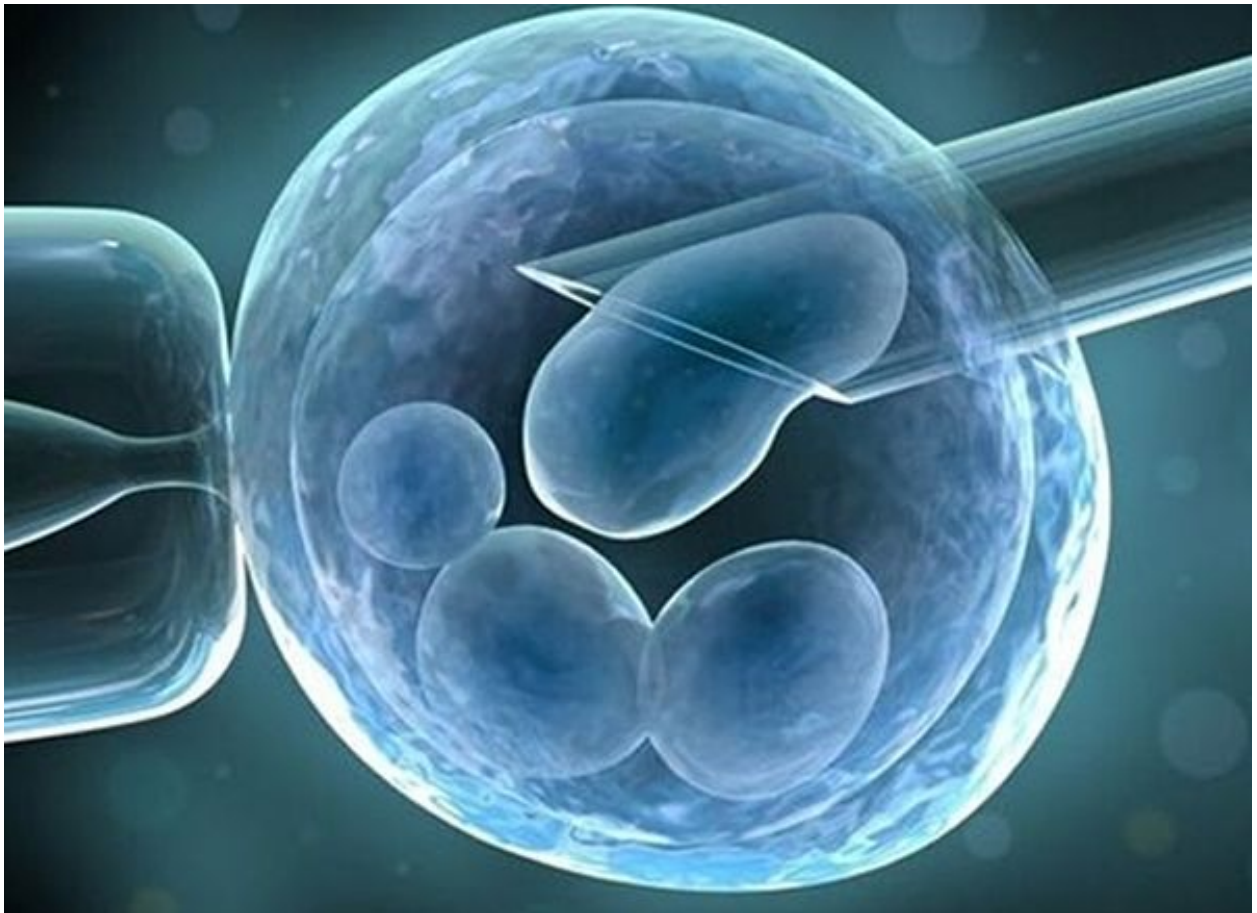

TERÀPIA CEL·LULAR I GÈNICA



CIÈNCIES BIOMÈDIQUES UB - PRIMAVERA 2017

ALBERT TORELLÓ PÉREZ

Índex

I	TERÀPIA CEL·LULAR	1
1	<i>Embrionic Stem Cells</i>	1
	<i>Stem Cells</i> — 1 • Blastocist pre-implantacional — 2 • Obtenció de cèl·lules mare embrionàries — 2 • Marcadors — 5	

II	TERÀPIA GÈNICA	10
-----------	-----------------------	-----------

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

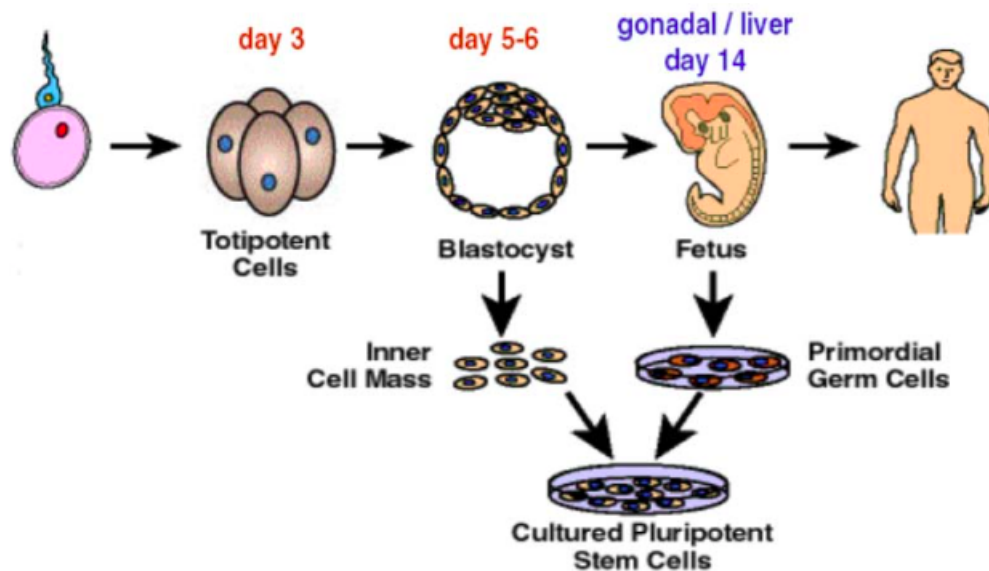


FIGURA 1: Procediment per l'aïllament d'ESC a partir de cèl·lules primordials de l'embrió

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.

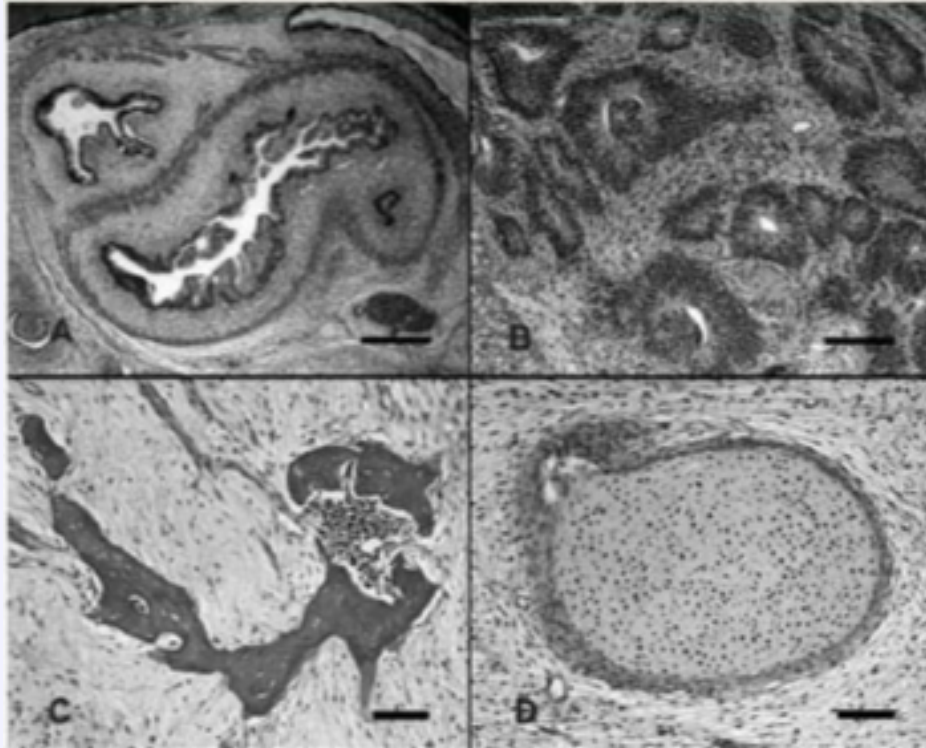


FIGURA 2: Teratomes originats a partir de la inoculació d'ESC derivades de blastocists en ratolins SCID immunodeprimits

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.

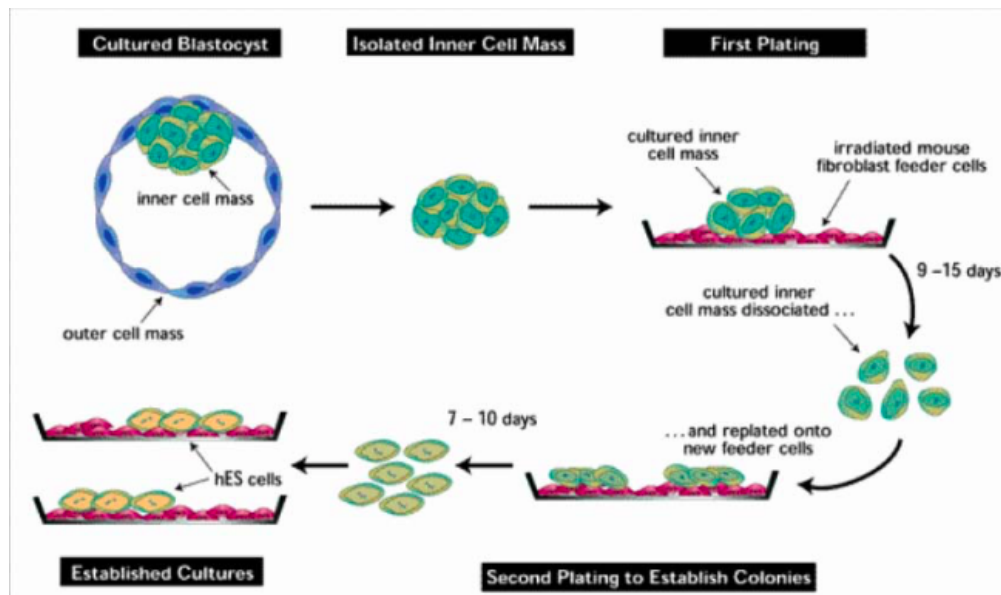


FIGURA 3: Derivació d'hESC

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.

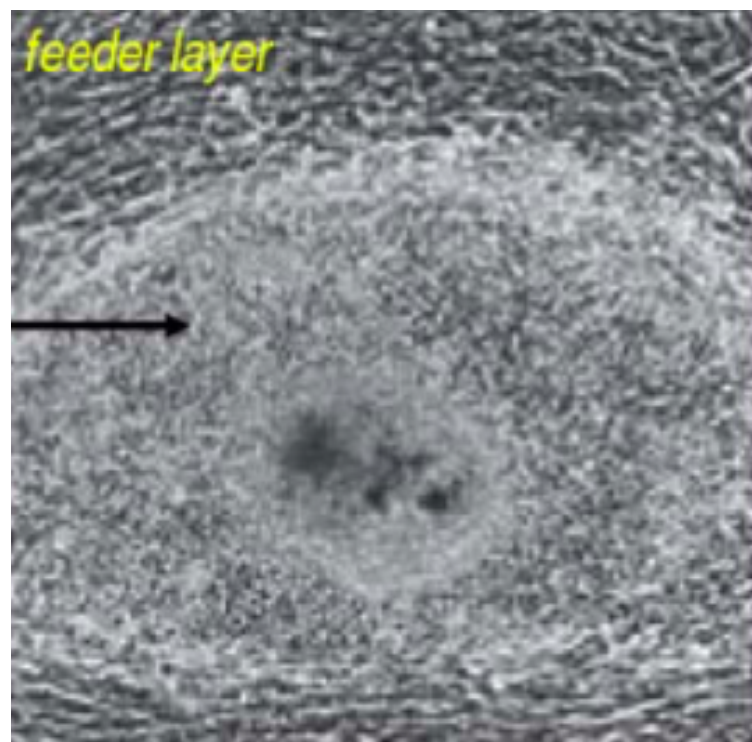


FIGURA 4: Cos embrioide amb el *core* hipòxic

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.

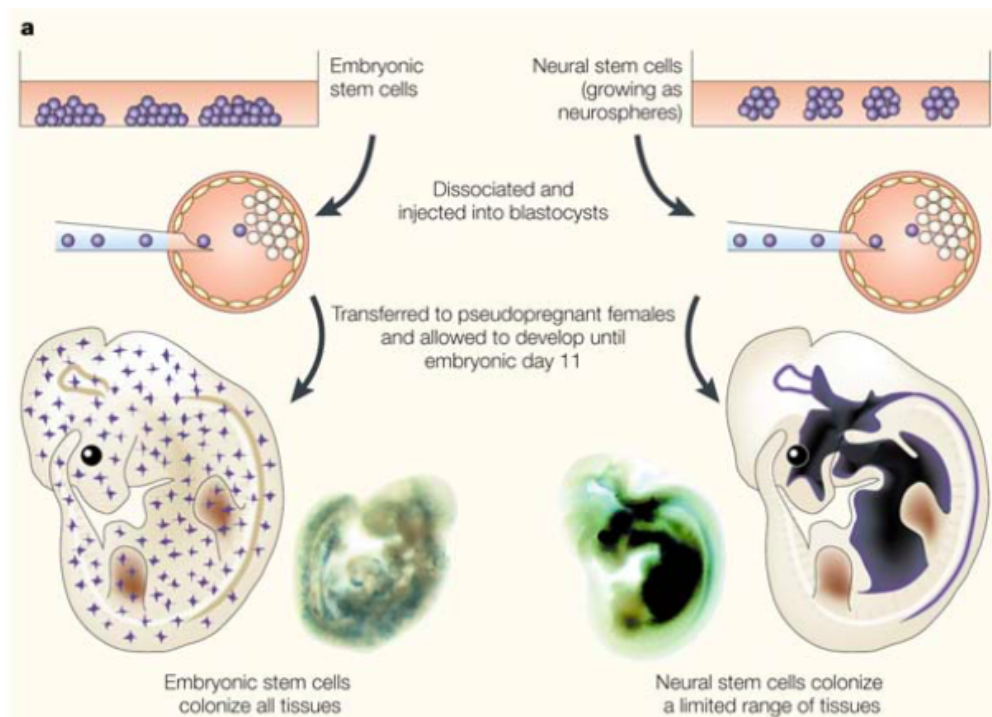


FIGURA 5: Procediment pels experiments quimera

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.

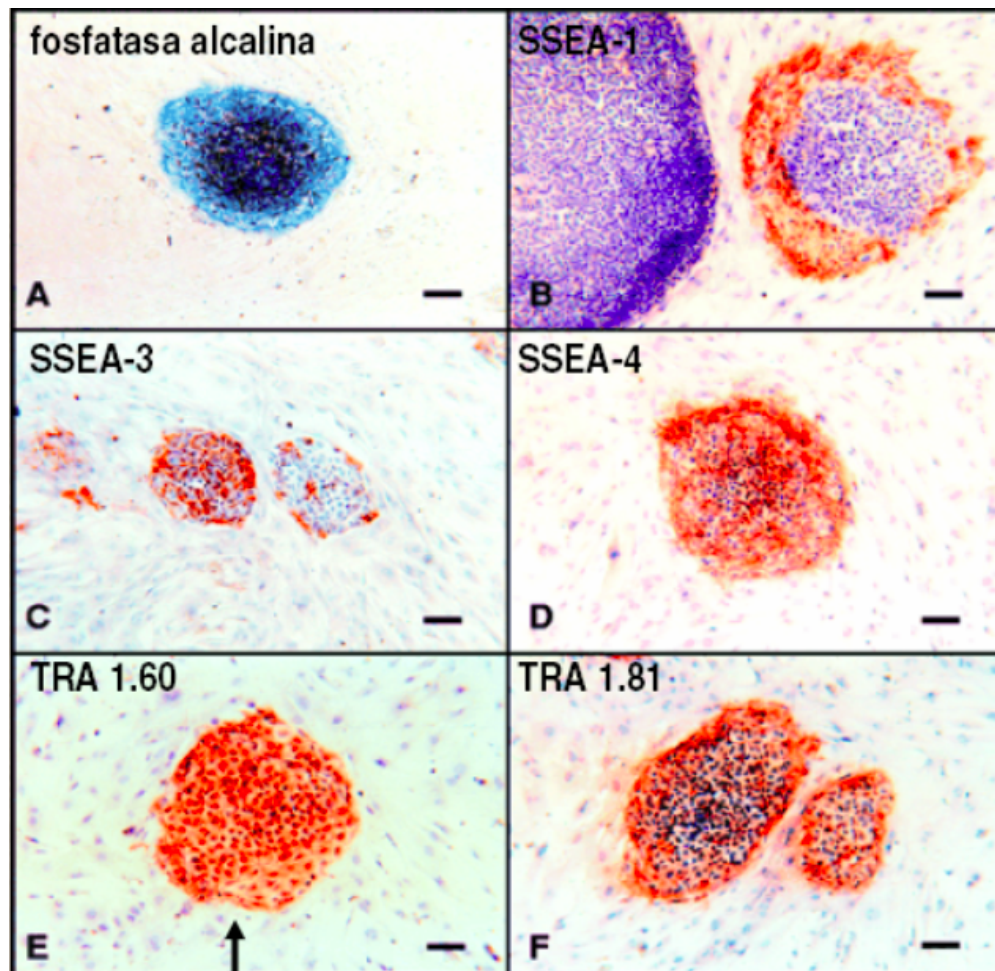


FIGURA 6: Immunohistoquímica de diferents marcadors d'ESC

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.

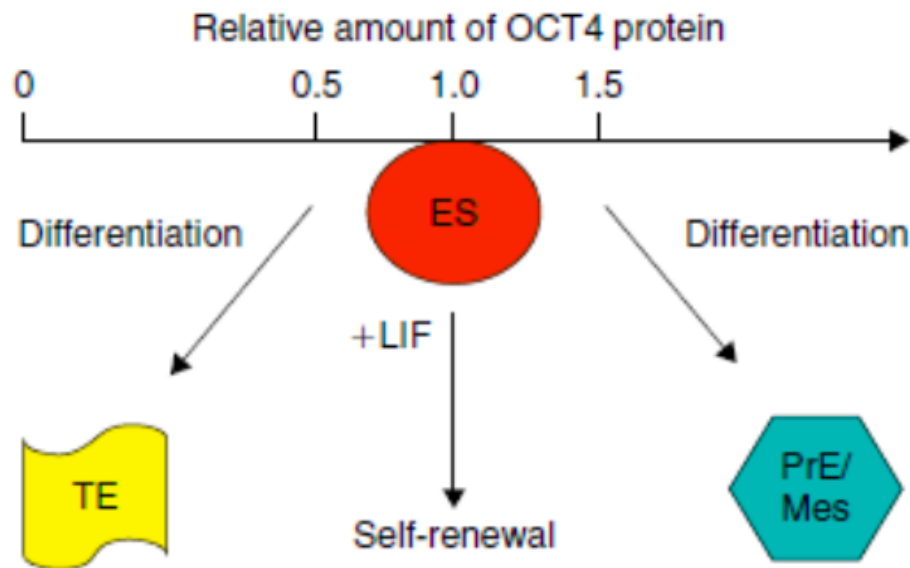


FIGURA 7: Model que il·lustra les conseqüències en la variació dels nivells d'Oct4

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.

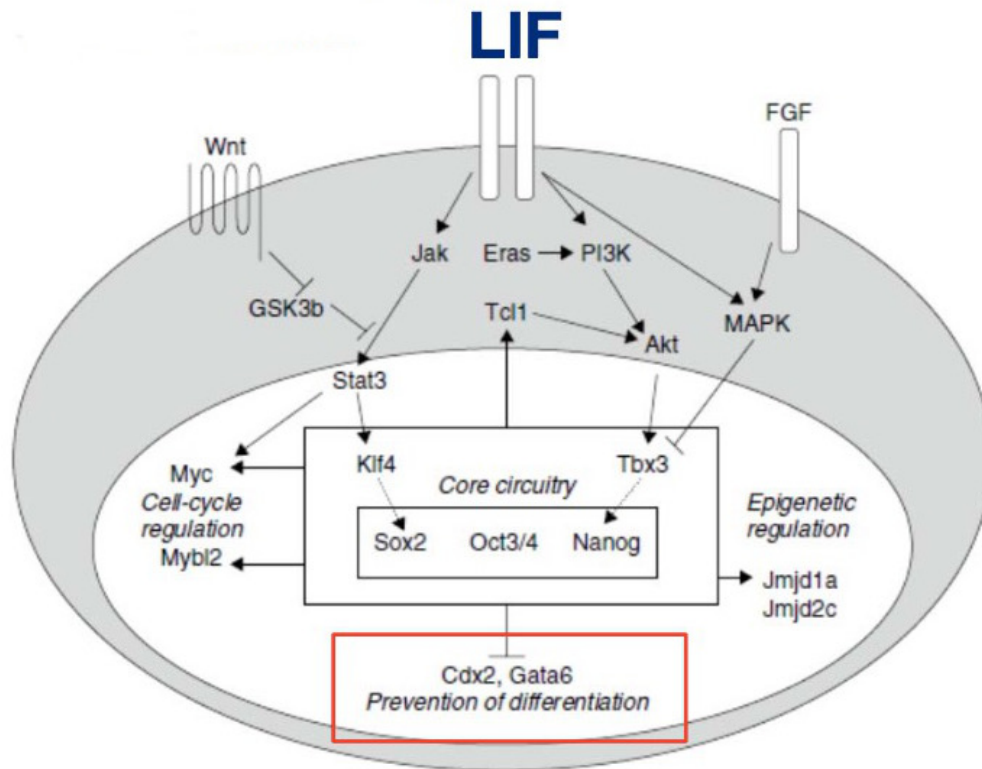


FIGURA 8: Mecanisme molecular per la retenció de l'auto-renovació de les ESC

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*.

II. TERÀPIA GÈNICA
