

Revisión sobre Células Madre

Mario Margolles Martins

Informe 2: Aplicaciones prácticas

Versión, 15.10.2004

CELULAS MADRE HEMATOPOIETICAS

Las células sanguíneas tienen la responsabilidad de mantener constantemente la protección inmune de cada tipo de células del nuestro cuerpo. Esto requiere que este tipo de células junto con las de la piel tengan los mayores poderes de autorenovación de todos los tejidos adultos.

Las células madre que forman células sanguíneas y del sistema inmunitario se conocen como células madre hematopoiéticas (CMH). Esta es una célula aislada de la sangre o médula ósea que se puede renovar por si misma, diferenciarse en una variedad de células especializadas, moverse fuera de la médula ósea a la sangre circulante y que puede controlar la muerte celular programada (apoptosis).

Dado que las CMH en cultivos se parece a las de la serie blanca un reto es intentar identificarlas morfológicamente (tamaño, forma) o a través de la búsqueda de marcadores. Esta situación se complica si tenemos en cuenta que 1 de cada 10.000-15.000 células de la médula ósea se piensa que es una célula madre. En el torrente sanguíneo la proporción baja a 1/100.000.

Diversos estudios nos muestran que parece haber 2 tipos de CMH: unas consideradas células madre de larga duración que son capaces de autorenovarse, y están en la médula ósea. Otras que también están en médula ósea pueden regenerarse inmediatamente a todos los diferentes tipos de c sanguíneas pero que no pueden renovarse ellas mismas en períodos largos de tiempo y se denominan células madre precursoras o progenitoras de corta duración. Estas últimas son c inmaduras que son precursoras de una gran cantidad de c diferenciadas del mismo tipo de tejido. Son capaces de proliferar pero tienen limitada la capacidad para diferenciarse en más de un tipo celular como lo hacen las primeras. Todo esto se ha sabido de ensayos en ratones. En humanos la longevidad de las células madre de corta duración no está bien establecida. Una verdadera células madre, debe ser capaz de renovarse por sí misma durante la vida de un organismo, por ello son las células madre de larga duración las que tienen mayores implicaciones terapéuticas. Por desgracia, cuando se extraen de la sangre no se pueden distinguir entre sí fácilmente y este es el problema fundamental por los costes, los consumos de tiempo y que esta identificación es muy difícil en humanos.

El estudio sobre CMH tiene un problema de identificación, como se ha dicho. Primero, las CMH con actividad de larga duración son escasas; segundo, hay múltiples tipos de células madre; tercero, las células madre se parecen a muchas otras del torrente sanguíneo o de la médula ósea. Para intentar identificarlas se intenta hacerlo a través de marcadores. Weissman identificó varios en humanos:

CD 34+, CD 59+; Thy1+, CD38^{low/-}, C-kit^{/low}, lin⁻. No obstante hay mucha controversia en la identificación de estos marcadores y no se han reproducido muchos de los estudios realizados.

Fuentes de las CMH:

Médula ósea: es el lugar clásico considerado como ósea fuente de las células madre. Cerca de 1/100.000 células de la médula ósea es una células madre de larga duración, verdadera células madre formadora de sangre.

Sangre periférica: anteriormente se usaba terapéuticamente mucho el trasplante de médula ósea. Hoy día se prefiere el uso de trasplante de CMH a partir de sangre extraída de la circulación periférica de donantes tras haberles inyectado una citoquina, como el factor estimulador de colonias de granulocitos (GCSF, en inglés). Después de recogida esa sangre se usa un sistema de filtrado que separa la serie blanca con CD34+ y se devuelve la serie roja al donante. De las células recogidas, de 5-20% serán verdaderas células madre. Esas células CD34+ son una mezcla de células madre, c progenitoras y células de la serie blanca en varios estados de madurez. Como se indicó en los últimos años la mayoría de los trasplantes de "médula ósea" tanto autólogos como alogénicos realmente son trasplantes de células de la serie blanca recogidas en la circulación periférica y no en la médula ósea. Parece que con esta estrategia los pacientes tienen tasas de supervivencia más altas que con las de trasplante de médula ósea. Puede ser debido a que la cantidad de células madre es casi el doble que con el trasplante tradicional y eso genera que el injerto se haga más rápido, logrando una recuperación de la serie blanca y de las plaquetas varios días antes que con la otra técnica. Esto se ha hecho en humanos en pacientes con trasplantes de células blancas con marcadores con CD34+ y Thy-1+ en pacientes con cáncer de mama que recibieron trasplantes autólogo después de una intensa quimioterapia.

Cordón umbilical: desde hace varios años se práctica la extracción de CMH a partir de cordones umbilicales guardados en bancos de tejidos. Como utilidad es que sus receptores han sido sobre todo niños y ha aumentado las tasas de supervivencia en los pacientes tratados. Como consideración teórica, aún no demostrada, se piensa que las células madre del cordón podrían ser capaces de desarrollar células multipotenciales o incluso todos los tipos de líneas celulares (pluripotenciales). Con todo ello, no se ha identificado que las características terapéuticas de las células madre del cordón sean superiores a las CMH extraídas de otros lugares.

Sistema hematopoyetico fetal: se ha investigado en ciencia básica pero aún no en uso clínico. Parece que comienza la actividad hematopoiética en ratones a partir del 7º día de vida del embrión murino que se incrementa mucho a partir del 11º día (equiparable a las semanas 4ª-6ª en el embrión humano) en la región AGM (aorta, gónadas y mesonefros (riñón fetal)) y, posteriormente, emigra esa funcionalidad a otros órganos (hígado, bazo, timo y, cerca del momento del parto, a la médula ósea). En humanos se ha descrito la presencia de CMH circulando en la sangre de fetos humanos abortivos en las semanas 12ª-18ª de gestación. Estas células circulantes tienen diferentes marcadores que las obtenidas en hígado, médula ósea fetal y cordón.

Células madre embrionarias y células germinales embrionarias: Se ha conseguido ya obtener las más importantes líneas celulares de células progenitoras en embriones murinos incluso sin haber añadido factores de crecimiento. No obstante, aún está lejos que se pueda usar en humanos una aproximación similar. Las líneas celulares derivadas de las células germinales embrionarias humanas

(células cultivadas derivadas de células embrionarias que se convertirían en huevos o espermatozoides) que se han cultivado en determinados medios han producido células CD34+. Sin embargo no se practican pruebas para conocer su capacidad de renovación a largo plazo o su capacidad de convertirse en diferentes tipos de células sanguíneas.

Diferencias de la CMH según donde se extraigan:

No se sabe cuando las CMH se mueven de su localización precoz a la médula ósea como lugar de radicación en adultos. Si se ha encontrado que la cantidad de c CD34+ desciende a medida que progresa la gestación pero la expresión de las moléculas de adhesión en estas células se incrementa. Las células del feto murino tenían en algunos estudios unas 50 veces más capacidad de repoblar médula ósea que las células de ratón adulto. No obstante, otros estudios no han encontrado ningún descenso con la edad, quizá debido a que es muy difícil cuantificar la cantidad por la dificultad de identificar las células madre de larga duración.

En la actualidad es muy complicado extraer más que unos pocos millones de CMH de una placenta o cordón (muy pocas para un trasplante en adultos, que necesita aproximadamente unos 7-10 millones de células CD34+/kg peso, pero que sí pueden valer para un niño pequeño). Algunos autores dicen que la sangre de cordón causa menos complicaciones en los trasplantes al generar menor rechazo, si bien este hecho también se discute en el mundo científico. En ensayos de laboratorio sobre ratones con CMH humanas si se ha encontrado que la sangre del cordón tiene una mayor capacidad de proliferación.

La sangre periférica además se es más fácil de recoger que la procedente de la médula ósea tiene otras ventajas sobre esta última. Parece ser que injerta más rápidamente aunque tiene el inconveniente de que causa una mayor proporción de rechazo. En terapia génica también parece que se moviliza mejor que la de la médula ósea.

Factores ligados a las CMH:

Las CMH tienen cuatro acciones principales: se pueden renovar por sí mismas, se pueden diferenciar, se pueden movilizar de médula ósea a circulación o viceversa y pueden controlar la muerte celular programada (apoptosis).

Las células madre se dividen y reemplazan por sí mismas lentamente en la médula ósea. Parece ser que la capacidad de renovación está ligada a la actividad de la telomerasa que desciende con la edad y produce telómeros más cortos y menos viables. Por tanto, la telomerasa está ligada a la capacidad de potencial de autorenovación en las CMH. Dado que esta capacidad es escasa cualquier método que la induzca sería un gran avance. En cultivos se ha logrado un incremento de actividad usando citoquinas. Otras aproximaciones se hacen en cultivos de líneas clonales ligadas a células estromales (AFTO24) logrando incrementos en la autorenovación. Dado que estos factores estromales son uno de las claves para la renovación, se está investigando mucho sobre el papel que juega el mantenimiento de células estromales adecuadas.

Las CMH tienen como gran objetivo el producir células diferenciadas de serie blanca y roja. Se ha calculado que para producir estas células circulantes adultas es necesario que se produzcan unas 17-19 divisiones, con una capacidad de amplificación de 170.000-720.000 veces. Cualquier factor que estimule esas repeticiones puede generar unos considerables avances, si bien aún está por

determinar cuales son los más válidos y las interacciones entre ellos si se usan varios.

Las migraciones de las CMH en un sentido u otro son muy activas. Aparecen en el adulto en varios órganos, y es necesaria una completa comunicación entre ellos para que un trasplante con CMH sea válido y se mantenga la carga de estas células y su autorenovación. Los factores que facilitan la movilización no están aún muy claros, si bien aparece que las células estromales juegan un papel, que puede ser de adhesión o de transmisor de señales reguladoras de la autorenovación y la diferenciación.

El número de células se regula por mecanismos genéticos y moleculares. La apoptosis es el proceso de muerte celular programada que lleva a la autodestrucción celular cuando ya no son necesarias o sobran. Actualmente la cantidad de CMH es importante en los trasplantes donde su gran cantidad inicial (que aumenta la capacidad y la velocidad de injerto) está regulada por apoptosis. Sin embargo no están claros sus mecanismos ni los signos de su aparición: uno puede ser la ausencia de señales de actividad en las células del estroma de médula ósea. Para mantener las CMH en cultivos es fundamental conocer los factores de la apoptosis en ellas. Algunos autores indican que las células madre necesitan de dos señales de factores de crecimiento para continuar viviendo y evitar la apoptosis: una regulada por una proteína llamada BCL-2, la otra de un factor de acero que por si misma induce las CMH a producir c progenitoras pero no para autorenovarse.

Usos clínicos de las CMH:

Entre los primeros usos están el tratamiento de cánceres de la sangre como leucemias y linfomas. Tras radiación o quimioterapia se hacía un trasplante de médula ósea o de células recogidas en sangre periférica a partir de un donante con un sistema HLA similar al del paciente. Así se trataron las LLA, la LMA, LMC, enfermedad de Hodgkin, mielomas múltiples, linfomas no Hodgkin, etc. Con ello se logró pasar en 20 años, por ejemplo, a la LMC de una enfermedad altamente mortal en una enfermedad que es altamente curable.

Otro uso de los trasplantes de médula ósea alogénicos es el tratamiento de enfermedades sanguíneas congénitas, como diferentes tipos de anemias (anemias aplásicas, betatalasemia, leucodistrofias, síndrome linfoproliferativo ligado a cromosoma X, etc.) o anomalías metabólicas (síndrome de Hunter, síndrome de Hurler, síndrome de Lesch Nyhan, osteopetrosis, etc.). No obstante como el trasplante de CMH genera gran riesgo para la vida queda como último recurso para estos procesos.

También se usan las CMH como sistema de complemento de otros tratamientos oncológicos. Antes de realizar quimioterapia o radioterapia se recogen tras estímulo de médula ósea sangre en estos pacientes que son conservadas hasta la finalización del tratamiento agresivo y se aplican posteriormente a los mismos pacientes. Con ello no hay posibilidad de autorechazo. El problema es que a veces no se filtran adecuadamente la células cancerosas y se vuelven a administrar al paciente. Hay estudios que están intentando resolver esta circunstancia purificando las células y preservando únicamente las células que sean CD34+ o Thy-1+.

Otra factibilidad terapéutica es el de tratar cánceres incurables con CMH. Ahora en experimentación se sitúan el tratamiento de tumores sólidos resistentes como el cáncer de pulmón, próstata, ovario, colon, esófago, hígado y páncreas. En los estudios realizados se suprime el sistema inmunitario pero no se destruye y con las c del donante se consiguen ciertas remisiones de estos tumores. La necesidad

de supresión inmunitaria se debe a que así las células T no reaccionan tan agudamente con las células trasplantadas. Además, parece que hay actividad antitumores en cáncer de mama y leucemia por parte del CMH de cordón al menos en el tubo de ensayo y estimulando su actividad con citoquinas IL-15.

Otras aplicaciones del las CMH están en investigación como su uso para enfermedades autoinmunes como la diabetes, artritis reumatoide, y el lupus. En ellas parece ser que pueden ser útiles, además de su uso como medio de llevar genes que reparen c dañadas.

Plasticidad de las CMH:

Varios estudios indican que se ha logrado induce a células de médula ósea en células diferenciadas de otros tejidos: cerebro, músculo e hígado. Hay varios estudios con objeto de distrofias musculares con buenos resultados (en ratón), así como ósea en sistemas de reparación hepática. También, en ratones se ha conseguido que una sola célula madre ha podido repoblar el sistema de médula ósea y hematopoyético del receptor. En humanos, parece que algunas células de médula ósea podrían tener la capacidad de integrarse en hígado y formar hepatocitos.

Problemas con nuevos tratamientos con CMH:

Uno es la capacidad limitada para crecer y expandir la cantidad de CMH en humanos. Cuanta más alta sea la cantidad de células madre mayor probabilidad de supervivencia en pacientes. Sin embargo, la placenta y el cordón tienen muy pocas células y son útiles solo en pacientes pediátricos. A mayor cantidad de células madre parece que al menos algunas de ellas pueden sobrevivir al rechazo del paciente y recuperar el sistema celular. La posibilidad de aumentar la cantidad de CMH humanas in vivo o in vitro aumentaría considerablemente las expectativas en este campo. Una vez cultivadas en cantidad adecuada si se pudiera manipular la célula madre para que estuviera libre de marcadores que provoquen rechazo, se podría trasfundirlos a pacientes con muchas garantías de éxito. En este sentido hay factores prometedores que se han ensayado solos o en combinación y, hoy día, se ha conseguido incrementar unas 20 veces la cantidad de células madre de larga duración, aunque sea brevemente y en cultivos. Los éxitos son mayores con las células progenitoras (corta duración) lográndose incrementos de cerca de 300 veces. Actualmente los incrementos que se producen son cortos en el tiempo no pudiendo valer para su uso masivo siendo además otro factor es que esas células producidas no están bien caracterizadas. Si se ha observado que parece haber una relación inversa entre las altas tasa de división celular y una mayor vida media.

Actualmente los riesgos de los trasplantes de CMH (rechazo de injerto, enfermedad donante-huésped, infecciones) reducen su uso a procesos muy graves o mortales. Las células T en los trasplantes son un arma de doble filo, por una parte luchan contra las infecciones y ayuda a injertar el trasplante; pero por otro pueden causar gran rechazo. Investigando sobre estos factores se podría extender más fácilmente las técnicas de uso de CMH. El uso de CMH de sangre periférica con un proceso adecuado podría llegar a eliminar el rechazo. Incluso se podría usar el proceso de microtrasplantes, reemplazando no la totalidad de las células dañadas sino solo las líneas requeridas necesariamente. También se podría llegar solo a adormecer al sistema inmunitario sin dañarlo mediante uso de trasplantes con mezcla de CMH del paciente y del donante lo justo para cumplir los objetivos del mismo.

En el momento actual se desconoce exactamente que pasa con el medio embrionario que facilita el crecimiento celular en un órgano y no en otro. Los estudios in vivo de la plasticidad de médula ósea en ratones están, incluso en ellos, en pañales. Incluso aunque se confirmasen las hipótesis en ratones no hay ninguna garantía de que se pueda lograr o inducir en humanos en un futuro.

CELULAS MADRE en ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Una característica general del sistema inmunitario es que si él falla en detectar y destruir, rápidamente, a un organismo invasor dará como resultado una infección. Por el contrario, si el sistema falla en el reconocimiento de sus propias células o componentes y las ataca erróneamente el resultado es lo que se llama una enfermedad autoinmune.

Los componentes implicados en el sistema inmunitario son células de la serie blanca de la sangre que incluyen linfocitos T y B que se originan en la médula ósea a partir de las CMH. A partir de la médula ósea las células inmaduras T migran al timo antes de dispersarse por el cuerpo con el resto de células inmunitarias (células B, etc.). Dentro del timo las células T se especializan en identificar las propias proteínas corporales y las foráneas a partir de las propias proteínas que expresan las CMH, que varían ligeramente entre cada persona y cuya variación es la base de la respuesta inmunitaria cuando un trasplante es rechazado. Estas variaciones se determinan genéticamente y por eso los familiares muy estrechos tienen dimensiones de variabilidad más pequeñas que las personas sin lazos familiares. Colectivamente esas células T son capaces de reconocer un ilimitado número de antígenos. Muchas de esas células T tienen la capacidad de reaccionar ante proteínas del propio sujeto. Para evitar este hecho el timo establece mecanismos por los cuales esas células son inactivadas en un proceso llamado **inducción de la tolerancia**. La tolerancia asegura que las células T no atacarán los autoantígenos del cuerpo.

Las enfermedades autoinmunes aparecen cuando este complicado sistema de inducción y mantenimiento de la tolerancia inmunológica falla. Se produce una destrucción por células T CD8 citotóxicas antígeno específicas o por anticuerpos. Los motivos del fallo de la tolerancia todavía no son bien conocidos, estando implicados factores genéticos, ambientales, hormonales y ciertas infecciones.

Uso de las CMH en las enfermedades autoinmunes:

Los tratamientos actuales de estas enfermedades consisten en el uso de fármacos antiinflamatorios, potentes inmunosupresores y agentes inmunomoduladores.

El daño producido por estas enfermedades puede ser específico de un órgano como en la diabetes tipo I o la esclerosis múltiple. En estos procesos se pueden establecer tratamientos para reparar o reemplazar las células dañadas o destruidas o incluso el tejido lesionado. Por el contrario hay otros procesos que no son específicos de un órgano concreto afectando a una gran cantidad de órganos o tejidos como el lupus. Los tratamientos en estos casos obtienen resultados pobres y un obstáculo para mejorarlos es que hay ausencia de un objetivo específico para la aplicación de la terapia. El objetivo del uso de CMH en el tratamiento del lupus es destruir la totalidad de las células reactivas autoinmunes y generar un nuevo sistema inmunitario. Se realizaron ensayos con trasplantes autólogos de CMH tras un régimen de quimioterapia y/o radiación que eliminó las células maduras inmunitarias. Estos regímenes terapéuticos pueden alterar enormemente el sistema inmunitario y conseguir que la persona trasplantada esté libre de la enfermedad durante un tiempo prolongado sin la necesidad de medicación inmunosupresora. Parece ser que la aparición de los mecanismos de autoinmunidad del lupus se debe al incremento de la concentración de las células T autoreactivas. Con estos trasplantes se consigue bajar esa concentración a los niveles normales,

restableciéndose la tolerancia y disminuyendo la posibilidad de recurrencia de la enfermedad.

Desarrollo de líneas de CMH para su trasplante:

La posibilidad de generar y propagar un número ilimitado de CMH fuera del cuerpo (sea del adulto, del cordón, del feto o del embrión) podría tener un enorme impacto tanto en cuanto a seguridad, costes y calidad de los trasplantes de células madre. Actualmente hay problemas en las enfermedades autoinmunes en cuanto al hecho de estimular el crecimiento en su cuerpo de CMH a través del uso de citoestimuladores, además de la propia contaminación de las CMH con células autoreactivas T y B que afectan al éxito de los tratamientos.

Por ello, el desarrollo de líneas celulares puras en el laboratorio podrían evitar estos fallos. Si estas células se generasen en personas sanas o de células embrionarias que carezcan de estas influencias genéticas sería un gran paso. Un riesgo de usar CMH externas es el de rechazo inmunitario en las células trasplantadas. El uso de bancos de células madre embrionarias (CME) con varias combinaciones de las tres proteínas que están mayormente implicadas en el desarrollo del rechazo inmunitario podría ser muy útil para evitarlo en el futuro. Además parece que estas mismas células madre embrionarias son receptivas a la manipulación genética que las propias CMH. Por ello se están ensayando varias estrategias de uso de las células madre embrionarias: una es la de intentar transferir las propiedades de reconocimiento de las proteínas en las CME mediante transferencia genética, otro es el de genera un donante universal de líneas de CME con una alteración genética o con las proteínas eliminadas. Ya se ha logrado este hecho en ratones con producción de células con una expresión mínima de las moléculas de proteínas. Otra investigación se basa en la necesidad de determinar la aplicación de estas estrategias para la prevención del rechazo en humanos.

Uso de terapia génica y células madre en enfermedades autoinmunes:

La terapia génica es la modificación genética de células para producir un efecto terapéutico. En ellas el ADN que contiene el gen terapéutico se trasfiere a las células cultivadas y estas se administran posteriormente en un animal o persona. El ADN también se puede administrar directamente en las células del lugar de inyección o en la circulación. Bajo condiciones ideales estas células tomarán ese ADN y producirán la proteína terapéutica codificada por ese gen.

En enfermedades autoinmunes el objetivo es el de modificar la respuesta anómala inflamatoria. Para ello se han planteado dos estrategias. La primera es bloquear las acciones de una citoquina inflamatoria transfiriendo un gen en células que llevan un decodificador para esas citoquinas. Otra aproximación es la transferencia de un gen que codifica una citoquina antiinflamatoria que redirige la respuesta inflamatoria a una situación de mayor tolerancia. En varios estudios animales se han logrado buenos resultados en estas aproximaciones. No obstante, en el ser humano ha varios obstáculos. Uno de ellos es la posibilidad de realizar transferencia de genes en células adultas o de división lenta (incluyendo las CMH) y producir una expresión a largo plazo de niveles suficientes de la proteína deseada. Por el contrario las CME son más fáciles de tratar con terapia génica que las células adultas además de hacer durante mucho más tiempo la expresividad de producción protéica.

La terapia génica de células madre debe permitir el desarrollo de nuevos métodos para la modulación del sistema inmunitario. Ya se ha usado en el lupus (mediante modificación de las CMH o de células diferenciadas con un receptor decodificador para la citoquina inflamatoria interferon gamma) en modelos animales. Otros modelos murinos han permitido tratar la diabetes tipo I. Las CME o las células madre adultas podrían ser modificadas genéticamente antes o durante la diferenciación en los islotes de páncreas para ser usados como trasplantes. También se está usando la investigación sobre la destrucción de las articulaciones y la pérdida de cartílago en personas con artritis reumatoide. En ellos se ha logrado en ratones la supresión completa de la enfermedad y además realizar una buena citoquina para esta terapia a partir del uso de células dendríticas. No obstante en humanos el aislamiento de estas células es muy difícil y obstaculizará esta aproximación. El uso de terapia sobre condrocitos puede ser una alternativa dado que estos se derivan del estroma de la médula ósea, aunque no se conozcan bien los mecanismos intermedios. Con el uso de CME se podrían intervenir sobre la enfermedad, así las células madre estromales embrionarias podrían generar nuevos condrocitos y facilitar la reparación del cartílago. Esto se ha logrado ya en ratones. La estrategia de intervenir sobre células madre estromales del adulto o sobre los condrocitos está condicionada por el escaso número de estas células que pueden ser trasplantadas y por la escasa respuesta a su propagación en el laboratorio. En cambio, el uso de CME, modificadas genéticamente y cultivadas antes de su diferenciación dirigida hacia una célula madre de tejido conectivo podría ser más fácil de obtener y útil.

Estos resultados nos ilustran sobre los tremendos potenciales que tienen estas células para el tratamiento de estos procesos autoinmunes.

