

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

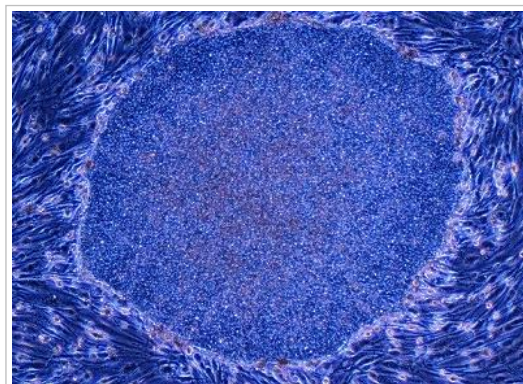


Figura 1. Célula adulta reprogramada (iPS) con función polivalente. Tomada de: Hidalgo Díaz, *ContraPunto*, 2019¹.

✉ 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-

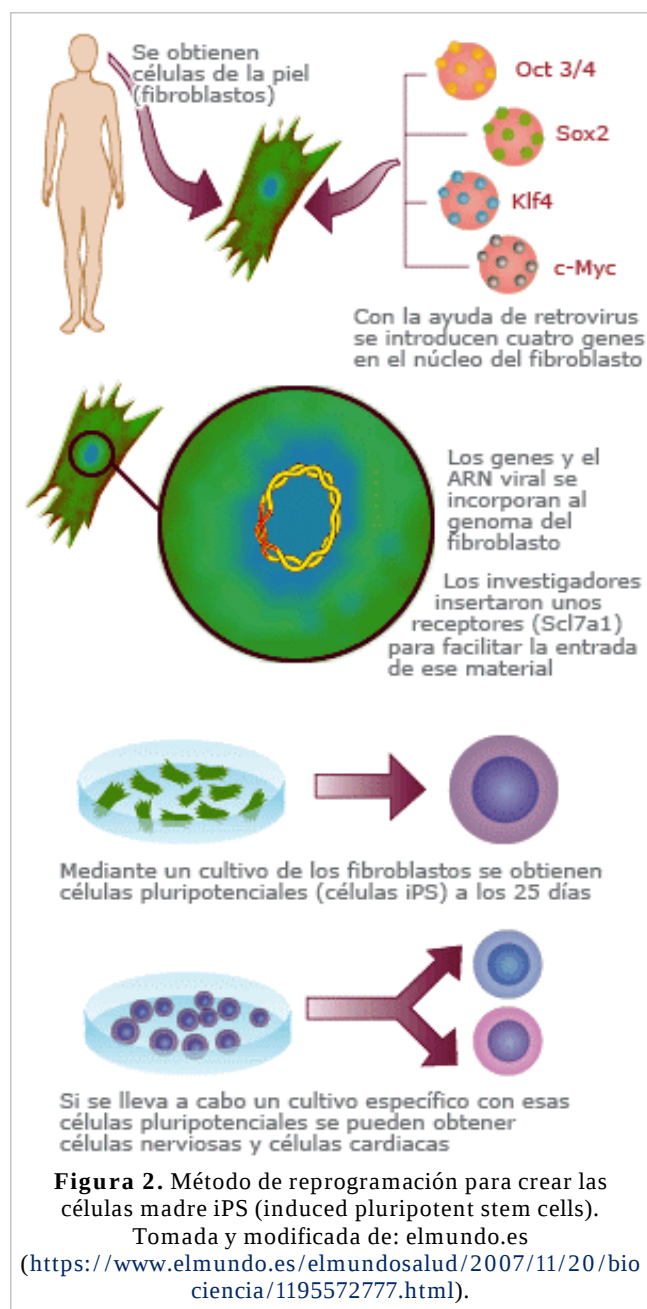
versidad de Wisconsin, que fue mundialmente reconocido por haber obtenido las primeras CM de embriones humanos, ha descubierto también este pequeño escollo de la persistencia en las células *iPS* de un pequeño segmento «del historial genético» de las células precedentes que las crearon. Pese a la gran 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/catalogo/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>

Cutting-edge trends on regenerative therapy: Induced embryonic and pluripotential stem cells, angiogenic growth factor and gene therapy

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

José R. Hidalgo Díaz^{1✉}, MD; Juan C. Chachques², MD; and Ángel Paredes Cordero³, MD

¹ Universidad de Ciencias Médicas, Havana, Cuba, and Hospital Militar Dr. Alejandro Dávila Bolaños, Managua, Nicaragua. Cardiac Bioassist Association. Paris, France.

² Pierre et Marie Curie University and Georges-Pompidou European Hospital. Paris, France.

³ Department of Cardiovascular Surgery. Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Havana, Cuba.

Este artículo también está disponible en español

ARTICLE INFORMATION

Received: December 21, 2018

Accepted: January 31, 2019

Competing interests

The authors declare no competing interests

Abbreviations

IPS: induced pluripotent stem cells

SC: stem cells

Keywords: Stem cells, Cardiovascular diseases, Therapeutics

Palabras clave: Células madre, Enfermedades cardiovasculares, Terapéutica

There is no doubt that the most recent discovery of Regenerative Medicine is iPS (Induced Pluripotent Stem cells), also called Reprogrammable Adult Stem Cells (SC), "third way cells" or Induced Pluripotency Stem Cells (**Figure 1**)¹. John Gurdon from the UK and Shinya Yamanaka from Kyoto University in Japan were awarded the Nobel Prize for Medicine precisely for their research on Stem Cells^{1,2}.

Gurdon successfully reprogrammed cells from an adult frog. The nucleus was extracted from a live frog egg and replaced by a tadpole cell. The modified egg became a normal tadpole. He undoubtedly managed to reprogram a cell². Yamanaka went much further and discovered that adult cells could be reprogrammed to create polyvalent cells, that is, pluripotent cells just like embryonic SC. He engineered four genes from a mouse embryo and then transferred them into cells taken from the skin of another mouse. Once reprogrammed, they became "polyvalent" cells that were able to continue developing into adulthood without risk of rejection³.

These polyvalent cells (iPS), which are ultimately pluripotent, can be used in

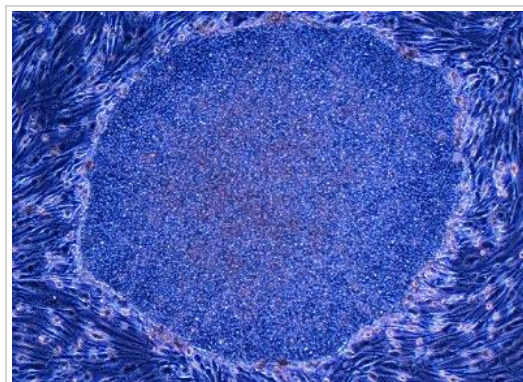


Figure 1. Reprogrammed adult cell (iPS) with polyvalent function. Taken from: Hidalgo Díaz, ContraPunto, 2019¹.

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

humans to grow heart, nerve and liver cells, among other cell lines. So, far from being mere fiction, the stunning truth is that somatic cells from humans can be reprogrammed and used in human pathological models⁴.

But iPS cells also have their drawbacks since the cells extracted from the skin and eventually reprogrammed preserve within their genome certain "latent memory" of their adult origin and that "mark" persists in any organ or tissue that is grown from them; an issue that must be addressed before using them on a large scale in the treatment of some illnesses such as neurodegenerative disorders (Parkinson and Alzheimer), diabetes, ischemic heart disease and many others. In fact, there is a specific line of research aimed at preventing these cells from ever degenerating into cancerous forms throughout their evolution course (oncogenesis)⁵.

Now then, iPS cells are obtained by "slowing down" the biological clock, that is, by reprogramming simple skin or hair cells of a patient: But they are so versatile and carry such a flexible power of transdifferentiation that their difference with embryonic SCs is practically non-existent. It will no longer be necessary to use SC extracted from the bone marrow, whether mononuclear or mesenchymal, nor will techniques such as Ficoll, apheresis, or others as controversial as the use of modified peripheral blood be used in the future. Much less will any scientist or pseudo-scientist think of grafting SC (say, from animals such as sheep) to humans; a procedure that has been practiced in clinics in the third world, using the inhabitants of these villages as guinea pigs. These cells, besides not being autologous, do not share the same human lineage⁶.

Joseph Ecker, Head of the Genomic Analysis Laboratory at the Salk Institute for Biological Studies in California, USA, has come across a completely unexpected problem. As stated above, the cellular reprogramming of skin cells that eventually transforms them into iPS does not wholly erase the genetic history that led to adulthood. The hot spots of the genome still persist in their adult state and surprisingly remain so after they are reprogrammed into iPS and in turn converted into cells of other tissue types suitable for transplantation. It is as if the "hard drive" does not completely erase their record^{1,4}.

James Thomson, the famous embryologist from the University of Wisconsin and world-renowned for obtaining the first human embryonic stem cells, has also come across this pitfall in his research, which is the persistence within iPS cells of a small segment of

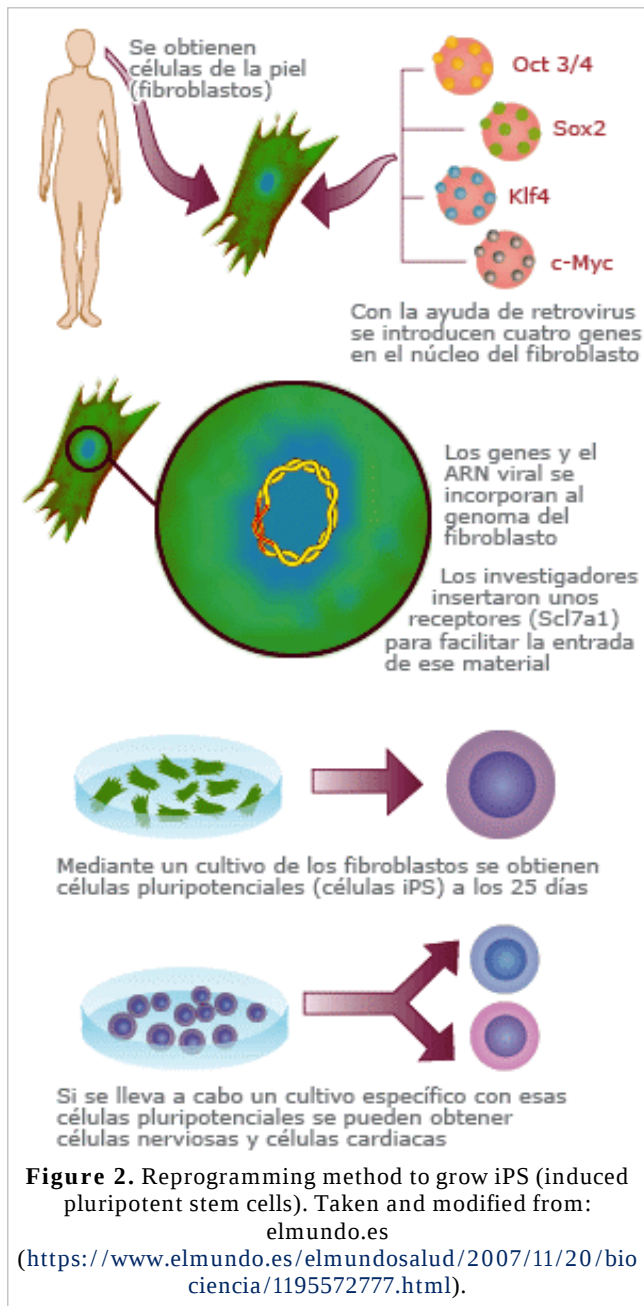
the "genetic history" belonging to the previous cells that originated them. Therefore, although iPS cells are quite promising, the research lines closest to a definitive application in regenerative therapy place embryonic stem cells as a strategically important counterpart option⁴.

The serious ethical, religious, political and even judicial problem involved in the use of iPS cells in regenerative therapy for the purpose of human procreation is well known, although the therapeutic use of embryonic stem cells is no less so, since it means the destruction of two-week old human embryos that are frozen in fertility centers in the USA, Western Europe and Asian countries that are highly developed in regenerative therapy technologies⁷.

In contrast, iPS cells do not have that problem but do have the difficulty described above when reprogrammed to create them. This problem is related to the most important area of research in Biomedicine: epigenetics. All cells during their embryonic development are assigned to a destination according to their position. They must "memorize" it as they move and proliferate, but that memory is not in their DNA sequence but in other molecules that adhere on top of them; that is why this type of biomedical research is called, epigenetics, which means above the genes⁸.

The epigenetic molecules found are histones, which are proteins, and the methyl radical-CH₃, which strongly adheres to both histones and DNA. The process of genetic methylation causes the gene in a given cell to become inactive, thus producing the inactivation of all the cells that come from it, since they also retain memory⁴.

According to Hidalgo⁴, Ecker and his team (Salk Institute, California, USA) were the ones who first examined methylomas, which are the genome methylation profiles for five human iPS cell lines maintained in culture, and compared the former with embryonic SC (telomeres) and those from other areas (centromeres) that are essential for distributing the genetic material equally between two daughter cells. Technically, according to the reprogramming method of the Kyoto University, only four genes are added to the skin cells or the five proteins produced by those genes. This is quite simple for a well-trained team (**Figure 2**) and such a regenerative therapy technique should always be done in this way if it is actually intended to be used on a large scale in human clinical practice, always in accordance to the provisions of the Declaration of Helsinki for medical research involving human subjects. However, there



are still loose ends as science advances and the problems of iPS cells in their methylation profiles or the epigenetic state of the human genome need to be solved.

It is clear that the reprogramming process is imperfect and some areas of the human genome that are methylated in the original skin cells remain methylated in the iPS cells reprogrammed from them. This does not occur in embryonic stem cells and is the most important difference found between these two types of cells, so further research is need-

ed as conservative sectors of society constantly press against the use of embryos and therefore embryonic stem cells⁴.

According to Hidalgo⁴ both the Salk Institute of California and the Center for Regenerative Medicine in Barcelona are already using retroviruses to generate iPS cells, but these cells still remain in culture for a long time and are therefore "stressed".

The implantation of these cells in cardiac surgery can be by epicardial (**Figure 3**) or intracoronary route, but transventricular is also useful, and even type-1 collagen tissue or matrix may be used to create a bioartificial myocardium, as described in the MAGNUM study (Myocardial Assistance by Grafting a New Bioartificial Upgraded Myocardium)⁹, since iPS cells can be seeded in the matrix mentioned above, prior to definitive implantation on the surface of the infarcted ventricle, as is done with autologous bone marrow cells^{9,10}. Professor JC Chachques of the European hospital Georges Pompidou in Paris, France, is currently developing a new project for "biomimetic" treatment using tissue engineering,



Figure 3. Dr. José R. Hidalgo Díaz implants stem cells directly (surgically, on February 24, 2004, at the Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular from Havana, Cuba) into the heart of a patient who had suffered a myocardial infarction. Taken from: Hidalgo Diaz⁷. CorSalud 2018;10:47-51.

where collagen is replaced by polycaprolactone (PCL), an elastomer that slowly degrades within two years¹¹. SC implanted in the PCL matrix could become in the future, a bioartificial myocardium^{9,11}.

For their part, embryonic stem cells also have their drawbacks: a) they accumulate mutations when manipulated and cultivated, b) they are immunologically incompatible with the patient to whom they are implanted, which is not the case with iPS stem cells, and c) as already mentioned, there are serious ethical controversies for their use and countless judicial problems in the control of research⁴.

Mesenchymal and umbilical cord cells are also used, but they are less likely to couple to the electromechanical system of the heart although there is no doubt about their myogenic and angiogenic power that causes thickening of the heart's fibrous eschar, achieves an "anti-remodeling" effect on the heart muscle and prevents other problems that occur in patients after a myocardial infarction. The same applies for mononuclear cells, CD-34+obtained by the Ficoll method. The echocardiogram (color-kinesis) has satisfactorily demonstrated the effect of these cells on myocardial regeneration⁷. In our opinion, other methods used, such as peripheral blood collection and its association with cell growth factors, lack any future perspective.

In addition to their use in Cardiology and Cardiovascular Surgery, and in cardiac bioassistance, SC are used for the treatment of diseases in several specialties, for example: corneal regeneration (Ophthalmology), chondrocyte implantation for joint defects (Orthopedics), islet of Langerhans transplant in diabetes mellitus (Endocrinology), Huntington and Parkinson diseases, spinal cord regeneration, Alzheimer, senile dementia, Duchenne muscular dystrophy (Neurology), hepatocytes as a bridge to liver transplantation (Gastroenterology), implantation of keratinocytes in burn patients (Dermatology and Caumatology), chronic lower limb ischemia (Angiology), chronic lymphocytic leukemia, aplastic anemia, immunodeficiencies and myeloma (Hematology).

The so-called qualitative method was initially used, but has become totally obsolete; therefore, flow cytometry is currently the appropriate method for identifying and counting the cells to be implanted. This is a quantitative, safe and effective method for such purposes, and is the one accepted by the International Association of Cardiac Bioassistance.

Regenerative therapy on extramedullary organs,

first performed in Paris, France in 2000 with the first SC heart transplant, made it clear that the problem of many conditions originates at the cellular level and therefore that is where we must maneuver in order to solve them¹². Cuba was one of the pioneers of regenerative therapy by using SC for the treatment of extramedullary diseases in humans. A team of scientists, led by Dr. José Hidalgo Díaz, transplanted SC obtained by the Ficoll method into an infarcted heart on February 27, 2004, at the Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular from Havana, Cuba; being in fact the first application of this procedure in our country, in Central America and the Caribbean. The members of this team were, in addition to Dr. Hidalgo who led it, Doctors Ángel Paredes, Consuelo Macías, Elvira Dorticós, José Manuel Ballester, Alberto Hernández Cañero and Porfirio Hernández, among others, all members of the Grupo de Terapia Regenerativa del Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular y el Instituto de Hematología de Cuba⁷.

Some experimental tests on animals had been previously performed at the Broussais Hospital in Paris, France, under the direction of Professor J. C. Chachques, who was leading the most important project of Regenerative Therapy in the European Economic Community (*Contrat Commission Européenne* ERB 4001GT957737) related to the use of SC in humans⁷. The preliminary preclinical results were presented in the Intercontinental Cardiology journal in 2001¹³, by Chachques, Hidalgo Díaz and other collaborators, from the Departments of Cardiovascular Surgery of the *Hôpital Georges Pompidou and Broussais*, Paris, France. This was the first time in America that there was talk of research on SC.

On the other hand, angiogenic or vascular endothelial growth factor (VEGF-cells) is proposed for patients with myocardial infarction by means of percutaneous or surgical revascularization¹²⁻¹⁴. This method has been studied in experimental animals at a number of institutions, one of which is the experimental surgery center of the European Georges Pompidou Hospital in Paris⁸. In one of its published works, an experimental myocardial infarction by ligation of two coronary arteries was induced. Three weeks later, the animals were randomized into four groups (control, autologous myoblast implant, VEGF-cells and both). The evaluation included an immunohistological study for quantitative analysis of capillaries three months after surgery, and concluded that there was improvement in the left ventricular ejection fraction, reduction of post-ischemic remodel-

eling and angiogenesis in the group where VEGF-cells were used, thus paving the way for further in-depth research⁸.

Author's note

With this article we make a special tribute to Dr. Abelardo Ramírez Márquez (*may he rest in peace*), who devoted all his strength in advancing this novel and futuristic therapy in Cuba since its beginning; and to Professor and Doctor Jesús Herrero (*may he rest in peace*), Head Director of the Fundación de Ingeniería Biomédica y Tecnologías Sanitarias de España.

REFERENCES

1. Hidalgo Díaz J. Las células madre y sus debates: nociones muy básicas. ContraPunto [Internet]. 2019 [cited 18 Dic 2018]. Available at: <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 [cited 18 Dic 2018]. Available at: <http://www.temas.cult.cu/catalejo/las-c-lulas-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 [cited 20 Dic 2018];10(1):47-51. Available at: <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 [cited 20 Dic 2018];1(6): e005652. Available at: <https://www.ahajournals.org/doi/pdf/10.1161/JAHA.112.005652>