

REGRESIÓN AL ESTADO EMBRIONARIO: ANTECEDENTES Y USOS ACTUALES DE LAS CÉLULAS MADRE PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS

Regression to the embryonic state: background and current uses of induced pluripotent stem cells

Herman Rozengway Vijil¹

RESUMEN

Las células madre pluripotenciales inducidas son células adultas modificadas por medios virales, químicos, físicos o combinados, que permiten crear células con características de células del embrioblasto del desarrollo embrionario humano, estas características incluyen una capacidad de dividirse ilimitadamente y conservar gran capacidad de diferenciación a cualquier tejido proveniente de las tres capas germinales embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo, pero incapaces de generar tejido extraembrionario como la placenta; estas características les permitiría usarse para investigaciones farmacológicas al poder probar medicamentos en tejidos humanos *in vitro*, con o sin alteraciones genéticas para estudiar sus efectos primarios, secundarios y concentraciones útiles, también permiten dar apoyo clínico en el área regenerativa y de trasplantes tisulares sin temor a rechazo de tejido extraño. En este trabajo se presentan antecedentes del uso de células madre a través de los años hasta la actualidad, los distintos métodos existentes para generar pluripotencialidad y ejemplos de la aplicación de las células madre pluripotenciales inducidas en la clínica y en el campo investigativo.

Palabras claves: Células madre, células madre pluripotentes inducidas, células madre pluripotentes, medicina regenerativa.

ABSTRACT

Induced pluripotent stem cells are adult cells who are modified by viral, chemical, physical or a combination

of the previous that create cells with characteristics of embryoblast human cells during embryonic development. These features include an unlimited ability to divide and store a considerable capacity for differentiation to any tissue from all three embryonic germ layers: ectoderm, mesoderm and endoderm, but unable to generate extra-embryonic tissue like placenta does; these features allow them to be used for pharmacological research and test drugs in human tissues *in vitro*, with or without genetic alterations to study their primary and secondary effects and useful concentrations, these cells also allow to help in clinical support in the area of tissues regeneration and transplants without fear of rejection of foreign tissue. This paper records the use of stem cells through the years to the present day, the various existing methods to generate pluripotency and examples of the application of pluripotent stem cells induced in the clinic and in the field of research methods.

Keywords: Stem cells, induced pluripotent stem cells, pluripotent stem cells, regenerative medicine

INTRODUCCIÓN

Las células madre pluripotenciales inducidas son células originalmente extraídas de un tejido de fácil obtención (usualmente fibroblastos) a las cuales se les reprograma usando varios métodos que varían; vectores virales modificados, inserción proteína dentro de células o modificadores epigenéticos para que estas células obtengan pluripotencialidad similar a la del embrioblasto encontrado en la etapa embrionaria. Estas células cuentan con el potencial de madurar a cualquier tejido adulto siempre y cuando el código genético de la célula original se lo permita.⁽¹⁾

Las células madre pluripotenciales inducidas permiten generar medios de regeneración celular con reducción

¹Estudiante de IV año, Carrera de Medicina, UNAH.

Dirección de correspondencia: herman.vijil@hotmail.com

Recibido: 2/03/15

Aceptado: 19/06/15

casi absoluta de rechazo inmune, además estas permiten la experimentación farmacológica *in vitro*, facilitando el desarrollo de esquemas personalizados reduciendo efectos adversos, mejorando la calidad de vida de los pacientes, junto a esto, permite obtener mayor entendimiento del desarrollo celular normal y anormal, por lo que son perfectas para el estudio fisiopatológico de muchas enfermedades genéticas.⁽¹⁾

Para la obtención de la información se utilizaron los buscadores por medio de Pubmed y el buscador integrado del Software Endnote. Se colocaron solamente aquellas revisiones y artículos recientes, incluyendo los artículos del 2006 de Shinja Yamanaka, los cuales fueron el origen del tema de las células madre pluripotenciales inducidas por el cual su revisión y subsecuente citación fueron indispensables.

DESARROLLO Y DISCUSIÓN

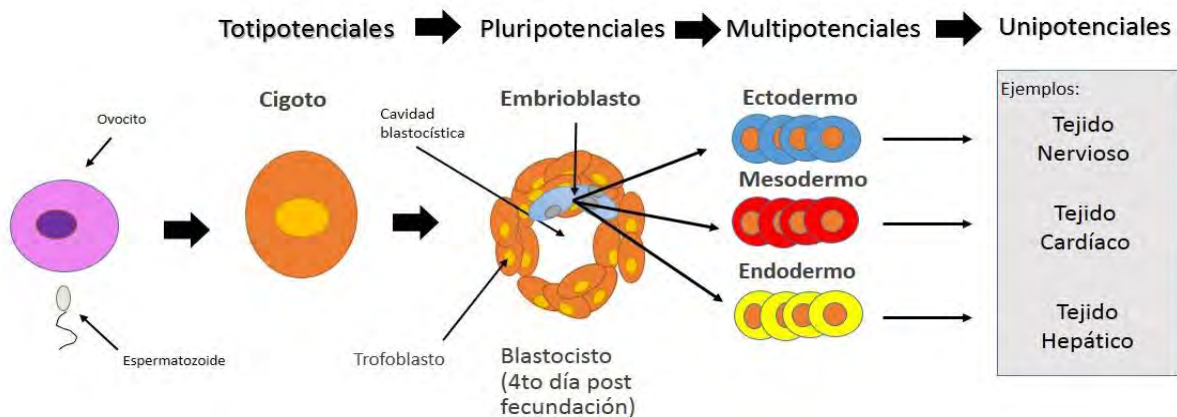
Antecedentes

El uso de células madre para regenerar tejidos no es un concepto nuevo en medicina, anteriormente se teorizó que las células madre encontradas en el cordón umbilical o células regenerativas de algunos órganos del cuerpo adulto, podrían ser cultivadas y usadas para regenerar órganos completos y curar enfermedades complejas, este pensamiento no duro mucho debido al descubrimiento del verdadero potencial de las células madre adultas y del cordón umbilical, el cual era mucho

más reducido que lo esperado, dando un ejemplo, las células del cordón umbilical solamente pueden madurar a tejido hematopoyético o de la línea sanguínea, por lo tanto no puede usarse para regenerar ningún otro tejido. A pesar de que aún se podían usar estas células de cordón umbilical para sustitución sanguínea (por medio de trasplante a la médula ósea), este uso también era limitado sólo a la persona del cual se obtuvo las células del cordón umbilical, ya que colocar células madre de cordón umbilical a otras personas sin compatibilidad celular adecuada, resultaba en el rechazo de las células madre por parte del huésped.

Anteriormente se teorizaba que se podían usar células madre de otras personas sin posibilidad de rechazo, debido a su inmadurez, pero los experimentos revelaron que sin importar que tan inmaduras eran las células, si no coincidían con el tejido de la persona a la cual le colocarían el trasplante, este empezaría a rechazar el tejido, al igual como se rechaza un órgano ajeno. Este dato generó gran decepción en el ámbito médico debido a que disminuía el potencial curativo de las células madre. Otro medio prometedor fue el uso de células madre embrionarias, obtenidas de las primeras etapas de la vida del embrión, usando las células en estadio pluripotencial del embrioblasto, es decir células con capacidad de generar cualquier tejido proveniente de las 3 capas embrionarias primitivas; ectodermo, mesodermo y endodermo (Figura No.1) pero sin la capacidad de generar tejido extra embrionario como la placenta. Estas células permitían la generación de cualquier tejido del cuerpo humano *in vitro* al usar los estímulos químicos y físicos necesarios.

Figura No. 1 Grados de potencialidad celular



A mayor potencialidad mayor rango de posibilidad de generación celular, a medida que maduran las células estas tienen un menor rango de diferenciación, en el momento que una célula del embrioblasto se vuelve mesodérmica esta ya no podrá generar ciertos tejidos como Hepatocitos o células beta pancreáticas.

Fuente: Esquema original del autor

Pero este sistema también sufría la desventaja del rechazo de tejido extraño y primordialmente existía la dificultad de obtención de estas células, ya que al principio no existía la metodología para no destruir completamente el fruto de la concepción, del cual se obtenían las células que usualmente eran embriones generados de fertilización *in vitro* de ratones. Esto generó un debate ético-moral-religioso que disminuyó el deseo de experimentación con esta estirpe celular, debido a que sí se deseaba realizar tratamientos regenerativos en humanos era necesario destruir sus embriones.

Por fortuna se creó un sistema que eliminaba la mayoría de las desventajas de los demás tipos de células madre, por un laboratorio en Japón liderado por Shinya Yamanaka (ganador de un premio Nobel por su descubrimiento), este sistema consistía en la adición de genes a una célula nucleada común del cuerpo humano; el fibroblasto, con un retrovirus modificado que incrustaría en el fibroblasto 4 genes (Oct4, Sox2, Myc y Klf4), que codifican para factores de transcripción proteínas que controlan que genes son activados o desactivados en el genoma al unirse al ADN o ciertas proteínas que regulan la expresión de los genes, estas pueden promover su expresión en forma de un activador o reprimir en forma de un represor.^(1,2)

Los genes inductores de pluripotencialidad

Oct4: en humanos su nombre oficial es POU5F1 pero también es conocido como OCT3; OCT4; OTF3; OTF4; OTF-3; Oct-3; Oct-4, codifica para un factor de transcripción que juega un rol importante en la pluripotencialidad de células embrionarias, la expresión aberrante de este gen en tejidos adultos se asocia con tumorigénesis. El gen se ubica en el Cromosoma 6p21.31.⁽³⁾

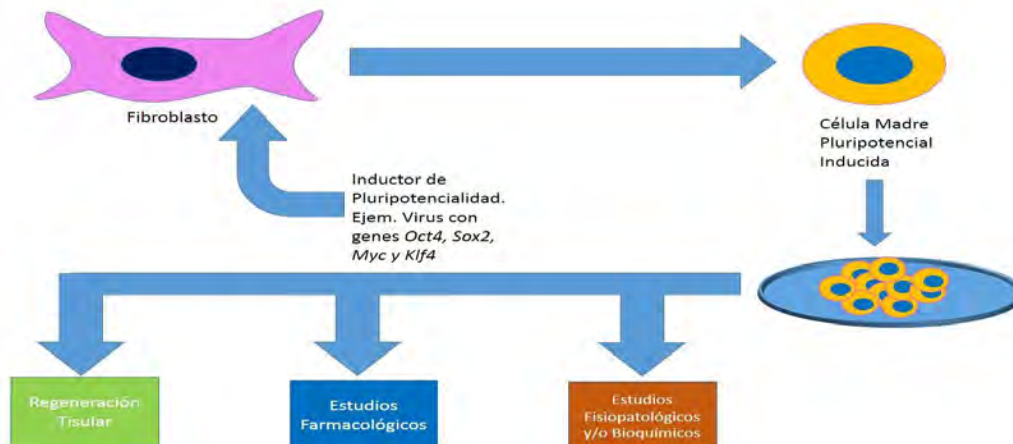
Sox2: su nombre completo es SRY (sex determining región Y)-Caja 2 en humanos. Este gen codifica un miembro de la familia de factores de transcripción involucrada en la regulación del desarrollo embrionario y definir la vía de desarrollo, es requerido para mantenimiento de células madre en el sistema nervioso central y regula la expresión genética del estómago; mutación en este gen se asocia a hipoplasia del nervio óptico y malformaciones oftálmicas varias. El gen se ubica en el cromosoma 3q26.3-q27.⁽⁴⁾

Myc: codifica para una fosfoproteína nuclear multifuncional que juega un rol en la transformación celular y apoptosis. Este regula la transcripción de múltiples genes, primordialmente activando genes relacionados con el crecimiento celular. Sobre expresión o mutaciones están asociados a una variedad de tumores hematopoyéticos, leucemias y linfomas. El gen se encuentra en el cromosoma 8q24.21.^(5,6)

Klf4: codifica para un factor de transcripción que regula la expresión de genes vinculados con mantener la pluripotencialidad y además prevenir la diferenciación (ya que actúa como activador o represor para múltiples genes). Involucrado en la regulación de transcripción de p53/TP53. El gen se ubica en el cromosoma 9q31.^(7,8)

Estos factores de transcripción lograron transformar una célula somática en estadio de maduración terminal, en una célula con características muy similares a una célula embrionaria con pluripotencialidad, al igual que un embrioblasto (Figura No 2)

Figura No 2. Diagrama simplificado del proceso de inducción a pluripotencialidad y los usos de estas células madres pluripotenciales inducidas



Fuente: Esquema original del autor

Esto generó un gran impacto en la comunidad científica al verificarse que estas células modificadas pueden madurar nuevamente a cualquier tejido que sus genes permitan, como por ejemplo: Hepatocitos a partir de fibroblastos modificados, estas células conservan las mismas características que un hepatocito normal extraído del paciente al cual se le realizó la modificación fibroblástica.⁽⁹⁻¹¹⁾

Para poder identificar apropiadamente a las células madre pluripotenciales inducidas de las demás células, se decidió usar como marcador la proteína *Fbx15*. Una proteína expresada en grandes cantidades por células inmaduras y expresado en pequeñas cantidades por células maduras, por lo que su presencia se vinculó con pluripotencialidad, estas células madre se les denominó “Células madre *Fbx15*” y carecían de la capacidad de generar quimeras (ratones que nacían después de la adición de células madre pluripotenciales inducidas en su estado embrionario y que contaban con 2 estirpes celulares distintas y funcionales).

Subsecuentemente se realizó un cambio el marcador celular a la proteína “*Nanog*”, esta se encuentra en altas concentraciones en células indiferenciadas y a medida que la célula madura la concentración de *Nanog* disminuye, esto facilitaba diferenciar células con pluripotencialidad con más exactitud que las células *fbx15*,⁽¹²⁾ los genes virales de las células madre *Nanog* fueron fuertemente silenciados (se inhibió su expresión permitiendo que maduren nuevamente) naturalmente y fue posible obtener de ellas quimeras viables.⁽¹⁰⁾

Las células reprogramadas de ratón en los estudios de Yamanaka, tenían la potencialidad de generar cualquier tejido de ratón, pero tenían tendencias a generar teratomas (tumores que generaban tejido de cualquiera de las tres capas germinales). Aunque la formación de teratomas podría ser considerado algo negativo, este se volvió el método más usado para verificar el apropiado funcionamiento de estas células al incentivarlas a formar teratomas y así confirmar la capacidad de generar tejidos provenientes del ectodermo, mesodermo y endodermo embrionario.

Yamanaka, logró inducir teratomas al inyectar las células madre subcutáneamente a ratones y luego extraer este tejido derivado de las células madre para visualizar la diferenciación tisular, se logró observar que las células se podían diferenciar a cartílago (derivado mesodérmico),

neuronas (derivado ectodérmico) y epitelio columnar intestinal (derivado endodérmico), pero en ninguno de los casos se observó desarrollo de tejido trofoblástico (se confirmó al buscar expresión de *Cdx2*, marcador común en trofoblasto, el cual estaba ausente en todos los experimentos) con lo que se descartó la posibilidad de ser células totipotenciales con capacidad de crear tejidos extraembrionarios.⁽⁹⁾

Al insertar estas células modificadas tipo *Fbx15* en un blastocito de ratón, este no lograba llegar a término y generar un embrión funcional más allá de la primera mitad de gestación, este proceso de generar un ratón u otro ser vivo a partir de células de una misma especie pero distinto código genético adjunto a sus células originales se denomina “Quimerización”, estas quimeras son útiles para observar reacciones intercelulares y rechazo de tejidos. La incapacidad de estas células madre para generar quimeras provocaba un problema de experimentación.⁽⁹⁾ Este problema se corrigió en generaciones subsecuentes de células madre pluripotenciales inducidas al encontrar los tiempos de maduración correctos, para mantener indiferenciado lo más posible a estas células madre adjunto al silenciamiento génico de las células madre “*Nanog*”.^(7,13)

Proceso de selección de Células Madre

Después de usar un retrovirus en una población de fibroblastos, es necesario seleccionar las células que lograron expresar los genes virales adecuadamente, en este caso se usan marcadores genéticos (distintos según el laboratorio y medio de inducción, siendo el más común en los primeros experimentos la proteína *Nanog*) para identificar la correcta introducción de estos genes y su expresión, lamentablemente existe un gran margen de error en la inducción e identificación de células pluripotentes, debido a la dificultad de encontrar en el momento oportuno a estas células sin que estas empiezan a diferenciarse por estímulos de sus células vecinas no transformadas.⁽⁶⁾

Estas células son luego separadas y cultivadas *in vitro* donde podrían ser usadas para más estudios, algunos de ellos involucraban saber el nivel de alteración epigenética de metilación y acetilación después de la reprogramación. La epigenética es el estudio del condensamiento (Heterocromatina) y descondensamiento (Eucromatina) del ADN sin alterar

en sí mismo su código genético, el condensar el ADN inhibe su expresión, este es el sistema natural que usan las células para evitar que una neurona produzca hormonas pancreáticas o que un fibroblasto accidentalmente madure a una célula gástrica en la dermis, por lo tanto la metilación (condensamiento) selectivo de genes es lo que imposibilita la maduración a otros tejidos de una célula completamente diferenciada.⁽⁶⁾

La expresión de los genes es mayormente epigénética por sus distintos niveles de metilación o acetilación después de la inducción (en algunos medios de inducción no es necesario alterar la carga genética en lo absoluto, por el cual no es necesario usar virus que se combinen con el ADN), por lo que la verdadera forma de generar pluripotencialidad es alterar la epigénética de los fibroblastos hasta llegar a niveles similares de metilación de una célula embrionaria.⁽⁶⁾ Se descubrió que esta reprogramación alteraba enormemente los niveles de metilación de ciertos promotores de algunos genes como el *Oct4*, *Nanog* y *Fbx15*. Pero la metilación de los genes globalmente, incluso la del cromosoma X de los fibroblastos de ratonas eran casi los mismos a los de células maduras, lo que significa que existe cierta conservación epigénética al reprogramar estas células, lo que permitiría estudios epigénéticos complejos con células madre.⁽¹⁾

Aunque los resultados de Yamanaka eran extremadamente prometedores estos presentaban algunos problemas, como el bajo nivel de eficiencia de transformación celular, en el cual la cantidad de células transformadas con eficacia eran solamente 0.04%, la oncogenicidad de los genes usados (en especial del gen *Myc*) y la incertidumbre de no saber si el mismo juego de genes produciría células madre pluripotenciales o afectaría de manera peligrosa a largo plazo a células humanas; hechos que retrasarían fuertemente la aplicación clínica de sus descubrimientos.^(1,6,14)

Estudios adjuntos con los genes de reprogramación dieron resultados interesantes, en los que se han introducido esos mismos 4 genes reprogramadores pero a células cancerosas, estas han presentado reducción de sus características malignas y regresión a células pluripotenciales. Estudios epigénéticos demostraron un incremento en la expresión del gen supresor de tumores *p16* y de metilación en la región promotora del gen. Estos estudios develaron lo que podría ser un sistema novedoso para tratar el cáncer en otro momento, si se

llegasen a generar los medios adecuados de bioseguridad, para introducción genética sin alterar células adjuntas no cancerosas y verificar la eliminación de los tumores a largo plazo.⁽¹⁴⁾

Medios de inducción a la pluripotencialidad

Aunque el primer medio exitoso para la generación de células madre fue usando un medio viral modificado, existen medios alternativos de generación de células madre pluripotenciales inducidas con el objetivo de reducir la oncogenicidad o aumentar la eficiencia de transformación; aquí se mencionan algunos de ellos:

a) Transferencia nuclear: Este medio consiste en la colocación del núcleo de una célula madura (ej. un fibroblasto) en un ovocito maduro anucleado, este ovocito luego es activado químicamente para empezar divisiones mitóticas y generar un embrión sin necesidad de fecundación por un espermatozoide. Esto generará un embrioblasto en el cual es posible tomar las células y cultivarlas según necesidad.

Este sistema resulta ser ineficiente ya que sólo 2 de cada 304 ovocitos generaban las células madre embrionarias deseadas, además, existía la posibilidad de combinación génica con restos de cromosomas del núcleo original del ovocito, generando rechazo de tejidos más adelante.⁽¹⁴⁾

b) Fusión celular: Se usa un sincitio celular con división constante (acumulación de múltiples células sin membrana celular delimitante para cada célula), dando la impresión de un gran cúmulo de citoplasma con muchos núcleos y una membrana celular delimitando a todas estas, semejante al sincitiotrofoblasto de la etapa embrionaria. se colocan núcleos de células madre obtenidas por medios alternativos, las células madre incentivan a los demás núcleos de células somáticas a obtener características iguales a las de una célula madre pluripotenciales embrionarias.

Resultados de este medio de fusión celular son prometedores por la generación de células con potencial de tejidos de las tres capas germinales y generación de teratomas. No existen muchos estudios usando este medio actualmente.⁽¹⁵⁾

- c) Reprogramación directa: así se le denomina al medio de transformación que consiste en la adición de genes a una célula madura para transformarla a una célula madre. Actualmente este medio se ha usado en fibroblastos, queratinocitos y células sanguíneas nucleadas con buenos resultados.⁽¹⁵⁾

Los ratones a los cuales se les colocan células obtenidas con reprogramación directa no rechazan los tejidos, pero tienen la mayor incidencia de obtener teratomas de todos los medios anteriores.⁽¹⁵⁾

Existen múltiples tipos de virus con el potencial de crear pluripotencialidad, en cuanto a los retrovirus, existen 2 clases importantes: *Replicativos-Competentes* o *Replicativos-Incompetentes*.⁽¹⁵⁾ Los *Replicativos-competentes* contienen el material necesario para la generación de nuevos viriones y permiten diseminación posterior a la infección, actualmente por su inestabilidad estos no son usados para generar células madre pluripotenciales inducidas.

Los virus *Replicativos-Incompetentes* son aquellos a los cuales se les elimina el código genético que permite el empaquetado y producción de otros virus, pero aún conservan el código suficiente para integrar la carga genética sin activar procesos líticos o de apoptosis celular, estos son el medio más común de estudio viral para células madre.

El mayor problema del uso de retrovirus es la necesidad de integrarse solamente en células mitóticamente activas, por lo que células divisorias más inactivas son muy resistentes a su infección y transducción, un ejemplo de estas son las neuronas. Otro problema de usar retrovirus son los defectos insercionales vinculados con mutagénesis, cáncer o leucemias.⁽¹⁵⁾

Los estudios de Yamanaka se realizaron con un retrovirus en fibroblastos de la cola de un ratón, el vector usado fue un "*Moloney Murine Leukaemia virus*" o *MMLV*, un defecto en este medio fue que aunque los factores de transcripción eran silenciados prontamente en la célula vía metilación permitiendo la diferenciación, un promotor del virus (promotor 5'*MMLV* LTR) volvía a activarse, llevando a la expresión descontrolada del gen "*Myc*", causando tumores en quimeras creadas a base de estas células.

Debido a este fenómeno Yamanaka decidió eliminar el gen "*Myc*" viral, inesperadamente ellos lograron crear células madre pluripotenciales inducidas sin este gen tanto en células somáticas de ratón como en humanas, pero la tasa de inducción sin "*Myc*" era mucho menor, volviendo a este medio de 3 genes poco práctico en estudios.⁽¹⁵⁾

La eficacia real de los retrovirus cambia dependiendo de la célula empleada, usar retrovirus es cien veces más eficiente en queratinocitos que en fibroblastos con los 4 factores usados por Yamanaka.⁽¹⁶⁾ Dos factores (*Oct4* y *Klf4* o *Myc*) pueden convertir células madre neuronales de ratón a células madre pluripotenciales debido a los altos niveles endógenos de *Sox2* y *Myc* en estas células.⁽¹⁷⁾ Es posible obtener células madre pluripotenciales inducidas al combinar genes y moléculas pequeñas varias, o usar solamente los genes *Oct4* y *Sox2* en células de cordón umbilical.⁽¹⁸⁾ El encontrar las combinaciones apropiadas de célula-carga genética permitirá una aplicación más segura de estas células.

Otra variante al método es el uso de Lentivirus (subclase de retrovirus) que pueden infectar células no mitóticas con gran eficiencia, se introducen al ADN celular y este se pasa a la próxima generación celular. Por medios de seguridad también se usan lentivirus de tipo *replicativos-incompetentes*.

Estudios sugieren una mayor eficiencia de reprogramación al usar lentivirus con *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin-28* adjunto a un promotor *EF1-alfa*, este cuenta con una alta tasa de inducción en relación al sistema original de Yamanaka, pero el silenciamiento del promotor no es viable ya que suele reactivarse durante la maduración y estimulando la generación de tumores.⁽¹⁹⁾

Otros medios directos de reprogramación involucran el uso de plásmidos bacterianos que expresen los factores reprogramadores, estos han demostrado ser seguros pero tienen una tasa de inducción aún menor que cualquier medio viral, siendo el valor más alto de inducción 1-29 colonias celulares de 1, 000,000.⁽²⁰⁾

Existen medios virales usados en la reprogramación directa, sin involucrar la adición de la carga viral al código genético de la célula. Esta puede ser usando

un Adenovirus, los cuales son virus pequeños que se expresan en el citoplasma y que tienen la capacidad de infectar células de casi cualquier tipo exceptuando algunas células linfoides, estas cuentan con la desventaja de tener una tasa de inducción de 0.0006%, pero un bajo recuento de oncogenicidad o alteración génica peligrosa, volviéndose un sistema atractivo a ser mejorado a futuro. ⁽²¹⁾ Los adenovirus no son los únicos con esa capacidad, otro medio usado es un virus del género Sendai modificado de ARN de cadena negativa de replicación citoplasmática que no requiere ADN intermedio para su función. Este virus expresa sus genes en el citoplasma incentivando la reprogramación celular. Este medio necesita el uso del gen *Myc* que es altamente oncogénico y necesario para reprogramaciones más eficientes. ⁽²¹⁾ Al eliminar el gen *Myc* la inducción es de un 10% en comparación al sistema con *Myc*. ^(14,22)

- d) Reprogramación directa por medio de proteínas: existen reportes de generación de células madre pluripotenciales inducidas por la adición de proteínas obtenidas de la expresión de cuatro genes reprogramadores (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, y *Myc*) usados anteriormente con inducción viral, junto a péptido (pequeñas proteínas) que permiten la penetración celular. A estas líneas celulares se les denominó “IPs humanas inducidas por proteínas o p-hips” que tienen la ventaja de no necesitar un medio viral para su obtención, lo que facilita laboratorialmente y económicamente la producción de células madre para múltiples usos. Estas células han presentado las mismas características que una célula madre inducida por virus, incluyendo la formación de teratomas. ⁽²²⁾

Una desventaja en el uso de este método es la necesidad de introducir las proteínas múltiples veces (más de 6 ciclos) al cultivo celular para generar células madre pluripotenciales, y esto genera una eficiencia de transformación mucho menor que los medios virales debido a que sólo puede colocarse las proteínas en pequeñas cantidades por ciclo (inducción exitosa del 0.001%), este medio no cuenta con una manera de expresar constantemente los genes que usualmente se usan con medios virales y necesitan formularse mejores sistemas para introducir las proteínas a momentos oportunos, sin afectar la maduración celular y aumentar el porcentaje de inducción exitosa. ⁽²³⁾

- e) Reprogramación por mRNAs: existen aproximadamente 1000 tipos de MicroRNAs, consistentes de 18 a 24 nucleótidos que han sido identificados en humanos. El sistema de mRNAs permite la modificación y control de la expresión de ciertos genes.

Estudios con células madre embrionarias develaron la expresión alterada de ciertos sistemas de mRNAs que podrían estar involucrados en la pluripotencialidad y auto regeneración de las células. Las células madre embrionarias tienen una alta expresión de mir-302s, -17s, -515s and mir-371-373, los cuales tienen expresión reducida en células maduras. Por lo que en experimentación al incrustar estos sistemas, específicamente el mir-302/367 al genoma, esta permitió la generación de células madre pluripotenciales inducidas. Este medio no requiere un retrovirus para su función y se ha considerado como un medio potencial para el tratamiento de cáncer. ⁽¹⁴⁾

Usos actuales de células madre Pluripotenciales inducidas

- a) Medicina regenerativa: uno de los posibles resultados más prometedores con los descubrimientos de las células madre es la regeneración de tejidos que han sido dañados. ⁽²⁴⁾

Estudios en ratones verifican la posibilidad de trasplantar tejidos de ratones quimeras (ratones a los cuales se les introdujo células madre en estado embrionario y en su nacimiento presentaron dos líneas celulares de dos ratones distintos) sin producir rechazo por tejido extraño. Para demostrar esta característica de las células madre se realizó un estudio de ratones con síndrome de Parkinson, en el cual se usaron neuronas creadas a partir de células madre e injertadas en los ratones, esto produjo una disminución de los síntomas de Parkinson, no produjo rechazo de tejido en ningún caso y no hubo necesidad de drogas inmunosupresoras. ⁽²¹⁾

Una de las mayores dificultades en la experimentación in vivo con células madre es la generación de teratomas.

Una solución en experimentación a la generación de teratomas es el uso de *células madre multipotenciales inducidas*. Un teratoma es un

tumor poco diferenciado que contiene células de las 3 capas embrionarias primitivas (endodermo, mesodermo y ectodermo), el uso de células multipotenciales en vez de células pluripotenciales, es decir, células que sólo generen tejidos de una capa embrionaria. Podría aliviar este problema al generarse un nivel de diferenciación más “local”, transformando fibroblastos a células madre del mesodermo (mesenquimatosas) para regeneración de tejido conectivo o músculo, células ectodérmicas para regeneración neuronal o células endodérmicas para producir células beta pancreáticas para tratar personas con diabetes. Esto eliminaría la posibilidad de generación de tejidos extraños *in vivo*, aunque aún no se logra detener la maduración celular a estos puntos específicos con eficiencia.⁽¹³⁾

- b) Estudios farmacológicos y toxicológicos: un objetivo a corto plazo del estudio de células madre, ha sido la creación de medicamentos a medida para diferentes pacientes, al experimentar dosificaciones o medicamentos de distintos tipos *in vitro* con tejidos diana específicos.

Un ejemplo aplicado a la vida real es con el síndrome de QT larga, en el cual la frecuencia de los latidos cardiacos está alterados por una repolarización ventricular prolongada, algunos pacientes que tienen este síndrome congénito fallecen de complicaciones cardiacas a temprana edad. Existen como mínimo 10 tipos confirmados de síndrome de QT larga, pero en aproximadamente el 45% la causa del síndrome es una mutación en el gen *KCNQ1*, que codifica para un canal de potasio de velocidad lenta sensible a estímulos adrenérgicos. A este tipo de síndrome de QT largo se le designa como tipo 1, este tipo de enfermedad tiene una herencia mendeliana de tipo autosómica dominante la cual la hace una enfermedad predilecta para estudios con células madre.⁽²⁵⁾

En el año 2010, se realizó un estudio de síndrome de QT larga en el cual se identificó a un niño de 8 años con el síndrome de tipo 1, con un pedigrí que presentaba la mutación genética en su padre, su tía de parte paterna y su abuelo; el padre fue el único asintomático y el resto de la familia son sintomatología leve. Se realizó una biopsia de piel del niño de 8 años y de dos personas sanas para control, se cultivaron las células y se usaron medios virales para la reprogramación celular; se verificó la

presencia de células madre en todos los cultivos y a continuación se programaron las células para generar miocitos de tipo ventricular y auricular. Se confirmó el tipo celular por medios inmunohistoquímicos y por PCR la presencia del gen afectado y normalidad de los demás genes. Todos los cultivos celulares empezaron a tener contracciones en los cultivos alrededor del 12mo día de maduración post diferenciación; usando medios electrofisiológicos y químicos se logró confirmar la presencia del canal afectado en el niño y anomalías de tiempo de contracción, mientras que las demás muestras resultaron normales.

A continuación se realizaron pruebas de medicamentos en los miocitos afectados, usando distintos fármacos y concentraciones hasta encontrar un resultado satisfactorio, el cual fue encontrado con rapidez. El medicamento fue aplicado al menor con resultados positivos para el control de su enfermedad, generando así una manera de entregar fármacos a medida del paciente.^(13,25)

Otros usos de las células madre en el ámbito farmacológico es el estudio de hepatocitos generados con células madre pluripotenciales de individuos con diferentes enzimas del citocromo p450, el cual permitiría analizar de manera más directa y segura los efectos hepatotóxicos de muchos medicamentos, sin tener que depender de estudios en animales con sistemas orgánicos distintos al humano o ensayos clínicos tardíos que ponen en riesgo la vida de personas.^(1,13)

- c) Estudios de bioquímicos y fisiopatológicos de enfermedades:

Hasta hoy no se conoce con plenitud los procesos bioquímicos o fisiológicos de muchas enfermedades, muchas veces se usan sistemas biológicos en animales similares al de los humanos como los ratones y las moscas de fruta, pero estos sistemas con animales a veces difieren con los procesos biológicos de los humanos lo que limita su utilidad en ciertas patologías; los estudios con células madre permitirían observar desde cerca el desarrollo directo de las células, permitiendo reconocer en que parte de su vida celular se produce el defecto y posibles maneras para detener la enfermedad en un modelo humano *in vitro*.⁽²¹⁾

Algunos ejemplos son la esclerosis lateral amyotrópica, enfermedad neurodegenerativa producida por un defecto en el gen SOD, la enfermedad no cuenta con una penetrancia del 100% en todos los individuos y a pesar de que se puede inducir la enfermedad, al colocar el gen defectuoso en sistemas animales su estudio ha sido difícil, con las células madre ha sido posible estudiar con mayor facilidad los mecanismos patológicos de esta enfermedad, dilucidando por qué neuronas motoras fallecen en los pacientes con esclerosis lateral amyotrópica.^(13,21)

Algunos problemas que presenta este sistema de estudio, son los artefactos o errores de producción en la generación de una célula madura a través de una célula madre o la poca homogeneidad de maduración en toda la muestra, pequeñas alteraciones pueden afectar la fisiopatología celular del conjunto de manera significativa.

Otro problema incluye la dificultad para estudiar patologías en el cual interactúan múltiples tipos celulares, en el pasado los estudios se limitaban a una muestra de un tipo celular únicamente, en la actualidad se ha podido combinar dos muestras de células distintas para estudiar su interacción como en el caso de las neuronas más neuroglia en el estudio del Alzheimer.^(21,27)

El método multicelular es complejo por la posibilidad de alterar la maduración celular de maneras inesperadas y no conseguir los tejidos esperados o las proporciones adecuadas, pero su uso correcto permite obtener resultados positivos como en el caso del estudio de la enfermedad de Alzheimer con células madre, en el cual se logró identificar que la enfermedad es además relacionada fisiopatológicamente con los astrocitos de manera directa, y que ellos tienen un componente primario en la producción de la patología y no sólo las neuronas como antes se pensaba, ya que al cultivar neuronas de pacientes con la enfermedad, estas no presentan todas las características que se observan en biopsias cerebrales, pero al incluir a los astrocitos presentaron más características similares a tejidos obtenidos directamente de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.⁽²⁷⁾

La mayor dificultad del estudio de enfermedades con células madre radica en el ambiente, muchas enfermedades requieren un estímulo externo que puede ser de tipo prolongado para la aparición de una enfermedad o depender de múltiples estímulos provocados por el ambiente y células vecinas, variables muy difíciles de imitar en un laboratorio en placas de Petri en cultivos mono epiteliales de células madre.

Conclusión

La aplicación de células madre pluripotenciales inducidas es un tema muy controversial y prometedor en el ámbito científico, debido a su alto potencial en la investigación y tratamiento de muchos padecimientos humanos, mientras suele producir debate en muchos dilemas éticos y morales. Pero a pesar de la pequeña cantidad de resultados o tratamientos con células madre confirmados hasta el momento, estas han generado una alternativa de investigación a muchas enfermedades, que no podían ser investigadas a detalle por sus características intrínsecas o por falta de modelos biológicos que estudiar.

Las células madre tienen la capacidad de confirmar los mecanismo fisiopatológicos y bioquímicos de muchas enfermedades genéticas que antes sólo eran teorías, estudiar desde cerca los efectos farmacológicos a nivel celular y en algún momento poder regenerar tejido suficiente para tratar enfermedades neurodegenerativas, metabólicas o afectaciones de tipo estético, como las que se producen después de un accidente automovilístico o por quemaduras. El uso de células madre pluripotenciales inducidas aumentaría la capacidad de mejorar enormemente la calidad de vida de millones de personas en el mundo.

Agradecimiento

Se agradece al Dr. Jorge Pineda y la Dra. María del Carmen Montoya, catedráticos de la clase de Embriología de la FCM-UNAH, por su apoyo e ideas en el desarrollo de la revisión, al Dr. Alvarado, Hematólogo del Hospital Escuela Universitario, por el apoyo intelectual en el desarrollo del artículo. A la bachiller Andrea Gutiérrez Rivera, instructora del laboratorio de Embriología por su revisión y correcciones iniciales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Qi H, Pei D. The magic of four: induction of pluripotent stem cells from somatic cells by Oct4, Sox2, Myc and Klf4. *Cell Res.* 2007;17(7):578-80.
2. Broad Institute. Transcription factor: broad's glossary. [en Internet]. 2015 [Consultado el 20 de enero del 2015]. Disponible en: <https://www.broadinstitute.org/education/glossary/transcription-factor>
3. National Center for Biotechnology Information. POU5F1 POU class 5 homeobox 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [en Internet] 2015. [Consultado el 20 de enero del 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5460>
4. National Center for Biotechnology Information. SOX2 SRY (sex determining region Y)-box 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [en Internet] 2015. [Consultado el 20 de enero del 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657>
5. National Center for Biotechnology Information. MYC v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [en Internet]. 2015. [Consultado el 20 de enero del 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4609>
6. UniProtKB. MYC - Myc proto-oncogene protein - Homo sapiens (Human) [en Internet] 2015. [Consultado el 20 de enero del 2015]. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01106>
7. UniProtKB. KLF4 - Krueppel-like factor 4 - Homo sapiens (Human) [en Internet]. 2015. [Consultado el 20 de enero del 2015]. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/O43474>
8. National Center for Biotechnology Information. KLF4 Kruppel-like factor 4 (gut) [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [en Internet]. 2015 [Consultado el 20 de enero del 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9314>
9. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126(4):663-676.
10. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007; 448(7151):313-7.
11. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature.* 2007; 448(7151):318-24.
12. UniProtKB. NANOG - Homeobox protein NANOG - Homo sapiens (Human) [Internet] 2015. [Consultado el 20 de enero del 2015]. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H9S0>
13. Yamanaka S. A Fresh look at iPS Cells. *Cell.* 2009;137(1):13-7.
14. Miyazaki S, Yamamoto H, Miyoshi N, Takahashi H, Suzuki Y, Haraguchi N, et al. Emerging methods for preparing iPS Cells. *J Clin Oncol.* 2012;42(9):773-779.
15. Shao L, Wu W-S. Gene-delivery systems for iPS cell generation. *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10(2):231-242.
16. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.* 2008;26(11):1276-1284.
17. Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature.* 2008;454(7204):646-650.
18. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodríguez-Pizà I, Vassena R, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell.* 2009;5(4):353-357.
19. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007;318(5858):1917-1920.
20. Gonzalez F, Barragan Monasterio M, Tiscornia G, Montserrat N, Rita Vassena R, et al. Generation of

- mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(22):8918–8922.
21. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science.* 2008;322(5903):945–949.
 22. Diecke S, Jung SM, Lee J, Ju JH. Recent technological updates and clinical applications of induced pluripotent stem cells. *Korean J Intern Med.* 2014;29(5):547-557.
 23. Ou L, Wang X, Zou F. Is iPS cell the panacea? *IUBMB Life.* 2010;62(3):170-175.
 24. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell.* 2009;4(6):472-476.
 25. Weissman I. Stem cell therapies could change medicine... If They Get the Chance. *Cell Stem Cell.* 2012;10(6):663-665.
 26. Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flügel L, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-qt syndrome. *N Engl J Med.* 2010;363(15):1397-1409.
 27. The Scientist Marketing Team. Using induced pluripotent stem cells in drug discovery. [Video en Internet]. 2014 [Consultado el 20 de enero del 2015]. Disponible en: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/40729/title/Using-Induced-Pluripotent-Stem-Cells-in-Drug-Discovery/>