

DATOS DE LA ASIGNATURA

NOMBRE: Cultivo y manipulación de células animales. Terapia génica.

PROFESORES: Dr. Francisco José Alonso Carrión (UMA) (Coordinador)

Dra. Inmaculada Ruz Maldonado (King's College London)

(Profesora externa)

CARGA LECTIVA: 4 Créditos (2Teóricos + 2Prácticos)

REQUERIMIENTOS PREVIOS

El contenido del curso precisa de una base conceptual previa eminentemente biológica por lo que está probablemente orientado a completar la formación de alumnos de postgrado procedentes de los grados de Biología, Bioquímica/Biotecnología o ciencias afines como Farmacia o Medicina. No obstante, consideramos que con un mínimo esfuerzo podrá ser seguido también sin problemas por alumnos procedentes de otros grados como los de Química o algunas Ingenierías relacionadas con la salud.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE CONTENIDOS DE LA ASIGNATURA

Esta asignatura tiene como principal objetivo establecer los fundamentos teórico-prácticos del empleo de células animales y de la tecnología asociada a su manipulación génica tanto *in vitro* como *in vivo*. Asimismo, se describirán las principales aplicaciones de estas técnicas en investigación básica y en la obtención de modelos animales útiles para la obtención de productos de alto valor biotecnológico.

El primero de los temas está dedicado a introducir el lenguaje asociado al cultivo de células animales *in vitro*, sus requerimientos nutricionales mínimos y sus principales aplicaciones. Se llevará a cabo también una descripción del material empleado para cultivar células, los aparatos básicos que se usan en los laboratorios de cultivos celulares, así como de las precauciones a tener en cuenta para evitar contaminaciones.

La introducción de un material genético 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 y práctico. El segundo de los temas se dedica a introducir los principales mecanismos (físicos, químicos y biológicos), para manipular genéticamente células animales de toda procedencia, indicando sus ventajas e inconvenientes respectivos.

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 y modificados genéticamente. 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 sólo, 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, y la utilización de animales como auténticos biorreactores para la producción de proteínas recombinantes de alto valor biotecnológico. El tercer tema del curso se dedica a describir con detalle los principales procedimientos experimentales para la obtención de animales transgénicos y *knock-outs* (condicionales y no condicionales) y sus principales aplicaciones en la investigación básica y en biotecnología.

En la base de la manipulación de células en cultivo están también la, todavía “en pañales”, pero muy prometedora terapia génica o el desarrollo de la “bioingeniería tisular” (esta última materia será el objeto específico de otro de las asignaturas de este máster), por ejemplo. El cuarto y último de los temas de este módulo se dedicará a describir los principios de la terapia génica, sus logros hasta el día de hoy y las promesas que esta estrategia terapéutica ofrece en el futuro.

Una descripción general de los principales tópicos a tratar en los cuatro temas comentados se muestra a continuación.

BLOQUES TEMATICOS

Tema 1.- Cultivo de células animales in vitro.

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. Cultivos 3D. 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 para células animales.

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. Sistema de edición de genomas CRISPR-Cas9 y transgenia. Estrategias de inactivación génica sin modificación directa de genes diana: antisentidos, ribozimas, RNAi y miRNAs. Interferencia directa de las proteínas expresadas.

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.

PRÁCTICAS DE LABORATORIO

Las prácticas se llevarán a cabo en grupos superreducidos de no más de 6 estudiantes, los cuales serán atendidos al menos por un profesor.

El programa de prácticas tiene como objetivo general suministrar al alumno la información básica necesaria para poder desenvolverse con garantías en un laboratorio de cultivos celulares, conocer el funcionamiento de su equipamiento básico y respetar las exigidas condiciones de higiene para evitar contaminaciones.

Se empleará un sistema multitarea programado de forma que cada día se inicien tareas nuevas y/o se terminen otras iniciadas con anterioridad.

Las tareas programadas constituyen la base del 90% del trabajo rutinario que todo investigador que utiliza cultivos celulares lleva a cabo en su quehacer diario.

Al final del programa de prácticas se pretende, entre otras consideraciones, que el alumno haya aprendido a:

- 1) Preparar medios de cultivo y contar células con diferentes estrategias.

- 2) Llevar a cabo el subcultivos de líneas celulares continuas, realizar curvas de crecimiento y determinar sus parámetros característicos.
- 3) Congelar y descongelar células.
- 4) Llevar a cabo ensayos de citotoxicidad empleando MTT
- 5) Realizar ensayos sencillos de transfección y analizar sus resultados.

PROFESORES

1) **Dr. Francisco José Alonso Carrión** (Coordinador de la asignatura)

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias (UMA)

El profesor Alonso estudió Bioquímica en la Universidad Complutense de Madrid y realizó su tesis Doctoral en la Universidad de Málaga. La mayor parte de su actividad docente e investigadora la ha desempeñado en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la UMA. En la actualidad, es catedrático de Bioquímica y Biología Molecular. Desde su entrada en el Dpto. de Biología Molecular y Bioquímica su tarea investigadora se ha centrado en el estudio del metabolismo nitrogenado tumoral, línea iniciada por el profesor Dr. D. Ignacio Nuñez de Castro hoy en situación de jubilado. Más concretamente, el principal interés del grupo de investigación al hoy pertenece es dilucidar el papel que desempeñan las diferentes isoenzimas de Glutaminasa (GA) (EC 3.5.1.2), en el estrés oxidativo y en la reprogramación metabólica tumoral y, recientemente, en el cerebro de los mamíferos. En estos campos, ha publicado un número significativo de trabajos de investigación en revistas de reconocido prestigio internacional. El profesor Alonso ha contribuido también al desarrollo de importantes modelos de experimentación en el campo tumoral y posee tres patentes de utilidad de la que es primer firmante en dos de ellas. Ha realizado diferentes estancias en centros de prestigio extranjeros destacando la realizada en la Universidad de California Santa Cruz (Sinsheimer's Labs) donde fue Research Associate. Allí adquirió gran experiencia en el cultivo y manipulación de células *in vitro* y en la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales. Dicha experiencia le sirvió para diseñar el laboratorio de cultivos celulares de los Servicios Centrales de Investigación (SCAI) de la UMA, del que fue responsable científico durante cinco años. Sus últimas tesis dirigidas versan sobre la obtención de animales *knock-out* condicionales para las isoenzimas L de GA por lo que tiene experiencia de primera mano en este campo. Al margen de su labor investigadora el profesor Alonso posee una dilatada experiencia docente, habiendo impartido diferentes asignaturas en las licenciaturas de Químicas, Biología, Ciencias Ambientales y Bioquímica, así como en diferentes cursos de doctorado y maestrías. Entre sus labores de gestión la más destacada es la de haber sido durante 10 años director del Dpto. de BM y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la UMA.

2) **Dra. Inmaculada Ruz Maldonado** (Profesora externa)

Es Licenciada en Biología por la Universidad de Málaga, y Doctora en Biología por la misma Universidad (2017), aunque gran parte de sus experimentos los llevó a cabo en el King's College de Londres. En la actualidad es Investigadora Postdoctoral de la División de Diabetes asociada al Guy's Hospital, Hodgkin Building del mencionado King's College de Londres. La Dra. Maldonado desarrolla su actividad investigadora en el campo científico de la diabetes tipo II, siendo experta en la obtención y estudio de islotes pancreáticos, tanto de roedores como de humanos. De manera más precisa su interés particular está centrado en el estudio molecular de la acción de endocannabinoides y análogos sintéticos de estas moléculas (activadores e inhibidores) sobre la fisiología de las células beta de los islotes de Langerhans. Pese a su juventud, la Dra. Maldonado tiene un grupo significativo de publicaciones indexadas en el primer cuartil y primer decil del Science Citation Report y ha participado e impartido charlas en multitud de ponencias y congresos internacionales. Asimismo, ha recibido ayudas de la asociación europea para el estudio de la diabetes (EFSD), a partir de la cual recibió la prestigiosa beca Albert Renold Fellowship for Young Scientist.

