



## Manipulación genética en las células madre

Leone, Paola E. <sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> Miembro y Ex Presidente, Sociedad Ecuatoriana de Genética Humana, Ecuador

<sup>2</sup> Ex Jefe, Grupo de Citogenética y Biología Molecular, Banco Andaluz de Células Madre, Ecuador

<sup>3</sup> Coordinadora, Laboratorio de Genética, SOLCA Núcleo de Quito, Ecuador

Correo para correspondencia: [peleone@yahoo.com](mailto:peleone@yahoo.com)

### Resumen

La manipulación genética ha permitido desarrollar células madre embrionarias (hESCs) y células madre pluripotentes inducidas (hiPSCs), las cuales tienen el potencial de diferenciarse a cualquier tipo de tejido, constituyéndose en un recurso importante de investigación y de aplicación biomédica. Sin embargo, la investigación con hESCs supone dificultades éticas como la utilización de embriones humanos y el problema del rechazo de tejidos después del trasplante en pacientes. Con los avances en reprogramación de fibroblastos de ratón y humanos a hiPSCs mediante la expresión de ciertos factores de transcripción se cuenta con una nueva herramienta en el campo de la medicina regenerativa. Así, con la reprogramación de células somáticas adultas se evitarían problemas de rechazo al generar hiPSCs directamente de células propias del paciente a tratar. En Ecuador aún no contamos con este recurso, en infraestructura, equipamiento y personal, pero es importante considerarlo como una alternativa de tratamiento.

**Palabras clave:** Manipulación genética, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas.

### Abstract

Genetic manipulation has made it possible to develop embryonic stem cells (hESCs) and induced pluripotent stem cells (hiPSCs), which have the potential to differentiate into any type of tissue, constituting an important resource for research and biomedical application. However, research with hESCs poses ethical difficulties such as the use of human embryos and the problem of tissue rejection after transplantation in patients. With the advances in reprogramming mouse and human fibroblasts to hiPSCs through the expression of certain transcription factors, a new tool is available in the field of regenerative medicine. Thus, with the reprogramming of adult somatic cells, rejection problems would be avoided by generating hiPSCs directly from the patient's own cells to be treated. In Ecuador we still do not have this resource, in terms of infrastructure, equipment and personnel, but it is important to consider it as a treatment alternative.

**Keywords:** Genetic manipulation, embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells.

### Artículo

Las células madre embrionarias (hESC, del inglés human embryonic stem cell) derivadas de embriones generados en la técnica de fecundación in vitro son células con capacidad de dar origen a tejidos de cualquier tipo, lo que significa un recurso importante de investigación y con posibilidades de aplicación biomédica. Desde su aislamiento y cultivo por primera vez por el grupo de Thompson [1] hasta ahora, se han derivado y mantenido hESCs con diferentes metodologías

sumando 829 líneas: 41,9% procedentes de Europa, 28,6% de Norteamérica, 25,7% de Asia, 3,7% de Oceanía y 0,1% de Latinoamérica [2].

Las líneas de España incluyen las derivadas en el Banco Andaluz de Células Madre a partir de embriones de mala calidad [3]. Se han generado según lo que establece el Real Decreto 413/1996 del 1 de marzo de 1996 sobre lo que se puede hacer con los embriones sobrantes: 1. Guardar para un próximo ciclo de fertilización in vitro (FIV), 2. Donar a otra pareja, 3. Desechar y 4. Donar a la ciencia. Sin embargo, la investigación con hESCs supone dificultades éticas como la utilización de embriones humanos y el problema del rechazo de tejidos después del trasplante en pacientes. En Ecuador, no hay una normativa sobre los embriones no utilizados en el proceso de FIV [4].

Una alternativa a estos problemas es la generación de células pluripotentes a partir de las propias células del paciente. Se ha logrado la reprogramación de fibroblastos de ratón y humanos a células madre pluripotentes (hiPSC, del inglés human induced pluripotent stem cell) a través de la introducción retroviral de cuatro factores de transcripción, Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc [5], aunque también se ha logrado la reprogramación en ausencia de c-Myc [6]. La solución de no emplear embriones humanos ha tenido un gran impacto llegándose a desarrollar 4 veces más líneas de tipo hiPSCs, con 3.123: 73,6% de Europa, 15,8% de Asia, 10,2% de Norteamérica y 0,4% de Oceanía [7].

En búsqueda de entender los mecanismos de acción de estos factores de transcripción en el proceso de desdiferenciación a células pluripotentes y desarrollar protocolos de reprogramación más eficientes se ha diseñado un protocolo alternativo utilizando el retroelemento humano LINE-1 como vehículo [8]. Aunque las células madre, hESCs y hiPSCs, representan una nueva herramienta en el campo de la medicina regenerativa, es importante considerar los riesgos que conlleva la integración de retrovirus o lentivirus que introducen los factores de transcripción y que al no ser silenciados, una vez que se han generado las células madre, pueden causar alteraciones genéticas [9].

Antes de plantearnos el uso terapéutico de hESCs o la generación de hiPSCs a partir de fibroblastos de pacientes con alguna enfermedad hematológica, decidimos analizar la estabilidad genética de líneas derivadas con diferentes metodologías, crecidas en distintas superficies, con pases de cultivo mecánico o enzimático, provenientes de diferentes laboratorios y países, lo que ha creado una gran variabilidad en las líneas [10].

Los estudios de citogenética convencional y molecular (FISH, CGH y SKY) no mostraron alteraciones cromosómicas [11], siendo el estudio citogenético el recomendado para la caracterización de cada línea. Sin embargo, los estudios moleculares evidenciaron alteraciones [12] y hemos recomendado la necesidad de aplicar tecnologías genómicas [13].

En Ecuador, aún no contamos con centros con toda la tecnología, desde la citogenética convencional y molecular hasta las de alta resolución y menos aún con la infraestructura y personal cualificado en este tema. Por dar un ejemplo, en España según la ley 14/2006, se debe contar con un centro de ciertas características como: salas limpias de cultivo celular completamente equipadas para derivación, mantenimiento y procesamiento de células madre; sala de cultivo celular equipada con campana de flujo laminar, incubador de CO<sub>2</sub> y microscopios ópticos (invertido y de fluorescencia); laboratorio de genética con citogenética convencional, FISH, SKY, equipamiento para procesamiento de ADN, ARN y proteínas, PCR a tiempo real, arrays de mapeo genético y de expresión, secuenciación convencional y masiva de genes; laboratorio de citometría de flujo con citómetro para análisis de muestras y separador de células; electroporador para nucleofección; laboratorio de patología para análisis de tejido ex vivo; laboratorio de producción viral para

manipulación genética de células en cultivo; animalario con salas libres de patógenos, irradiador y lo necesario para desarrollar modelos animales in vivo, entre otros; y según la ley 14/2007, el personal idóneo atendiendo a principios éticos y en plena conformidad con la Ley de Investigación Biomédica.

La experiencia investigativa con reprogramación celular para fines terapéuticos se dio después de que la propuesta superó el proceso de evaluación establecido: 1. Panel externo de evaluación, integrado por profesionales de reconocido prestigio dentro del campo de investigación de estudio, 2. Comisión de Ética e Investigación Sanitaria, 3. Comisión de seguimiento y control para la donación y utilización de células y tejidos humanos, y 4. Comité de investigación de reprogramación celular de la región geográfica en donde se realizaría el estudio [14]. Las células madre constituyen una nueva herramienta terapéutica para varias enfermedades. La manipulación genética de las células madre exige inversión en la estructura y personal con leyes que apoyen el desarrollo tecnológico.

## Referencias

- [1] Thompson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.S.; Waknitz, M.A.; Swiergiel, J.J.; Marshal V.S.; Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998, 1145-1147.
- [2] Human Embryonic Stem Cell Registry, [En línea]. Disponible en <https://hpscereg.eu/search?q=hesc> [Accedido: Abr 17, 2022].
- [3] Cortés, J.L.; Sánchez, L.; Ligeró, G.; Gutiérrez-Aranda, I.; Catalina, P.; Elosua, C.; Leone, P.E.; Montes, R.; Bueno, C.; Ramos-Mejía, V.; Maleno, I.; García-Pérez, J.L.; Menéndez P. Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. *Hum Reprod*. 2009, 24, 1844-1851.
- [4] Córdova, A. Embrióloga, CONCEBIR – Unidad de Fertilidad y Ex Secretaria, Sociedad Ecuatoriana de Medicina Reproductiva. Comunicación personal: Abr 15, 2022.
- [5] Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006, 126, 663-676.
- [6] Nakagawa, M.; Koyanagi, M.; Tanabe, K.; Takahashi, K.; Ichisaka, T.; Aoi, T.; Okita, K.; Mochiduki, Y.; Takizawa, N.; Yamanaka, S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008, 26, 101-106.
- [7] Human Pluripotent Stem Cell Registry, [En línea]. Disponible en <https://hpscereg.eu/search?q=ips> [Accedido: Abr 17, 2022].
- [8] García-Pérez, J.L. Director del proyecto de investigación en salud – ISCIII PI08/0171: Generación de células madre pluripotentes humanas utilizando retroelementos Line-1. Comunicación personal.
- [9] Ramos-Mejía, V.; Muñoz-López, M.; García-Pérez, J.L.; Menéndez, P. iPSC lines that do not silence the expression of the ectopic reprogramming factors may display enhanced propensity to genomic instability. *Cell Res*. 2010, 20(10), 1092-1095.
- [10] Catalina, P.; Montes, R.; Ligeró, G.; Sánchez, L.; de la Cueva, T.; Bueno, C.; Leone, P.E.; Menéndez, P. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation of differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties?. *Mol Cancer*. 2008, 7, 76.
- [11] Catalina, P.; Elosua, C.; Cortés, J.L.; Nieto, A.; García-Pérez, J.L.; Menéndez, P.; Leone, P.E. Characterization of chromosomal stability in human embryonic stem cells. *Lat Am J Dysmorphol*. 2009, 2, 5-9.
- [12] Rubio, R.; García-Castro, J.; Gutiérrez-Aranda, I.; Paramio, J.; Santos, M.; Catalina, P.; Leone, P.E.; Menéndez, P.; Rodríguez, R. Deficiency in p53 but not retinoblastoma induces the transformation of mesenchymal stem cells in vitro and initiates leiomyosarcoma in vivo. *Cancer Res*. 2010, 70(10), 4185-4194.

[13] Leone, P.E.; Paz-y-Miño, C; et al. Identificación de ganancias y pérdidas de material genético por arrays de mapeo genético en líneas de células madre embrionarias. En: Leone, P.E; Paz-y-Miño, C. Resúmenes de eventos científicos de la Sociedad Ecuatoriana de Genética Humana. Edición de la Sociedad Ecuatoriana de Genética Humana y Centro de Investigación Genética y Genómica-UTE: Quito, 2018; pp 111-112.

[14] Europa Press. Autorizan cinco nuevos proyectos andaluces de investigación con células madre embrionarias y de reprogramación celular, [En línea]. Disponible en <https://www.20minutos.es/noticia/956735/0/> [Accedido: Abr 17, 2022].