

MYOCURE-RAC1: NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS PERSONALIZADAS PARA VARIANTES PATOGENICAS EN EL GEN RAC1

López-Cabrera, Alejandra, Romero-González, Ana, Piñero-Pérez, Rocío, Reche-López, Diana, Gómez-Fernández, David, Romero-Domínguez, José Manuel, Álvarez-Córdoba, Mónica, Cilleros-Holgado, Paula, González-Tirado, Paulo, De la Villa-Galán, Lola & Sánchez-Alcázar, José Antonio

Department of Physiology, Anatomy and Cell Biology - Andalusian Center for Developmental Biology (CABD- CSIC- Universidad Pablo de Olavide), 41089 Dos Hermanas, Sevilla, Spain; alopcab2@alu.upo.es; jasanalc@upo.es

INTRODUCCIÓN

Rac1 es una pequeña GTPasa perteneciente a la familia de proteínas Rho y cuya actividad depende de si está unida a GTP (activa) o GDP (inactiva). En concreto, RAC1 actúa como un interruptor molecular en numerosos procesos celulares y dentro de sus funciones principales en humanos destacan: la regulación y reorganización del citoesqueleto de actina, la plasticidad sináptica, la migración neuronal, la formación de lamelipodios, la producción de ROS, la protección neuronal y otras funciones críticas para el desarrollo neuronal y la función cerebral. **Las variantes patogénicas en el gen RAC1 conducen a un trastorno del neurodesarrollo con diversas manifestaciones fenotípicas**, incluyendo anomalías en el tamaño cerebral, discapacidad intelectual, epilepsia, dismorfia facial, hipotonía y defectos cardiovasculares, entre otras; y para el que **no hay tratamientos disponibles**. Hasta la fecha, existen diferentes estudios publicados para mutaciones en RAC1 que utilizan modelos animales pero los ensayos en modelos celulares y humanos son limitados, por lo que es fundamental fomentar la investigación en estos modelos para comprender mejor la fisiopatología de la enfermedad y poder desarrollar enfoques terapéuticos eficaces que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

OBJETIVOS DEL PROYECTO

- 1) Establecer un modelo celular para entender los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a las variantes patogénicas del gen RAC1. Como modelos celulares para estudiar la enfermedad se utilizarán fibroblastos derivados de los pacientes obtenidos mediante biopsia cutánea y neuronas derivadas de los pacientes que se obtendrán por reprogramación directa a partir de los fibroblastos de los pacientes
- 2) Identificar tratamientos mediante el desarrollo de una metodología de cribado farmacológico que sean capaces de corregir las alteraciones celulares halladas en los modelos celulares de estudio y de mejorar la calidad de vida de los pacientes

RESULTADOS PREVIOS

- Los fibroblastos derivados de pacientes con mutaciones en el gen RAC1 presentan niveles proteicos reducidos de RAC1

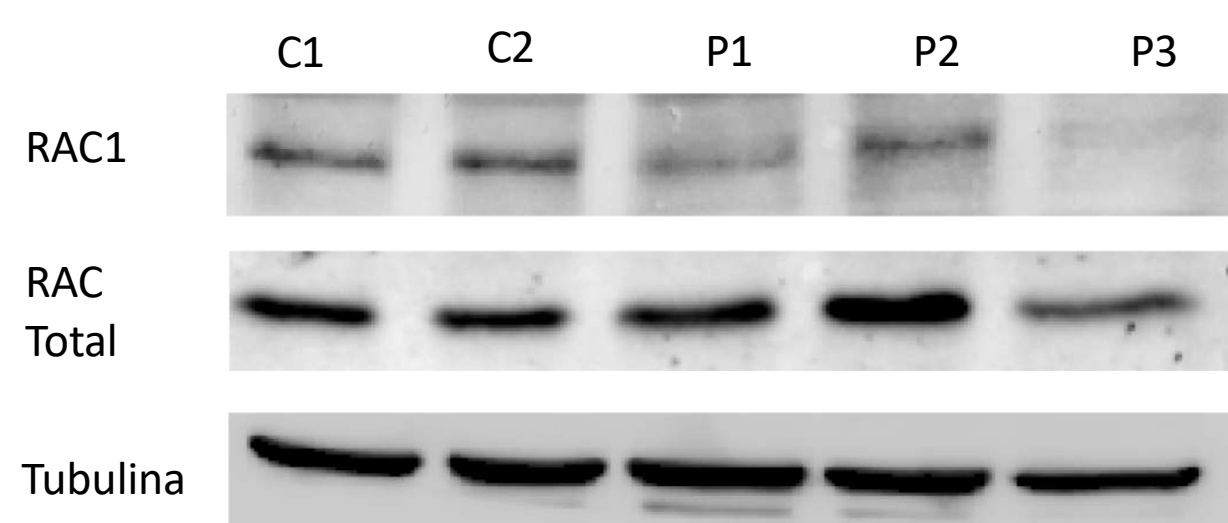
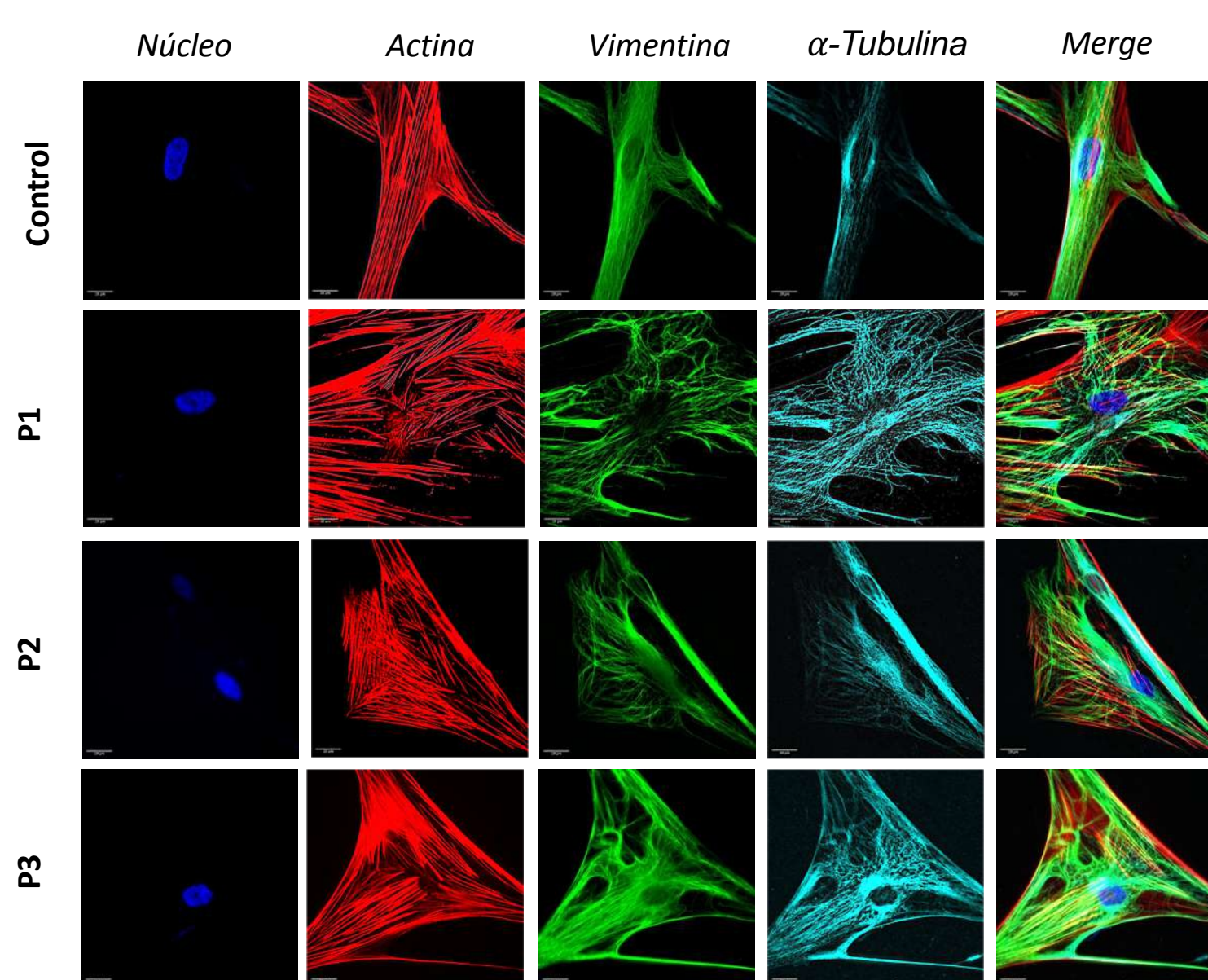


Figure 2. Niveles de expresión proteica de RAC1 y RAC total en fibroblastos control y mutantes RAC1. Se sometieron a análisis de inmunotransferencia extractos celulares procedentes de controles (C1 y C2) y de líneas celulares de pacientes con mutaciones en el gen RAC1 (P1, P2 y P3). Se utilizó un gel de poliácridamida con SDS para separar los extractos proteicos (30 µg) y, posteriormente, se inmunotifieron las muestras empleando anticuerpos frente a RAC1, RAC total y α-tubulina (esta última utilizada como control de carga).

- Los fibroblastos derivados de pacientes con mutaciones en el gen RAC1 presentan alteraciones en el citoesqueleto celular

Figure 3. Imágenes representativas de la caracterización del citoesqueleto celular de fibroblastos control y mutantes RAC1 mediante inmunotinción. Las células control (Control) y derivadas de pacientes con mutaciones en RAC1 (P1, P2 y P3) se tiñeron con Faloidina-Rodamina (sonda fluorescente específica de los filamentos de actina) y se inmunotifieron contra la Vimentina (marcador de los filamentos intermedios) y la α-Tubulina (marcador de los microtúbulos) y se visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia. Los núcleos se revelaron mediante tinción con DAPI. Las imágenes fueron obtenidas usando lentes 40x y procesadas con el software ImageJ. Barra de escala = 20 µm.



- Los fibroblastos derivados de pacientes con mutaciones en el gen RAC1 presentan una capacidad de migración celular disminuida

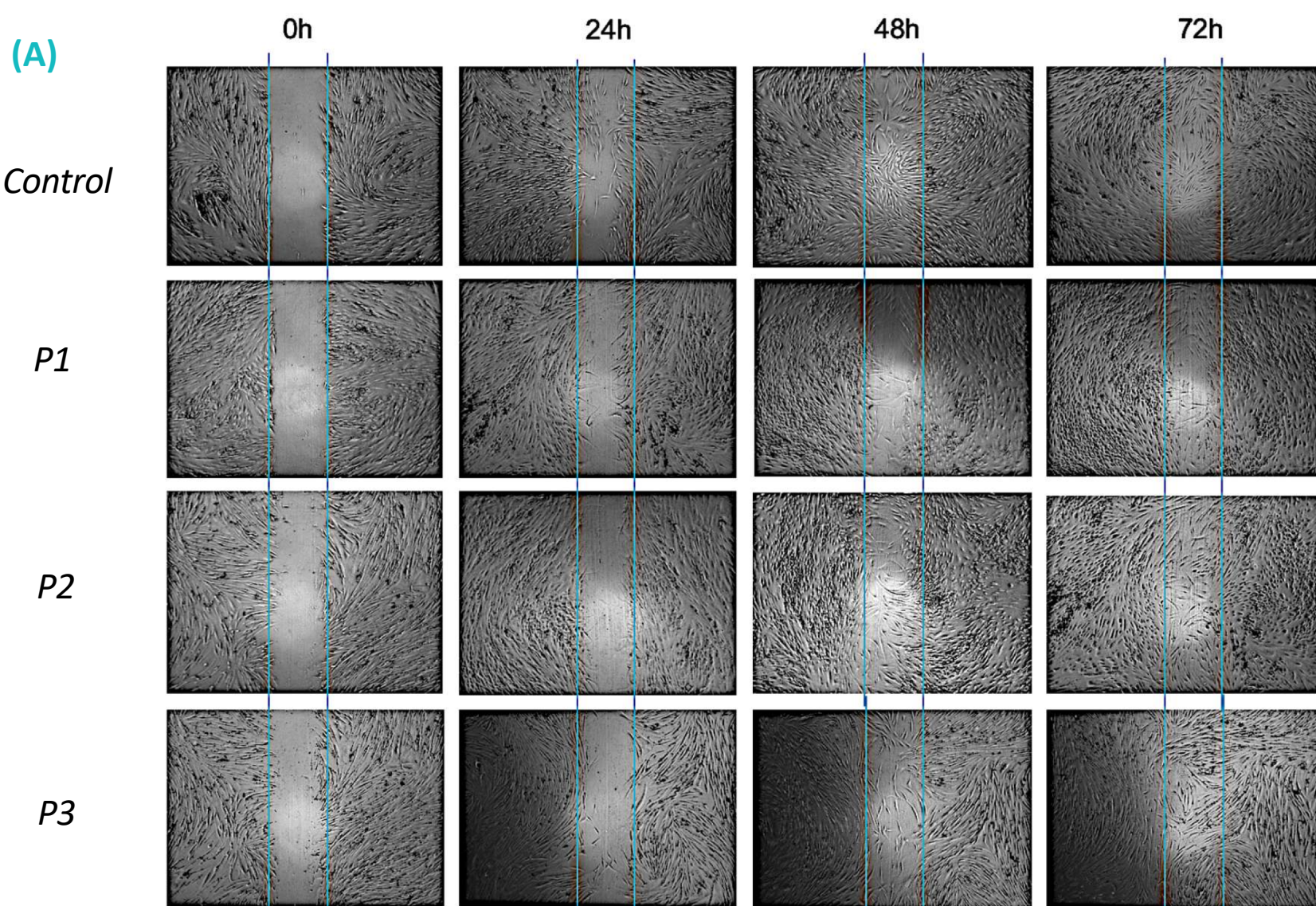


Figure 4. Medida de la migración celular mediante el ensayo de cicatrización de heridas. (A) Imágenes representativas a las 0h, 24h, 48h y 72h tras la generación de la herida en fibroblastos control y derivados de los pacientes con mutaciones en RAC1 P1, P2 y P3. (B) Cálculo de la confluencia de la herida a las 24h, 48h y 72h posteriores a su formación. La confluencia se calculó mediante el ratio área celular/área total de la herida. *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001 frente al control.

MÉTODOS

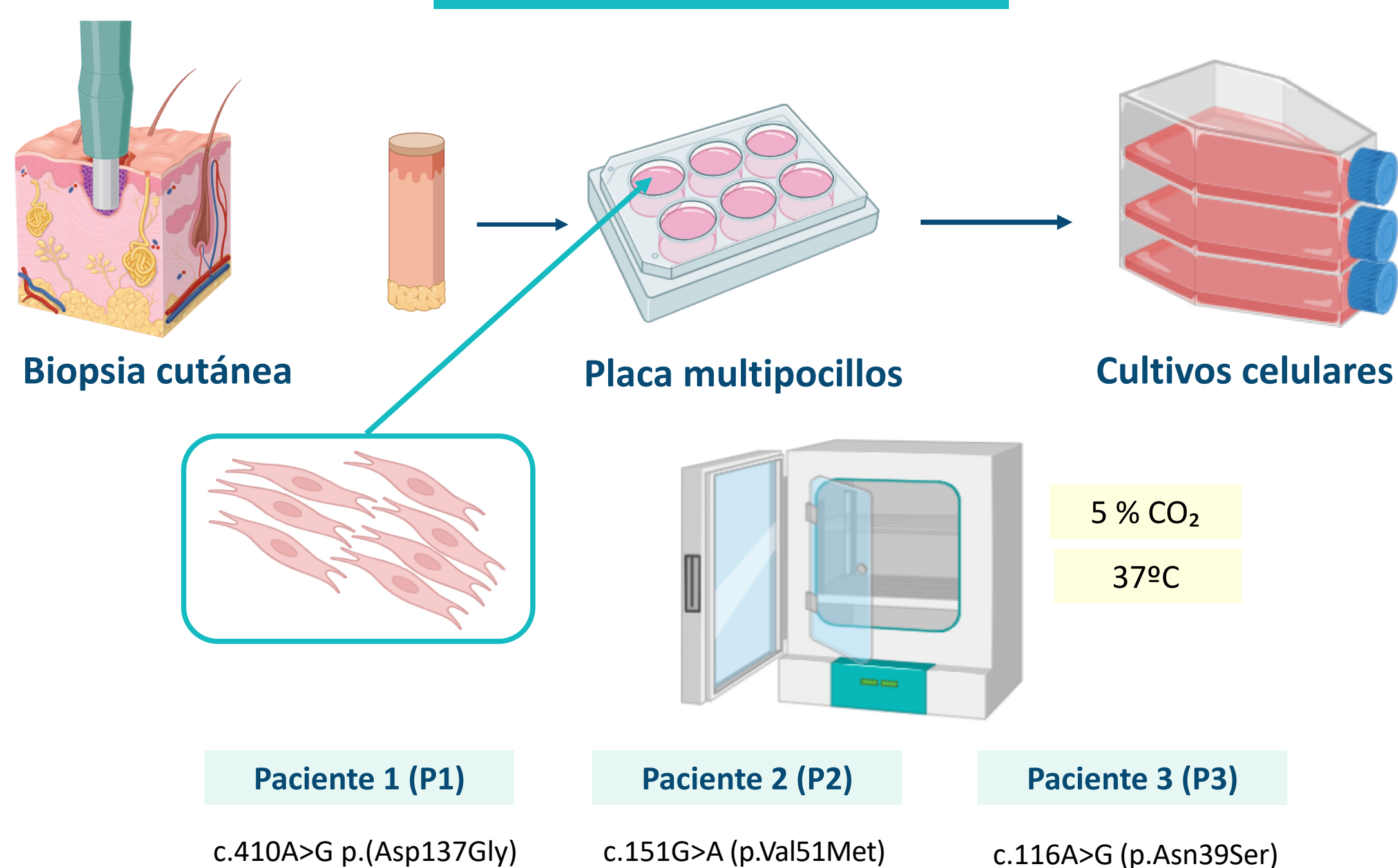
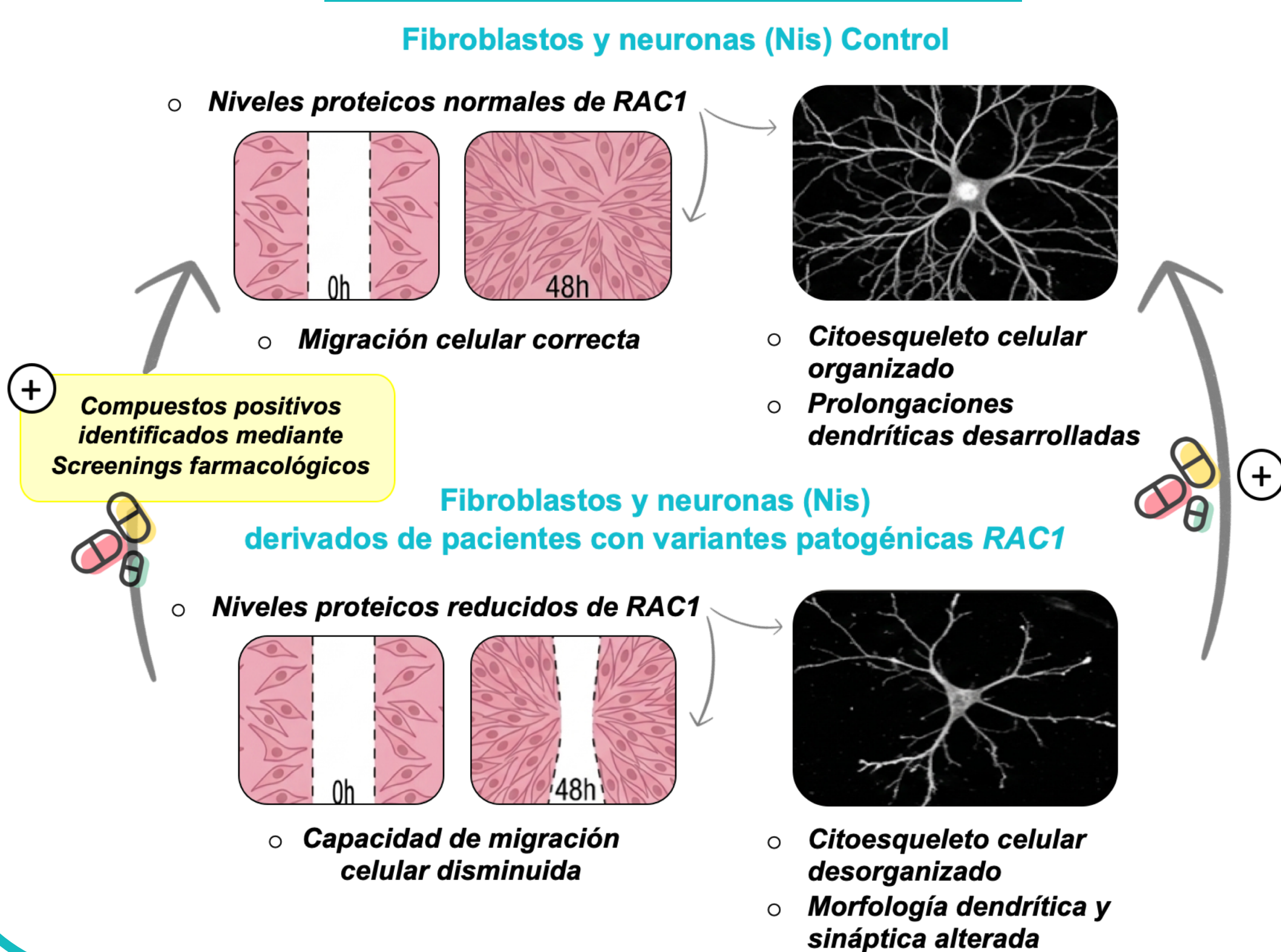


Figura 1. Imagen representativa del flujo de trabajo seguido en el laboratorio tras la biopsia cutánea y las líneas celulares de fibroblastos de pacientes que componen actualmente la cohorte del estudio.

CONCLUSIONES



PERSPECTIVAS FUTURAS

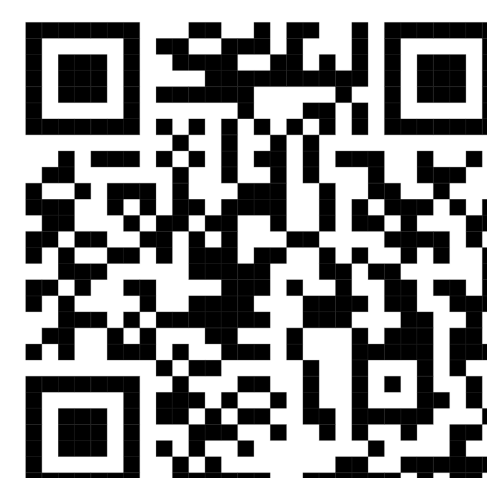
- Comprender mejor las alteraciones y los mecanismos patofisiológicos derivados de las mutaciones en el gen RAC1
- Realizar screenings farmacológicos con suplementos y fármacos ya aprobados por la FDA y la EMA
- Obtener, mediante reprogramación directa, neuronas inducidas (Nis) derivadas de los fibroblastos de los pacientes RAC1, por ser el tipo celular más afectado en la enfermedad
- Comprobar en las Nis obtenidas las alteraciones previamente halladas y confirmar el efecto de los compuestos positivos identificados



CUENTA DE INSTAGRAM de la Asociación colaboradora: [@misobrinomanuel](https://www.instagram.com/misobrinomanuel)



Sánchez-Alcázar's lab
Web page



Linkedin