

NOMBRE: CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE CÉLULAS ANIMALES (I5)

PROFESOR RESPONSABLE: Francisco José Alonso Carrión (Universidad de Málaga)

PROFESORES PARTICIPANTES:

Segura Checa, Juan Antonio (Universidad de Málaga)

Lobo García, Carolina (Universidad de Málaga)

Ana Rodríguez Quesada (Universidad de Málaga)

DESCRIPTORES:

Cultivo celular, transfección, transducción, animales transgénicos, knockout, terapia génica.

OBJETIVOS DEL APRENDIZAJE

El presente curso tiene como principal objetivo establecer los fundamentos teórico-prácticos del empleo de células animales y de la tecnología básica asociada a su manipulación génica, así como a describir sus principales aplicaciones en el campo biotecnológico.

Al final de este curso, el alumno debería haber comprendido que éstas técnicas pueden ser de gran valor para generar, entre otras cosas, modelos de experimentación muy útiles para la resolución de problemas biológicos de índole tanto básica como aplicada. Se hará especial énfasis sobre la metodología asociada al cultivo *in vitro* de células animales y a la discusión de las técnicas de las que disponemos para transferirles material genético.

La introducción de un material genético nuevo y exógeno (DNA/RNA) a una célula animal puede proporcionar en algunos casos ganancia de función, en otros, pérdida de la misma o la generación de mutaciones, lo que abre un enorme abanico de posibilidades desde el punto de vista investigador.

Una de las aportaciones más fructíferas del estudio de los requerimientos nutricionales específicos necesarios para el crecimiento de células animales de diferentes tejidos, y el desarrollo de las técnicas de transferencia génica, ha sido la generación de animales transgénicos. A nadie puede escapar que sin la experiencia acumulada tras más de un siglo de investigación sobre el cultivo de tejidos no podrían haberse desarrollado estos nuevos y valiosísimos modelos de experimentación. El empleo de estos animales ha ayudado, no solo, a esclarecer aspectos básicos, oscuros hasta el momento, de la fisiología humana tanto normal como patológica (cáncer, enfermedades neurodegenerativas, etc...) o al desarrollo de las técnicas de clonación y fertilización *in vitro*, por ejemplo, sino que ha abierto un interesantísimo campo en la mejora agropecuaria o en la utilización de animales para la producción de proteínas recombinantes de alto valor biotecnológico y comercial.

En la base de la experimentación con células en cultivo está también el desarrollo de la todavía “en pañales” pero muy prometedora terapia génica o el desarrollo de la llamada “bioingeniería tisular”. Esta última materia será el objeto específico de otro de los cursos de doctorado que serán impartidos en este programa.

De acuerdo a lo ya dicho, y como se verá mas adelante, se justifica que uno de los

temas propuestos en este curso se dedique a estudiar las principales técnicas para generar animales transgénicos y a describir sus principales aplicaciones, y otro, a introducir los fundamentos básicos de la terapia génica.

El programa que se presenta, consta de 3 créditos de los cuales 1 será destinado a realizar prácticas de laboratorio. El contenido del curso precisa de una base conceptual previa eminentemente biológica por lo que está probablemente mas orientado a completar la formación de alumnos de postgrado procedentes de la Licenciatura en Ciencias Biológicas. No obstante, considero que podrá ser seguido sin problemas por alumnos procedentes de otras Licenciaturas con conocimientos básicos en Biología General y Bioquímica.

N^a DE CREDITOS ECTS: 4

TIPO: Optativo (orientación investigadora)

SECUENCIA: 2^a trimestre

CARÁCTER: Teórico-práctico

DESARROLLO: Presencial

BLOQUES TEMATICOS

Tema 1.- Cultivo de células animales. Definiciones básicas y principales aplicaciones del cultivo de células animales. Aspectos históricos del cultivo de tejidos. Clasificación de cultivos celulares según el origen celular: cultivos primarios y líneas celulares. Tipos de líneas celulares. Clasificación según la forma de crecimiento: células adherentes y en suspensión. Líneas celulares continuas y transformadas. Establecimiento de cultivos primarios. El laboratorio de cultivos celulares. Consejos para el mantenimiento de buenas condiciones asépticas de trabajo. Técnicas básicas para el mantenimiento de líneas celulares: Medios de cultivo y su preparación, cuantificación de células, realización de subcultivos, congelación celular. Separación celular. Principios de la citometría de flujo. Escalado de los cultivos de células animales: Diseño de biorreactores.

Tema 2.-Manipulación genética de células de animales. Métodos de transferencia génica a células animales. Transfección de células animales. Conceptos de transfección y transformación. Transfección química. Transfección mediada por liposomas. Lipofección. Electroporación. Transferencia directa de DNA : microinyección y bombardeo con partículas. Evaluación de la eficiencia de la transfección: genes reporteros. Transducción: transferencia génica mediada por virus (SV40, Adenovirus, Virus adeno-asociados, Retrovirus, etc...). Transfección génica con bacterias. Expresión de genes en células animales. Elementos necesarios para la expresión de un DNA exógeno en células de mamífero. Marcadores de selección para células animales: endógenos y dominantes. Marcadores de selección y amplificación génica en células animales.

Tema 3.- Manipulación genética de animales. Introducción a las diferentes fases del desarrollo embrionario. Métodos para producir ratones transgénicos: microinyección de pronúcleos de huevos fertilizados, transfección de células madre embrionarias, retrovirus recombinantes, transferencia nuclear. Discusión crítica de los diferentes métodos. Principales aplicaciones de los ratones transgénicos. Animales transgénicos como biorreactores. Ratones transgénicos como modelo de enfermedades humanas (cáncer y otras), una discusión crítica Factores que influyen en la expresión de transgenes. Sistemas inducibles para la expresión de transgenes. “Gene targeting”. Sistemas para la generación de ratones transgénicos con mutaciones en genes específicos y “knockout” (KO). Manipulación específica de genomas animales con recombinasas lugar específicas: sistema de la Cre-recombinasa. Estrategias de inactivación génica sin modificación directa de genes diana: antisentidos, ribozimas, RNAi. Inhibición génica a nivel de proteínas.

Tema 4. Terapia génica. Principios en los que se basa la terapia génica. Métodos para la inserción y expresión de un gen en una célula o tejido diana. Métodos para reparar o inactivar un gen causante de enfermedad en una célula o tejido. Silenciamiento mediante siRNAs en vectores retrovirales y adenovirales. Ejemplos de terapia génica en humanos.

BIBLIOGRAFIA BASICA

- I. Freshney Wiley-Lyss (2005) Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique R., 5 Edition
- R. M. Twyman (2005) Gene Transfer to Animal Cells Bios Scientific Publishers Limited,
- S. Prinrose, R. Twyman, B. Old and G. Bertola (2006) Principles of Gene Manipulation and Genomics Blackwell Publishing Limited; 7 edition
- Strachan and A. Read Garland (2004). Human Molecular Genetics