

Acta Médica

Grupo Ángeles

Volumen
Volume **3**

Número
Number **2**

Abril-Junio
April-June **2005**

Artículo:

Trasplantes celulares: De terapia celular
a células autólogas personalizadas

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Grupo Ángeles Servicios de Salud

**Otras secciones de
este sitio:**

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



medigraphic.com



Trasplantes celulares: De terapia celular a células autólogas personalizadas

Mario Castañeda*

La terapia celular encuentra sus registros en la literatura desde hace unos cien años. Se le ha conocido también con diversos nombres como terapia glandular, organotterapia, terapia con células embrionarias, con suspensiones, o extractos celulares frescos, o como "siccacell therapy" (extractos celulares secos). Todos esos intentos han sufrido no solamente de un empirismo demasiado burdo sino de una caprichosa ignorancia de rigor científico, de conocimientos inmunológicos, de procedimientos de esterilización, y de extrañas vías de administración. Médicos alemanes como H. Kuettner reportaron en 1912 el intento de tratamiento de niños hipotiroideos con células de tiroides heterólogos. En 1917, John R. Brinkley en EUA implantó en un sinnúmero de hombres, testículos de cabra para el tratamiento de impotencia e infertilidad (además de otras condiciones), hasta que su licencia de médico le fue revocada y después fue penalmente indiciado. Paul Niehans aparece en los inicios de la década de los 30 con terapias celulares de rejuvenecimiento y todavía en 1999 su Clinique La Prairie en Suiza cobraba miles de dólares (pagados también por miles de personas) por una semana de "revitalización". A partir de 1970, Wolfram Kühnau, asociado de Niehans aparece en Tijuana, Baja California con terapia celular contra cáncer, Down, Alzheimer, epilepsia y otras condiciones incluyendo SIDA. Y en los 90 una compañía mexicana exportaba pastillas de "Zellen-Cell Therapy" (Terapia Celular-Celular) acompañadas de opiniones favorables como la del "Especialista en Envejecimiento Prematuro Dr. Hans Byron". Las reacciones adversas a estas intervenciones (a

excepción de las del grupo de Suiza) fueron numerosas y serias, desde gangrena por *Clostridium perfringens* hasta reacciones inmunes en sistemas vascular, nervioso central y periférico, y en piel (un 40% de ellas fatales).

Desde antaño hasta la actualidad, la idea fundamental sigue siendo la misma: el reemplazo de, o el apoyo a, células, tejidos u órganos defectuosos por los correspondientes especímenes vivos y funcionales, armónicamente integrados al organismo para ofrecer terapias de mediano y largo plazo. Es decir, el sueño de poder tener acceso a nuestra tienda autorizada de refacciones cuando alguna pieza nuestra malfuncione. La idea, lejos de ser mala, es trascendente. La meta es ambiciosa y el camino complejo. A la fecha, esto se ha venido realizando, ya de manera profesional, con diversos trasplantes de órganos y tejidos (alógenicos y hasta xenogénicos) con un riesgo/beneficio aceptable aunque no sin problemas por supuesto. Una mejor estrategia en ciertos casos sin tratamiento a la fecha (ni en el futuro cercano) es utilizar células, ya sea modificándolas o transplantándolas. La modificación se ha pensado la más asequible por su inherente enfoque reduccionista. Con gran optimismo y natural ignorancia se iniciaron ensayos clínicos encontrándose serios tropiezos que obligaron a regresar, abandonando con humildad el lenguaje de "terapia génica", a la mesa del laboratorio experimental, trabajando ahora en, simplemente, investigación en transferencia génica; para diseñar y mejorar tanto procedimientos como otros posibles enfoques. Una interesante vía es el corte y unión del genoma ("genome editing") de células eucariotas a través del diseño de nucleasas que cortan secuencias específicas y el corte es reparado por la inserción de la información genética nueva. Un primer reporte informa sobre la obtención de hasta un 18% de células humanas corregidas en la mutación responsable de la deficiencia inmune combinada y severa (SCID)¹ y de la cual escribí anteriormente en esta revista.² Las células del paciente podrán ser después reintroducidas.

Las líneas de células madre embrionarias capaces de multiplicación *in vitro* sin pérdida de sus características iniciales (células ME; "embryonic stem cells o ESC's") a partir de clonaciones en otros mamíferos,³ ofrecen la po-

* Médico Cirujano, Doctor en Ciencias. Ex-Investigador Titular "C". Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondencia:
Mario Castañeda
Fuente Murmullos 87-101
Lomas Palmas
52788 Huixquilucan, Estado de México
Correo electrónico: marjorcast@cts.com

Aceptado: 29-06-2005.



sibilidad del trasplante de estas células primitivas. Este procedimiento puede, si llegase a la clínica, llamarse terapia celular; aunque en vista de las torpezas relatadas en el primer párrafo, se prefiere guardar distancia con esa denominación. Lo mismo ocurre con la de clonación terapéutica en función de que dicha terapia es sólo una meta a largo plazo y el usar la frase implicaría dar falsas esperanzas a las personas más necesitadas de este tipo de intervención. Teniendo en cuenta lo sucedido y el camino tomado con la terapia génica, el trasplante celular se ha venido reduciendo a lo que en verdad es: investigación en células madre embrionarias. No se trata solamente de una de las tantas investigaciones en un campo de los múltiples que existen en biomedicina, sino de un campo que reviste un gran interés para la medicina, puesto que ésta es, la que podrá conducir hacia la meta del trasplante celular autólogo (núcleo somático donado por el paciente) y orientada hacia las necesidades particulares del enfermo para los casos en que la terapia génica es inadecuada.

Al hablar de clonación, implícitamente estamos aceptando una herejía a un canon de la biología del desarrollo que duró hasta toda la primera mitad del siglo 20: la posibilidad de regresar el tiempo; el tiempo de desarrollo, del organismo y producir un ser completo a partir de un genoma nuclear obtenido de una célula adulta diferenciada hacia funciones somáticas. Tal precepto permanecía a pesar de los múltiples ejemplos de clonación en horticultura. La posibilidad se tornó en realidad, cuando en 1997 Ian Wilmut dio a conocer a Dolly, el borrego más famoso en ciencia. Pero, así como Colón partió hacia el oeste para llegar al este por saber que la tierra era redonda, Wilmut intentó su clonación porque sabía que era posible. La prensa popular ignoraba anteriormente los acontecimientos científicos y nunca puso atención en "Molly" la rana de mucho mayor significado en ciencia. En 1952 Robert Briggs y Thomas King realizaron la primer transferencia nuclear (proveniente de blástulas) en vertebrados usando oocitos encucleados de *Rana pipiens* con la obtención de embriones morfológicamente normales.⁴ En la década siguiente, John Gurdon usó núcleos de células diferenciadas (epitelio intestinal) de *Xenopus laevis* llegándose hasta el estadio de renacuajo⁵ y en experimentos posteriores, hasta adultos fértiles. Con ello se probó, de manera contundente, que: a) el genoma permanecía intacto durante todo el proceso de diferenciación (opuesto a la opinión mayoritaria anterior de pérdida de genes), b) este proceso se debía a la expresión diferencial de genes, y c) los cambios epigenéticos (responsables de la expresión diferencial) ocurridos durante la evolución hacia el núcleo somático, son reversibles. Éstas son las premisas fundamentales sobre las cuales se apoya todo trabajo en clonación y la esperanza del trasplante de células (comprometidas hacia un camino de diferenciación o ya diferencia-

das) acorde a las necesidades de tal o cual órgano o tejido humano. La fuente de estas células, por consecuencia, serían las líneas euploidías humanas que llegasen a ser establecidas a partir de las pluripotenciales células ME.

Si todo este sueño ha de realizarse, tendremos que poner los pies sobre la tierra. Es decir, manejar en el laboratorio experimental material humano. En este caso, las células que contienen las señales maravillosas, cuasimágicas hasta ahora pero reales, para dirigir a un genoma ahí injertado y anteriormente puesto en un camino determinado con destino fijo y casi inmutable (el de la célula diferenciada) hacia otro que se ramifica en un abanico que cubre todos los caminos de la diferenciación integrada y autorregulada de las células que constituyen el organismo humano (o cualquier otro multicelular). Me refiero por lo tanto, al oocito, la célula estrella de la procreación. Esta misma notoriedad obliga a evitar la llamada clonación humana que, de por sí, está fuera del alcance y del interés científico. La mayoría de los mamíferos clonados mueren durante la gestación y los pocos sobrevivientes presentan anormalidades neonatales (agrupadas bajo el "large offspring syndrome") o durante el periodo juvenil-adulto joven ocasionando muerte prematura. El tipo de núcleo donado al oocito es un factor importante. La sobrevivencia a término se ha cuantificado en embriones bovinos por el grupo de Wilmut, obteniéndose cifras de 28%, 13% y 5% para embriones clonados con núcleos de mórlula, fetales y fibroblastos adultos, respectivamente (núcleos de neuronas dan menor rendimiento). Para embriones de ratón (por un grupo japonés), 22%, 14% y 8% para núcleos de blastómeros en etapas de 2, 4 y 8 células, respectivamente. Estos datos son de esperarse. No en balde la vida ha desarrollado células germinales. Lo sorprendente aquí es que se lleguen a producir embriones tempranos con núcleos somáticos. La clonación nuclear (transferencia nuclear) obliga a la reprogramación de ese genoma y el proceso no alcanza a completarse. La expresión génica del 5% del genoma total y del 50% de los genes con impronta (metilados y silenciados) es defectuosa.

El patrón de la impronta de los genomas haploides materno y paterno en el huevo fertilizado es diferente y se obtienen, en consecuencia, genes con un alelo silenciado y el otro activo. La expresión monoalélica de estos genes es fundamental para el desarrollo normal del embrión. En el zigote, o "clonote" (denominación propuesta por P. R. McHugh, NEJM 2004; 351: 209-11), obtenido por transferencia nuclear, la impronta asimétrica de ese genoma diploide adulto se pierde durante el proceso de reprogramación ejercido por el citoplasma del oocito a través de la desmetilación de bases nucleicas; la cual, es preferencial hacia el genoma haploide paterno en el huevo fertilizado y hacia el diploide somático (por diferente

organización de la cromatina). La resultante expresión bialélica de dichos genes ocasiona un desarrollo anormal del clonote. Sin embargo, su capacidad de generar células ME pluripotentes es la misma comparada a la obtenida a partir de fertilización *in vitro*. Los clonotes son entonces inservibles para clonación reproductiva pero de gran utilidad para avanzar el conocimiento biológico sobre desarrollo y diferenciación y sobre patogenia de enfermedades, como las complejas multigénicas, para estudios toxicológicos y para su eventual uso en medicina reparativa. Por otro lado, en un campo diferente pero íntimamente ligado, la discusión de si el embrión, así clonado (clonote) y cultivado hasta la etapa de blastocisto, es un ser humano o no, está fuera del ámbito científico.

Una vez obtenidos los clonotes, éstos se cultivan en gotas de unos 10 microlitros y al tercer y noveno días se obtienen mórulas y blastocistos, respectivamente. Las células que forman la masa interna del blastocisto son, a su vez, cultivadas y una minoría de ellas adquiere la capacidad de proliferación *in vitro* para constituir las deseadas líneas celulares euploides y pluripotentes de células ME ("Somatic Cell Nuclear Transfer Embryonic Stem cells, SCNT-ES cells"). Este simplista protocolo de laboratorio ha sido, por años, penosamente infructoso; sobre todo con las células de las especies cercanas a nosotros,³ y en particular, con células humanas. El *impasse* ha sido por fin superado por un grupo de Seúl, Corea del Sur que trabaja de sol a sombra todos y cada uno de los días del año y dirigido por un veterinario y un ginecólogo. A principios del año pasado reportó la obtención de la primera línea humana (SCNT-hES) gracias a una serie de modificaciones al protocolo; la principal, en lugar de enuclear al oocito por la succión con pipeta, hicieron una "incisión" en el vitelo a través de la cual extruyen el aparato mitótico en metafase II e insertan la célula somática, fusionan eléctricamente ambas células ya en contacto y activan al clonote químicamente.⁶ ¿Rendimiento? ¡De un total de 242 oocitos (16 voluntarias con estimulación ovárica), 176 oocitos en metafase II, 30 blastocistos derivados de SCNT, 20 masas internas celulares y una SCNT-hES! ¿Utilidad médica? Ninguna, pues la célula somática fue una del cúmulo aislada del complejo cúmulo-oocito de la misma donadora e imposible entonces de eliminar la posibilidad de una simple partenogénesis; además de haber usado material murino en el cultivo y enzimas de otros animales con el problema de transmisión de virus y material xeno. ¿Significado biológico? Enorme, pues fue la prueba del principio: es posible obtener líneas pluripotenciales humanas para trasplantes autólogos obviando el requerimiento de inmunodepresores.

En una segunda comunicación este año, el mismo grupo reporta una eficiencia 10 veces mayor.⁷ De 185 oocitos

donados por 18 mujeres (un promedio de 10 oocitos por ciclo estimulatorio), ¡11 líneas celulares! Una línea por cada ciclo de estimulación en promedio y en 2 casos, 2 líneas por un solo ciclo (eficiencia menor con oocitos de mujeres mayores de 30 años). Además y fundamental, las células somáticas adultas provinieron de personas sin relación biológica (excepto en una línea) con las donadoras de oocitos. Los marcadores génicos en las líneas corresponden a los presentes en los donadores somáticos (descartando ahora partenogénesis) y los isótipos del complejo de histocompatibilidad mayor HLA son idénticos entre las líneas y los correspondientes donadores, lo que permite así el trasplante celular autólogo con tolerancia inmune. La nota de precaución clínica a este respecto es que: a) algunos antígenos de histocompatibilidad pasan por mitocondria y la población mitocondrial en las líneas celulares proviene tanto del oocito como de la célula somática (fibroblastos de biopsias de piel), y b) aun en trasplantes autólogos (dentro de la misma persona) y en singénicos (entre gemelos idénticos) se llega a presentar el síndrome de injerto contra hospedero (GVHD). El cual, interesantemente y sólo dicho de paso, en trasplantes alogénicos de médula ósea tiene efectos positivos contra las restantes células leucémicas y de linfoma (donde un grupo de genes de microRNAs es amplificado y funciona como oncogen). También es de destacarse que el rendimiento fue independiente del sexo y la edad (de 2 a 56 años) de los donadores somáticos; los cuales, padecen de lesión de médula espinal (la mayoría), hipogammaglobulinemia congénita (el de 2 años) y diabetes juvenil (de 6 años). Por último, el material murino utilizado en el primer reporte ha podido ser reemplazado por uno humano. Trabajo futuro intentará resolver la sustitución del material xeno restante y llenar todos los requerimientos de la "Current Good Manufacturer Practice" para evaluación por las autoridades reguladoras. En resumen y pendiente de la solución de estos últimos obstáculos para la aplicación clínica, la posibilidad del trasplante celular autólogo y personalizado es real. ¿Resultará tan dramático como el trasplante singénico de tejido cortical ovárico humano que culminó con un producto vivo a término?⁸ ¿Servirá del todo en medicina?

REFERENCIAS

1. Urnov FD, Miller JC, Lee Y-L, Beausejour CM et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 2005; 435: 646-651.
2. Castañeda M. Cáncer iatrogénico: obstáculos y posibilidades en terapia génica. *Acta Médica Grupo Ángeles* 2004; 2: 133-136.
3. Castañeda M. De oocitos *in vivo* a *in vitro* y a clonación. *Acta Médica Grupo Ángeles* 2003; 1: 113-116.

4. Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1952; 38: 455-463.
5. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 1962; 34: 93-112.
6. Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES et al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004; 303: 1669-1674.
7. Hwang WS, Roh SI, Lee BC, Kang SK et al. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science* 2005; 308: 1777-1783.
8. Silber SJ, Lenahan KM, Levine DJ, Pineda JA et al. Ovarian transplantation between monozygotic twins discordant for premature ovarian failure. *N Engl J Med* 2005; 352: 1056/NEJMoa043157 (on line; in press July 21).

