

## Para crear una medicina regenerativa hay que “releer la evolución”

*To create a regenerative medicine it is necessary to “reread evolution”.*

“... moléculas como las del ADN son moléculas que tienen una historia y que, con su estructura, nos hablan del pasado en el que se han constituido. Son fósiles, o, si se prefiere, testigos del pasado, ...  
... ¿Cómo se imprime el tiempo en la materia? *En definitiva, esto es la vida, es el tiempo que se inscribe en la materia, y esto vale no sólo para la vida, sino también para la obra de arte.*”

ILYA PRIGOGINE  
“*El nacimiento del tiempo*”

### INTRODUCCIÓN

Los médicos conocemos poco o nada de la así llamada “biología evolutiva”, porque se ha desarrollado separada y con poca o ninguna interacción con la “medicina”. Esta brecha se debe tanto a que los biólogos evolucionistas conocen poco o nada de la medicina como al hecho de que los médicos conocen poco o nada de biología evolucionista.

La biología evolutiva alejada de las escuelas de medicina y de su enseñanza parece más dedicada a los estudios paleontológicos de la evolución humana con la sistematización de los registros fósiles en los áridos museos y últimamente se ha utilizado como herramienta de genética poblacional. (1)

Sin embargo, ahora, imprevistamente, nos impacta reconocer que los alelos que causan la anemia de células falciformes, la talasemia y otras hemoglobinopatías, que con lógica calificamos hoy como alteraciones genéticas que producen enfermedades, se desarrollaron por la selección natural evolutiva en aquellos territorios en los que existía el paludismo. ¿Y por qué sucedió esto? Porque casualmente esta condición genética confería “resistencia” contra *Plasmodium falciparum*, agente etiológico de la malaria. Es decir, en ese momento protegía de una enfermedad infecciosa muy preponderante; por lo tanto, lo que en nuestro actual medio ambiente sin malaria produce enfermedad (anemia), en el medio ambiente previo con paludismo protege de una enfermedad grave (malaria). Quizás Dobzhansky tenía algo de razón cuando decía: “*nada en medicina tiene sentido salvo a la luz de la evolución*”. (2)

El núcleo del problema es que en medicina nos explican minuciosamente el mecanismo próximo de la enfermedad corporal, el “cómo” funciona (cómo el colesterol-LDL aumentado genera la aterosclerosis, cómo son las distintas presentaciones del feto en el parto, cómo...), y la explicación evolutiva olvidada se refiere a “por qué” la selección natural, considerando

nuestra historia como especie, ha dejado el cuerpo vulnerable a las enfermedades predominantes (por qué nuestras arterias actuales son proclives a la obstrucción por ateromas, por qué tenemos un canal de parto estrecho, por qué...), con la escasa excepción de algunos defectos genéticos únicos.

La pregunta por el “mecanismo próximo” es ¿cómo hace la ontogenia, o el desarrollo de nuestro ciclo de vida, para que el mecanismo funcione? A su vez, la pregunta por la “selección evolutiva” es: ¿por qué la filogenia, el trazado de la historia de la evolución humana, ha adaptado y adoptado los rasgos que, en la interacción con el medio ambiente, nos confiere una ventaja o desventaja selectiva? (3)

Consideremos otro problema real sobre lo que llamamos “normal” o “anormal”. Tradicionalmente, la medicina nos habla del *anormal* “síndrome de intolerancia a la lactosa” y lo cataloga como una enfermedad; pero esto podría cuestionarse si conociéramos que, en realidad, el 70% de la población mundial es intolerante a la lactosa y en un contexto poblacional en el cual no se consume lactosa esa situación es *normal* y además no produce ninguna enfermedad.

Conozcamos un poco más de la ontogenia y la filogenia de la intolerancia a la lactosa. El intestino del infante expresa el gen de la lactosa y permite el amamantamiento, pero cesa de expresarlo luego del destete. A su vez, hasta el comienzo del período neolítico los humanos adultos no necesitaban digerir lactosa para su nutrición; recién hace aproximadamente 8.000 a 10.000 años en el Oriente Medio, junto con el cultivo del trigo, las poblaciones asentadas comienzan con la cría de animales domésticos, entre ellos las especies de las que se podía extraer leche. En ese momento, la mutación para promover el gen de la lactosa que permitía que su expresión persistiera a lo largo de la vida comenzó a darles a los que ingerían leche una ventaja nutricional. Esta ventaja selectiva conferida por esta mutación llevó a un rápido crecimiento poblacional, con una fuerte presión migratoria con rápida diseminación de la mutación a lo largo de la población europea hace unos 8.000 años. Como prueba de la adaptación que produce la selección evolutiva, también conocemos que en África aparece una mutación diferente, pero igualmente efectiva, mucho más tardíamente, hace 2.000 años, cuando allí se desarrolla el ganado doméstico. De ello resultó que las poblaciones que descienden de africanos y europeos pueden digerir la lactosa a lo largo de su vida, mientras que los mayoritarios descendientes de aborígenes australianos, de Oceanía y Asia, que no estuvieron expuestos a una carga alta de leche luego del destete, tienen síntomas gastrointestinales cuando ingieren lactosa. (3)

A veces hay que ser cuidadoso al hacer interpretaciones, ya que podría resultar que la causa de la *incidencia* de “*enfermedad en la población*” puede pasar desapercibida, cuando los factores que la inducen están muy generalizados, como enfatizó Geoffrey Rose que sucedería si se analizara con los diseños de estudios de causa de *casos* o “*enfermedad en los individuos*”. Como Rose ha advertido, “*si todo el mundo fumara 20 cigarrillos por día, entonces los estudios clínicos, de caso-control y de cohorte del mismo modo nos llevarían a concluir que el cáncer de pulmón sería una enfermedad genética*” y no una pandemia atribuida a fumar cigarrillos como es en realidad. (1) Ésta sería una de las explicaciones de por qué la presencia masiva de aterosclerosis e hipertensión actuales, generada por nuestro modo *globalizado* de alimentación, que produce los niveles actuales extremadamente altos de colesterol e ingesta de sodio en casi todas las personas, en comparación con las poblaciones del período paleolítico, pueda estar infravalorada en el análisis de “*enfermedad en los individuos*”. (4) En esta situación, estos factores sólo podrían explicar en forma parcial por qué los individuos se van a enfermar en un análisis comparativo dentro de la comunidad, donde las diferencias no son tan extremas, lo que deja ocultos los mecanismos evolutivos de la alta incidencia poblacional de hipertensión y aterosclerosis y de esta forma retrasa la necesaria implementación de medidas colectivas.

Pero otra cosa que debemos tener bien en claro es que el mecanismo de “*selección natural*” descrito por Darwin y Wallace facilita la aptitud reproductiva -la habilidad para sobrevivir hasta la madurez reproductiva y entonces hacer surgir y sustentar a la descendencia- de nuestros antepasados, y no es un mecanismo biológico para eliminar la enfermedad, el sufrimiento o la muerte.

La selección natural modela nuestra “*estrategia de forma de vida*”, ya que en la utilización de la energía corporal total compite la energía que se desvía hacia el proceso de “*reproducción*” con la que se dirige a la “*reparación*” del daño que el tiempo (léase envejecimiento) produce en las moléculas proteicas, células y órganos.

Dado que durante el desarrollo acumulamos un exceso de capacidad fisiológica, ya que, por ejemplo, es bien conocido que tenemos muchas más nefronas y más hepatocitos que los necesarios para una función renal y hepática normal, esto permitió acuñar una metáfora de la economía corporal, que clarifica la visión evolutiva del envejecimiento y a la que se llamó “*capital fisiológico*”. Debido a que los procesos de reparación y mantenimiento no son perfectos, consumimos ese capital durante nuestra vida, y una vez acabado nuestro capital, padecemos enfermedades y eventualmente morimos. Esta metáfora nos permite comprender que incorporamos dos estrategias en el desarrollo de nuestra vida humana: por un lado, el incremento de nuestro capital fisiológico que se consigue con una buena nutrición e higiene prenatal y durante los primeros años de vida y, por el otro, el enlentecimiento de la depleción

de ese capital fisiológico por la capacidad de reparación (nutrición adecuada del adulto, especialmente micronutrientes) y la reducción de la exposición a agentes que incrementan el daño somático (tabaco, alcohol, sal, dieta grasa y con gran cantidad de calorías). (5)

### ¿REGENERACIÓN DE ÓRGANOS?

Ya pasaron más de 240 años desde que Spallanzani, en 1769, escribiera el primer tratado científico donde se habla de la “*Reproducción de las Piernas en la Salamandra Acuática*” en “*Un Ensayo Sobre la Reproducción de los Animales*” y aún más años desde que Abraham Trembley, al disecar y vigilar hidras que descubrió nadando en un arroyo cercano a la Haya, en 1740, observó cómo se regeneraban bajo el microscopio. A pesar de los notables avances de la biología y la medicina, muchos de la mayoría de los notables rasgos de la regeneración de miembros delineados por Spallanzani aún hoy permanecen en el misterio. (6)

Además de la regeneración del miembro de un anfibio como la salamandra acuática, también conocemos que el pez cebra tiene la capacidad de regenerar varios órganos y hasta su corazón dañado. La potencialidad de regenerar miembros y corazones dañados parece un cuento de ciencia ficción. (7)

Sin embargo, la capacidad de los humanos, que sólo podemos regenerar grandes partes del hígado y el páncreas y reparar en forma limitada el músculo esquelético y el sistema nervioso periférico, palidece si se compara con la asombrosa habilidad que tienen los anfibios y los peces de reparar la mayoría de sus órganos, incluidos el cristalino, la retina, el músculo cardíaco y el sistema nervioso central, además de recrear miembros y aletas amputadas.

En los mamíferos, como nosotros, el hígado es uno de los pocos órganos que tiene una capacidad notable para restaurarse completamente por sí mismo después de una pérdida significativa de tejido hepático, ya sea debido a una hepatectomía parcial o una lesión hepática aguda. Este magnífico potencial regenerativo del hígado posiblemente se conozca desde hace miles de años, como está reflejado en la mitología griega de los tiempos clásicos con el mito de Prometeo. Habiendo robado el secreto del arte del fuego a los dioses del Olimpo, que entregó a los habitantes de la tierra, Prometeo fue condenado por Zeus -y encadenado por Hefesto en las montañas del Cáucaso- a la tortura de que su hígado fuera devorado cada día por un águila. Pero como su hígado se regeneraba durante la noche, esto hacía que mientras el águila se daba un banquete eterno, Prometeo sufría una tortura eterna. (8)

La regeneración del hígado después de una hepatectomía parcial está mediada por la proliferación de las distintas células maduras residentes en el hígado (hepatocitos, células del endotelio, células del epitelio biliar, células hepáticas estrelladas, células de Kupffer) hasta restaurar el tejido hepático perdido. Sin embargo, no fue sino en estos últimos años que nos hemos dado

cuenta de que, a fin de dividirse, incluso una célula del hígado tiene que diferenciarse hacia atrás, para pasar de un estado posmitótico hacia el ciclo celular mitótico. (9)

Llegado a este punto, podríamos hacernos unas pocas preguntas, como las siguientes.

¿Qué pueden aprender los científicos de estas simples criaturas, como la salamandra acuática o el pez cebra? ¿Por qué no han retenido los mamíferos, excepto en algunos tejidos como el hígado, esta propiedad notoriamente útil en el curso de la evolución? ¿Una perspectiva evolutiva sobre los mecanismos utilizados por estos “humildes” seres puede darnos una pista de la estrategia necesaria para la regeneración de los tejidos humanos? ¿Podría utilizarse la generación de abundantes células diferenciadas específicas del paciente para la terapia celular, para dilucidar los mecanismos de enfermedad o para la búsqueda de drogas terapéuticas? Estudios recientes sugieren que esto es posible y lo desarrollaremos a continuación. (10-13)

### REGENERACIÓN DE MIEMBROS AMPUTADOS

La capacidad de los anfibios, como las salamandras acuáticas, de regenerar un miembro entero después de la amputación ha atraído la atención de los científicos por siglos, con la esperanza de que fuera posible reproducir en los humanos esta utilísima habilidad. En los últimos años, trabajos pioneros con estas especies han aportado muchos puntos de vista seminales. (12, 13)

Siguiendo a la amputación, el miembro de la salamandra acuática sangra sólo un tiempo breve y comienza rápidamente el importante proceso de curación de la herida que llevará a la regeneración del miembro. En apenas 24 horas, si no se sutura la piel, la superficie del corte queda completamente envainada por células de la “epidermis de la herida”, que proliferan y migran hacia la superficie del muñón formando el “casquete epidérmico apical” (CEA). Se ha postulado que esta estructura inicial permite señales moleculares claves necesarias para estimular y mantener las etapas precoces de la regeneración, ya que si la piel es suturada no se forma un CEA y el miembro queda como un muñón residual definitivo. Otra evidencia de la importancia de este paso viene de la medicina humana: en niños pequeños con amputación distal de los dedos puede ocurrir una regeneración perfecta de la punta del dedo, pero esto ocurre únicamente si no se sutura la piel del muñón. (6)

El paso crítico siguiente es la creación de un blastema, o agregado celular, del cual se desarrollará un nuevo miembro. Las células del extremo distal del muñón forman una excrecencia transparente debajo del CEA, que prolifera en forma de cono.

Se pensó por mucho tiempo que el blastema comprendía un grupo de células multipotentes que tenían que especializarse nuevamente. Sin embargo, sorpresivamente, los últimos estudios destacados de rastreo de linajes han mostrado que las células no son

pluripotentes, sino que cada tejido produce células progenitoras con potencial restringido. Por lo tanto, el blastema es una colección heterogénea de células progenitoras restringidas, la identidad posicional es una propiedad específica de cada tipo de célula del blastema; en su lugar permanecen células dedicadas al cartílago, hueso, nervio y músculo. (14) Un paso crítico en este proceso de regeneración del miembro es la adquisición de la potencia de proliferar. Esto se logra por la reentrada en el círculo celular de células posmitóticas que retienen su identidad específica. Un proceso similar se observa en la regeneración cardíaca del pez cebra. (13)

La regeneración del miembro por el blastema implica la vuelta a crecer de una diversidad de tejidos en sus posiciones y proporciones apropiadas. Este proceso complejo es dependiente de la inervación (en el miembro desnervado el blastema no prolifera lo suficiente y falla la regeneración, que se puede rescatar reemplazando el nervio con una única proteína nAG, una molécula de superficie celular que se expresa gradualmente en el eje proximal-distal del miembro de la salamandra) y requiere la orquestación de una interacción dinámica de las células. (12)

El proceso finaliza con el achatado y formación -como paleta de pintor- del brote del miembro, con un vago diseño que permite discernir los futuros dedos. El desarrollo final es la reconstrucción de un miembro igual al amputado, con los nuevos vasos y los finos nervios integrados sin solución de continuidad a las estructuras existentes en el muñón, quedando con una morfología y función indistinguible del resto de los miembros. (6)

Si un animal pierde un pie le volverá a crecer solamente el pie que le falta y no más; si pierde el miembro desde el nivel del muslo, le volverá a crecer todo el faltante que una vez estaba distal al plano de amputación del muslo.

¿Cómo se genera esta ingeniería de reconstrucción perfecta? ¿Se debe al contexto donde prolifera o a una especie de “memoria” celular? Algunas de estas claves se pudieron aclarar con experimentos de “injerto de blastema”.

Cuando se injertó a un blastema proximal del “muslo” un blastema distal “destinado” a hacer un pie, traslocado distalmente al miembro del huésped, se da nacimiento a un miembro completamente regenerado que tiene dos pies. De manera alternativa, si un blastema proximal se injerta al blastema proximal del huésped, la salamandra regenerará dos piernas perfectas y completas. Por lo tanto, es como si cada blastema “recordara” su cometido y la información de la posición proximodistal estuviera codificada dentro de las células del blastema.

Existen otros experimentos en que el blastema es sin ninguna duda una unidad autónoma y, una vez creado, puede solamente atenerse a la información subyacente en el tejido pero no en la información contextual, ya que si un blastema proximal de un miembro

es injertado en un campo receptivo como el ojo de una salamandra, de la cuenca del ojo crecerá un miembro.

Otro punto de discusión interesante es que si bien es conocido que una salamandra acuática puede regenerar múltiples órganos a lo largo de su vida, comparativamente, una rana sólo puede regenerar sus miembros mientras está pasando por el estado de renacuajo y gradualmente pierde la capacidad de regenerarlos cuando se aproxima a la etapa final de la metamorfosis.

Comprender el mecanismo celular y molecular que le permite a una salamandra crear y desarrollar un blastema o la simple comparación de un renacuajo en la etapa regenerativa *versus* el renacuajo que en la etapa tardía no puede regenerar su cola, permitiría ayudar al desarrollo de terapias para mejorar la capacidad de regeneración en animales, como nosotros, que no la tenemos.

### ¿LA BIOLOGÍA EVOLUTIVA NOS PUEDE EXPLICAR LA INHIBICIÓN DEL CICLO CELULAR?

Algunos han sugerido que la pérdida de la potencialidad regenerativa de los mamíferos durante la evolución, con el avance de la complejidad, se debería a que se requiere el gobierno de un vasto número de linajes celulares, la integralidad de las formas y el mantenimiento de un plan corporal estable y esto implicaría una negociación para la protección de la proliferación de células desorganizadas en estos seres multicelulares complejos, que producirían cáncer.

Pero, ¿qué pasaría si, como en las salamandras acuáticas o en los peces, las células humanas que no se dividen y están completamente “diferenciadas” y por lo tanto especializadas a tareas específicas, se pudieran volver “indiferenciadas” (desdiferenciadas) al ser empujadas *hacia atrás sólo un paso* y así nuevamente entrar en un estado de proliferación, mientras retienen su identidad o “sentido de sí mismas”? Estas células podrían producir copias precisas de ellas mismas capaces de regenerar los tejidos dañados de los cuales surgieron.

Un paso crucial probablemente sería suprimir la inhibición de la proliferación celular y esto implicaría, como un autor lo ha llamado, “levantar los frenos” en la división celular. Pero hay que “levantar los frenos” sólo transitoriamente, para así evitar una proliferación incontrolada con la potencial formación de tumores.

Para lograr la “desdiferenciación”, ¿puede tener un papel la inhibición transitoria de los inhibidores tumorales?

El supresor tumoral Rb -codificado por el gen del retinoblastoma- es conocido como el “guardabarrera” eucariota que inhibe la fase de síntesis con replicación del ADN del ciclo celular (G1-S). La inactivación del Rb permite la regeneración del miembro en la salamandra acuática. (15) Pero, en contraste, en los mamíferos la pérdida del Rb no lleva a que las células se desdiferencien (p. ej., las células primarias del músculo esquelético). (11, 16)

¿Cuál sería entonces, en los mamíferos, el freno adicional que impide la reentrada en el ciclo celular?

Los que se dedican a la biología del cáncer ya han definido una función crítica para la proteína “*alternative reading frame*” (ARF) (también conocida en ratones como p19ARF y en humanos como p14ARF), que es un producto del *locus* supresor de tumor ink4a de los mamíferos.

La función del ARF es mantener detenido el ciclo celular, para de esa manera prevenir la formación de tumores cuando el Rb es inactivado.

Se conoce que en los cánceres humanos el ARF frecuentemente está inactivado. (17) Aun las células maduras diferenciadas se vuelven indiferenciadas cuando el ARF está inactivado si además están expuestas a señales anormalmente altas de factores de crecimiento. (18) En la evolución, el ARF no tiene ningún homólogo en los vertebrados regenerativos; en efecto, el ARF no se ha identificado en el desarrollo evolutivo en organismos más inferiores que los pollos. (19)

En consecuencia, el ARF se ha postulado como el otro culpable del “freno” para reentrar en el ciclo celular. Es notable que la transferencia de microARN -cortos ARN no codificantes que actúan como reguladores negativos de la expresión genética- inhibe tanto el Rb como el ARF y, por lo tanto, el núcleo de las células inicia la síntesis de ADN.

Así, la doble caída de estos dos supresores tumorales (Rb y ARF) supera el bloqueo a la reentrada del ciclo celular. (11)

Recientemente, a un microARN, titulado miR33, se le reconoció la propiedad de inhibir la expresión de la “*cyclin-dependent kinase 6*” (CDK6) y la “*cyclin D1*” (CCND1), lo que causa la detención de la progresión del ciclo celular en la fase G1 y la proliferación celular. Inversamente, inhibiendo el miR33 se incrementa la expresión del mRNA de la CDK6 y CCND1 y se promueve la proliferación celular. (20)

### ¿SE PUEDE HACER REENTRAR UNA CÉLULA MONONUCLEAR AISLADA EN EL CICLO CELULAR, COMPLETAR LA MITOSIS Y PROLIFERAR?

La pregunta crítica que encabeza esta sección se puso a prueba en células musculares diferenciadas conocidas como miocitos, que no pueden reentrar en el ciclo celular a pesar de exponerlas a una andanada de “factores de crecimiento”. Para demostrar en forma definitiva que una célula posmitótica diferenciada puede iniciar la división y proliferar, fue esencial que un grupo de investigadores de la Universidad de Stanford crearan un instrumento para poder seguir miocitos individuales. (11)

Para ello utilizaron miocitos vivos individuales que fueron circunscriptos y cortados utilizando láser, el cual fue entonces reorientado para producir la energía necesaria para catapultar el miocito individual, fuera de su membrana, dentro de una cápsula de la cual la célula viva capturada fue retirada y sembrada en cultivo.



Si los miocitos individuales no eran tratados sobrevivían y se arrastraban fuera de sus membranas pero nunca se dividían. Por el contrario, los miocitos que eran tratados con microARN inhibitorios, focalizados para reducir transitoriamente la actividad del Rb y el ARF, se dividieron, proliferaron y dieron nacimiento a colonias. Los clones así obtenidos con esta “doble caída” temporaria retuvieron su identidad y eran funcionales. Tiempo después, las células se diferenciaron en los cultivos y volvieron a expresar Rb y ARF.

Además comprobaron que, introduciendo estos miocitos en un miembro dañado de ratón, las células repararon el daño. Estos hallazgos sugieren que células de mamíferos “diferenciadas terminalmente” pueden ser “indiferenciadas” a un estado proliferativo, reteniendo su identidad y sin producir tumores al transformarse. (11)

### ¿POR QUÉ LA INDUCCIÓN DE REGENERACIÓN DE LOS TEJIDOS POR DESDIFERENCIACIÓN CELULAR PUEDE SER UN MÉTODO ÚTIL PARA LOS HUMANOS?

Ya hemos discutido extensamente que la regeneración de la mayoría de los tejidos de los mamíferos es en extremo limitada. Si bien la fuente regenerativa de las células madre adultas parece ausente en algunos tejidos, otros albergan a estos precursores quiescentes, que son estimulados a dividirse para reparar el daño cuando fuera necesario; pero la población de las células madre adultas es muy pequeña para alimentar una regeneración significativa.

Por muchos años se creyó que el corazón adulto, como otros órganos, era un órgano posmitótico con sólo células completamente diferenciadas que necesitaban sobrevivir a lo largo de la vida, sin la posibilidad de formar nuevas células vasculares o miocárdicas debido a la inexistencia de células madre. Pero en años recientes se identificaron diferentes clases de células progenitoras cardíacas (CPC) que cambiaron el paradigma de la biología del corazón; en algunos estudios se identificó la existencia de células madre cardíacas humanas (hCSC) como células marcadas positivamente *C-kit*<sup>POS</sup>, que abarcan el  $1,1 \pm 1,0\%$  de toda la población celular cardíaca. (21) También se invocaron como fuente sustituta las células madre embrionarias o, interesantemente, células multipotentes inducidas. (22)

Por otro lado, la desdiferenciación de las células del propio tejido dañado podría servir como una alternativa muy viable, porque las células serían abundantes, conocerían su identidad, tendrían las propiedades deseadas del tejido y se localizarían exactamente donde son necesarias.

Si se aplicara la desdiferenciación para la inducción, por ejemplo, de proliferación de cardiomiocitos sanos e integrados en la vecindad del tejido miocárdico infartado, se podría potencialmente producir células de identidad apropiada, con el resultado de una regeneración del verdadero tejido miocárdico, en lugar de fibrosis o angiogénesis. ¿Se podría lograr esto por supresión

transitoria del Rb y ARF, reproduciendo un proceso que la naturaleza ya utiliza en las especies que regeneran sus órganos y, por lo tanto, ya se conoce que funciona?

Una duda que debería intranquilizarnos es que la naturaleza tiene presumiblemente buenas razones para restringir la promiscuidad de la proliferación. Por lo tanto, debe ser crítico lograr una desdiferenciación controlada, haciendo que la pérdida de la supresión tumoral sea solamente temporaria.

Otra aplicación mayor de la desdiferenciación sería la obtención de células (cardiomiocitos, células del islote pancreático, neuronas dopaminérgicas y otras) de tejidos humanos por biopsia o en la necropsia, que podrían ser inducidas, por la supresión del Rb y ARF, a reentrar en el ciclo celular, proliferar y de esa manera deberían replicar estrechamente, *in vitro*, el fenotipo de su enfermedad de origen (Parkinson, Alzheimer, diabetes, ciertas enfermedades cardíacas), porque al realizar sólo un paso hacia atrás mantienen su identidad. Además, la potencialidad de este modelo de enfermedad *in vitro* permitiría, por ejemplo, la búsqueda de drogas específicas.

La replicación de una célula de naturaleza definida puede resultar más fácil, en algunos casos, que intentar dirigir una célula madre multipotente inducida (*induced pluripotent stem cell* -iPS-) para que adopte el fenotipo especializado que se desea. Es posible que las células derivadas por desdiferenciación, como se describió aquí, complementen, como fuentes de terapia celular, la utilización de células madre embrionarias multipotentes, células iPS, células madre del tejido específico adulto y aun a una especie de alquimia moderna, con reconversión o reprogramación del destino de células somáticas maduras a otros destinos celulares. (23)

También es posible que existan mecanismos mixtos; por ejemplo, en el implante de células progenitoras o madre cardíacas humanas (CPC, hCSC), además de su afinamiento directo, gran parte de la regeneración se debería a una acción paracrina de estimulación de las células madre residentes o aun la entrada en el ciclo cardíaco de células diferenciadas, como veremos en la discusión sobre los recientes ensayos clínicos en fase 1 con células madre o progenitoras cardíacas autólogas.

### ÚLTIMAS NOTICIAS

Escribiendo el artículo me sorprende agradablemente la publicación muy reciente del estudio SCIPPIO y el hallazgo *on line* en *The Lancet* del ensayo clínico CADUCEUS, ambos estudios de seguridad y para “prueba del concepto” (*proof-of-concept*) del implante y regeneración de cardiomiocitos humanos.

#### SCIPPIO

#### (Stem Cell Infusion in Patients with Ischemic cardiomyopathy) (24)

Pacientes con disfunción del ventrículo izquierdo crónico isquémico-necrótico (FEy < 40%), antes de realizar la cirugía

coronaria fueron enrolados a tratamiento o control. Durante la cirugía se reseccó el apéndice de la aurícula derecha, que se utilizó para aislar y expandir las CSC. A los 16 pacientes asignados al grupo tratamiento, casi 4 meses más tarde, se les infundió por vía coronaria 1.000.000 de CSC autólogas que expresaban el receptor de superficie tirosina kinasa c-kit; 7 pacientes sirvieron como grupo control.

A los 4 meses, la fracción de eyección aumentó del 30,3% al 38,5% ( $p = 0,001$ ) en los pacientes tratados, mientras que en el grupo control no cambió (30,1% vs. 30,2%). En 8 pacientes con seguimiento a 1 año, la fracción de eyección se incrementó aún más, 12,3% de aumento absoluto (FEy 42,5%;  $p = 0,0007$ ). En los 7 tratados que se pudo realizar RMN cardíaca, el tamaño del infarto disminuyó, de 32,6 g, unos 7,8 g (24%) a los 4 meses ( $p = 0,004$ ) y 9,8 g (30%) al año ( $p = 0,04$ ).

Estos resultados iniciales son muy alentadores, dado que sugieren que la infusión coronaria de CSC autólogas es efectiva para mejorar la función sistólica del ventrículo izquierdo y reducir el tamaño del infarto en pacientes con miocardiopatía crónica grave luego de un infarto.

## CADUCEUS

### (Cardiosphere-Derived aUtologous stem Cells in reverse ventricUlar dySfunction) (25)

Pacientes con IAM -luego de 1,5 a 3 meses- y fracción de eyección del 25% al 45% fueron asignados en una proporción 2:1 a recibir por infusión coronaria en la arteria relacionada con el infarto células autólogas derivadas de cardioesferas (17 pacientes) o a cuidado estándar (8 pacientes).

La inyección en un período de convalecencia del IAM se explica porque la muestra para biopsia endomiocárdica se toma entre la segunda y la cuarta semana del inicio del infarto y luego a las propias células cultivadas "in vitro" les lleva cerca de 4 semanas crecer hasta tener el volumen buscado de 25 millones de población celular, para poder infundirlas.

A los 12 meses, el tamaño de la zona con necrosis por RMN disminuyó un 12% en valores absolutos *versus* nada en el control ( $p = 0,007$ ) y la masa de necrosis promedio decreció 13 gramos (42% relativo) con respecto al basal en pacientes que recibieron las células cardíacas derivadas ( $p = 0,003$ ), con un incremento no significativo de 0,9 gramos en el grupo control ( $p = 0,02$  entre los grupos). Es importante notar que la cantidad de la masa de miocardio viable se incrementó (22 g) cerca del 60% más que el achicamiento de la cicatriz necrótica, lo que sin duda sugiere que la reversión de la lesión había tenido lugar y explica la restauración de parte de la masa ventricular izquierda en los pacientes tratados con células.

Su investigador principal, Eduardo Marban, señaló: "Nuestro gran hallazgo con este estudio es muy simple: éste es el primer estudio que ha demostrado regeneración terapéutica del corazón... Eso nunca se había hecho antes, y ciertamente ha sido nuestra fantasía médica por décadas".

Por supuesto, como dice el editorial acompañante, investigaciones adicionales que "impliquen más pacientes, seguimiento más largo y un verdadero brazo placebo se necesitarían para confirmar la seguridad y eficacia de la terapia celular derivada de cardioesferas". (26)

Si bien ambos estudios fueron diseñados para evaluar cómo las hCSC autólogas regeneran nuevo tejido miocárdico por diferenciación directa, otras evidencias experimentales, sin embargo, apoyan la idea de que el mecanismo podría ser indirecto, ya que tanto el contacto físico y los factores paracrinos estimulan y activan caminos de reparación y regeneración seguros quizás con beneficios más duraderos. (27)

## CONCLUSIONES

Para concluir, podemos afirmar que es verdad lo que plantea el título: "para crear una medicina regenerativa hay que releer la evolución".

Ahora conocemos que para trasladar la potente capacidad de regeneración de la salamandra acuática y el pez cebra a los humanos, se debe inhibir en forma transitoria y simultánea el obstáculo crítico de los dos supresores tumorales, llamados ARF y Rb.

El descubrimiento del mecanismo que la evolución había diseñado y utilizado previamente en vertebrados inferiores, para adaptarlo al hombre de evolución posterior, es una aventura fascinante; ya que este mecanismo de "desdiferenciación" puede ayudar a proporcionar mayor comprensión sobre las enfermedades humanas, quizás llevar al descubrimiento y desarrollo de drogas y, sobre todo, diseñar una nueva técnica para intentar la regeneración de nuestros tejidos dañados.

Por último, voy a utilizar la frase final del comentario de Blau y Pomerantz, (10) porque me parece imposible mejorarla en la irónica elegancia de su doble sentido: "Quizás las salamandras acuáticas puedan dar a los humanos, igual que a sí mismas, una mano".

**Dr. Hernán C. Doval**<sup>IMTSAC</sup>

Editor Consultor de la Revista Argentina de Cardiología

## BIBLIOGRAFÍA

1. Perlman RL. Evolutionary biology. A basic science for medicine in the 21st century. *Perspect Biol Med* 2011;54:75-88.
2. Tajer C. Medicina evolucionista y problemas cardiovasculares. *Rev Argent Cardiol* 2010;78:533-9.
3. Gluckman PD, Low FM, Buklijas T, Hanson MA, Beedle AS. How evolutionary principles improve the understanding of human health and disease. *Evolutionary Applications* 2011;4:249-63.
4. Doval HC. La selección genética programó nuestra alimentación. ¿Deberíamos volver a la comida del hombre del paleolítico? *Rev Argent Cardiol* 2005;73:244-8.
5. Nesse RM, Stearns SC. The great opportunity: evolutionary applications to medicine and public health. *Evolutionary Applications* 2008;1:28-48.

6. Whited JL, Tabin CJ. Limb regeneration revisited. *J Biol* 2009;8:5.
7. Von Harsdorf R. Can cardiomyocytes divide? *Heart* 2001;86:481-2.
8. Ankoma-Sey V. Hepatic regeneration- Revisiting the myth of Prometheus. *News Physiol Sci* 1999;14:149-55.
9. Michalopoulos GK, De Frances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-5.
10. Blau HM, Pomerantz JH. Re“evolutionary” regenerative medicine. *JAMA* 2011;305:87-8.
11. Pajcini KV, Corbel SY, Sage J, Pomerantz JH, Blau HM. Transient inactivation of Rb and ARF yields regenerative cells from postmitotic mammalian muscle. *Cell Stem Cell* 2010;7:198-213.
12. Brockes JP, Kumar A. Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008;24:525-49.
13. Poss KD. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanism in animals. *Nat Rev Genet* 2010;11:710-22.
14. Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Maden M, Epperlein HH. Cells keep a memory of their tissue origin during axotolot limb regeneration. *Nature* 2009;460:60-5.
15. Tanaka EM, Gann AA, Gates PB, Brockes JP. Newt myotubes re-enter the cell cycle by phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol* 1997;136:155-65.
16. Huh MS, Parker MH, Scimé A, Parks R, Rudnicki MA. Rb is required for progression through myogenic differentiation but not maintenance of terminal differentiation. *J Cell Biol* 2004;166:865-76.
17. Sherr CJ, McCormick F. The Rb and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002;1:103-12.
18. Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, Sharpless NE, Chan SS, You MJ, et al. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* 2002;1:269-77.
19. del Arroyo AG, Peters G. The Ink4a/Arf network: cell cycle checkpoint or emergence brake? *Adv Exp Med Biol* 2005;570:227-47.
20. Inukai S, Slack FJ. MiR-33 connects cholesterol to the cell cycle. Comment on: Cirera-Salinas D, et al. *Cell Cycle* 2012;11:922-3; PMID:22333591; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.11.5.19421>.
21. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, et al. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:14068-73.
22. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010;465:704-12.
23. Asuelime GE, Shi Y. A case of cellular alchemy: lineage reprogramming and its potential in regenerative medicine. *J Mol Cell Biol* 2012. [Epub ahead of print]
24. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011;378:1847-57.
25. Makkar RR, Smith RR, Cheng KE, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): A prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 2012; DOI:10.1016/S0140-6736(12)60195-0.
26. Siu CW, Tse HF. Cardiac regeneration: messages from CADUCEUS. *Lancet* 2012; DOI:10.1016/S0140-6736(12)60236-0.
27. Rota M, Padin-Iruegas E, Misao Y, De Angelis A, Maestroni S, Ferreira-Martins J, et al. Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescue scarred infarcted myocardium improving cardiac function. *Circ Res* 2008;103:107-16.