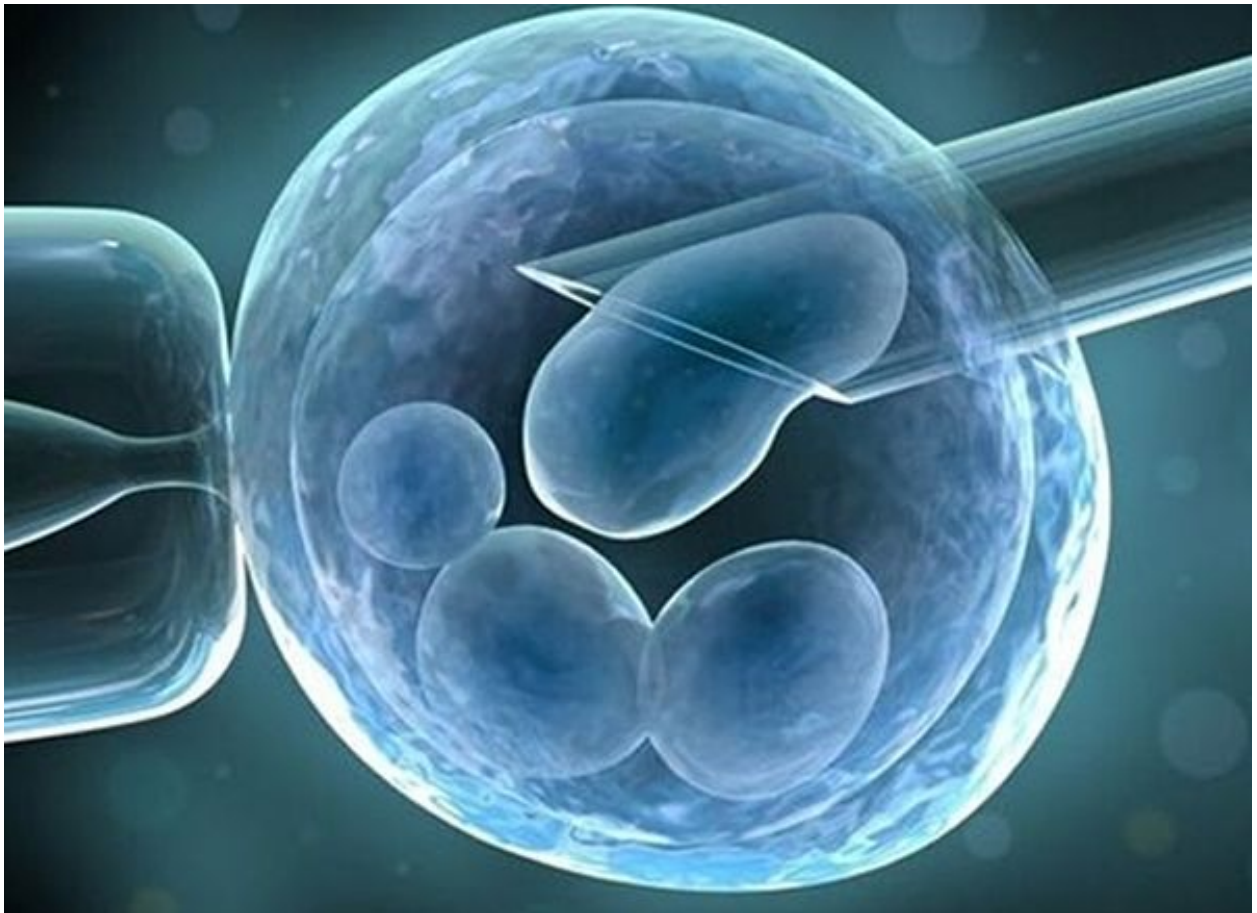

TERÀPIA CEL·LULAR I GÈNICA



CIÈNCIES BIOMÈDIQUES UB - PRIMAVERA 2017

ALBERT TORELLÓ PÉREZ

Índex

I	TERÀPIA CEL·LULAR	1
1	<i>Embryonic Stem Cells</i>	1
	<i>Stem Cells</i> — 1 • Blastocist pre-implantacional — 2 • Obtenció de cèl·lules mare embrionàries — 2 • Marcadors — 5 • Manteniment de la pluripotència — 9	
2	<i>Adult Stem Cells</i>	11
	Cèl·lules mare hematopoiètiques — 12 • Cèl·lules mare mesenquimals — 12	
3	Teràpia cel·lular per malalties coronàries	15
	Infart de miocardi — 15 • Estratègies de teràpia — 15	
4	<i>induced Pluripotent Stem Cells</i>	18
	Cèl·lules somàtiques vs ESC — 18 • Reprogramació cel·lular — 19 • Mètodes — 21 • Caracterització de la pluripotència — 21 • Bancs de cèl·lules — 22 • Ús d'iPSC — 22	
5	Cèl·lules mare neurals	23
II	TERÀPIA GÈNICA	24
	REFERÈNCIES	25

I. TERÀPIA CEL·LULAR

1. *Embrionic Stem Cells*

1.1 *Stem Cells*

Les cèl·lules mare tenen el potencial de desenvolupar-se a molts tipus cel·lulars diferents. Serveixen com a reservori pel sistema de reparació i regeneració d'estructures a l'organisme, es poden dividir en teòricament sense límit per replecionar altres cèl·lules sempre i quan la persona/animal estigui viva. Quan una cèl·lula mare es divideix, cada cèl·lula nova té el potencial de mantenir-se com a cèl·lula mare o esdevenir un altre tipus cel·lular amb una funció més especialitzada.

Una *stem cell* és una cèl·lula que presenta 2 propietats (poden ser endògenes o induïdes):

1. **Auto-renovació:** es pot dividir de manera que s'obté una cèl·lula idèntica. P.e els fibroblasts presenten aquesta característica. La divisió és simètrica. La capacitat d'auto-renovació depèn de cada clon. El grau d'auto-renovació d'una ESC és dels més alts que es poden aconseguir, en canvi una cèl·lula del mesoderma ja té una capacitat d'auto-renovació més limitada. Una ESC es pot mantenir 1 any *in vitro*. Les cèl·lules mare adultes han perdut la capacitat d'autorenovació.
2. **Capacitat de diferenciació:** Capacitat de generar una cèl·lula especialitzada per divisió asimètrica (morfologia, patró epigenètic, destí cel·lular). Molts medis de cultiu per cèl·lules mare bloquegen la capacitat de diferenciació.

D'una cèl·lula embrionària és interessant obtenir-ne clons. Dels diferents clons que s'obtenen s'ha de comprovar la pluripotencialitat.

Hi ha diferents graus de potència:

Totipotents Són els zigots. Poden donar lloc a un organisme sencer ben format. Té una capacitat proliferativa il·limitada i pot desenvolupar tots els teixits i òrgans post-embrionaris.

Pluripotents Són les ESC, del blastocist... Tenen la capacitat d'originar varietats de tipus cel·lulars i teixits.

Multipotents P.e les cèl·lules mesenquimals. Especialitzades en originar únicament determinats tipus cel·lulars de determinats teixits.

Les *germinal stem cells* també tenen potència. Les iPSC són cèl·lules adultes que s'han desdiferenciat artificialment amb un alt grau de potència.

Les cèl·lules de la medul·la òssia són cèl·lules mesenquimals i hematopoiètiques.

1.2 Blastocist pre-implantacional

Les cèl·lules mare embrionàries deriven d'embrions, concretament d'embrions desenvolupats a partir d'òvuls fertilitzats *in vitro* i després donats a la recerca amb un consentiment informat per part dels donants.

Les ESC s'aïllen típicament d'un blastocist pre-implantacional. Aquest blastocist no està adherit a l'úter, ja que quan s'adhereix a l'úter pateix canvis de morfologia i de llinatges importants. És aproximadament als 5 dies de gestació que s'aïlla. S'obtenen cèl·lules de l'estadi entre massa interna i la generació dels 3 fulls embrionaris. Si la massa interna es deixa desenvolupar, es comença a diferenciar. Es força a que la massa interna sigui una *stem cell*.

No totes les ESC són capaces de generar cèl·lules de línia germinal.

1.3 Obtenció de cèl·lules mare embrionàries

Es poden obtenir per 3 procediments:

- 1) Aïllament de la massa cel·lular interna
- 2) Aïllament de cèl·lules primordials de l'embrió
- 3) Transferència nuclear a partir de cèl·lules somàtiques adultes

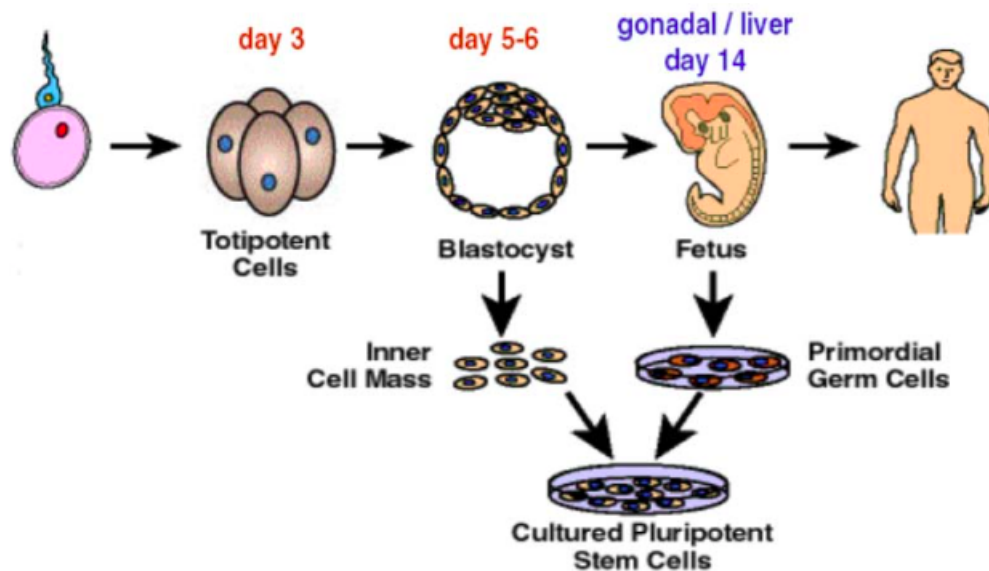


FIGURA 1: Procediment per l'aïllament d'ESC a partir de cèl·lules primordials de l'embrió

Aquestes tècniques han evolucionat en paral·lel a FIV.

Teratoma

Un **teratoma** és un tumor sòlid que conté cèl·lules proliferatives de les 3 capes embrionaries. Per generar els teratomes, s'injectaven les cèl·lules a escrot de ratolí o subdèrmic. Les iPSC tenen la capacitat de produir teratomes.

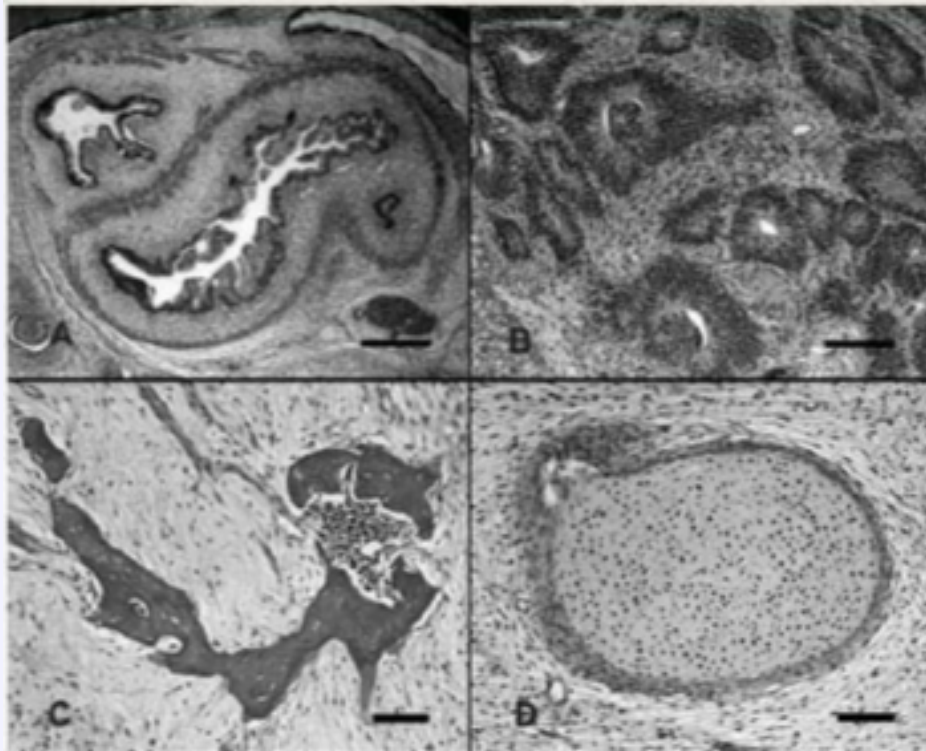


FIGURA 2: Teratomes originats a partir de la inoculació d'ESC derivades de blastocists en ratolins SCID immunodeprimits

1.3.1 Cultiu de ESC

Quan s'aïlla la massa interna, no s'obté de manera pura. El cultiu pretén recrear les condicions del blastocist. Si són humanes, es plaquegen sobre una capa de fibroblasts irradiats que donen suport físic i biològic (factors de creixement, citocines). Els fibroblasts són de prepuci de ratolí, són línies establertes que aguanten molt bé la irradiació. Els fibroblasts apoten un suport estructural a les ESC alhora que sintetitzen factors que promouen la supervivència i divisió de les ESC.

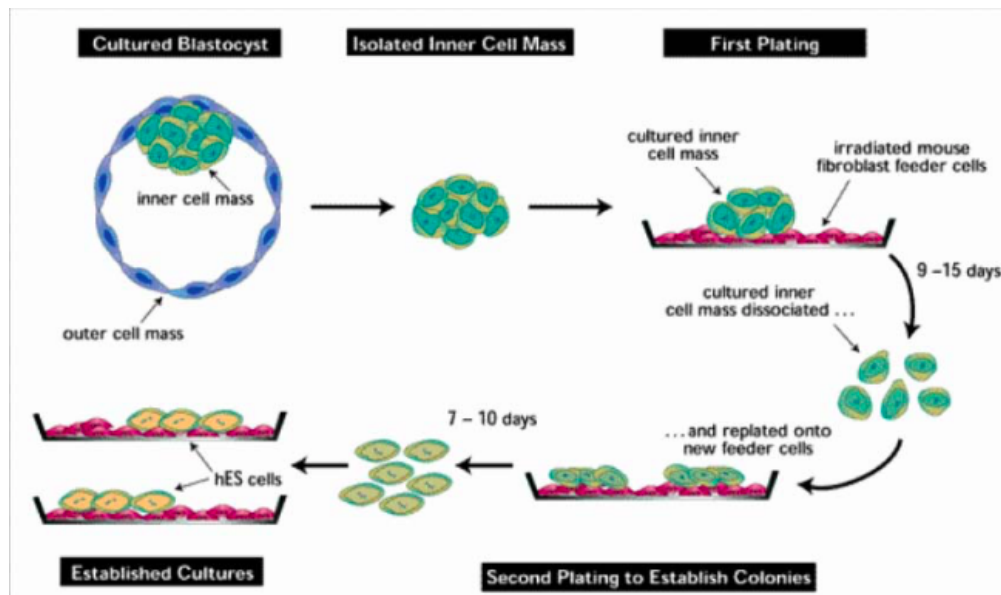


FIGURA 3: Derivació d'hESC

Passats uns dies, es forma un cos embrioide. S'agafen cèl·lules de la perifèria, les cèl·lules del centre estan en hipòxia i les cèl·lules del voltant es diferencien per l'acció del ROS. Aquestes cèl·lules de la perifèria es passen a una altra placa i així successivament fins que s'obtenen clons de ESC.

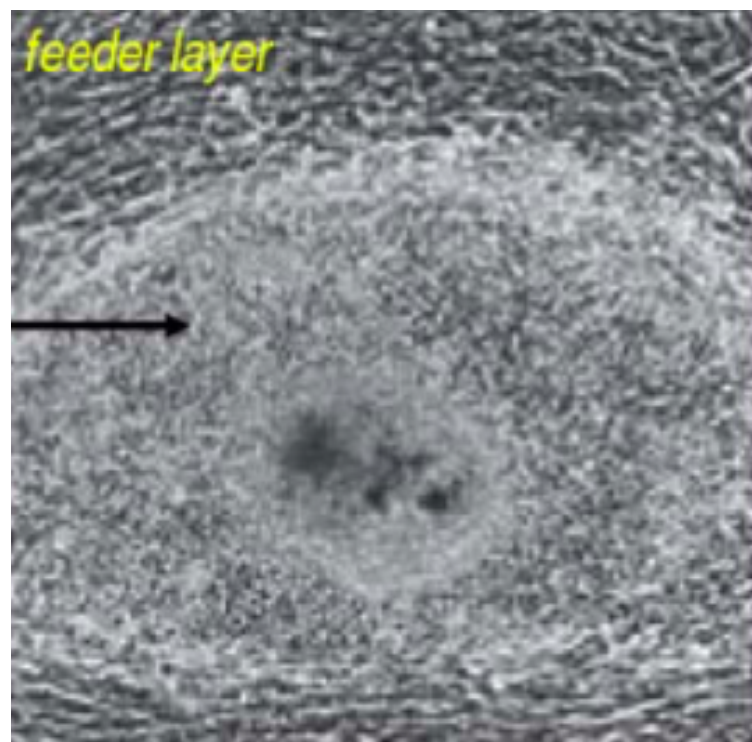


FIGURA 4: Cos embrioide amb el *core* hipòxic

El procés de replaquejar les cèl·lules es repeteix diverses vegades durant uns mesos, i s'anomena subcultiu. Cada cicle de subcultiu s'anomena passatge (*passage*). Després de 6 mesos o més, les 30 cèl·lules originals de la massa interna del blastocist dona lloc a

milions de cèl·lules. Els clons que proliferen en cultiu més de 6 mesos sense diferenciar-se són pluripotents i si presenten un cariotip normal ja són ESC.

Les neurosfères també poden presentar hipòxia al centre de la massa cel·lular. Per caracteritzar cèl·lules dopaminèrgiques s'utilitza la tirosina hidroxilasa com a marcador. Baixant la pO_2 (al 15-20%) s'aconsegueix una diferenciació a cèl·lules tirosina hidroxilasa.

En el ratolí, hi ha un punt que no es requereix la capa de fibroblasts. Per inhibir la proliferació dels fibroblasts es posa un antimitòtic (algo derivat de l'arabinosa).

Les cèl·lules de ratolí no fa falta que es cultivin sobre una capa de fibroblasts. El LIF es va utilitzar en el cultiu d'hibridomes per la obtenció d'anticossos monoclonals. El LIF també serveix per proliferar i mantenir mESC. El LIF activa la via de JAK/STAT, l'activació d'STAT3 indueix la formació de TF que afavoreixen l'auto-renovació de les cèl·lules. El LIF s'uneix a l'heterodímer LIFR-gp130. A vegades, s'activen vies que indueixen diferenciació com la via de les MAPK.

1.4 Marcadors

A diferents punts del procés de generació d'ESC, es proven si les cèl·lules mostren les propietats fonamentals de les ESC. Aquest procés s'anomena caracterització. Aquests tests inclouen:

- Caracterització de marcadors de membrana
- Cariotip
- Subcultiu, congelació, descongelació, passatge
- Provar si les hESC són pluripotents:
 - 1) Permetre la diferenciació espontània en cultiu
 - 2) Manipular les cèl·lules per dirigir-ne la diferenciació
 - 3) Formació de teratomes en ratolins

1.4.1 Experiments quimera

Tenen per objectiu demostrar si les cèl·lules són pluripotents o no.

S'obtenen 2 tipus cel·lulars d'un animal que expressa constitutivament la fosfatasa alcalina. Després s'injecten en un blastocist pre-implantacional i es col·loquen en una mare receptora (el grau d'implantació és molt petit). Es recullen els embrions a E11 i es revela l'activitat fosfatasa alcalina.

Si tots els teixits presenten coloració, estem parlant que les cèl·lules injectades són embrionàries. Si no tots els teixits presenten coloració, vol dir que la potència d'aquestes cèl·lules és més limitada.

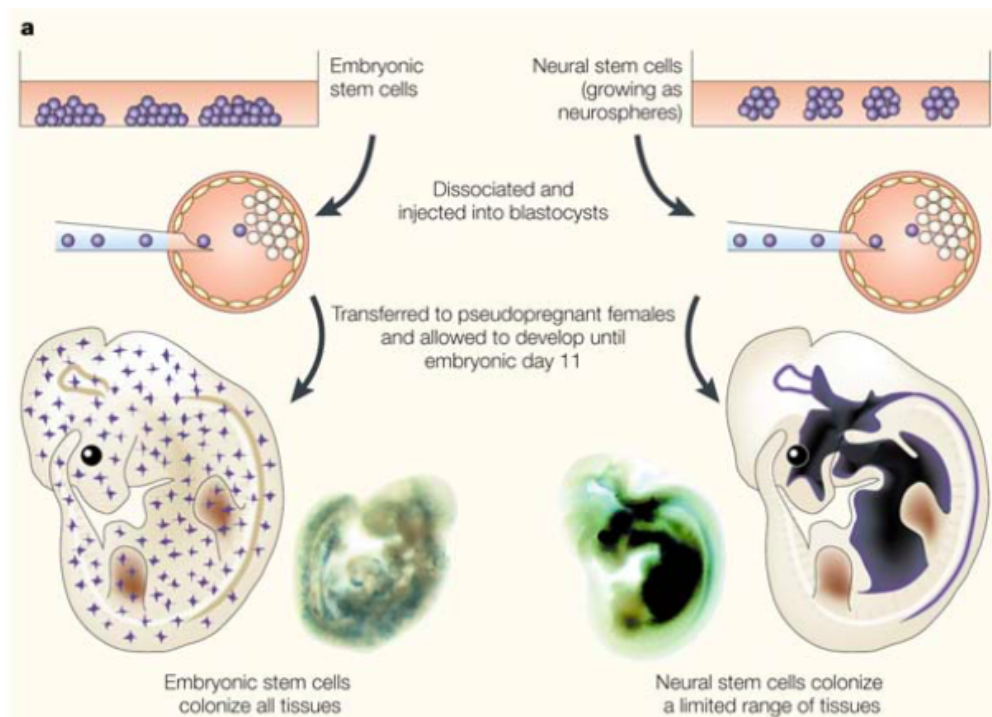


FIGURA 5: Procediment pels experiments quimera

En ESC, el control de la divisió cel·lular és molt complicat.

1.4.2 Validació de la pluripotencialitat

Els marcadors s'han de demostrar per 2 vies:

- RT-PCR
- IHC

Aquests marcadors poden ser:

- Les ESC tenen activitat **fosfatasa alcalina**, pel que es pot revelar fàcilment la seva activitat. Es forma un precipitat de color blau. Els clons de ESC són circulars i els de iPSC són poligonals. Els fibroblasts no tenen activitat fosfatasa alcalina; pel que es pot confirmar si el cultiu és pur.
- El **SSEA-1** (CD15) és un proteoglicà de membrana participa en adhesió a la membrana, etc.
- El **TRA** és un antigen associat a tumors.
- **Oct-4** (dímer de 3-4) és un factor de transcripció que s'expressa en cèl·lules que estan en auto-renovació.

En funció del tipus cel·lular, hi haurà diferències entre marcadors.

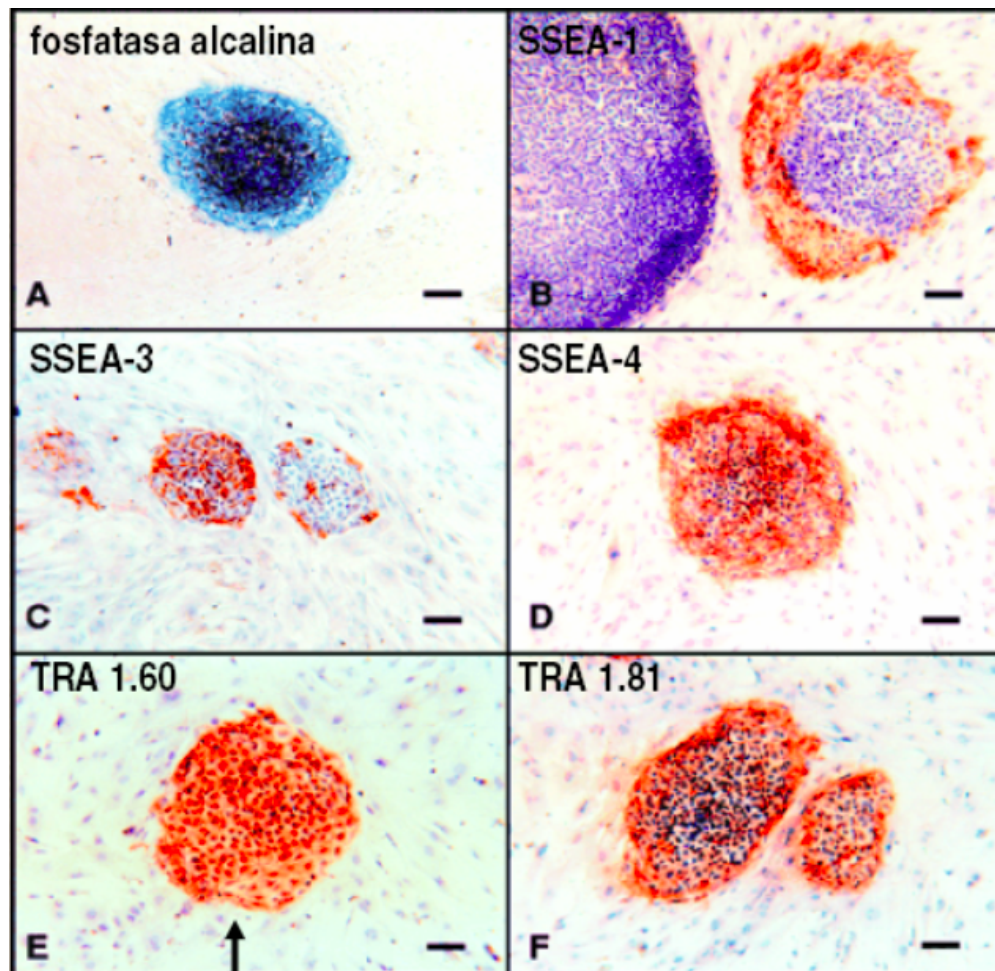


FIGURA 6: Immunohistoquímica de diferents marcadors d'ESC

1.4.3 Oct-4

Oct-4 és essencial per la primera especificació de llinatge embrionari, mentre que Nanog prevé la diferenciació d'endoderma a la massa interna. Sox2 i FoxD3 són essencials en el manteniment de la pluripotència de l'epiblast.

Oct-4 s'expressa a la mòrula, a la massa interna del blastocist, i després a l'epiblast (en el procés d'implantació). Oct-4 manté la capacitat proliferativa.

Nanog és un factor de transcripció sota el control de Oct4. S'expressa al trofoectoderma i evita la formació d'endoderma. Quan Nanog baixa l'expressió es forma endoderma.

El LIF regula la concentració d'Oct-4 per la via de les JAK/STAT.

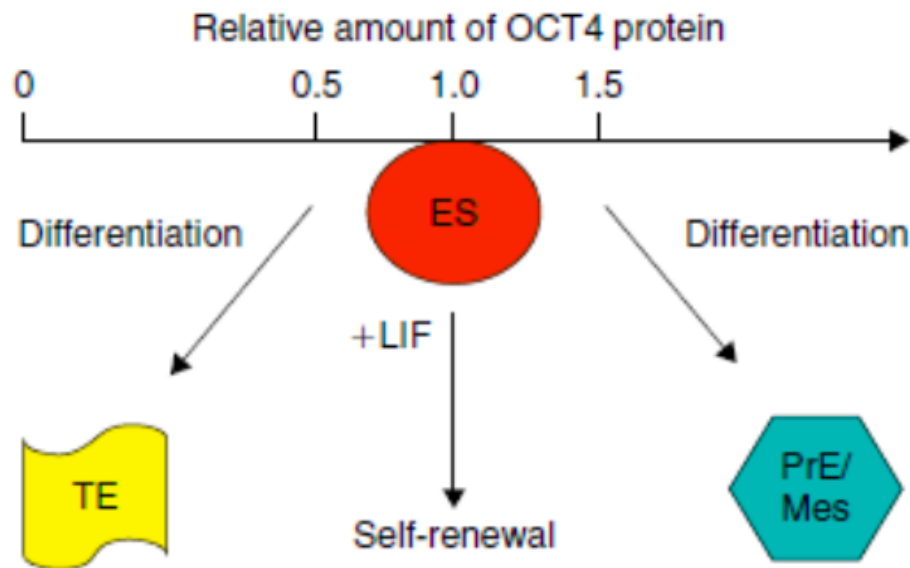


FIGURA 7: Model que il·lustra les conseqüències en la variació dels nivells d'Oct4

1.4.4 Regulació transcripcional de les ESC

Està molt controlat per diversos factors:

- **STAT3:** Activada per LIF. No sempre requerida ja que les ESC de mico no requereixen LIF. En rosegadors activa el Klf4 i altres com *myc*.
- **Oct3/4:** Codificats per Pou5FI. És necessari. Els KO presenten errors en estat pre-implantacional. El manteniment de l'expressió d'Oct4 no és suficient per l'auto-renovació en absència de LIF.
- **Sox2:** Es considera un cofactor d'Oct4 i activa l'expressió de Nanog. Sox2 i Oct4 presenten un procés de retroalimentació positiva.
- **Nanog:** També anomenat ENK. Pot forçar auto-renovació en absència de LIF. Codifica un factor de transcripció de la família d'homeobox NK2.
- **Klf4:** Membre de *Krüppel-like zing finger proteins*. Està sota el control d'STAT3 induït per LIF. La sobreexpressió de Klf4 és capaç de suportar auto-renovació sense LIF.

S'ha identificat un circuit central que regula la potència (Sox2, Oct-4, Nanog); amb vies positives i negatives:

- Les vies positives són LIF, PI3K-Akt.
- Les vies negatives (indueixen diferenciació) són FGF, MAPK, ERK1/2. ERK1/2 bloqueja TBX3, que de forma natural activa Nanog. Wnt és una via negativa, el factor armadillo es trobava per formar estructures dorsals, per generar adhesió la cèl·lula s'ha de diferenciar. Wnt controla l'adhesió cel·lular en estructures dorsals. Wnt inhibeix GSK3b i GSK3 inhibeix STAT3. Quan Wnt s'activa, STAT3 funciona millor.

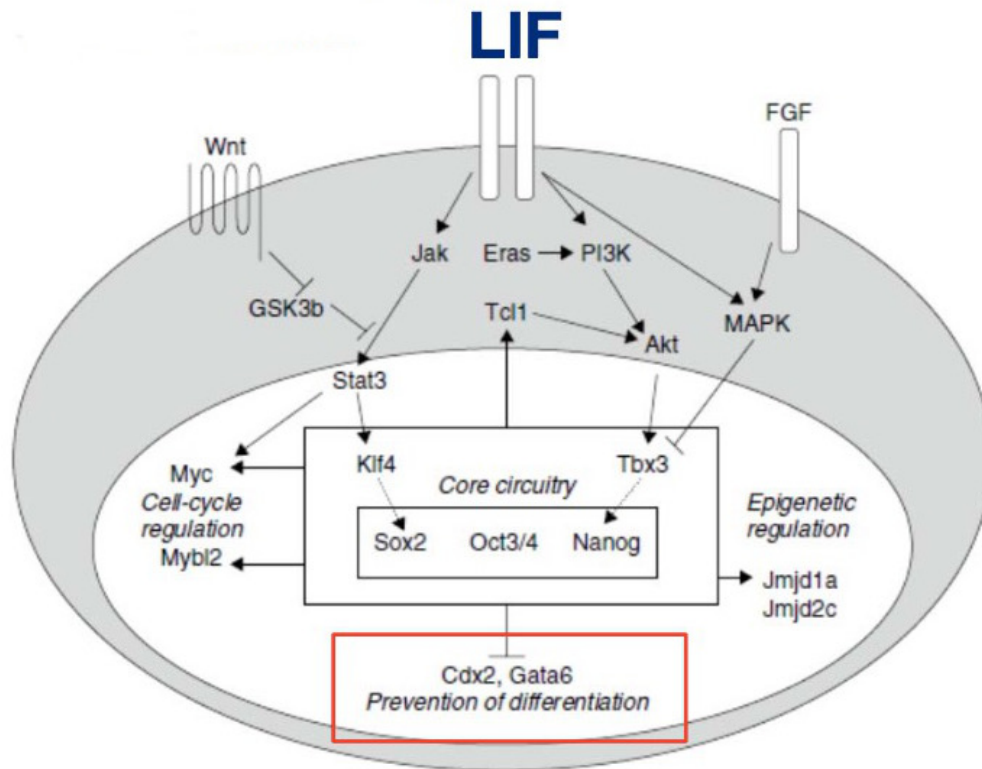


FIGURA 8: Mecanisme molecular per la retenció de l'auto-renovació de les ESC

La sobreexpressió de Sox2, Oct-4 i Nanog provoca un canvi de patró d'expressió genètic molt semblant al de les ESC. El problema principal és el manteniment de l'auto-renovació en el temps. Per mantenir la proliferació, es sobreexpressava *myc*.

Les germinal cells deriven de l'epiblast a l'estadi 10.

1.5 Manteniment de la pluripotència

Per tal de determinar els gens implicats en la pluripotència, es van fer experiments d'hibridació substractiva [Mitsui *et al.*, 2003]. Van obtenir cèl·lules somàtiques adultes i ESC i van construir llibreries de cDNA. El pool de cDNA de les cèl·lules somàtiques es va marcar amb 32-P i el pool de mRNA de ESC es va marcar amb biotina. Es van incubar els 2 pools per deixar-los hibridar. Es va aïllar la fracció de cDNA que no s'ha hibridat i es va purificar per biotina-estreptovidina. Així van obtenir una llibreria de cDNA amb gens expressats en ESC. La llista era de 24 gens.

	Gene name	Expression	Function
1	Khdh3 (ECAT1)	pluripotent cells, germ cells	Putative RNA-interacting protein
2	Esg1 (ECAT2, Dppa5)	pluripotent cells	RNA-interacting protein
3	Fbxo15 (ECAT3)	pluripotent cells, germ cells	Target of Oct3/4 and Sox2
4	Nanog (ECAT4)	pluripotent cells, germ cells	Core transcription factor in pluripotent cells
5	ERas (ECAT5)	pluripotent cells	Activator of PI3K pathway
6	Dnmt3l (ECAT7)	pluripotent cells, germ cells	DNA methyltransferase family required for maternal genomic imprints
7	Tdrd12 (ECAT8)	pluripotent cells, germ cells	RNA-interacting protein required for germ cell development
8	Gdf3 (ECAT9)	pluripotent cells, early mesoderm	a member of TGF β superfamily
9	Sox15	pluripotent cells	Sox family member has redundant function with Sox2
10	Dppa4 (ECAT15-1)	pluripotent cells, germ cells	DNA-interacting factor
11	Dppa2 (ECAT15-2)	pluripotent cells, germ cells	DNA-interacting factor plays important role in lung development
12	Fthl17 (ECAT20)	pluripotent cells	Ferritin, Heavy Polypeptide-Like protein
13	Sall4 (ECAT24)	pluripotent cells, germ cells	Transcription factor plays important role in pluripotency and embryogenesis
14	Oct3/4	pluripotent cells, germ cells	Core transcription factor in pluripotent cells
15	Sox2	pluripotent cells, germ cells, neural cells	Core transcription factor in pluripotent cells
16	Rex1 (Zfp42)	pluripotent cells, germ cells	Target of Oct3/4
17	Utf1	pluripotent cells, germ cells	Target of Oct3/4 and Sox2
18	Tcl1	pluripotent cells, germ cells	Activator of PI3K pathway
19	Dppa3 (Stella, PGC7)	pluripotent cells, germ cells	DNA-interacting molecule protects against DNA demethylation in early embryos
20	Klf4	widely expressed	Transcription factor plays important role in pluripotency
21	β -catenin (stabilized mutant)	widely expressed	Regulator of cell adhesion and gene transcription as a target of Wnt pathway
22	c-Myc (stabilized mutant)	widely expressed	Transcription factor plays important role in pluripotency
23	Stat3 (dominant active)	widely expressed	Transcription factor plays important role in pluripotency
24	Grb2 (dominant negative)	widely expressed	Adaptor molecule of Ras/MAPK pathway

FIGURA 9: Llista dels 24 gens identificats en l'screening inicial

Per decidir la importància d'aquests 24 gens en la pluripotència es va fer un experiment de promoter trapping. El promoter trapping es basa en clonar un reporter downstream d'un promotor d'interès, en aquest cas era la galactosidasa i un gen de resistència a la geneticina (G418). Si la cèl·lula té el promotor actiu, expressarà galactosidasa. Van fer servir Fbxo15, que és un motiu que es troba a les seqüències promotores de certs gens. Amb aquesta estratègia es van seleccionar 14 gens [Tokuzawa *et al.* , 2003].

Actualment, abans de fer la hibridació s'amplifica la llibreria per tal de no perdre els fragments menys abundants.

2. Adult Stem Cells

La potència de les ASC és més limitada, aquestes cèl·lules són multipotents. El programa epigenètic és restrictiu i el cultiu és complicat.

El nínxol cel·lular es refereix a cèl·lules mare adultes. Primer es va descriure al sistema nerviós. Es va veure que el nínxol és extrapol·lable a tots els òrgans adults. El nínxol necessita cèl·lules amb capacitat proliferativa, una matriu extracel·lular permissiva i angiogènesi a la zona:

- Aquestes cèl·lules presenten taxes de proliferació baixes. Moltes vegades estan quiescents. Elements que controlen entrada i sortida al cicle cel·lular. El cicle cel·lular pot durar fins a 3 dies.
- La matriu extracel·lular permissiva permet que les cèl·lules migrin (cèl·lules de les criptes intestinals). La fibronectina és dels més importants.
- Hi ha una molècula endotelial que controla la proliferació d'ASC. El vas sanguini aporta elements que forcen a la diferenciació de les ASC, a la sortida del cicle cel·lular...

Els ROS inhibeixen la capacitat proliferativa de la cèl·lula i indueixen la diferenciació. Les ASC es troben en:

- Sang del cordó umbilical: Majoritàriament HSC. També hi ha MSC i endotelials. ca (en persones joves) o en estèrnum (gent gran). Hi ha 2 poblacions: les HSC i MSC (mesenquimals de medul·la òssia).
- Placenta
- Medul·la òssia: Punció a cresta ilíaca
- Lipoaspirat: S'obtenen MSC.

Per aïllar ASC, es necessita molta quantitat de teixit. Trobem 1 ASC per cada milió de cèl·lules.

- 1) Percentatge baix de la població cel·lular general: A la medul·la òssia i al cordó umbilical, però, hi ha moltes HSC.
- 2) Dificultat d'aïllament en el teixit adult: Actualment, els protocols són senzills.
- 3) Relativa dificultat de creixement *in vitro*: Actualment, no és difícil.
- 4) Limitació amb relació al potencial i versatilitat: Una MSC no dura més de 3 setmanes i les neural stem cells uns 4 mesos abans de ser un glioma.

2.1 Cèl·lules mare hematopoètiques

El marcador de les HSC és el CD34. La diferenciació d'aquestes cèl·lules a línies eritroides i leucoides és senzilla però costa molt obtenir plaquetes ja que els megacariòcits costen de mantenir en cultiu.

Les cèl·lules CD34 no funcionen per reparar la necrosi en un cor infartat.

Un *sorting* per CD34, c-kit i Sca-1 s'obté la població de progenitors hematopoètics. Són cèl·lules poc adherents a les plaques de plàstic ja que són molt proliferatives.

Quan s'extreu la sang de cordó umbilical, les cèl·lules es cariotipen i es guarden en un banc.

2.2 Cèl·lules mare mesenquimals

El CD44 és un marcador de cèl·lules mesenquimals. S'obtenen de medul·la òssia, teixit adipós blanc, epidermis, musculatura i perivascularura.

El lipoaspirat és un mètode que dona poques contaminacions. Per degradar el teixit es fan servir col·lagenasa o dispasa. Es centrifuga l'homogenat de teixit i s'obtenen 2 bandes: a la part superior queda el greix i just per sota hi ha les MSC. Els primers dies hi haurà molta mort cel·lular i després queda un cultiu adherent. Són cèl·lules mononucleades.

Són cèl·lules multipotents. Exemple: no es poden diferenciar a cèl·lules neuronals funcionals, ja que quan se'ls hi treu els factors diferenciadors no mantenen el llinatge neuronal.

Les MSC de medul·la òssia es va veure que anaven bé per casos de neurodegeneració. L'esclerosi múltiple presenta brots en què el sistema va revertint els processos de desmielinització fins que la malaltia cronifica. Quan es posaven MSC autòlogues, els pacients presentaven menys brots.

Aquestes cèl·lules a part de la capacitat reparadora, poden modular el sistema immunitari a la zona d'implantació.

Les cèl·lules mare mesenquimals es van identificar per primera vegada en 1966 en els estudis realitzats per Friedenstein i Petrakova, que van aïllar cèl·lules progenitores formadores de cartílag a partir de cèl·lules de la medul·la òssia de rates amb una morfologia similar a fibroblasts.

La font més estudiada i accessible de MSC és la medul·la òssia, encara que MSC s'han aïllat a partir de més teixits, incloent el fetge, la sang fetal, sang del cordó umbilical i el líquid amniòtic

Dins de la medul·la, les MSC comprenen 0,001 -0,1% de la població total de cèl·lules nucleades. Les MSC humanes s'aïllen de la medul·la òssia, obtingudes principalment de la cresta ilíaca posterior de la pelvis, i dels compartiments tibial i femoral.

Aquestes MSC es poden expandir àmpliament en cultius in vitro sense pèrdua de funció o de fenotip.

MSCs se seleccionen a partir de cèl·lules mononuclears de moll d'os (MNC) per la seva adherència a plàstic en cultiu i s'expandeixen en un mitjà que consta d'Eagles Modificat

Medi Dulbecco (baix nivell de glucosa), suplementat amb 10% de sèrum boví fetal (FBS) i L-glutamina en 37°C amb 5% de CO₂ a densitats d'1 x 10⁴-0,4 x 10⁶ cèl·lules / cm², segons el protocol estàndard.

Els cultius contenen cèl·lules de ràpida auto-renovació que es mantenen en alts nivells durant diversos passatges si es mantenen els cultius a baixa densitat, a més de les cèl·lules més grans i més madures que predominen en passatges posteriors. Aquestes cèl·lules més grans deixen la proliferació aproximadament al límit de Hayflick de 50 duplicacions de població. Hi ha moltes variacions de les condicions de cultiu descrites, incloent el medi de cultiu privades de sèrum suplementat amb citoquines específiques i factors de creixement essencials per a l'expansió de MSC. En condicions de cultiu, les MSC en el seu estat indiferenciat es pot observar per microscòpia de contrast com una monocapa confluent adherent de cèl·lules en forma de fus que tenen una aparença fibroblàstica.

Separaven les cèl·lules per gradient de densitat i les cultivaven. Hi havia cèl·lules adherents (HSC) i en suspensió (cèl·lules estromals). Creien que les estromals servien de suport a les HSC.

Aquests cultius costaven d'arrencar, però després presentaven una gran proliferació. Aguanten fins a 20 *passages*. Es va veure que el responsable d'aquest fenomen era Dickkopf-1 (inhibidor de la senyalització de Wnt). Quan un cultiu arriba a confluència, les cèl·lules es comencen a tocar formant unions amb E-cadherina. Les unions amb E-cadherina són dependents de β -catenina. Si la β -catenina no està a les unions cel·lulars, es troba al nucli fent de factor de transcripció. De forma natural, GSK-3 β fosforila a β -catenina i indueix la degradació al proteasoma i roman un flux cap al nucli. Wnt inhibeix l'activitat GSK-3 β . Wnt funciona de forma autocrina.

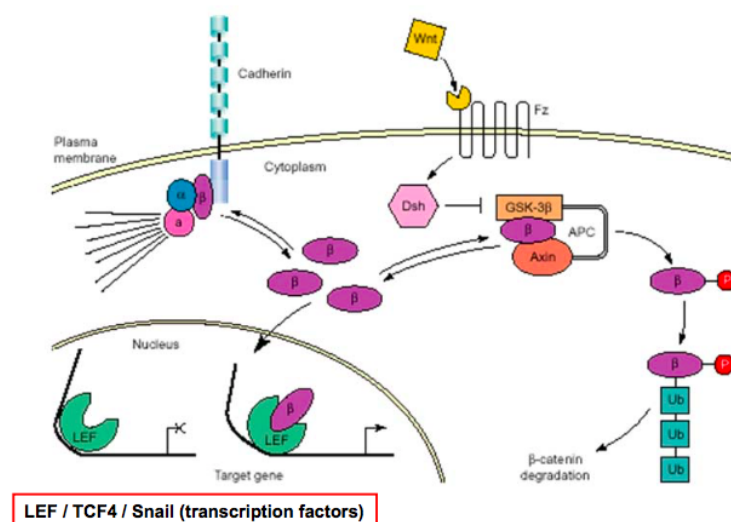


FIGURA 10: Regulació de la proliferació per Wnt/beta-catenina

Els assajos de cicatrització es basen en lesionar una capa de cèl·lules endotelials per avaluar *in vitro* la capacitat de regeneració i cicatrització. El KillerRedR emet fluorescència vermella i genera ROS, que mata la cèl·lula. El KillerRed es basa en transfectar un plàsmid que expressi aquest compost. El Rosa Bengala fa el mateix però de manera

massiva i s'emplea en experiments *in vivo*.

Aquest paper feia lesions puntuals usant làser pulsat. Després col·locaven MSC en aquesta lesió. Al cap d'un temps hi havia una recuperació de cèl·lules. La conclusió que van treure és que la MSC es va transdiferenciar a cèl·lules endotelials. El que REALMENT va passar és que la MSC es van fusionar amb cèl·lules endotelials (*in vitro*).

2.2.1 Aplicacions terapèutiques de les MSC

Les aplicacions en teràpia són 2:

1. Immunomodulació
2. Reemplaçament cel·lular

2.2.1.1 Immunomodulació

Les MSC formen part de l'estroma de la medul·la òssia i donen suport al microambient. SDF1 (CXCL12) és una citocina sintetitzada per les MSC. Aquesta molècula té 2 receptors: el CXCR4 i el CXCR7, els quals competeixen per SDF1. Quan la cèl·lula expressa CXCR7, sempre lliga SDF1. Si la cèl·lula expressa CXCR4 i CXCR7, CXCR7 fa les funcions de dominant negatiu ja que té més afinitat. La cèl·lula regula els nivells de CXCR7 durant la migració. Provoca canvis al citosquelet, proteïnes motores associades al citosquelet, integrines... CXCR4 s'expressa en HSC i fa que la HSC vagi al torrent sanguini. El binomi SDF1/CXCR4 activen la via de les MAPK (diferenciació).

El tractament de MSC en pacients amb esclerosi múltiple anava molt bé, els pacients milloraven símptomes.

Les MSC disminueixen l'activació de limfòcits i macròfags. Les MSC generen NO, PGE2, TGF β 1 i la kineurina disminueixen l'activació de limfòcits.

2.2.1.2 Reemplaçament cel·lular

Pot regenerar tots els tipus cel·lulars derivats de mesènquima. A la pràctica s'emplea per produir os, cartílag i teixits connectiu.

Si en un cultiu de MSC, es suplementa amb dexametasona, glicerol fosfat, ascorbat i FBS; es comença a acumular calci i expressa colàgen VIII. Després es poden trasplantar en os i tenen un percentatge d'èxit alt.

Si en un cultiu de MSC, s'afegeix TGF β 1, ascorbat i sense sèrum; augmenta l'expressió de colàgen II i IX i agrecan i àcid hialurònic.

3. Teràpia cel·lular per malalties coronàries

3.1 Infart de miocardi

Posem el cas que hi ha el tamponament d'una artèria coronària. Si s'afecta una branca primària, tot el que queda per sota mor. Si afecta una terciària, lògicament l'afectació és menor. El gruix del ventricle disminueix i quan arriba a ser un 40% menor de l'inicial és un problema greu, és una afectació a llarg termini degut a la mort cel·lular.

El cateterisme coronari es basa en netejar el trombe i la col·locació d'un stent (per mantenir l'artèria oberta). L'altre opció és un bypass coronari.

Al cor hi ha unes cèl·lules que estan en un nínxol quiescent que generen poques cèl·lules. La resposta endògena està dirigida a renovació i manteniment. La complicació és que les cèl·lules generades s'han d'incorporar a un sistema contràctil i amb activitat elèctrica. El pericardi reacciona i cobreix la zona de fibroblasts. La cicatriu no presenta activitat elèctrica i no la transmet, no es contrau. Llavors es generen arrítmia. El cor perd força d'ejecció i els nivells d'oxigen en sang baixen i es genera més musculatura. L'arrítmia es complica fins a una insuficiència coronària.

3.2 Estratègies de teràpia

La injecció de cèl·lules directament al cor és un problema ja que el cor presenta moviment i les cèl·lules es perden. S'injecten llavors amb un hidrogel per augmentar la densitat de la solució. L'altra opció és col·locar un pegat amb cèl·lules sobre la zona lesionada. L'altre estratègia és induir la proliferació endògena al cor.

Els 2 ventricles del cor s'originen de progenitors diferents. L'aurícula té un altre origen. Hi ha 9 poblacions diferents descrites al cor. El ventricle esquerre és el més gran però és el que té menys cèl·lules.

S'han provat nombroses teràpies cel·lulars per reparar les lesions d'un infart; tant teràpies de recuperació (citocines i quimioquines) o de regeneració.

El c-kit és un receptor tirosina quinasa que es presenta només en algunes cèl·lules. MDR-1 és un altre marcador. c-kit és el marcador més general.

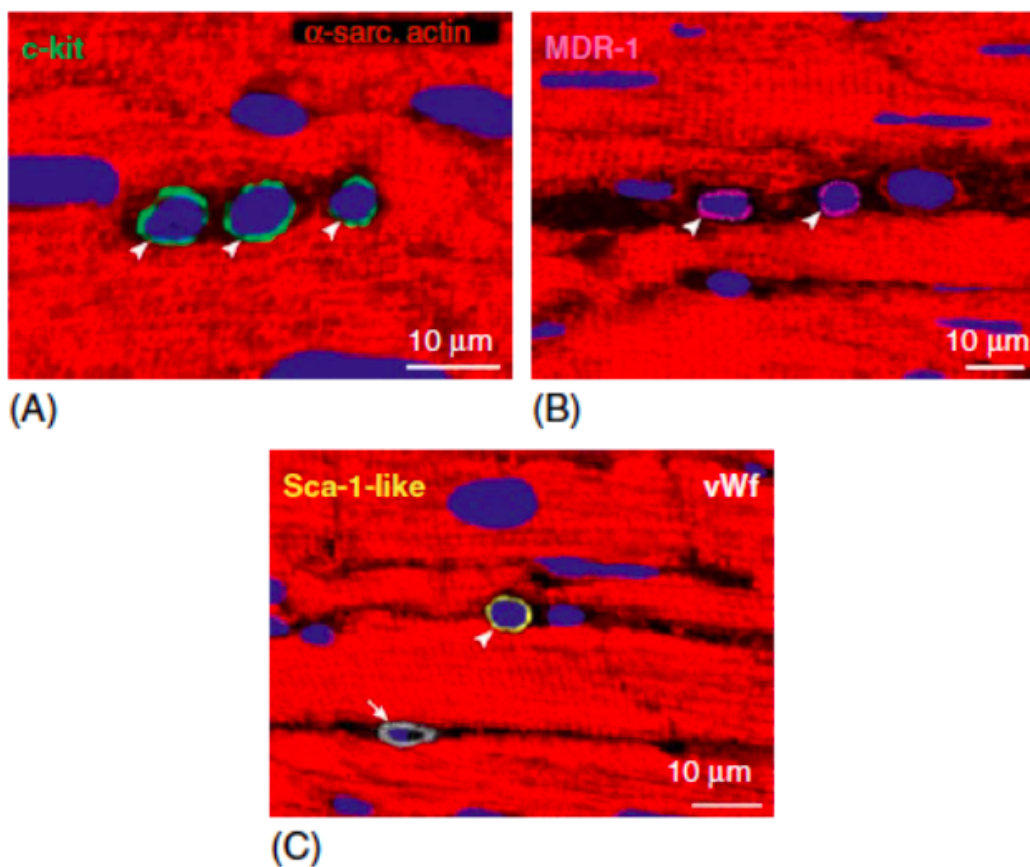


FIGURA 11: Seccions del ventricle d'una rata adulta

3.2.1 Ús de cèl·lules de cor

L'anàlisi clonal es basa en aïllar una cèl·lula i fer-la proliferar en cultiu. Si s'injecten en un cor, les cèl·lules s'integren. L'inconvenient és l'eficiència. Les cèl·lules s'integren més en un ventricle que en un altre.

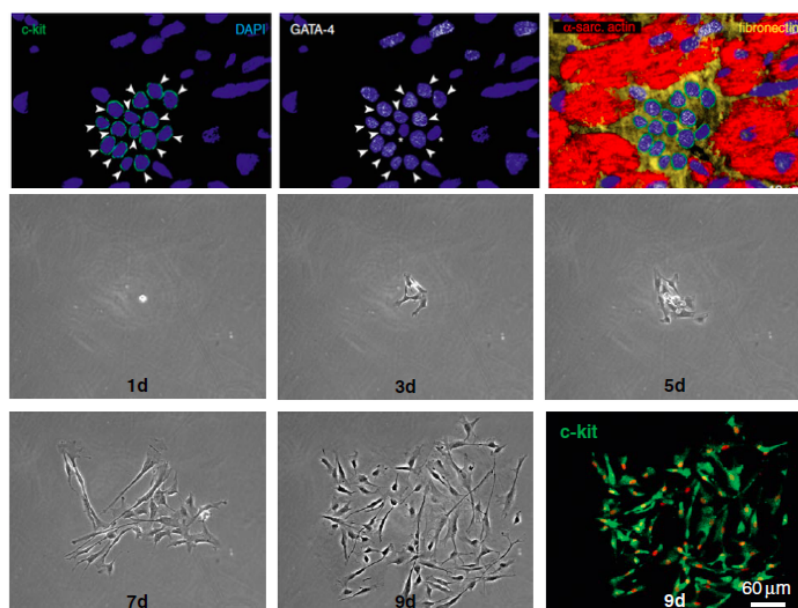


FIGURA 12: Anàlisi clonal de cardiomiòcits

3.2.2 Ús de HSC

Es provoca una isquèmia en rates femella. Per altra banda, hi ha mascles que expressen GFP i se'ls fa una punció ilíaca. Es van barrejar les cèl·lules obtingudes amb un hidrogel. Els hidrogels s'obtenen de matriu extracel·lular de sarcomes en cultiu.

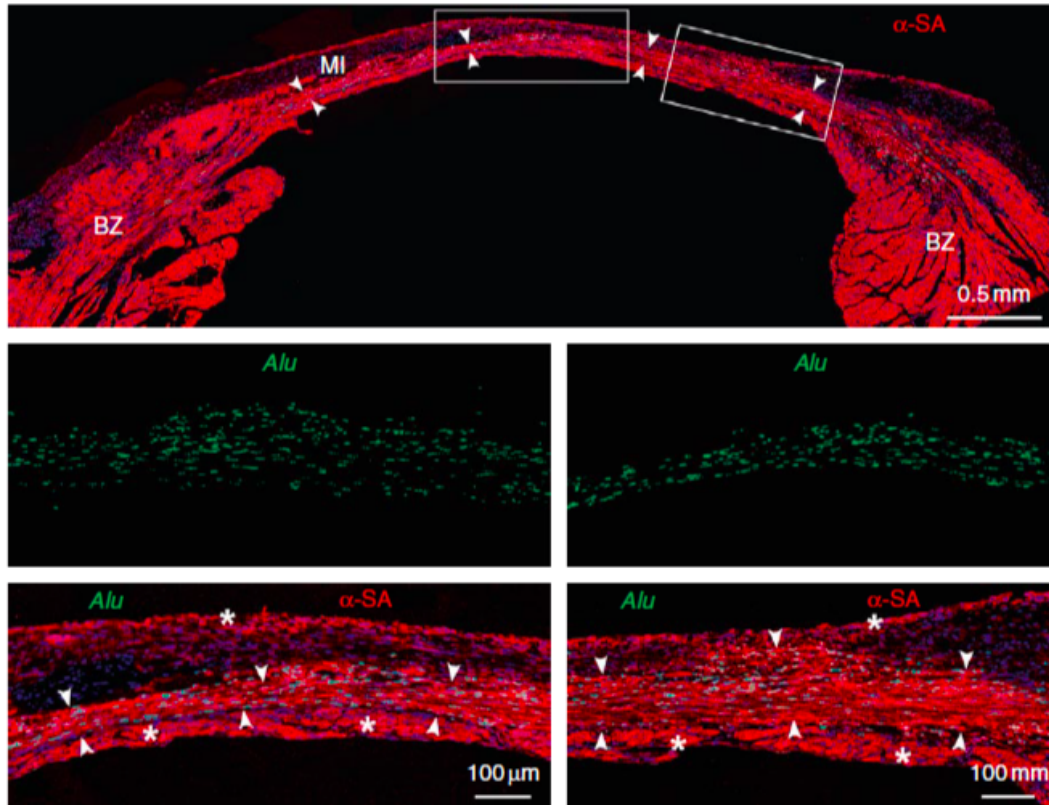


FIGURA 13: Injecció de MSC en un cor infartat

Van injectar aquest hidrogel + aspirat medul·lar.

Més tard, es va demostrar que les HSC no servien per infart de miocardi.

Llavors es van fer estudis amb MSC i el cor recuperava el gruix del ventricle després del tractament amb MSC. El problema era que la diferenciació no generava múscul cardíac i les cèl·lules no anaven en sincronia amb la resta del cor. Les MSC no guanyaven potència d'ejecció i al cap d'un temps generaven arrítmies.

4. induced Pluripotent Stem Cells

4.1 Cèl·lules somàtiques vs ESC

La primera reprogramació completa es va fer amb humans. El primer experiment de Yamanaka no va aconseguir una reprogramació completa [Takahashi & Yamanaka, 2016].

Als anys 90 s'intentava fer transdiferenciació cel·lular, transferència somàtica, etc.

Per tal de determinar els gens implicats en la pluripotència, es van fer experiments d'hibridació substractiva [Mitsui *et al.*, 2003]. Van obtenir cèl·lules somàtiques adultes i ESC i van construir llibreries de cDNA. El pool de cDNA de les cèl·lules somàtiques es va marcar amb 32-P i el pool de mRNA de ESC es va marcar amb biotina. Es van incubar els 2 pools per deixar-los hibridar. Es va aïllar la fracció de cDNA que no s'ha hibridat i es va purificar per biotina-estreptovidina. Així van obtenir una llibreria de cDNA amb gens expressats en ESC. La llista era de 24 gens.

	Gene name	Expression	Function
1	Khdh3 (ECAT1)	pluripotent cells, germ cells	Putative RNA-interacting protein
2	Esg1 (ECAT2, Dppa5)	pluripotent cells	RNA-interacting protein
3	Fbxo15 (ECAT3)	pluripotent cells, germ cells	Target of Oct3/4 and Sox2
4	Nanog (ECAT4)	pluripotent cells, germ cells	Core transcription factor in pluripotent cells
5	ERas (ECAT5)	pluripotent cells	Activator of PI3K pathway
6	Dnmt3l (ECAT7)	pluripotent cells, germ cells	DNA methyltransferase family required for maternal genomic imprints
7	Tdrd12 (ECAT8)	pluripotent cells, germ cells	RNA-interacting protein required for germ cell development
8	Gdf3 (ECAT9)	pluripotent cells, early mesoderm	a member of TGFβ superfamily
9	Sox15	pluripotent cells	Sox family member has redundant function with Sox2
10	Dppa4 (ECAT15-1)	pluripotent cells, germ cells	DNA-interacting factor
11	Dppa2 (ECAT15-2)	pluripotent cells, germ cells	DNA-interacting factor plays important role in lung development
12	Fthl17 (ECAT20)	pluripotent cells	Ferritin, Heavy Polypeptide-Like protein
13	Sall4 (ECAT24)	pluripotent cells, germ cells	Transcription factor plays important role in pluripotency and embryogenesis
14	Oct3/4	pluripotent cells, germ cells	Core transcription factor in pluripotent cells
15	Sox2	pluripotent cells, germ cells, neural cells	Core transcription factor in pluripotent cells
16	Rex1 (Zfp42)	pluripotent cells, germ cells	Target of Oct3/4
17	Utf1	pluripotent cells, germ cells	Target of Oct3/4 and Sox2
18	Tcl1	pluripotent cells, germ cells	Activator of PI3K pathway
19	Dppa3 (Stella, PGC7)	pluripotent cells, germ cells	DNA-interacting molecule protects against DNA demethylation in early embryos
20	Klf4	widely expressed	Transcription factor plays important role in pluripotency
21	β-catenin (stabilized mutant)	widely expressed	Regulator of cell adhesion and gene transcription as a target of Wnt pathway
22	c-Myc (stabilized mutant)	widely expressed	Transcription factor plays important role in pluripotency
23	Stat3 (dominant active)	widely expressed	Transcription factor plays important role in pluripotency
24	Grb2 (dominant negative)	widely expressed	Adaptor molecule of Ras/MAPK pathway

FIGURA 14: Llista dels 24 gens identificats en l'screening inicial

Abans de la hibridació, es pot fer una amplificació RT-PCR amb primers oligo-dT.

4.2 Reprogramació cel·lular

4.2.1 Selecció per G418

Fbxo15 és un factor downstream d'Oct4. Oct4 i Sox2 activa Fbxo15. Van construir un cassette amb la β -galactosidasa i un gen de resistència a la geneticina i ho transfectava conjuntament amb els 24 factors descoberts per hibridació substractiva per veure quins gens activaven Fbxo15.

Per avaluar aquests 24 gens candidats, van desenvolupar un sistema en què la inducció de l'estat pluripotent es podia detectar com la resistència a la G418. Van insertar un cassette β -geo, una fusió de β -galactosidasa i un gen de resistència a la geneticina, al gen Fbx15 de ratolí per recombinació homòloga (A). Encara que s'expressa específicament en mESC i embrions primerencs, Fbxo15 és imprescindible pel manteniment de la pluripotència i el desenvolupament en ratolins [Takahashi & Yamanaka, 2006].

Les ESC homozigotes per la construcció β -geo ($Fbx15^{\beta geo/\beta geo}$) eren resistents a altes concentracions de G418 (més de 12 mg/mL), mentre que les cèl·lules somàtiques derivades de ratolins $Fbx15^{\beta geo/\beta geo}$ eren sensibles a una concentració normal de G418 (0.3 mg/mL). Esperaven que inclús l'activació parcial del locus Fbx15 resultaria en la resistència a concentracions normals de G418.

Van introduir cadascun dels 24 gens candidats per transducció retroviral ([Mitsui *et al.*, 2003]) en MEF (fibroblasts embrionaris de ratolí) derivats d'embrions $Fbx15^{\beta geo/\beta geo}$. Les cèl·lules transduïdes es van cultivar sobre una monocapa de cèl·lules STO (*feeder cells*) en medi per ESC amb 0.3 mg/mL de G418. No van obtenir, però, colònies resistents amb únic factor; per tant no hi havia cap gen candidat que fos suficient per activar el locus Fbx15. D'altra banda, la transducció dels 24 gens candidats junts generaven 22 colònies resistents a la G418 (B). Dels 12 clons que es van continuar cultivant sota condicions selectives, 5 clons exhibien una morfologia similar a ESC; com ara una forma rodona, un nuclèol gran i un citoplasma escàs (C). Si la vora de la colònia està molt ben definit, la reprogramació ha anat relativament bé.

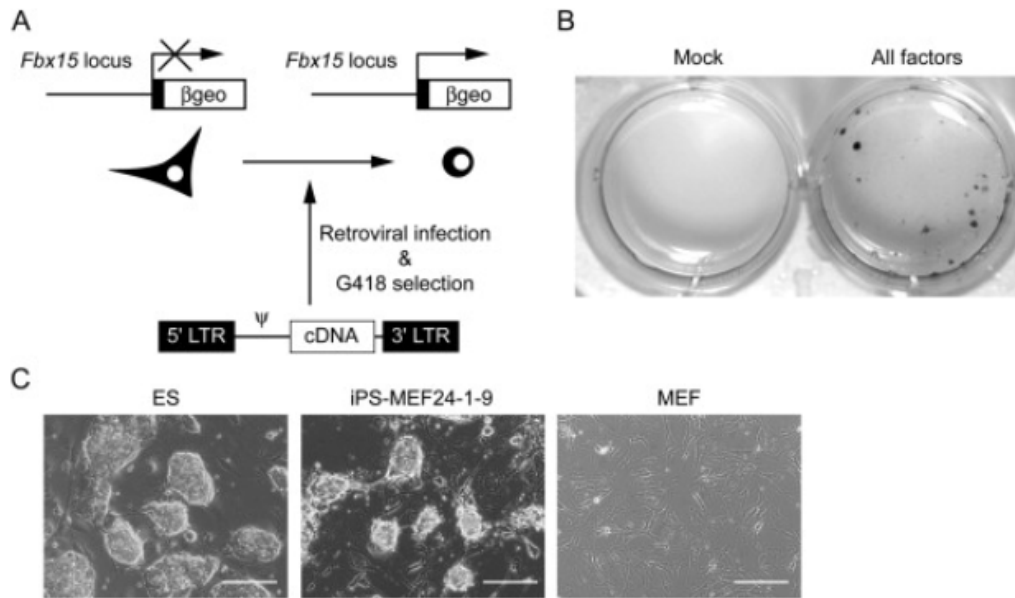


FIGURA 15: Generació d'iPSC a partir de cultius de fibroblasts embrionaris I

Van repetir els experiments i van observar 29 colònies a la G418, de les quals van seleccionar 6. 4 d'aquests clons mostraven una morfologia similar i unes propietats proliferatives similars a ESC (D). El temps de duplicació d'aquestes cèl·lules (19.4, 17.5, 18.7, and 18.6 hores) era equivalent a les ESC (17h). Van anomenar aquestes cèl·lules "iPS-MEF24" per cèl·lules mare pluripotents induïdes a partir de MEF per 24 factors. Anàlisis per RT-PCR van revelar que els clons iPS-MEF24 expressaven marcadors d'ESC; com Oct3/4, Nanog, E-Ras, Cripto, Dax1, ZFP296 i FGF4 (E). El *bisulfite genomic sequencing* va demostrar que els promotors de Fbx15 i Nanog no estaven metilats en iPS-MEF (F). Per contra, el promotor d'Oct4 sí que estava metilat en aquestes cèl·lules.

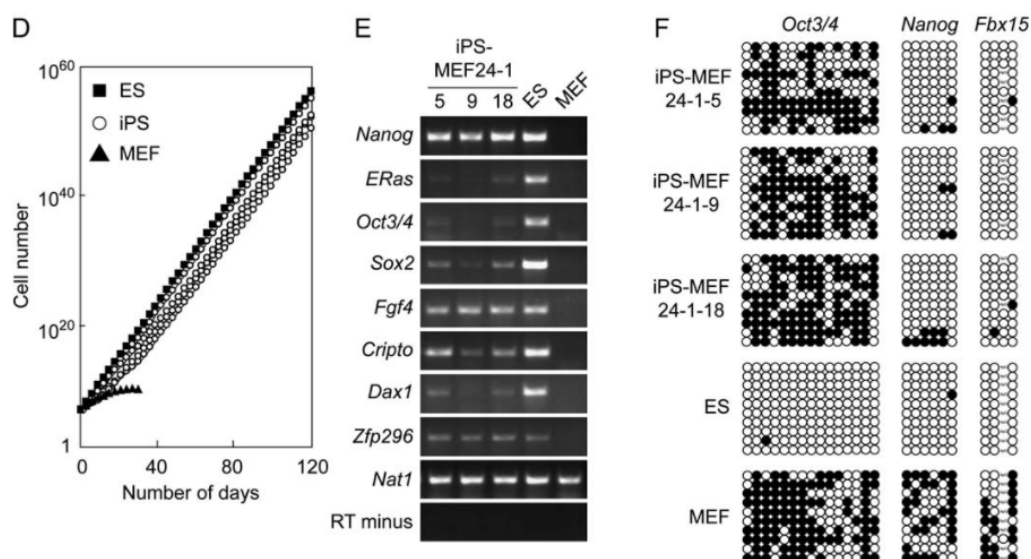


FIGURA 16: Generació d'iPSC a partir de cultius de fibroblasts embrionaris II

La metilació de promotors (en illes CpG, que inactiva promotors) és un marcador de

reprogramació. Yamanaka usava promotors de CMV, que eren metilats molt ràpidament.

4.2.2 Reprogramació parcial

Amb el mateix sistema, introduïen Sox2, Oct4, c-Myc i Klf4 i aconseguien una reprogramació parcial.

Van repetir el mateix sistema però posant el cassette (EGFP i puromicina) sota el promotor de Nanog. En aquest cas, va separar els 2 gens per una seqüència IRES per optimitzar els resultats.

Va aconseguir una reprogramació plena. Els promotors de Oct4 i Nanog no estaven metilats. El 20% dels ratolins quimera van desenvolupar càncer ja que el promotor endogen de *myc* tampoc estava metilat.

Sense *myc* la reprogramació no era tant eficient ni tant ràpida.

Va usar LIN28 en comptes de *myc* i lentivirus. Els lentivirus de 2a generació són molt més segurs a nivell biològic.

4.2.3 Mecanisme de reprogramació

En el cas de la iPSC, la formació de teratomes és deguda a l'activació endògena dels gens de pluripotència.

En una cèl·lula somàtica, al final de la reprogramació s'arriba a una activació dels gens de pluripotència endògena.

Quan es reprogramen MEF, s'ha d'observar la pèrdua d'expressió de CD44 i l'aparició d'ICAM1.

Diferents models:

- 2009: procés estocàstic (aleatori)
- 2012: procés jeràrquic en què una cèl·lula mostra molta activitat de Sox2.
- 2014: Model privilegiat. Una cèl·lula és la privilegiada per ser reprogramada. La diferència és deguda a que les cèl·lules no s'infecten amb el mateix nombre de virus ni el grau d'integració és homogeni.

4.3 Mètodes

Els mètodes que no usen retrovirus/lentivirus són molt menys eficients.

Per tal que la cèl·lula expressi els 4 factors en nivells similars, s'empaqueten junts en un mateix virus.

4.4 Caracterització de la pluripotència

Per marcar:

- Endoderma: alpha-fetoproteïna, FoxA2

-
- Mesoderma: ASMA (Smooth muscle actin) i brachyury
 - Ectoderma: betaIII-tubulina (isoforma de tubulina específica de neurones), GFAP (astròcits) i Pax6.

4.5 Bancs de cèl·lules

EL banc espanyol deriva del Banc Europeu d'iPSC. El banc espanyol té diferents seus: CMRB, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Banco Andaluz de células madre, inbio-bank.

4.6 Ús d'iPSC

Problemes de bioseguretat.

S'estan utilitzant per assajos d'screening farmacològics.

També per teràpia reparadora.

5. Cèl·lules mare neurals

Hi ha cèl·lules proliferant al cervell. Es van descriure en rata als 70's. El 1979 es va descriure un grup de cèl·lules que proliferaven al bulb olfactori.

Hi ha 3 tipus de cèl·lules proliferant al SN:

- Cèl·lules de la zona subventricular
- Hipocamp
- Progenitor d'oligodendroglia que està per tot el sistema nerviós

Per aïllar-les, s'homogeneïtza un tros de teixit mecànicament i/o amb enzims. Es semblen 1 milió de cèl·lules en 10 mL en un T25. Es suplementa el cultiu amb FGF2 i EGF (10-20 ng/mL). Al cap de 2 dies, gran part del cultiu haurà mort. Com més violeta és el cultiu, més mort està. Al cap de 2 dies més, es neteja el cultiu per centrifugació i s'ali-quota. Després de 2 dies, s'obtenen unes neuroesferes visibles a ull nu: grups de cèl·lules en suspensió que mantenen la capacitat de proliferació. Cada setmana s'han de disgregar les neuroesferes de manera mecànica.

Per diferenciar-les, s'han de retirar els factors tròfics i es tracten les plaques amb un adherent. Es diferencien en neurones, progenitors de neuroglia i neuroglia. El percentatge de neurones obtingudes és del 15%. Amb aquest procediment s'obtenen neurones GABAèrgiques. Espuny et al, Neuron, 2009 va obtenir neurones glutamatèrgiques a partir d'iPSC.

La zona subventricular es troba al ventricle lateral. Si es fa un marcatge de cèl·lules proliferatives i es fa un tall sagital del cervell per revelar aquesta activitat es veu un corrent migratori rostral que va des de la zona subventricular al bulb olfactori. La rata renova la mucosa olfactiva cada 70 dies. Al microscopi electrònic es veuen cèl·lules ependimals (multiciliades), la cèl·lula B té 1 cili i la cèl·lula A i C. La discussió és quina d'elles és la cèl·lula mare. La solució era fer un anàlisi clonal. La cèl·lula mare era la B, C són cèl·lules transitòries i A són les neurones. El sistema depèn de BMP4, que fa que la cèl·lula mare proliferi, hi ha factors sangunis que també regulen la proliferació simètrica de SC. La cèl·lula ependimal genera noggin, que redirigeix la proliferació cap a un procés de diferenciació neural. Noggin és un inhibidor del receptor de BMP.

Als primats es va veure cèl·lules que proliferaven però que no feien neurogènesi. Després es va veure que aquesta proliferació eren progenitors d'oligodendroglia, necessaris per renovar la mielina.

II. TERÀPIA GÈNICA

Referències

- MITSUI, KAORU, TOKUZAWA, YOSHIMI, ITOH, HIROAKI, SEGAWA, KOHICHI, MURAKAMI, MIREI, TAKAHASHI, KAZUTOSHI, MARUYAMA, MASAYOSHI, MAEDA, MITSUYO, & YAMANAKA, SHINYA. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, **113**(5), 631–42.
- TAKAHASHI, KAZUTOSHI, & YAMANAKA, SHINYA. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, **126**(4), 663–676.
- TAKAHASHI, KAZUTOSHI, & YAMANAKA, SHINYA. 2016. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **17**(3), 183–93.
- TOKUZAWA, YOSHIMI, KAIHO, EIKO, MARUYAMA, MASAYOSHI, TAKAHASHI, KAZUTOSHI, MITSUI, KAORU, MAEDA, MITSUYO, NIWA, HITOSHI, & YAMANAKA, SHINYA. 2003. Fbx15 Is a Novel Target of Oct3 / 4 but Is Dispensable for Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Mouse Development. *Molecular and cellular biology*, **23**(8), 2699–2708.