

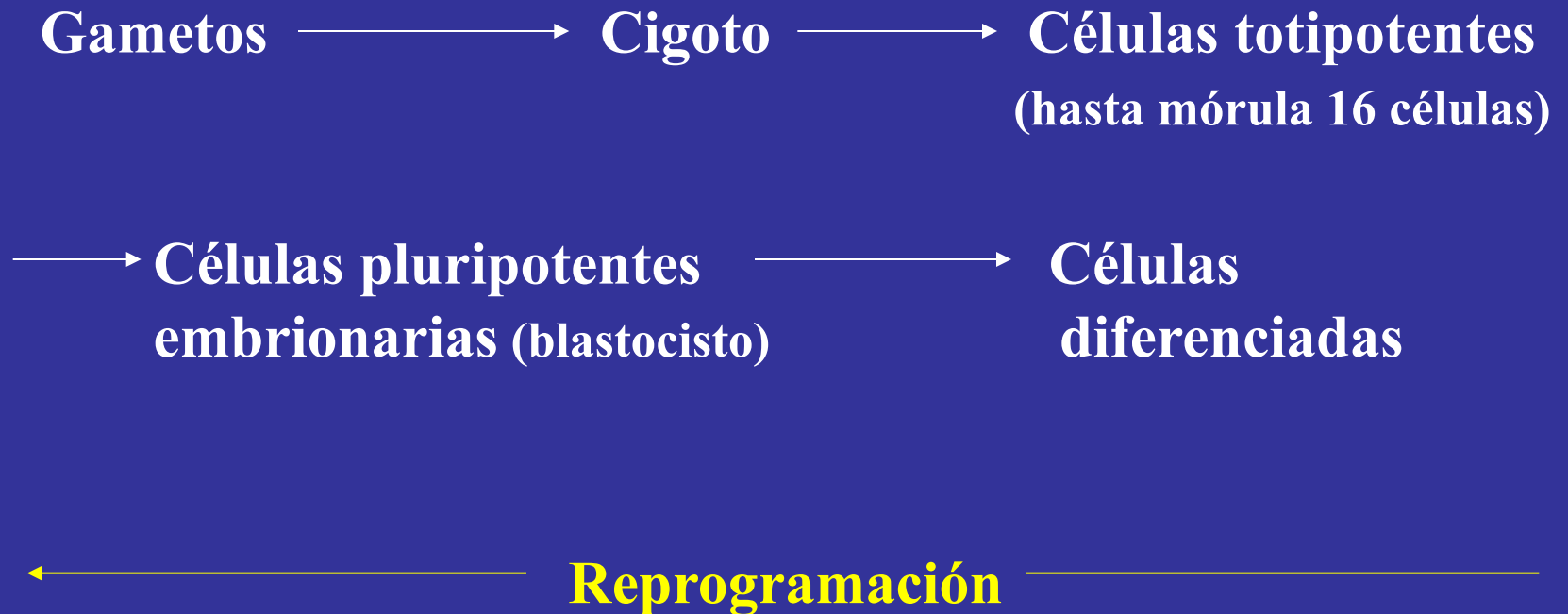
CÉLULAS TRONCALES Y TERAPIA CELULAR

Juan-Ramón Lacadena

COLEGIO LIBRE DE EMÉRITOS

Madrid, 13 marzo 2012

REPROGRAMACIÓN NUCLEAR



REPROGRAMACIÓN NUCLEAR

CRONOLOGÍA DE LA REPROGRAMACIÓN NUCLEAR

- Clonación en anfibios por transferencia de núcleos (1950 - 1965)
- Transferencia nuclear de células somáticas en mamíferos (SCNT, *somatic cell nuclear transfer*) (1997)
- Células troncales embrionarias (ES, *embryo stem*) en mamíferos (ratón, 1981; humano, 1998)
- Células troncales adultas (AS, *adult stem*) (1999, 2000, 2001, 2002)
- Células troncales pluripotentes inducidas (iPS, *induced pluripotent stem*) (2007, 2008, 2009)
- Reprogramación directa (2008, 2010): alquimia celular

CÉLULAS TRONCALES Y MEDICINA REGENERATIVA

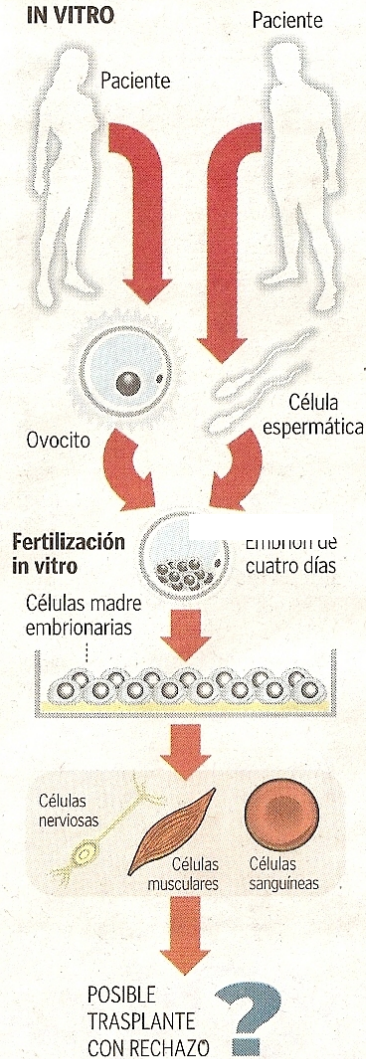
FINES Y MEDIOS

Terapia celular y Medicina regenerativa

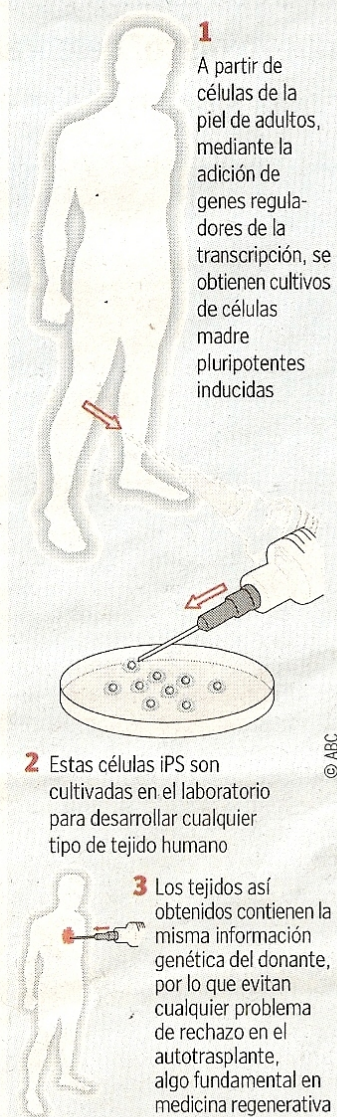
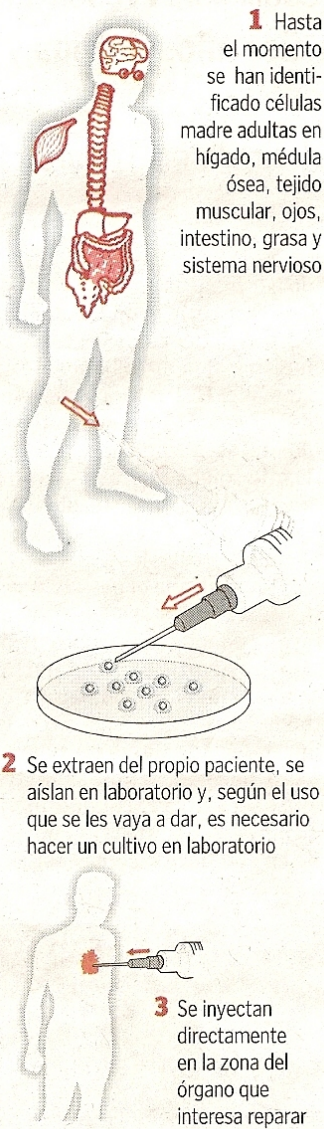
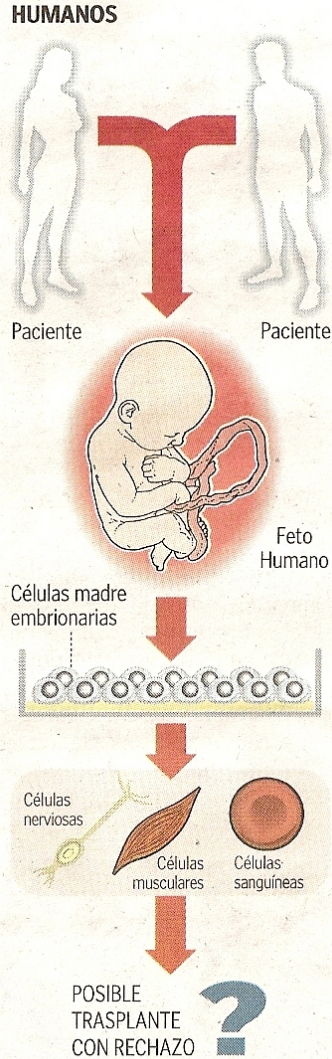
CONCEPTOS

- Células troncales
 - Terminología (*stammzellen, stem cells, células madre*)
 - Definición
- Totipotencia, pluripotencia, multipotencia
- Tipos: células troncales embrionarias (ES y ES-SCNT), células troncales adultas (AS), células troncales pluripotentes inducidas (iPS)
- Reprogramación directa

EMBRIONES OBTENIDOS POR FERTILIZACIÓN IN VITRO



TEJIDOS FETALES HUMANOS



CÉLULAS TRONCALES Y MEDICINA REGENERATIVA: APLICACIÓN CLÍNICA DE LA TERAPIA CELULAR

Transferencia celular heteróloga

- Células ES de embriones obtenidos por FIV (sobrantes de técnicas de reproducción asistida o producidos ex profeso)
- Células AS de donante (trasplante, DGP: selección de embriones con fines terapéuticos)

Transferencia celular autóloga

- Clonación terapéutica (embrión somático)
- Células AS del paciente
- Células iPS del paciente
- Reprogramación directa (alquimia celular)

CÉLULAS TRONCALES Y MEDICINA REGENERATIVA

**LA DÉCADA PRODIGIOSA DE
LAS CÉLULAS TRONCALES
(1998-2008 ss)**

CÉLULAS TRONCALES

CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS (ES)

- **Células troncales embrionarias pluripotentes:** ratón (Evans, 1981), humano (Thomson, 1998)
- **Células troncales embrionarias pluripotentes a partir de un solo blastómero, sin destrucción del embrión:** ratón (Lanza, 2006), humano (Lanza, 2006)

CÉLULAS TRONCALES

CÉLULAS TRONCALES ADULTAS (AS)

Primeros datos experimentales en ratón:

Vecovi (1999): Células troncales del tejido nervioso inyectadas en la médula ósea se transforman en células sanguíneas.

Mezey (2000): Células troncales hematopoyéticas pueden generar neuronas

Anversa (2001): Regeneración de tejido cardiaco infartado a partir de células troncales hematopoyéticas

Verfaillie (2002): Células MAP (*mesenchymal adult pluripotent cell*) tienen muchas de las características pluripotenciales de las células troncales embrionaria

CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS

Células troncales pluripotentes inducidas (células iPS, *induced pluripotent stem*) en ratón:

Yamanaka

2006: Retrovirus, Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc

2008: Transfección repetida con dos plásmidos (Oct3/4, Sox-2, Klf4) y c-Myc

Jaenisch

2007: Ratifica trabajo de Yamanaka (2006)

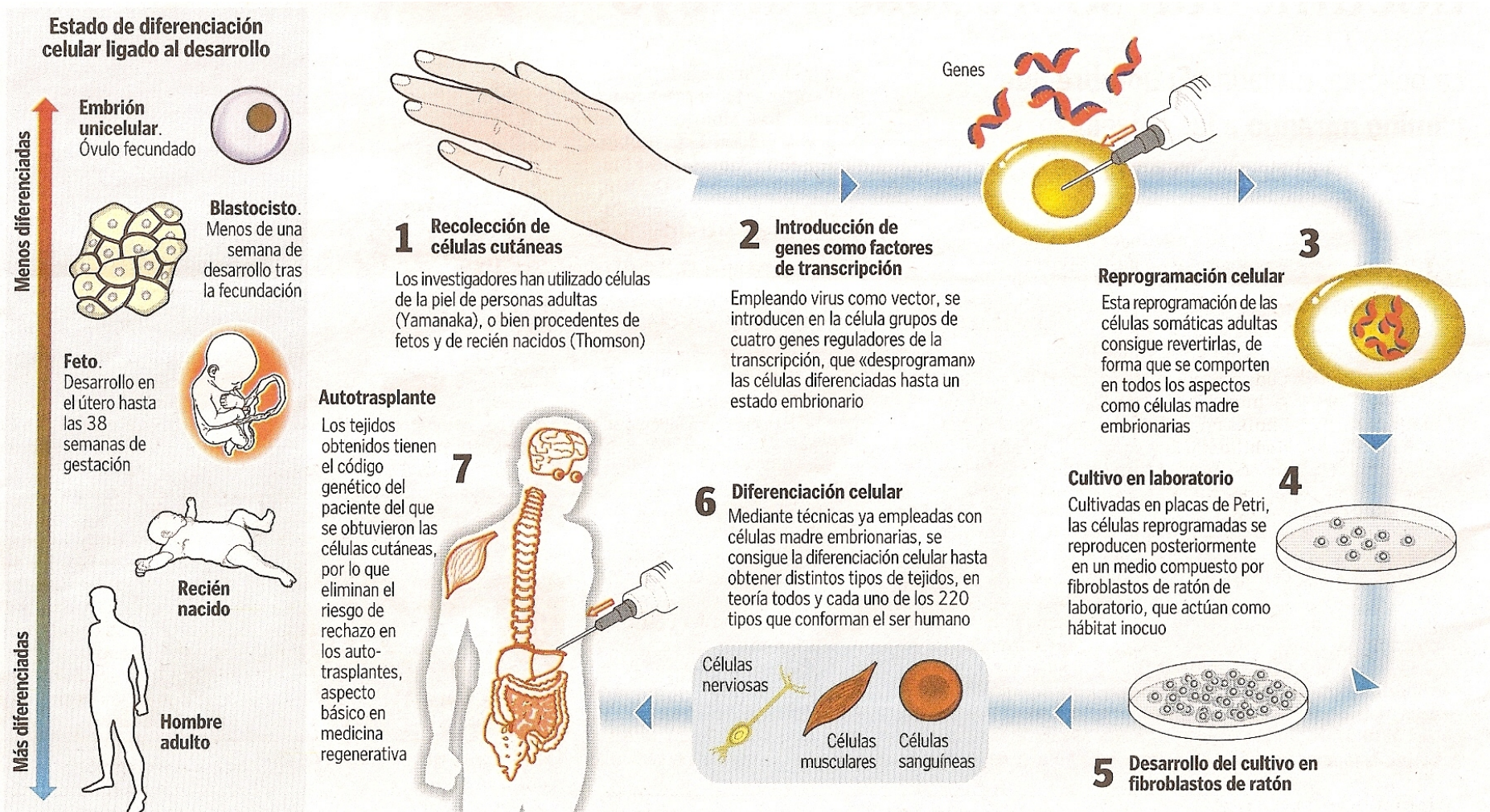
2009: Un único vector policistrónico Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc

Schöler (2009): Basta la presencia de Oct4 (1FiPS)

Blasco (2009): Papel necesario de la telomerasa

Ding (2009): Transformación de células somáticas en células iPS sin introducir información genética (ADN), utilizando proteínas

OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE REPROGRAMADAS Y SU EMPLEO EN MEDICINA REGENERATIVA



CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS

Células troncales pluripotentes inducidas (células iPS, *induced pluripotent stem*) en humanos:

Yamanaka (2007): retrovirus, Oct3/4, Soc2, c-Myc, Klf4

Thomson (2007): Oct4, Sox2, Nanog, Lin28

Melton (2008): Oct4 y Sox2

Jaenisch (2009): Un único vector policistrónico Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc

Lowry (2008): Obtención de iPS a partir de fibroblastos de la dermis

Izpisúa Belmonte (2008): Queratinocito → célula nerviosa

Rossi (2010): Obtienen células iPS utilizando ARNm sintético (células RiPS). Posibilidad de dirigir la diferenciación al tipo de células deseado

Ecker, Thomson (2011): Diferencias entre los metilomas (perfiles de metilación) de las células iPS y las embrionarias

CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS

APLICACIONES TERAPÉUTICAS:

Ratón: anemia falciforme HbS (Jaenisch, 2007); hemofilia A (Ward y Ma, 2009), diabetes (Wars y Ma, 2010), lesiones en médula espinal (Yamanaka y Okano, 2010)

Humano: esclerosis lateral amiotrófica, ELA (Eggan, 2008); distrofia muscular y enfermedad de Huntington (Park., 2008); atrofia muscular espinal, AME (Svendsen, 2009)

REPROGRAMACIÓN DIRECTA (ALQUIMIA CELULAR)

Reprogramación directa: transformación de una célula diferenciada adulta en otra de otro tipo sin pasar por un estadio intermedio de reversión troncal pluripotente (Melton, 2008).

- **Aplicación terapéutica:**

- Transformación de células exocrinas de páncreas en células beta pancreáticas (islotos de Langerhans) en ratones adultos diabéticos *in vivo*. Adenovirus con Ngn3, Pdx1 y MafA (Melton, 2008)
- Transformación *in vitro* de fibroblastos embrionarios y postnatales en neuronas funcionales en ratón utilizando factores de transcripción específicos de linaje neural: Ascl1, Brn2 (Pou3f2) y Myt1l (Wernig, 2010).
Transformación *in vitro* de fibroblastos humanos en células progenitoras de la sangre (Bhatia, 2010)

CÉLULAS TRONCALES Y MEDICINA REGENERATIVA: APLICACIÓN CLÍNICA DE LA TERAPIA CELULAR

Transferencia celular heteróloga

- Células ES de embriones obtenidos por FIV (sobrantes de técnicas de reproducción asistida o producidos ex profeso)
- Células AS de donante (trasplante, diagnóstico genético preimplantacional histocompatible: selección de embriones con fines terapéuticos)

Transferencia celular autóloga

- Clonación terapéutica (embrión somático)
- Células AS del paciente
- Células iPS del paciente
- Reprogramación directa

Aspectos éticos y legales

- El debate ético
- Aspectos legales: legislación comparada (UE, España)

FECUNDACIÓN IN VITRO Y TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

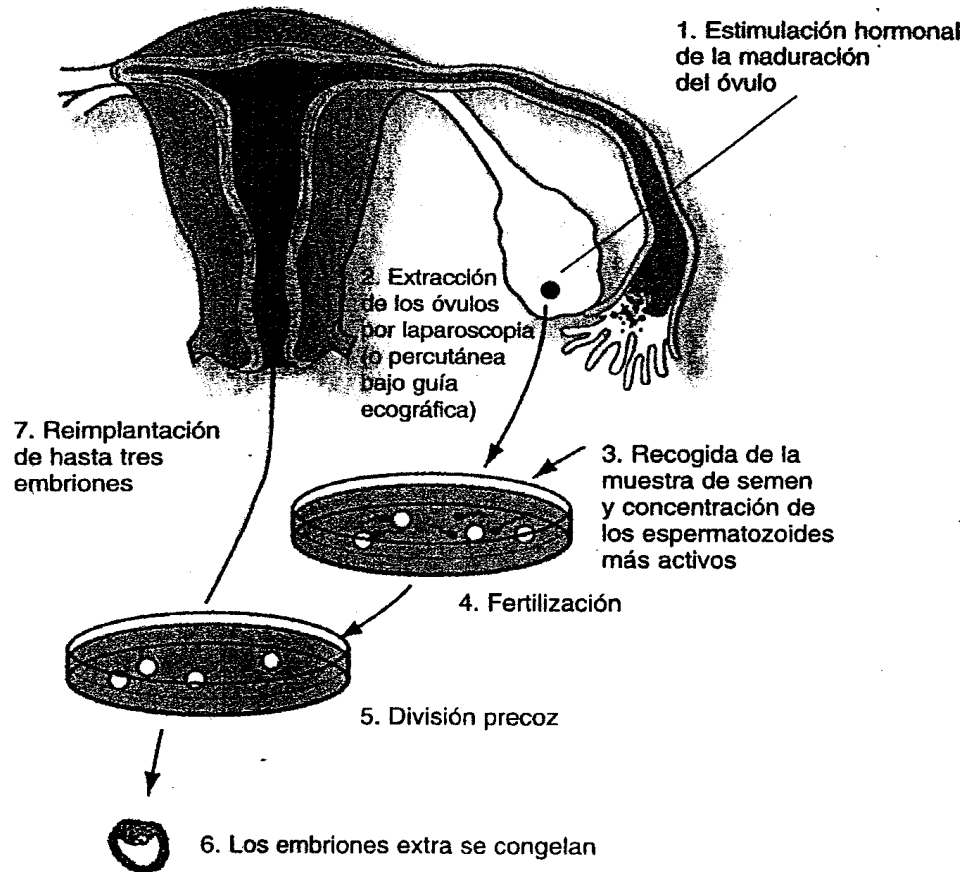
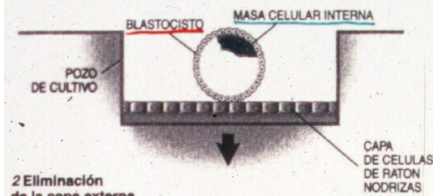


Figura 2-7 Representación esquemática de un procedimiento típico de fecundación *in vitro* y transferencia embrionaria en seres humanos.

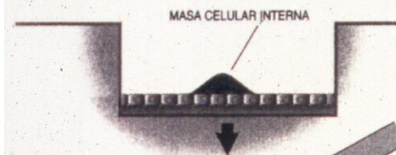


3. El procedimiento para generar células madre embrionarias (pasos 1-5) se inicia con el cultivo de un embrión en estado de blastocisto, fase precoz del desarrollo. Se ha abierto el que se muestra en la micrografía (izquierda), para mostrar la masa celular interna. Las células derivadas de las células madre embrionarias en un futuro podrían administrarse a pacientes (6 y 7).

1 Cultivo de blastocisto



2 Eliminación de la capa externa



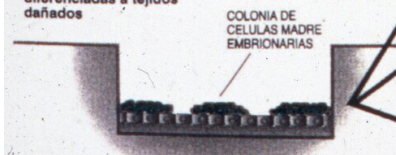
3 Adición de sustancias que disgregan la masa celular interna



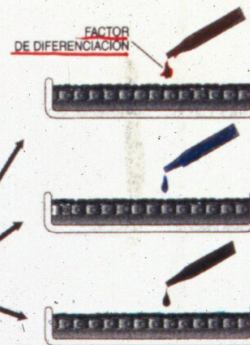
4 Transferencia de los agregados celulares a un nuevo pozo



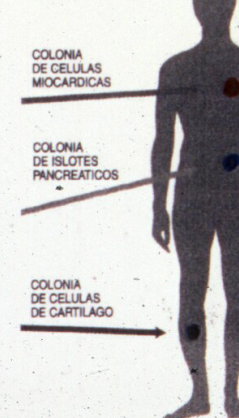
5 Formación de células diferenciadas a tejidos dañados



6 Adición de factores de diferenciación seleccionados



7 Administración de células diferenciadas a tejidos dañados



INVESTIGACIÓN CON CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS

Utilización de las células troncales embrionarias

- Embriones obtenidos *ex profeso* por FIV
- Embriones sobrantes de programas de reproducción asistida por FIVTE
- Embriones somáticos obtenidos por transferencia nuclear (SCNT)
- Embriones partenogenéticos (¿?)

INVESTIGACIÓN CON CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS

EL PROBLEMA DE LOS EMBRIONES SOBRANTES

- **Soluciones alternativas posibles sobre su destino (Ley 14/2006):**
 - Utilización propia
 - Donación a terceros: “adopción biológica”
 - Descongelarlos, utilizando sus células troncales y destruyéndolos
 - Descongelarlos, dejándolos morir
 - o
 - Mantenerlos en el limbo de la congelación (¿?)

CÉLULAS TRONCALES EN ESPAÑA

EL DESTINO DE LOS EMBRIONES SOBRANTES

- Aceptarían su propia transferencia: 24 (27 %)
- Aceptarían la donación a terceros: 29 (32,5 %)
- No les complace ninguna opción legal: 28 (31,5 %)
- Manifiestan respuestas discordantes: 7 (7,9 %)
- No contestan: 1 (1,1 %)
- Total: 89 (100 %)

(Instituto Dexeus, 2001)

CÉLULAS TRONCALES EN ESPAÑA

Opinión de la pareja sobre investigación / destrucción de los embriones sobrantes (> 5 años)

	<u>Sí</u>	<u>No</u>	<u>Discordante</u>	<u>No contesta</u>	<u>Total</u>
--	-----------	-----------	--------------------	--------------------	--------------

Investigación:	28	51	5	5	89
	(31,5%)	(57,3%)	(5,6%)	(5,6%)	(100%)

Destrucción	39	37	6	7	89
	(43,8%)	(41,6%)	(6,7%)	(7,9%)	(100%)

(Instituto Dexeus, 2001)

CÉLULAS TRONCALES EN ESPAÑA

Razones de las parejas por las que no habían transferido sus embriones crioconservados (> 5 años)

Satisfechos con el número de hijos actual:	51 (57,3%)
Actualmente no desean tener hijos:	8 (9,0%)
Problemas médicos que lo contraindican:	8 (9,0%)
Dificultades económicas:	6 (6,7%)
Otras circunstancias:	7 (7,9%)
Respuesta discordante en la pareja:	6 (6,7%)
No contesta:	3 (3,4%)
Total:	89 (100%)

(Instituto Dexeus, 2001)

CÉLULAS TRONCALES EN ESPAÑA

**Decisión legal que adoptarían las parejas encuestadas
(Banco Nacional Líneas Celulares Nodo Andalucía, 2007)**

Centro	Parejas <u>encuestadas</u>	Embriones <u>crioconservados</u> (E > 3 años)	Decisión legal (Ley 14/2006*)			
			<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>
HUVNG	22	96	10	1	11 (50%)	0
			E = 52	2	42	0
HUVRS	75	332	32	7	35 (47%)	1
			E = 140	40	150	2
Total:	97	428	42	8	46 (49%)	1
			E = 192	42	192 (45%)	2

- A) Guardar embriones utilización posterior propia pareja
- B) Donar embriones a parejas infértiles con fines reproductivos
- C) Donación para investigación, incluyendo células troncales
- D) Eliminación sin otra utilización

CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS

- **Células troncales embrionarias clónicas (embrión somático, embrión SCNT, *somatic cell nuclear transfer*):** primates no humanos, macaco rhesus (Mitalipov, 2007), humano (blastocistos SCNT) (French, 2008)
- **Células troncales embrionarias partenogenéticas:** primates no humanos, macaco (*Macaca fascicularis*) (Cibelli y Lanza, 2002)

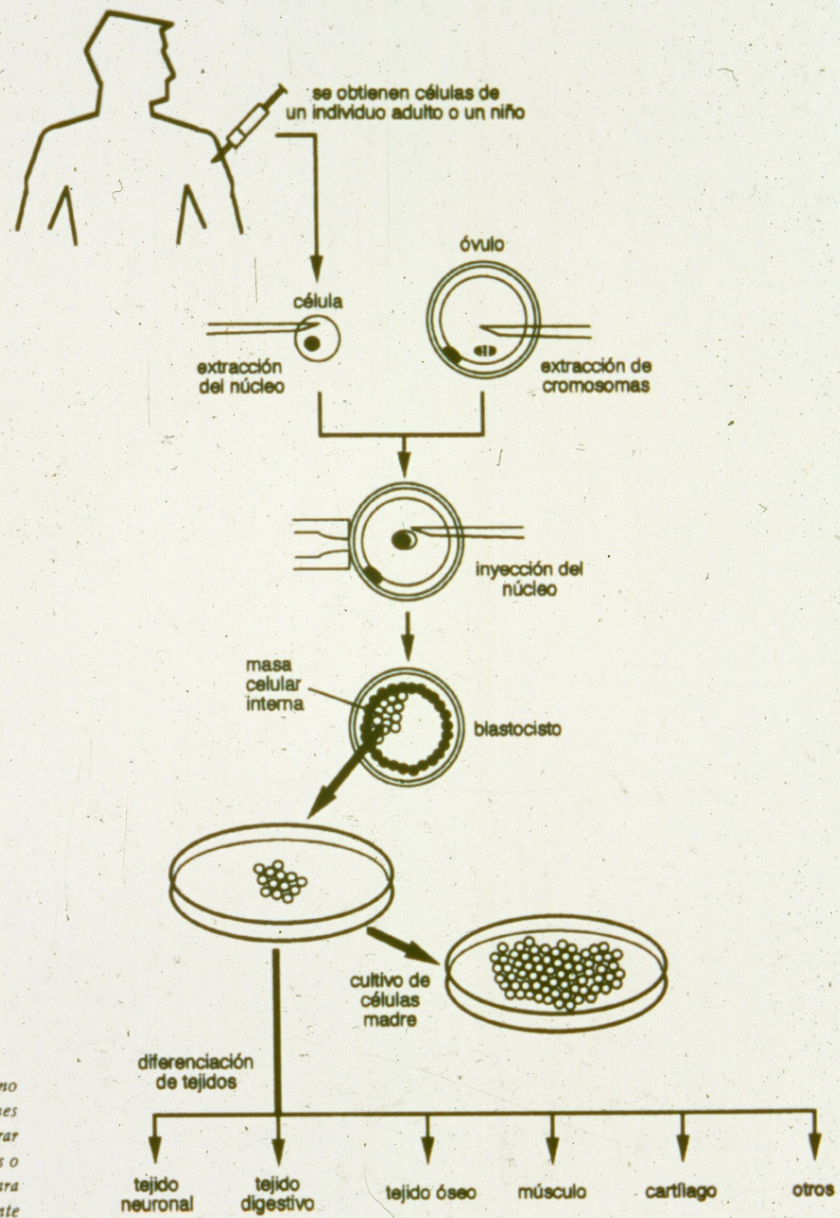
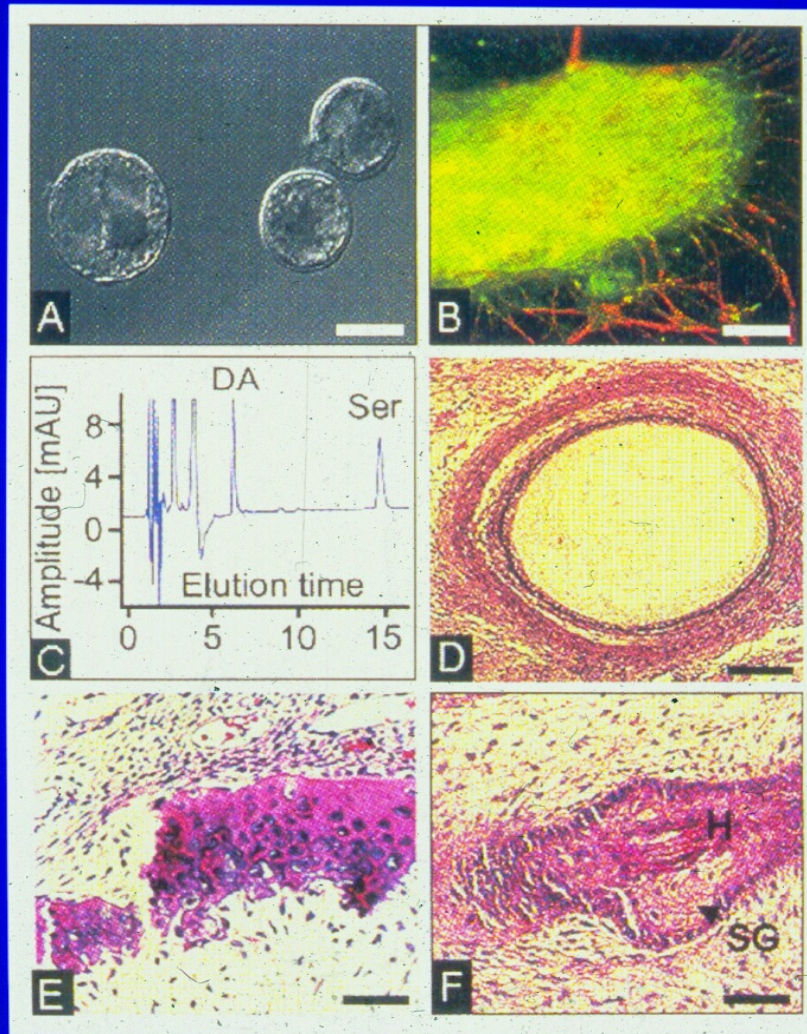


Figura 8. Clonación no reproductiva, con fines terapéuticos, para generar células madre totipotentes o pluripotentes y tejidos para trasplante

HOY CHITA, MAÑANA JANE

Cibelli et al. *Science*, 295: 819 (2002)



PATENTES DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS (I)

TRIBUNAL DE JUSTICIA DE LA UNIÓN EUROPEA

Sentencia del 18 de octubre de 2011

- 1) El artículo 6, apartado 2, letra c), de la Directiva 98/44/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de julio de 1988, relativa a la **protección jurídica de las invenciones biotecnológicas**, debe interpretarse en el sentido de que:
 - Constituye un “**embrión humano**” todo óvulo humano a partir del estadio de la **fecundación**, todo óvulo humano no fecundado en el que se haya **implantado** el núcleo de una célula humana madura [**transferencia nuclear**] y todo óvulo humano no fecundado estimulado para dividirse y desarrollarse mediante **partenogénesis**.
 - Corresponde al juez nacional determinar, a la luz de los avances de la ciencia, si una célula madre obtenida a partir de un embrión humano en el estadio de blastocisto constituye un “embrión humano” en el sentido del artículo 6, apartado 2, letra c), de la Directiva 98/44.

PATENTES DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS (II)

- 2) La **exclusión de la patentabilidad** en relación con la utilización de embriones humanos con **fines industriales o comerciales** contemplada en el artículo 6, apartado 2, letra c), de la Directiva 98/44 **también se refiere** a la utilización con fines de **investigación científica**, pudiendo únicamente ser objeto de patente la utilización con fines terapéuticos o de diagnóstico que se aplica al embrión y que le es útil.
- 3) El artículo 6, apartado 2, letra c), de la Directiva 98/44 **excluye la patentabilidad** de una invención cuando la información técnica objeto de la solicitud de patente requiera la **destrucción previa de embriones humanos o su utilización como materia prima**, sea cual fuere el estadio en el que éstos se utilicen y aunque la descripción técnica no mencione la utilización de embriones humanos.

CÉLULAS TRONCALES ADULTAS Y MEDICINA REGENERATIVA

Los primeros datos experimentales:

Vecovi (1999): Células troncales del tejido nervioso inyectadas en la médula ósea se transforman en células sanguíneas.

Mezey (2000): Células troncales hematopoyéticas pueden generar neuronas

Anversa (2001): Regeneración de tejido cardiaco infartado a partir de células troncales hematopoyéticas

Verfaillie (2002): Células MAPC (*mesenchymal adult pluripotent cell*) tienen muchas de las características pluripotenciales de las células troncales embrionaria

CÉLULAS TRONCALES ADULTAS Y MEDICINA REGENERATIVA

National Institutes of Health (NIH) (www.ClinicalTrials.gov, 12/03/2012):

En el mundo hay un total de **3.813** ensayos clínicos en marcha con **células troncales adultas (AS)** frente a solamente **17** con **células troncales embrionarias (ES)**. Por ejemplo, en Estados Unidos hay 2.384 investigaciones con células AS y sólo 10 con células ES, en Israel hay 85 de células AS y 3 de células ES, en China 252 con células AS y 2 con células ES, en Australia 110 de células AS y 1 de ES y en Europa 840 de células AS y 1 de ES, mientras que en Canadá hay 230 investigaciones con células AS y ninguna con células ES. En España, 108 ensayos clínicos con células AS y ninguno con células ES.

En todo el mundo solamente hay 10 ensayos clínicos con **células troncales pluripotentes inducidas (iPS)**: 7 USA, 2 Israel, 1 Irán.

Bancos de células (cordón umbilical, dientes de leche, sangre menstrual, tejido adiposo):

En España unas 25.600 familias guardan muestras de CU, pero sólo 600 en bancos nacionales. En el mundo se han realizado unos 8.000 trasplantes de donante (heterólogos) frente a solamente 4 de autotrasplante (autólogos)

Selección de embriones con fines terapéuticos (Ley 14/2006)

CÉLULAS TRONCALES ADULTAS Y MEDICINA REGENERATIVA

- **FINES Y MEDIOS**

La terapia celular en la Medicina Regenerativa del futuro.
El fin no justifica los medios.

- **ÉTICA DE LA NO-INVESTIGACIÓN (J. TESTART)
FRENTE A LA ÉTICA DE LA RESPONSABILIDAD (H.
JONAS)**

