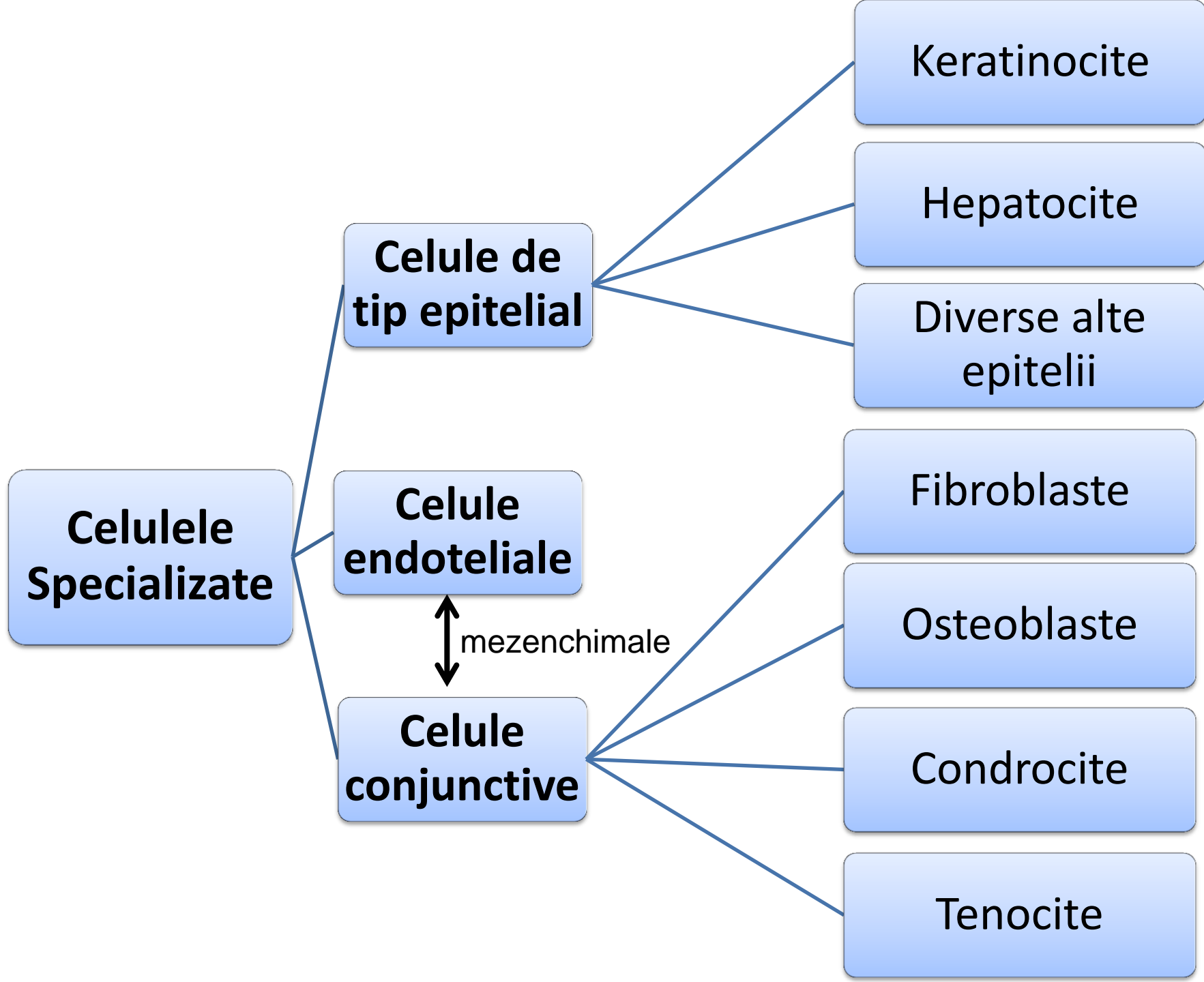


**TIPURI DE CELULE
SI
SURSE CELULARE**

Tipuri de celule in vitro

- Celule specializate, care nu si-au pierdut capacitatea de diviziune
- Celule stem, nediferentiate
- Celule tumorale



Celulele epiteliale

- Asigura functii complexe in organele din care provin:
 - secretie – hepatocite, insule pancreatice si epiteliul ductului pancreatic si multe altele
 - transport dirijat – epiteliul renal, intestinal etc;
 - schimb de gaze – epiteliul tractului respirator
 - rol protector - keratinocite
- In cultura primara, adesea isi pierde functiile specifice
- In cultura primara, sunt dominate de celulele mezenchimale si eliminate in timp, daca nu se aplica conditii preferentiale de crestere, specifice metabolismului celulelor epiteliale - manipulari nutritionale ale mediului.

Factorii cu actiune diferentiata in cultura mezenchimala si epiteliala

- Serul fetal are actiune puternic mitogena asupra componentei mezenchimale si efect inhibitor asupra celulelor epiteliale
- Mediile pentru celule epiteliale - fara ser fetal, cu factori de crestere specifici
- Izolarea celulelor cu ajutorul colagenazei, care disperseaza celulele stromei, pastrand celulele epiteliale in clastere (le asigura viabilitatea post-izolare)
- Utilizarea substraturilor de cultura (monostraturi subconfluente de celule doica, inactivate mitotic)
- Medii de cultura cu o concentratie mica de Ca ionic (0,03-0,06 mM vs. 1,2-1,4 mM)
- Asigurarea unor densitati celulare mai mari la subcultivare

Freshney I.(2005) Culture of animal cells

TABLE 23.1. Inhibition of Fibroblastic Overgrowth

Method	Agent	Tissue
Selective detachment	Trypsin	Fetal intestine, cardiac muscle, epidermis
	Collagenase	Breast carcinoma
Confluent feeder layers	Mouse 3T3 feeder cells	Epidermis
	Fetal human intestine feeder cells	Normal and malignant breast epithelium
Selective inhibitors	D-valine	Colon carcinoma
	Cis-OH-proline	Kidney epithelium
	Ethylmercurithiosalicylate	Cell lines
	Phenobarbitone	Neonatal pancreas
	Antimesodermal antibody	Liver
Selective media	Geneticin	Squamous carcinomas
	MCDB 153	Colonic adenoma
	MCDB 170	Melanocytes, melanoma
	Low Ca ²⁺	Epidermis
		Breast
		Epidermal melanocytes

Celule mezenchimale

- Celule rol structural
 - Celulele tesutului conjunctiv (fibroblaste)
 - Celule musculare striate si cardiomiocite
 - Celule osoase
- Celule vasculare
 - Endotelilale (in cultura se comporta ca celule epiteliale, necesitand medii specifice acestora)
 - Celule musculare netede

CELULE STEM

- **Se clasifica în funcție de sursa celulară în:**
 - Celule stem embrionare și fetale
 - Celule stem adulte, sau celule stem somatice (responsabile pentru creșterea, menținerea și regenerarea țesuturilor differentiate)
- **Se clasifica în funcție de potențialul de a genera celule differentiate în:**
 - Totipotente
 - Pluripotente
 - Multipotente
 - Oligopotente și unipotente

Tipuri de celule STEM cu potentiale aplicatii in medicina regenerativa

Celulele Stem

Celule Stem Embrionare

totipotente

pluripotente

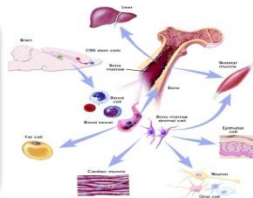


Celule Stem Adulte

multipotente
pluripotente
unipotente

maduva os

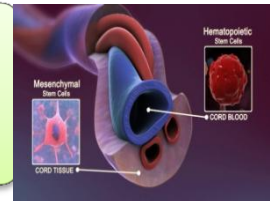
tesut adipos



Celule stem pluripotente induse (iPSC si piPSCs)

sange

altele



2006

Prof Shinya Yamanaka (Kyoto, Japonia)

Dr. James Thomson (Univ. Wisconsin, SUA)

Premiu Nobel 2012

John Gordon si Shinya Yamanaka

– **Celulele stem totipotente**

- pot forma un organism întreg (ovocitul fertilizat și celulele formate după primele diviziuni ale zigotului)

– **Celulele stem pluripotente**

- formează cele 3 foițe germinative ale embrionului, inclusiv celulele germinale.
- nu pot forma celulele placentei și a cordonului ombelical
- Provin din masa celulară internă a blastocistului

– **Celulele stem multipotente**

- Pot forma multiple celule (ex. celulele stem mezenchimale - osteoblaste, condrocite, miocite și adipocite)

– **Celule stem oligopotente**

- Pot forma un anumit număr de linii celulare specifice unui țesut (ex. celulele stem neurale pot forma un subset de neuroni cerebrali; celulele stem hematopoietice pot forma subseturile de celule sanguine)

– **Celule stem unipotente**

- Celule care formează o singură linie celulară (ex. Spermatogoniile se diferențiază doar în spermatozoizi)

Proprietatile celulelor stem

Markeri nucleari:

Oct4

Sox2

Nanog

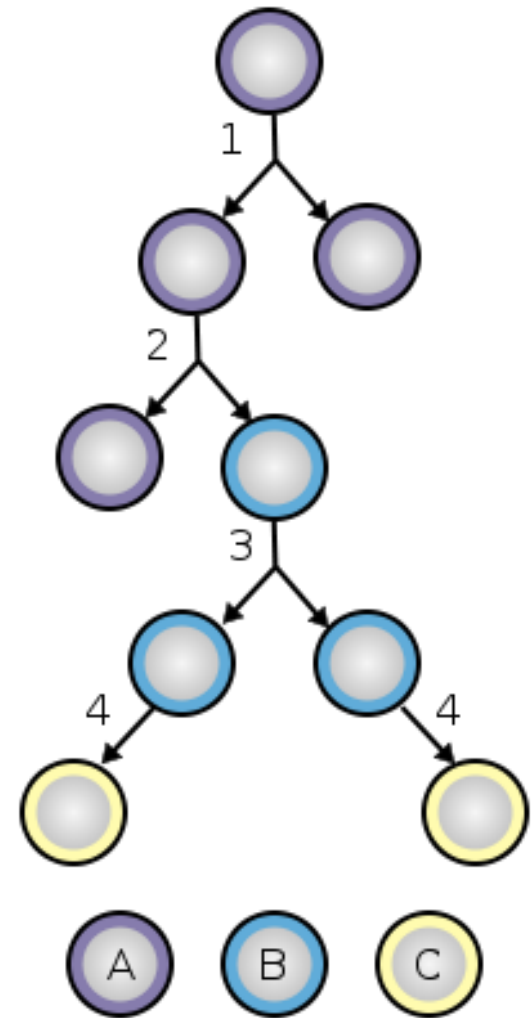
Markeri de suprafata:

TRA-1-81

TRA-1-60

SSEA-4

SSEA-3






A-Stem/B-Progenitoare/C-Diferentiata

- Auto-replicare
- Diferențiere in celule specializate

- Diviziunea simetrică sau asimetrică depinde de:
 - Mecanismele intrinseci (factorii de polaritate, alte mecanisme interne)
 - Mecanisme extrinseci (poziționarea asimetrică în raport cu mediul extracelular, ceea ce duce la acțiunea unor semnale diferite asupra celor două celule)

Celule stem, celule precursorare si celule diferențiate

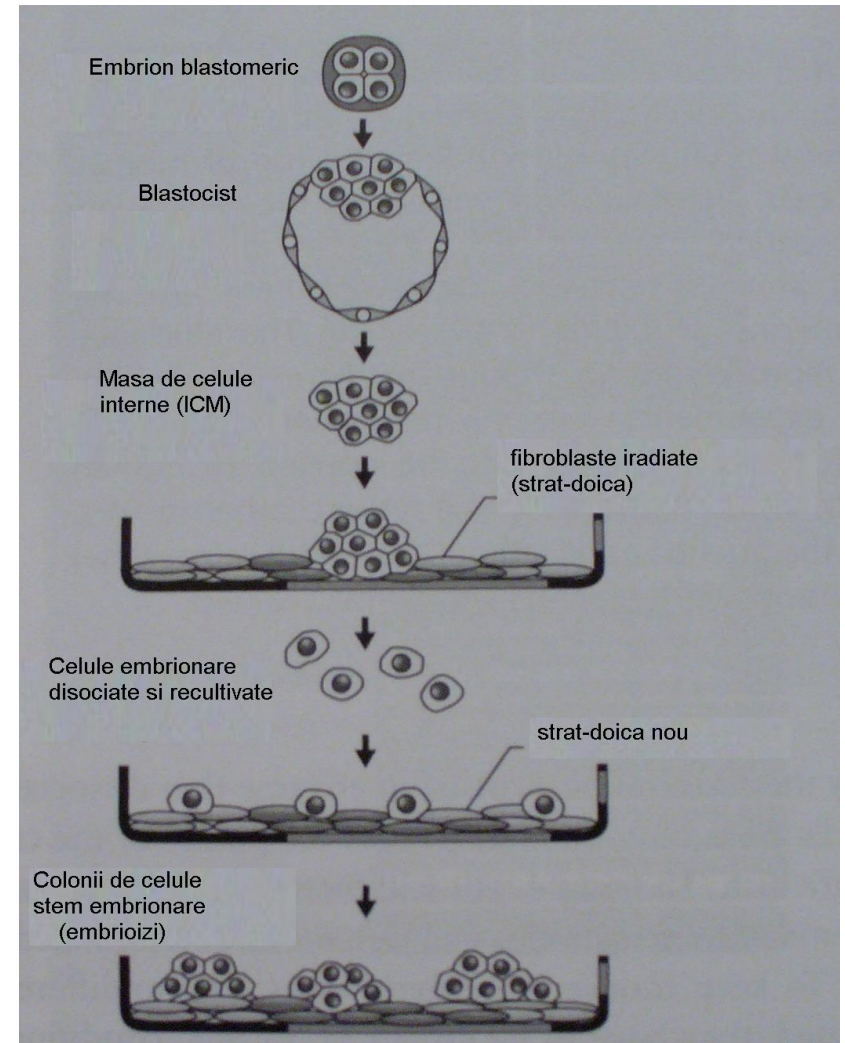
- Încetarea semnalelor intrinseci si extrinseci care mențin celula stem în stare nediferențiată
- 
- stadiu de precursor sau celulă tranzitorie de amplificare
- 
- Celulă diferențiată, cu funcții specializate pentru o perioadă prelungită de timp
- 
- Moarte celulară

Alte proprietăți ale celulelor stem progenitoare

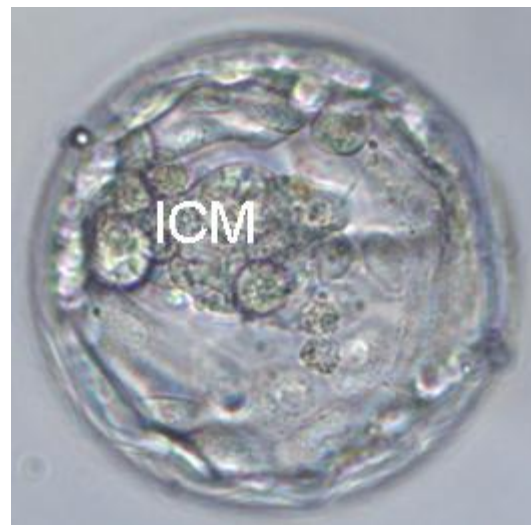
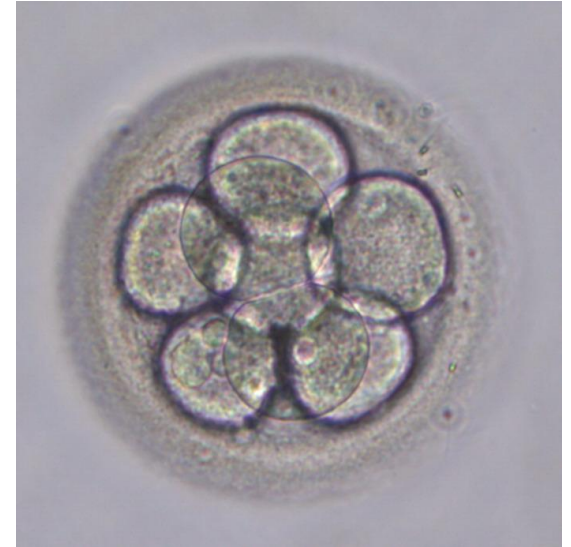
- Rediferențierea
 - Revenirea la o etapă tranzitorie anterioară, la un fenotip mai puțin matur (ex. dediferențierea condrocitelor în fibroblaste la trecerea de la sistemul de cultură 3D la 2D)
- Transdiferențierea (fenomen controversat)
 - Trecerea unei celule diferențiate de la un fenotip la altul, fără a trece prin etapa de dediferențiere (ex. transformarea celulelor pancreatice în hepatocite)
- Plasticitatea
 - Abilitatea celulelor stem adulte dintr-un țesut de a genera celule diferențiate specifice altui tip de țesut (ex. celulele stem hematopoietice pot forma, în afară de celulele sângelui, keratinocite, hepatocite, neuroni, cardiomiocite)

Celulele stem embrionare

- Au fost izolate pentru prima data în 1981 de Evans și Kaufman
- Pot fi recoltate din embrion în stadiul blastomeric sau blastocitar de dezvoltare
- Sunt transferate în sistem de cultură pe un strat de celule doică (fibroblaste)
- Coloniile celulare formate sunt periodic dezintegrate și recultivate în mediu de cultură proaspăt



Etape de dezvoltare embrionară, în care se obțin celulele stem embrionare



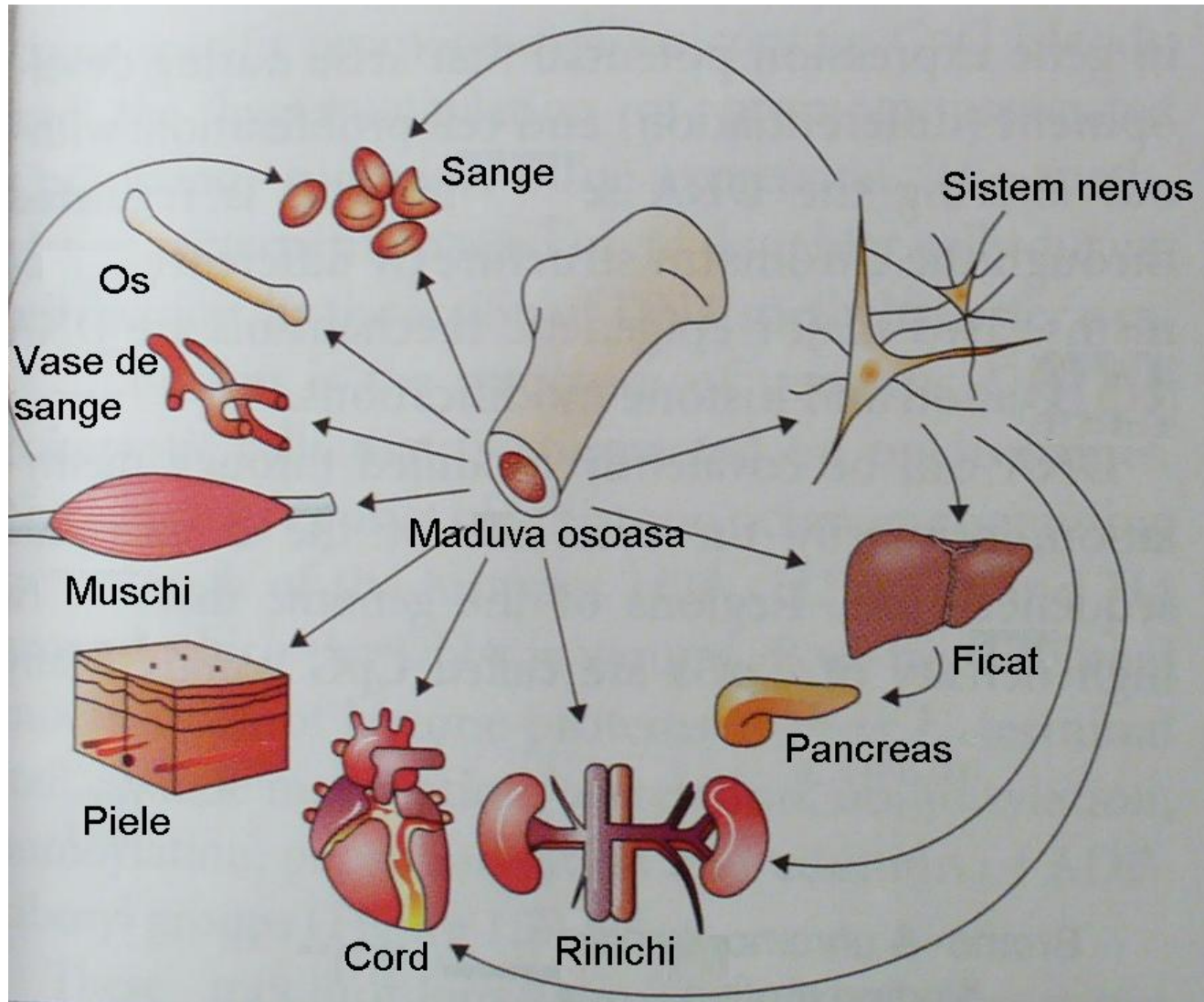
Caracteristicile celulelor stem embrionare

- Se pot autoreplica la infinit în prezența GF specifici
- Prezintă markeri specifici (Oct4, fosfataza alcalină, antigenul embrionar de tipul SSEA și altele)
- Diferențierea *in vitro* începe cu formarea corpurilor embrioizi (agregate flotante, parțial diferențiate)
- Cultivarea embrioizilor în sistem de picătură suspendată, duce la o diferențiere într-o manieră caracteristică pentru perioada post-implantațională timpurie
- Metode *in vivo* care demonstrează pluripotența celulelor SE:
 - injectarea celulelor stem embrionare subcutanat, intrarenal sau testicular, la șoricei imunodeficienți. În zona de implantare se formează o tumoră benignă (teratomă), care va conține celule de diferite tipuri, provenite din toate foițele embrionare
 - obținerea de animale himere (injectarea celulelor stem embrionare în interiorul blastocitului și apoi transferul intrauterin al blastocistului. Se constată o repartiție uniformă a celulelor rezultate din celulele stem injectate

Celule stem adulte

- Sunt celulele nediferentiate (nespecializate) localizate în țesuturile diferențiate
- Au fost descoperite cu aproximativ 50 de ani. În 1961 și 1963 apar primele publicații care relatau prezenta a două tipuri de celule stem în măduva hematopoietică
 - Celule stem hematopoietice, cele din care iau naștere elementele figurate ale sangelui
 - Celule medulare stromale (celule stem mezenchimale), o populație heterogenă de celule precursorare, care se pot diferenția în celule osoase, cartilaj, adipocite și celulele tesutului conjunctiv al măduvei hematopoietice
- Până în prezent, celule cu proprietati asemanatoare celulelor stem mezenchimale au fost descoperite în toate țesuturile diferențiate (cord, ficat, pancreas, creier, pulpa dentara, epiderm etc.)

Plasticitatea celulelor stem adulte



Surse de celule stem adulte, usor accesibile

- Măduva hematopoietică
- Sângele periferic, după mobilizarea celulelor stem din măduva hematopoietică cu ajutorul tratamentelor cu citokine (G-CSF)
- Placenta și cordonul ombelical – sursa celulară productivă și ușor de recoltat
- Țesut adipos obținut prin liposucție

Caracteristicile moleculare ale celulelor stem adulte

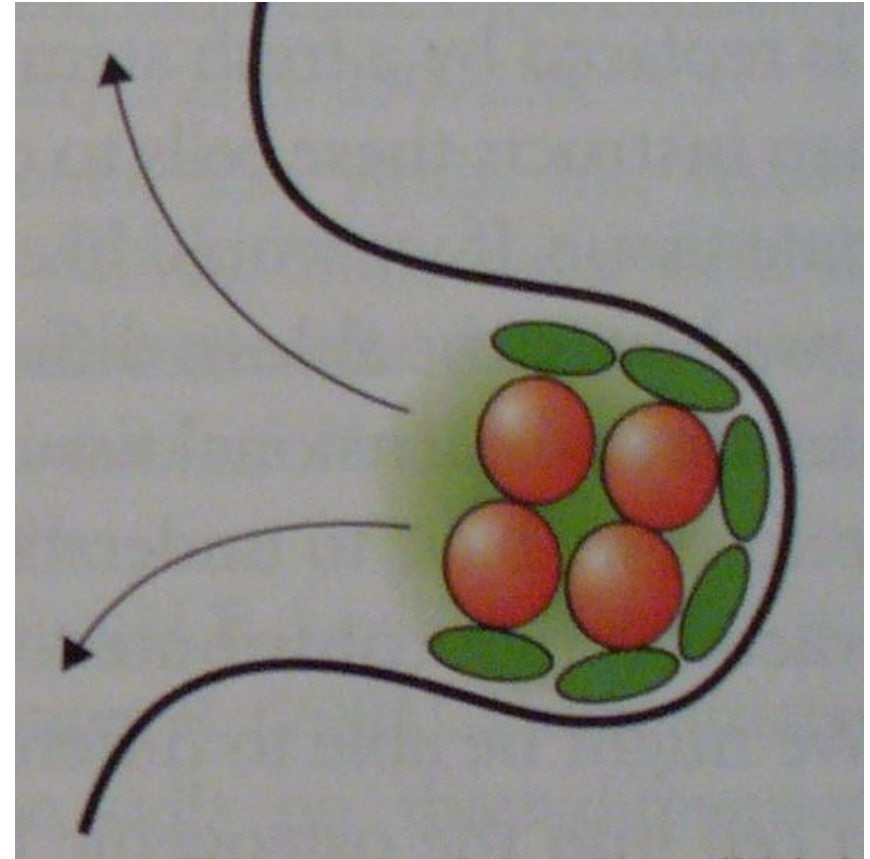
- Celulele stem se identifică cu markeri de suprafață
- Combinația specifică a unor markeri sau absența unor markeri stau la baza identificării și purificării unui anumit tip de celule dintr-un amestec celular
- Majoritatea markerilor specifici sunt proteine membranare din categoria proteinelor CD (Cluster of differentiation)
- Markerul caracteristic pentru toate celulele stem hematopoietice este CD34, iar în funcție de prezența acestuia împreună cu unul sau mai mulți alți markeri, definește și permite izolarea unei subpopulații foarte pure de celule stem hematopoietice.
- Celulele stem mezenhimale, spre deosebire de celulele stem hematopoietice, au ca marker specific proteina STRO-1, iar markerul CD34 este absent.

Capacitatea funcțională a celulelor stem mezenchimale umane

- Demonstrații *in vitro* (culturi de celule)
- *In vitro* celulele stem mezenchimale pot genera adipocite, condrocite și procese de mineralizare specifice osului
- Primele celule stem mezenchimale au fost izolate de Friedenstein, în 1979, din grasime, prin centrifugarea în gradient de densitate.
- Doar 0,001-0,01% din celulele izolate s-au dovedit a fi cele stem
- După o amplificare prin multiplicare *in vitro*, au fost obținute culturi de celule diferențiate de tipul celor adipoase, condroide și osteoide

Micromediul celulelor stem

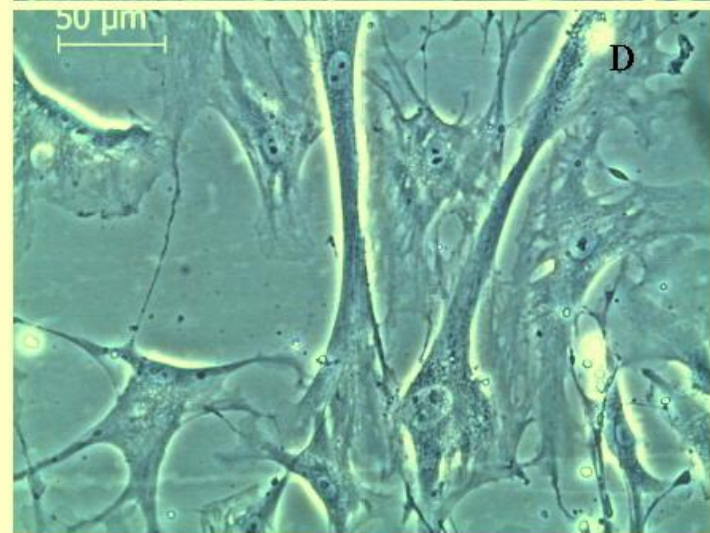
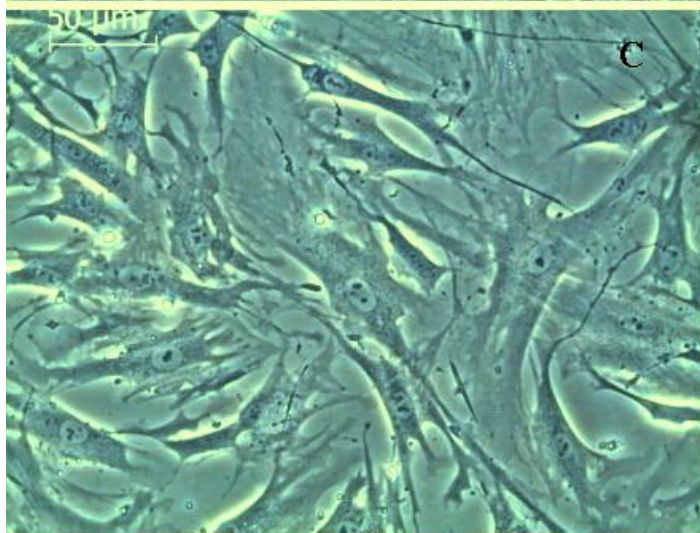
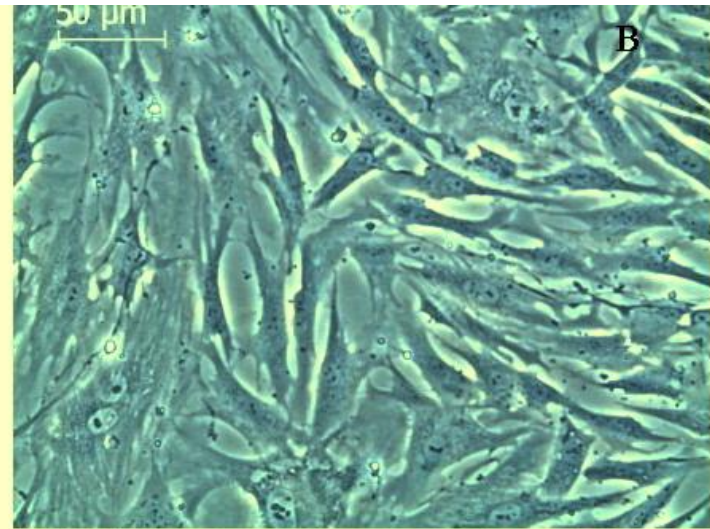
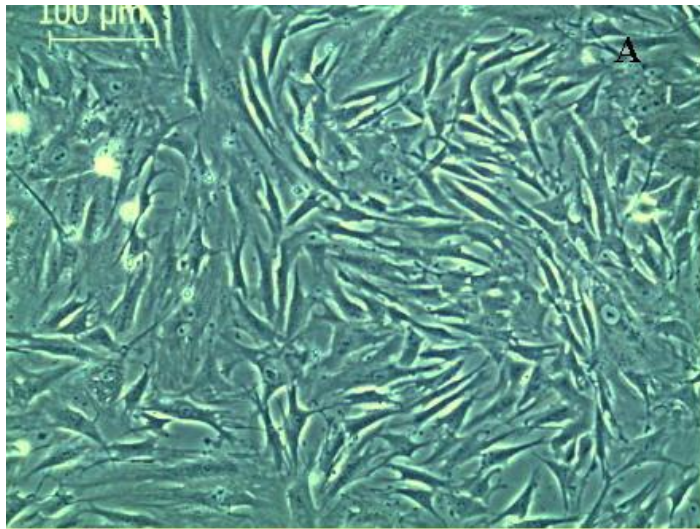
- Fiecare celulă stem adultă are o localizare anatomică specifică în țesut – nișa celulară
- Nișa reprezintă micromediul celular, care adăpostește, protejează și reglează balanța dintre celulele active și cele în repaus
- Nișa celulară determină menținerea rezervei de celule stem, diferențierea precursorilor și eliberarea celulelor diferențiate
- Factorii care acționează asupra celulelor stem în nișa sunt:
 - celulele asemănătoare din nișa și alte tipuri de celule stem
 - MEC
 - Factorii reglatori solubili și cei asociați MEC



Senescența replicativă a celulelor stem

- Celulele stem mezenchimale au o viață replicativă mai scurtă decât a celulelor stem embrionare – 50-70 diviziuni celulare
- Senescența replicativă este determinată de scurtarea telomerelor - regiunea terminală a cromizomului, alcătuită din terminația repetitivă de tipul TTAGGG
- La fiecare diviziune celulară, se pierde o parte din secvența repetitivă, din cauză replicării incomplete
- Scurtarea treptată a telomerelor duce la alterarea progresivă a ADN și implicit la moartea celulară

Aspectul celulelor stem adulte in cultura *in vitro*






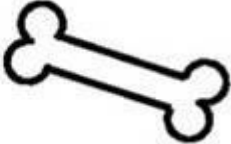
Imortalizarea celulelor stem

- Ceulele stem embrionare exprimă un nivel crescut de telomerază, enzimă care adaugă secvențe repetitive la capătul terminal al telomerului
- Majoritatea celulelor au expresie foarte mică sau chiar nedetectabilă a telomerazei
- Imortalizarea prin restabilirea activității telomerazice cu hTERT (human telomerase revers transcriptase)
 - hTERT este subunitatea catalitică a telomerazei și poate fi introdusă în celulă cu ajutorul vectorilor retrovirali
 - Tratarea celulelor stem mezenchimale cu hTERT prelungește și stabilizează fenotipul nediferențiat

**Celule stem
embrionare**

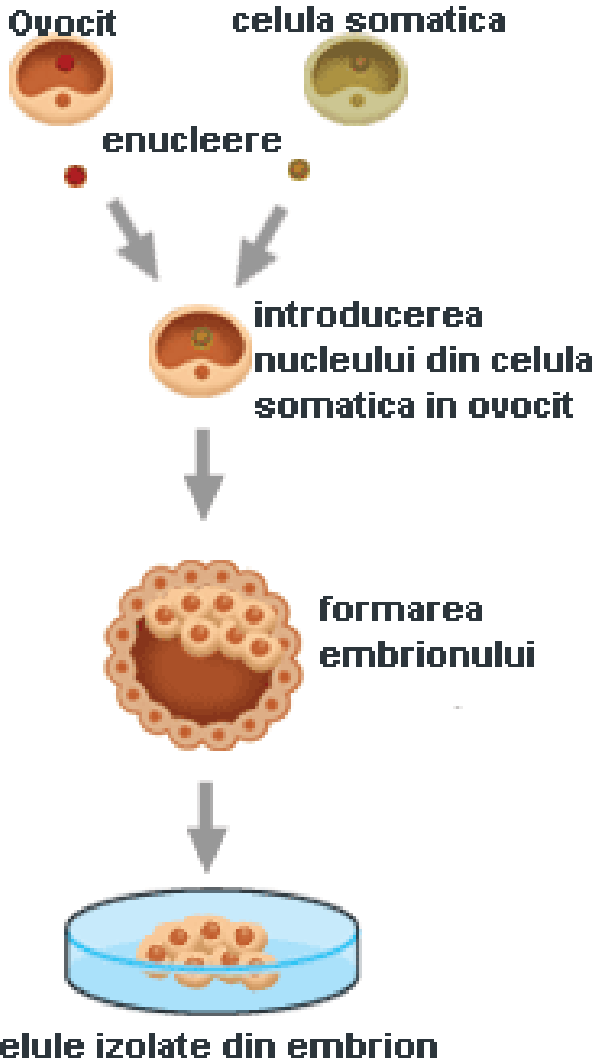
VS

**Celule stem
pluripotente adulte**

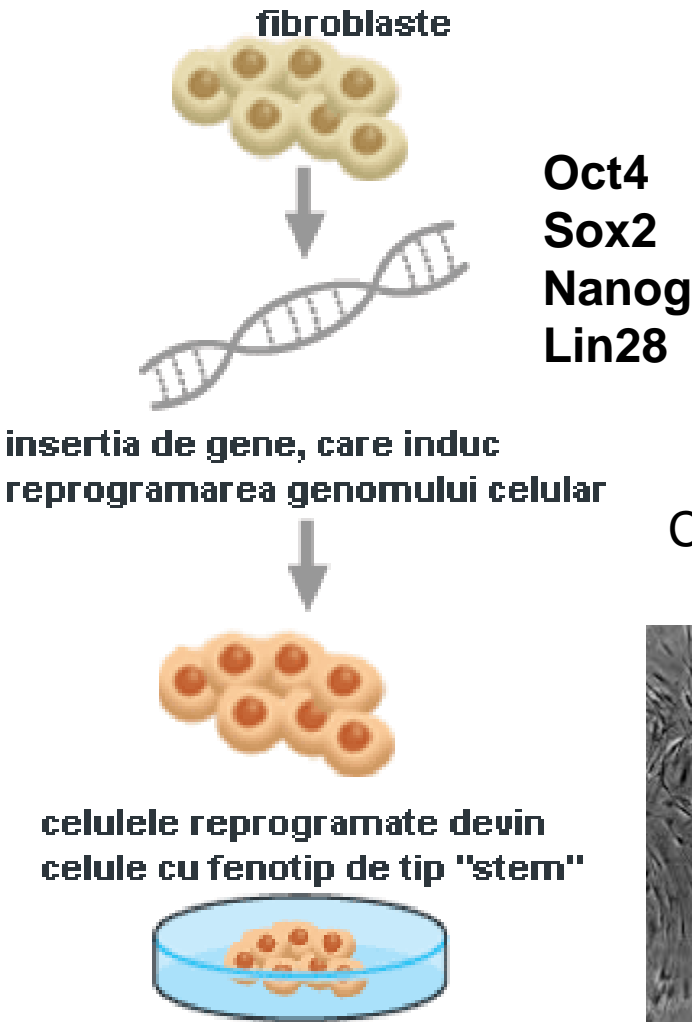
multiplicare rapida	potential oncogenic	
plasticitate de diferentiere		celule stem embrionare
foarte bine caracterizate	disponibilitate tisulara	
	restrictii de diferentiere	
	bariere etice privind utilizarea	SNC fetal sau de adult
accesibilitate	potential fenotipic nesigur	
sigure in utilizarea clinica		dermul cutanat
posibil autologe		
fara restrictii etice		stroma maduvei osoase
+	-	

PESC (pluripotent embryonic stem cells) vs iPSC (induced pluripotent stem cells)

Clonare terapeutică



Reprogramare nucleară



Corp embrioid obținut din iPSC

