

Uso terapéutico de las células troncales embrionarias humanas

por **Bernat Soria**

*Conferencia pronunciada
el 5 de abril de 2005*

Forum Deusto

Uso terapéutico de las células troncales embrionarias humanas

Juan R. Tejedo, Karin Hmadcha, Bernat Soria*

Introducción

Las células troncales embrionarias (CTE) humanas representan las unidades naturales del desarrollo embrionario y la regeneración de tejidos. Las CTE humanas son obtenidas a partir de la masa interna del blastocisto mediante un procedimiento llamado derivación. En condiciones adecuadas de cultivo, las CTE humanas mantienen sus características de no-diferenciación y pluripotencialidad, constituyéndose en una fuente ilimitada de células potencialmente útiles en Medicina Regenerativa. Sin embargo, antes de plantear su utilización terapéutica, existen importantes problemas que se tienen que resolver. Por ejemplo, la comprensión de los procesos biológicos que rigen el estado de no-diferenciación, la posibilidad de cultivar las CTE humanas en sistemas libres de xenoproductos y al desarrollo de protocolos de diferenciación cada vez más eficientes hacia el tipo celular deseado. En este escrito revisaremos los distintos enfoques para resolver estos problemas.

Obtención de células troncales embrionarias

Las CTE humanas son obtenidas a partir de la masa celular interna (MCI) del blastocisto (Figura 1), al procedimiento de extracción se le

* Bernat Soria es Director del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), de Sevilla.

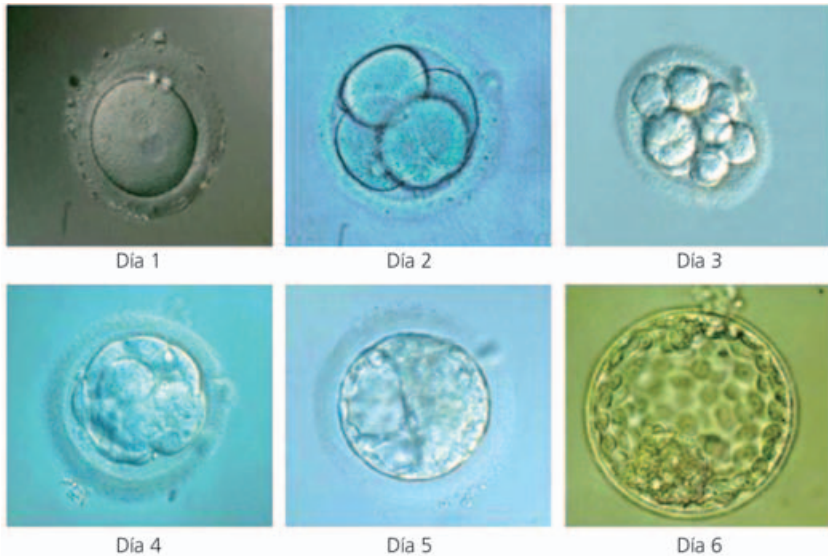


Figura 1

Formación de blastocisto humano. (Día 1) El óvulo fecundado. (Día 2) Estadio de 4 células. (Día 3) Mórula. (Día 4) Mórula compactada. (Día 5) Iniciación blastocele. (Día 6-7) Blastocisto. Cortesía de la Dra. Anna Veiga, Instituto Dexeus, Barcelona.

llama derivación, en general la derivación consiste en separar las células contenidas en la MCI utilizando métodos de inmuno-cirugía, micro-cirugía, cultivo de porciones de embriones y cultivo de embriones completos; finalmente el material derivado es colocado en sistemas de cultivos que permitan su crecimiento. Este método y sus variantes ha sido ampliamente descrito por Kim HS y colaboradores (Kim, Oh *et al.* 2005).

El método inmuno-quirúrgico (Figura 2) comprende la incubación con enzimas proteolíticas como la pronasa para disolver la zona pelucida, a continuación el blastocisto libre de zona pelucida es incubado con una solución de anticuerpo contra suero-total humano y complemento, durante la incubación se produce la ruptura del trofo-ectodermo, luego de lavar el exceso de anticuerpos, se recupera la MCI utilizando una pipeta que tiene un diámetro muy fino, las células recuperadas son posteriormente colocadas en una placa de cultivo que presenta una capa de células alimentadoras o «feeder layer», que por lo general son fibroblastos inactivados con mitomicina. Se monitoriza diariamente en primer lugar la fijación y posteriormente el desarrollo de

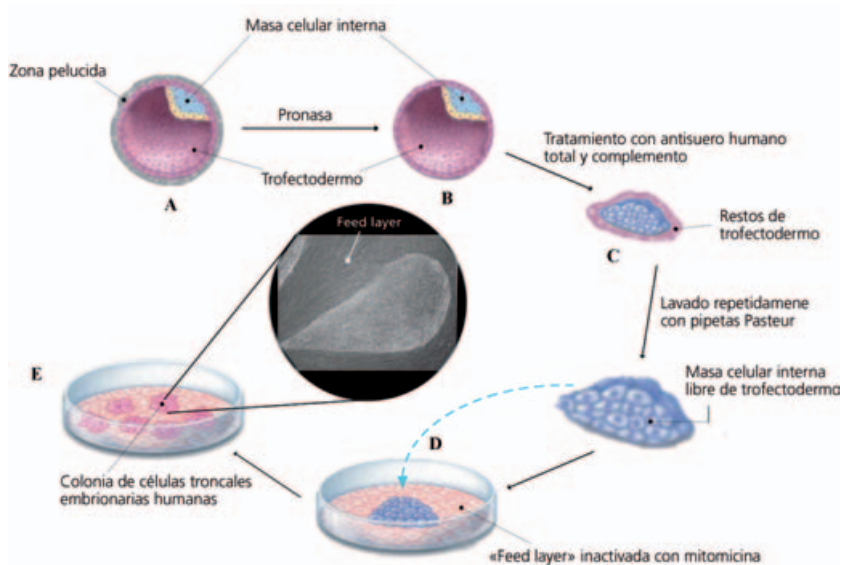


Figura 2

Derivación de líneas embrionarias humanas. Método inmuno-quirúrgico. (A) Blastocisto. (B) Blastocisto con la zona pelúcida disgregada con Pronasa. (C) Masa celular interna con restos de trofoectodermio después del tratamiento con anticuerpos anti suero total humano y complemento, el trofoectodermio roto es separado de la masa celular interna mediante repeticiones de pipeteo. (D) La masa celular interna que ha sido completamente separada del trofoectodermio es transferida a una placa de cultivo que contiene una capa de «feeder layer» inactivada con mitomicina. (E) Después de siete días, la masa celular interna ha formado una colonia, a la que finalmente se puede sub-cultivar.

la MCI, cuando se observa la formación de una colonia, es que se procede a realizar un pase y la posterior caracterización de la línea generada.

Para la caracterización del estado de no-diferenciación se estudian una serie de proteínas marcadoras, tales como Oct3/4, TRA 1-60, SSEA-4, Sox-2, NANOG, FOX D3, SSEA-3, TRA 1-81; la estabilidad genética es controlada mediante la determinación del cariotipo, la actividad de la telomerasa y la ausencia o presencia de mutaciones, y finalmente la capacidad pluripotente para generar distintos tejidos, se estudia tanto *in vitro* (marcadores, expresión génica) como *in vivo* (formación de teratomas en ratones inmunodeprimidos, SCID).

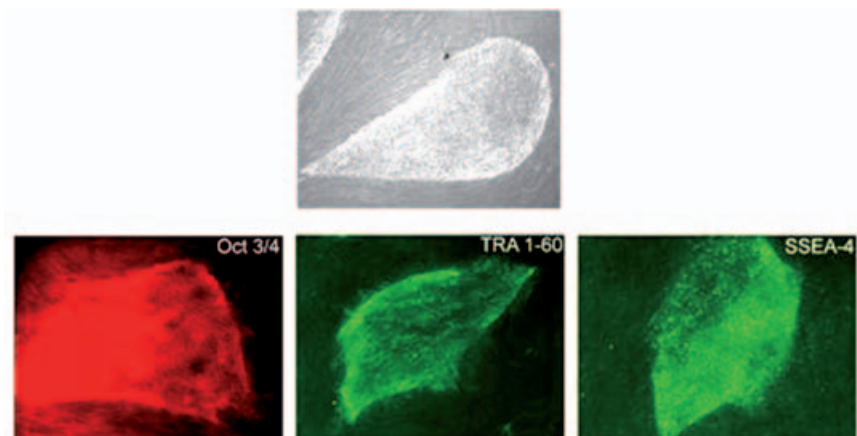


Figura 3

Caracterización de líneas de células troncales embrionarias de origen humanas. Las colonias de CTE humanas expresan diferentes marcadores propios de no-diferenciación. Estos marcadores pueden ser detectados mediante técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos. La figura muestra el marcaje con anti-Oct3/4 (rojo izquierda), anti-TRA 1-60 (verde centro) y anti-SSEA-4 (verde derecha)

Cultivos de CTE humanas

Las CTE humanas pueden ser cultivadas en condiciones de no-diferenciación sobre una monocapa de células alimentadoras, cuyo propósito es servir de sistema de fijación de las CTE humanas y liberar aquellos factores que impiden que las células se diferencien. Al principio se utilizaban cultivos primarios de fibroblastos fetales de ratón, en la actualidad la mayor parte de laboratorios utiliza fibroblastos de origen humano provenientes de prepucio con el fin de obtener cultivos de CTE humanas libre de productos xenogénicos. Muchos laboratorios han empezado a cultivar las CTE humanas sobre diversas matrices provenientes de preparados de proteínas de la matriz extracelular, sin embargo los resultados obtenidos aún no son satisfactorios y la matriz más utilizada, el Matrigel, es de origen animal. En el mismo sentido, la composición de los medios de cultivo ha evolucionando tratando de reemplazar el suero fetal bovino por el sustituto de suero, pero sigue teniendo origen animal.

Potencialidad de uso de las CTE humanas

El uso terapéutico de las CTE humanas es posible debido a su segunda propiedad, la pluripotencialidad, lo que permite a estas células en primer lugar formar los tres principales tejidos embrionarios, ectodermo, mesodermo y endodermo y a partir de allí teóricamente estas células pueden ser dirigidas a diferenciarse en los diferentes tipos de células adultas (Figura 4). La diferenciación se realiza mediante el cultivo de las células siguiendo protocolos de diferenciación específicos para cada tipo celular al que se quiere llegar.

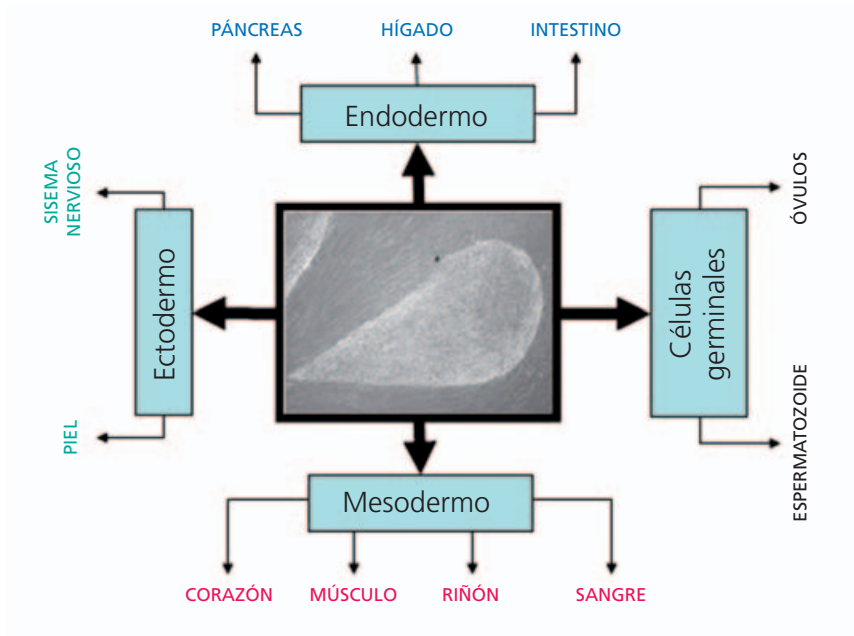


Figura 4

Pluripotencialidad de la CTE. Las CTE pueden diferenciarse a los tres tipos principales de tejidos embrionarios y hacia la formación de células germinales. El endodermo posteriormente podrá ser diferenciado a células de los tejidos pancreáticos y células de los tejidos hepáticos. El mesodermo podrá ser diferenciado hacia cardiomiocitos, músculo esquelético, músculo liso, células de la sangre, tejido conectivo, etc. El ectodermo podrá ser diferenciado hacia neuronas, células gliales, células epiteliales de la piel, etc. Y las células germinales podrán ser diferenciadas a óvulo y espermatozoide.

Ejemplos de terapia celular

Una de las cuestiones críticas concernientes al potencial terapéutico de las células diferenciadas a partir CTE, es saber si estas células pueden integrarse dentro de un tejido receptor y cumplir la función específica que se ha perdido. Para las células embrionarias de origen murino se pueden utilizar modelos de enfermedad en el ratón, sin embargo para las células embrionarias humanas no se dispone de buenos modelos animales. Se puede utilizar el embrión de pollo y el feto de ratón (permite ver las primeras etapas de diferenciación) y los ratones inmunodeprimidos (SCID, que no rechazan las células de otras especies). La tabla I muestra algunos

Tabla I

Transplantes de CTE de ratón y humanas en modelos animales.
(Datos tomados de Wobus and Boheler 2005).

Tipo celular	Modelo de transplante
Cardiomiocitos	Ratón con distrofia de miocardio
Neuronas GABAérgicas inducidas con ácido retinoico	Ventrículos embrionarios de rata Integración en «striatum» de rata Integración en cerebro de ratón
Neuronas post-mitóticas separadas por «cell-sorting»	Integración en la vesícula telencefálica de embriones de rata
Precusores gliales	Ratas deficientes en mielina
Neuronas inducidas por ácido retinoico	Médula espinal lesionada de rata
Neuronas motoras	Integración e inervación muscular en médula espinal de pollo
Neuronas dopaminérgicas del cerebro medio	Modelos de Parkinson en ratas
Progenitores neurales	Ventrículos cerebrales de ratón
Células productoras de insulina	Ratones diabéticos tratados con estreptozocina
Hepatocitos	Ratones con hígado dañado por CCl ₄
Precusores hematopoyéticos	Ratones irradiados
CTE de ratón indiferenciadas	Bazo de ratones inmuno-deprimidos (SCID) Ratas con miocardio infartadas
CTE humanas indiferenciadas	Ratones inmuno-deprimidos (SCID) Somitas de embriones de pollo

ejemplos de posibilidades terapéuticas de las CTE en modelos animales. El potencial de integración dentro de un cerebro en desarrollo se puede estudiar implantando progenitores neuronales derivados de CTE humanas en el sistema nervioso en desarrollo del ratón. De igual manera, colonias que han sido derivadas a partir de CTE humanas se han injertado en un área adyacente al tubo neural de embriones de pollo; estas células posteriormente se diferencian en estructuras primarias con características morfológicas y moleculares típicas de las rosetas neurales y neuronas diferenciadas. Sin embargo, es aún muy prematuro decir que a partir de estos resultados pilotos la terapia con CTE humanas pueda tener éxito, pero estos resultados son alentadores, y es necesaria una investigación extensiva utilizando modelos animales grandes antes de su aplicación en humanos.

Diferenciación hacia endodermo

El páncreas y el hígado son derivados del endodermo definitivo. A partir de CTE de ratón se han descrito diversas estrategias para diferenciarlas hacia células similares a células beta pancreáticas o células productoras de insulina. Nuestro grupo, utilizando una estrategia llamada del «cell trapping», ha logrado desarrollar diversos protocolos para la obtención de células productoras de insulina que pueden controlar la glicemia cuando son transplantadas en animales diabéticos (Soria, Roche *et al.* 2000; Leon-Quinto, Jones *et al.* 2004). El protocolo consiste en transfectar las células con un gen quimérico formado por la fusión funcional del promotor de la insulina acoplado a un gen de resistencia a la neomicina (Figura 5). Así, aquellas células que contengan el complejo de transcripción que activa la expresión de dicho gen tendrán también activada la expresión del gen de resistencia a la neomicina. La estrategia utilizada se puede descomponer en varios pasos:

- 1) Transfección mediante electroporación de CTE de ratón con una construcción plasmídica que permitirá la selección de células en las que se active el gen de la insulina.
- 2) Selección mediante higromicina de las células transfectadas.
- 3) Diferenciación *in vitro*: formación de cuerpos embrionarios, cultivo en monocapa, adición de factores de crecimiento, etc.
- 4) Selección de clones resistentes a neomicina (y que, por tanto, están expresando insulina).

5) Maduración de clones que expresan insulina (2 semanas en 10 mM nicotinamida y alta glucosa 25 mM + 5 días en 10 mM nicotinamida y glucosa 5 mM) (Figura. 5).

6) Caracterización del clon en términos de contenido de insulina, secreción y liberación de la misma en respuesta a distintos secretagogos.

7) Trasplante a animales diabéticos.

Recientemente hemos publicado un protocolo en la revista *Stem Cell* que tiene por novedad que las CTE de ratón transfectadas con la construcción plasmídica son dirigidas a diferenciarse hacia células productoras de insulina por factores producidos por las yemas pancreáticas de 16.5 días de desarrollo (Vaca, Martin *et al.* 2006).

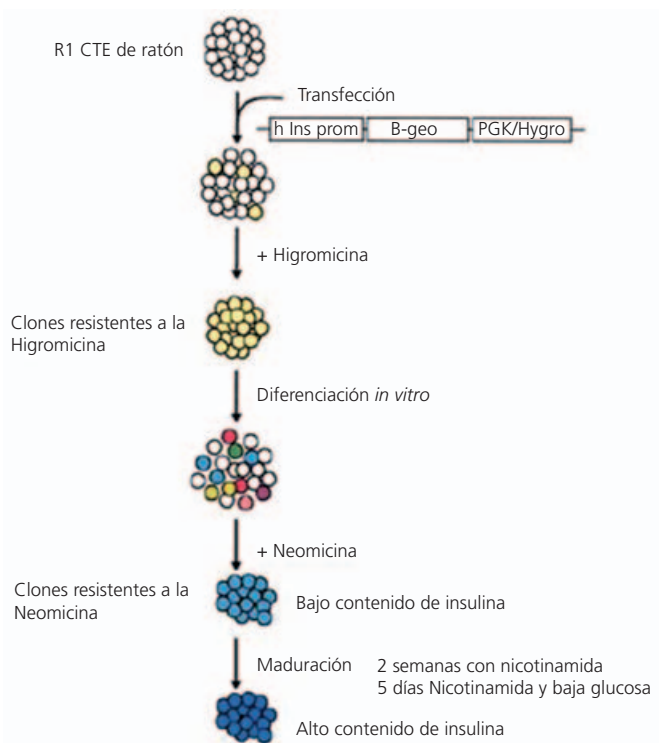


Figura 5

Diagrama en flujo de la selección de células productoras de insulina a partir de células troncales embrionarias de ratón indiferenciadas. (Adaptado de Soria B., A. Skoudy, Martin F, 2001).

Los ensayos con CTE humanas indican que después de realizar diversos protocolos de diferenciación *in vitro* se generan alrededor del 1% de células productoras de insulina. Todos estos protocolos utilizados son aún insuficientes por lo que es necesario seguir estudiando a fin de generar células productoras de insulina funcionales.

Asimismo se ha podido mostrar que las CTE de ratón pueden ser diferenciadas hacia células hepáticas, estas células se integran y funcionan satisfactoriamente en el hígado del huésped cuando son transplantadas, indicando que pueden dar origen a los tres linajes hepáticos, hepatocitos, células epiteliales del conducto biliar y células ovales.

A partir de CTE humanas se han derivado células en las que se detectan marcadores de endodermo similar a los que presentan los hepatocitos, adicionalmente a partir de CTE humanas transfectadas establemente con una construcción que presenta el promotor de la albúmina unida a la proteína verde fluorescente (eGFP) se ha logrado diferenciar y aislar células similares a los hepatocitos

Diferenciación hacia mesodermo

El mesodermo es la capa embrionaria que desarrolla hacia músculo, hueso, cartílago, sangre y tejido conectivo. Muchos autores han descrito la diferenciación de CTE hacia mesodermo *in vitro*, la diferenciación a través de la formación de cuerpos embrionarios permite la formación de islotes sanguíneos conteniendo eritrocitos y macrófagos, mientras que la diferenciación en medios semisólidos es eficiente para la formación de neutrófilos, células cebadas, macrófagos y linajes de células eritrocitarias. La aplicación de Factores Estimulantes de Colonias, citoquinas como la IL-3, IL-1 y el factor estimulante de colonias de granulocito-macrófagos (GM-CSF) generan precursores hematopoyéticos tempranos.

Los cardiomiocitos generados a partir de las CTE humanas muestran actividad contráctil espontánea. Estudios moleculares, electrofisiológicos y fenotípicos muestran que estas células son auténticos cardiomiocitos (Wei, Juhasz *et al.* 2005).

Diferenciación hacia ectodermo

La capa embrionaria del ectodermo da origen a los distintos tipos celulares (neuroectodérmicos) del sistema nervioso central y periférico,

y células del tejido epidérmico. Entre los tipos celulares derivados del ectodermo destacan las neuronas (dopaminérgicas, GABAérgicas, etc.), células gliales (astrocitos, oligodendrocitos, etc.) y células epiteliales. La diferenciación celular hacia piel puede ser evidenciada por la presencia de citokeratina y otras proteínas específicas de keratinocitos.

De mayor importancia con respecto a las terapias celulares de desórdenes neurodegenerativos son las células neuronales y gliales. La diferenciación de las CTE de ratón hacia células neuronales fue publicado independientemente por tres grupos (Wobus and Boheler 2005). La diferenciación espontánea de las CTE hacia células neuronales ha sido abordada desde varias perspectivas experimentales mediante el uso de Ácido Retinoico (RA), selección de líneas, etc. Aunque altas concentraciones de RA promueven una diferenciación eficiente hacia neuronas, la supervivencia y el desarrollo de neuronas derivadas en respuesta a RA es limitada. Además, la teratogenicidad del RA hace imposible la aplicación terapéutica. Por eso, se utilizan otros protocolos alternativos para la obtención de progenitores neuronales de aplicación terapéutica. Después de la formación de los cuerpos embrionarios el suero es eliminado del medio para evitar la diferenciación mesodérmica. La proliferación de progenitores neuronales es inducida por la adición de bFGF y EGF. Posteriormente, la diferenciación neuronal es dirigida mediante la adición de factores neurotróficos (GDNF, NT, TGF β 3, IL β 3) y cultivo en medios específicos para diferenciación neuronal. Estudios de expresión génica y de electrofisiología demuestran una correcta diferenciación hacia los diferentes tipos neuronales: dopaminérgicas, GABAérgicas, serotoninérgicas, glutamatérgicas y colinérgicas; precursores gliales como astrocitos y oligodendrocitos. La diferenciación hacia ectodermo tiene importantes aplicaciones terapéuticas a enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, lesiones de la médula espinal, enfermedades desmielinizantes, etc.

Agradecimientos

Realizado en parte gracias a Ayudas de la Fundación Progreso y Salud (Junta de Andalucía) y el Instituto Carlos III del Ministerio de Sanidad. Los autores agradecen la ayuda técnica de Nuria Mellado-Damas y Yolanda Guilera en el cultivo de Células Troncales Embrionarias Humanas y de Sergio Mora por su apoyo en el diseño de figuras.

Referencias

- Kim, H. S., S. K. Oh, et al. (2005) «Methods for derivation of human embryonic stem cells». *Stem Cells* **23**(9): 1228-33.
- Leon-Quinto, T., J. Jones, et al. (2004) «In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells». *Diabetologia* **47**(8): 1442-51.
- Soria, B., E. Roche, et al. (2000). «Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice». *Diabetes* **49**(2): 157-62.
- Soria B, Skoudy A, Martin F (2001) «From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy in diabetes mellitus». *Diabetologia* **44**: 407-415).
- Vaca, P., F. Martin, et al. (2006) «Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors». *Stem Cells* **24**(2): 258-65.
- Wei, H., O. Juhasz, et al. (2005). «Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation: phenotypic and molecular analyses». *J Cell Mol Med* **9**(4): 804-17.
- Wobus, A. M. and K. R. Boheler (2005). «Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy». *Physiol Rev* **85**(2): 635-78.

