

CÉLULAS IPSCS: UNA APROXIMACIÓN PROMETEDORA PARA EL ESTUDIO Y POSIBLE TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES RARAS

Rafael Garesse

*Rector de la Universidad Autónoma de Madrid.
Catedrático de Bioquímica. Facultad de Medicina
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (UAM-CSIC), Madrid*

M. Esther Gallardo

*Catedrática de Bioquímica. Facultad de Medicina
Grupo de Investigación Traslacional con células iPS. Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12
de Octubre (i+12), Madrid. Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERER).*

Queremos agradecer la amable invitación de la revista *Encuentros Multidisciplinares* a contribuir con un artículo en homenaje a Margarita Salas. Es para nosotros un auténtico privilegio. Margarita ha desarrollado una gran parte de su trayectoria científica en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" CSIC-UAM, primero en las instalaciones de la Facultad de Ciencias y desde su puesta en marcha en el nuevo edificio en el Campus de Cantoblanco. Colaboradora en numerosas actividades científicas y académicas de la Universidad Autónoma de Madrid, ha formado a una generación de biólogos moleculares que lideran esta disciplina en nuestro país. Fuente continua de inspiración, su figura es un ejemplo para las futuras generaciones y una referencia para nuestra universidad.

Nuestra contribución se centra en discutir brevemente el impacto que la nueva tecnología de las células pluripotentes inducidas (IPSC) está teniendo en la investigación de un grupo de enfermedades de un enorme impacto socio sanitario, las enfermedades raras, un campo en el que nuestro grupo viene trabajando durante los últimos años. Estamos seguros que Margarita estaba al día de todos los avances tecnológicos dirigidos a mejorar la salud y el bienestar de las personas.

ENFERMEDADES RARAS Y ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Se define enfermedad rara como aquella que no afecta a más de 1 persona de cada 2.000 en la población, según aparece recogido en el reglamento de la Unión Europea sobre medicamentos huérfanos del año 1999. A pesar de su baja incidencia en la población muchas de estas enfermedades tienen consecuencias fatales y devastadoras. Durante los últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de las bases moleculares de estas enfermedades debido, en parte, a la implementación en el diagnóstico molecular de rutina hospitalaria de las tecnologías de secuenciación de nueva generación. Este hecho ha supuesto que el análisis genético de los pacientes sea mucho más rápido y que haya habido un incremento del número de enfermedades raras hereditarias registradas. Sin embargo, el mecanismo molecular subyacente a un defecto genético o el descubrimiento de terapias para estas enfermedades está siendo mucho más lento. Esto se debe, en parte, a la falta de modelos de estudio que mimeticen de forma fidedigna este tipo de patologías.

Hasta hace muy poco tiempo las alternativas disponibles para generar modelos de estudio de las enfermedades se han basado, fundamentalmente, en la utilización de modelos animales transgénicos y líneas celulares transformadas¹. Aunque estos modelos, indudablemente, tienen muchas ventajas también presentan algunos inconvenientes, como el hecho de que no siempre reproducen de forma adecuada la patología. La utilización de células derivadas de los pacientes, para el estudio de estas

enfermedades, aunque potencialmente sería una herramienta *in vitro* mejor no siempre es posible. Ello es debido a que el tejido humano no siempre está disponible o no es accesible. Un ejemplo muy claro de esta situación se daría, por ejemplo, en las enfermedades neurológicas, ya que, indudablemente, es muy complicado acceder al cerebro de los pacientes para poder estudiar qué está sucediendo en sus neuronas o en su sistema glial¹.

En nuestro grupo, hemos centrado nuestro trabajo durante los últimos veinte años en el estudio de un tipo de enfermedades raras que tienen en común la alteración del sistema de producción de energía de las células que se encuentra en las mitocondrias. Las enfermedades mitocondriales pueden estar causadas por mutaciones en alguno de los genes codificados en la pequeña molécula de DNA mitocondrial, o en cientos de genes codificados en el genoma nuclear, necesarios para el correcto funcionamiento del sistema de Fosforilación Oxidativa localizado en la membrana interna de las mitocondrias, que es el que genera la mayor parte de la energía celular en forma de ATP. Las enfermedades mitocondriales pueden afectar a uno a varios tejidos y en general cursan con un cuadro clínico que puede ser muy grave. Recientemente hemos generado una amplia colección de células IPS que contienen mutaciones en algunos de los genes asociados a estas patologías^{2 3 4 5 6 7 8} y estamos caracterizando sus efectos en los tejidos diana de la enfermedad⁹.

INTRODUCCIÓN DE LAS CÉLULAS IPSC

En el año 1998, se aislaron por primera vez células madre o troncales embrionarias (ES, del inglés *Embryonic Stem cells*)¹⁰. Estas células presentaban muchas ventajas, entre las que se encuentran que son autorrenovables (son capaces de proliferar indefinidamente) y que son pluripotentes (es decir, tienen el potencial de poder convertirse en cualquier tipo celular presente en el organismo). Este hecho convierte a las células ES en unas células con una capacidad regenerativa única. Sin embargo, la utilización de estas células, al proceder de embriones, conlleva asociados un gran número de problemas éticos y legales. Para solventar este problema el científico japonés Shinya Yamanaka descubrió que era posible volver hacia atrás en el destino células especializadas adultas totalmente diferenciadas y convertirlas a un estado de pluripotencia, utilizando únicamente un sencillo cóctel de cuatro factores de transcripción (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, OSKM). Los factores de transcripción son proteínas especializadas en regular la lectura del mensaje genético, y existen cientos de ellos que regulan de modo preciso qué genes se expresan en cada momento.

Estas células fueron denominadas células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)^{11 12}. Las iPSCs, al ser células similares a las células ES, también son autorrenovables y pluripotentes, pero, al ser obtenidas *in vitro* a partir de células adultas (por ejemplo, células de la piel), no tendrían los inconvenientes éticos y legales propios de las células ES. Además, al ser generadas a partir del propio paciente, potencialmente producirían menos problemas de rechazo inmunológico en terapias de trasplante autólogo que se pudieran desarrollar. El descubrimiento de estas células le supuso a Yamanaka la concesión del premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 2012, compartido con el británico John Gourdon. Hoy en día es posible obtener iPSCs casi a partir de cualquier tipo celular, mediante reprogramación con los cuatro factores de Yamanaka, OSKM¹². Una vez obtenidas, estas células tienen que ser caracterizadas desde un punto de vista molecular y funcional para confirmar que cumplen todos los criterios de pluripotencia¹³ y tienen que ser analizadas para verificar que cumplen unos criterios mínimos de calidad¹³. A continuación, pueden ser diferenciadas al tipo celular diana afectado en la enfermedad que se pretenda modelizar. Por ejemplo, si la enfermedad es neurológica, las iPSCs se pueden diferenciar a neuronas, evitando así el tener que acceder al cerebro del paciente, algo que no siempre es posible. El objetivo final es confirmar si las células diferenciadas obtenidas reproducen con precisión las características moleculares típicas de la patología. De este modo, se generaría un modelo *in vitro* de la enfermedad que podría ser utilizado para estudiar los mecanismos fisiopatogénicos que la producen¹.

APLICACIONES DE LAS CÉLULAS iPSC

El disponer de este tipo de modelos de enfermedad ha supuesto un avance enorme por las repercusiones que esto podría tener en el campo de la medicina regenerativa y la terapia personalizada. Por un lado, este modelo podría ser utilizado como plataforma de cribado farmacológico. Hoy en día, muchos fármacos testados en modelos animales, aparentemente prometedores, han fracasado después en los ensayos clínicos por falta de eficacia, intolerancia, etc. En este sentido, las iPSCs ofrecerían una oportunidad única, ya que permiten llevar a cabo estudios de cribado y reposicionamiento de fármacos de alto rendimiento¹. Como, además, los estudios de toxicidad y eficacia de los fármacos se realizarían en células derivadas del propio paciente se eliminaría el problema, mencionado anteriormente, del testado de fármacos en modelos animales.

En la actualidad, ya se han realizado algunos avances relacionados con el descubrimiento de fármacos potenciales para enfermedades raras utilizando la tecnología de iPSCs. Entre ellos, se ha visto que los inhibidores de histona deacetilasa podrían ser un agente terapéutico potencial para pacientes con atrofia muscular espinal, una enfermedad genética rara que ataca fundamentalmente a las neuronas motoras en la médula espinal¹⁴. Algunos de los fármacos, identificados en experimentos realizados con iPSCs derivadas de pacientes, han sido aprobados para ser incluidos en ensayos clínicos. Entre ellos, la rapamicina que es un inmunosupresor que ha sido aprobado para ser testado en pacientes con fibrodisplasia osificante progresiva, una enfermedad rara hereditaria del tejido conectivo que provoca una osificación progresiva de los músculos esqueléticos, tendones, fascias y ligamentos¹⁵.

Otra de las aplicaciones de las iPSCs, que ha suscitado gran expectativa, es su posible utilidad en el campo de la medicina regenerativa¹⁶. Hoy en día, es posible corregir el defecto genético presente en las iPSCs utilizando el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9. El objetivo final es obtener células diferenciadas corregidas que tras su aislamiento y purificación podrían ser empleadas en terapias potenciales regenerativas de reemplazamiento. En este sentido, ya se han realizado bastantes avances. Entre ellos, en el año 2014, la Dra. Takahashi, del *Riken Center for Developmental Biology* de Japón y su equipo pusieron en marcha un ensayo clínico de trasplante autólogo de células de epitelio pigmentario de la retina (REP) obtenidas a partir de iPSCs de pacientes con degeneración macular asociada a la edad^{17, 18}.

Un año después de la cirugía, la capa de células del único paciente que fue trasplantado permaneció intacta y en el paciente no han aparecido tumores¹⁷. Sin embargo, este ensayo fue suspendido coincidiendo con cambios en la legislación japonesa y debido a que cuando se iba a trasplantar el segundo paciente se detectó una alteración en el número de copias en las células que iban a ser trasplantadas que no estaba presente en las células somáticas de partida¹⁷. Llegados a este punto, se ha empezado a considerar que podría ser mucho más conveniente, de cara a un futuro escalado, la generación de bancos de iPSCs perfectamente caracterizadas no solo desde el punto de vista genómico sino también desde el punto de vista del tipado del complejo HLA (del inglés, Human Leukocyte Antigen)¹. A modo de ejemplo, la empresa australiana *Cynata therapeutics* está llevando a cabo un ensayo clínico de trasplante alogénico de células mesenquimales obtenidas a partir de iPSCs de donantes para el tratamiento de pacientes con enfermedad injerto frente a huésped.

Recientemente, se ha iniciado también en Japón otro ensayo clínico que ha generado una gran expectación en todo el mundo. Este ensayo surge por el hecho de que se ha visto, previamente, que las células neuronales precursoras de dopamina mejoran la sintomatología en monos con la enfermedad de Parkinson¹⁹. Basándose en este hecho, a finales de 2018, el neurocirujano Takayuki Kikuchi consiguió trasplantar millones de células neuronales precursoras de dopamina en un paciente de 50 años con enfermedad de Parkinson, en el Hospital Universitario de Kyoto²⁰. Estas células de obtuvieron previamente a partir de iPSCs generadas reprogramando células de la piel de un donante anónimo sano²¹. Hasta el momento, no se ha observado ningún efecto negativo en el paciente trasplantado pero

permanece en observación y si no surgen complicaciones volverá a ser trasplantado de nuevo. El objetivo final es tratar seis pacientes más, a finales de 2020, con el objeto de analizar la seguridad y eficacia de la técnica²¹. Hasta la fecha no nos consta que se haya registrado ningún ensayo clínico de este tipo dirigido a enfermedades raras pero los resultados mencionados anteriormente, junto con otros más que están en marcha, resultan muy esperanzadores.

MIRANDO AL FUTURO

En la actualidad, la investigación en este campo se está dirigiendo hacia la generación de organoides (versión miniaturizada y simplificada de un órgano) y hacia la ingeniería de tejidos. Ello es debido a que la mayor parte de los modelos de enfermedad generados con iPSCs, se han conseguido utilizando técnicas de cultivo tradicionales, en monocapa (2D). Este tipo de aproximaciones, aunque muy interesantes, no siempre son el modelo más apropiado para reproducir lo que tiene lugar en un organismo *in vivo*. Por este motivo, existe un interés creciente en intentar reproducir *in vitro* la arquitectura celular de los tejidos nativos en tres dimensiones (3D), pues así se puede lograr mimetizar de forma más veraz el comportamiento celular *in vivo*^{22 1}.

Hasta el momento, los trabajos publicados en ingeniería de tejidos muestran que éstos alcanzan niveles de madurez y funcionalidad celular mayores cuando se generan modelos en 3D^{23 24}. A modo de ejemplo, a principios del año 2018 ya ha sido posible generar minimúsculos 3D funcionales capaces de contraerse y generar tránsitos de calcio en respuesta a estimulación eléctrica o por acetilcolina²⁵. Del mismo modo, la generación de organoides a partir de iPSCs no es una entelequia²⁶. De hecho, ya se han conseguido obtener organoides de retina, de corazón²⁷, de hígado²⁸, de colón²⁹, de cerebro³⁰ e incluso miniestómagos³¹. Este tipo de modelos proporcionan una información mucho más parecida a lo que sucede *in vivo* y, es por este motivo, por el que muchos grupos de investigación están aunando esfuerzos con el fin de conseguir modelos 3D cuyo objetivo último es la búsqueda de terapias (identificación de fármacos y corrección del defecto genético presente en las iPSCs para generar organoides isogénicos “sanos”)²⁴. En este sentido, la ingeniería de tejidos también resulta muy prometedora para el estudio y aproximación terapéutica de las enfermedades raras.

Han transcurrido ya más de diez años desde el descubrimiento de las iPSCs pero, todavía hoy, sigue existiendo una gran esperanza en torno a ellas. Esto se debe a que su utilización, en cualquiera de sus facetas, puede suponer una oportunidad única para el desarrollo de terapias personalizadas o lo que es lo mismo para buscar una terapia personalizada para cada paciente y no terapias generales particulares para cada enfermedad. Sin embargo, la tecnología de iPSCs también presenta muchos inconvenientes que están dificultando su traslación a la clínica. Entre ellos, sigue siendo una tecnología muy cara y que requiere una gran inversión de tiempo. Además, los fenotipos inmaduros y fetales que se obtienen tras su diferenciación deben ser tenidos en cuenta a la hora de generar modelos de enfermedad de inicio en la edad adulta. Finalmente, quedan muchas preguntas por responder acerca de su uso en terapias de reemplazamiento, por ejemplo, las relativas a la aparición de tumores. Aunque los ensayos clínicos iniciados hasta el momento parecen prometedores, hay que ser cautelosos todavía antes de poder afirmar que la tecnología de iPSCs es totalmente segura,¹ pero de lo que no cabe duda es que esta herramienta puede suponer una revolución para el estudio y búsqueda de tratamientos para las enfermedades raras en general y las enfermedades mitocondriales en particular.

REFERENCES

- [1] Gallardo, M.E. (2020): “Utilización de células iPS como modelo de enfermedad y aproximación a terapia.” Medicina Evolucionista: Aportaciones Pluridisciplinarias. Volumen V. Available at: <http://www.medicinayevolucion.com/Publicaciones/nuestros-libros/libro-v/ips>. Accessed March 4.
- [2] Zurita-Díaz, F.; Galera-Monge, T.; Moreno-Izquierdo, A. et al. (2016): Generation of a human iPSC line from a patient with a mitochondrial encephalopathy due to mutations in the GFM1 gene. *Stem Cell Res*;16(1):124-7.

- [3] Galera-Monge, T.; Zurita-Díaz, F.; Moreno-Izquierdo, A. et al. (2016): Generation of a human iPSC line from a patient with an optic atrophy “plus” phenotype due to a mutation in the OPA1 gene. *Stem Cell Res*;16(3):673-6.
- [4] Galera-Monge, T.; Zurita-Díaz, F.; Moreno-Izquierdo, A. et al. (2016): Generation of a human iPSC line from a patient with an optic atrophy “plus” phenotype due to a mutation in the OPA1 gene. *Stem Cell Res*;16(3):673-6.
- [5] Zurita, F.; Galera, T.; González-Páramos, C. et al. (2016): Generation of a human iPSC line from a patient with a defect of intergenomic communication. *Stem Cell Res*;16(1):120-3.
- [6] Zurita-Díaz, F.; Galera-Monge, T.; Moreno-Izquierdo, A. et al. (2016): Generation of a human iPSC line from a patient with a mitochondrial encephalopathy due to mutations in the GFM1 gene. *Stem Cell Res*;16(1):124-7.
- [7] Galera, T.; Zurita, F.; Gonzalez-Paramos, C. et al. (2016): Generation of a human iPSC line from a patient with Leigh syndrome. *Stem Cell Res*;16(1):63-6.
- [8] Galera-Monge, T.; Zurita-Díaz, F.; González-Páramos, C. et al. (2016): Generation of a human iPSC line from a patient with Leigh syndrome caused by a mutation in the MT-ATP6 gene. *Stem Cell Res*;16(3):766-9.
- [9] Galera-Monge, T.; Zurita-Díaz, F.; Garesse, R. et al. (2019): The mutation m13513G>A impairs cardiac function, favoring a neuroectoderm commitment, in a mutant-load dependent way. *J Cell Physiol*; jcp.28549.
- [10] Thomson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.S. et al. (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*; 282(5391):1145-7.
- [11] Takahashi, K.; Yamanaka, S. (2006): Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*;126(4):663-76.
- [12] Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M. et al. (2007): Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*; 131(5):861-72.
- [13] Ortuño-Costela, M. del C.; Rodríguez-Mancera, N.; García-López, M. et al. (2017): Establishment of a human iPSC line (IISHDOi001-A) from a patient with McArdle disease. *Stem Cell Res*; 23188-92.
- [14] Lai, J.I.; Leman, L.J.; Ku, S. et al. (2017): Cyclic tetrapeptide HDAC inhibitors as potential therapeutics for spinal muscular atrophy: Screening with iPSC-derived neuronal cells. *Bioorg Med Chem Lett*; 27(15):3289-93.
- [15] Hino, K.; Zhao, C.; Horigome, K. et al. (2018): An mTOR Signaling Modulator Suppressed Heterotopic Ossification of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *Stem cell reports*; 11(5):1106-19.
- [16] Hirschi, K.K.; Li, S.; Roy, K. (2014): Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng*;16277-94.
- [17] Mandai, M.; Watanabe, A.; Kurimoto, Y. et al. (2017): Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med*; 376(11):1038-46.
- [18] Ortuño-Costela, M.D.C.; Cerrada, V.; García-López, M. et al. (2019): The challenge of bringing iPSCs to the patient. *Int J Mol Sci*; 20(24):1-16.
- [19] Kikuchi, T.; Morizane, A.; Doi, D. et al. (2017): Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson’s disease model. *Nature*; 548(7669):592-6.
- [20] Takahashi, J. (2019): Preparing for first human trial of induced pluripotent stem cell-derived cells for Parkinson’s disease: An interview with Jun Takahashi. *Regen Med*; 14(2):93-5.
- [21] Cyranoski, D. (2018): “Reprogrammed” stem cells implanted into patient with Parkinson’s disease. *Nat* 2018.
- [22] Gu, Q.; Tomaskovic-Crook, E.; Wallace, G.G. et al. (2017): 3D Bioprinting Human Induced Pluripotent Stem Cell Constructs for In Situ Cell Proliferation and Successive Multilineage Differentiation. *Adv Healthc Mater*; 6(17):1700175.
- [23] Choi, Y.J.; Yi, H.G.; Kim, S.W. et al. (2017): 3D Cell Printed Tissue Analogues: A New Platform for Theranostics. *Theranostics*; 7(12):3118-37.
- [24] Ortuño-Costela, M. del C.; García-López, M.; Cerrada, V. et al. (2019): iPSC s: A powerful tool for skeletal muscle tissue engineering. *J Cell Mol Med*; jcmm.14292.

- [25] Rao, L.; Qian, Y.; Khodabukus, A. et al. (2018): Engineering human pluripotent stem cells into a functional skeletal muscle tissue. *Nat Commun*; 9(1):126.
- [26] Rowe, R.G.; Daley, G.Q. (2019): Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Genet*.
- [27] Voges, H.K.; Mills, R.J.; Elliott, D.A. et al. (2017): Development of a human cardiac organoid injury model reveals innate regenerative potential. *Development*; 144(6):1118-27.
- [28] Ogawa, M.; Ogawa, S.; Bear, C.E. et al. (2015): Directed differentiation of cholangiocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*; 33(8):853-61.
- [29] Crespo, M.; Vilar, E.; Tsai, S.Y. et al. (2017): Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nat Med*; 23(7):878-84.
- [30] Lancaster, M.A.; Renner, M.; Martin, C.A. et al. (2013): Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*; 501(7467):373-9.
- [31] McCracken, K.W.; Catá, E.M.; Crawford, C.M. et al. (2014): Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*; 516(7531):400-4.