

LAS CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS COMO MODELO DE ESTUDIO Y POSIBLE TERAPIA CELULAR DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

Julia Carrasco-Zanini

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México D.F. Correo E: julia.czs1512@gmail.com

Las células troncales son células no especializadas, capaces de proliferar y que pueden diferenciarse en células especializadas. Las células troncales embrionarias (ESCs por sus siglas en inglés) y las células troncales pluripotentes inducidas (iPSC por sus siglas en inglés) tienen la capacidad de diferenciarse hacia cualquier tejido procedente del embrión. Sin embargo, como lo indica su nombre las ESCs se obtienen de embriones, mientras que las iPSCs son obtenidas mediante la reprogramación genética de células especializadas adultas. Por esta razón, las iPSCs no conllevan las implicaciones éticas asociadas al intervenir con el potencial que tiene un embrión de convertirse en un ser humano. En 2007, el grupo de Yamanaka (1) comprobó que se requiere la inducción de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, proteínas que prenden o apagan genes (conocidos como factores de transcripción), para lograr la reprogramación de células especializadas adultas humanas a iPSCs. Dichos factores de transcripción pueden ser inducidos mediante vectores que se integran al genoma de la célula huésped (retrovirus y lentivirus), o mediante métodos en los cuales no hay dicha integración (transposones, adenovirus y nucleofección de plásmidos). Hoy en día incluso existen métodos de inducción no basados en DNA, como el virus Sendai (un virus de RNA), la expresión de microRNAs o RNAs mensajeros.

Las iPSCs suelen asociarse con su posible uso para el desarrollo de tratamientos de medicina regenerativa y también han proporcionado excelentes modelos *in vitro* de enfermedades cuyo estudio ha sido dificultado por la inaccesibilidad a cultivos primarios de pacientes. Este es el caso de la fibrosis quística, enfermedad en la cual el gen de la proteína que normalmente transporta activamente iones de cloruro al exterior de la célula, llamada regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), tiene una mutación ($\Delta F508$) que evita su expresión o función. Esto causa la acumulación de moco espeso el cual facilita la colonización por

patógenos, lo que termina ocasionando una falla respiratoria. Según la Organización Mundial de la Salud, la incidencia de esta enfermedad en América del Norte es de 1 en cada 3500 neonatos, mientras que en México es de 1 en cada 8500 y la supervivencia promedio es de 17.5 años de edad.

En 2014, el grupo dirigido por Inder M. Verma reportó un protocolo para la diferenciación por pasos de iPSCs a un epitelio respiratorio funcional, con el objetivo de conocer mejor los mecanismos de dicho proceso y proveer un modelo para el estudio de varias enfermedades del tracto respiratorio (2). Este proceso de diferenciación se logra mediante la expresión controlada de genes específicos asociados a distintos estadios de diferenciación, siguiendo los estadios que se dan durante el desarrollo embrionario del epitelio respiratorio en condiciones normales. La diferenciación exitosa a células pulmonares maduras se pudo comprobar por la presencia de genes específicos como MUC5A/C, MUC1, CFTR y cEBP α , aparte de genes característicos de estadios de diferenciación previos como FOXA2 y GATA6 los cuales son expresados en células del endodermo definitivo. Adicionalmente, se identificaron factores importantes que favorecen este proceso como son el mantener las células en una interfaz aire-líquido lo cual promueve la maduración de las células epiteliales respiratorias progenitoras.

Posteriormente, el mismo grupo desarrolló un método para corregir la mutación del gen CFTR en iPSCs derivadas de fibroblastos (un tipo de célula especializada del tejido conectivo) de pacientes con fibrosis quística. La corrección de la mutación en las iPSCs se hizo con un sistema de edición genética conocido como CRISPR/Cas9 (Caja 1), para después ser diferenciadas en células epiteliales respiratorias a través del mecanismo elucidado en su trabajo previo (2).

En dicho modelo, se demostró que la corrección de la mutación $\Delta F508$ del gen CFTR había sido realizada con éxito al observar un incremento en las

corrientes de cloruro comparadas con las corrientes de las células en las cuales no se hizo la corrección (3). Adicionalmente, se comprobó que en las células corregidas, la proteína tenía una modificación post-traducciona, que no ocurre cuando el gen se encuentra mutado. Dicha modificación es esencial para que CFTR se pueda expresar en la membrana plasmática, ya que en su ausencia, en vez de que la proteína sea llevada a la membrana, se queda en el citoplasma donde es degradada.

El trabajo hecho por el grupo de Inder M. Verma proporciona un modelo para la corrección de mutaciones en iPSCs y la diferenciación de éstas a un epitelio respiratorio maduro, el cual resuelve limitaciones previas que impedían el estudio a profundidad de la patofisiología de la fibrosis quística. Este modelo llevará a un mejor entendimiento de la enfermedad e incluso al desarrollo de medicamentos efectivos. Adicionalmente, este trabajo podría abrir la posibilidad de explorar este enfoque como una terapia celular en el futuro, ya que las células del epitelio respiratorio generadas por este método podrían ser implantadas en pacientes con fibrosis quística. Sin embargo, esta posibilidad es aún lejana dado que quedan muchas cuestiones por resolver antes de utilizar este tipo de terapias en la clínica. Más allá de un tratamiento para la fibrosis quística, este trabajo da una visión innovadora sobre las iPSCs, que adicionalmente, no tiene las implicaciones éticas de la ESCs.

Referencias

1. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K and Yamanaka S (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult

Caja 1. CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas9 está compuesto por Cas9, una enzima nucleasa que corta la doble cadena de DNA y un RNA guía (gRNA) de 20 nucleótidos, el cual le indica a Cas9 en qué parte del genoma hacer el corte. Para la edición genética, aparte de los dos elementos ya mencionados, se introduce a la célula un fragmento de DNA molde que contiene la secuencia que se quiere integrar al genoma. Cas9 forma un complejo con el gRNA, el cual se une a la parte del genoma que contenga la secuencia blanco y corta las dos cadenas del DNA. En el sitio del corte, se puede unir el fragmento del DNA molde para que al reparar el corte se introduzca la edición deseada.

human fibroblasts by defined factors. Cell 131, 861-872.

2. Firth AL, Dargitz CT, Qualls SJ, Menon T, Wright R, Singer O, Gage FH, Khanna A, Verma IM. (2014) Generation of multiciliated cells in functional airway epithelia from human induced pluripotent stem cells. Natl Acad Sci USA 111(17): E1723-30.
3. Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E, Dargitz CT, Wright R, Khanna A, Gage FH, Verma IM. (2015) Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. Cell reports 12(9): 1385-90.

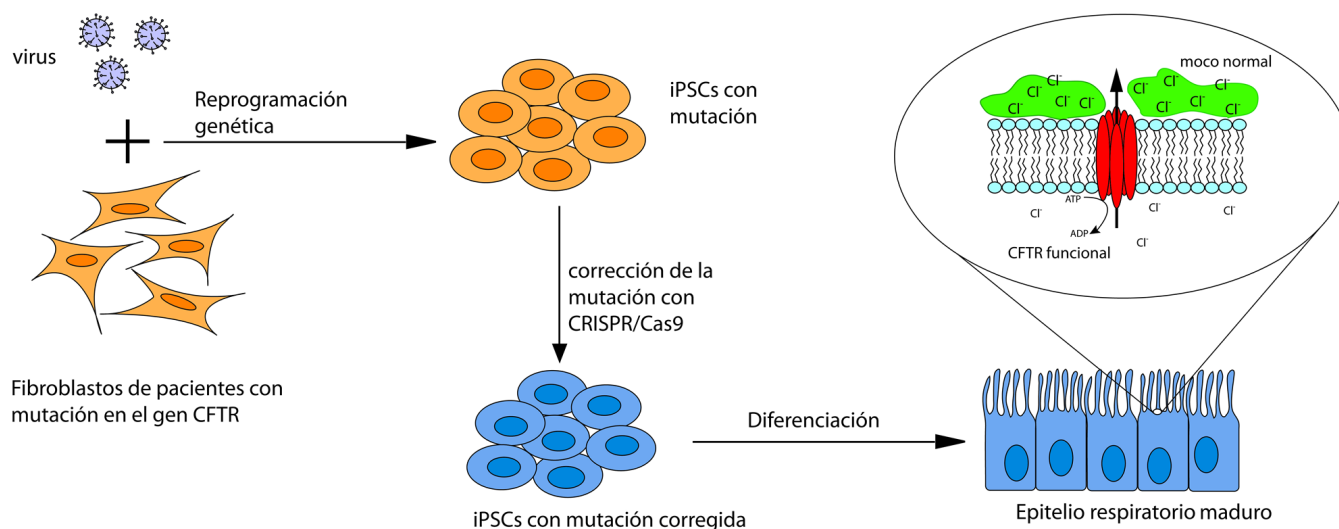


Figura 1. Modelo de la corrección de la mutación en el gen CFTR en iPSCs obtenidas por reprogramación de fibroblastos de pacientes con fibrosis quística y subsecuente diferenciación a un epitelio respiratorio maduro.