

Modelado y corrección de enfermedades genéticas mediante CRISPR y células madre pluripotentes inducidas

Moro, Lucia Natalia*; Amín, G.; Catañeda, S.; Miriuka, S.

LIAN-FLENI-CONICET, Belén de Escobar, Buenos Aires, Argentina. *lmoro@fleni.org.ar

El descubrimiento de la tecnología de CRISPR/Cas9 para edición génica ha sido la mayor revolución científica de los últimos tiempos y ha permitido el desarrollo de nuevas oportunidades terapéuticas, entre otras grandes aplicaciones. A su vez, esta tecnología sumada a la disponibilidad de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) paciente-específicas con potencialidad de diferenciación a diferentes tipos celulares, ha marcado una nueva era en el campo de la medicina de precisión. La utilización de ambas tecnologías ha hecho posible el modelado de enfermedades *in-vitro* con el objetivo de descubrimiento de nuevas terapias y estudios toxicológicos de drogas. Es posible modelar una enfermedad *in-vitro* a partir de la generación de iPSCs de pacientes o a partir de la generación de mutaciones reportadas de enfermedades genéticas en iPSCs normales. Nosotros nos encontramos realizando ambas estrategias para enfermedades genéticas cardíacas y musculares. Por un lado, hemos generado por recombinación homóloga mediada por CRISPR/Cas9 dos líneas de iPSCs con un codón de stop prematuro en el gen de placoglobina (PKG), una proteína desmosomal que se encuentra alterada en la cardiomiopatía displasia arritmogénica del ventrículo derecho (C/DAVD). Estas líneas de iPSCs *knock-out* (KO) para PKG fueron sometidas a diferenciación cardíaca en monocapa observando un déficit en la diferenciación al linaje cardíaco, lo que denota la relevancia de esta proteína en los cardiomiocitos, nunca antes reportado en humanos. Por otro lado, hemos generado y caracterizado iPSCs a partir de muestras de sangre de 3 pacientes pertenecientes a una familia que porta una duplicación heterocigota de un triplete en el exón 6 (1059_1061DupGGA) del gen de desmina, la cual no ha sido reportada anteriormente. Esta mutación conlleva a una desminopatía, caracterizada por la formación de agregados proteicos que alteran el normal funcionamiento de las células musculares esqueléticas y cardíacas. Las líneas Las iPSCs de los pacientes también fueron diferenciadas a cardiomiocitos exitosamente con el objetivo de caracterizar los mismos, estudiar el fenotipo molecular comparándolos con cardiomiocitos normales, y desarrollar una estrategia de edición génica para corregir dicha mutación directamente sobre el tejido cardíaco, emulando así una terapia *in-vivo*. Para ello nos encontramos desarrollando la tecnología de adenovirus asociado (AAV) como vector del sistema CRISPR/Cas9, el cual está siendo actualmente utilizado en ensayos clínicos de terapias génicas en pacientes con diferentes patologías genéticas. Hasta el momento hemos logrado transducir cardiomiocitos con un AAV que porta la proteína fluorescente GFP como marcador para sentar las condiciones óptimas de transducción con el AAV portador del sistema CRISPR dirigido a la mutación de desmina. Como conclusión, el modelado de enfermedades genéticas mediado por CRISPR y la utilización de iPSCs permitirá desarrollar terapias paciente-específicas eficientes, siendo

posible evaluar el efecto benéfico y posibles efectos secundarios sobre el tejido involucrado de manera no invasiva.