



**Clase magistral: Introducción al vocabulario asociado a la investigación del laboratorio**

**Autor: Dra. Anabel Fernández Iglesias**

**Contenido**

1. ¿Qué aporta la investigación traslacional a la clínica? .....	1
Definiciones.....	1
2. Sujetos en la investigación traslacional .....	2
2.1 Cultivos celulares.....	2
2.1.1 Líneas celulares .....	2
2.1.2 Células primarias .....	3
2.1.3 Induced pluripotent stem cells (iPSC) .....	3
2.1.4 Cultivos 2D.....	3
2.1.5 Cultivos 3D.....	4
2.1.6 <i>Microfluidics-based in vitro devices</i> .....	4
2.2 Experimentación animal.....	4
2.2.1 Modelos de enfermedad .....	5
2.2.2 Tecnología génica .....	5
2.3 Ex vivo.....	5
3. Técnicas de laboratorio .....	6
3.1 Análisis génicos.....	6
3.2 Análisis proteicos.....	6
3.3 Análisis funcionales .....	6
4. Conclusiones.....	7

**1. ¿Qué aporta la investigación traslacional a la clínica?**

**Definiciones**

**Investigación fundamental:** se busca conocimiento para poder describir, explicar, predecir nuevos fenómenos que se producen tanto en la naturaleza como en la sociedad, es decir la salud.



**Investigación clínica:** se buscan nuevas formas de prevenir, detectar, tratar enfermedades, ya sea con nuevos medicamentos o combinaciones de ellos, nuevos dispositivos quirúrgicos, nuevas metodologías, con el objetivo principal de determinar la seguridad y la eficacia de un nuevo tratamiento.

Entre estas dos investigaciones hay un espacio muy grande y es aquí donde entra en juego la **investigación traslacional** o también llamada preclínica: el principal objetivo es llevar los avances científicos que se obtienen en el laboratorio hasta el paciente, de manera que la investigación clínica sea más precisa, más efectiva y con unos enfoques preventivos más sólidos.

## **2. Sujetos en la investigación traslacional**

### **2.1 Cultivos celulares**

**In vitro:** experimentos fuera del contexto biológico u organismo, es decir, fuera de un sistema complejo. El principal objetivo es analizar de manera aislada el comportamiento y los cambios fenotípicos de células a un tratamiento, a un estímulo, etc., para definir el mecanismo molecular de un cambio significativo que se ha observado, por ejemplo, en un modelo animal.

Existen diferentes tipos de células y diferentes tipos de cultivos.

#### **2.1.1 Líneas celulares**

Las líneas celulares provienen de un sub-cultivo de cultivo primario, procedente de un tejido humano o animal.

#### **Características:**

- Líneas finitas (20-80 ciclos) o líneas infinitas (inmortales).
- Pierden características en cada transformación.
- Experimentos de larga duración.
- En cada transformación estas células van perdiendo características típicas, siendo totalmente diferentes en pasajes altos.



**Curiosidad:** las células HeLa fue la primera línea celular que se conoce como tal. Son células que se aislaron de un tumor de cáncer de Henrietta Lacks en 1951. Su uso en investigaciones pre-clínicas sirvió para desarrollar la vacuna de la polio así como se han realizado muchos estudios del virus del papiloma.

### **2.1.2 Células primarias**

Se aíslan directamente de un tejido humano o de un animal de experimentación utilizando diferente metodología (ver tabla en la presentación). Un ejemplo que engloba varias de estas técnicas se encuentra en la siguiente publicación: Fernández-Iglesias A, et al, JCM, 2019 Feb;23(2):877-886.

#### **Características:**

- Características fenotípicas similares a las células *in vivo*.
- Se puede correlacionar con características clínicas de los donantes.
- Cultivos de corta duración.

### **2.1.3 Induced pluripotent stem cells (iPSC)**

Se obtienen de células madres pluripotentes programadas para diferenciarse a un tipo celular concreto. Éstas:

- No pierden el fenotipo como ocurre en las líneas celulares, aunque no son 100% similares a las primarias.
- No dependes del tejido de estudio para aislar células, siempre disponibles.

### **2.1.4 Cultivos 2D**

Son cultivos celulares en monocapa o en suspensión utilizando flasks o placas especiales de cultivo celular. Pueden ser:

- **Monocultivos:** se cultiva un único tipo celular.



- **Co-cultivos:** se cultivan 2 o más tipos celulares. Para ello existen diferentes metodologías: transwells, interactive co-culture plate (ICCP) o medio condicionado, entre otros.

### 2.1.5 Cultivos 3D

Son cultivos celulares de más de un tipo celular en una estructura **tri-dimensional** que mimetiza el ambiente *in vivo* donde las células se organizan e interactúan entre ellas y con el ambiente:

- **Esferoides:** se forman a partir de células primarias de un tejido co-cultivado junto a una matriz extracelular para formar una esfera recreando un ambiente más próximo al *in vivo*.
- **Organoides:** se forman a partir de células madres de un tejido específico que formará *in vitro* un “mini-órgano” adquiriendo estructura y organización similar al tejido *in vivo*.

### 2.1.6 Microfluidics-based in vitro devices

Estos dispositivos mimetizan el microambiente del órgano a estudiar y se pueden utilizar células primarias, líneas celulares, esferoides u organoides.

#### Características:

- Es un sistema dinámico: continuamente hay un intercambio de medio de cultivo, simulando el flujo de sangre.
- Se pueden realizar diferentes análisis en directo de diferentes parámetros gracias a sensores colocados en el dispositivo.

## 2.2 Experimentación animal

**In vivo:** experimentos que se llevan a cabo en un organismo vivo completo o sistema biológico entero y complejo. Las especies más utilizadas en la investigación traslacional son la rata y el ratón por su homología genética con el humano (85-90%).



Antes de realizar un estudio con animales éste debe ser evaluado por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA), donde se evaluará que el estudio cumpla la regla de las “3 Rs”: **reemplazo, reducción y refinamiento**. Estos procedimientos son evaluados por la propia unidad de experimentación animal del centro y finalmente por la agencia correspondiente de cada comunidad autónoma.

### **2.2.1 Modelos de enfermedad**

Según el estudio traslacional planteado se deberá inducir el mejor modelo de enfermedad (ver tabla resumen en la presentación). Estos se pueden inducir administrando por diferentes vías (inhalación, subcutáneo, intraperitoneal, oral) tóxicos químicos, así como diferentes dietas e incluso bacterias. También existen intervenciones quirúrgicas y el uso de la **tecnología génica** para inducir diferentes modelos.

### **2.2.2 Tecnología génica**

Los organismos a los que se les aplica la tecnología génica son denominados como OMG: organismos modificados genéticamente. Existen diferentes metodologías para eliminar o insertar un gen, como el uso de ratones **knock-out** o tecnología **CRISP/Cas9**, o ratones **knock-in** respectivamente.

## **2.3 Ex vivo**

**Ex vivo:** experimentación con un tejido extraído del organismo en un ambiente controlado que mimetiza las condiciones *in vivo*:

### **Características:**

- Mantienen la estructura y funciones.
- Se pueden realizar estudios por un tiempo limitado (aprox. 24h).
- Son una muy buena alternativa a experimentos *in vivo*.

**Ejemplos:** Precision-cut liver slices (PCLS) o InTESTine.



### 3. Técnicas de laboratorio

Una vez finalizado los diferentes experimentos *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* se aplicarán diferentes técnicas de laboratorio para realizar análisis a nivel de genes o de proteína y análisis funcionales celulares.

#### 3.1 Análisis génicos

- Extracción de RNA de tejido/células: kits específicos, trizol
- Cuantificación (ng/μl): Nanodrop (abs λ=260)
- Transcripción reversa: convertir el RNA en cDNA
- Expresión de un gen específico (dirigido): Real-Time PCR
- Expresión de todos los genes (unbiased): Transcriptómica (RNA sequencing)
- Expresión de todos los genes de cada tipo celular por separado: Single-cell RNA sequencing

#### 3.2 Análisis proteicos

- Extracción de proteína de tejido/células: lysis buffer
- Cuantificación del contenido proteico (ng/ml): Bradford, BCA, Lowry
- Expresión proteica específica (dirigido): Western blot, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia
- Expresión de todas las proteínas: Proteoma
- Detección de los niveles de proteína: ELISA

#### 3.3 Análisis funcionales

Los análisis funcionales celulares serán específicos según el objetivo del estudio. Existen kits y reactivos específicos para la realización de éstos. Además, también se puede analizar todo aquello que la célula secreta al exterior (de manera soluble o envuelto en vesículas extracelulares), con el principal objetivo de estudiar la comunicación celular.



#### 4. Conclusiones

- La **investigación traslacional** es crucial para la investigación clínica.
- En un estudio pre-clínico hay que **combinar** diferentes sujetos y metodologías para que sea lo más traslacional posible.
- Nunca perder de vista el objetivo de la investigación traslacional: **mejora del paciente**.