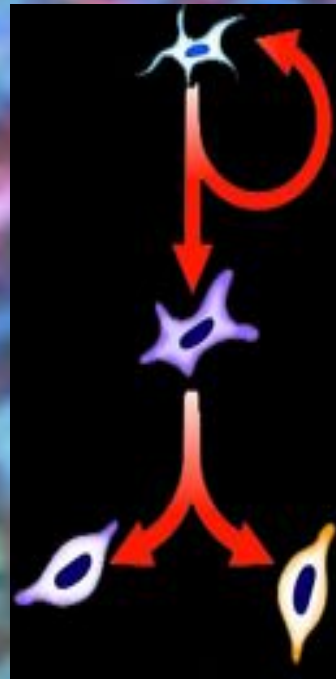




Células troncales: Orígenes, fenotipos y su aplicación en investigación básica y clínica



Dra. Verónica Palma

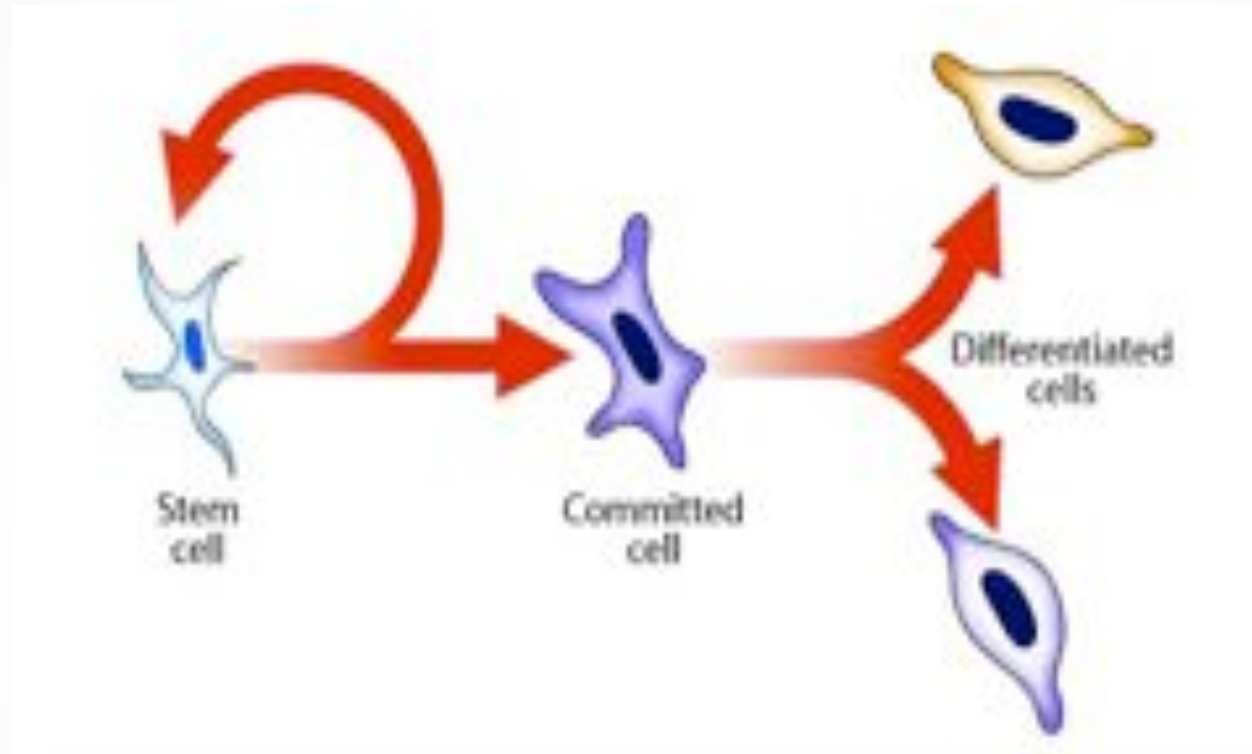
Células troncales: Orígenes, fenotipos y su aplicación en investigación básica y clínica

Células troncales:
definiciones y
características
principales

Medicina
regenerativa e
ingeniería tisular

Estado actual de la
investigación “*from
bench to bedside*”

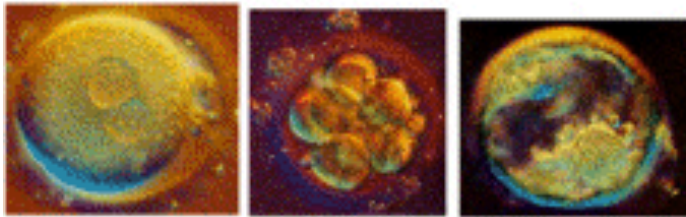
Que es una célula troncal o madre ?



“A cell that can continuously produce unaltered daughters and also has the ability to produce daughter cells that have different, more restricted properties” .

- Smith A, 2006, Nature.

Desarrollo humano



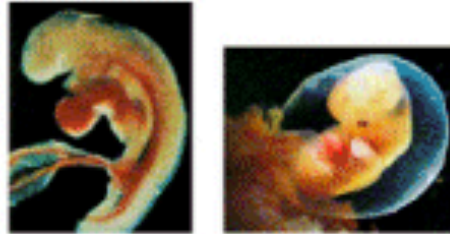
Embrión
1 célula

3 días

5-7 días

Célula troncal
totipotente

Célula troncal
embrionaria
(pluripotente)



4 semanas

6 semanas

Célula troncal
germinal
(multipotente)

Célula troncal
fetal
(multipotente)



Niño

Célula troncal
Sangre de cordón
(multipotente)



Adulto

Célula troncal
adulta
(multipotente)

Teratocarcinoma

Célula troncal
tumoral
(pluripotente)



Potencial de diferenciación de las células madre

Conceptos básicos

- Totipotencia (*totus* = entero)

El oocito fertilizado es totipotente, porque posee el potencial de generar todas las células y tejidos que forman un embrión y que le permiten su desarrollo en el útero

- Pluripotencia (*plures* = varios, muchos)

Células madre que originan células derivadas de las tres capas germinales embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo

- Multipotencia -Unipotencia (*unus* = uno)

Células capaces de diferenciarse en un sólo linaje

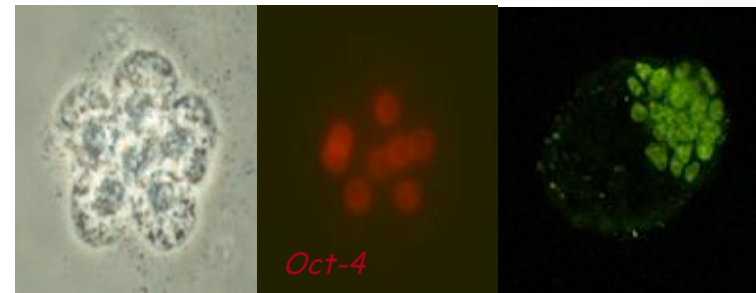
1. Células madre embrionarias (embyonic stem cells ES)

- Se originan a partir de la masa celular interna del blastocisto en un estadio previo a la implantación en la pared uterina
- Pueden auto-replicarse
- Son pluripotentes (pueden originar células de las tres capas germinales)



Propiedades definitorias de una célula madre embrionaria

- Son clonogénicas: una sola célula madre embrionaria puede originar una colonia de células genéticamente idénticas, o clones, que tienen las mismas propiedades que la célula original
- Expresan factores de transcripción maestros como son *Oct-4*, *Nanog*, *sox2* que activan o inhiben genes diana y mantienen las células madre embrionarias en un estado de proliferación, no de diferenciación
- Pueden inducirse para continuar proliferando o diferenciarse
- No poseen el punto de restricción *G1* en el ciclo celular. Suelen estar en la fase *S*, durante la cual sintetizan DNA.
- No presentan inactivación del cromosoma X



¿Son las células madre embrionarias verdaderamente pluripotentes?

1. Inyectar células madre derivadas de la masa celular interna del blastocisto en la cavidad de otro blastocisto y transferir la combinación de embriones a una hembra pseudo-preñada

→ Formación de quimeras

2. Inyectar las células madre embrionarias en ratones adultos genéticamente idénticos o inmunodeficientes

→ Formación de teratomas

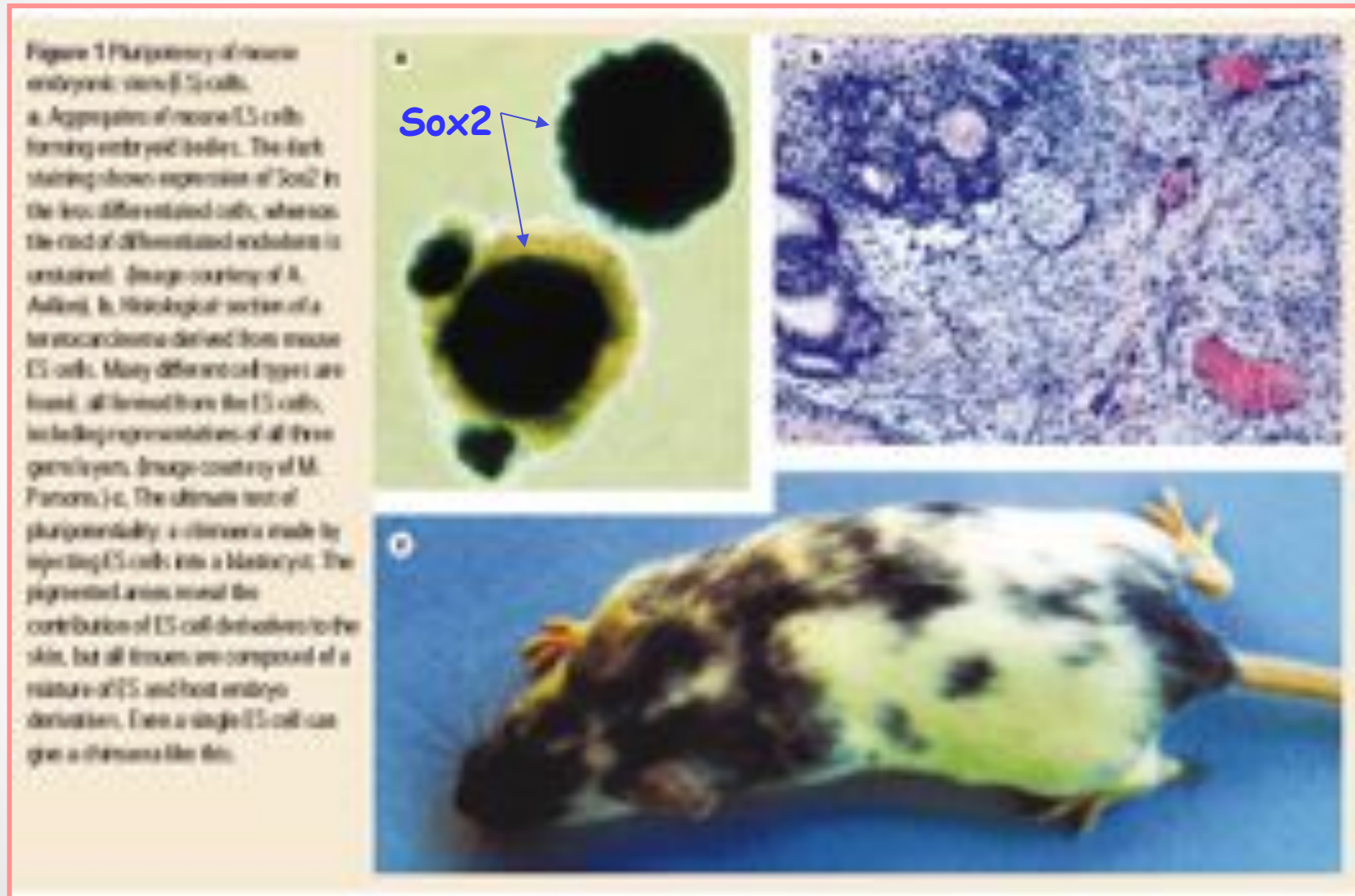
3. Permitir a las células madre diferenciarse espontáneamente o dirigir su diferenciación a lo largo de vías específicas

→ Formación de cuerpos embrioideos

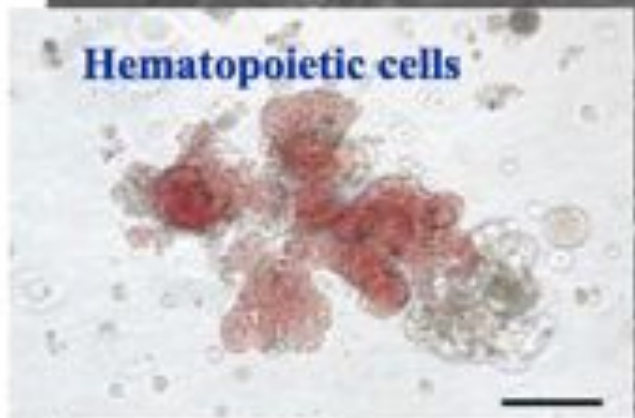
Pluripotencia de las células madre embrionarias de ratón

Cuerpos embrioideos

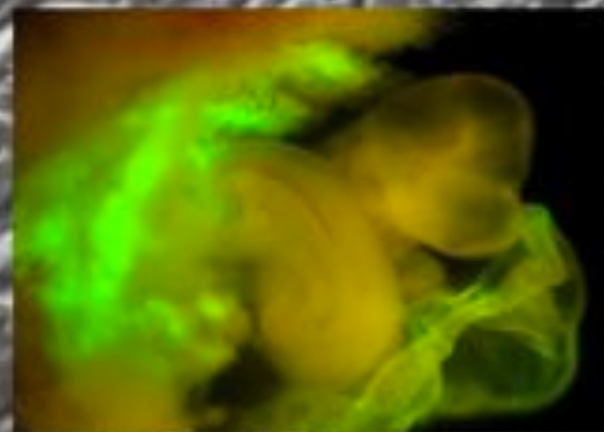
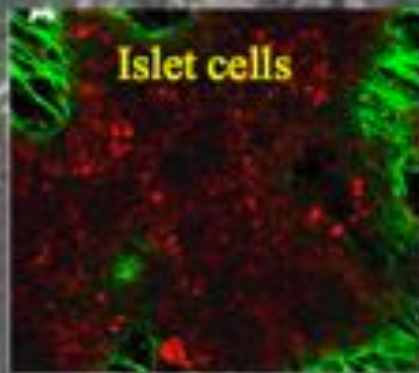
Teratocarcinoma



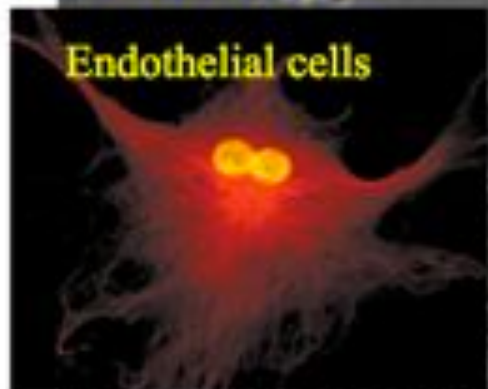
Hematopoietic cells



Islet cells



Endothelial cells

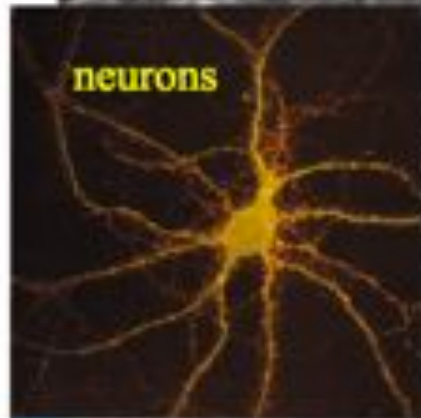


adipocytes

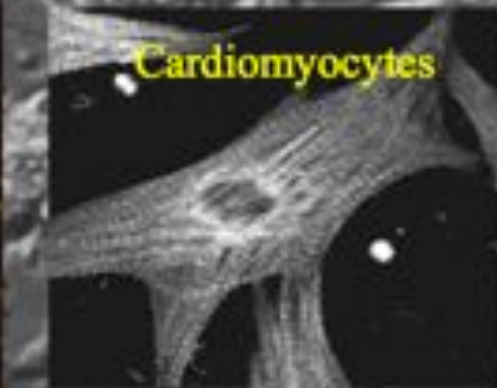


ES CELLS

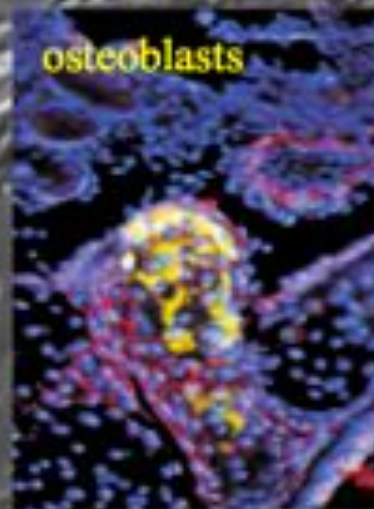
neurons



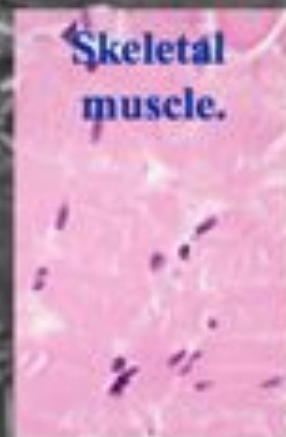
Cardiomyocytes



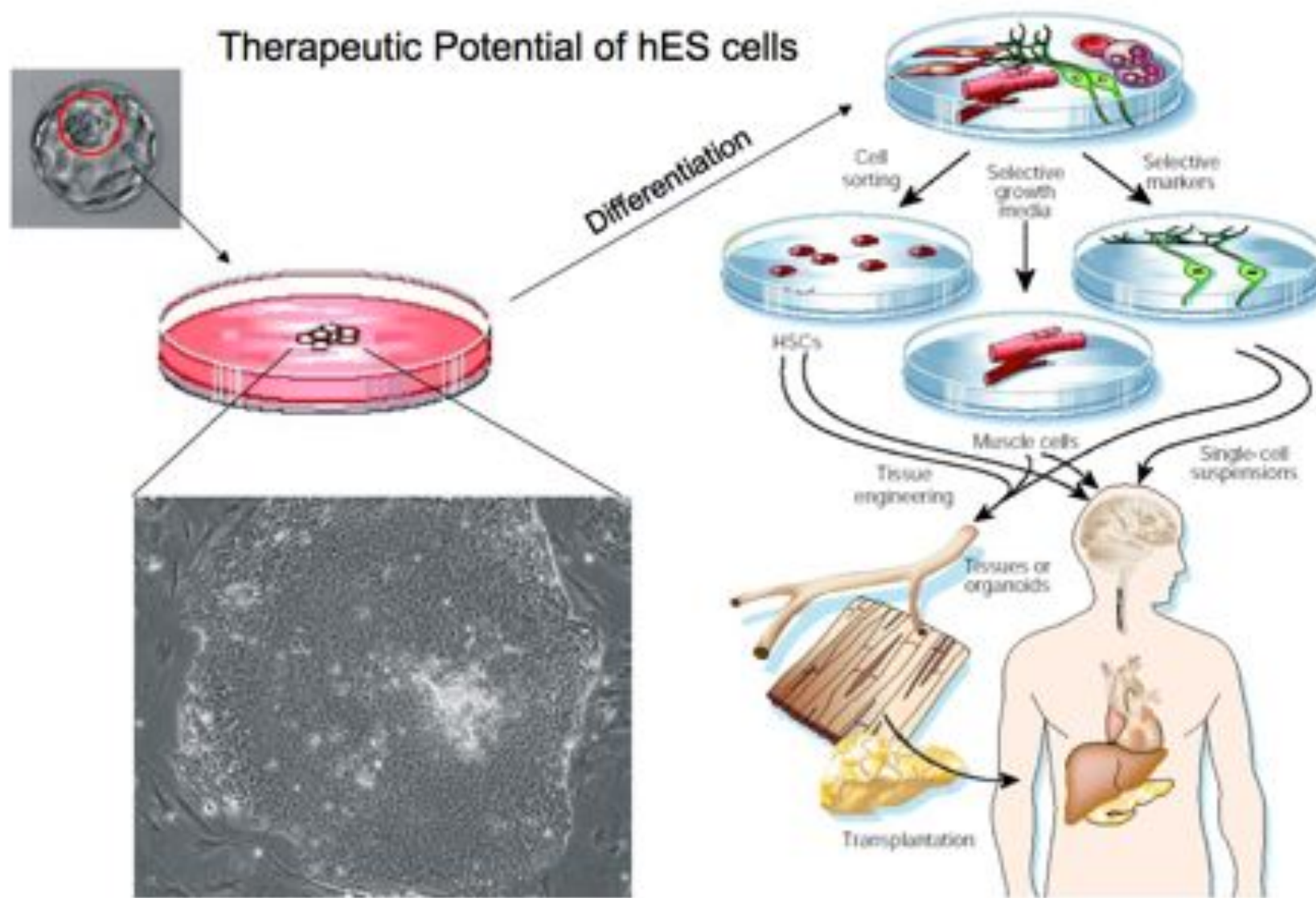
osteoblasts



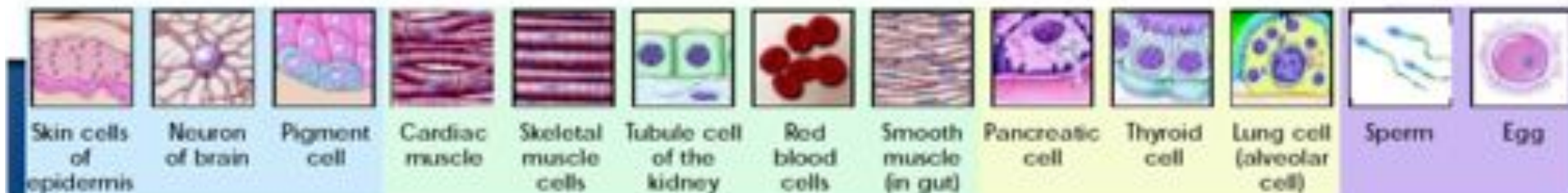
Skeletal muscle.



Therapeutic Potential of hES cells



Donovan and Gearhart, 2001, Nature; NIH SC Review



1. Células madre embrionarias (embyonic stem cells ES)

- Se originan a partir de la masa celular interna del blastocisto en un estadio previo a la implantación en la pared uterina
- Pueden auto-replicarse
- Son pluripotentes (pueden originar células de las tres capas germinales)

2. Células madre adultas -somáticas

- Son células indiferenciadas (no especializadas) que se encuentran en un tejido diferenciado (especializado)
- Pueden renovarse a sí mismas y convertirse en células especializadas
- No hay evidencias de que sean pluripotentes, pero si multipotentes
- Fuentes en el organismo: médula ósea, sangre periférica, córnea, retina, pulpa dental, hígado, piel, tracto gastrointestinal, páncreas

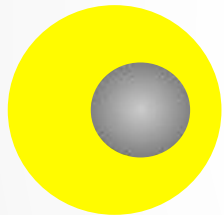
Concepto de transdiferenciación



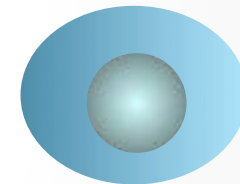
Reversión a la pluripotencialidad- IPS

Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Kazutoshi Takahashi and Shinya Yamanaka. CELL August 2006

ES cell



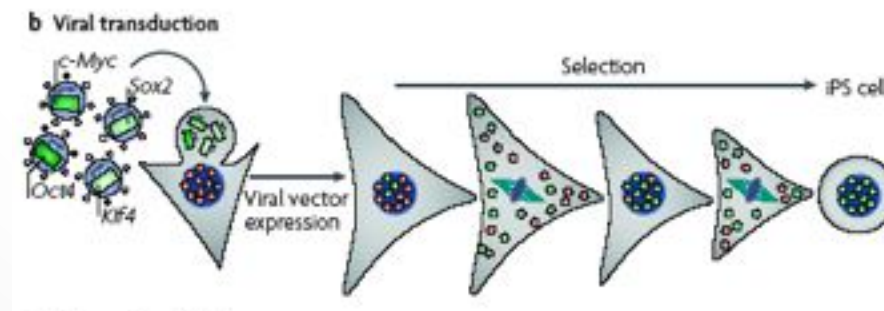
Somatic cell



Epigenetic erasure



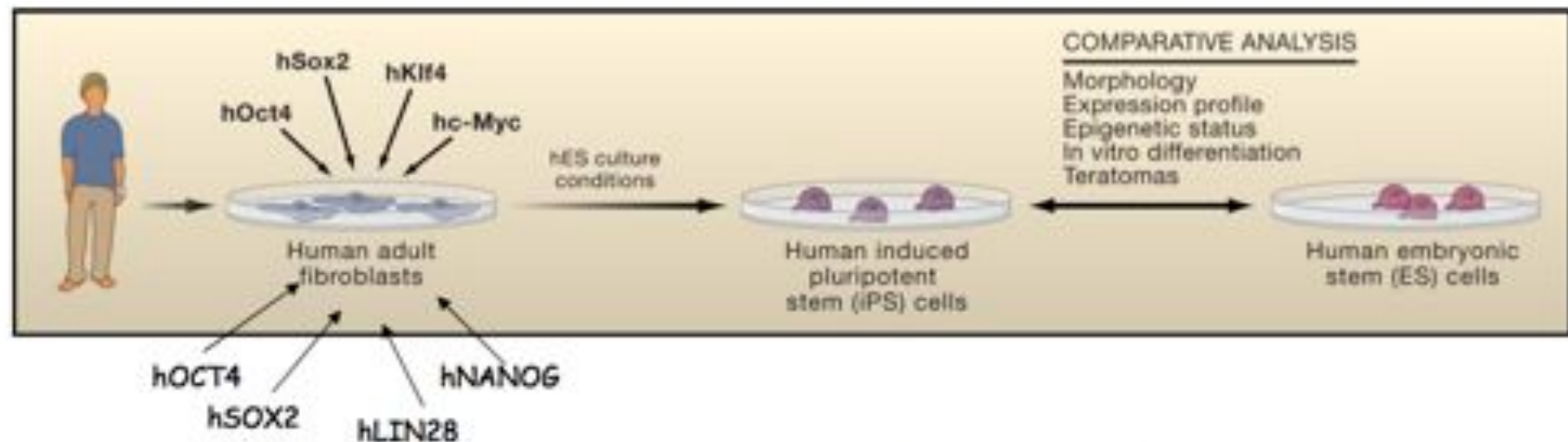
Transcriptional resetting



IPS: el futuro?

Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors

Takahashi et al. Cell 2007



Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells

Yu et al, Science 2007

Embryonic Stem Cells



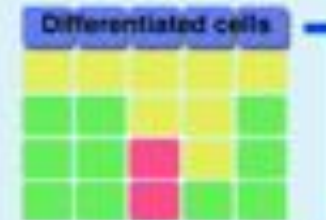
- ESCs originate from the inner cell mass of the blastocyst
- Self-renewal
- Pluripotent
- Generation of mouse chimeras
- Generation of 254 cell types originating adult tissues

Adult Stem Cells



- ASCs are created during ontogeny and persist within the niche in most adult animal tissues/organs
- Self-renewal
- Multipotent
- Maintenance of tissue homeostasis in physiological and pathological conditions

Induced Pluripotent Stem Cells



- iPS originate from somatic differentiated cells after transduction with cMyc, Klf-4, Oct-3/4 and Sox-3
- Self-renewal
- Pluripotent
- Generation of mouse chimeras
- Patient-specific stem cells

Células troncales: Orígenes, fenotipos y su aplicación en investigación básica y clínica

**Células troncales:
definiciones y
características
principales**

**Medicina
regenerativa e
ingeniería tisular**

**Estado actual de la
investigación “from
bench to bedside”**

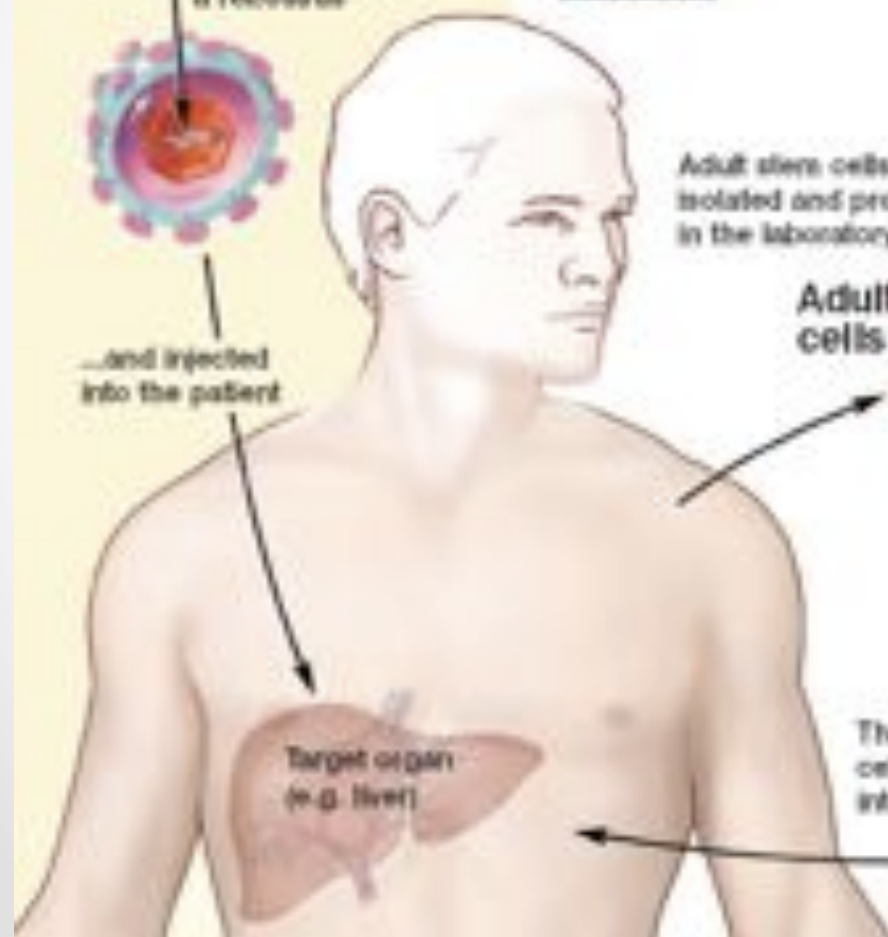
MEDICINA REGENERATIVA (MR)

- **La MR persigue restablecer funciones dañadas del organismo, basado en la comprensión de procesos biológicos como la embriología y función de células madres (troncales)**
- **La MR busca recrear condiciones que permitan el crecimiento de células/tejidos y así superar la inhabilidad orgánica de reparar daño causado por enfermedades/trauma/vejez.**

Direct Delivery



...and injected into the patient



Target organ
(e.g. liver)

Cell-based Delivery

Genetically modified ES cells
(can block immune rejection
from patient)

OR

ES cell
HLA bank

OR

SCNT

ES cells



in vitro
differentiated
stem cell

Adult stem cells are
isolated and propagated
in the laboratory.

Adult stem
cells



The genetically modified
cells are reintroduced
into the patient.



Therapeutic
gene

The therapeutic gene
is packaged into a
delivery vehicle such
as a retrovirus and
introduced into the
cells.



Objetivos del desarrollo de terapias de trasplantes de células madre embrionarias humanas



TERAPIA CELULAR (TC)

- **Prevención/tratamiento enfermedad por uso cel's seleccionadas/expandidas/tratadas/modificadas fuera del organismo (ex vivo)**
- **El objetivo es reemplazar/reparar/mejorar la función de un tejido/órgano dañado**

VENTAJAS DE TERAPIA CELULAR

Cel's rápidamente disponibles

Cel's pueden ser criopreservadas y descongeladas al necesitarse (Bancos)

Por trasplantes guiados, es posible aumentar eficacia/ seguridad:

- **Las cel's pueden ser del paciente/donante**
- **Las cel's vuelven al paciente por mecanismos simples (sitio de la deseada acción)**

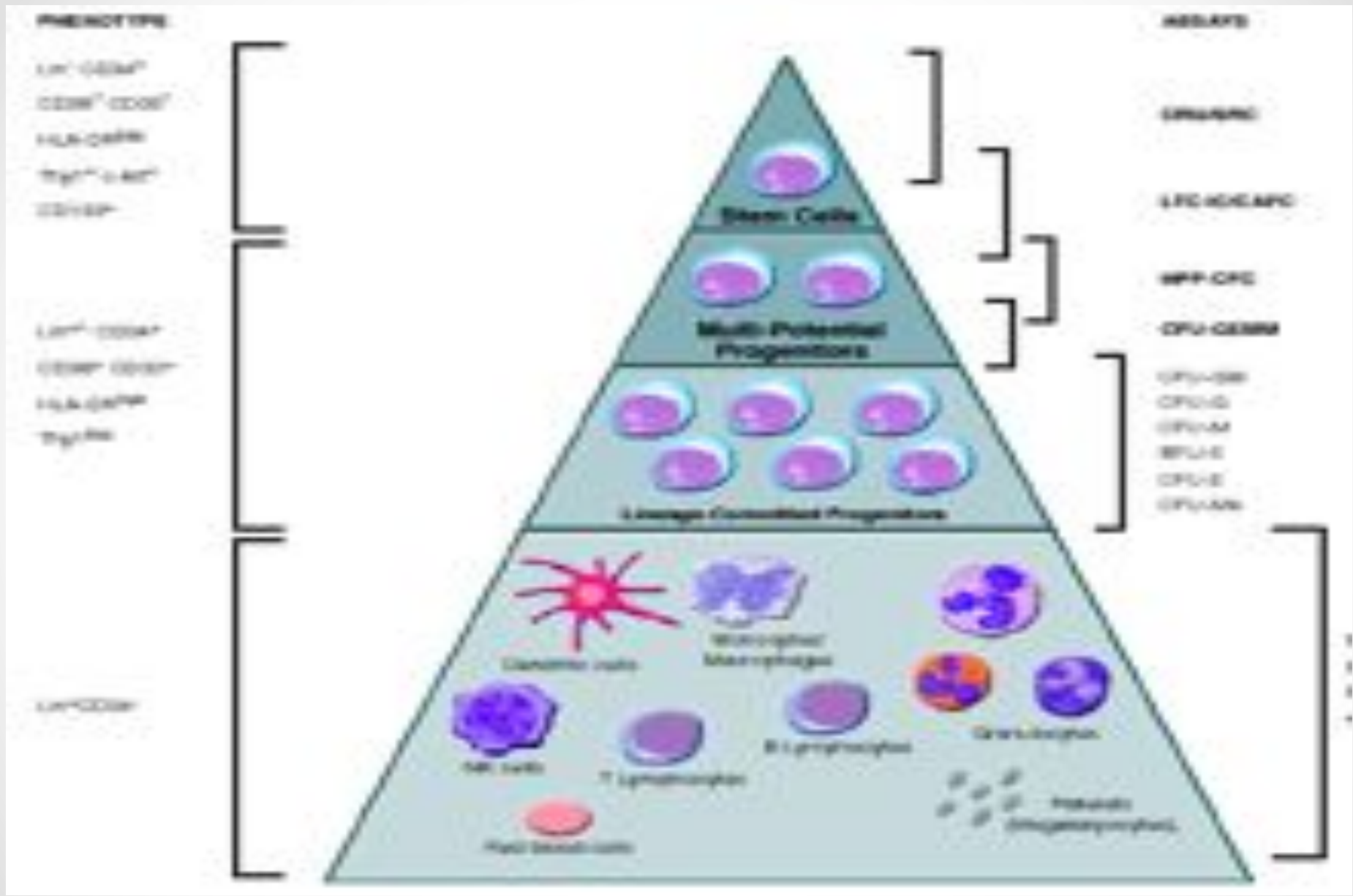
TERAPIA CELULAR Y CELULAS TRONCALES ADULTAS (CTA)

Estudios *in vitro*, preclínicos y clínicos han demostrado que el uso de CTA ('rescue cells'), permite:

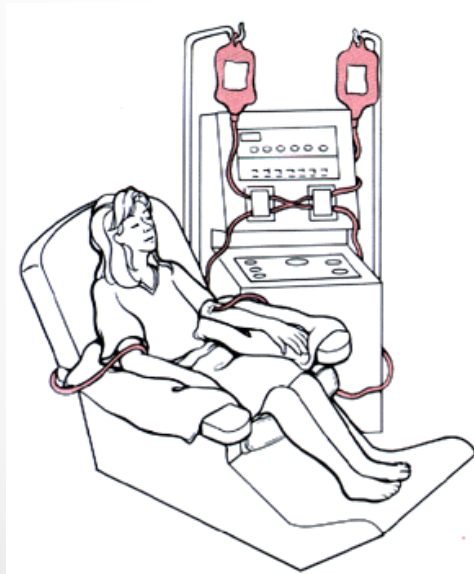
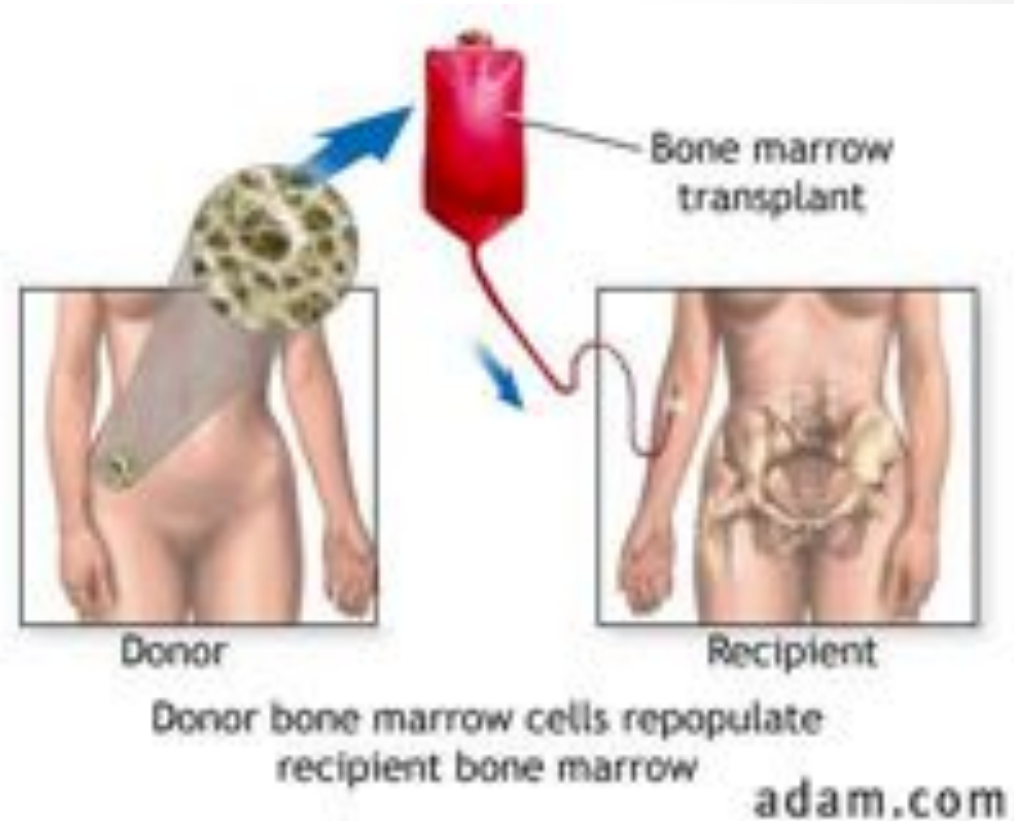
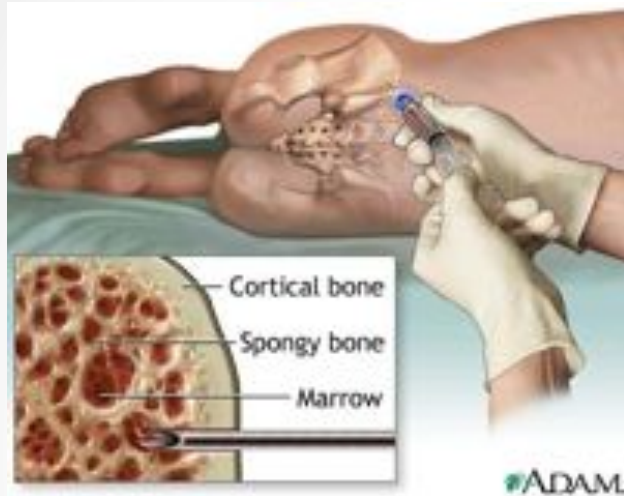
- generar virtualmente todos los tejidos adultos
(commitment & differentiation)**
- producir y mantener un numero suficiente de células
(self-renewal/homeostasis)**
- especificar destinación a tejido dañado
(homing/microenvironment)**

REQUISITOS PARA SER CONSIDERADA UNA CELULA DE RESCATE...

- **TRASPLANTABILIDAD Y SOBREVIVENCIA**
- **MIGRACION TRASENDOTELIAL**
- **DIFERENCIACION A LINAJE DESEADO**
- **NO PRODUCIR RESPUESTA INMUNE (allogéneico)**

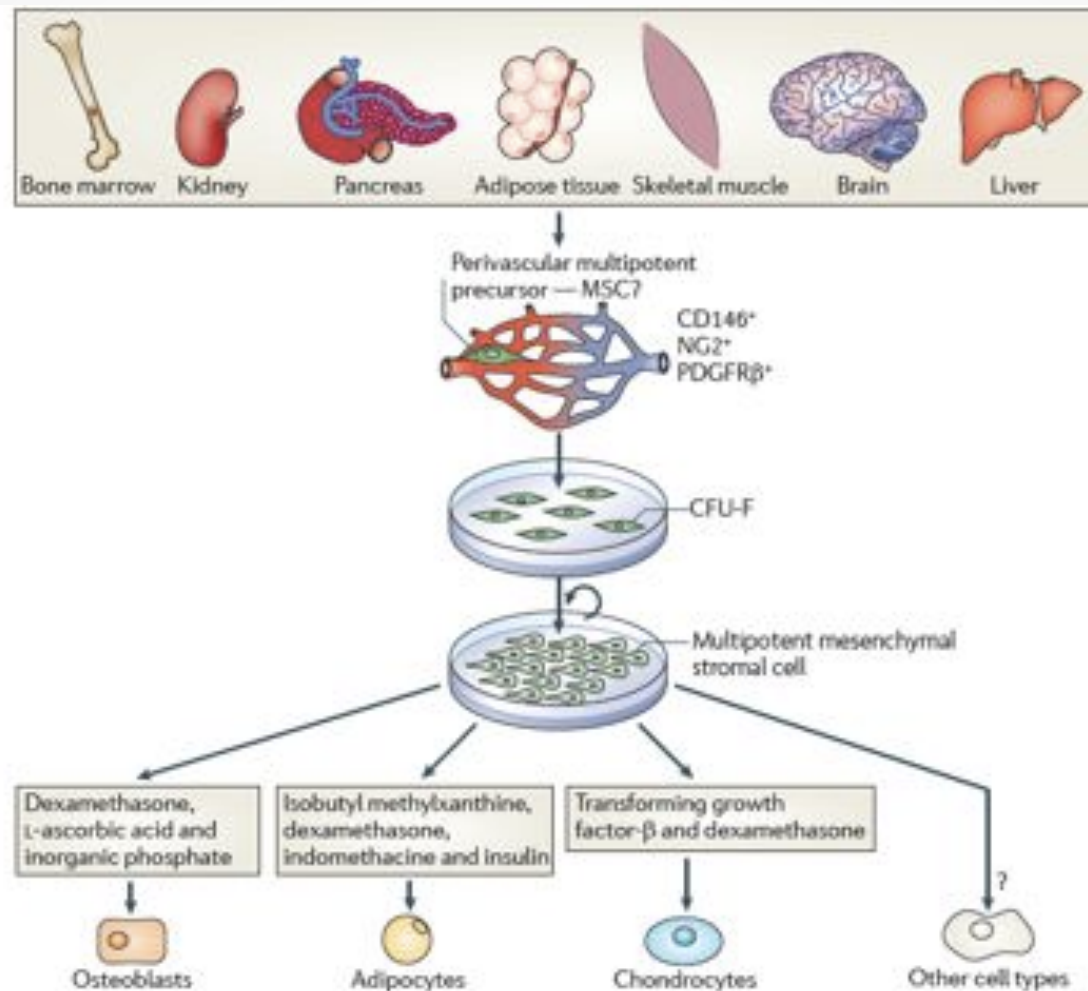


Primeras Aplicaciones clínicas de células troncales



PROTOTIPOS DE CELULAS DE RESCATE

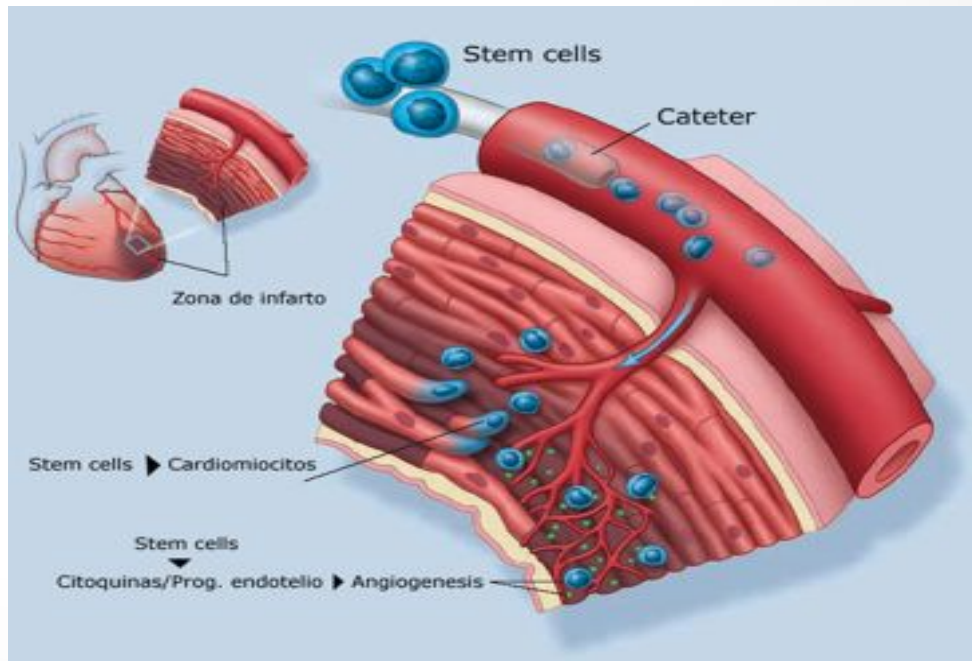
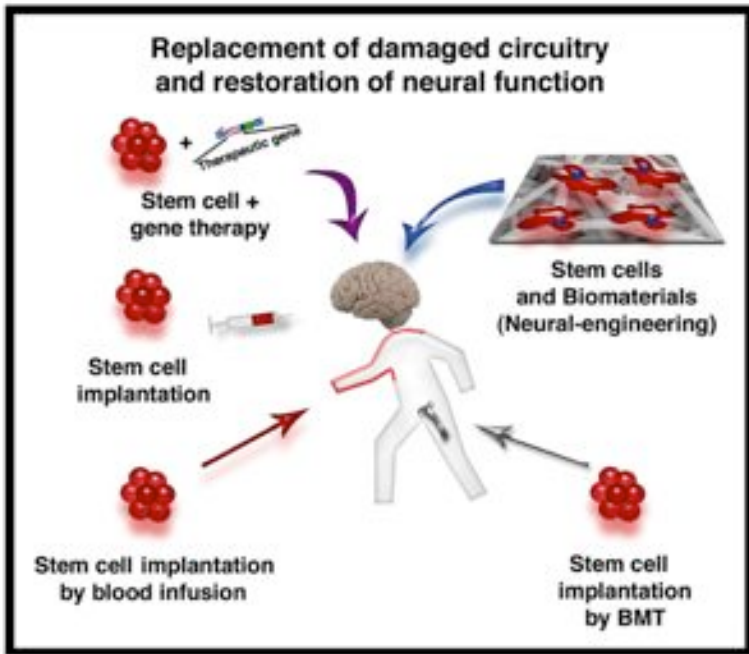
- **HEMATOPOYETICA** → hematopoiesis
- **MESENQUIMATICA** → cartílago, hueso, músculo cardíaco
- **EPITELIAL** → epitelios, cornea
- **ENDOTELIAL** → angiogenesis/vasculogenesis



- MSC must be plastic-adherent if maintained in standard culture conditions
- MSC must express CD105, CD73 and CD90; lack expression of hematopoietic markers such as CD45, CD34, CD14 or CD11b.
- MSC must be capable of differentiation to osteoblasts, adipocytes and chondroblasts under differentiating conditions

Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.

The International Society for Cellular Therapy position statement (Dominici et al., 2006)



Efecto del Transplante

Las células migran al tejido lesionado y mantienen su potencial

Diferenciación Terminal Pobre...
aún...

Su efecto podría estar dado por un mecanismo alternativo al reemplazo celular

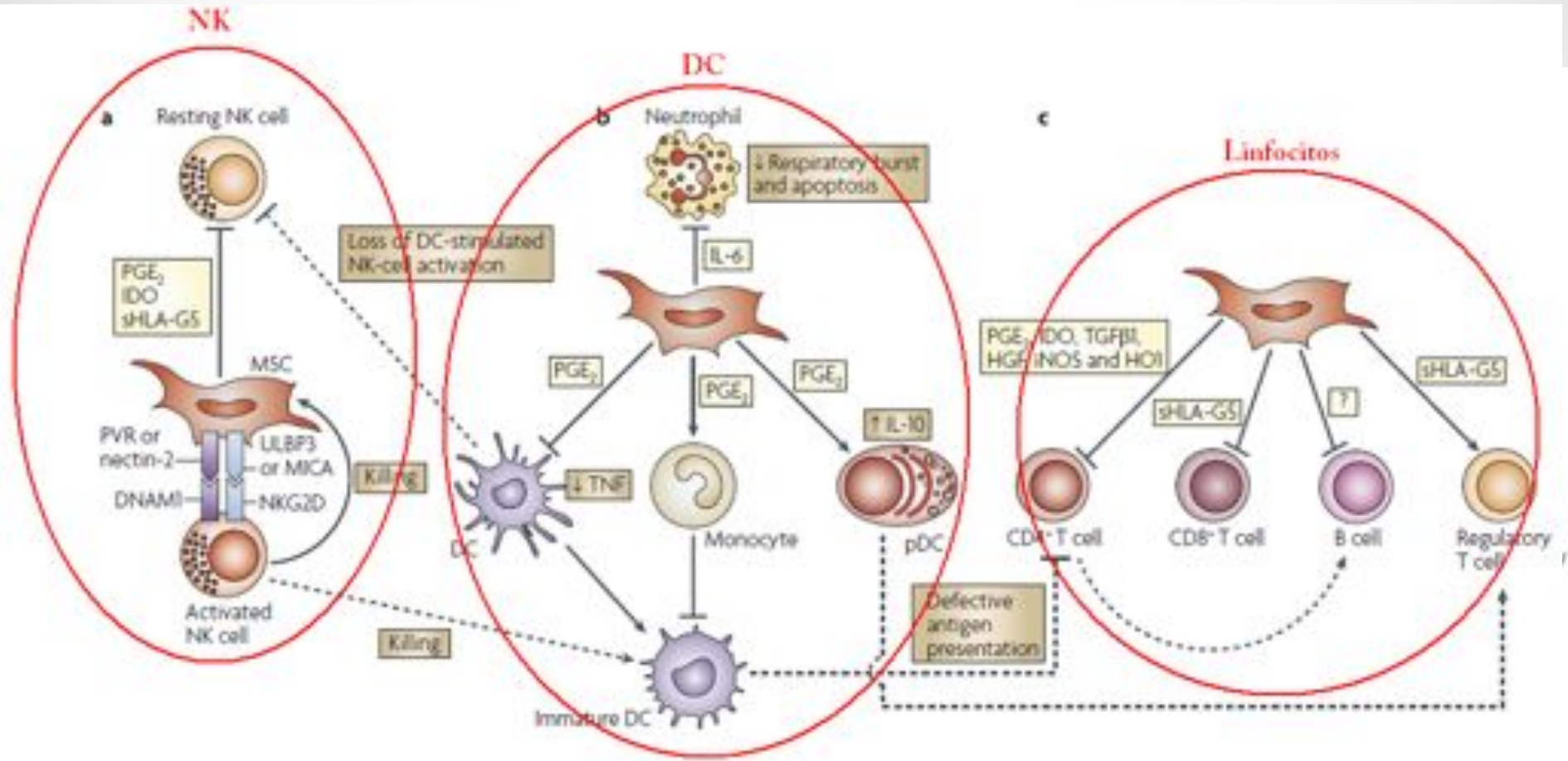
Impedir Cicatrices
Aumentar Supervivencia
De Progenitores Endógenos

Aumentando la
Disponibilidad de
Factores tróficos

Promover **Inmunomodulación**

Expresando citoquinas y quimioquinas
Y Receptores

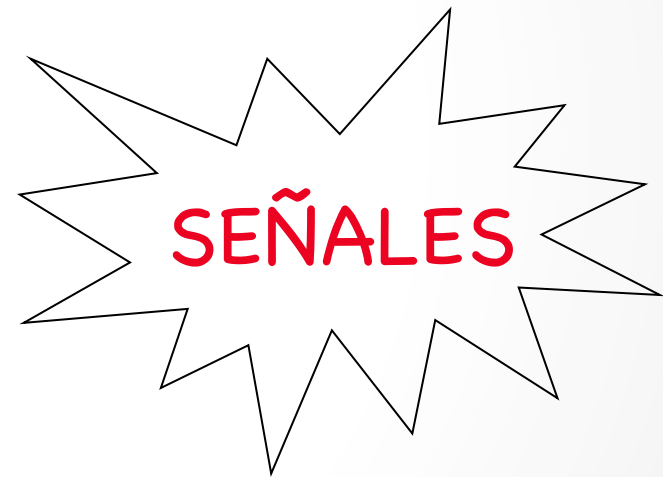
Immunomodulación



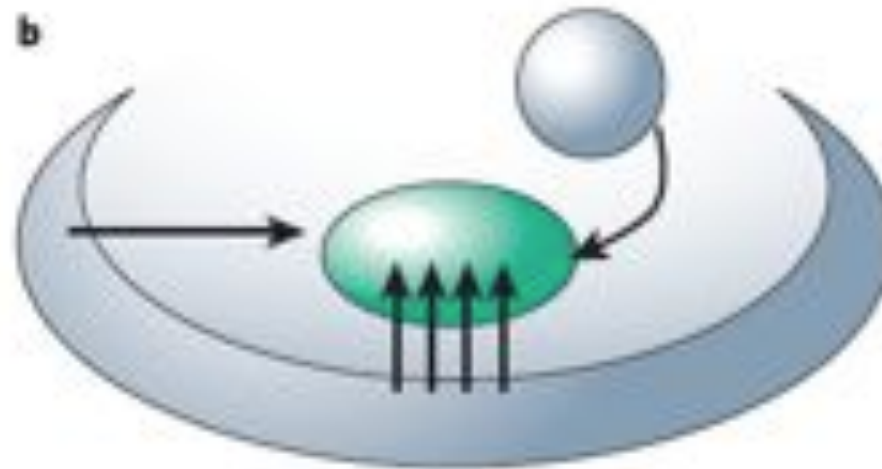
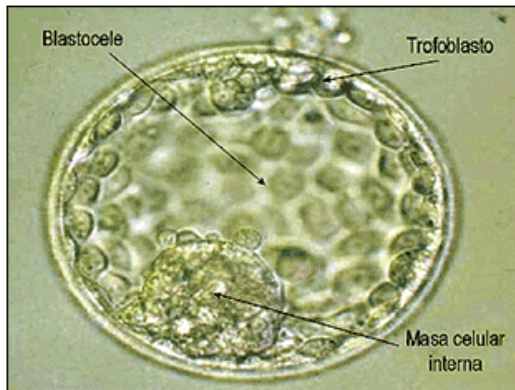
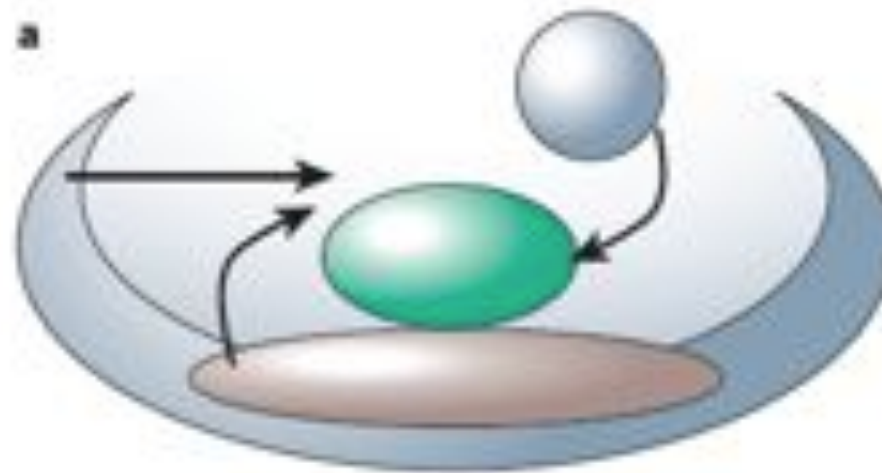
Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (April 2010)

- Mesenchymal stem cells: **10774** (1556 reviews)
- Mesenchymal stem cells + Differentiation: **6177** (848 reviews)
- Mesenchymal stem cells + Secretion: **421** (42 reviews)
- Mesenchymal stem cells + Inflammation **301** (73 reviews)
- Mesenchymal stem cells + Immune system **919** (152 reviews)
- Mesenchymal stem cells + Autoimmune **148** (63 reviews)
- Mesenchymal stem cells + Disease **1593** (422 reviews)

**Ninguna célula es una isla...
las células requieren de
comunicación-envían y reciben
señales**



EL concepto de nicho o microambiente



Importancia del nicho....

5 January 2012 Last updated at 19:00 GMT

744 [Share](#) [f](#) [t](#) [e](#) [p](#)



First 'mixed embryo' monkeys born

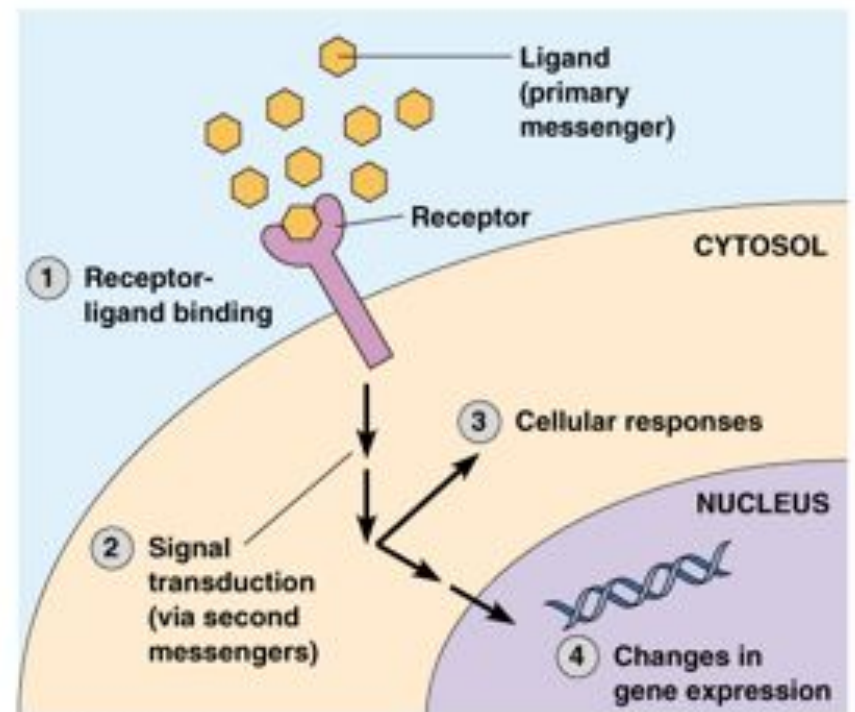
By Paul Rincon

Science editor, BBC News website

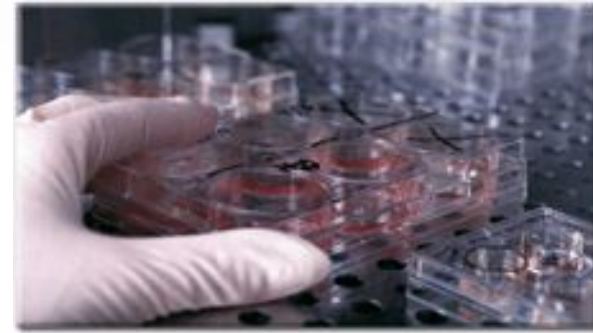
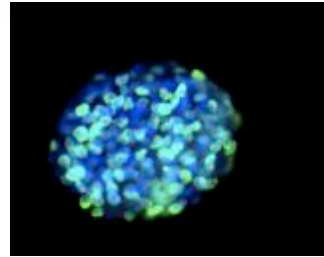


TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

- RECONOCIMIENTO DE LA SEÑAL: Receptor
- TRANSDUCCION: Cambio del mensaje extracelular a uno intracelular
- EFECTO: cambio en la conducta celular y por ende en la población



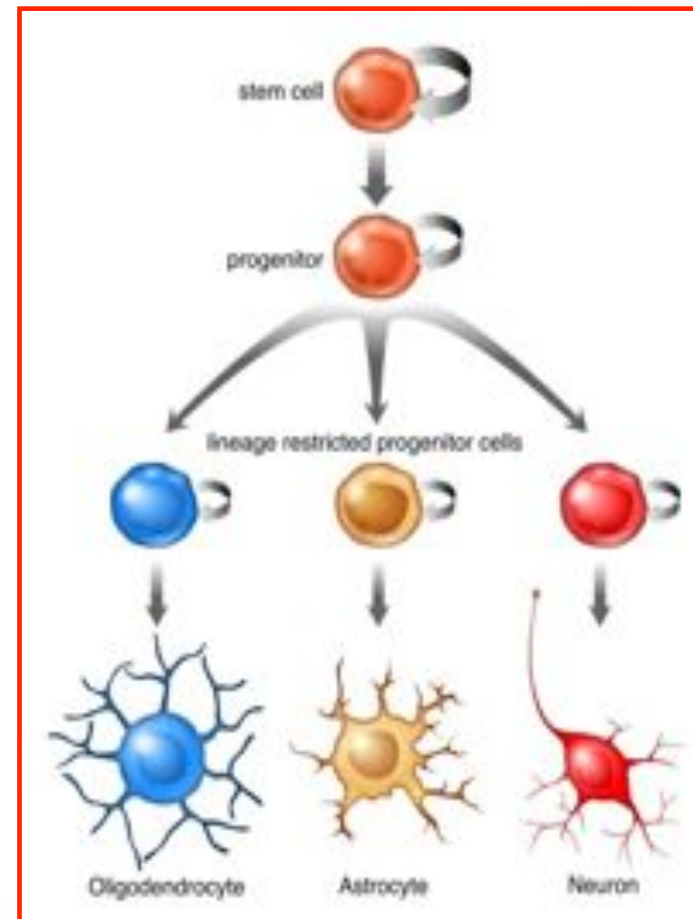
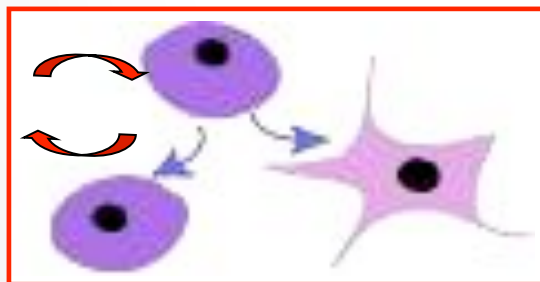
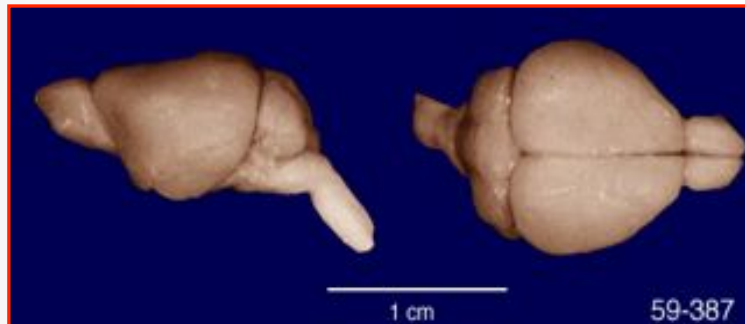
- El eje principal de investigación del laboratorio se centra en el papel que desempeñan la vía de señalización SHH/Gli en el desarrollo normal del organismo y comprender como una desregulación de estas proteínas conlleva a alteraciones en el desarrollo y enfermedades
- Nos interesa estudiar el rol de SHH/Gli en diferentes aspectos relativos al desarrollo animal, pero por sobre todo en el control de la **proliferación y diferenciación celular de las células madre** (o troncales)



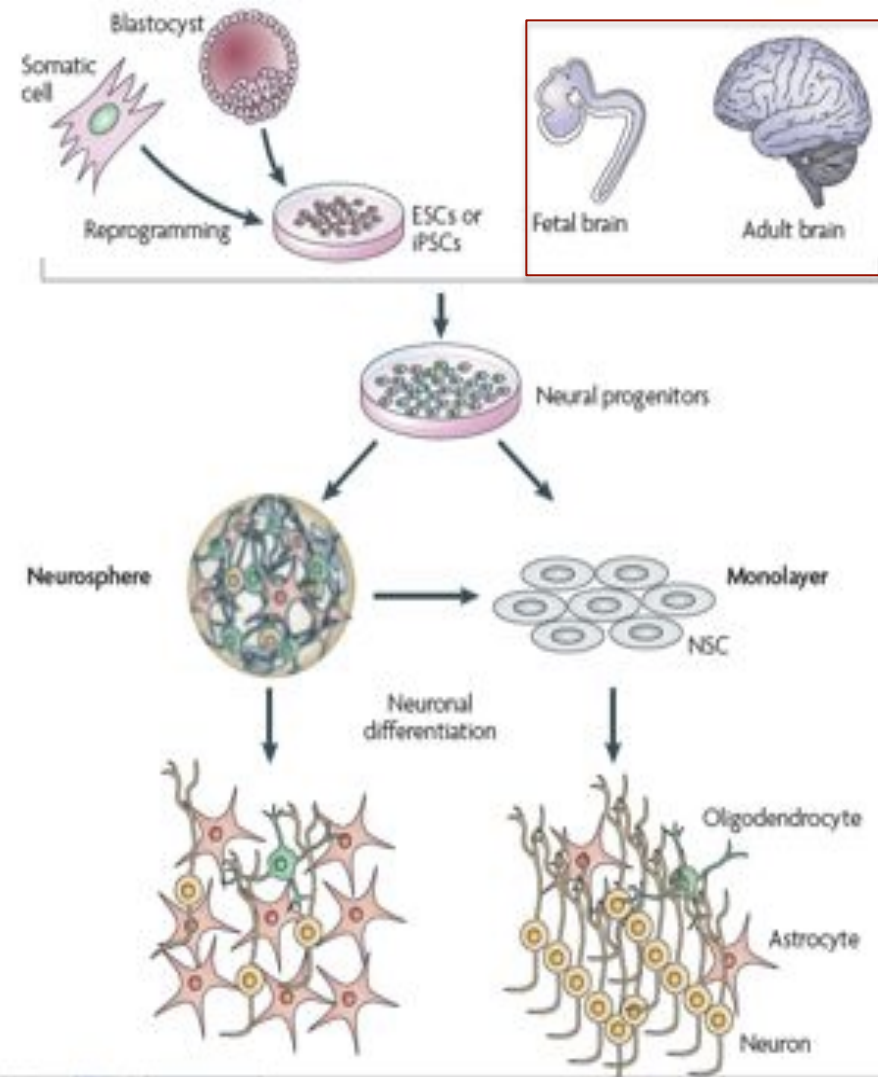
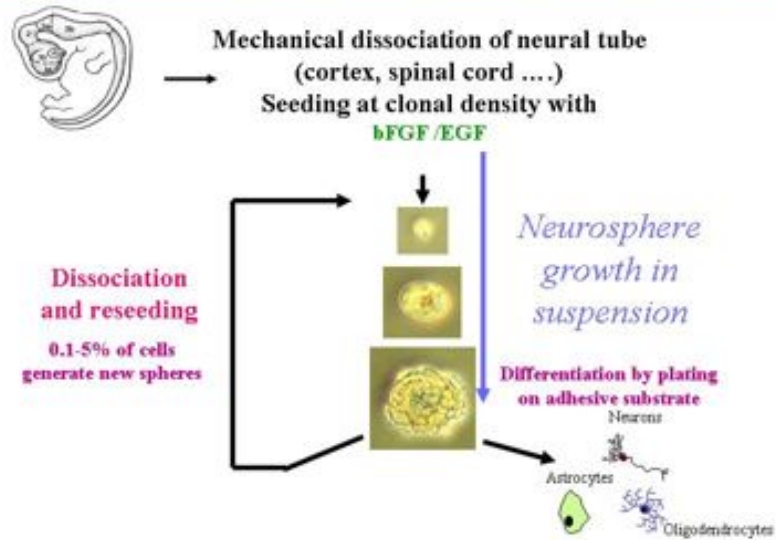
- **Las metodologías que utilizamos incluyen tanto técnicas de biología celular como molecular. Los sistemas que estudiamos incluyen embriones de pez cebra, pollo y de ratón y cultivos de células primarias y células madre de ratones y humanos, así como algunas líneas celulares modelo.**



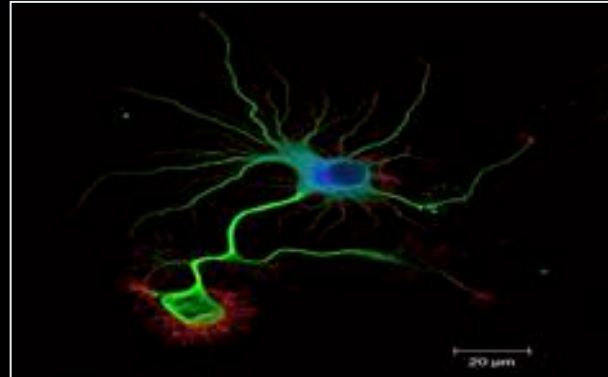
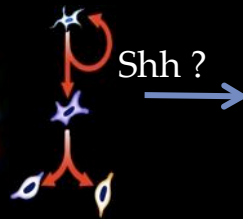
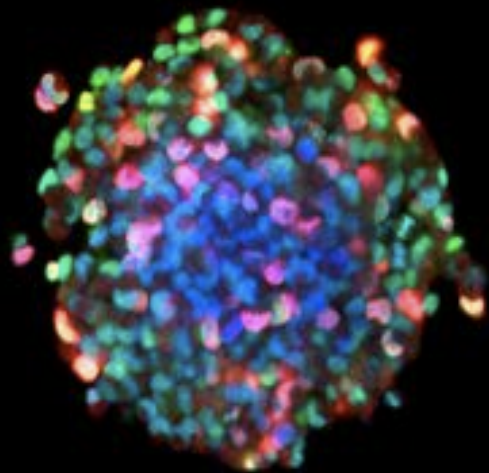
Células troncales del sistema nervioso - Neural Stem Cells (NSC)



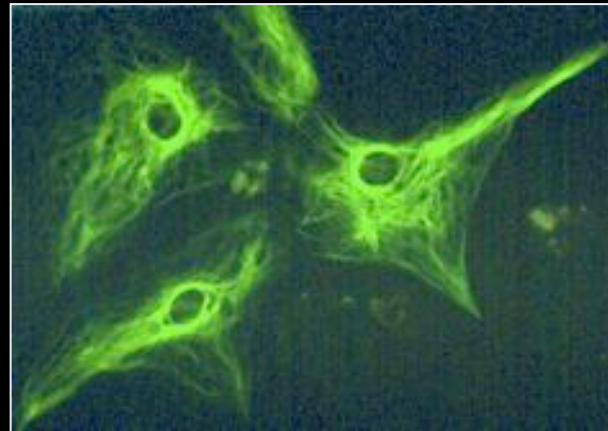
The Neurospheres: A model for studying the neural lineage



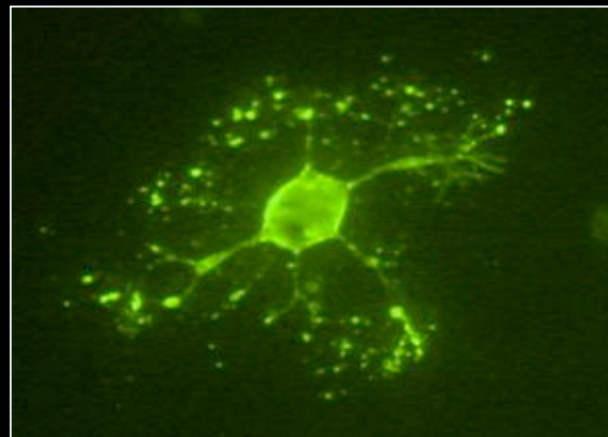
Embriogenesis tardía (E18.5)



NEURONS
15%
(Tuj1/MAP-2)

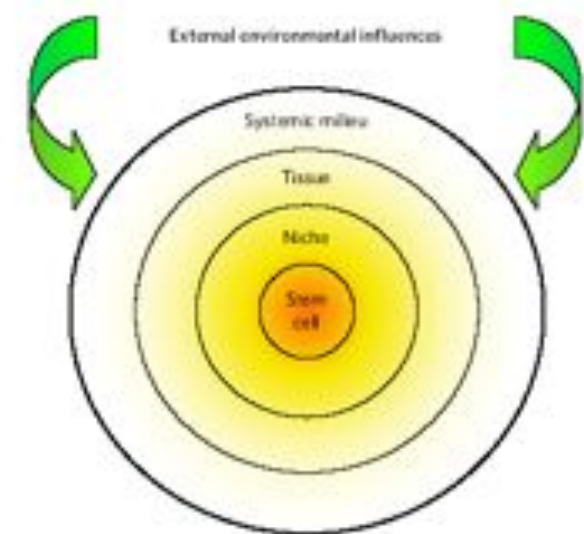


ASTROCYTS
75%
(GFAP)



OLIGODENDROCYTS
2%
(O4)

- ◆ Que mecanismos controlan la auto-renovación de las NSC?
- ◆ Pueden disociarse los procesos de proliferación y multipotencialidad?
- ◆ Pueden disociarse los procesos de proliferación y diferenciación?
- Cúal es el papel del nicho ?

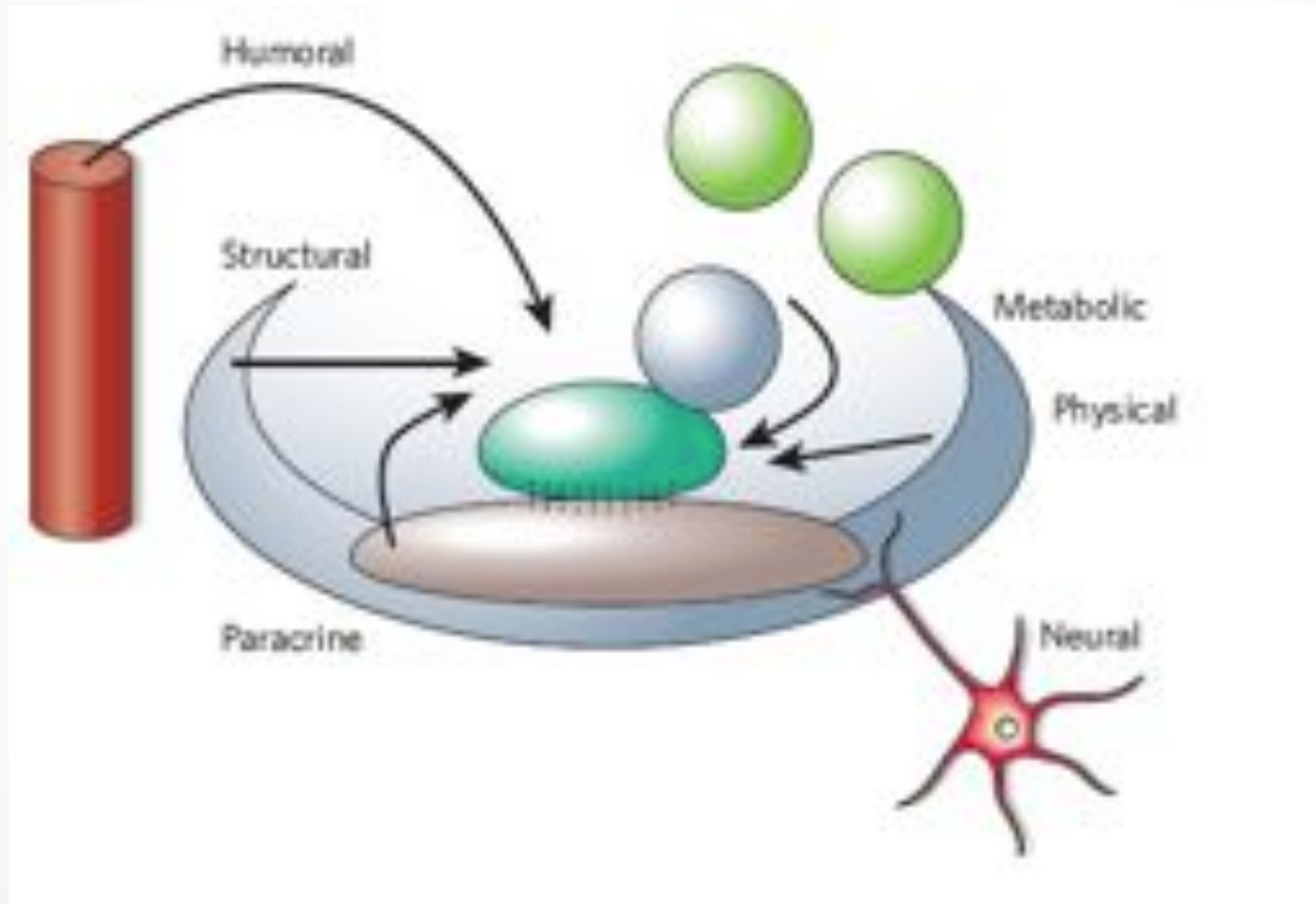


Nuestra investigación sobre la formación de los embriones nos ha permitido estudiar dos tipos de enfermedades y la implicancia de la vía de señalización de Shh/Gli:

- **las enfermedades debidas a la pérdida de células, como son las enfermedades degenerativas (enfermedad de Parkinson, enfermedad periodontal), injurias/isquemias, y**
- **las enfermedades debidas al aumento no homeostático del número de células, como el cáncer.**



Ingeniería Tisular



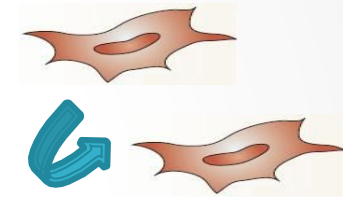
Las bases de la regeneración-remodelación tisular



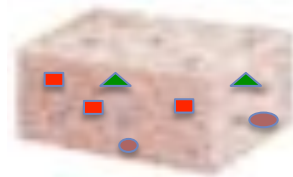
BIOMATRIZ

INGENIERÍA DE
TEJIDOS

CELULAS
TRONCALES



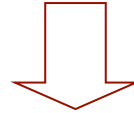
- Neurales
- MSC



MOLECULAS
BIOACTIVAS



Pérdida de Tejidos



Terapias regenerativas

Ingeniería Tisular

Células: progenitoras / diferenciadas

Biomoléculas: recapitulación del desarrollo, Sonic Hedgehog (Shh)

Matrices tridimensionales: soporte



Sustitutos
Tisulares

Salud Oral

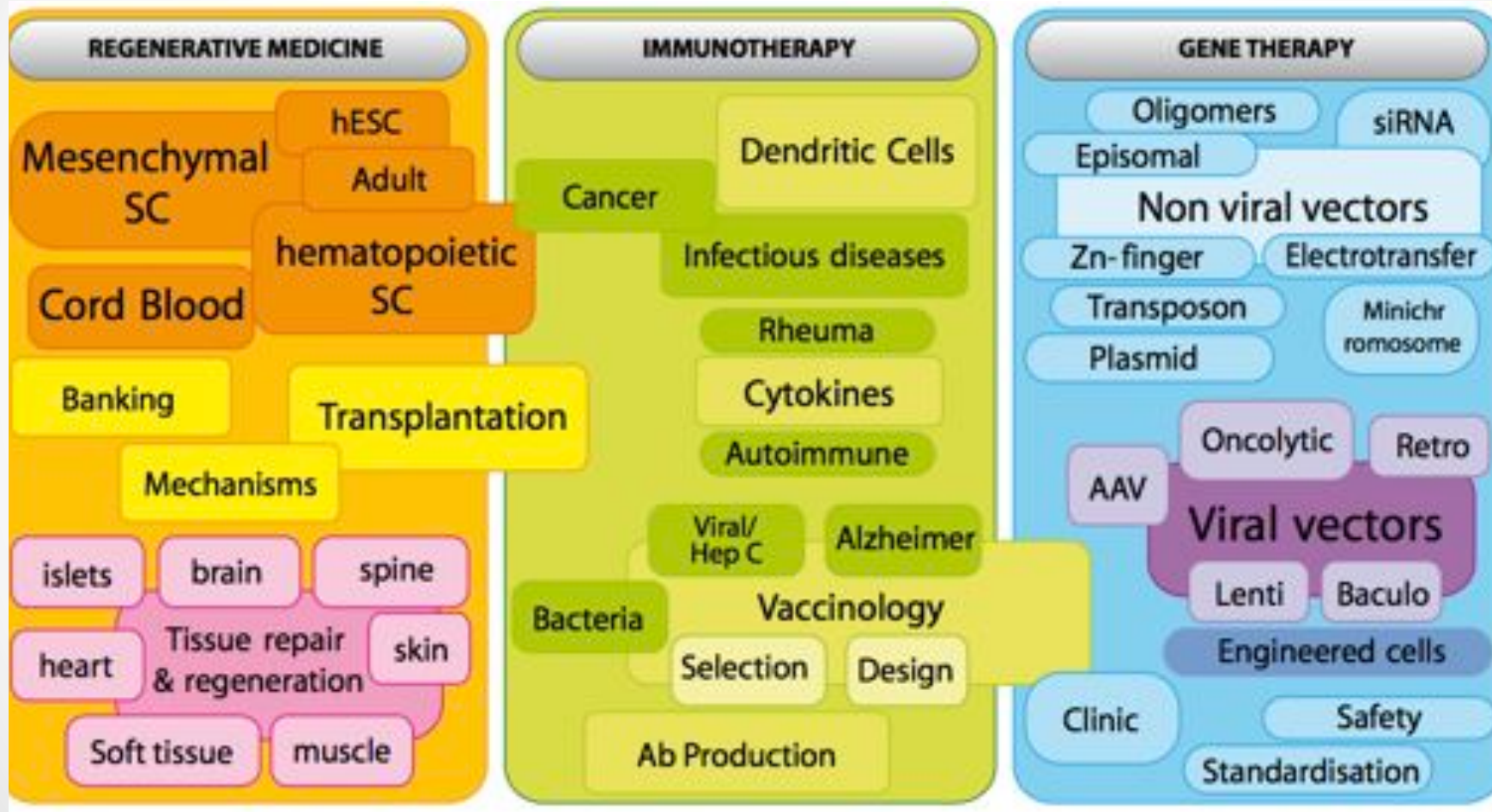


Células troncales: Orígenes, fenotipos y su aplicación en investigación básica y clínica

**Células troncales:
definiciones y
características
principales**

**Medicina
regenerativa e
ingeniería tisular**

**Estado actual de la
investigación “from
bench to bedside”**



GENOSTEM

Adult mesenchymal stem cells engineering for connective tissue disorders:
from the bench to the bedside

BETACELLTHERAPY

Beta Cell Programming for Treatment of Diabetes

SKINTHERAPY

Gene therapy for edidermolysis bullosa: a model system for treatment of inherited skin diseases

EUROSTEMCELL

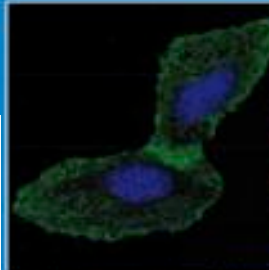
European Consortium for Stem Cell Research



Genomics & Biotechnology for Health

STEMSTROKE

Towards a stem cell therapy for stroke



SC&CR

Application and process optimisation of human stem cells for myocardium repair

RESCUE

From stem cell technology to functional restoration after spinal cord injury

STROKEMAP

Multipotent adult progenitor cells to treat stroke



NEUROSCREEN

The discovery of future neuro-therapeutic molecules

OSTEOCORD

Bone from blood: Optimised isolation, characterisation and osteogenic induction of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood

ULCER THERAPY

Gene transfer in skin equivalents and stem cells: novel strategies for chronic ulcer repair and tissue regeneration

Uso de MSC humanas para transplantes terapéuticos

1. Enfermedades del sistema nervioso central y periférico

- **Enfermedad de Parkinson**
- **Traumatismos de la columna vertebral**
- **Degeneración de las células de Purkinje**

2. Enfermedades neuro-musculares

- **Distrofia muscular de Duchenne**

3. Enfermedades metabólicas

- **Diabetes**

4. Enfermedades cardíacas

- **Fallo cardíaco**

5. Enfermedades óseas

- **Osteogénesis imperfecta**

Ley sobre investigación científica en el ser humano, su genoma, y prohibición de la clonación humana.

Congreso despachó proyecto que prohíbe clonación humana y regula la investigación científica en Chile, 17/10/2005

“...Dispone que el cultivo de tejidos y órganos sólo procede con fines de diagnósticos terapéuticos o de investigación científica. En ningún caso podrá destruirse embriones humanos para obtener las células troncales que den origen a dichos tejidos y órganos, mientras que la terapia génica en células somáticas estará autorizada sólo con fines de tratamiento de enfermedades o a impedir su aparición.”





"It's nothing a few stem cells and another 75 years of research can't fix."

Consultas?