

**DECLARACIÓN DE INTERÉS PARA RECIBIR PROFESIONALES FP-II EN
CONTRATOS DE PRÁCTICAS**

Grupo Acreditado Receptor: Hepatología Experimental

Responsable: Jose V. Castell

**ESPECIALIDAD/ES SOLICITADAS ACORDE CON LA NATURALEZA PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN AL CUAL SE ADSCRIBIRÍA Y COLABORARÍA EL CONTRATADO**

Anatomía patológica-Citología

Dietética

Laboratorio de Diagnóstico Clínico

Documentación Sanitaria

Laboratorio (rama Química)

Otros, especificar

(Se podrán presentar dos declaraciones de interés, como máximo por grupo y en formularios separados)

PROGRAMA FORMATIVO A REALIZAR POR EL CONTRATADO

Proyecto de investigación en vigor al que se adscribirá el contratado (indique referencia y resumen)

TITULO: Nueva estrategia para la derivación de hepatocitos funcionales de mujeres afectas de deficiencia de ornitina transcarbamilasa (SAF2014-51991R).

RESUMEN: La deficiencia de ornitina transcarbamilasa (OTC; OMIM#311250; Xp21.1) es una enfermedad metabólica rara del ciclo de la urea ligada al cromosoma X que causa hiperamonemia. La enfermedad puede cursar asintomática o en casos graves conducir a sintomatología muy severa a edades muy tempranas e incluso muerte perinatal. En la actualidad no existe ningún tratamiento más allá del trasplante hepático, lo que en el caso de pacientes pediátricos no constituye una solución por la elevada morbi-mortalidad de los tratamientos inmunosupresores. Todo ello convierte esta enfermedad en una buena candidata para terapias celulares avanzadas. Este proyecto propone la prueba de concepto de que es posible derivar hepatocitos sanos de mujeres afectas de deficiencia en OTC sin necesidad de edición genómica (gene-editing en inglés). Nuestra aproximación consiste en aprovechar el silenciamiento al azar del cromosoma X en mujeres o lionización.

Las mujeres son en realidad un mosaico celular en el que algunas células expresan el cromosoma X materno y otras el paterno. Nuestra estrategia consiste en aislar células nucleadas (fibroblastos y células sanguíneas) de pacientes afectas de deficiencia de OTC, obtener una población homogénea (fibroblastos y células sanguíneas) que hayan **silenciado** el cromosoma X portador del alelo mutado y reprogramarlas a hepatocitos. Esta estrategia se puede hacer extensiva a otras enfermedades ligadas al cromosoma X como las Hemofilias A y B.

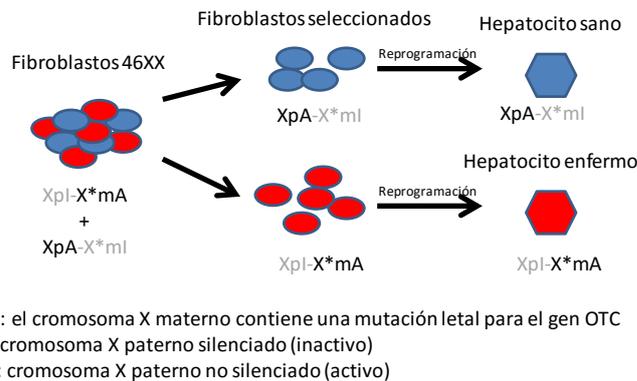
La ventaja del método es evitar la manipulación genómica (gene-editing en inglés) que es extraordinariamente compleja y siempre puede derivar en procesos no deseados y potencialmente graves por los fenómenos de "off-targeting". Así mismo, como sub-producto de este proyecto obtendremos hepatocitos con deficiencia en OTC como modelo in vitro para profundizar en aspectos metabólicos de la enfermedad y para el desarrollo de fármacos paliativos.

Describir el proyecto de investigación, haciendo especial énfasis en los aspectos formativos y las tareas a realizar por el contratado FP-II (*Este apartado se publicará junto con las bases de la convocatoria con el fin de que el candidato FP-II pueda seleccionar el proyecto que más le interese*)

La terapia regenerativa celular consiste en reemplazar las células de un tejido que presentan una disfunción por otras sanas. Aunque es una terapia incipiente, parece claro que sería deseable si no imprescindible, el utilizar células del propio individuo para evitar problemas de rechazo sin tener que utilizar fármacos inmunosupresores con graves efectos secundarios. Además, estas enfermedades se manifiestan al poco de

nacer, cuando las intervenciones quirúrgicas y los tratamientos con inmunosupresores presentan mayor riesgo y morbilidad.

Las mujeres son en realidad un mosaico celular en el que algunas células expresan el cromosoma X materno y otras el paterno. Éste fenómeno se conoce como inactivación o silenciamiento al azar del cromosoma X. El hígado de mujeres (heterocigotas) afectas de deficiencia de OTC está compuesto casi exclusivamente por hepatocitos que han silenciado el cromosoma X que contiene el alelo salvaje (funcional) de OTC. En base a que el sesgo en el silenciamiento en el cromosoma X no tiene por qué afectar a todos los órganos por igual, nos proponemos obtener cultivos homogéneos de células de pacientes heterocigotas con afección severa por deficiencia de OTC que hayan silenciado el cromosoma X que contiene el alelo mutado, para reprogramarlas a hepatocitos y demostrar que es posible obtener hepatocitos funcionalmente sanos de pacientes afectas de OTC:



Los iHep enfermos obtenidos siguiendo esta estrategia también puede ser empleados en el estudio in vitro de la enfermedad y en el desarrollo de terapias paliativas

Así pues, nuestro objetivo es **Obtener iHep sanos (funcionales) a partir de células nucleadas (fibroblastos y/o células sanguíneas) de pacientes heterocigotas sintomáticas por deficiencia de OTC.**

Este objetivo fundamental vertebrará los diferentes sub-objetivos de los que se compone el proyecto:

Sub-objetivo 1. Aislamiento y clonación de células nucleadas procedentes de mujeres heterocigotas afectas de deficiencia en ornitina transcarbamilasa.

Este sub-objetivo se compone de tres apartados:

- 1- Reclutamiento de mujeres heterocigotas para el gen OTC con síntomas severos de deficiencia de OTC
- 2- Aislamiento cultivos primarios de fibroblastos y células sanguíneas de pacientes femeninas afectas de deficiencia en OTC.
- 3- Obtención una población celular homogénea que hayan silenciado el cromosoma X paterno (Xp) y otra población homogénea de dichos tipos celulares que hayan silenciado el cromosoma X materno (Xm)

En la actualidad ya hemos obtenido células de una paciente y estamos a la espera de obtener células de una segunda paciente ya seleccionada.

El contrato FP-II que solicitamos no desarrollará ningún papel en este objetivo del estudio.

Sub-objetivo 2. Reprogramación a hepatocitos.

Las poblaciones celulares homogéneas serán sometidas a un protocolo de reprogramación a hepatocitos en base al estudio publicado por Zhu et al (Nature 2014, Nature Protocols 2015) y que hemos implementado en nuestro laboratorio recientemente.

Se trata de un protocolo largo y complicado que requiere de una gran experiencia e “intuición”. El contrato FP-II que solicitamos servirá de apoyo en este sub-objetivo.

Sub-objetivo 3. Caracterización de las células iHep.

La caracterización de las células iHep obtenidas será exhaustiva y a tres niveles: expresión de mRNA (qRT-PCR y/o microarray), expresión proteica (inmunoblot e inmunocitoquímica) y funcionalidad (ensayos bioquímicos específicos y/o análisis metabonómico). Los criterios empleados para determinar si las células obtenidas son hepatocitos funcionales, resultan heterogéneos y varían sensiblemente entre unos laboratorios y otros. Desde nuestro laboratorio emplearemos estos criterios:

1- In vitro:

- i. Transcriptómica: comparación mediante microarray o RNAseq con una suspensión recién aislada de hepatocitos humanos
- ii. Expresión de proteínas: inmunocitoquímica e inmunoblot
- iii. Metabonómica: análisis del perfil metabólico mediante espectroscopia de masas comparado con un cultivo primario de hepatocitos en cultivo de (24 horas en cultivo)
- iv. Funcionalidad: evaluación de la actividad OTC y de otras funciones típicamente hepáticas como ciclo de la urea, metabolismo de xenobioticos, metabolismo de glucógeno...

- 2- In vivo: rescate del ratón mutante espontáneo $Otc^{spf-ash}$. Este ratón contiene una mutación en la OTC que resulta en una actividad entre el 5-10% de la cepa salvaje.

Este sub-objetivo del estudio es donde el contrato FP-II que solicitamos tendrá un papel más relevante. Llevará a cabo la mayor parte de los estudios in vitro y servirá de apoyo en el análisis de las muestras de los experimentos in vivo. El desarrollo de estas tareas permitirá que el FP II adquiera soltura en un buen número de técnicas muy utilizadas en el laboratorio:

- Cultivos celulares
- Biología Molecular
 - Extracción de RNA y DNA genómico
 - qRT-PCR
 - Genotipación de ratones mediante qPCR usando sondas de hidrólisis
 - Western-blot
- Biología Celular
 - Inmunocitoquímica
 - Ensayos funcionales y metabolomicos (producción de urea, actividades P450...)
- Inmunohistoquímica