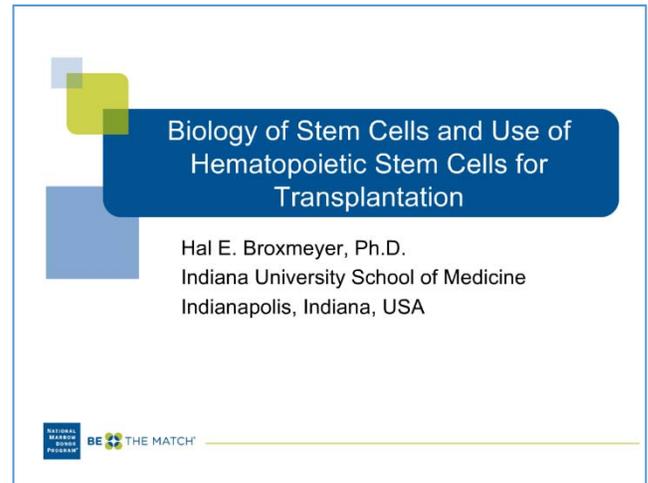


# Biology of Stem Cells and Use of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation

## Diapositiva 1

**HAL BROXMEYER, M.D.:** Soy Hal Broxmeyer del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Indiana en Indianápolis, y voy a explicar la biología de varios tipos distintos de células madres y también de las células madres hematopoyéticas y su uso en trasplantes.



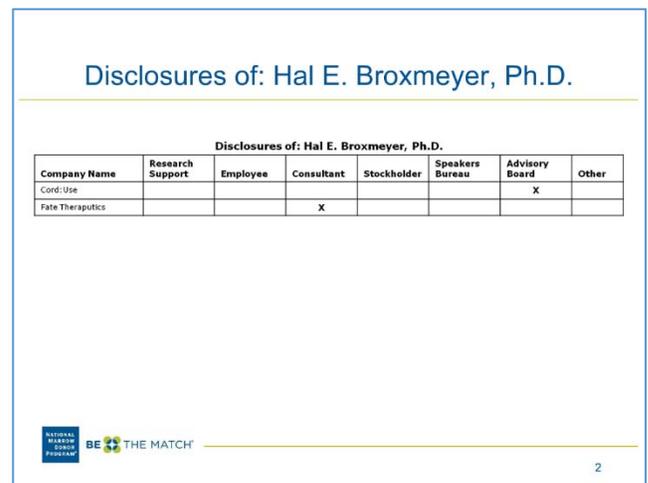
**Biology of Stem Cells and Use of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation**

Hal E. Broxmeyer, Ph.D.  
Indiana University School of Medicine  
Indianapolis, Indiana, USA

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM® BE  THE MATCH®

## Diapositiva 2

Dos declaraciones de intereses son que integro la Junta de Asesoramiento Científico de Cord: Use, una compañía que es un banco de sangre de cordón umbilical, y también soy consultor activo de Fate Therapeutics.



**Disclosures of: Hal E. Broxmeyer, Ph.D.**

Disclosures of: Hal E. Broxmeyer, Ph.D.

Company Name	Research Support	Employee	Consultant	Stockholder	Speakers Bureau	Advisory Board	Other
Cord: Use						X	
Fate Therapeutics			X				

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM® BE  THE MATCH®

2

### Diapositiva 3

Muchos tejidos de los organismos en pleno funcionamiento requieren un mecanismo para reemplazar las células viejas, dañadas o enfermas. Por ejemplo, el reemplazo de células sanguíneas en la circulación humana es de unas  $10^8$  a  $10^9$  células por hora. El recambio epitelial en el intestino delgado ocurre aproximadamente cada 3 a 5 días y el recambio de las células de la piel depende del lugar, pero ocurre aproximadamente cada 3 o 4 semanas en promedio. Para que ocurra este recambio, es necesario que las células sean reemplazadas y las células son reemplazadas por una población de células específicas llamadas células madres.

Many tissues of the fully developed organism require a mechanism be present for the replacement of aged, injured or diseased cells.

- Turnover of blood cells in human circulation = 108-109 cells per hour
- Epithelial turnover in the small intestine = every 3-5 days
- Skin cell turnover is location dependent but = every 3-4 weeks on average

### Diapositiva 4

Y voy a definir brevemente qué es una célula troncal porque mucha gente no tiene totalmente claro qué es una célula troncal y entonces voy a explicar los distintos tipos de células madres.

#### Stem Cells

- Definition
- Types

### Diapositiva 5

Para que una célula se llame troncal, dicha célula tiene que poder producir células iguales a sí misma. Es decir, tiene que tener la capacidad de autorrenovarse. A menos que tenga esa capacidad de autorrenovarse, no puede considerarse una célula troncal. Y hay poblaciones de células madres que la gente las llama así pero que en realidad no tienen ninguna prueba absoluta de que haya un proceso de autorrenovación y, por lo tanto, a esas células podría llamárselas más apropiadamente células progenitoras, una célula que sigue en línea a la célula troncal. Además de la capacidad de la célula troncal de autorrenovarse, es decir, producir células iguales a sí misma, tiene que poder dar origen a diferentes linajes, es decir, tener la capacidad de generar más de un linaje.

#### Stem Cell Definition

- Self Renewal (make more of itself)
- Differentiate (down multiple lineages)

## Diapositiva 6

Hay células madres en el embrión, que pueden llamarse células madres embrionarias. También está esta nueva población de células que recientemente se ha presentado en la literatura médica, que se llaman células madres pluripotentes inducidas, y luego tenemos células que son más histoespecíficas, que se llaman mesenquimatosas, hematopoyéticas o esas células madres que son importantes para el desarrollo de nervios, la producción de nervios, músculos, intestinos y otros tejidos diferentes.

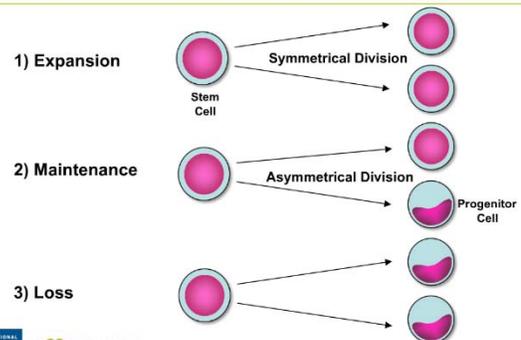
## Stem Cell Types

- Embryonic
- Induced Pluripotent (iPS)
- Tissue Specific
- Mesenchymal (MSC)
  - Hematopoietic (HSC)
  - Nerve
  - Muscle
  - Intestinal
  - Etc.

## Diapositiva 7

Hay ciertas posibilidades distintas en cuanto al destino de una célula troncal. Puede haber una expansión de la célula troncal, como vemos en el número 1. Si hay una división simétrica de esa única célula troncal, esa división simétrica da origen a dos células iguales que tienen ambas las características funcionales de una célula troncal, es decir que pueden producir más células iguales a sí mismas y también pueden diferenciarse y generar múltiples linajes. Si hay una división asimétrica como en el segundo grupo, tenemos mantenimiento, y eso esencialmente significa que hay una célula que se divide y da origen a una célula que es funcionalmente una célula troncal y otra célula que ya no es una célula troncal sino que está más abajo, como una célula progenitora, que se encuentra en la jerarquía siguiente de diferenciación de la célula troncal. Si la célula troncal se divide simétricamente, pero en vez de derivar en dos células madres, genera dos células más maduras, como células progenitoras, entonces esencialmente lo que se tiene es una pérdida de esas células madres. Así que cuando pensamos en células madres y su capacidad de formar células diferenciadas, esta es el área que estamos viendo: expansión, número 1; frente a mantenimiento, número 2; frente a pérdida de las células, que es número 3.

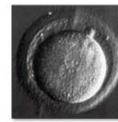
## Stem Cell Possibilities and Cell Fate Determinants



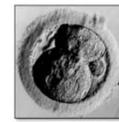
### Diapositiva 8

Voy a empezar hablando de las células madres embrionarias humanas y les mostraré una imagen de las primeras etapas del desarrollo embrionario humano. Arriba a la izquierda se ve el óvulo fecundado y a continuación en esa línea se ve un embrión de dos células, un embrión de cuatro células y luego abajo se ve un embrión de ocho células que luego se transforma en una mórula y luego en un blastocisto.

### Early stages of human embryonic development



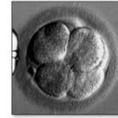
Fertilized egg



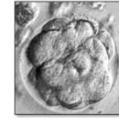
Two-cell embryo



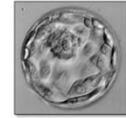
Four-cell embryo



Eight-cell embryo



Morula

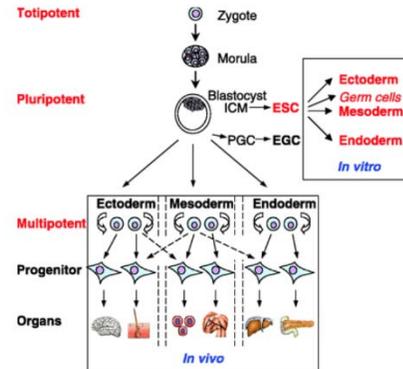


Blastocyst



### Diapositiva 9

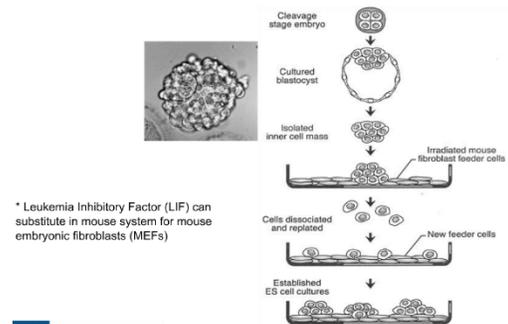
Viéndolo desde otro ángulo, desde el cigoto a la mórula al blastocisto, y esa es la masa celular interna, abreviada aquí como ICM, en el blastocisto da origen a las distintas capas de células germinales que forman todas las células del cuerpo. Y entonces estas células pueden formar el ectodermo, el mesodermo y el endodermo in vivo. Pero si tomamos esta masa celular interna, se pueden tomar esas células y desarrollar una línea celular de células madres embrionarias que entonces tendrían la capacidad de mantener su estado pluripotente y todavía ser células madres o, bajo ciertas condiciones, se las puede inducir a diferenciarse y originar los linajes celulares germinales del ectodermo, mesodermo o endodermo.



## Diapositiva 10

Esta imagen muestra el aislamiento y el establecimiento de células madres embrionarias. Así que, arriba de todo, con el embrión en etapa de segmentación, lo que tenemos es un blastocisto. Aislamos la masa celular interna y luego la ponemos en una placa de cultivo. Ahora, para que estas células permanezcan en el estado pluripotente, necesitan ciertos factores de crecimiento. Resulta que los fibroblastos embrionarios de ratón son muy, muy útiles como células nodrizas y esencialmente se irradia la capa de fibroblastos usados como nodrizas para que no se dividan. Luego se colocan las células de la masa celular interna encima de esas nodrizas y entonces se pueden mantener estas células y dispersarlas y colocarlas en otra placa. Resulta que uno de los ingredientes más activos que salen de estas células fibroblásticas embrionarias que contribuye a mantener las células madres embrionarias es el factor inhibidor de la leucemia, llamado así principalmente porque se lo identificó por primera vez como una célula que inhibía la proliferación de células leucémicas o líneas de células leucémicas. De modo que el factor inhibidor de la leucemia o LIF puede mantener, contribuir a mantener, las células nodrizas embrionarias murinas. Y, como veremos más adelante, esto no funciona con las células embrionarias humanas.

### Isolation and establishment of embryonic stem cells



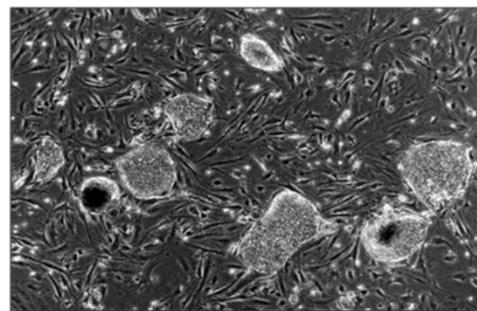
NATIONAL NIDDK ORGAN DONOR PROGRAM BE THE MATCH

10

## Diapositiva 11

Aquí se ve una imagen de varias células madres embrionarias de ratón diferentes proliferando sobre fibroblastos embrionarios que han sido irradiados. Así que podemos retirar estas células de la capa de nodrizas o bien del LIF y estas células se diferenciarían y luego formarían cuerpos embrioides. Y estos cuerpos embrioides contienen células de distintos linajes que, con los ingredientes apropiados, nos permiten generar distintos linajes; por ejemplo, el linaje hematopoyético, el linaje de células nerviosas, el linaje muscular. Pero si permanecen sobre los fibroblastos o en presencia de LIF, se mantendrán en un estado no diferenciado muy primitivo y continuarán teniendo las características que les permiten producir más de sí mismas.

### Murine ES cells growing on embryonic fibroblasts



NATIONAL NIDDK ORGAN DONOR PROGRAM BE THE MATCH

11

## Diapositiva 12

¿Así que por qué querría uno estudiar las células madres embrionarias? Les daré tres razones: Una, es entender mejor el proceso de la supervivencia y la autorrenovación de estas células porque la información puede entonces traducirse para ayudarnos a entender más cómo mejorar la supervivencia y la autorrenovación de otras células madres más histoespecíficas. Otra es estudiar la diferenciación, por ejemplo, mediante la generación de cuerpos embrioides, que llamamos EB y, nuevamente, esto es después de retirar estas células de los fibroblastos embrionarios murinos (los MEF) y/o del factor inhibidor de la leucemia (LIF). También se pueden estudiar porque son necesarias como control para entender esta nueva área de células madres pluripotentes inducidas, sobre las que hablaré más adelante. Y luego por supuesto la principal razón por la que uno querría estudiarlas es por su posible uso futuro en la clínica, si bien esto aún no se ha logrado. Ciertamente esperamos poder hacerlo en el futuro, pero en este momento hay cosas que impiden que se usen en la clínica. Una de ellas es poder controlar las células para que no formen tumores y para poder diferenciarlas para que no quede ninguna célula troncal embrionaria que pueda causar tumores.

### Regulation of the Growth and Survival of Embryonic Stem Cells (ESC)

#### Reasons to study ESC

1. Better understand processes of:
  - survival and self-renewal (ESCs)
  - differentiation, via generation of embryoidbodies (EBs) after removal of ESCs from MEFs and LIF
2. Use as a control for induced pluripotent stem cells
3. Potential future clinical use

12

## Diapositiva 13

Ahora bien, hay diferentes marcadores de estas células madres embrionarias. Tenemos la expresión de ciertos factores de transcripción que principalmente se encuentran en las células muy primitivas como las que tienen características de células madres, especialmente aquellas que tienen características de células madres embrionarias. Esto incluye Oct4, NANOG, Sox2 y Klf4. Hay también una serie de moléculas, o proteínas, en la superficie celular que definen el estado pluripotente. Uno de esos marcadores es la proteína SSEA. Para asegurarse de que una célula embrionaria es pluripotente, uno de los ensayos cruciales es tomar esas células y ponerlas en sitios inmunitarios privilegiados en un animal y formar un teratoma. Un teratoma está formado por células que expresan algunos genes y que muestran las características de las células germinales, de modo que hay células que provienen de las tres capas de células germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo. La manera más segura de comprobar si se está en presencia de una célula troncal es usar esa célula troncal embrionaria para formar un animal intacto y esto se ha hecho si bien es un poco exagerado hacerlo simplemente para tratar de probar que tenemos células madres embrionarias.

### Markers of Pluripotent State of ESCs

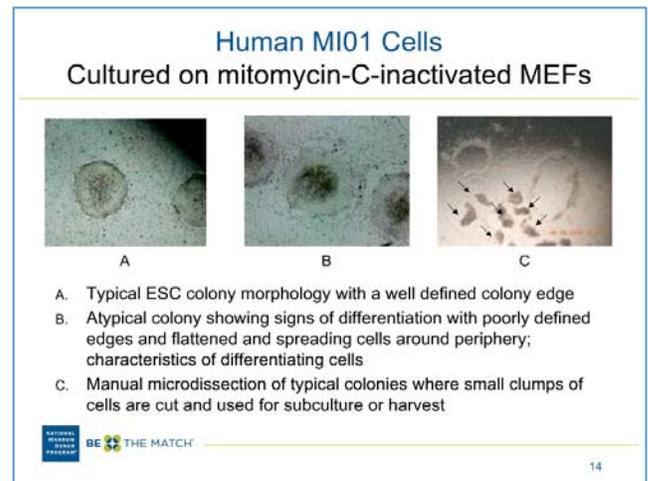
- Transcription Factors:  
Oct4, nanog, Sox2, KLF4
- Surface Markers SSEA, etc.
- Teratoma Formation in vivo

13

## Diapositiva 14

Los linajes de células madres embrionarias en seres humanos son un poco diferentes y les voy a mostrar unos ejemplos de una línea de células madres embrionarias humanas, MI01, y estas células se han cultivado sobre fibroblastos embrionarios murinos inactivados con mitomicina C. A la izquierda, en A, se ve la morfología típica de las colonias de células madres embrionarias y se ve el borde de la colonia bien definido. En el panel del medio, B, se ve una colonia atípica con signos de diferenciación, con un borde poco definido y células aplanadas que se desparan alrededor de la periferia, y estas son de hecho características de que estas células madres embrionarias, al menos parcialmente hacia el borde, ahora están formando células poco diferenciadas. Así que si quieren pasar las células y preservarlas mantenidas, las células humanas, es necesario que puedan recoger las colonias que no tienen este borde en el que ya se observa diferenciación. Ahora bien, hay al menos dos maneras de pasar estas células; una es tomar las células y digerirlas para sacarlas de la capa de nodrizas, y transferirlas entonces a otra placa de cultivo donde ya se hayan puesto las nodrizas. La otra manera es usar microdissección manual, como se ve en C, en el panel de la derecha, y retirar estas colonias típicas y agruparlas en pequeños cúmulos y subcultivarlas después de haberlas cosechado. Ahora bien, el cultivo de células madres embrionarias de ratón es un poco diferente al de las células madres embrionarias humanas. Por alguna razón, se pueden hacer suspensiones de una sola capa de células con células madres embrionarias de ratón para pasarlas y cultivarlas y mantenerlas en un estado similar al de las células madres embrionarias pluripotentes. Pero es mucho más difícil hacer esto con células humanas y, por algún motivo, es necesario que haya más interacción entre las células y no se puede en realidad hacerlo con suspensiones de una sola capa de células, aunque hay quienes dicen que pueden pasar las células de esta manera.



## Diapositiva 15

Así que hay varios ejemplos distintos de cómo se pueden tomar estas células madres embrionarias murinas o humanas y aprender de ellas, y les voy a dar un par de ejemplos de mi propio laboratorio. Este es un artículo que se publicó en 2007 y que trataba sobre el desacoplamiento del punto de regulación-apoptosis en células madres embrionarias humanas y murinas como posible fuente de inestabilidad cariotípica. Así que estamos analizando los puntos de regulación del ciclo celular y la apoptosis o muerte celular programada.

### Checkpoint-Apoptosis Uncoupling in Human and Mouse Embryonic Stem Cells: A Source of Karyotypic Instability

Charlie Mantel, Ying Guo, Man Ryul Lee, Min-Kyoung Kim, Myung-Kwan Han, Hirohiko Shibayama, Seiji Fukuda, Mervin C. Yoder, Louis M. Pelus, Kye-Seong Kim, and Hal E. Broxmeyer

*Blood*, 109: 4518-4527, 2007

## Diapositiva 16

Y en ese artículo pudimos demostrar que si se usa nocodazol, que es un inhibidor del punto de regulación del huso mitótico, tanto las células madres murinas como las humanas se vuelven poliploides, y en el proceso de volverse poliploides, no sufren la muerte celular programada, es decir, no pasan por la apoptosis. Esto contrasta directamente con las células somáticas y eso incluye las células corporales embrionarias que están diferenciadas de las células madres embrionarias porque estas células somáticas, o células que provienen de los cuerpos embrioides después de que las células madres embrionarias se vuelven diferenciadas, bajo el mismo tratamiento con nocodazol, no se vuelven poliploides y no sufren la muerte celular programada. Eso nos hizo preguntarnos dónde encajan las células madres hematopoyéticas. ¿Son más como las células madres embrionarias, lo que nos haría dudar, especialmente si uno trató de expandir las células hematopoyéticas ex vivo, o son más como las células somáticas? Así que usando las células madres hematopoyéticas murinas que habíamos aislado y purificado de maneras que explicaré más adelante, el tratamiento con nocodazol causó la muerte celular programada sin poliploidía, lo que sugiere que las células madres hematopoyéticas son más cercanas a las células somáticas y no sufrieron este desacoplamiento inusual del punto de regulación del huso mitótico y la apoptosis. Eso nos hizo sentir un poco mejor acerca del concepto de expandir las células madres hematopoyéticas ex vivo.

- Using nocodazole, a mitotic spindle checkpoint inhibitor, mouse and human ESCs become polyploid, but did not undergo apoptosis
- In contrast, somatic cells, including embryoid body cells produced after differentiation of ESCs under the same nocodazole treatment, did not become polyploid, and did apoptose  
*Mantel et al Blood 109:4518-4527, 2007*
- Mouse hematopoietic stem cells, unlike human and mouse ESCs, did exhibit checkpoint-apoptosis coupling. Nocodazole treatment caused apoptosis without polyploid formation  
*Rohrbaugh, Mantel, Broxmeyer Stem Cells and Development 17:1017-1020, 2008*

## Diapositiva 17

Otro ejemplo es si tomamos estas células madres embrionarias y eliminamos ciertos genes, podemos descubrir exactamente qué hace ese gen en el proceso de autorrenovación y/o diferenciación. Y un gen que estudiamos fue SIRT1, que cumple múltiples funciones. Interviene en el metabolismo y la remodelación del acromion, pero también se lo ha asociado a la longevidad. Lo que descubrimos es que la deficiencia en el SIRT1 de la línea de células madres embrionarias de ratón afecta la capacidad de la célula troncal de formar células hematopoyéticas y esto sucede tanto en la hematopoyesis embrionaria como en la adulta, y esto se hizo en ratón.

### SIRT1 Deficiency Compromises Mouse Embryonic Stem Cell Hematopoietic Differentiation, and Embryonic and Adult Hematopoiesis in the Mouse

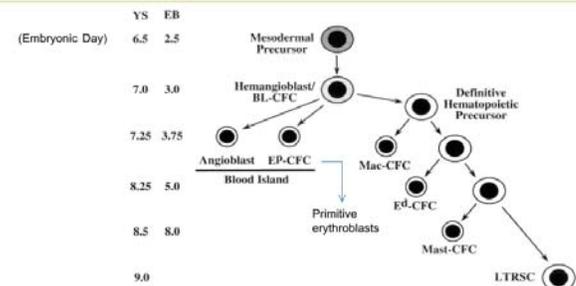
Xuan Ou, Hee-Don Chae, Rui-Hong Wang,  
William C. Shelly, Scott Cooper, Tammi Taylor,  
Young-June Kim, Chu-Xia Deng,  
Mervin Yoder, and Hal E. Broxmeyer

*Blood* 117: 440-450, 2011

## Diapositiva 18

Así que si miramos el esquema del inicio de la hematopoyesis, por ejemplo en el saco vitelino, que es uno de los primeros lugares de producción de células sanguíneas en el embrión, y luego miramos los cuerpos embrioides que provienen de estas líneas de células madres embrionarias, estas líneas de células madres embrionarias establecidas, básicamente tenemos el mismo patrón de diferenciación, es decir que tenemos una precursora, arriba de todo, y a la izquierda se muestran los días y los días en el saco vitelino de generación de cuerpos embrioides. Y esas células derivan en una célula muy primitiva que es el hemangioblasto y esa célula posee la capacidad de diferenciarse en el linaje endotelial en angioblastos o células progenitoras endoteliales y también en eritroblastos primitivos o, como se ve a la derecha, puede derivar en células precursoras hematopoyéticas definitivas que derivan en células formadoras de colonias de macrófagos, células eritroides definitivas y mastocitos, y eventualmente, células madres repobladoras a largo plazo.

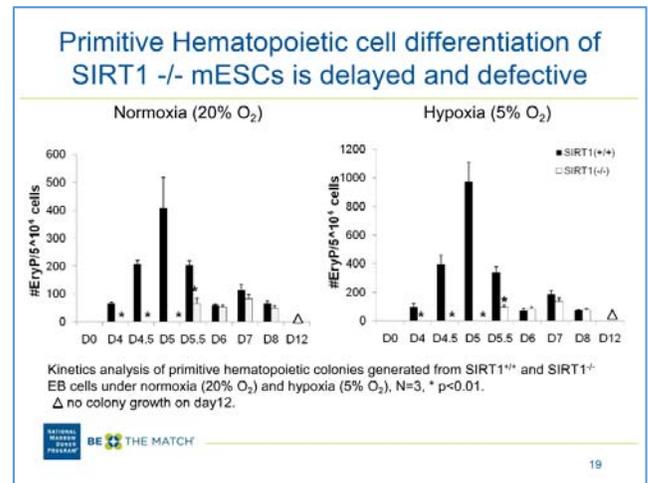
### Scheme of the onset of hematopoiesis in the yolk sac and EBs



Lacaud G, et al, *Ann N Y Acad Sci*, 2001 Jun;938:96-107  
Lux TC, et al, *Blood*, 2008 April; 111(7): 3435-3438

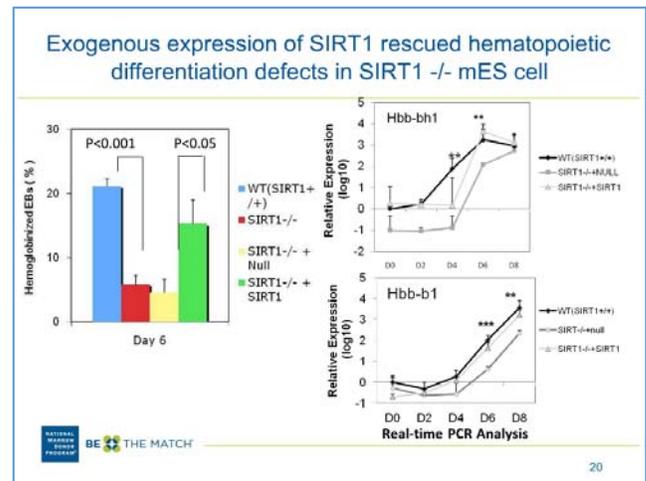
## Diapositiva 19

Este es un ejemplo de lo que sucede cuando se compara una línea normal de células madres embrionarias con una línea de células madres embrionarias de ratón con el gen SIRT1 eliminado. En el panel de la izquierda, vemos el número de células eritroides primitivas y, en negro, se ven los números, con el tiempo, que se forman en cultivo bajo normoxia, o tensión de oxígeno normal, aproximadamente 20% de oxígeno, y esas son las barras negras, y las barras blancas abiertas se ve que hay una gran deficiencia en la generación de estas células eritroides primitivas. Resulta que la tensión de oxígeno es muy importante en esto. Porque en el grupo de la derecha, verán lo que sucede a las mismas células bajo hipoxia, o baja tensión de oxígeno, de 5%, en vez de 20% de oxígeno. Y hay una diferencia entre el panel de la izquierda y el panel de la derecha y es que, en el panel de la derecha, los números son más altos. Así que aunque parecen iguales, tenemos un máximo de 1200 a la derecha contra 600 a la izquierda, y todo esto nos muestra que esa diferencia entre la capacidad de las células con SIRT1 eliminado de formar progenitoras eritroides primitivas es mucho mayor bajo hipoxia que bajo normoxia.



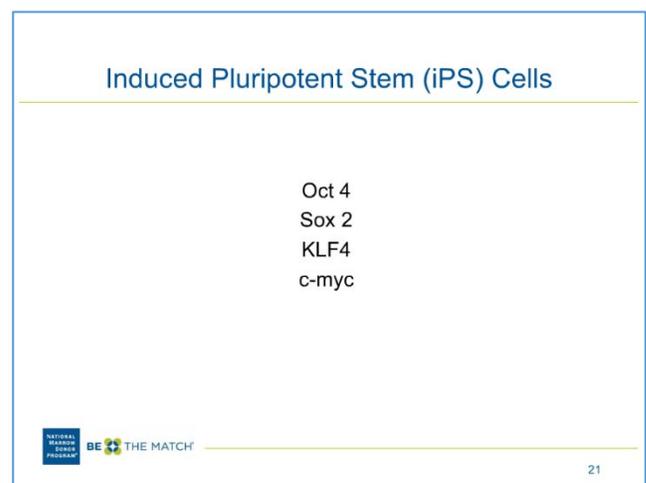
## Diapositiva 20

Si se quiere demostrar que un cierto gen es realmente importante, no es suficiente con inactivar ese gen o eliminarlo, de hecho habrá que reponer ese gen y demostrar que se recupera la formación de las características normales de las células madres embrionarias originales que no tenían el gen eliminado. Así que, por ejemplo, en el panel de la izquierda, si ven los cuerpos embrioides hemoglobinizados, esas células están diferenciadas de las células madres eritroides de ratón, pueden ver, en azul, qué sucede con su número, el porcentaje de esos cuerpos embrioides que efectivamente expresaron hemoglobina y pueden ver en rojo que cuando no tenemos un gen SIRT1, tenemos muchos menos cuerpos embrioides hemoglobinizados. Y si les ponemos el gen, que se ve en verde, esencialmente devolvemos la capacidad del cuerpo embrioides hemoglobinizados a la de las células madres embrionarias controladas naturales. Y si vemos el panel de la derecha, esencialmente lo que se ve es exactamente lo mismo con la expresión de hemoglobina. De modo que, esencialmente al devolver, mediante un vector lentiviral, un gen SIRT1 a una línea de células madres embrionarias con el SIRT1 eliminado, básicamente se restablece lo que se ve con las células naturales controladas, lo que demuestra que las deficiencias que se observan al eliminar el SIRT1 de hecho se deben a la eliminación del gen SIRT1.



## Diapositiva 21

Así que quisiera pasar ahora a este campo totalmente nuevo de las células madres pluripotentes inducidas. Como mostré antes, había cierto factor de transcripción que estaba asociado con el mantenimiento de las células madres embrionarias primitivas en el estado pluripotente. Y los cuatro factores de transcripción que se ven aquí. Esos factores de transcripción que se mostró originalmente que eran importantes, se toma una célula somática y se ponen estos genes para que se expresen en las células somáticas y esas células entonces son reprogramadas a un estado similar al de la célula troncal embrionaria. Estos factores de transcripción también se conocen como factores Yamanaka por la persona que identificó por primera vez que se pueden generar células madres pluripotentes inducidas y quien recientemente recibió el Premio Nobel por este trabajo sobre las células madres pluripotentes inducidas.



## Diapositiva 22

Si quieren aprender más sobre estas células, pueden ver la reseña escrita por el profesor Yamanaka en *Cell* en 2009. No está muy actualizado, pero sin duda les dará una buena idea sobre estas células. También pueden ver el artículo en *Nature* en el que hablan sobre la promesa de estas células madres pluripotentes inducidas, o I-P-S, en la investigación y el tratamiento, que provino del laboratorio de George Daley en Harvard, y pueden ver otro, el tercero en la lista, de *Cell Stem Cell*, en el que se muestran todos los tipos diferentes de células somáticas que se podrían de hecho reprogramar a un estado similar al de una célula troncal embrionaria usando diferentes factores de transcripción. Como una de las áreas de mayor interés para mí tiene que ver con la sangre de cordón umbilical y su biología, inmunología y trasplante, me interesé mucho en todo este concepto de generación de células IPS y sangre de cordón umbilical. Ahora los primeros tres artículos que se ven provienen de otros grupos y están incluidos. Los primeros dos aparecieron en *Cell Stem Cell* y hubo otro en *Blood*, hubo otros desde entonces, y después nuestro propio artículo que se publicó en 2011 en *Blood*, que mostró que podemos generar células IPS a partir de células CD34 provenientes de sangre de cordón umbilical descongelada después de 20 años de estar congelada en estado criopreservado.

Induced Pluripotent Stem Cells (iPS cells)  
Reviewed: Yamanaka, S. *Cell* 137:13-17, 2009

The Promise of iPS Cells in Research and Therapy  
D.A. Robinson and G.Q. Daley. *Nature* 481:295-305, 2012

iPS Cells Generated From Numerous Somatic Cell Types  
Maherali, N., and Hochendlinger, K. *Cell Stem Cell* 3:595-605, 2008

iPS Cells Generated from Cord Blood (CB)

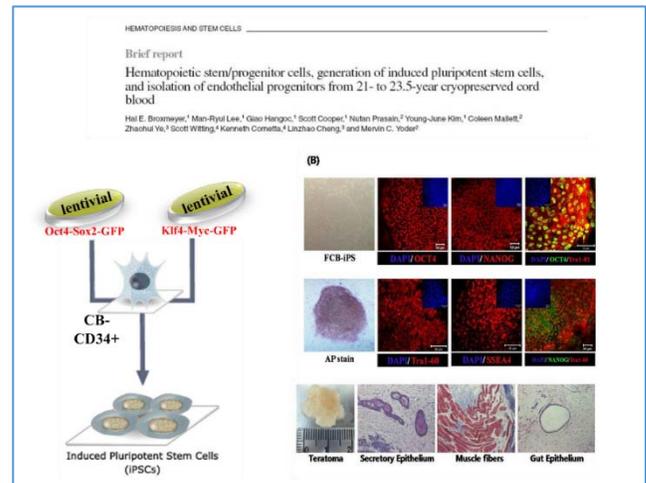
- 1) Haase, et al *Cell Stem Cell* 5:434-441, 2009  
[endothelial cells derived/generated from human CB]
- 2) Giorgetti, A., et al *Cell Stem Cell* 5:352-357, 2009  
[CD133+ CB; used CB frozen 5 years]
- 3) Ye, Z., et al *Blood* 114:5473-5480, 2009  
[CD34+ CB; used CB frozen up to 8 years]
- 4) Broxmeyer, H.E., et al *Blood* 117:4773-4777, 2011  
[generation of iPS cells after 23.5 years of cryopreservation]



22

## Diapositiva 23

Acá se muestra aproximadamente la metodología que usamos en ese artículo en el que teníamos un vector lentiviral que expresaba Oct4 y Sox2 con una proteína fluorescente verde, o GFP, como marcador, y otro vector lentiviral que permitiría la expresión de Klf4 y Myc, también con marcador de proteína fluorescente verde, y al poner esas células en las células CD34-positivas de sangre de cordón umbilical se demostró que, con el tiempo, se pueden producir células madres pluripotentes inducidas. Ahora bien, a la derecha hay un grupo completo de paneles que muestran que efectivamente reprogramamos estas células. Así que si miran bajo B y bajo FCB-IPS arriba a la izquierda, pueden ver qué aspecto tienen esas colonias y se puede mostrar que estas colonias ahora están expresando Oct4, NANOG y TRA-1-81 endogénicamente y después se ve que se tiñen para fosfatasa alcalina, que también es un marcador de una célula primitiva y luego mediante inmunofluorescencia también que expresan TRA-1-60 y SSEA4 y luego combinaciones, y que podemos tomar estas células que fueron generadas en cultivo y ponerlas en un lugar inmunocomprometido en ratón y hacer que se forme un teratoma y pueden ver una imagen del teratoma y después se pueden ver en los tres paneles a la derecha del teratoma que muestran que mediante histoquímica se pueden lograr células que son de epitelio secretor, fibras musculares y de epitelio intestinal, lo que demuestra que efectivamente se pudo reprogramar las células de sangre umbilical CD34-positivas a un estado similar al de una célula troncal embrionaria. Ahora siendo que esa fue la manera en que ocurrió completamente, resulta que no todas estas células están completamente reprogramadas.



## Diapositiva 24

Y este artículo que salió de mi laboratorio saldrá pronto publicado en *Stem Cells* donde mostramos que si se enlaza la regulación epigenética de NANOG, un factor de transcripción, mediante una combinación del complejo microARN 302 y MBD2, de hecho se pueden tomar estas células parcialmente reprogramadas e inducir las a un estado completamente reprogramado.

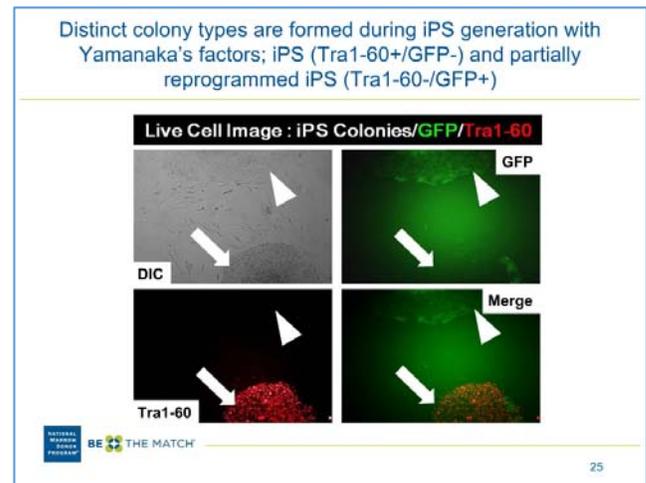
### Epigenetic Regulation of Nanog by MiR302 Cluster-mBD2 Completes Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming

Man Ryul Lee, Nutan Prasain, Hee-Don Chae, Young-June Kim, Charlie Mantel, Mervin C. Yoder, and Hal E. Broxmeyer

*Stem Cells*, 2013

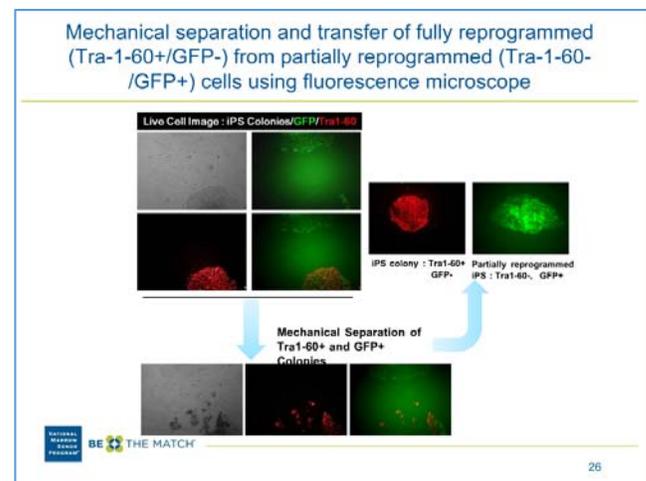
## Diapositiva 25

Así que tenemos un ejemplo de esto y de cómo se hace cuando se ponen los genes con estos distintos factores de transcripción exógenamente, estas células comienzan a reprogramarse a un estado anterior. Pero lo que se quiere es eventualmente poder perder los genes que se insertaron, lo que se puede saber porque esos genes también tienen un marcador, que es proteína fluorescente verde, y luego encontrar un tipo de colonia que exprese endógenamente en vez de exógenamente estos distintos factores de transcripción. Así que se pueden ver en el panel de arriba a la izquierda, y después en el panel de arriba a la derecha se puede ver donde está el triángulo. Hay una colonia que expresa la proteína fluorescente verde, lo que significa que todavía hay expresión del gen agregado exógenamente. Y en la parte inferior, la colonia que está junto a la flecha, no está expresando la proteína fluorescente verde, lo que significa que en esa colonia el gen exógeno ahora está inactivado. En la parte inferior a la izquierda, se puede ver el panel superior, que habíamos mostrado que todavía tenía la proteína fluorescente verde y todavía expresaba exógenamente el marcador verde no estaba completamente programado, pero el de la parte inferior sí, porque el de la parte inferior expresa TRA1-60, que es un marcador de una célula troncal embrionaria más reprogramada. Ese rojo no aparece en la parte superior donde en vez de la flecha, hay un triángulo. Y después abajo a la derecha, si las superponemos, se puede ver abajo que el estado similar a la una célula troncal embrionaria pluripotente inducida es bastante cercano a una reprogramación completa, y el de arriba no.



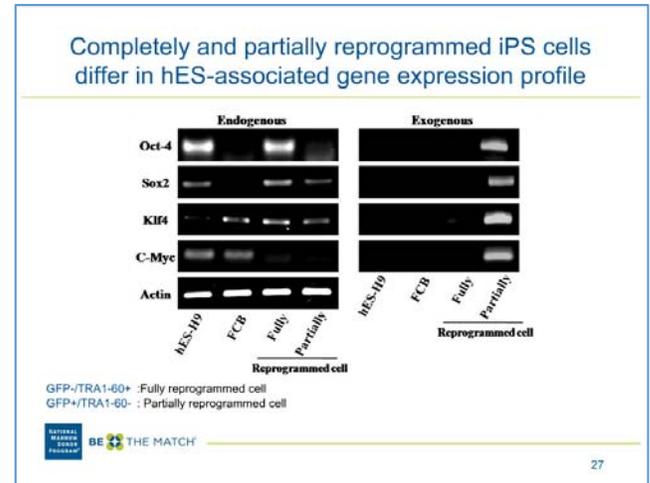
## Diapositiva 26

Es muy fácil separar mecánicamente ambas células mediante microscopio inmunofluorescente para poder sacar las células que están rojas, las colonias que están rojas y esas supuestamente serían las células completamente programadas y las de la derecha, en la parte de arriba, son las células parcialmente reprogramadas, y entonces se pueden separar mecánicamente.



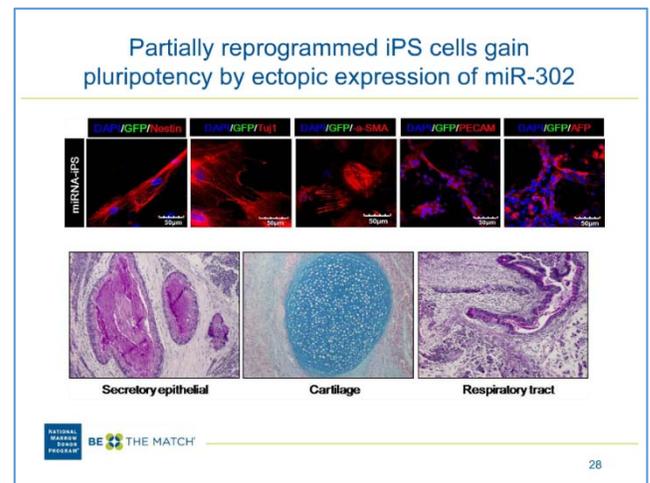
## Diapositiva 27

Entonces se pueden hacer perfiles de expresión génica del ARN mensajero para ver si esas células que creemos que están completamente programadas, porque como pueden ver bajo la expresión endógena del gen hay distintos factores de transcripción de células completamente programadas que expresan Oct4, Sox2, Klf4 y, en mucha menor medida, las células parcialmente programadas. Y si miramos la expresión de los genes exógenos, se puede ver a la derecha que los genes exógenos todavía son expresados pero las células completamente reprogramadas expresan poco o nada los genes agregados exógenamente. De modo que, efectivamente, hemos podido diferenciar esas células madres pluripotentes inducidas completamente reprogramadas de las parcialmente reprogramadas.



## Diapositiva 28

De hecho, como se muestra aquí, se pueden tomar esas células parcialmente reprogramadas y ponerles, mediante un vector lentiviral, el gen 302 microARN y hacer que se vuelvan completamente reprogramadas. Esto se muestra en los paneles superiores donde estas células entonces pueden programarse completamente y se puede hacer que se diferencien y pueden diferenciarse y generar células que expresan nestina, las células Tuj1 arriba a la izquierda, segundo panel, a células que expresan alfa-SMA, a células que expresan PECAM y a células que expresan AFP y no se ve ninguna expresión de la proteína fluorescente verde, lo que significa que estas células han sido completamente reprogramadas y entonces son capaces de diferenciarse y se pueden tomar esas células completamente reprogramadas y formar teratomas a partir de ellas y abajo se muestra que, mediante histología, se puede observar epitelio secretor, cartílago y células de conducto respiratorio.



## Diapositiva 29

¿Pero dónde encajan estas células madres embrionarias y todas estas células sobre las que se está investigando y hablando en relación con la medicina regenerativa y las células madres pluripotentes inducidas, en la realidad de la aplicabilidad terapéutica? Hace unos años escribí un artículo que se publicó en *Cell Stem Cell* bajo el título '¿Mejorarán las células madres pluripotentes inducidas la aplicabilidad terapéutica de las células y del almacenamiento de sangre de cordón umbilical?'. Y estos son los puntos que se trataron en ese artículo. Todavía hay muchas incógnitas con respecto al potencial realista de las células IPS así como de otras células que se están considerando para usar en medicina regenerativa. Ahora sabemos más que cuando se publicó este artículo pero todavía hay muchas incógnitas. El segundo punto es que todavía falta determinar el potencial clínico de seguridad de estas células y su progenie diferenciada además de, por ejemplo, si la sangre de cordón umbilical puede demostrar ser una fuente preferible de material inicial para la generación de células IPS y hay ciertos datos que indican que podría serlo porque son células más inmaduras y simplemente parece haber una mayor eficiencia para la generación de estas células IPS en la sangre de cordón umbilical que, digamos, de una célula más madura como un fibroblasto cutáneo. Y luego, el tercero es que la generación de células madres hematopoyéticas, de las cuales las que más me interesan son las IPS, independientemente de la población en estudio, podrían no ser lo suficientemente eficientes para justificar una generación a partir de células IPS para utilidad clínica. Y también está la posibilidad de que las células IPS nunca estén listas para un uso estelar en la clínica. Como soy optimista, quisiera creer que esto sucederá en el futuro, pero no creo que estemos en esa etapa o siquiera cerca de la etapa de usar estas células en medicina regenerativa auténtica, si bien sin duda espero que esto sea una posibilidad en el futuro.

### Forum

---

**Will iPS Cells Enhance Therapeutic Applicability of Cord Blood Cells and Banking**  
**Hal E. Broxmeyer, PhD**  
*Cell Stem Cell 6:21-24, 2010*

- Many unknowns remain regarding the realistic potential of iPS and other cell types for regenerative medicine.
- The clinical potential and safety of these cells and their differentiated offspring have yet to be determined let alone whether CB may turn out to be a preferable source of starting material for iPS cell generation.
- Generation of hematopoietic stem cells from iPS cell regardless of the starting cell population, may not be efficient enough to warrant their generation from iPS cells for clinical utility.

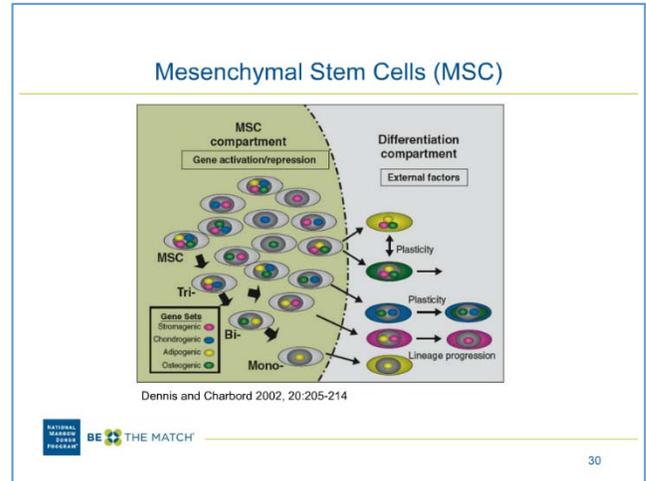
\* It is possible that iPS cells may never be ready for "prime-time" clinical use.



29

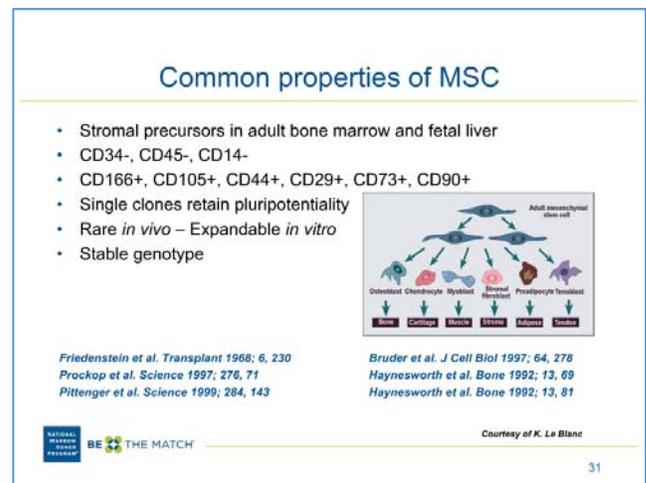
### Diapositiva 30

Y ahora, pasando al tema de una célula troncal más histoespecífica, tenemos una población de células madres llamadas células madres mesenquimatosas. Algunas personas no las llaman células madres. Las llaman células estromales así que las pueden llamar células madres mesenquimatosas/estromales. Y estas células, que se podrían aislar de la médula ósea y otras fuentes tisulares, tienen la capacidad de producir más de ellas mismas pero también pueden generar distintos linajes como condrocitos, adipocitos, células osteógenas y otras células estromales.



### Diapositiva 31

Estas células mesenquimatosas poseen ciertas características. Como he dicho, se pueden encontrar en médula ósea adulta, en hígado fetal, en sangre de cordón umbilical o en epitelio umbilical y pueden distinguirse de otros tipos de células por los componentes de la superficie celular y sus niveles de expresión. Así, por ejemplo, las células hematopoyéticas primitivas expresan el marcador CD34; estas células son CD34-negativas; o las células sanguíneas expresan el antígeno leucocitario común, CD45, y estas células no expresan CD45 ni tampoco expresan otro marcador hematopoyético, CD14. Sí expresan CD166, 105, 44, 29, 73 y 90. Se pueden expandir a partir de una sola célula in vivo. Es muy raro encontrarlas in vivo, pero se espera que su aislamiento y su expansibilidad se pueda usar en medicina regenerativa y, de hecho, ya hay gente trabajando en eso. Lo más importante es que, cuando se expanden estas células, como con otras células, es importante saber si tenemos una expresión estable del genotipo y que no estemos teniendo una expresión maligna del genotipo. Y esto se torna sumamente importante, especialmente si se quiere usar alguna como estas células después del tratamiento ex vivo para una utilización clínica real.



### Diapositiva 32

De modo que uno puede tomar estas células y luego pasarlas a otra placa como se ve en el panel de la derecha. De hecho, algunas de estas células se encuentran en ensayos clínicos en este momento, especialmente células generadas a partir de células de médula ósea.

### Ex vivo expansion and harvest of MSC for research and clinical use

- CD34-, CD45-, CD14-
- CD166+, CD105+, CD73+, D90+
- Negative bacterial cultures + mycoplasma
- Pluripotential in vitro

**Bone Marrow Cells**

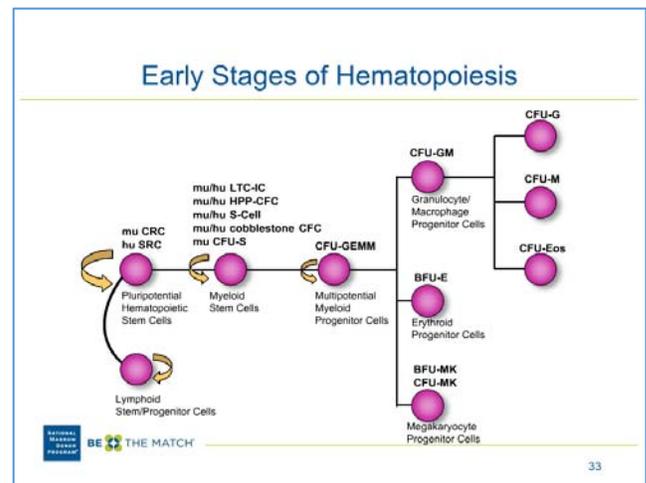
BE THE MATCH

Courtesy of K. Le Blanc

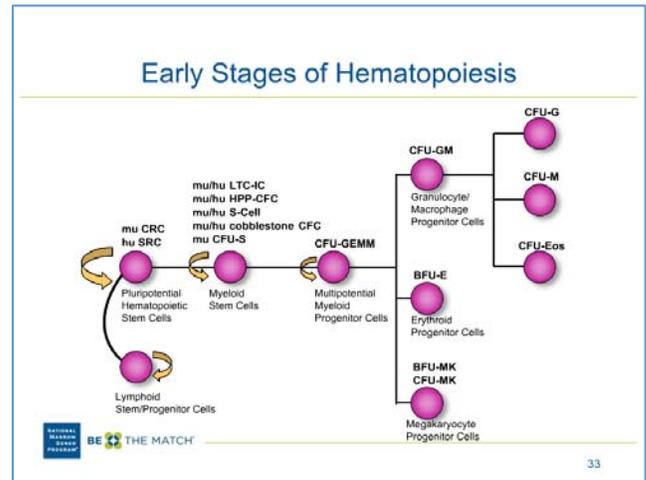
32

### Diapositiva 33

Así que ahora quisiera concentrarme en la hematopoyesis y darles una idea de las distintas caracterizaciones de las células madres y progenitoras hematopoyéticas y también de los diferentes ensayos usados para detectarlas y qué se puede hacer con estos ensayos que pueda llevarlos a la utilidad clínica. Hay tres fuentes diferentes de células madres hematopoyéticas que se han usado por su eficacia clínica: Médula ósea, y E. Donnall Thomas, que falleció recientemente, ganó el Premio Nobel a comienzos de la década de 1990 por su trabajo en el trasplante de médula ósea, y no se necesitan todas las células que están en la médula ósea, sino que las células madres hematopoyéticas y posiblemente las células progenitoras son las más importantes. Así que quizá más del 99% de las células de la médula ósea realmente no son células madres y, por lo tanto, no sirven para la repoblación. Así que no son las células de médula ósea en sí las que son necesarias para el trasplante, sino las células madres hematopoyéticas en esa médula ósea. Estas células también se encuentran en la sangre, pero están presentes con una frecuencia muy baja y entonces hay que usar distintos medios movilizados para extraer estas células de la médula ósea hacia la sangre, desde donde pueden entonces extraerse por aféresis y luego usarse para el trasplante autólogo o alogénico de células madres. Y la tercera población proviene de la sangre de cordón umbilical y llegaremos a eso hacia el final de esta presentación. Así que si miramos la jerarquía de las primeras etapas de la hematopoyesis, comenzamos con las células madres hematopoyéticas pluripotentes. Esto se puede analizar en el ratón y veremos esto dentro de poco. También se puede analizar en las células humanas pero, para hacerlo, hay que usar un ensayo de ratón. Así que se puede usar el análisis de repoblación celular competitiva murina, de ratón, o MU. En humanos, se puede usar el análisis de repoblación celular competitiva SCID humano, o HU. También hay ensayos para las madres o progenitoras linfoides, pero no están tan bien definidos como la serie más mieloide, incluidos los grupos granulocitos, macrófagos, eritroides y plaquetas. Así que tenemos células madres mieloides destinadas al ensayo que se pueden analizar mediante varios ensayos in vitro distintos. Las células humanas y murinas se pueden estudiar a través de lo que se llama un ensayo de célula iniciadora de cultivo a largo plazo, el ensayo LTC-IC. Pueden ver formaciones de colonias por las células que dan origen a colonias muy, muy grandes. Las llamamos células formadoras de colonias potenciales altamente proliferativas. También hay otro tipo celular, la célula S, que inicialmente se

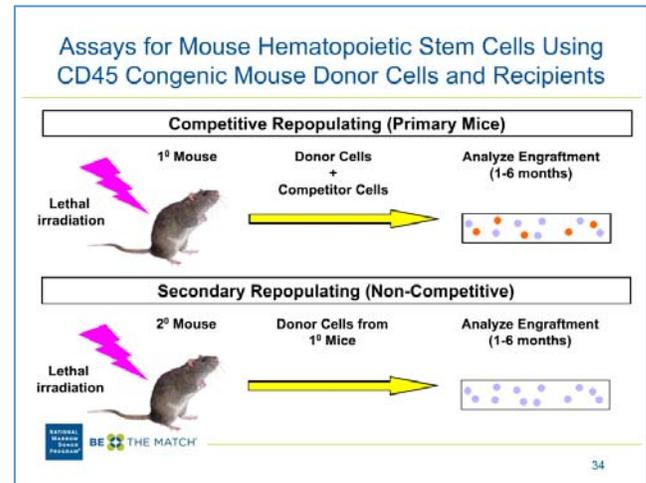


creyó que identificaba una célula troncal pluripotente muy primitiva, si bien eso no está claro ahora. Y luego hay otros ensayos que se pueden usar, pero no está claro y ni siquiera probado que alguno de estos ensayos de verdad detecte una célula troncal hematopoyética autorrenovadora que pueda poblar la médula a largo plazo, y se pueden usar ensayos de colonias para obtener una célula progenitora multipotencial y definimos esto como una unidad formadora de colonias o CFU-GEMM, y es una célula que da origen a una colonia que contiene granulocitos, células eritroides, macrófagos y también, a veces, megacariocitos. Y estas células se pueden entonces diferenciar en otras poblaciones celulares que son más maduras pero que continúan siendo células progenitoras, lo que significa que pueden dar origen a otras poblaciones celulares de una manera más restringida y que tienen una capacidad limitada o nula de autorrenovarse, y esa es la unidad formadora de colonias de granulocitos/macrófagos, la unidad formadora de brotes eritroides y la unidad formadora de brotes o unidad formadora de colonias de megacariocitos; en la parte superior las progenitoras de granulocitos/megacariocitos; en el medio, las células progenitoras eritroides, y abajo, las células progenitoras de megacariocitos. Y también hay ensayos que permiten determinar la célula progenitora de granulocitos, esto es a la derecha, CFU-G; la célula progenitora de macrófagos, CFU-M; y también hay un ensayo para una célula progenitora de eosinófilos.



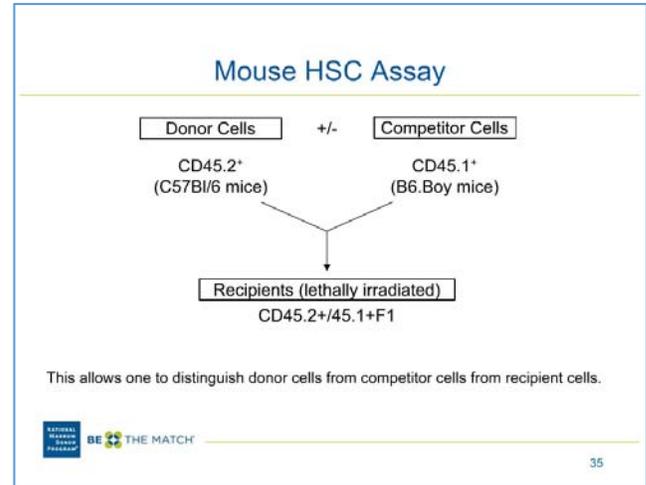
### Diapositiva 34

Si se quiere probar que de hecho tenemos una célula troncal hematopoyética de ratón y determinar los efectos de distintos procedimientos en esa célula, ya sea para expandirla ex vivo o para probar su capacidad de responder al estrés, tenemos un ensayo funcional que requiere introducir las células donadas de médula ósea de un ratón en un ratón primario irradiado letalmente. Esencialmente, lo que se hace es tratar de ver si después de la irradiación letal en la que se matan prácticamente todas las células madres hematopoyéticas que harían que ese animal muera, se pueden introducir esas células de médula ósea, o de donde sea que se obtengan las células del ratón, y si tenemos suficientes de esas células del tipo correcto, podremos salvar la vida del animal irradiado letalmente. Ahora, se pueden introducir las células donadas solas, o se pueden poner las células donadas con células competidoras y entonces tendremos un ensayo de repoblación competitiva y eso lo explicaré en más detalle más adelante. Pero entonces se puede estudiar el análisis con los tiempos después de que prende para la repoblación del ratón irradiado con las células de médula ósea de los animales donantes y entonces se dejan estar de uno a seis meses o más. Pero se pueden tomar las células del animal trasplantado primario y ponerlas en un animal de repoblación secundario. En este caso, ahora tenemos un ratón secundario, irradiado letalmente, y se introducen las células de médula ósea provenientes del ratón sobreviviente que había sido repoblado con las células donadas y entonces se estudia cómo prenden a corto y a largo plazo.



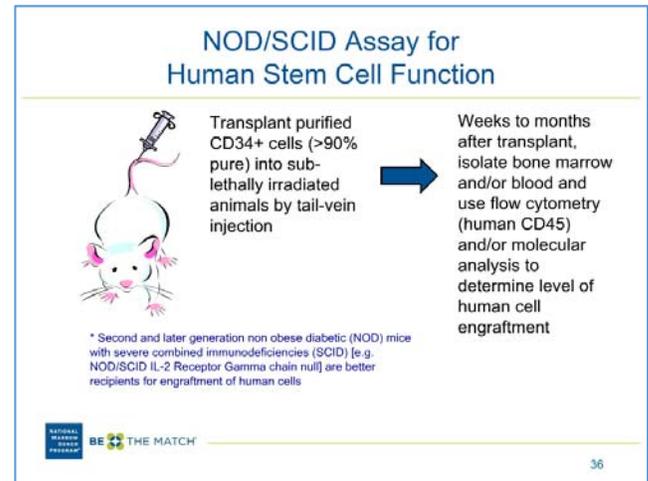
### Diapositiva 35

¿Así que cómo se diferencian las células donadas introducidas de las células del receptor de las células competidoras? Esto se hace mediante un ensayo congénico en el que tenemos ratones que tienen un cierto tipo del antígeno leucocitario común, CD45, y con anticuerpos específicos se puede distinguir si este animal tiene células que expresan en su superficie CD45.2, que se encuentra en los ratones C57Bl/6. Se pueden usar células competidoras, por ejemplo, CD45.1-positivas, como las que se obtienen de ratones B6. Boy J y entonces se pueden tomar otros ratones que son híbridos de F1 y que expresan tanto CD45.2 como CD45.1. Usando el anticuerpo específico para 45.1 y 45.2, podemos distinguir si, por ejemplo, la repoblación que estamos viendo proviene de las células donadas arriba a la izquierda, de las células competidoras arriba a la derecha, y entonces después vemos si tenemos células corporales de repoblación endógena provenientes de los receptores irradiados letalmente, y esto a veces sucede y este es el tipo de ensayo que se usa para determinar la capacidad y entonces introducirlas en animales secundarios. ¿Hay una célula troncal hematopoyética disfuncional? ¿Puede esta célula autorrenovarse? Y la autorrenovación se determina por la capacidad de repoblar animales secundarios irradiados.



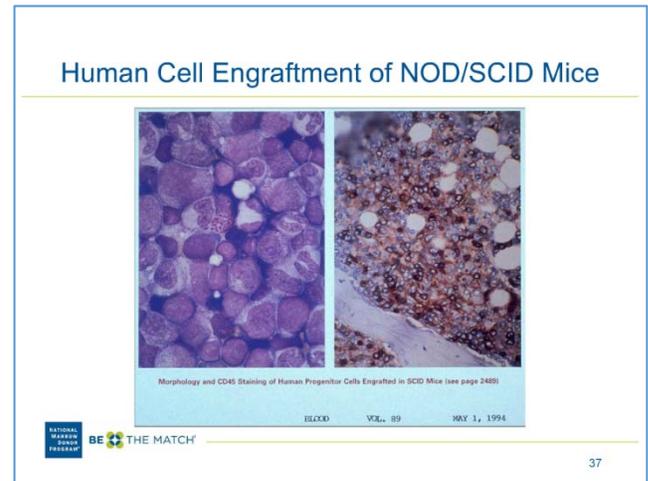
## Diapositiva 36

La situación en humanos es un poco diferente y más difícil porque se pueden usar muchos ratones como receptores de células murinas, pero no vamos a armar un ensayo con células humanas que se inyectan en seres humanos irradiados letalmente. Y entonces hay ensayos que nos permiten detectar lo que creemos que es una célula troncal hematopoyética humana y esto lo hacemos tomando células humanas, por ejemplo células CD34-positivas aisladas de médula ósea o sangre umbilical humanas, inyectándolas en un animal que tiene una inmunodeficiencia. Por ejemplo, del genotipo NOD/SCID, que significa genotipo no obeso diabético y también inmunodeficiencia combinada grave. Y entonces ponemos estas células en estos animales y un tiempo después analizamos para detectar células humanas buscando CD45 humano en vez de CD45 murino porque hay anticuerpos que distinguen el CD45 humano del CD45 murino. Y ahora tenemos varios animales NOD/SCID de segunda generación y ulteriores que aceptan mejor las células humanas y estamos aprendiendo una tremenda cantidad de información sobre la modulación y la presencia de células humanas que tienen la capacidad repobladora de SCID o la capacidad repobladora de las células madres. Y uno de estos de siguiente generación son los ratones NOD/SCID genosuprimidos para la cadena gamma del receptor de IL-2 o de genotipo nulo. Y, como dije, estos parecen ser mejores receptores para que prendan las células humanas.



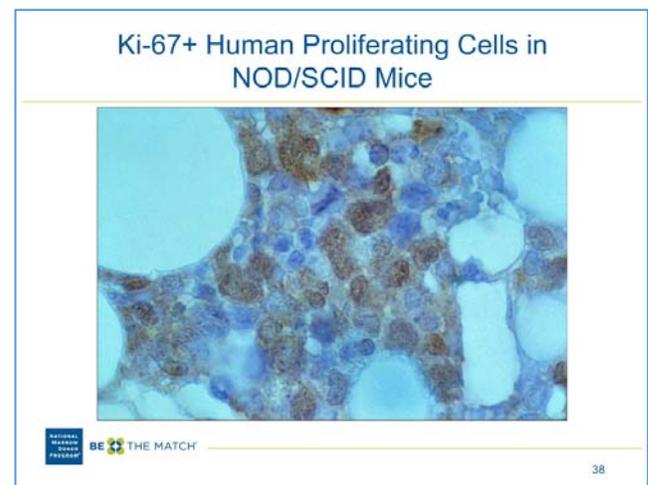
### Diapositiva 37

Aquí vemos imágenes de un animal NOD/SCID, de primera generación, que ha sido repoblado por células humanas morfológicamente identificables en el ratón, y a la derecha, mediante inmunohistoquímica que detecta células CD45-positivas humanas en la médula de estos ratones. Las células humanas no pueden salvar la vida del animal irradiado letalmente, que es uno de los criterios clave para definir una célula troncal hematopoyética de ratón. Así que, de hecho, si bien se da una dosis letal de radiación a los ratones para hacer un trasplante de médula ósea murina en ratones irradiados letalmente, hay que dar una dosis subletal de irradiación a estos animales NOD/SCID o NOD/SCID de segunda generación, por ejemplo 300 rads, en vez de 1000 rads de radiación. Debido a que las células humanas no salvarán la vida del animal NOD/SCID irradiado letalmente, hay que asegurarse de que ese animal NOD/SCID sobrevivirá, pero todavía tendrá el medio que nutre las células humanas para que puedan prosperar, reproducirse y diferenciarse en distintos tipos de células sanguíneas maduras.



### Diapositiva 38

Aquí se ve que en el ratón se pueden detectar células humanas que están proliferando usando Ki67 como marcador de células humanas que están proliferando en el medio de un animal NOD/SCID que fue irradiado subletalmente. Así que esos son ensayos para las células madres hematopoyéticas humanas y de ratón; hay ensayos de colonias para las células progenitoras hematopoyéticas que son las siguientes en la línea de las células madres y una forma más madura.



### Diapositiva 39

Así que he listado algunas características que se pueden examinar. Por ejemplo, en el punto de arriba dice que si se estimulan células de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica movilizada, en un ensayo de colonias in vitro con una combinación de factores de crecimiento, se obtiene un subgrupo más inmaduro de esa célula progenitora y la colonia es más grande. Y esas colonias derivan de una célula que es más inmadura que las colonias que se obtienen estimulándolas solo con una única citocina. Así que, por ejemplo, si estimulamos una colonia con factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos, o GM-CSF, que es la abreviatura, obtenemos colonias que contienen granulocitos y macrófagos. Si solo agregamos eritropoyetina, obtenemos colonias de células eritroides, pero son más pequeñas. Pero si agregamos a esas citocinas únicas una combinación de otras citocinas, incluidas las muy potentes citocinas coestimuladoras, como factor de célula troncal o ligando de Flt3, obtenemos colonias más grandes que vienen de un subgrupo anterior. Así que podemos definir un subgrupo inmaduro de uno maduro solo por las citocinas que agregamos. También se pueden obtener estas colonias y se forman y las sacamos como una colonia individual, hacemos una subsuspensión en una sola capa, las ponemos en una placa secundaria y estudiamos la capacidad de esas colonias individuales de poder pasarse a otra placa, lo que también nos da un cálculo estimativo muy aproximado, si bien de manera limitada, de la capacidad potencial de autorrenovación de las células que forman las progenitoras o las células formadoras de colonias que dan origen a la colonia.

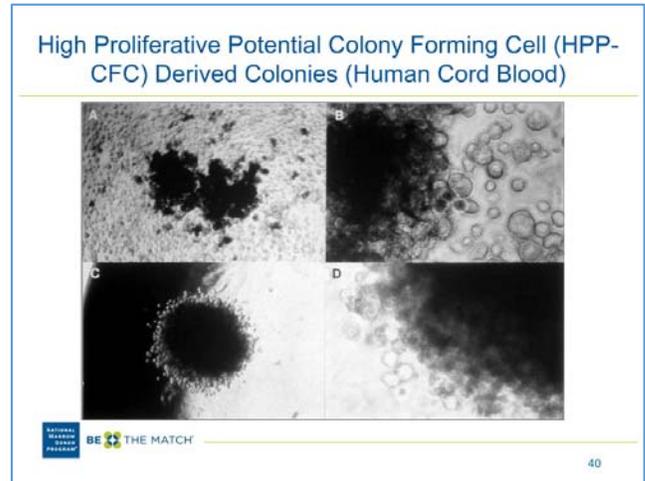
### Assays used to assess functional HPC

#### Colony Assays for

- Immature subsets of HPC (HPP-CFC, CFU-GM, BFU-E, CFU-GEMM, CFU/BFU-Megakaryocyte (Meg)) responsive to stimulation in vitro by combinations of growth factors
- Mature subsets of HPC (CFU-GM, CFU-G, CFU-M, BFU-E) responsiveness to stimulation by single cytokines
- Self renewal of immature subsets of HPC. Replating of single colonies derived from immature subsets of CFU-GEMM and CFU-GM/M into secondary dishes with resultant secondary colonies allows one to determine the number of secondary plates with at least one colony, and the number of secondary colonies per replated single colony. This assay has been used to estimate the limited self-renewal capacity of HPC.

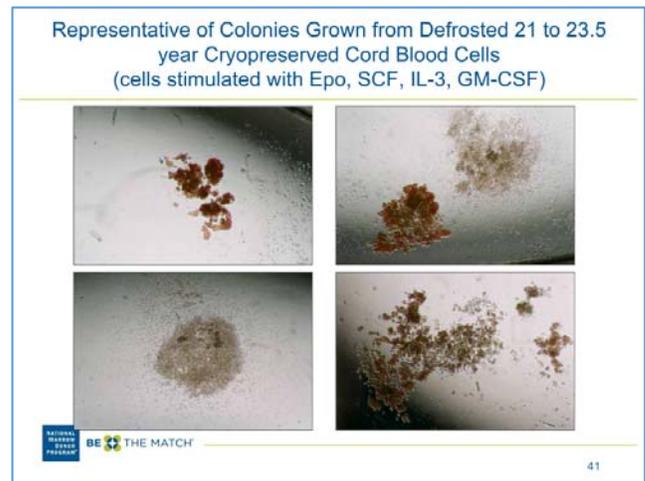
### Diapositiva 40

Así que estos son ejemplos del aspecto que tienen las colonias. Este caso en particular muestra una única célula que se colocó en una placa en un medio con múltiples citocinas. Esta célula provino de sangre de cordón umbilical. Fue aislada en una población que tenía expresión muy alta de CD34 determinado por el antígeno y pueden ver las colonias muy grandes que formó que contenían decenas o centenas de miles de células tras 14 a 21 días en cultivo. Los cuatro paneles básicamente muestran cuatro aumentos distintos de estas colonias sumamente grandes.



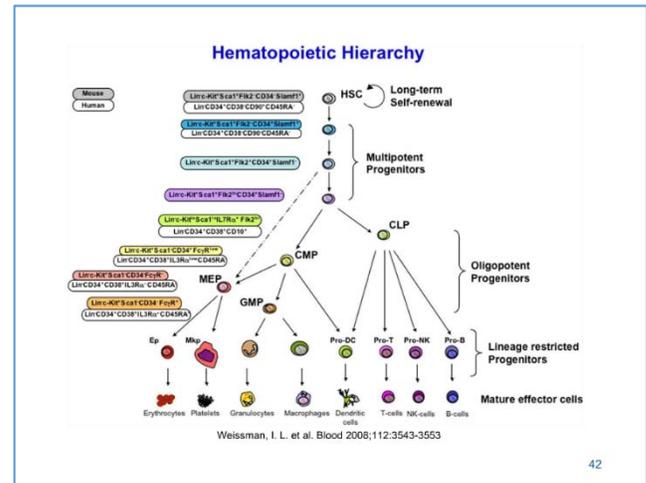
### Diapositiva 41

Aquí vemos colonias provenientes de células no separadas de sangre de cordón umbilical que habían estado congeladas durante 21 a 23 años y  $\frac{1}{2}$  en estado criopreservado, y las células se descongelaron, lavaron y colocaron en placas en una combinación de varios factores de crecimiento. Arriba a la izquierda pueden ver una colonia que contiene células eritroides y también granulocitos/macrófagos, a veces megacariocitos. Esa colonia debe haber provenido de una progenitora multipotencial, o CFU-GAEM o GEMM. En el panel de arriba a la derecha vemos, abajo a la izquierda, una colonia multipotencial y, arriba a la derecha, una colonia de granulocitos/macrófagos. El panel de abajo a la izquierda muestra un tipo de colonia de granulocitos/macrófagos muy proliferativa y, abajo a la derecha, se ve una colonia multipotencial muy grande generada a partir de una progenitora multipotencial o CFU-GEMM.



## Diapositiva 42

Y esos son los ensayos funcionales. Es muy importante entender que no solo se pueden detectar estas células por su funcionalidad, sino que también se pueden detectar por el fenotipo que tienen, por la expresión de diferentes proteínas en la superficie celular, lo que nos permite aislar las células. Esta es una expresión fenotípica de las células madres hematopoyéticas a progenitoras multipotentes a progenitoras linfoides comunes, progenitoras mieloides comunes y después a células, las MEP, progenitoras mieloides y linfoides, GMP, progenitoras granulocíticas/macrofágicas, y las diferentes células que forman. A la izquierda de estas células se muestra el fenotipo de estas células, según lo que se sabía en 2008, en un artículo de revisión que se publicó en *Blood*. Con cada célula, tenemos el de arriba, que es el fenotipo de la célula murina, y el de abajo que es el fenotipo de la célula humana. Nuevamente, esto es lo que sabíamos de estas células aproximadamente en 2008 y gran parte de ello todavía se considera cierto, aunque ha habido algunas modificaciones que han contribuido a definir mejor los distintos tipos de células. Es sumamente importante entender que un fenotipo es un buen marcador pero el fenotipo no siempre recapitula la función, especialmente bajo condiciones de estrés y cuando las células se sacan del cuerpo y se cultivan *ex vivo*. Así que cuando buscamos un fenotipo, es realmente importante entender que hay que comprobar que la célula que dijimos que es una célula troncal hematopoyética o una progenitora mielóide común o una progenitora linfóide común, que realmente sea esa célula. Porque incluso cuando se aíslan células con estos fenotipos, no siempre nos dan los resultados funcionales que creemos que deberíamos obtener.



### Diapositiva 43

Un artículo de continuación que se publicó en *Cell Stem Cell* utilizó otras caracterizaciones fenotípicas para identificar una célula troncal repobladora a largo plazo o LT, la llamada LTR-SC, que vemos arriba, luego definieron una célula que llamaron célula troncal repobladora a plazo intermedio o IT, que solo prende en animales irradiados letalmente durante 6 a 8 meses, en comparación con la célula a largo plazo que puede repoblar animales irradiados durante más de un año, y luego las células que tenían el fenotipo de una célula repobladora a corto plazo. Así que se pueden obtener estas células de animales irradiados letalmente un mes después del trasplante o menos, pero no mucho después de eso. De modo que entonces tenemos los fenotipos de estas células y nuevamente la única prueba que tenemos es si efectivamente podemos demostrar que ese fenotipo nos da ese tipo de célula, especialmente cuando las células han sido manipuladas y/o cultivadas por mucho tiempo.

Separation of Long-Term (LT-RSC), Intermediate-Term (IT-RSC), and Short-Term (ST-RSC) repopulating Mouse Hematopoietic Stem Cells\*

**LT-RSC (allow multilineage stable engraftment of irradiated mice for more than a year)**  
CD34<sup>lo/neg</sup>, SKL, Flt3/Flk2<sup>-</sup>, Rhodamine123(Rho)<sup>lo</sup>, CD150<sup>+</sup>, CD49b( $\alpha$ -integrin)<sup>lo</sup>

**IT-RSC (Engrafts mice from 6-8 months)**  
CD34<sup>lo/neg</sup>, SKL, Flt3/Flk2<sup>-</sup>, Rho<sup>lo</sup>, CD150<sup>-</sup>, CD49b<sup>hi</sup>

**ST-RSC (Engrafts about 1 month or less)**  
CD34<sup>hi</sup>, Flt3/Flk2<sup>+</sup>, Rho<sup>hi</sup>

\* Benveniste et al *Cell Stem Cell* 6:48-58, 2010 (and references cited within)

BE THE MATCH

43

### Diapositiva 44

Más recientemente, se publicó un artículo en 2011 en *Science* que mostró que se puede tomar una única célula de sangre de cordón umbilical humano de un fenotipo definido, un poco más definido que en los dos artículos que acabamos de ver en las diapositivas anteriores, y que una única célula entonces puede mostrar prendimiento en un animal NOD/SCID. En este momento, esta es probablemente la mejor definición de una célula troncal hematopoyética humana pero nuevamente, solo porque esto funciona bajo una situación normal no significa que ese fenotipo necesariamente se va a mantener bajo condiciones de estrés o manipulación, o incluso la condición de una célula que podría tener un fenotipo maligno, como una célula troncal cancerosa o una célula iniciadora de cáncer.

Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment

Faiyaz Notta, Sergei Doulatov, Elisa Laurenti, Armando Poepl, Igor Jurisica, John E. Dick

*Science* 333:218-221, 2011

BE THE MATCH

44

## Diapositiva 45

¿Entonces dónde encaja todo esto y qué pasa en realidad? De hecho, originalmente usamos algunos de estos ensayos para mostrar que, efectivamente, la sangre de cordón umbilical contiene células que creíamos que serían trasplantables y de hecho el primer artículo basado en un estudio de laboratorio que llevó al primer trasplante clínico se publicó en *Proceedings of the National Academy of Science* donde mostramos que creíamos que había células madres y progenitoras hematopoyéticas trasplantables en una sola unidad de sangre de cordón umbilical. Y nos basamos en los elevados números y alta calidad de las células progenitoras, en comparación con las que había en la médula ósea, y que podíamos criopreservarlas y obtener una recuperación muy eficiente, como mencioné anteriormente, hemos tenido células en el congelador durante más de 23 años y ½ y, sin embargo, podemos sacarlas y usarlas. Podemos entonces mostrar una recuperación muy eficiente de estas células progenitoras y mostrar que estas células se pueden activar en un animal NOD/SCID irradiado subletalmente de segunda generación, pero eso sucedió después porque obviamente esos ensayos no existían en 1984-1988 cuando se hizo gran parte de este trabajo. Pero fue este trabajo el que llevó al primer trasplante realizado por Eliane Gluckman en el Hôpital Saint-Louis en París, donde demostró con nuestra ayuda que se podía usar la sangre del cordón umbilical de un hermano HLA compatible para trasplantarla y salvarle la vida a un niño de 6 años con anemia de Fanconi.

Y ese trasplante, que se realizó en octubre de 1988, tuvo éxito y el receptor del trasplante todavía sigue vivo y bien, y está curado de todas las manifestaciones hematológicas de la anemia de Fanconi. Es interesante que cuando publicamos nuestro artículo por primera vez en *Proceedings of the National Academy of Science*, hubo una serie de editoriales, y uno de ellos, que fue publicado en *Nature*, sugirió que estábamos locos, que iba a ser un “Desastre destinado al fracaso”, y de hecho todos sabemos que va a haber algo de autocontaminación interna y que vamos a terminar causando una enfermedad del injerto contra el huésped masiva, el fracaso del injerto y, como mínimo, un regreso de las células leucémicas si hacíamos esto. Y el asunto es que ya habíamos hecho el estudio en la clínica y sabíamos que funcionaba y, como les mostraré enseguida, ha funcionado bastante bien, y luego al poco tiempo después del artículo “Desastre destinado al fracaso” salió otro que decía que había funcionado y cuyo título fue “De la basura al oro”. Una serie de eventos interesantes.

### Background

The field of cord blood transplantation has come a long way since the first cord blood transplant.

- HLA-matched sibling cord blood transplant for 6 year old with Fanconi Anemia (Gluckman, Broxmeyer, et. al. *N. Eng. J. Med.*, 1989)
- This first cord blood transplant was based on a laboratory study:
  - Transplantable hematopoietic stem and progenitor cells in single collections of cord blood.
  - High numbers and quality of progenitor cells
  - Cryopreservation with high efficiency recovery of progenitors
  - Transportation by over-night mail (Broxmeyer, et. al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989)
- Editorials, etc. by others.
  - “Disaster-Doom and Gloom”
    - Massive GVHD; Graft Failure; Leukemic Relapse
  - “From Garbage to Gold”
    - It works!!

 BE  THE MATCH

45

## Diapositiva 46

De modo que, en la actualidad, se han realizado más de 30,000 trasplantes de sangre de cordón umbilical para prácticamente todas las enfermedades, tanto cancerosas como no cancerosas, que se han tratado con trasplante de médula ósea. Y tiene sus pros y sus contras. Pero antes de hablar de eso, déjenme decirles que el primer trasplante de sangre de cordón umbilical en leucemia fue realizado por John Wagner cuando estaba en Baltimore Johns-Hopkins. Entonces hizo un informe de registro que incluyó su propio trabajo y el trabajo de otros donde se mostraban las características del trasplante de célula de cordón umbilical de hermano HLA-compatible. El primer trasplante de sangre de cordón umbilical de un hermano parcialmente HLA-compatible fue realizado por Joanne Kurtzberg en Duke University usando células del banco de sangre de cordón umbilical del New York Blood Center, dirigido por Pablo Rubinstein, y algunos de los primeros trasplantes de sangre de cordón umbilical de donante no emparentado fueron realizados por Joanne Kurtzberg también usando células que provenían del banco de sangre de cordón umbilical del New York Blood Center. La mayoría de los estudios originales se hicieron en niños debido al número limitado de células que se obtienen de un espécimen de sangre de cordón umbilical en comparación con toda la médula ósea que se puede aspirar de una persona. Está claro ahora que los trasplantes de sangre de cordón umbilical se pueden hacer en adultos y este trabajo ha sido realizado por varias personas, entre ellas Eliane Gluckman, Joanne Kurtzberg, Mary Laughlin, Vanderson Rocha y John Wagner, y eso nos lleva prácticamente a la situación actual.

### Background (con't)

#### Other Early Cord Blood Transplants

- HLA-matched sibling cord blood transplant for leukemia.  
*(Wagner, et. al. Blood)*
- HLA-matched sibling cord blood transplants  
*(Wagner, et. al. Lancet)*
- Partial HLA-matched sibling cord blood transplants  
*(Kurtzberg, et. al.)*
- Unrelated cord blood transplants – matched and partially matched  
*(Kurtzberg, et. al.)*
- Cord blood transplants in adults  
*(Gluckman, Kurtzberg, Laughlin, Rocha, Wagner, etc.)*

↓

Present Situation



46

## Diapositiva 47

Como les he dicho se han realizado más de 30,000 trasplantes de sangre de cordón umbilical para tratar una gran variedad de enfermedades, tanto cancerosas como no cancerosas, con células madres hematopoyéticas. Las ventajas de la sangre de cordón umbilical es que se puede obtener la sangre del cordón, se puede criopreservar y luego, cuando uno la necesita, ahí está. Porque a veces una persona no puede esperar para un trasplante. Sabemos ahora que estas células también causan menos enfermedad del injerto contra el huésped que las células de médula ósea, lo que significa que con la sangre de cordón puede usarse una menor compatibilidad HLA que con la médula ósea de un adulto en casos limitados, de modo que si bien un trasplante de médula ósea de donante no emparentado tiene que ser completamente compatible o cuando menos no tener más de un antígeno HLA no coincidente, con la sangre de cordón umbilical aparentemente puede haber al menos uno o dos antígenos HLA no coincidentes y a veces tres. No es que no ocurra la enfermedad del injerto contra el huésped, sino que hay un poco de enfermedad del injerto contra el huésped dependiendo del grado de la incompatibilidad. Las desventajas son que, en realidad, no se obtiene mucha sangre de cordón umbilical. Al recoger la sangre del cordón umbilical al nacer un bebé quizá se obtengan entre 50 ml y hasta un poco más de 200, pero igual es mucho menos de que lo que se obtiene con la médula ósea, que es la razón por la cual para adultos, si bien está claro que sí se puede lograr el prendimiento con una sola unidad de sangre de cordón, siempre y cuando se tenga un número suficiente de células, quienes hacen trasplante han pasado a utilizar dos unidades.

Esto en realidad probablemente no podría haberse hecho con médula ósea pero, debido a la menor enfermedad del injerto contra el huésped y la menor reactividad de las células inmunitarias de la sangre de cordón umbilical, probablemente debido a su estado virginal, de hecho se pueden mezclar dos sangres de cordón y administrarlas a un receptor y sí funciona. No es algo perfecto, pero funciona. Y, de hecho, ahora mismo, hay gente viendo maneras de manipular las células de sangre de cordón para expandirlas *ex vivo* algo que no había funcionado muy bien con células humanas de sangre de cordón o cualquier tipo de células madres hematopoyéticas humanas, o de tratar las células para mejorar su capacidad de prender o de tratar al receptor para que presente un entorno más nutritivo para que las células del donante prendan. Algunos ejemplos podrían ser pretratar las células con prostaglandina E o pretratar las células con un inhibidor de una enzima, que es CD26, que se expresa en la superficie celular, y la CD26 es una enzima que se llama dipeptidil peptidasa-4. Así que somos optimistas y creemos que, en el futuro, vamos a poder usar una o más de estas manipulaciones, quizá para volver al trasplante de una sola unidad de sangre de cordón umbilical como dosis, pero eso va a requerir trabajo y va a requerir información más detallada sobre las células madres y qué es lo que las hace proliferar.

**There have now been over 30,000 cord blood transplants done to treat a wide variety of malignant and non-malignant disorders with hematopoietic stem cells**

Rocha and Broxmeyer. 2009  
New Approaches for Improving Engraftment After Cord Blood Transplantation.

*Blood and Bone Marrow Transplantation 16: S126-S132*

Broxmeyer, Farag and Rocha. 2013  
Cord Blood Transplantation, in Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation.

## Diapositiva 48

En ese contexto, les muestro esta última diapositiva, que es que hay una cantidad de células y tipos de células dentro de la médula ósea que consideramos que son el micromedio que quizá ayuda a nutrir la proliferación, autorrenovación, diferenciación y supervivencia de las células madres hematopoyéticas y las células progenitoras hematopoyéticas. Y esta es una imagen que salió en un artículo de 2006. Ahora sabemos mucho más, pero en última instancia lo que tenemos que hacer es entender cómo las células del micromedio, por ejemplo los osteoblastos o las células endoteliales y mesenquimatosas, y las distintas proteínas que producen, influyen en la capacidad funcional de las células madres hematopoyéticas. Una vez que sepamos esto, deberíamos poder —usando los distintos ensayos que les he mostrado para las células madres y progenitoras hematopoyéticas— comenzar a manipular y modular las células madres para lograr un mejor prendimiento y una mejor supervivencia. Espero que esta información les sea de ayuda y que los haga interesarse en la hematopoyesis, las células madres hematopoyéticas y las tremendas cosas nuevas que están ocurriendo, considerando lo que ya hemos aprendido en tan poco tiempo, recordando que el primer trasplante de médula ósea no ocurrió sino hasta finales de la década del '50, que no fue muy útil hasta que otros a fines de la década del '60 y del '70 comenzaron a trabajar con la compatibilidad HLA y a entender mejor cómo controlar la enfermedad del injerto contra el huésped y luego a la sangre periférica movilizada y la sangre de cordón umbilical. Así que obviamente hemos avanzado mucho pero hay mucho que aprender para poder hacer que la utilidad clínica de estas células sea más eficaz e incluso más terapéutica, en el contexto de lo que ellas mismas pueden hacer y quizá con otras células, lo que estas y otras células podrían hacer, si aprendemos a estimular su diferenciación en las células que necesitamos para, por ejemplo, la medicina de transfusión y la medicina regenerativa.

Gracias.

