospital Militar Dr. Alejandro Dávila Bolaños, Managua, Nicaragua. Asociación Internacional de Bioasistencia Cardíaca. París, Francia.

² Universidad *Pierre et Marie Curie* y Hospital Europeo Georges-Pompidou. París, Francia.

³ Servicio de Cirugía Cardiovascular. Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. La Habana, Cuba.

Full English text of this article is also available

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Recibido: 21 de diciembre de 2018

Aceptado: 31 de enero de 2019

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses

Abreviaturas

CM: células madre

iPS: *induced pluripotent stem cells*

Palabras clave: Células madre, Enfermedades cardiovasculares, Terapéutica
Keywords: *Stem cells, Cardiovascular diseases, Therapeutics*

El último descubrimiento de la Medicina Regenerativa no hay dudas que son las células madre *iPS* (*Induced Pluripotent Stem cells*), también llamadas células madre (CM) adultas reprogramables, «células de la tercera vía» o CM de pluripotencia inducida (**Figura 1**)¹. Eso les valió al británico John Gurdon y al japonés Shinya Yamanaka, de la Universidad de Kioto en Japón, el premio Nobel de Medicina por sus investigaciones sobre CM^{1,2}.

Gurdon logró reprogramar células de una rana adulta. El núcleo fue extraído de un huevo de una rana viva y fue reemplazado por una célula de renacuajo. Dicho huevo modificado se convirtió en un renacuajo normal. No hay dudas de que reprogramó una célula². Por su parte, Yamanaka fue más lejos y descubrió que las células adultas podían ser reprogramadas para crear células polivalentes, o sea, pluripotentes como las CM embrionarias. Utilizó cuatro genes de un embrión de ratón y los transfirió a células extraídas de la piel de otro ratón, una vez reprogramadas estas se convirtieron en células «polivalentes» que podían

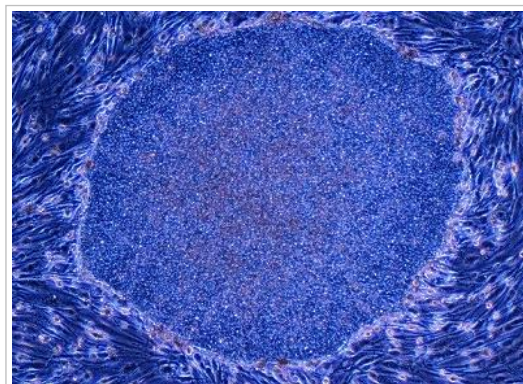


Figura 1. Célula adulta reprogramada (iPS) con función polivalente. Tomada de: Hidalgo Díaz, *ContraPunto*, 2019¹.

✉ JR Hidalgo Díaz
Del Complejo Policial (Seguridad Personal) Cristhian Mungía. 1 Cuadra Arriba, 2 al Lago, Casa # 77
Bloque XXVIII. Managua, Nicaragua.
Correo electrónico:
hidalgodiaz2003@yahoo.com

seguir su camino de desarrollo hacia la adultez sin riesgo de rechazo³. Estas células polivalentes (*iPS*) que son, en definitiva, pluripotenciales pueden ser utilizadas en humanos para procrear células cardíacas, nerviosas y de hígado, entre otras líneas celulares. Por tanto, es una realidad y no una ficción que células somáticas de humanos puedan ser reprogramadas y utilizadas en modelos patológicos humanos⁴.

Las CM *iPS* tienen también sus problemas ya que cuando se usa la piel para extraer las células que después se reprograman preservan en su genoma «cierta memoria» de su origen adulto, y esa «marca» persiste en cualquier órgano o tejido que hagamos procrear de ellas. Esto hay que resolverlo antes de usarla a gran escala en el tratamiento de algunas enfermedades como la neurodegenerativas (Parkinson y Alzheimer), la diabetes, las enfermedades isquémicas cardíacas y otras. De hecho, hay una línea de investigación específica que trata de asegurarse de que estas células nunca degeneren a formas cancerosas en su evolución (oncogénesis)⁵.

Pero las CM *iPS* se obtienen «retrasando» el reloj biológico, o sea reprogramando simples células de piel o el pelo de un paciente, pero son tan versátiles y tienen tal poder de transdiferenciación que es mínima su diferencia con las CM embrionarias. Ya no será necesario utilizar CM extraídas de la médula ósea, ya sean mononucleares o mesenquimales, ni se emplearán técnicas como el Ficoll y la aféresis, u otras tan controvertidas como el uso de sangre periférica modificada. Mucho menos a ningún científico o pseudocientífico se le ocurrirá aplicar en humanos CM de animales como las de ovejas que se aplican en clínicas del tercer mundo utilizando a los habitantes de esos pueblos como conejillos de india. Dichas células, además de no ser autólogas, no tienen el mismo linaje humano⁶.

Joseph Ecker, Director de Terapia Regenerativa del Instituto Salk de Estudios Biológicos de California, EEUU, ha descubierto un problema inesperado. Como se dijo anteriormente, la reprogramación celular de las células de piel que las transforma en *iPS* no borra por completo su historial genético que las hizo adultas. Los *hot spots* o puntos calientes del genoma persisten en su estado adulto y, sorprendentemente, siguen así después de ser reprogramadas a *iPS* y estas, a su vez, convertidas en células de otros tipos de tejido aptos para ser trasplantados. Es como si el «disco duro» no borrara completamente su historial^{1,4}.

James Thomson, el famoso embriólogo de la uni-

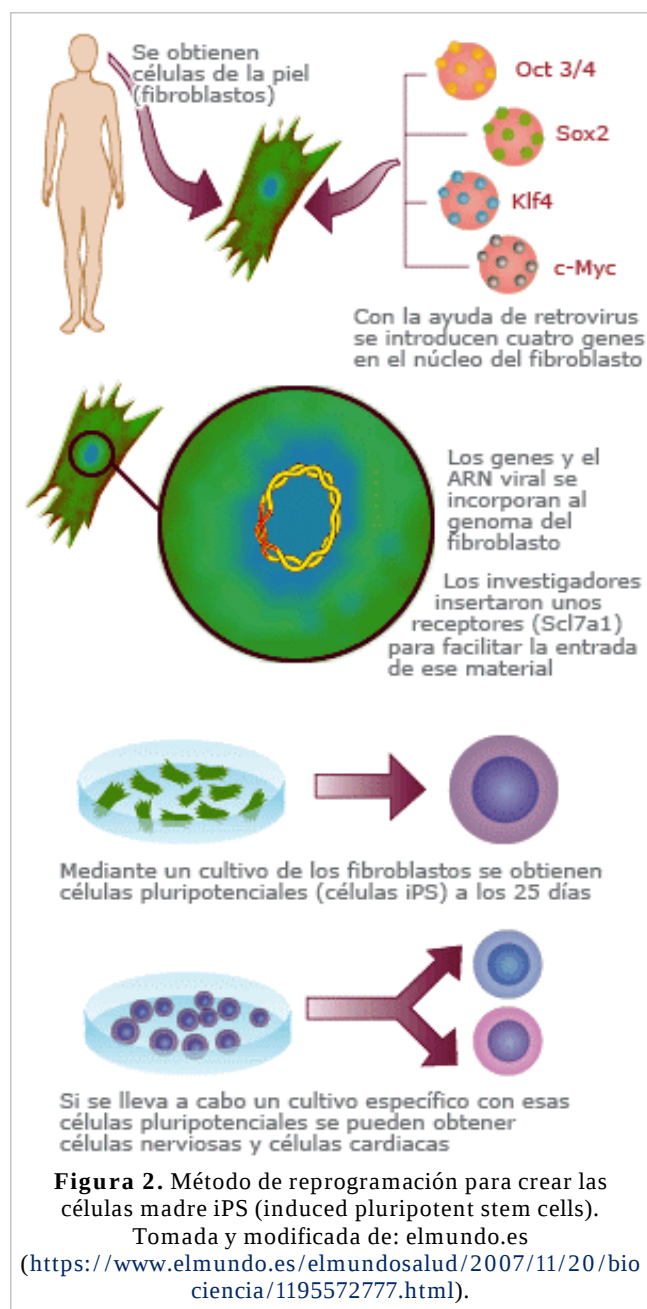
versidad de Wisconsin, que fue mundialmente reconocido por haber obtenido las primeras CM de embriones humanos, ha descubierto también este pequeño escollo de la persistencia en las células *iPS* de un pequeño segmento «del historial genético» de las células precedentes que las crearon. Pese a la gran promesa de las células *iPS*, las líneas de investigación más cercanas a una aplicación definitiva en la terapia regenerativa sitúan a las CM embrionarias como una opción de contrapartida de importancia estratégica⁴.

Es conocido el grave problema ético, religioso, político e incluso judicial que implica el uso en la terapia regenerativa con fines de procreación humana, pero también el uso terapéutico de las CM embrionarias ya que implica la destrucción de embriones humanos de dos semanas que están congelados en los centros de fertilidad de USA, Europa Occidental y países asiáticos altamente desarrollados en tecnologías de terapia regenerativa⁷.

Las CM *iPS* no tienen ese problema pero sí la dificultad ya descrita a la hora de la reprogramación para crearlas. Este problema está relacionado con el área de investigación más importante de la Biomedicina: la epigenética. Todas las células durante su desarrollo embrionario son asignadas a un destino según su posición. Ellas deben «memorizarlo» mientras se mueven y proliferan, pero esa memoria no está en su secuencia de ADN sino en otras moléculas que se adhieren encima de ellas; por eso se llama, a esta investigación biomédica, epigenética, que quiere decir por encima de los genes⁸.

Las moléculas epigenéticas encontradas son las histonas, que son proteínas, y el radical metilo, el -CH₃, que se pega tanto a las histonas como al ADN. Cuando se le realiza un proceso de metilación a un gen de una célula este provoca su inactivación y de todas las células que descienden de ella, pues recordemos que ellas conservan la memoria también⁴.

Según Hidalgo⁴, Ecker y su equipo (Instituto Salk, California, EEUU) examinaron por primera vez los metilomas que son los perfiles de metilación del genoma de cinco líneas celulares *iPS* humanas, mantenidas en cultivo, y compararon a estas con las CM embrionarias (telómeros) y de otras zonas (centrómeros) que son fundamentales para repartir a partes iguales el material genético entre dos células hijas. Técnicamente, según el método de reprogramación de la Universidad de Kioto, se añaden solo cuatro genes a las células de piel o bien las cinco proteínas que producen esos genes. Esto es muy simple para un equipo bien entrenado (**Figura 2**) y muy desea-



ble que sea así si se quiere usar a gran escala esta técnica de terapia regenerativa en la práctica clínica humana, y respetar lo estipulado por la Declaración de Helsinki para tratamientos aplicados a seres humanos. Pero todavía faltan detalles pues la ciencia avanza y hay que resolver los problemas de las células *iPS* en sus perfiles de metilación o el estado epigenético del genoma humano.

Es evidente que el proceso de reprogramación es imperfecto y algunas zonas del genoma humano que están metilados en las células originales de la piel lo

siguen estando en la células *iPS* reprogramadas a partir de ellas. Esto no ocurre en las CM embrionarias y es la diferencia más importante encontrada entre estos dos tipos de CM, por lo que hay que seguir investigando ya que los sectores conservadores de la sociedad presionan constantemente contra el uso de embriones y, por tanto, de CM embrionarias⁴.

Según Hidalgo⁴, en el propio instituto Salk de California y en el Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona se están utilizando retrovirus para generar células *iPS*, pero estas células todavía están mucho tiempo en cultivo y se «estresan».

La implantación de estas células en cirugía cardíaca puede ser por vía epicárdica (**Figura 3**) o intracoronaria, pero también es útil la trasventricular, y hasta se puede emplear tejido o matriz de colágeno tipo 1 para la creación de un miocardio bioartificial, como se describió en el estudio MAGNUM (*Myocardial Assistance by Grafting a New Bioartificial Upgraded Myocardium*)⁹, pues las células *iPS* se pueden sembrar en la matriz antes mencionada,



Figura 3. El Dr. José R. Hidalgo Díaz implanta células madre de forma directa (por vía quirúrgica, el 24 de febrero de 2004, en el Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular de La Habana, Cuba) al corazón de un paciente que había sufrido un infarto de miocardio. Tomada de: Hidalgo Díaz⁷. CorSalud 2018;10:47-51.

previo a su implantación definitiva en la superficie del ventrículo infartado, como mismo se hace con las células autólogas de medula ósea^{9,10}. El Profesor JC Chachques del Hospital Europeo Georges Pompidou de París, Francia, desarrolla un nuevo proyecto para el tratamiento «biomimético» con empleo de ingeniería tisular (*tissue engineering*), donde se reemplaza el colágeno por policaprolactona (PCL), elastómero que se degrada lentamente en 2 años¹¹. Las CM implantadas en la matriz de PCL podrían convertirse en el futuro, en miocardio bioartificial^{9,11}.

Por su parte, las CM embrionarias también tienen sus inconvenientes: a) acumulan mutaciones al ser manipuladas y cultivadas, b) son inmunológicamente incompatibles con el paciente al que se les implanta, cuestión que no ocurre con las CM *iPS*, y c) como ya hemos comentado, hay serias controversias éticas para su uso e innumerables problemas judiciales en el control de las investigaciones⁴.

Las células mesenquimales y de cordón umbilical también se emplean, pero tienen menos posibilidades de acoplarse al sistema electromecánico del corazón aunque no hay dudas de su poder miogénico y angiogénico que provocan engrosamiento de la escara fibrosa del corazón, logran un efecto «anti-remodelación» del músculo cardíaco y evitan otros problemas que se presentan en los pacientes después de un infarto de miocardio. Esto ocurre también con las células mononucleares, CD-34+ obtenidas por el método de Ficoll. Mediante ecocardiograma (color-quiénesis) se ha demostrado el efecto de estas células en la regeneración miocárdica⁷. Otros métodos utilizados, como la extracción de sangre periférica y su asociación con factores de crecimiento celular, pensamos que no tienen futuro alguno.

Además del empleo en Cardiología y Cirugía Cardiovascular, y en la bioasistencia cardíaca, las CM se utilizan para el tratamiento de enfermedades en varias especialidades, por ejemplo: regeneración corneal (Oftalmología), implantación de condrocitos para defectos articulares (Ortopedia), trasplante de islotes de Langerhans en la diabetes mellitus (Endocrinología), enfermedades de Huntington y Parkinson, regeneración de medula espinal, Alzheimer, demencia senil, distrofia muscular de Duchenne (Neurología), hepatocitos como puente al trasplante de hígado (Gastroenterología), implantación de queratinocitos en pacientes quemados (Dermatología y Caumatología), isquemia crónica de los miembros inferiores (Angiología), y leucemia linfocítica crónica, anemia aplásica, inmunodeficiencias, mieloma

(Hematología).

Inicialmente se utilizó el llamado método cualitativo, pero ha quedado totalmente obsoleto; por lo que es la citometría de flujo el método adecuado en la actualidad para identificar y contar las células a implantar. Este es un método cuantitativo, seguro y eficaz para tales fines, y es el aceptado por la Asociación Internacional de Bioasistencia Cardíaca.

Desde que se comenzó a utilizar la terapia regenerativa en órganos extramedulares por primera vez en el año 2000 en París, Francia, con el primer trasplante cardíaco de CM, no hay dudas de que el problema de muchas afecciones hay que resolverlo a nivel celular pues es en la célula donde se producen las enfermedades¹².

Cuba fue uno de los países pioneros que comenzaron con la terapia regenerativa al utilizar CM para el tratamiento de enfermedades extramedulares en humanos. Un equipo de científicos, encabezados por el Dr. José Hidalgo Díaz, trasplantó CM obtenidas por el método de Ficoll en un corazón infartado, el 27 de febrero de 2004, en el Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular de la Habana, Cuba; lo que constituyó la primera aplicación de este procedimiento en nuestro país, en Centroamérica y el Caribe. Los integrantes de ese colectivo fueron, además del Dr. Hidalgo que dirigía el grupo, los doctores Ángel Paredes, Consuelo Macías, Elvira Dorticós, José Manuel Ballester, Alberto Hernández Cañero y Porfirio Hernández, entre otros, todos miembros del Grupo de Terapia Regenerativa del Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular y el Instituto de Hematología de Cuba⁷.

Previamente se habían realizado los ensayos experimentales en animales en el Hospital Broussais de París, Francia, bajo la dirección del Profesor J. C. Chachques, quien dirigía el proyecto más importante de Terapia Regenerativa de la Comunidad Económica Europea (*Contrat Comisión Européenne* ERB 4001GT957737) en relación al empleo de CM en humanos⁷. Los resultados preclínicos preliminares fueron expuestos en la revista *Cardiología Intercontinental* en 2001¹³, por Chachques, Hidalgo Díaz y otros colaboradores, de los Departamentos de Cirugía Cardiovascular de los Hospitales Broussais y Georges Pompidou de París, Francia. Esta fue la primera vez en América que se hablaba de una investigación sobre CM.

Por otra parte, el factor de crecimiento angiogénico o endotelial vascular (*VEGF-cells*) se propone para pacientes con infarto de miocardio mediante la revascularización percutánea o quirúrgica^{12,14}. Este

método se ha estudiado en animales de experimentación en múltiples instituciones, una de ellas es el centro de cirugía experimental del Hospital Europeo George Pompidou de París⁸. En uno de sus trabajos publicados se provocó un infarto de miocardio experimental mediante la ligadura de 2 arterias coronarias. Tres semanas después, los animales se aleatorizaron en 4 grupos (control, implante de mioblastos autólogos, *VEGF-cells* y ambos). La evaluación incluyó estudio inmunohistológico para el análisis cuantitativo de capilares 3 meses después de la cirugía, y se concluyó que hubo mejoría de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, se redujo la remodelación posisquémica y se demostró angiogénesis en el grupo donde se utilizaron *VEGF-cells*, por lo que el camino ha quedado expedito para nuevas investigaciones⁸.

Nota del autor

Con este artículo se hace un homenaje especial al Dr. Abelardo Ramírez Márquez (EPD), quien no escatimó energías en estimular el progreso de esta novedosa y futurista terapéutica en Cuba desde sus comienzos; y al Profesor Doctor Jesús Herrero (EPD), Director General de la Fundación de Ingeniería Biomédica y Tecnologías Sanitarias de España.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hidalgo Díaz J. Las células madre y sus debates: nociones muy básicas. *ContraPunto* [Internet]. 2019 [citado 18 Dic 2018]. Disponible en: <https://www.contrapunto.com.sv/opinion/academia/las-celulas-madre-y-sus-debates-nociones-muy-basicas/9257>
2. Johnson MH, Cohen J. Reprogramming rewarded: the 2012 Nobel Prize for Physiology or Medicine awarded to John Gurdon and Shinya Yamanaka. *Reprod Biomed Online*. 2012;25(6):549-50.
3. Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):678-84.
4. Hidalgo Díaz J. Las células madre y sus debates: nociones muy básicas para no entendidos. *Temas* [Internet]. 2017 [citado 18 Dic 2018]. Disponible en: <http://www.temas.cult.cu/catalejo/las-celulas-madre-y-sus-debates-nociones-muy-b-sicas-para-no-entendidos>
5. Feldman DE, Chen C, Punj V, Tsukamoto H, Machida K. Pluripotency factor-mediated expression of the leptin receptor (OB-R) links obesity to oncogenesis through tumor-initiating stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(3):829-34.
6. Hernández Cañero A, Hidalgo Díaz J. La regeneración del corazón y la terapia celular con células madre. *Rev CENIC Ciencias Biol*. 2004;35(3):210-11.
7. Hidalgo Díaz JR, Hernández Cañero A, Chachques JC, Paredes Cordero A. Células madre mesenquimales de médula ósea y de cordón umbilical en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. *CorSalud* [Internet]. 2018 [citado 20 Dic 2018];10(1):47-51. Disponible en: <http://www.revcorsalud.sld.cu/index.php/cors/article/view/294/628>
8. Chachques JC, Duarte F, Cattadori B, Shafy A, Lila N, Chatellier G, *et al*. Angiogenic growth factors and/or cellular therapy for myocardial regeneration: a comparative study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;128(2):245-53.
9. Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Roura S, Soler-Botija C, Bayes-Genis A. Ingeniería tisular cardíaca y corazón bioartificial. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66(5):391-9.
10. Nadal-Ginard B. Inducción de nuevos cardiomiocitos en el corazón adulto: futuro de la regeneración miocárdica como alternativa al trasplante. *Rev Esp Cardiol*. 2001;54(5):543-50.
11. Jhala D, Rather H, Kedaria D, Shah J, Singh S, Vasishta R. Biomimetic polycaprolactone-chitosan nanofibrous substrate influenced cell cycle and ECM secretion affect cellular uptake of nanoclusters. *Bioact Mater*. 2018;4(1):79-86.
12. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, *et al*. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003;107(18):2294-302.
13. Chachques JC, Hidalgo J, Cattadori B, Duarte F, Shafy A, Argyriadis P, *et al*. Cardiomioplastia Celular: Un nuevo enfoque terapéutico para la disfunción ventricular. *Cardiología Intercontinental*. 2001;10(1):11-5.
14. Mathison M, Gersch RP, Nasser A, Lilo S, Korman M, Fourman M, *et al*. In vivo cardiac cellular reprogramming efficacy is enhanced by angiogenic preconditioning of the infarcted myocardium with vascular endothelial growth factor. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2012 [citado 20 Dic 2018];1(6):e005652. Disponible en: <https://www.ahajournals.org/doi/pdf/10.1161/JAHA.112.005652>