

Revisión

Aspectos generales de las células madre y su potencial aplicación en la medicina regenerativa general (*Overview of stem cells and their potential application in regenerative medicine*)

Por Licenciada en Bioquímica Clínica Fabiola Noelia Velázquez y Doctora Beatriz Leonor Caputto

fvelazquez@fcq.unc.edu.ar

Integrantes del CIQUIBIC (CONICET), Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Resumen:

Las células madre son células especializadas que poseen la capacidad de auto-renovación y, al mismo tiempo, pueden generar al menos un tipo de célula madura diferenciada. Representan un pilar fundamental durante la vida de todos los vertebrados. En los últimos años, muchos estudios se han focalizado en la investigación con células madre debido a su potencial aplicación en terapia clínica y a que constituyen una herramienta útil en el estudio de mecanismos moleculares del desarrollo aún no determinados. Existen distintos tipos de células madre que se diferencian entre sí por su capacidad de auto-renovación y su plasticidad. Entre ellas, las células madre embrionarias (ESCs) son las que presentan mayor capacidad de auto-renovación, plasticidad y regeneración tisular, no obstante debido a que su obtención implica la destrucción de embriones humanos, su uso genera grandes debates tanto a nivel científico como en la sociedad en general. El surgimiento de las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) generadas a partir de células somáticas adultas, ha permitido superar los aspectos éticos asociados al uso de las ESCs. El siguiente artículo intenta brindar un panorama general acerca de los diferentes tipos de células madre, haciendo hincapié en las iPSCs y los últimos avances en medicina regenerativa mediante el uso de células madre.

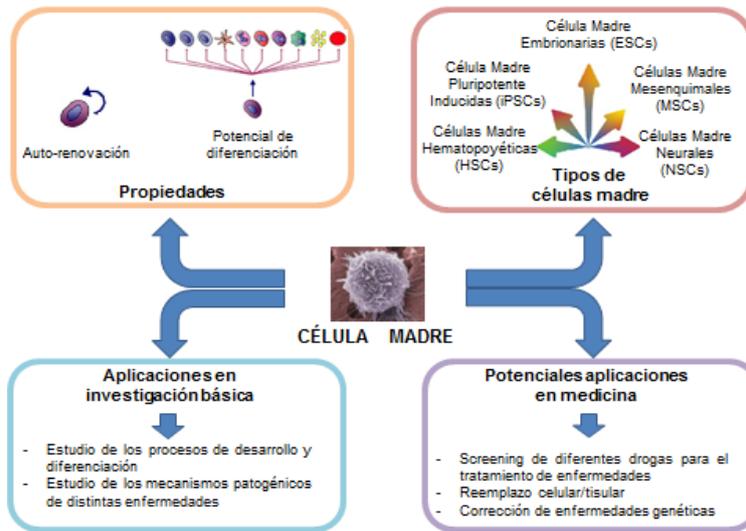
Abstract:

Stem cells are specialized cells that possess the capacity to undergo self-renewal while maintaining at the same time the ability to give rise to at least one or more differentiated or mature cell types. They represent a fundamental cornerstone during the life of all vertebrates. Much attention has been focused on stem cells because of their wide potential for therapeutic applications and their potential for unraveling molecular mechanisms of development. The major characteristics of stem cells, self-renewal and potency, differ between various stem cells. Embryonic stem cells (ESCs) represent the gold standard stem cell with the greatest potential to offer in terms of immortality, plasticity and tissue regeneration; however since to obtain ESCs requires the destruction of human embryos, their use has generated controversy in both the scientific and the general community. The creation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) by direct reprogramming of somatic cells allowed to overcome the ethical controversies of destroying an embryo for generating ESCs. This article attempts to provide an overview of the different types of stem cells, putting special attention on the iPSCs and the latest advances in regenerative medicine.

Palabras claves/ Keywords

**células madre *auto-renovación *potencialidad *células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) *medicina regenerativa *stem cells *self-renewal *plasticity *induced pluripotent stem cells (iPSCs) *regenerative medicine*

Resumen gráfico



Las células madre representan un pilar fundamental para la vida de todos los vertebrados, ya que desempeñan un rol central tanto en la generación de nuevas células durante el desarrollo, como en el reemplazo celular propio de ciertos tejidos a lo largo de la vida del organismo. Estas células han sido aisladas tanto a partir del embrión como de la mayoría de los tejidos adultos (piel, intestino, hígado, sistema nervioso, sistema hematopoyético).

Se trata de células especializadas que tienen la capacidad de auto-renovación (propiedad por medio de la cual mantienen en el tejido el número de su población celular constante) y la capacidad de generar al menos uno o más tipos de células maduras diferenciadas (potencialidad). Estas propiedades varían entre los distintos tipos de células madre. Por ejemplo, las ESCs derivadas del blastocito tienen una gran capacidad de auto-renovación y potencialidad, mientras que las provenientes de tejidos adultos tienen una limitada auto-renovación y sólo pueden diferenciar a células específicas del tejido del cual provienen.

Las células madre pueden ser clasificadas teniendo en cuenta diferentes criterios, uno de ellos considera su potencialidad de diferenciación (cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de las células madre según su potencialidad

CÉLULAS MADRE	EJEMPLO	POTENCIALIDAD
Totipotentes ¹	Oocyto fertilizado	Tejido embrionario y extraembrionario
Pluripotentes ²	Células de la masa interna del blastocito (ESC) Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) ³	Células procedentes de las tres capas germinales del embrión (mesodermo, endodermo y ectodermo)
Multipotentes ⁴	Células madre mesenquimales (MSCs) *	Células procedentes de una de las capas germinales
Oligopotentes	Células madre hematopoyéticas (HSCs) Células madre neuronales (NSCs)	Dos o más linajes celulares específicos del tejido del cual proceden
Unipotentes	Células madre musculares	Diferencian a un solo tipo celular específico

* Son las únicas células madre multipotentes en las cuales su capacidad de transdiferenciación ha sido demostrada ⁵

Las células madre adultas pueden permanecer quiescentes (estado en el cual la célula se encuentra en reposo, no se divide) por largos períodos de tiempo, pero también pueden proliferar bajo ciertas circunstancias. La dinámica de comportamiento de estas células varía de acuerdo a las características del tejido; las células madre de médula ósea, pulmón, hígado e intestino muestran una mayor tasa de proliferación, que las de tejidos como páncreas, corazón y sistema nervioso.

La investigación de células madre ofrece gran interés no sólo porque permite profundizar el conocimiento de procesos biológicos básicos como

el desarrollo y la diferenciación, sino también, por la posibilidad de desarrollar terapias de tratamiento para distintas enfermedades que impactan en la humanidad. Esta área de investigación es una de las que ofrece mayores debates políticos y sociales en parte debido a la fuente de obtención de las ESCs, ya que inicialmente su fuente de obtención era exclusivamente tejido embrionario (6). No obstante muchos esfuerzos se han realizado con el objetivo de poder superar los aspectos éticos asociados con el uso de las ESCs, entre los cuales el surgimiento de las iPSCs constituye uno de los hitos más importantes.

Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)

Las iPSCs se obtienen a partir de células somáticas adultas diferenciadas las cuales son genéticamente reprogramadas a un estado de célula madre embrionaria (ESC-like-state). Fueron generadas por primera vez por los científicos Takahashi y Yamanaka (3) en 2006 (Yamanaka recibió por éste descubrimiento el Premio Nobel de Medicina en 2012), a través de la infección retroviral de fibroblastos de ratón con cuatro genes que codifican para los siguientes factores de transcripción: Oct 3/4 (octamer-binding transcription factor), Sox2 (SRY-related high-mobility group box protein-2), c-Myc y Klf4 (Kruppel-like factor 4). Un año más tarde el mismo grupo de investigación describió la generación de iPSCs humanas utilizando el mismo sistema de reprogramación a partir de fibroblastos dérmicos.

La principal desventaja de la metodología utilizada por Yamanka es el uso de vectores retrovirales como así también de factores oncogénicos (c-Myc), lo cual genera el riesgo de provocar alteraciones genéticas y/o la formación de tumores a partir de las células a reprogramar. Es por ello que se han desarrollado nuevos métodos que no implican manipulación genética con el objetivo de generar iPSCs seguras, entre los que cabe mencionar el tratamiento de las células con un cocktail de proteínas o con ARNm modificados. Una vez obtenidas las iPSCs es necesario demostrar que las mismas son similares a las ESCs en términos de morfología, proliferación, antígenos de superficie, expresión génica, estado epigenético de los genes de pluripotencia, actividad telomerasa como así también en su capacidad de generar células procedentes de las tres capas embrionarias.

La posibilidad de poder generar iPSCs específicas de cada paciente ofrece una plataforma única a partir de la cual se puede determinar el mecanismo patogénico de distintas enfermedades, llevar a cabo el *screening* de distintas drogas para

evaluar su potencial terapéutico y explorar la posibilidad de reparar genes alterados (en el caso de enfermedades genéticas) aplicando la terapia celular.

La disautonomía familiar o síndrome de Riley-Day es una neuropatía periférica fatal hereditaria caracterizada por la degeneración de neuronas autónomas y sensoriales. Clínicamente los pacientes desarrollan síntomas desde el nacimiento (diarrea y estreñimiento, apnea, falta de coordinación, etc.) que van empeorando con el tiempo, siendo una de las características más notables la insensibilidad al dolor. Se trata de una enfermedad poco frecuente (la incidencia en la población en general es del 0,03%) difícil de estudiar en detalle debido a la dificultad de acceso al tejido afectado (el sistema nervioso). Sin embargo, mediante el uso de la tecnología de las iPSCs, en 2009 un grupo de investigación reveló el mecanismo patogénico de la enfermedad (se observó principalmente una alteración en la migración de las células precursoras del sistema nervioso periférico) y al mismo tiempo evaluó distintas drogas con el objetivo de una aplicación terapéutica, encontrando que el fenotipo de la enfermedad podía ser parcialmente revertido por una hormona de planta conocida como kinetina (7). Éste fue uno de los reportes iniciales que demuestra el potencial uso de las iPSCs.

La utilidad de las iPSCs como herramientas para el estudio in vitro de enfermedades es indiscutible. No obstante la generación de iPSCs específicas de cada paciente también es motivada por el deseo de generar células y/o tejidos inmunocompatibles para ser usados en el trasplante autólogo, evitando así uno de los principales riesgos del trasplante, el rechazo inmune. Al presente la idea de la terapia celular basado en el uso de las iPSCs es bastante futurista, sin embargo existen estudios en modelos animales que dan indicios de que dicho tratamiento será posible algún día. Por ejemplo, en un modelo de ratón de la enfermedad humana conocida como anemia falciforme, se reparó por recombinación homóloga la alteración genética característica de esta enfermedad en iPSCs generadas a partir de fibroblastos del ratón, posteriormente las iPSCs reparadas fueron diferenciadas a progenitores hematopoyéticos y estos transplantados al animal logrando revertir la enfermedad. En otro estudio, se inocularon neuronas dopaminérgicas derivadas de células iPSCs en el cerebro de ratas que constituyen un modelo de la enfermedad de Parkinson, logrando una integración funcional de las neuronas

implantadas y un mejoramiento clínico de la enfermedad.

No hay dudas de que el uso de las iPSCs representa un modelo ideal para el estudio de enfermedades, el descubrimiento de nuevas terapias y el desarrollo de tratamientos personalizados (**Figura 1**), no obstante para que su uso en la terapia de celular sea una realidad falta mucho por evaluar e investigar.

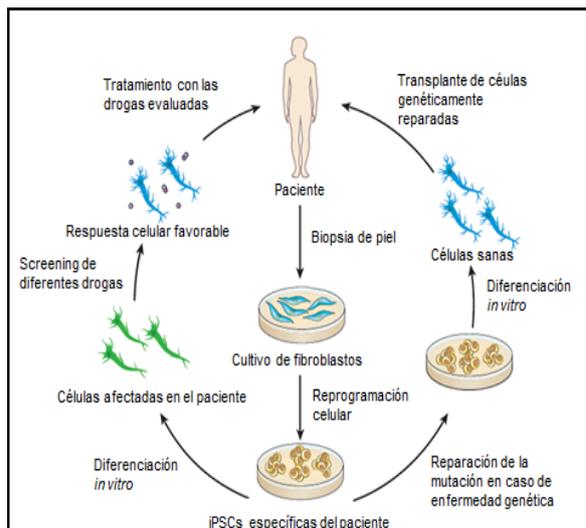


Figura 1. Aplicaciones médicas de las iPSCs. iPSCs específicas de un paciente pueden ser generadas y luego utilizadas ya sea para reparar la mutación que produce la enfermedad (en caso de enfermedad genética) como para estudiar la patología de la misma y el efecto de distintas drogas.

Las células madre en la medicina regenerativa

El uso de células madre en medicina regenerativa comenzó en la década del 50' con los primeros intentos de trasplante de médula ósea (MO) en modelos animales. Estos estudios iniciaron el camino hacia el trasplante de MO en humanos, actualmente ampliamente utilizada en varios desórdenes hematológicos (como en la aplasia de MO, leucemias, linfomas) (8). La medicina regenerativa es uno de los focos de mayor interés en investigación, existiendo resultados prometedores (a partir de estudios preclínicos y clínicos) en muchas enfermedades, como: cirrosis (9), fibrosis pulmonar (10), diabetes (11), la enfermedad de Crohn (12), falla cardíaca (13) y varios desórdenes del sistema nervioso (14). Además el efecto inmunomodulatorio de las células madre ha sido demostrado en varias condiciones dominadas por la inflamación (15).

En el caso de las enfermedades cardiovasculares (principal causa de muerte en el mundo) los mayores progresos en el estudio de tratamientos basados en el uso de células madre se

han realizado con HSCs y MSCs. Estudios realizados en un modelo de ratón indican que el tratamiento con el factor de células madre (SCF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), antes o después de la inducción de un infarto de miocardio, conduce a la movilización de HSCs al sitio de lesión mejorando la función cardíaca y la supervivencia celular. En la actualidad se realizan ensayos de movilización de células madre en pacientes con enfermedades de la arteria coronaria mediante la administración del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF).

Las MSCs constituyen las células madre adultas de mayor interés en medicina regenerativa debido a que son relativamente fáciles de aislar y expandir (se encuentran en muchos tejidos como MO, sangre periférica, tejido adiposo, músculo esquelético, etc.). Presentan propiedades anti-trombogénicas, baja inmunogenecidad y el potencial de diferenciar a distintos tipos celulares (adipocitos, condrocitos, osteoblastos, células endoteliales, células musculares, neuronas). Existen ensayos clínicos en desarrollo que demuestran que el tratamiento de pacientes que sufrieron infarto de miocardio con MSCs resulta beneficioso para su recuperación, no solo porque las células inoculadas diferencian a cardiomiocitos y células de los vasos sanguíneos sino también porque secretan distintos factores de crecimiento que favorecen la regeneración cardíaca.

Muchos esfuerzos están destinados a conseguir que las células madre puedan ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (como en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington), debido principalmente a que la mayoría de estos desórdenes implica la pérdida de circuitos neuronales particulares por lo que se planea restablecer dichos circuitos mediante al aprovechamiento de la capacidad regenerativa de las células madre. En el caso de la enfermedad de Parkinson (segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente después del Alzheimer) se produce una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra que proyectan hacia el estriado (vía nigroestriada). A consecuencia de ello el paciente padece trastornos en el movimiento, alteraciones en la función cognitiva, en la expresión de las emociones y en la función autónoma. El tratamiento farmacológico de rutina consiste en la ingesta de levodopa (un precursor de la dopamina) complementada con agonistas de dopamina e inhibidores de enzimas que degradan la misma. Este tratamiento resulta efectivo en estadios

tempranos de la enfermedad pero a medida que el trastorno avanza comienza a ser menos efectivo e incluso puede conducir a nuevas complicaciones motoras. Un tratamiento alternativo consiste en el reemplazo de las neuronas dañadas por nuevas células que restauren la vía nigroestriada. Inicialmente se utilizó el trasplante de tejido humano mesencefálico fetal como una terapia efectiva en estadios avanzados de la enfermedad.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la obtención del tejido fetal representa un hecho muy cuestionado desde el punto de vista ético y religioso. La tecnología de células madre ofrece una herramienta alternativa capaz de brindar una fuente de abundantes células diferenciadas obtenidas a partir de células madre particulares dependiendo del tipo celular deseado. Por ejemplo, a partir de NSCs se puede obtener por diferenciación *in vitro* neuronas dopaminérgicas que pueden posteriormente ser trasplantadas. Actualmente existen estudios en fase pre-clínica de investigación que intentan determinar cuál es la mejor fuente de células madre neurales para la obtención de neuronas dopaminérgicas. Otra alternativa de tratamiento es el trasplante de NSCs o MSCs en la zona afectada, lo cual fue aplicado en modelos animales de la enfermedad y condujo a un mejoramiento clínico de la misma, tanto por el reemplazo celular como por la secreción de neurotransmisores, de factores neurotróficos y neuroprotectores. En la actualidad existen al menos cuatro ensayos clínicos oficiales que evalúan la eficacia de este procedimiento.

Si bien la perspectiva de poder utilizar células madre con fines terapéuticos es muy promisorio, existen varios ensayos clínicos que no encontraron una mejoría clínica luego del tratamiento con células madre. Incluso, hay casos reportados que indican la formación tumoral luego de su aplicación. Estos hallazgos impulsan la necesidad de mayores estudios para poder acceder a terapias seguras. Hay varios aspectos que deben continuar siendo investigados, tales como el sitio de aislamiento de las células madre, el tipo de células a administrar (células madre o células ya diferenciadas), la vía de administración, la supervivencia de las células administradas, dónde se integran, el mecanismo exacto mediante el cual actúan, entre otros. La realidad es que no existen datos suficientes para aplicar en forma rutinaria el uso de células madre en el tratamiento de distintas enfermedades (a excepción del trasplante de MO para el tratamiento de algunos desórdenes hematológicos).

Conclusión

Las células madre son una importante herramienta para el entendimiento de la organogénesis y la capacidad regenerativa de los tejidos humanos. Constituyen un modelo para el estudio de los mecanismos patogénicos de diversas enfermedades y además ofrecen la posibilidad de desarrollar modelos biológicos para el estudio de nuevos agentes farmacológicos. El potencial más importante de estas células es su posible aplicación en el reemplazo del tejido dañado, incluso en la regeneración de órganos. Hasta el momento un gran número de investigaciones referidas a este aspecto han sido publicadas, tanto desde el aspecto básico como clínico. Si bien algunos estudios clínicos ofrecen resultados alentadores para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el uso de células madre, existen aún muchos aspectos que deben continuar siendo estudiados.

Bibliografía

1. Rossant J. Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells* (2001) 19: 477–482.
2. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* (1981) 292: 154-156.
3. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* (2006) 126: 663–676.
4. Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E., Kucia M., Poniewierska A., Suszynska M., Ratajczak J. Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Adv Med Sci* (2012) 57: 1–17.
5. Barzilay R., Melamed E., Offen D. Introducing transcription factors to multipotent mesenchymal stem cells: making transdifferentiation possible. *Stem Cells* (2009) 27: 2509–2515.
6. McCormick J.B., Huso H.A. Stem cells and ethics: current issues. *J of Cardiovascular Trans. Res.* (2010) 3: 122-127.
7. Lee G., Papapetrou E.P., Kim H., Chambers S.M., Tomishima M.J., Fasano C.A., y col. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* (2009) 461: 402–406.
8. De la Morena M.T., Gatti R.A. A history of bone marrow transplantation. *Immunol Allergy Clin North Am* (2010) 30: 1–15.
9. Pai M., Zacharoulis D., Milicevic M.N., Helmy S., Jiao L.R., Levicar N., y col. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34+ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* (2008) 103: 1952–1958.

10. Banerjee E.R., Laflamme M.A., Papayannopoulou T., Kahn M., Murry C.E., Henderson W.R.Jr: Human embryonic stem cells differentiated to lung lineage-specific cells ameliorate pulmonary fibrosis in a xenograft transplant mouse model. *PLoS One* (2012) 7:e33165.
11. Kroon E., Martinson L.A., Kadoya K., Bang A.G., Kelly O.G., Eliazar S., y col. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose- responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol*(2008) 26: 443–452.
12. Cassinotti A., Annaloro C., Ardizzone S., Onida F., Della V.A., Clerici M., y col. Autologous haematopoietic stem cell transplantation without CD34+ cell selection in refractory Crohn's disease. *Gut* (2008) 57: 211–217.
13. Menasche P., Alfieri O., Janssens S., McKenna W., Reichenspurner H., Trinquart L., y col. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* (2008) 117: 1189–1200.
14. Lindvall O., Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* (2006) 441: 1094–1096.
15. Le B.K., Frassoni F., Ball L., Locatelli F., Roelofs H., Lewis I., y col. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus- host disease: a phase II study. *Lancet* (2008) 371: 1579–1586.