

## **Simposio Horizontes Futuros en los Tratamientos de Células Madres**

### **PRESENTE Y FUTURO DE LAS INVESTIGACIONES CON STEM-CELLS EMBRIONARIAS**

RA. STELLA DECOURT

Una célula madre es una célula que puede autorrenovarse indefinidamente al mismo tiempo que produce una progenie que puede madurar a células más especializadas, específicas de órganos y/o tejidos. Mediante divisiones asimétricas da origen a una célula que conserva las características de “célula madre” (autorrenovación y pluripotencia) y a una célula diferenciada, que sigue dividiéndose simétricamente.

Las células madre embrionarias son células derivadas del macizo celular interno (MCI) del embrión en estadio de blastocisto y que pueden ser crecidas indefinidamente en su estado indiferenciado, siendo aún capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular del organismo adulto.

Las células madre embrionarias (CME) presentan tres características principales: su ORIGEN, ya que son derivadas de embriones de pre-implantación; su AUTORRENOVACIÓN, pueden dividirse durante largos periodos de tiempo para hacer copias de ellas mismas sin diferenciarse, y su PLURIPOTENCIA, la capacidad de dar origen a células derivadas de las 3 capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo).

Entre otras características podemos mencionar que expresan genes y productos génicos asociados a la autorrenovación y pluripotencia (como ser Oct-4, Nanog, Sox2) además de marcadores de superficie celular característicos (SSEA -3, SSEA -4, TRA-1-60, TRA-1-81); presentan una actividad telomerasa elevada; expresan la enzima fosfatasa alcalina; exhiben un ciclo celular atípico (con una fase G1 de corta duración); presentan una morfología celular y de colonia única, creciendo como una colonia plana de una sola capa de espesor; las células muestran una alta relación núcleo:citoplasma y, finalmente, son capaces de mantener un cariotipo estable durante el cultivo a largo plazo.

Existen dos formas principales de corroborar la pluripotencia de las CME: *in vitro*, mediante la formación de agregados tridimensionales llamados CUERPOS EMBRIOIDES, que recapitulan la organogénesis del desarrollo embrionario temprano; e *in vivo*, mediante la inducción de la formación de TERATOMAS en ratones inmunosuprimidos.

Para la obtención de las colonias de CME, generalmente se procede a la extracción del MCI de los blastocistos y a su cultivo sobre una capa de células alimentadoras (*feeder layer*) inactivadas mitóticamente, que liberan factores de crecimiento y otras sustancias que ayudan a la adhesión de los embriones. Una vez obtenidos los primeros esbozos de las colonias de células madre, éstos son repicados mediante métodos mecánicos o enzimáticos y sembrados sobre nuevas *feeder layers*.

Existen 3 factores de transcripción que son clave para la pluripotencia de las células madre embrionarias, Oct-4, Nanog y Sox2. Oct-4 es exclusivo de células pluripotentes y una disminución en su expresión dirige la diferenciación a trofoblasto, mientras que un aumento provoca diferenciación a endodermo extraembrionario y mesodermo, por lo que se requieren niveles exactos de este factor, ya que cualquier variación provoca la pérdida del estado indiferenciado. Nanog, al igual que Oct-4, se expresa únicamente en linajes pluripotentes, una disminución en su expresión provoca la diferenciación a linajes extraembrionarios, pero a diferencia de Oct-4, al aumentar sus niveles, el mantenimiento del estado indiferenciado se ve favorecido. Sox2 es un factor que se detecta en los linajes pluripotentes del embrión temprano de ratón pero también en células multipotentes del ectodermo extraembrionario; es un regulador transcripcional de Oct-4 y Nanog.

Existen además, ciertos factores exógenos, que agregados al medio de cultivo, permiten la autorrenovación de las CME. Uno de los principales es el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) que colabora en el mantenimiento de la indiferenciación a largo plazo.

Son varias las fuentes a partir de las cuales pueden obtenerse las CME, por ejemplo, embriones excedentes de los procedimientos de FIV, de buena calidad pero que ya no se mantendrán congelados; embriones de mala calidad (detenidos o de desarrollo tardío) descartados durante los procesos de FIV; embriones diagnosticados como anormales mediante PGD (*Preimplantacional Genetic Diagnosis*, diagnóstico genético preimplantacional), ya que pueden revertir a un cariotipo normal luego de cultivos prolongados; cultivo de blastómeras provenientes de embriones sometidos a PGD; embriones destinados a su destrucción luego de selección sexual; embriones creados específicamente para la investigación en CMEh; embriones abortados; transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, *Somatic Cell Nuclear Transfer*); partenogénesis.

Durante los inicios de la derivación de las CMEh, se utilizaban *feeder layers* y medios de cultivo suplementados con sueros de origen animal; debido a que esto podría dar origen a una contaminación xenogénica de las CME obtenidas, en la actualidad se busca utilizar sueros que no sean derivados de animales y se intenta hacer crecer a las CME en *feeder layer* de proveniencia humana, o directamente, en placas libre de ellas.

Entre las potenciales aplicaciones de las CME humanas figuran: la Investigación básica: elucidación de eventos complejos que ocurren durante el desarrollo humano, mecanismos moleculares que regulan la expresión génica, rol de señales en la expresión génica y diferenciación de las células madre, comparación del desarrollo humano temprano normal y anormal; la Biotecnología: las células madre pueden proveer tipos celulares específicos para la prueba de nuevas drogas, evaluaciones seguras de nuevas drogas en líneas celulares di-

ferenciadas, evaluaciones toxicológicas; experimentos genómicos y proteómicos; estudio de perfiles genéticos y epigenéticos de embriones y CME humanas; Terapias celulares: Terapia regenerativa: para el tratamiento del Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, diabetes mellitus, daños en la médula espinal, quemaduras, enfermedades del corazón, Terapia génica: células madre genéticamente modificadas, Clonación terapéutica.

---

## STEM CELLS MESENQUIMALES ADULTAS Y SU DIFERENCIACION

DRA. JOHANA CARDOZO

Las stem cells adultas (SCAs) son células no diferenciadas encontradas en un tejido especializado. Exhiben al menos dos características: pueden hacer copias de si mismas por largos períodos de tiempo (auto-renovación) y pueden dar origen a tipos celulares maduros que tienen morfologías características y funciones especializadas.

Las SCAs tienen como función primaria el mantenimiento del funcionamiento de una célula en un estado constante (homeostasis) y el reemplazo de células que mueren debido a daño o enfermedad. Se encuentran dispersas a lo largo de los tejidos del organismo adulto y se comportan de diferentes maneras dependiendo del ambiente local.

Además, otra característica de estas células es que pueden generar tipos celulares especializados de otro tejido del cual ellas son originarias, que puede ser un tejido derivado de la misma o de una capa germinativa diferente, es decir que tienen plasticidad. Cuando las SCs derivadas de un tejido adulto cambian hacia fenotipos celulares que no son encontrados normalmente en dicho tejido, el fenómeno es conocido como “transdiferenciación”.

Un tipo de SCAs son las Stem Cells Mesenquimales (MSCs), las cuales han sido localizadas en médula ósea, tejido adiposo, sangre, córnea, retina, cerebro, músculos esqueléticos, pulpa dental, hígado y piel. Éstas se definen por una combinación de propiedades físicas, morfológicas, fenotípicas y funcionales. La mayoría de esta población ha sido aislada utilizando la propiedad física de adherencia al plástico. Otra característica es que tienen la capacidad de formar colonias tipo fibroblásticas in vitro, llamadas unidades formadoras de colonias fibroblastoides (CFU-F).

Fenotípicamente, las MSCs expresan un número de marcadores no específicos; son negativas para marcadores hematopoyéticos y endoteliales, como lo son CD11b, CD31, CD34 y CD45; pero expresan numerosas moléculas de adhesión de superficie, incluyendo CD44, CD49d y CD62 y son positivas para MHC I y Sca-1. Debido a que las poblaciones de MSCs son heterogéneas de acuerdo al método de aislamiento, del tejido, de la especie de origen y a las condiciones de cultivo, se observa una expresión variable de CD90 (Thy 1), CD117 (c-kit), CD105 (Sh2 o endoglin), CD73 (SH3 o SH4) y Stro-1.

Las MSCs tienen la capacidad de diferenciarse in vitro, cuando son tratadas con factores específicos, hacia varios linajes mesodérmicos, como lo son el osteogénico, adipogénico, miogénico y condrogénico. Además, diversos informes recientes demuestran que, bajo condiciones experimentales específicas, las MSCs pueden también diferenciarse en células que no son parte de su repertorio normal como lo son el músculo esquelético y cardíaco, los hepatocitos, la glía y las neuronas.