

Generación de células iPS en el campo de las Enfermedades Raras

Salvador Martí Pérez¹, Virginia Corrochano James¹, Jose María Millán Salvador^{1,2}, Francesc Palau Martínez^{1,3}.

¹ CIBERER Biobank, Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP), Valencia, España;

² Unidad de Genética, Instituto de Investigación Sanitaria-La Fe, Valencia, España; ³ Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, España.

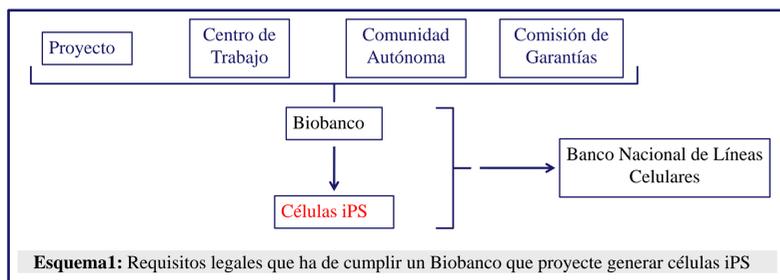
Células Madre Pluripotentes Inducidas

Las células madre pluripotentes inducidas o células iPS (del inglés *Induced-Pluripotent Stem Cells*) son células capaces de diferenciarse en todos los tejidos del organismo adulto, tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo que su potencial para aplicaciones médicas y farmacológicas es enorme. Además, sufren un proceso de auto-renovación simétrico, por lo que se pueden mantener y expandir en cultivo de forma indefinida sin perder sus atributos funcionales y permiten el desarrollo de modelos celulares de la enfermedad específicos de cada paciente. Asimismo, las células iPS pueden ser utilizadas en el descubrimiento de fármacos y/o en test toxicológicos personalizados para el diseño de tratamientos específicos.

En este sentido, la obtención de células iPS se podría considerar como un gran paso en el avance y desarrollo de la medicina personalizada, especialmente en el ámbito de las Enfermedades Raras.

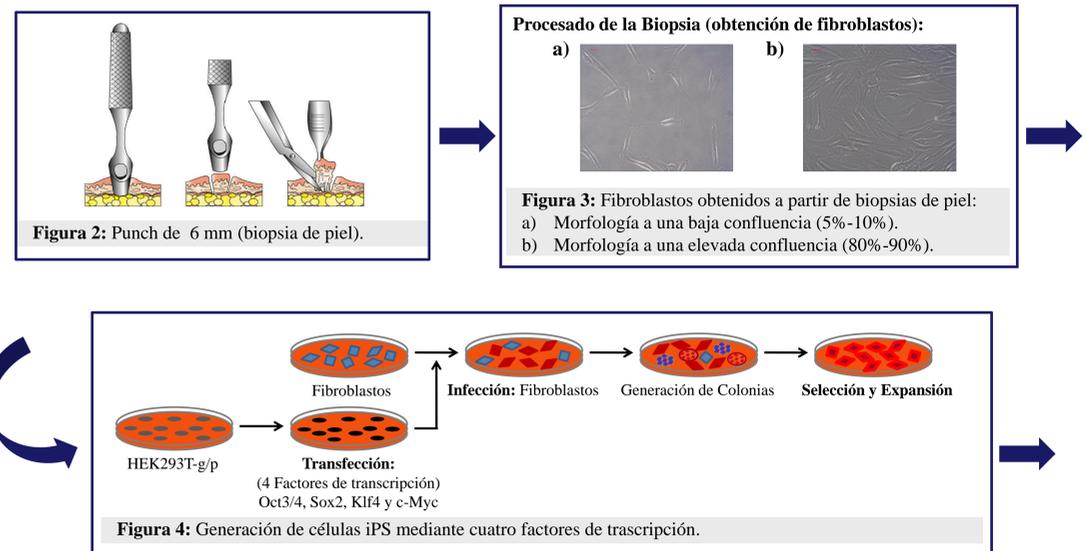
Requisitos legales a cumplir (Biobanco):

- 1.- Participar en un proyecto de investigación para generar células iPS, bien como parte subcontratada o como colaboradores.
- 2.- Autorización del centro de realización del proyecto así como del Comité de Ética al que éste esté adscrito.
- 3.- Compromiso de cesión al Banco Nacional de Líneas Celulares de cualquier línea pluripotente que se genere.
- 4.- Autorización de la Dirección General de Ordenación, Evaluación e Investigación Sanitaria de la CCAA donde resida el IP del proyecto.
- 5.- Informe favorable, antes del inicio del proyecto, de la Comisión de Garantías para la donación y utilización de células y tejidos humanos de la Subdirección General de Investigación en Terapia Celular y Medicina Regenerativa, autorizando la generación de líneas pluripotentes en el marco del proyecto de investigación en concreto.



Generación de células iPS:

Las células iPS se obtienen mediante la reprogramación de células derivadas de un tejido adulto a un estado embrionario. El protocolo más utilizado y reproducible para la obtención de células iPS, y en el que está trabajando el Biobanco del CIBERER (CBK), consiste en la expresión retroviral de cuatro factores de transcripción Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc en células somáticas. Aunque una gran cantidad de tipos celulares han sido reprogramados de forma satisfactoria, el tipo celular más frecuentemente utilizado para la generación de células iPS humanas son los fibroblastos dermales, los cuales proceden de cultivos de biopsias de piel.



Caracterización Molecular y Funcional:

- a) Silenciamiento de los ADNs exógenos utilizados para el proceso de reprogramación por PCR utilizando oligos específicos que diferencian entre las formas endógenas y recombinantes
- b) Expresión de marcadores de pluripotencia mediante PCR, utilizando oligonucleótidos específicos:
NANOG, OCT4, SOX2, REX1, NODAL, FGF4, ESG1/DPPA5, GDF3 y LEFTY1
- c) Expresión de marcadores de pluripotencia mediante inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos específicos:
NANOG, OCT4, TRA-1-60 y TRA-1-81
- d) Ensayo de pluripotencia mediante la inducción de la diferenciación de los clones de células iPS *in vitro*: Método de agregación celular en cuerpos embrionados
- e) Análisis la expresión de marcadores propios de las tres capas germinales mediante PCR:
endodermo: FOXA2, SOX17 y AFP
mesodermo: BRACHYURY, DESMIN, MSX1 y KDR
ectodermo: PAX6, GFAP, MAP2 y SOX1
- f) Análisis la expresión de marcadores propios de las tres capas germinales mediante inmunofluorescencia:
endodermo: AFP
mesodermo: SMA
ectodermo: NESTIN
- g) Análisis del silenciamiento de los marcadores de pluripotencia.
- h) Análisis del cariotipo.

Entidades Colaboradoras