

A microscopic image of pluripotent stem cells, showing a dense, interconnected network of cells with a characteristic wavy, fibrous appearance. The cells are stained, likely with a fluorescent marker, giving them a golden-brown hue. The overall texture is highly textured and fibrous, typical of a cell culture monolayer.

Bancos de Células Madre Pluripotentes

Begoña Aran

**Banco de Líneas Celulares
Centro de Medicina Regenerativa**

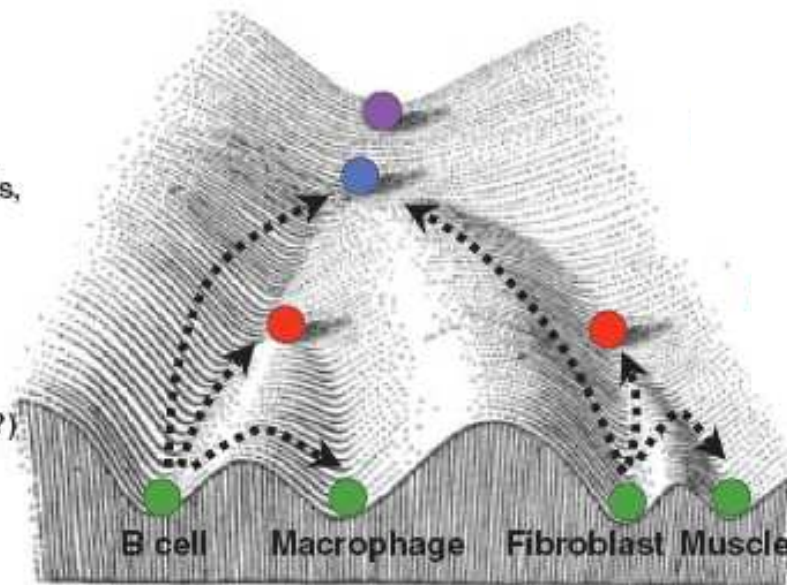
Developmental potential

Totipotent
 Zygote

Pluripotent
 ICM/ES cells, EG cells,
 EC cells, mGS cells
 iPS cells

Multipotent
 Adult stem cells
 (partially reprogrammed cells?)

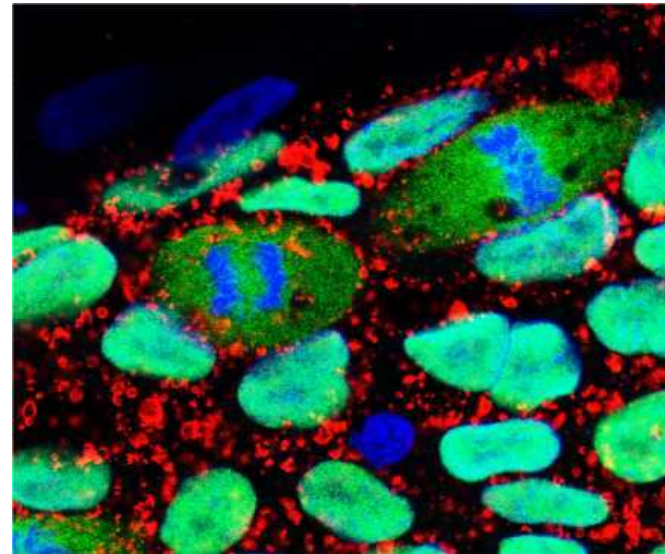
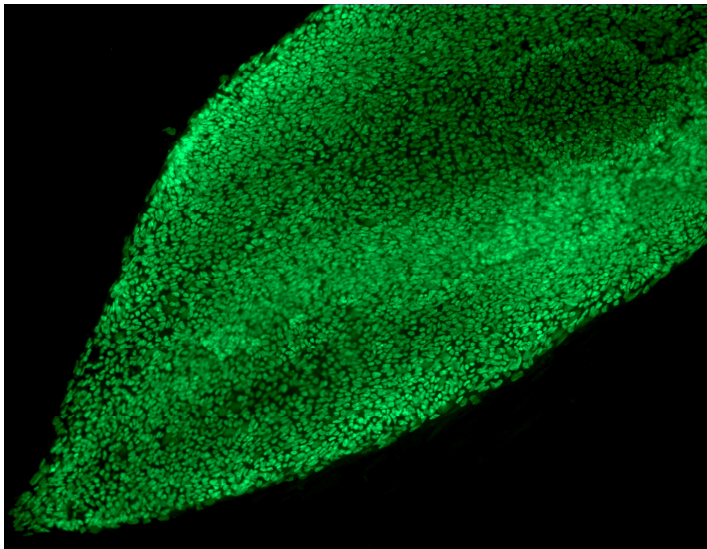
Unipotent
 Differentiated cell types



Hochedlinger, Development 2009
 (adapted from Waddington, 1957)

CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

- Las células madre pluripotentes pueden obtenerse de la masa celular interna del blastocisto (hESC) o mediante reprogramación nuclear (SCNT o iPS)



células madre embrionarias

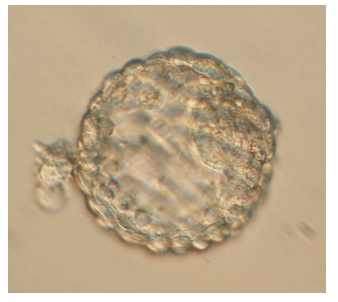
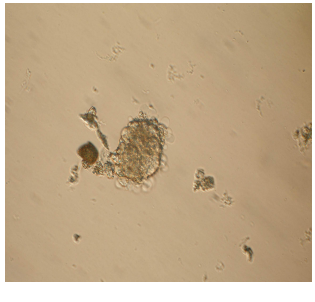
son las que derivan de la **masa celular interna** (MCI) de un blastocisto (día +5/6 de desarrollo, \pm 150 células). Las células de la MCI dan lugar a las 3 líneas del embrión: ectodermo, mesodermo y endodermo.





MCI

Derivación células madre embrionarias

<p>Descongelación embriones</p>		<p>Cultivo hasta blastocisto D+5/6</p>	
---------------------------------	--	--	---

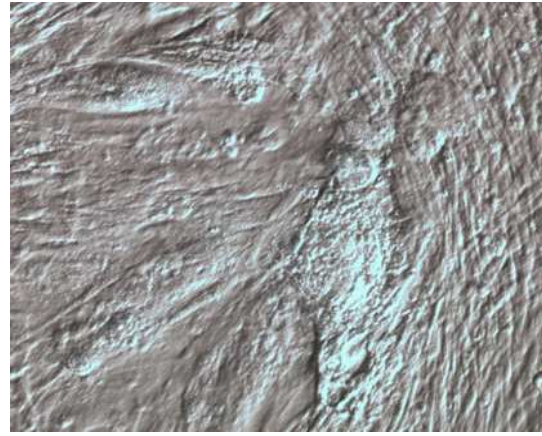
<p>Eliminación de la zona pellucida</p> <ul style="list-style-type: none"> - 5mg/ml pronasa - Ac. Tyrode's 		<p>Eliminación del trofoblasto</p>	
--	---	------------------------------------	--

<p>Siembra y cultivo del blastocisto o MCI sobre monocapa de fibroblastos humanos (HFF-1) irradiados, en placas cubiertas de gelatina (0.1%)</p>		
--	---	---

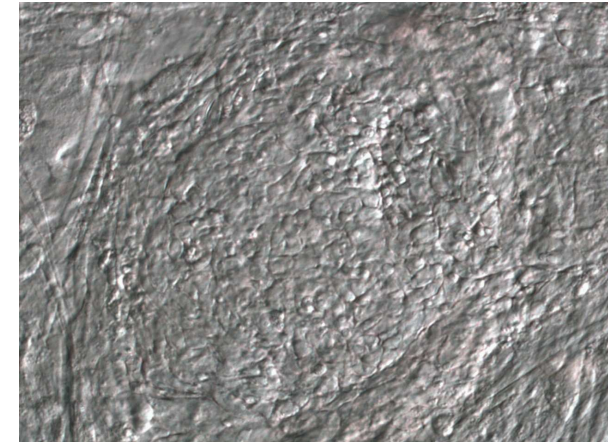
Derivación ES[2]



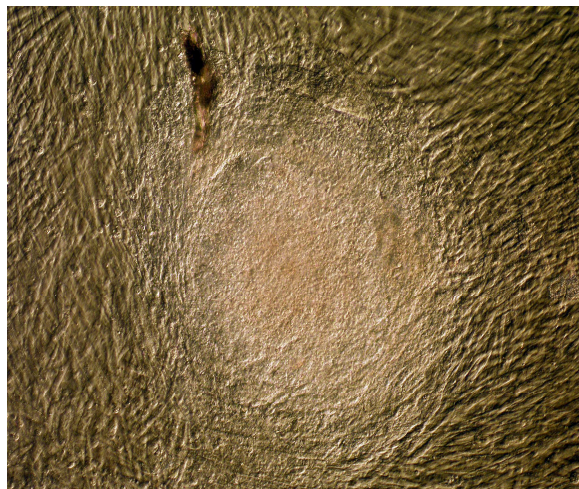
p0 d4 (10x)



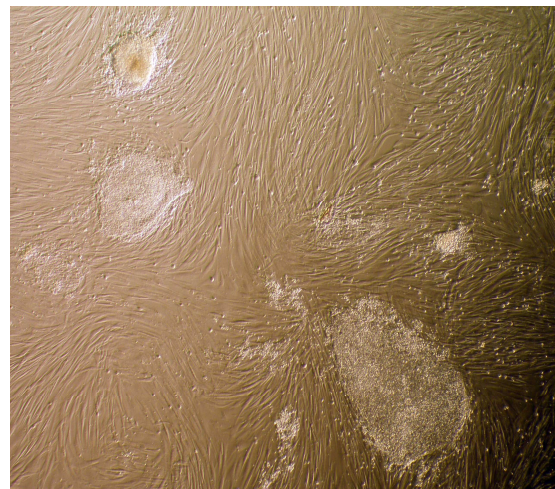
p0 d7 (20x)



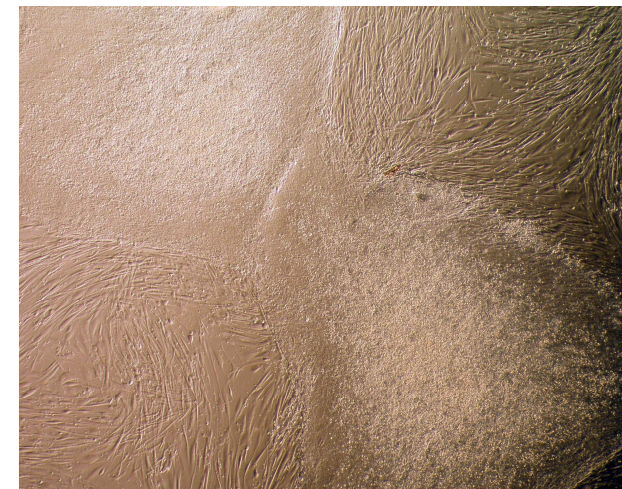
p0 d9 (20x)



p0 d12 (10x)



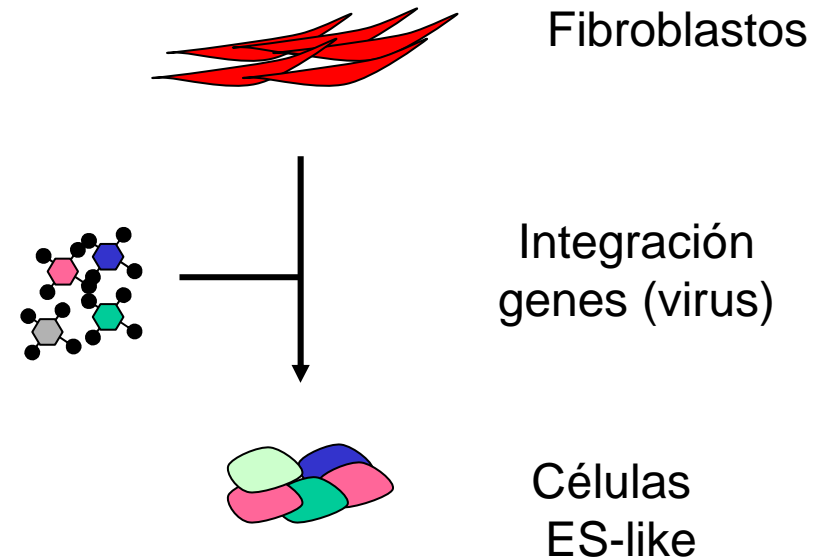
p1 d2 (4x)



p1 d6 (4x)

Células somáticas de pluripotencia inducida (IPS)

- **Paciente-compatible**
- **No problemas éticos**
- Disponible en humanos
- Pluripotentes
- Integración mediante vector (virus)
- Segura? Activación oncogenes, transmisión línea germinal?

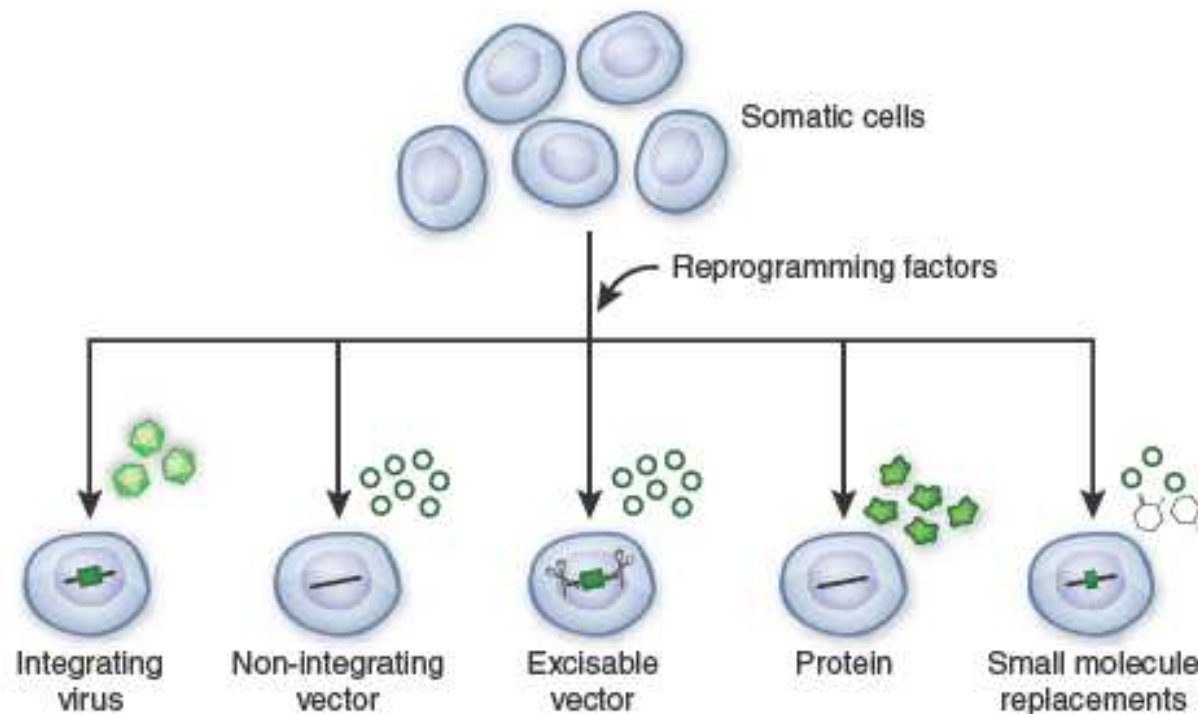


Takahashi et al., 2007

Nakagawa et al., 2007

Park et al., 2007

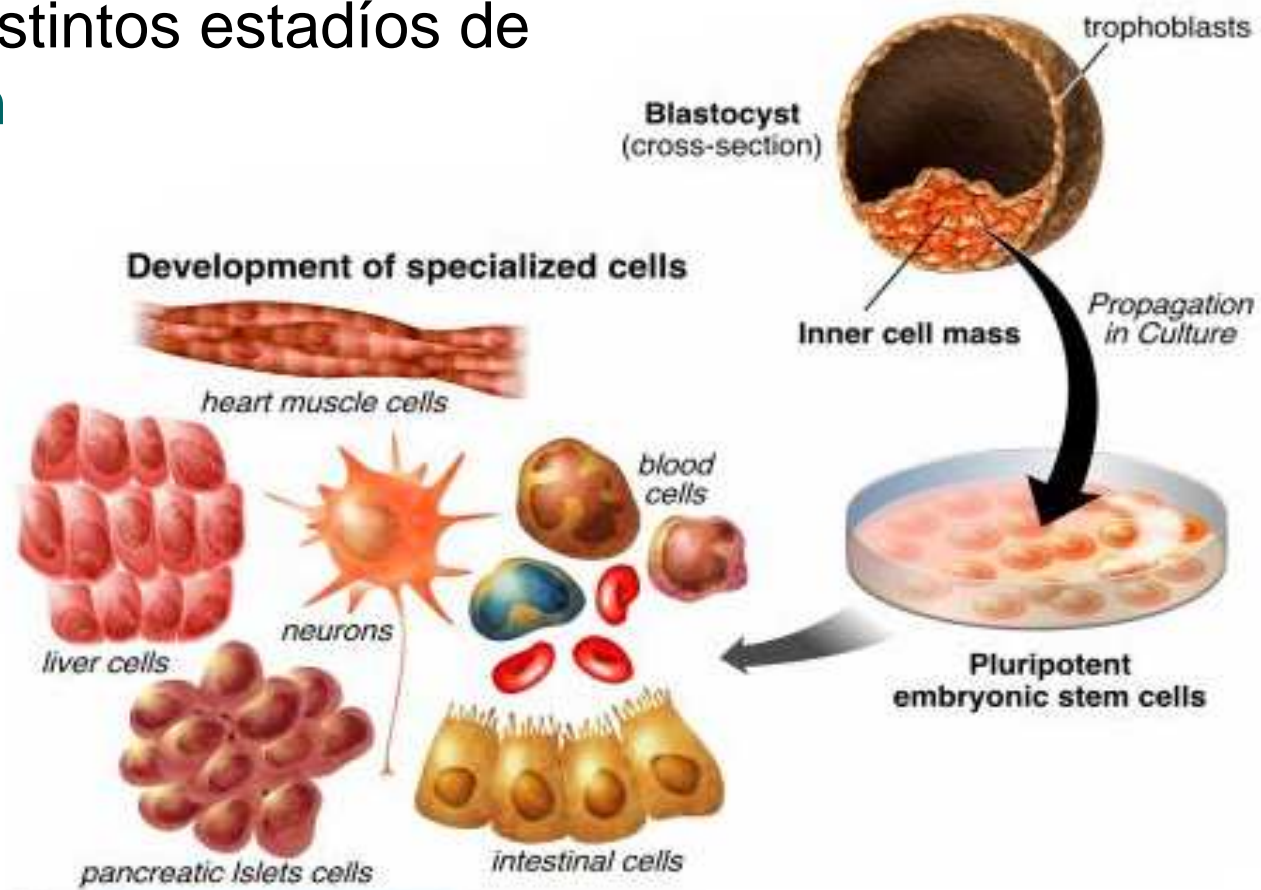
Método reprogramación



Lentivirus/retrovirus mediated reprogramming methods are still major approaches for generation of iPS

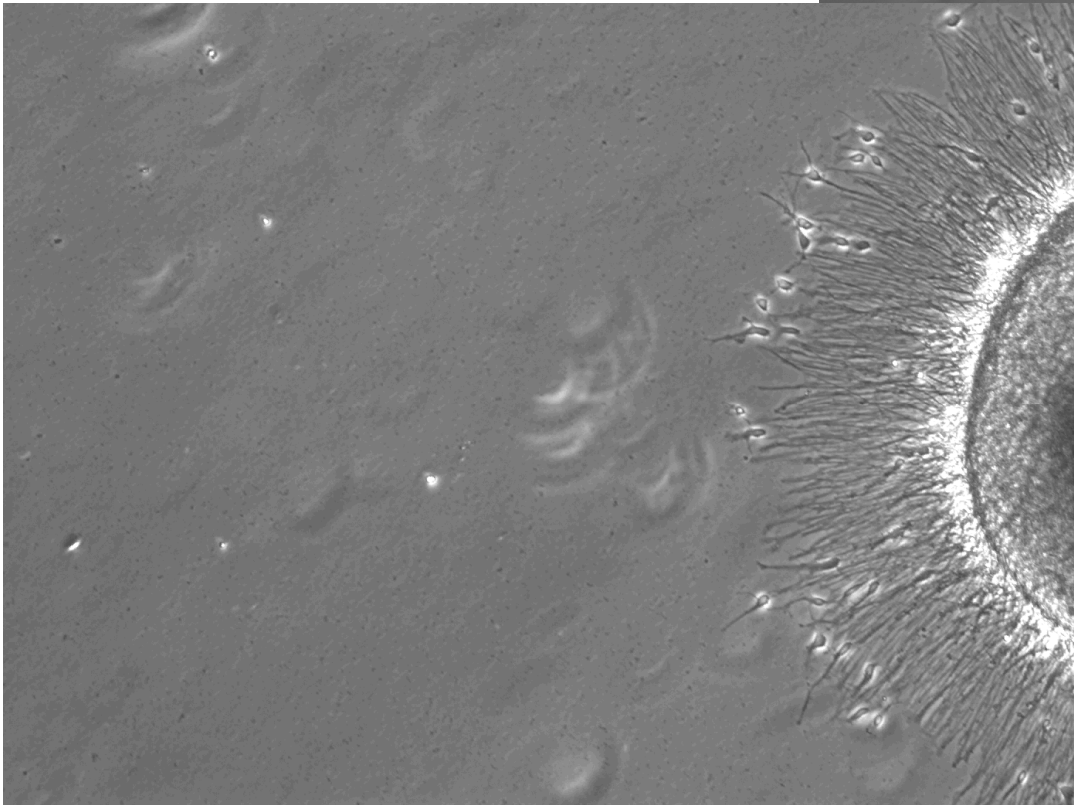
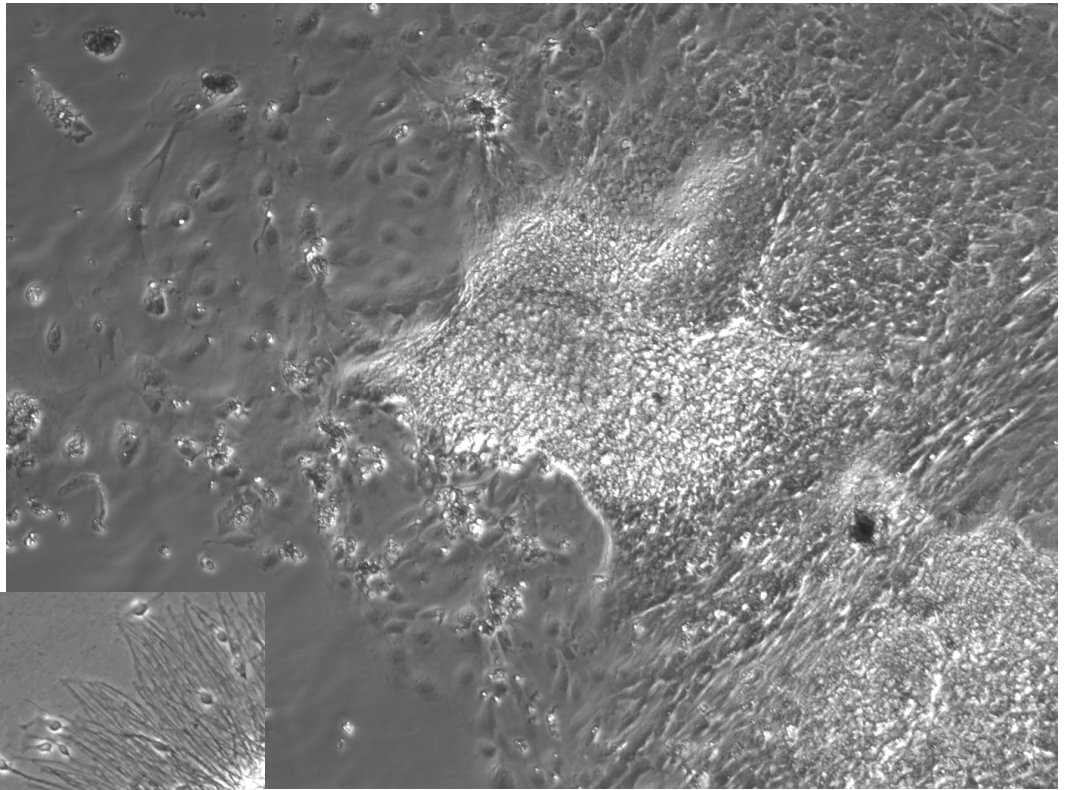
DIFERENCIACIÓN

Quedan por establecer los factores genéticos y/o ambientales que controlan el desarrollo de las CME y su importancia durante los distintos estadios de diferenciación



Diferenciación de las CME

- ADIPOCITOS
- ASTROCITOS
- CARDIOMIOCITOS
- CONDROCITOS
- CÉL. HEMATOPOYÉTICAS
- CÉL. DENDRÍTICAS
- CÉL. ENDOTELIALES
- KERATINOCITOS
- HEPATOCITOS
- PRECURSORES LINFOCITOS
- MASTOCITOS
- NEURONAS
- OLIGODENDROCITOS
- OSTEOBLASTOS
- ISLOTES PANCREÁTICOS
- MÚSCULO LISO
- MÚSCULO ESTRIADO
- TROFECTODERMO
- GAMETOS (?)



Legislación Española

- **Investigación:** Subdirección General de Investigación en Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Instituto de Salud Carlos III.
- **Terapia celular:** Agencia Española del Medicamento

Legislación Española Investigación

- Ley 45/2003 por la que se modifica la Ley 35/1988 sobre **Técnicas de Reproducción Humana Asistida**
- Ley 14 /2006 sobre Técnicas de Reproducción Asistida
- ORDEN SCO/393/2006, por la que se establece la **organización y funcionamiento del Banco Nacional de Líneas Celulares**
- REAL DECRETO 1301/2006 por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación.
Transposición Directiva Europea de Tejidos y Células
- Ley 14/2007 de **Investigación Biomédica**

Ley de Reproducción Asistida 14/2006

4. Los diferentes destinos posibles que podrán darse a los preembriones criopreservados, así como, en los casos que proceda, al semen, ovocitos y tejido ovárico criopreservados, son:

- a) Su utilización por la propia mujer o su cónyuge.
- b) La donación con fines reproductivos.
- c) La donación con fines de investigación.
- d) El cese de su conservación sin otra utilización. En el caso de los preembriones y los ovocitos criopreservados, esta última opción sólo será aplicable una vez finalizado el plazo máximo de conservación establecido en esta Ley sin que se haya optado por alguno de los destinos mencionados en los apartados anteriores.

Ley de Reproducción Asistida 14/2006

· d) Que se realicen con base en un proyecto debidamente presentado y autorizado por las autoridades sanitarias competentes, previo informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida si se trata de proyectos de investigación relacionados con el desarrollo y aplicación de las técnicas de reproducción asistida, o del órgano competente si se trata de otros proyectos de investigación relacionados con la obtención, desarrollo y utilización de líneas celulares de células troncales embrionarias.

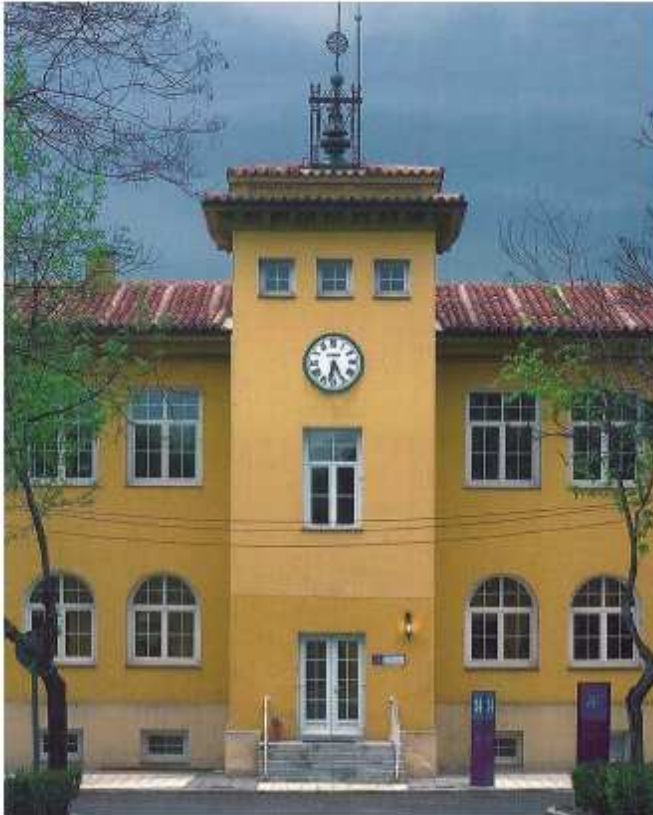
Ley Investigación Biomédica 14/2007

...

La Ley prohíbe explícitamente la constitución de pre-embryones y embryones humanos exclusivamente con fines de experimentación, de acuerdo con la concepción gradualista sobre la protección de la vida humana sentada por nuestro Tribunal Constitucional, en sentencias como la 53/1985, la 212/1996 y la 116/1999, pero permite la utilización de cualquier técnica de obtención de células troncales embrionarias humanas con fines terapéuticos o de investigación que no comporte la creación de un pre-embrión o de un embrión exclusivamente con este fin y en los términos definidos en la Ley.



Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)



Organismo público español,
con carácter autónomo
adscrito al Ministerio de
Ciencia e Innovación

Objetivo

Fomentar y apoyar la
investigación en el desarrollo
tecnológico de la
biomedicina

www.isciii.es

CMR[B]^R

Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

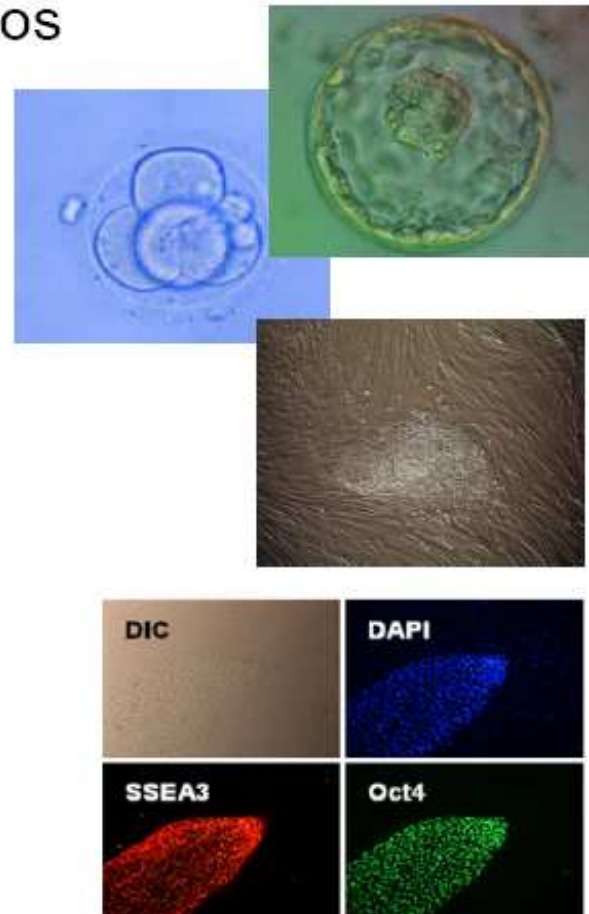


Subdirección General de Investigación en Terapia Celular y Medicina Regenerativa

- Control y seguimiento de los proyectos de investigación relacionados con embriones y hESC
- Creación y coordinación del Banco Nacional de Líneas Célulares

Comisión de Garantías para la Donación y la Utilización de Células y Tejidos Humanos

- Investigación con embriones humanos destinados a la derivación de hESC y otros usos **excepto para investigación relacionada con TRA**
- Investigación con hESC
- Investigación en activación de ovocitos para SCNT
- Investigación con muestras humanas con el objetivo de obtener células madre pluripotentes



Banco Nacional de Líneas Celulares

Estructura en red con varios nodos, coordinados por uno central.

Garantizar la disponibilidad de líneas celulares troncales embrionarias y adultas para la investigación biomédica.



1.- Líneas de células hES

Hombre de la línea	Origen	Características
AND-1	Banco Andaluz de Células Madre	PDF
AND-2	Banco Andaluz de Células Madre	PDF
AND-3	Banco Andaluz de Células Madre	PDF
ES2	CMR[B] Barcelona	PDF
ES3	CMR[B] Barcelona	PDF
ES4	CMR[B] Barcelona	PDF
ES5	CMR[B] Barcelona	PDF
ES6	CMR[B] Barcelona	PDF
ES7	CMR[B] Barcelona	PDF
ES8	CMR[B] Barcelona	PDF
ES9	CMR[B] Barcelona	PDF
ES10	CMR[B] Barcelona	PDF
ES11-EM	CMR[B] Barcelona	PDF
pES[12]	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
HVR-1	Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla (HUVR) Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER)	PDF
HVR-2	Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla (HUVR) Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER)	PDF Anexo
RiMi1	Centro Príncipe Felipe (Valencia)	PDF Anexo
VAL-3	Centro Príncipe Felipe (Valencia)	PDF
VAL-4	Centro Príncipe Felipe (Valencia)	PDF
VAL-5	Centro Príncipe Felipe (Valencia)	PDF
VAL-6M	Centro Príncipe Felipe (Valencia)	PDF
VAL-7	Centro Príncipe Felipe (Valencia)	PDF
VAL-8	Centro Príncipe Felipe (Valencia)	PDF
VAL-9	Centro Príncipe Felipe (Valencia)	PDF
VAL-9-GFP	Centro Príncipe Felipe (Valencia)	PDF
VAL-10B	Centro Príncipe Felipe (Valencia)	PDF
VAL-11B	Centro Príncipe Felipe (Valencia)	PDF

2.- Líneas de células iPS

Nombre de la línea	Origen	Características
AND-4	Banco Andaluz de Células Madre	PDF Anexo
hiPSC clone 1	Centro Príncipe Felipe (Valencia)	PDF
hiPSC clone 4	Centro Príncipe Felipe (Valencia)	PDF
iPS-SCU-CD34+ #1	Banco Andaluz de Células Madre	PDF Anexo
iPS-SCU-CD34+ #2	Banco Andaluz de Células Madre	PDF Anexo
CBiPS6-2F-4	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
CBiPS30-4F-3	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
CBiPS30-4F-5	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
CBiPS32-3F-10	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
FiPS-3F-1	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
[GA]FiPS4F	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
HKiPS4F	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
XF-iPSF44-3F-1	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
XF-iPSF44-3F-2	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
cFA404-KiPS4F-1	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
cFA404-KiPS4F-3	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
KiPS3F-7	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
KiPS4F-1	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
KiPS4F-8	CMR[B] Barcelona	PDF Anexo
MSUH-001	Banco Andaluz de Células Madre y I Universidad de Michigan. USA	PDF Anexo

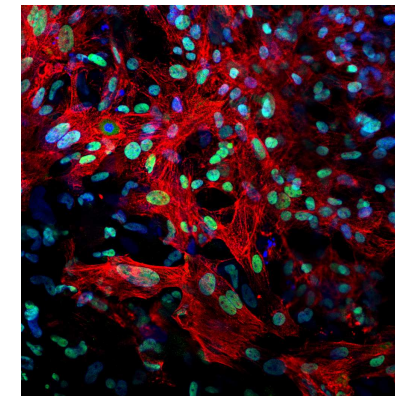
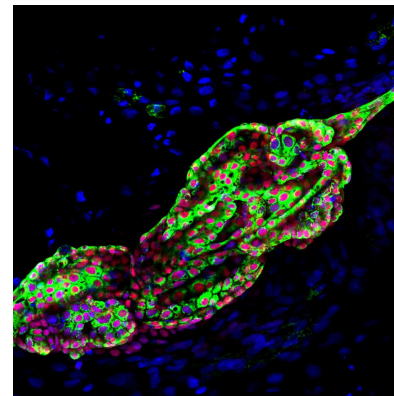
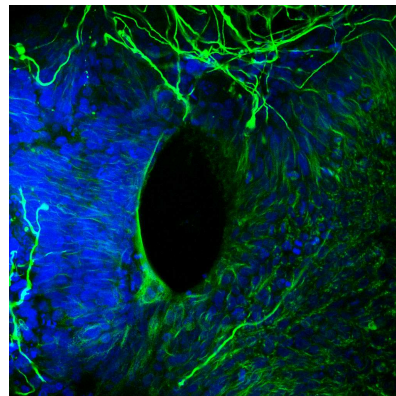
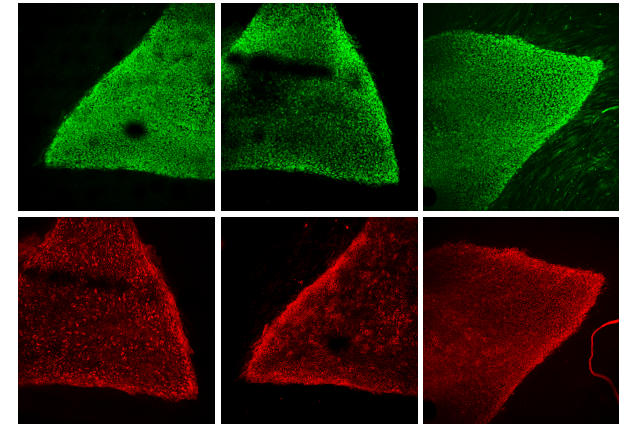
3.- Líneas de células Adultas

Nombre de la línea	Origen	Características
Human bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSC)	<u>Inbiobank</u>	<u>PDF</u>
Human lipoaspirate mesenchymal stem cells (FT-MSC)	<u>Inbiobank</u>	<u>PDF</u>
Human umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSC)	<u>Inbiobank</u>	<u>PDF</u>
Primary human fibroblasts (SK-F)	<u>Inbiobank</u>	<u>PDF</u>
Primary human keratinocytes (SK-K)	<u>Inbiobank</u>	<u>PDF</u>

Criterios mínimos

- Consentimiento informado
- Trazabilidad
- Aprobación Comité Ética

- Datos derivación (origen, métodos, etc)
- Disponibilidad
- Cariotipo
- Modificación genética
- Marcadores celulares de pluripotencia
- Diferenciación a las 3 líneas germinales (in vitro y/o in vivo)



Hacia la aplicación clínica

- Estandarización protocolos: procedencia material, métodos de cultivo, preparación, almacenaje, banqueo, transporte.
- Eliminación xenobióticos
- Condiciones GMP
- Control de calidad
- Supervisión por comités externos de protocolos y ensayos clínicos. Valoración riesgos.
- Consentimiento informado

ISSCR: guidelines for clinical translation of stem cells.

http://www.isscr.org/clinical_trans/pdfs/ISSCRGLClinicalTrans.pdf

Primeros ensayos clínicos



- Geron corp.: Oligodendrocitos derivados de CME, lesionados medulares
- Advanced Cell Technologies: Epitelio pigmentado de retina derivado de CME, distrofia macular de Stangerdt's. Pendiente aprobación FDA.

Muchas gracias por vuestra atención

baran@cmrb.eu

