

Póster

Obtención y caracterización de células de pluripotencia inducida a partir de monocitos humanos



Eduardo Rodríguez Bocanegra, Berta de la Cerda Haynes, Francisco Javier Díaz Corrales, Shomi Battaracharya

Departamento de Terapia Celular y Medicina Regenerativa. Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Avda. Américo Vespucio s/n, Parque Científico y Tecnológico Cartuja, Sevilla, España.

Palabras clave: Células de pluripotencia inducida; Reprogramación celular; Monocitos

RESUMEN

La obtención de células de pluripotencia inducida (iPS) a partir de células somáticas ha proporcionado al campo de la medicina regenerativa una nueva herramienta para la terapia celular, evitando los problemas éticos relacionados con las células madre embrionarias (ESC) (Ronen et al. 2012). Las iPS, al igual que las ESC, son capaces de diferenciarse hacia distintos tipos celulares por lo que pueden derivarse a modelos celulares de enfermedades, apropiados tanto para la investigación básica como para el ensayo de nuevas terapias. La fuente habitual de iPS son fibroblastos obtenidos de una biopsia de piel. En nuestro caso, el objetivo es poner a punto un sistema de generación de modelos celulares a partir de sangre periférica, que es el tejido adulto más accesible, por lo que la obtención de muestras es mucho menos invasivo, y además permite el acceso a numerosas muestras almacenadas en los bancos de sangre (Phillips et al. 2012). Concretamente, en nuestro proyecto pretendemos obtener epitelio pigmentario de la retina (RPE) a partir de monocitos de pacientes con degeneración macular (AMD) portadores de un genotipo de susceptibilidad a la enfermedad.

La metodología seguida ha consistido en el cultivo de monocitos sanguíneos y su transformación a iPS mediante la expresión de factores de reprogramación introducidos en la célula mediante el virus Sendai (SeV). El SeV es un virus no integrativo y se emplea como portador de los factores de transcripción claves para activar la pluripotencia, es decir, permite la expresión de transgenes sin el riesgo de modificación del genoma del hospedador (Fusaki et al. 2009). Además, la eficiencia de generación de iPS con el SeV es significativamente mayor que con otros métodos como la reprogramación por mARN o mediante vectores episomales.

Los clones de iPS obtenidos, antes de su diferenciación hacia RPE, han de ser caracterizados mediante la comprobación de la ausencia del SeV (por PCR), la expresión de marcadores de pluripotencia, mediante inmunocitoquímica y PCR (OCT4, SOX2, SSEA-4, NANOG) y ensayos de fosfatasa alcalina. Los resultados obtenidos nos permiten comprobar que la reprogramación ha sido satisfactoria.

Hasta el momento, hemos sido capaces de reprogramar células sanguíneas hacia iPS y mantenerlas. El siguiente paso será empezar a optimizar los protocolos de diferenciación hacia RPE. Tras caracterizarlo procederemos a realizar todo el proceso de reprogramación y diferenciación con muestras de pacientes con AMD.

BIBLIOGRAFIA

- Ronen, D., & Benvenisty, N. (2012). Genomic stability in reprogramming. *Current opinion in genetics & development*, 22(5), 444-449.
- Phillips, M. J., Wallace, K. A., Dickerson, S. J., Miller, M. J., Verhoeven, A. D., Martin, J. M., ... & Gamm, D. M. (2012). Blood-Derived Human iPS Cells Generate Optic Vesicle-Like Structures with the Capacity to Form Retinal Laminae and Develop Synapses. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(4), 2007-2019.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 85(8), 348-362.