



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Medicina
i Ciències de la Salut



IDI
BELL

Institut d'Investigació
Biomèdica de Bellvitge

**CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL COMO FUENTE DE
MINI-CEREBROS *IN A "DISH"***

Trabajo de Final de Grado

Grado en Odontología

ESTHER MARTÍN VIDAL

Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Junio de 2019

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría expresar mis agradecimientos al tutor/a de este trabajo, por el interés, rigor y profesionalidad que ha mostrado a lo largo del proceso. Su energía, apoyo y dedicación ha sido de gran ayuda para lograr el éxito de este trabajo.

Asimismo, quiero dar las gracias a mis padres, a mis hermanos y a toda mi familia por apoyarme incondicionalmente durante la etapa académica que pronto culmina.

RESUMEN

Introducción: El trastorno del espectro autista representa una variedad de trastornos del desarrollo neurológico en la infancia caracterizados por una serie de discapacidades complejas y crónicas, las cuales afectan a la habilidad comunicativa y de socialización, incluyendo comportamientos repetitivos y estereotipados. A día de hoy sigue siendo una condición desconocida a nivel etiológico y muy heterogénea en cuanto a manifestaciones clínicas. Por consiguiente, la tecnología con células madre pluripotentes inducidas está jugando un papel importante en el modelaje de éste trastorno para su comprensión y para la búsqueda de un diagnóstico y tratamiento válido.

Materiales y métodos: Se ha realizado una búsqueda exhaustiva a través de Pubmed/Medline, Scopus y Cochrane durante la cual se han seleccionado los artículos más recientes y con mayor relevancia científica.

Resultados: La búsqueda de la comprensión de los trastornos neurológicos ha llevado a la comunidad científica a la reprogramación de células somáticas en células neuronales, y a la creación de cultivos organotípicos en 3D para la obtención de modelos *in vitro* que representen el trastorno. Actualmente, la aplicación de células reprogramadas de la pulpa dental y el posterior cultivo de un organoide está representando un avance significativo para la comprensión del TEA. Éste recurso no invasivo está permitiendo la reprogramación de células de individuos afectados y su aplicación personalizada en medicina terapéutica y regenerativa.

Conclusión: Aún hay mucho terreno desconocido en este ámbito y no se conoce todo el potencial de esta tecnología; así como todas sus limitaciones. Sin embargo, cada vez más se está utilizando este recurso para el estudio del TEA, y los avances tecnológicos y científicos en esta área permitirán progresar en el diagnóstico y tratamiento de esta condición.

Palabras clave: Trastorno del espectro autista, células madre pluripotentes inducidas, organoide, neuronas, células de la pulpa dental, neurodesarrollo.

ABSTRACT

Introduction: Autistic spectrum disorders represent a variety of childhood neurodevelopmental disorders characterized by complex and chronic disabilities, which affect communication and socialization skills, including repetitive and stereotyped behaviors. To this day, it remains an unknown disease at etiological level and heterogeneous in terms of clinical manifestations. Therefore, induced pluripotent stem cells technology is playing an important role in modeling this disorder for its understanding and for the search of a valid diagnosis and treatment.

Materials and methods: An exhaustive search was carried out through Pubmed/Medline, Scopus and Cochrane during which the most recent and scientifically relevant articles were selected.

Results: The search for the understanding of neurological disorders has led the scientific community to reprogramming somatic cells into neuronal cells, and to the creation of organotypic 3D cultures to obtain *in vitro* models that represent the disorder. Currently, the application of reprogrammed dental pulp cells and the subsequent culture of an organoid is representing a significant advance for the understanding of ASD. This non-invasive resource is allowing the cells of affected individuals to reprogram and to personalize their application in therapeutic and regenerative medicine.

Conclusion: There is still a lot of terrain to discover in this area and the full potential of this technology is unknown; as well as all its limitations. However, this source is increasingly being used for the study of ASD, and technological and scientific advances in this area will allow progress in the diagnosis and treatment of this condition.

Key words: Autistic spectrum disorders, induced pluripotent stem cells, organoid, neurons, dental pulp cells, neurodevelopment.

ÍNDICE

1. Introducción	7
1.1. ¿Qué es el autismo?.....	7
1.2. Clasificación.....	9
1.3. Tratamiento, evaluación y conducta clínica	11
1.4. Modelos experimentales para estudiar los mecanismos de la base del TEA	12
1.5. Células madre	13
1.5.1. Células madre totipotentes.....	14
1.5.2. Células madre multipotentes o adultas.....	14
1.5.2.1. Aplicación de las MSC en terapia regenerativa.....	15
1.5.3. Células madre pluripotentes.....	16
1.6. Células madre pluripotentes inducidas.....	17
1.6.1. Métodos de reprogramación.....	18
1.7. Células somáticas como fuente de iPSCs.....	19
1.7.1. La pulpa dental.....	19
2. Objetivos	20
3. Diseño	20
4. Materiales y métodos	21
4.1. Estrategia de búsqueda	21
4.2. Términos de búsqueda.....	21
5. Resultados	22
5.1. Modelaje del TEA a partir de iPSCs de la pulpa dental.....	23
5.2. Organoides o cultivos 3D.....	29
6. Discusión	32
6.1. Limitaciones del modelaje del TEA mediante iPSCs derivadas de DPCs.....	32
6.2. Limitaciones de los organoides como modelos de desarrollo del cerebro.....	32
6.3. Futuras líneas de investigación.....	33
7. Conclusiones / Conclusions	36
8. Bibliografía	38

ABREVIATURAS

CNVs	Variaciones en el número de copias
DPCs	Células de la pulpa dental
ESCs	Células madre embrionarias
HSCs	Células madre hematopoyéticas
iPSCs	Células madre pluripotentes inducidas
MSCs	Células madre multipotentes
NSCs	Células madre neuronales
PSCs	Células madre pluripotentes
SV	Virus Sendai
TEA	Trastorno/s del espectro autista
TSCs	Células madre totipotentes

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ¿Qué es el autismo?

El trastorno del espectro autista (TEA) es una discapacidad crónica del neurodesarrollo del cerebro con una etiología compleja y que se caracteriza principalmente por afectar a la capacidad de las personas para comunicar con el entorno social, por la presencia de conductas, intereses o actividades repetitivas y estereotipadas y por la dificultad para mantener el contacto visual. Los signos y síntomas del autismo varían ampliamente, al igual que sus efectos. El TEA aparece en la infancia y en los primeros años de vida, y tiende a persistir hasta la adolescencia y la edad adulta. Considerando que diferentes etiologías pueden generar un comportamiento similar, muchos trastornos con rasgos autistas se agrupan dentro del mismo cajón(1–8).

Las personas que sufren de TEA se encuentran entre las más vulnerables y dependientes de las diferentes sociedades humanas. El autismo afectará la forma en que experimentan el mundo y el entorno circundante. Como dice el Prof. Muotri, un pájaro puede ser tan poderoso como un jet que vuela sobre su cabeza y un árbol de Navidad más impresionante que una colisión de galaxias(7).

Los signos y síntomas clínicos varían en cada individuo, lo que hace más desafiante el diagnóstico(6). Normalmente aparecen temprano en el desarrollo, aunque los déficits sociales y comportamentales a menudo no son evidentes hasta más tarde, cuando el niño tiene dificultades para satisfacer sus demandas sociales o educativas(2). Un diagnóstico precoz parece ser la clave para una mejor trayectoria clínica, ya que brinda la oportunidad de realizar intervenciones tempranas en la vida del individuo(6). Aun así, todavía no existe un test médico para diagnosticar el TEA, y las familias dependen de profesionales especializados para realizar evaluaciones psicológicas y comportamentales. Es decir, menos del 15% de los casos diagnosticados de autismo tienen una causa subyacente identificada(4).

Los individuos con TEA generalmente presentan manifestaciones clínicas heterogéneas coocurriendo con el autismo, como ecolalia, hipotonía, convulsiones, trastornos del sueño, discapacidad intelectual y dificultades en el procesamiento del habla. Considerando la variabilidad de síntomas clínicos, un individuo con TEA puede estar severamente afectado en la comunicación, por ejemplo, mientras otros pueden hablar perfectamente, incluso tener un vocabulario por encima del promedio en la infancia, es

decir, no hay dos individuos con TEA iguales. Esto hace que el espectro de los TEA varíe entre severo y leve(6).

Aunque la etiología exacta se desconozca, hay estudios que sugieren que éste trastorno tiene componentes ambientales y genéticos en algunos casos(2,4,7). Hay muchas alteraciones genéticas implicadas en la fisiopatología de los TEA, coherentes con una heterogeneidad inherente de la condición, las cuales causan los diferentes tipos de autismo(2,6). Aun así, no todos los genes han sido mapeados y entendidos completamente(6). Si bien la arquitectura alélica del TEA aún no se ha aclarado en su totalidad, existe evidencia de un alto grado de heterogeneidad del *locus* y una contribución de variantes raras y de *novo*(8).

Los genes *de novo* desempeñan un papel importante en el proceso de la investigación de los TEA; sin embargo, todavía no hay respuestas a todas las preguntas sobre este trastorno(6). De hecho, en los últimos años los esfuerzos de secuenciación genómica están acumulando evidencias sobre la presencia de alteraciones genómicas hereditarias y esporádicas; desde mutaciones puntuales hasta variaciones en el número de copias (CNVs)(7), las cuales se han revelado fundamentales para establecer el papel de las variantes genéticas raras en la etiología del TEA(9). Éstos estudios también demuestran una sorprendente heterogeneidad genética, explicando parcialmente el amplio espectro de las manifestaciones clínicas(7). Los últimos estudios de genómica para descubrir nuevas variantes causales se han centrado en pequeñas deleciones cromosómicas o duplicaciones en forma de CNVs medidas en el genotipo de grandes cantidades de individuos. Así, se han encontrado CNVs en cadherinas y protocadherinas, implicando la vía de adhesión de células neuronales en el TEA y el sistema ubiquitina-proteasoma, que regula atributos sinápticos como la liberación de neurotransmisores y el reciclaje de la vesícula sináptica. Otros estudios han descubierto que los genes con CNVs interfieren en las vías de desarrollo neurológico, afectando la maduración y la función de las sinapsis glutamatérgicas que pueden ser interrumpidas en el TEA(1,4). Otras pruebas sugieren la existencia de defectos o alteraciones genéticas en la sinapsis neuronal, así como disparidades en la densidad de la espina dendrítica, el tamaño del soma y la señalización del calcio(4). No obstante, los mecanismos patógenos subyacentes al comportamiento autista siguen siendo desconocidos para la mayoría de los individuos con TEA(2). Se necesita una comprobación más exhaustiva de las variantes

estructurales para averiguar los mecanismos genéticos que sustentan el riesgo de padecer TEA(9).

Las imágenes neuropatológicas también proporcionan información importante sobre el TEA(1). La macrocefalia, la alteración del cerebro con un crecimiento excesivo temprano y la posterior normalización, se ha reportado asociada en algunos casos de TEA. Este aumento de tamaño del cerebro durante los tres primeros años de vida ha demostrado ser la primera manifestación clínica. Varios estudios sugieren que el crecimiento acelerado del cerebro en la población con TEA empieza prenatalmente y continua durante los primeros años de vida y la resonancia magnética revela unas neuronas más empaquetadas y un número reducido de células de Purkinje en el cerebelo(1).

Respecto a su epidemiología, se calcula que 1 de cada 68 niños tiene TEA. Esta estimación representa una cifra media, pues la prevalencia observada varía considerablemente entre los distintos estudios. Además, se ha visto que el TEA es casi cinco veces más frecuente en hombres que en mujeres(1–4,6,7,10). Las razones que han determinado el drástico incremento de la prevalencia del TEA a lo largo de los años(1), llevándola a ser una condición actualmente más frecuente que el cáncer infantil, la diabetes y el SIDA pediátrico combinados(6) no quedan claras; no obstante, la mejora y la disponibilidad del diagnóstico y un aumento legítimos de las tasa de recién nacidos afectados pueden ser factores que contribuyen(1–4,6,7,10).

1.2. Clasificación

Los TEA se definen en base a criterios clínicos, así los individuos con síntomas autísticos y además, con una mutación en un gen específico (mutación monogénica) pertenecen a un conjunto llamado autismo sindrómico o autismo monogénico (debido a un gen mutado). Por otro lado, las formas con una base genética incierta son llamadas bajo el nombre de autismo complejo, multigénico, idiopático o no sindrómico (fondo genético incierto) debido a la falta de información genética clara(2,6). Las formas monogénicas pueden surgir en conjunción con otros fenotipos de enfermedades que incluyen los siguientes trastornos genéticos: síndrome de X Frágil, síndrome de Rett, síndrome de Timothy, esclerosis tuberosa, síndrome de Joubert, síndrome de Angelman y síndrome de Phelan-McDermid y representan aproximadamente un 10% de los TEA. Por lo tanto, la mayoría de los casos de TEA son idiopáticos, con mutaciones *de novo* o

herencia de polimorfismos comunes que contribuyen al riesgo de padecer autismo en familias múltiples(2,10).

Los estudios en familias en donde había más de una persona afectada por TEA, han permitido señalar la influencia de distintos genes cuyas mutaciones pudieran estar implicadas en la causa del autismo sindrómico como, por ejemplo:

1. La haploinsuficiencia del gen SHANK3/PROSAP2: 22q13, involucrado en la sinapsis (presente en el 1% de los TEA). Conlleva un déficit severo del lenguaje y sociabilidad.
2. La deleción Xq13 y Xq22.3 (genes NLGN3 y 4: neuroligina). Implicado en la sinaptogénesis. Se asocian a tics y ansiedad (presente en <1% de los TEA).
3. Genes SLC25A12 involucrados en la mielinización, que afectan a la conectividad neuronal y esto puede ser parte de la causa del comportamiento de las personas con TEA.
4. La captación de serotonina: En alrededor del 30% de los individuos con TEA se observan niveles elevados de serotonina. Al tratar estos pacientes con inhibidores de la reutilización de serotonina, los síntomas mejoran.

Además, se piensa que otros genes como HOXA1, GABRA4, GABRB1 y algunas variaciones de 5-HTTLPR pueden contribuir a las manifestaciones del TEA. Belmonte, Bourgeron y cols. proponen un modelo de interpretación biológica del individuo autista donde genes conocidos de causas sindrómicas como el FMR1 (S. X Frágil), MECP2 (S. Rett), PTEN (S. Cowden-Bannayan), TSC, NF1, etc. originan modificaciones en la red neuronal de acción derivándose de ello y en función de la especificidad de cada uno, anomalías en el número, forma y conexión de las sinapsis que abocarían a un déficit mental, desbalance entre excitación e inhibición (Glutamato-GABA) con susceptibilidad a la epilepsia y fallos en el procesamiento de la información neuronal, un incremento del número de células cerebrales con la macrocefalia habitual, y un aumento de la serotonina que tendría implicación en los trastornos obsesivos-compulsivos. Esta podría ser una explicación para la fragilidad Xq27, el S. de Rett, la duplicación de 15q11-q13, etc.(11).

Para las formas no sindrómicas, que normalmente coocurren con otras comorbilidades como la macrocefalia temprana(6), la combinación de varios polimorfismos con variable número de copias (CNVs), estarían implicados en el desbalance del desarrollo y función cerebral del individuo autista(11,12)(Figura 1).

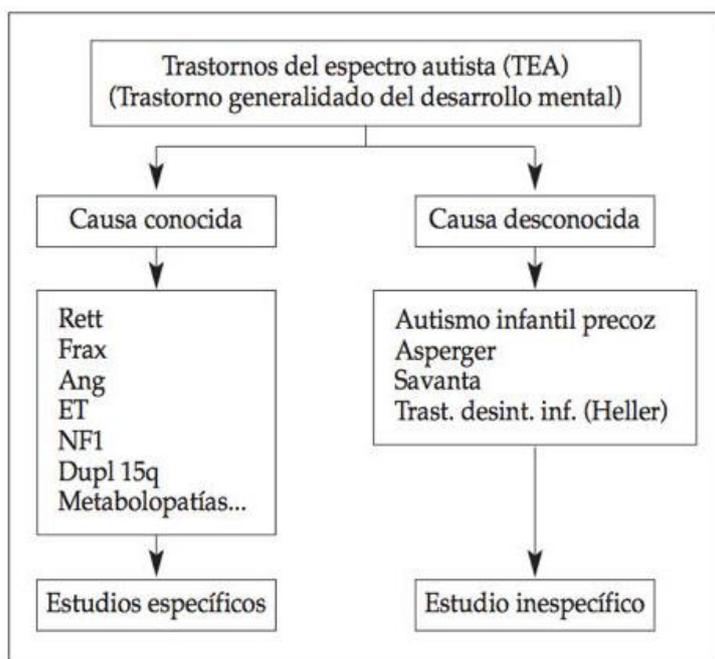


Figura 1. Clasificación del TEA según el conocimiento o no de la causa(11).

1.3. Tratamiento, evaluación y conducta clínica

No hay cura para éstas condiciones y eso puede suponer un reto para los individuos afectados de forma crónica(1,6,10). El tratamiento del TEA requiere una gran colaboración entre múltiples profesionales, y la base de éste incluye intervenciones educativas individualizadas, que incorporan estrategias de comportamiento y terapias primarias e intensivas para obtener mejores resultados clínicos y la atenuación de síntomas(1,7). El coste de este tipo de tratamiento personalizado es bastante elevado(1) y además, las intervenciones a corto y largo plazo son útiles y pueden reducir los síntomas del autismo en los niños, pero la respuesta al tratamiento es muy variable entre individuos, sugiriendo que se necesitan mejores herramientas de diagnóstico(2,6). Como estos niños maduran en adultos autistas, la mayoría no vive de manera independiente(1,3,4). Por lo tanto, la necesidad de un diagnóstico precoz y un tratamiento mejorado de los TEA no sólo es una preocupación creciente entre los

científicos y los médicos, sino también desde una perspectiva económica(1,4). Sin embargo, la naturaleza de los TEA, con su heterogeneidad intrínseca, y un amplio espectro de síntomas clínicos entre los pacientes(1), además de la carencia de células cerebrales humanas vivas, de biomarcadores y de modelos de ratones adecuados para la investigación, ha hecho difícil, hasta hace poco, avanzar en la comprensión y estudio de las vías neurológicas de la enfermedad y en el desarrollo de enfoques de tratamiento(3,6).

1.4. Modelos experimentales para estudiar los mecanismos de la base del TEA

Dada la inherente heterogeneidad de la base genética asociada al autismo, modelar éste trastorno usando animales transgénicos es muy difícil. Por otro lado, las muestras de cerebro recogidas de individuos *post mortem* con TEA se han usado durante mucho tiempo para ayudar a aclarar un fenotipo autista; no obstante, éste abordaje tiene limitaciones importantes, ya que el cerebro representa el estado terminal de la enfermedad; las células cerebrales están muertas y el tejido es fijo(2). Además, las células de los tejidos periféricos, como la sangre, tampoco son adecuadas para estudiar el TEA, ya que no son células del cerebro, y por lo tanto, no representan las células relevantes de las condiciones asociadas al TEA. Es decir, el potencial limitado de las muestras neuronales obtenidas de cerebros *post mortem* y la imposibilidad de aislar poblaciones neuronales de sujetos vivos ha bloqueado durante mucho tiempo el progreso hacia la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares de los trastornos del desarrollo neurológico(12).

Gracias a la introducción del concepto de reprogramación por parte del Premio Nobel Yamanaka, una nueva tecnología que permite obtener células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) a partir de las células somáticas de los pacientes, últimamente se están abriendo nuevas perspectivas para la comprensión de los mecanismos patogénicos del TEA y su tratamiento(6). Estas células derivadas de individuos afectados de TEA se están usando como una herramienta para modelar tanto la forma sindrómica como la no sindrómica. Además, el TEA plasmado en una placa se está proporcionando como una plataforma para la posible identificación de nuevos fármacos(6).

Desde la introducción de esta tecnología, muchos laboratorios están desarrollando modelos celulares basados en iPSCs, con el fin de avanzar en el conocimiento y orientar

nuevas estrategias terapéuticas para diversas enfermedades como las hereditarias, la diabetes, las enfermedades neurodegenerativas y las de neurodesarrollo.

Específicamente, éstos laboratorios generan y utilizan células madre pluripotentes inducidas y las diferencian hacia tipos celulares de interés, por ejemplo: neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, interneuronas GABA-positivas o astrocitos, células beta, etc. Se utiliza una perspectiva multidisciplinar que incluye desde abordajes de diferenciación en 3D hasta la manipulación genética de genes relevantes para la enfermedad y para orientar la diferenciación a un linaje determinado, orientada a resolver aspectos importantes de la biología celular y la biomedicina. De esta manera, se han desarrollado modelos genuinamente humanos para modelar el TEA tanto a nivel celular como molecular y genético.

El objetivo final es avanzar en el conocimiento los mecanismos moleculares responsables de las anomalías de desarrollo que llevan a una condición compleja, como el TEA, utilizando células neurales humanas que capturan la genética de los pacientes, e identificar las rutas moleculares que subyacen a estos procesos, y a su vez, permitir el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

1.5. Células madre

El término ‘célula madre’ apareció por primera vez en la literatura científica en 1868 por el biólogo alemán Ernst Haeckel. En sus escritos, las células madre tenían dos significados diferentes: uno es el origen evolutivo unicelular de todos los organismos pluricelulares y el otro es el óvulo fecundado que da lugar a todos los otros tipos celulares del cuerpo. Ésta última definición ha evolucionado hacia la definición moderna de células madre; células que pueden dividirse para autorenovarse y/o diferenciarse en otros tipos de células y tejidos(13). Generalmente se definen como células clonogénicas capaces de auto-renovación; es decir, son células no especializadas que se renuevan durante largos períodos de tiempo por división celular; y además son capaces de, bajo estímulos específicos, diferenciarse en una población específica; esto hace referencia a que pueden ser inducidas por un estímulo adecuado a diferenciarse a células con funciones especiales como miocitos, osteoblastos, etc.(14)

Las células madre están reguladas por mecanismos complejos para mantener sus características únicas. La comprensión de la regulación de estas células nos da la oportunidad de explorar mecanismos de desarrollo, así como estudiar enfermedades derivadas de su disfunción(13).

Las células madre están clasificadas en tres categorías distintas en función del grado de diferenciación en el que se encuentren. Hablamos de células madre totipotentes, células madre multipotentes o adultas y células madre pluripotentes.

1.5.1. Células madre totipotentes (TSCs)

Se trata de las células que forman un embrión desde la fertilización hasta la etapa de 8 células, antes de la compactación. Tienen una capacidad ilimitada de formar cualquier tipo de célula del feto, así como membranas y tejidos extraembrionarios, el propio embrión y todos los tejidos y órganos postembrionarios. La capacidad totipotente de estas células se debe al hecho de que cada blastómero del embrión en estas etapas tiene la capacidad de formar un nuevo individuo completo si se separa. De hecho, este método exacto se ha utilizado para la clonación reproductiva en la investigación y producción animal. Un ejemplo claro es el propio embrión(15).

1.5.2. Células madre multipotentes o adultas (MSCs)

Estas células, también conocidas como células madre adultas, se encuentran en el feto y en el individuo adulto. Son específicas de los diferentes tejidos y se encuentran en un estado de diferenciación que puede ser más o menos avanzado según el tejido del que se haya extraído. Se comprometen a dar lugar a células que tienen una función específica y algunas MSCs son responsables del mantenimiento y la regeneración del tejido en el que residen durante toda la vida, y por esta razón se consideran células que se renuevan a sí mismas. Un ejemplo son las células madre sanguíneas(15).

Las MSCs se encuentran en la mayoría de los tejidos adultos, como la médula ósea, la piel, algunas áreas específicas del sistema nervioso central, la grasa, el epitelio intestinal, etc. El tipo de MSCs que se usa de manera más habitual en las terapias de reemplazo celular son las células madre hematopoyéticas (HSCs). Las HSCs se encuentran en la médula ósea y en la sangre del cordón umbilical, tienen alta capacidad de autorenovación *in vivo* y son el reservorio celular para la formación de líneas de células sanguíneas. En el caso de la piel, la teoría más reciente postula que existe un

progenitor epidérmico común, que es capaz de mantener la homeostasis de todo el tejido. Por otro lado, se ha demostrado que la epidermis, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas poseen células progenitoras específicas, pero que estos progenitores pueden migrar a otros tejidos para repararlos, en caso de que la población de células madre residentes se haya perdido. Además, se ha demostrado la existencia de células madre nerviosas adultas, y estas células tienen la capacidad de diferenciarse todo el tiempo en neuronas maduras. Sólo hay dos áreas en el cerebro humano donde se ha demostrado la existencia de estas células madre neurales: el área subventricular de los ventrículos laterales y el área subglandular del giro dentado en el hipocampo(15).

1.5.2.1. Aplicación de las MSCs en terapia regenerativa

El objetivo de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos es regenerar y reparar las células y los tejidos dañados para restablecer las funciones normales. La medicina regenerativa implica el uso de biomateriales, factores de crecimiento y células madre. La regeneración de tejidos existe de manera natural debido a la presencia de células madre con el potencial de autoregenerarse y diferenciarse en uno de los tipos celulares más especializados. No obstante, este potencial de regeneración disminuye con la edad y la regeneración no es suficiente para reparar los daños producidos por enfermedades de base degenerativa, inflamatorias o tumorales. Las células madre embrionarias y las células madre pluripotentes inducidas se consideran células madre pluripotentes, pero tienen obstáculos técnicos y morales; además, estas células no son fáciles de controlar y pueden formar tumores después de su inyección. Al contrario, las MSCs son multipotentes y sólo pueden diferenciarse en un número restringido de tipos celulares(16).

Las MSCs se comprometen a diferenciarse en una población terminal específica, incluso algunas de ellas, como las células madre mesenquimales, tienen cierta plasticidad y pueden diferenciarse no solo en tejidos del linaje del mesodermo, como los osteoblastos, los condrocitos y los adipocitos, sino también hacia otras células del linaje del ectodermo como neuronas y astrocitos(15).

El uso de estas células no plantea ningún problema ético, ya que provienen del mismo paciente y, por lo tanto, eliminan la necesidad de utilizar un pre-embrión para derivarlas. El mayor problema que presentan estas células es que son difíciles de

mantener *in vitro* en su estado multipotente y, por esta razón, se usan principalmente en protocolos intraoperatorios o sin crioconservación(15).

A pesar de esto, hay muchos estudios destinados a la investigación de las MSCs cómo una fuente para regenerar tejidos. El reto es conseguir mejorar la vida de los pacientes, hacer las cirugías más predictibles y sustituir simplemente tejidos dañados o degenerados por MSC procedentes de tejidos ya adultos(16).

1.5.3. Células madre pluripotentes (PSCs)

Las PSCs tienen la capacidad de proliferar indefinidamente manteniendo la pluripotencia y tienen la habilidad de diferenciarse en cualquier célula de las tres capas germinales(17), es decir, tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares de un organismo adulto(18). Estas células se han usado para estudiar mecanismos moleculares que controlan muchos tipos de diferenciación celular. Hay dos tipos principales de PSCs, las células madre embrionarias (ESCs) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). Las ESCs derivan de la masa celular interna de los blastocitos de mamíferos y las iPSCs se fabrican *in vitro* reprogramando las células somáticas diferenciadas de tejido adulto a un estado pluripotente(17,18).

En 1981, la masa celular interna de un blastocito murino se aisló por primera vez, disociado y cultivado *in vitro* para obtener una línea de ESCs con un potencial proliferativo ilimitado e indiferenciado(18), es decir, unidades capaces de producir células de cualquier capa germinal(19).

El campo de las ESCs humanas surgió como un área muy prometedora en ciencias del desarrollo. Por primera vez, los investigadores tenían la posibilidad de explotar *in vitro* las primeras etapas del desarrollo humano. Por este motivo promete convertirse pronto en una herramienta poderosa para entender el neurodesarrollo humano(4).

Actualmente, las ESCs humanas se están estudiando como fuente de células de reemplazo para una serie de enfermedades, como el Parkinson, las lesiones medulares y la diabetes. Sin embargo, existen dificultades éticas con respecto al uso de embriones humanos, así como el problema del rechazo de tejidos después del trasplante en pacientes y la escasa disponibilidad de ESCs humanas específicas para cada enfermedad(4,17). Una forma de evitar estos problemas es la generación *in vitro* de células pluripotentes directamente de las propias células somáticas de los pacientes(17).

1.6. Células madre pluripotentes inducidas

Las iPSCs son células pluripotentes con capacidad de autorenovación que se han producido en el laboratorio a través de la reprogramación inducida de células somáticas, mediante la sobreexpresión de un número específico de factores transcripcionales. Este proceso conocido como reprogramación celular permite convertir cualquier células adulta del organismo en células pluripotentes que, como se ha explicado anteriormente, se pueden mantener infinitamente en el laboratorio y a su vez, pueden diferenciarse en los 200 tipos celulares(15).

Esto lo consiguió por primera vez, en 2006, Shinya Yamanaka que reveló la combinación apropiada de factores de transcripción (TF) Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (factores OSKM o también llamados factores de Yamanaka) que permiten la reconversión del destino celular somático a un estado pluripotente similar al de la ESC. Es así como Yamanaka desafió el dogma de que las células adultas tienen una flexibilidad limitada(4). Un año más tarde, en 2007, el equipo de Yamanaka también derivó iPSCs de fibroblastos humanos, abriendo el camino al uso terapéutico en medicina regenerativa de células directamente diferenciadas de iPSCs(18), como una alternativa a la terapia regenerativa mediante MSCs mencionada anteriormente. Además, las iPSCs no sólo suponen una ventaja por su posible uso terapéutico con un menor riesgo de rechazo inmune, sino también por sus perspectivas de comprender mejor trastornos complejos con condiciones hereditarias y esporádicas(12).

La base del proceso de reprogramación se está estudiando, aun así, se cree que sirve para despertar los factores de transcripción endógenos que caracterizan una célula pluripotencial y que normalmente se expresan durante el desarrollo embrionario(18). Los factores pioneros de transcripción acceden directamente a los nucleosomas, se unen a estructuras de cromatina cerradas y coordinan la unión de factores de transcripción secundarios para iniciar un nuevo destino celular(20).

En la reprogramación de iPSCs, los factores de Yamanaka OCT4, SOX2, KLF4 actúan como factores de transcripción pioneros, mientras que MYC actúa como un potenciador secundario, ya que no es imprescindible pero favorece la eficiencia del proceso de reprogramación(20). Una vez estos factores de transcripción están activados, a través de la expresión ectópica transitoria de los factores OSKM la célula permanecerá en estado embrionario(18).

1.6.1. Métodos de reprogramación

La liberación de factores de transcripción OSKM para la reprogramación de fibroblastos de ratones o humanos se consigue mediante agentes integrantes o no integrantes (Figura 2). Por un parte, agentes integrantes como los retrovirus modificados proporcionan una vía relativamente fácil y eficiente de introducir genes exógenos en células somáticas. Otra opción son los lentivirus que, a diferencia de los retrovirus, son capaces de transducir tanto las células en división como las no divisorias, disminuyendo considerablemente el riesgo de mutaciones y mejorando la eficiencia del proceso(18).

Delivery method			Delivery method		
Integrating	Viral	Retrovirus	Non-integrating	Recombinant virus	Adenovirus
		Lentivirus			Sendai virus
		Excisable polycistronic lentiviral vectors			
		Tetracycline/doxycycline inducible lentivirus		Episomal	Episomal vectors Minicircle DNA

Figura 2. Métodos de reprogramación(18).

Por otro lado, basado en su comportamiento como ADN episómico no integrante, los vectores adenovirales también han sido considerados como agentes para la reprogramación celular. Como alternativa a la introducción viral, se ha desarrollado el uso de vectores de ADN plasmídicos episomales, a pesar de que igual que el sistema adenoviral, la eficiencia en la generación de iPSCs humanas es baja(18).

Finalmente, en 2011 se reportó la eficiente generación de iPSCs libres de transgénicos mediante vectores no integrantes del virus Sendai (SV) sensible a la temperatura. El SV introduce ARN monocatenario en las células, el cual permanece en el citoplasma y no implica ni los intermediarios del ADN ni la integración en el genoma del huésped. Adicionalmente, el vector del SV que contiene los genes reprogramados puede ser eliminado de la célula huésped utilizando las mutaciones funcionales sensibles a la temperatura introducidas en las proteínas virales clave(18).

1.7. Células somáticas como fuente de iPSCs

Diferentes tipos de células somáticas han sido reprogramadas y usadas para modelar varias enfermedades incluyendo queratinocitos, varios tipos de células sanguíneas, células epiteliales renales exfoliadas presentes en la orina, fibroblastos, etc. Cada una de ellas tiene sus ventajas y desventajas(20). En concreto, la obtención de estos fibroblastos habitualmente se consigue mediante biopsias de piel, aunque en el caso de niños con TEA la pulpa dental se ha considerado una fuente no invasiva de fibroblastos mediante su obtención a partir de dientes exfoliados o extraídos, lo que supone una gran ventaja (Ilustración 1)(5,21).

1.7.1. La pulpa dental

La pulpa dental contiene tejido conectivo, células mesenquimales, fibras neurales y vasos sanguíneos y linfáticos. Sus principales funciones son las de producir dentina y mantener la vitalidad tanto biológica como fisiológica de la dentina. El paquete vasculonervioso entra en la pulpa dental a través del foramen apical y proporciona nutrientes y un sistema nervioso sensorial sensible(22). Las células de la pulpa dental tienen un origen ectodérmico, es decir, se desarrollan a partir del mismo conjunto de progenitores que generan neuronas y expresan varios marcadores(5,8).

Estudios sugieren la existencia de MSCs en la pulpa dental con elevada capacidad de diferenciarse en tejidos osteo/odontogénicos, adipogénicos y neurogénicos. Estas células son candidatas para la ingeniería de tejidos dentales por su fácil y rápida recolección y generación de tejidos de dentina y poseer privilegio inmune(23).

A lo largo de este trabajo no se hace referencia a estas células mesenquimales con capacidad de multidiferenciarse en tejidos dentales, sino que se expone el concepto de pulpa dental cómo una fuente de fibroblastos candidatos a la reprogramación en iPSCs para su posterior diferenciación en neuronas y al estudio del TEA mediante este modelo.

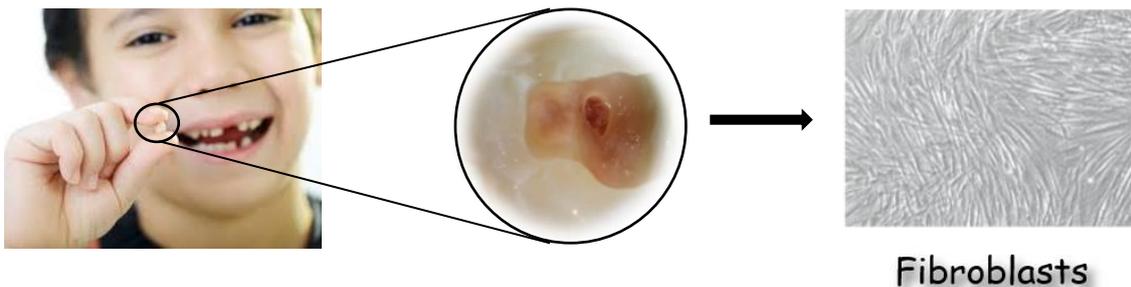


Ilustración 1. Representación esquemática de la obtención de fibroblastos a partir de la pulpa dental(23).

2. OBJETIVO

Este trabajo pretende ser una revisión científica que describa los avances actuales en el estudio del autismo mediante la utilización de iPSCs generadas a partir de la pulpa dental de niños con autismo y donantes sanos (controles). Las iPSCs representan una nueva, valiosa y prometedora herramienta para la comprensión de los mecanismos celulares, moleculares y genéticos que están en la base del desarrollo del autismo y además, sirven como una fuente infinita para identificar nuevos tratamientos.

Con él, se quiere dar respuesta a los siguientes puntos:

- ¿Cómo se puede modelar el autismo a partir de células de la pulpa dental?
- ¿Qué avances ha permitido el descubrimiento de éstos procesos?

3. DISEÑO

El trabajo es una revisión bibliográfica o narrativa que trata de dar una visión sobre el estado actual de éste tema dando respuesta, a la vez, a los objetivos propuestos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Estrategia de búsqueda

Para la elección de la literatura científica, en diciembre de 2018 se realizó primeramente una búsqueda exhaustiva a través de los recursos electrónicos Pubmed/Medline, Scopus y Cochrane en la cual se analizaron las publicaciones relevantes procedentes de dichas bases de datos. Así, se introdujo inicialmente las palabras clave ‘dental pulp AND stem cells’ y ‘dental pulp AND neurological disorders’ y se identificaron 2255 y 547 artículos respectivamente. Se seleccionaron los artículos relevantes mediante la lectura de sus títulos, resúmenes y finalmente el contenido completo.

Además, se llevó a cabo una búsqueda manual en diversas revistas como *Biological Psychiatry* o *Molecular Psychiatry*. Y además, se realizó una búsqueda específica acerca de artículos con participación del profesor Alysson Muotri, Director de la *Stem Cell Program, UCSD School of Medicine, San Diego, CA*.

En febrero de 2019 se realizó una segunda búsqueda a través de los recursos electrónicos ya mencionados con el fin de profundizar en las enfermedades neurológicas detalladas en el trabajo, en especial el autismo, por lo que se introdujo las palabras clave ‘dental pulp AND autism’, y se distinguieron 9 artículos.

Además, también se introdujeron las palabras clave ‘organoid AND neurological disorders’ con el fin de obtener la literatura escrita hasta hoy acerca del estudio de enfermedades neurológicas mediante organoides *in vitro*.

Durante todo el proceso de selección se recopilaron las publicaciones más recientes y las que se consideraron de mayor relevancia científica. También se identificaron artículos referenciados en las publicaciones seleccionadas.

4.2. Términos de búsqueda

Para realizar la búsqueda se utilizaron éstos términos clave: ‘stem cell’, ‘organoid’, ‘dental pulp’, ‘dental stem cells’, ‘iPSC’, ‘neurological disorders’ y ‘autism’ ya sea interrelacionados entre ellos o no. De este modo, la interrelación o no de estos términos permitió la búsqueda y posterior selección de los artículos.

5. RESULTADOS

Las investigaciones sobre el desarrollo normal del cerebro humano y la etiología de las enfermedades del desarrollo neurológico se enfrentan a varios retos importantes. Una dificultad obvia es la inaccesibilidad del embrión o feto humano, por razones prácticas y éticas. Otra es la complejidad del cerebro y de los propios mecanismos que controlan su desarrollo, como se ha mencionado anteriormente. El cerebro contiene entre 80 y 90.000 millones de neuronas, más de diez veces el número de personas vivas en el planeta actual, organizadas en complejas estructuras neuroanatómicas vinculadas por billones de conexiones. La variabilidad inherente de las poblaciones humanas es una complicación adicional. Los seres humanos muestran variaciones considerables en genética, epigenética y factores ambientales que modulan los efectos de los acontecimientos patológicos, dando lugar a significativas diferencias interindividuales en las consecuencias de un acontecimiento patológico dado. Todo esto hace más compleja la investigación sobre mecanismos comunes de desarrollo y de enfermedades(24).

Como se ha mencionado anteriormente, la obtención de iPSCs a partir de células somáticas ha proporcionado al campo de la medicina regenerativa una nueva herramienta no solo para su potencial uso terapéutico con menor riesgo de reacción inmune sino también para investigar los mecanismos moleculares responsables de enfermedades complejas, hereditarias o esporádicas.

El primer trabajo para generar células neuronales de iPSCs se hizo utilizando células de un paciente con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y atrofia muscular espinal (SMA)(2). Desde éste primer artículo se han publicado muchos otros que demuestran la fiabilidad de esta tecnología de establecer modelos celulares de varias enfermedades no sólo genéticas sino también esporádicas y complejas como los trastornos neuropsiquiátricos, de neurodesarrollo y neurodegenerativas.

Estos cultivos definidos de subtipos específicos de células neurales y gliales generadas *in vitro* proporcionan un recurso valioso y único para investigar los mecanismos del neurodesarrollo humano inaccesible de otra manera. Además, la reprogramación celular también puede permitir la investigación de modelos específicos de pacientes con enfermedades genéticas y esporádicas y permitir a los investigadores monitorear la

progresión de trastornos neuropsiquiátricos y neurodegenerativos en estos modelos (Ilustración 2)(20).

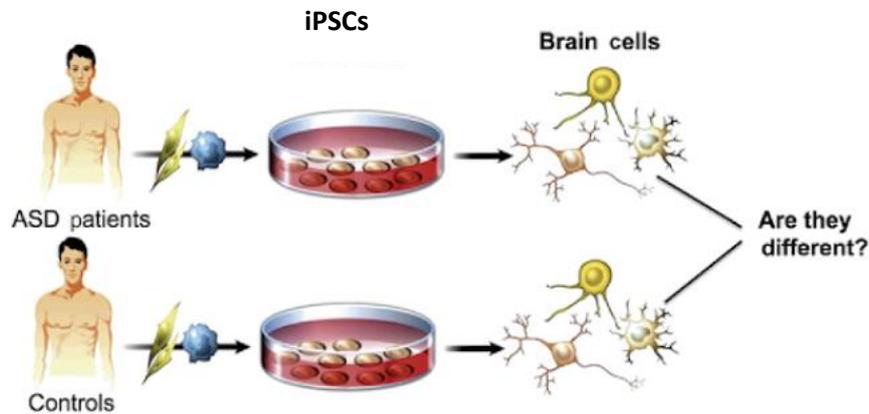


Ilustración 2. Utilizando iPSCs derivadas de pacientes con TEA se pueden generar progenitores neurales que después pueden dar lugar a subtipos neuronales relevantes para el estudio del trastorno y compararlos con un modelo control(25).

5.1. Modelaje del TEA a partir de iPSCs de la pulpa dental

Actualmente se han generado modelos celulares de varios trastornos del desarrollo neurológico como el TEA síndrónico y no síndrónico basados en la tecnología de las iPSCs. El modelaje del autismo es de interés particular, ya que se conserva la base genética de cada individuo, se puede investigar cualquier ruta involucrada en la fisiología de esta condición y relaciona las alteraciones genéticas con mecanismos moleculares y fenotipos de comportamiento y cognitivos complejos(2,8).

Un primer estudio es el realizado por Marcehtto y cols. en el que modelaron el síndrome de Rett (autismo síndrónico) a través de iPSCs derivadas de fibroblastos. En él, compararon las neuronas derivadas de iPSCs de pacientes con síndrome de Rett con muestras control y analizaron la mutación en el gen MeCP2. Los resultados sugirieron un fenotipo neuronal relevante con características diferentes a las neuronas control, es decir, observaron una reducción del soma i del núcleo, de la densidad del árbol dendrítico y de las sinapsis. Además, hallaron un defecto electrofisiológico de la señalización del Ca^{2+} . Para rescatar el fenotipo observado en este síndrome usaron el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1) como fármaco candidato, el mismo que actualmente se está usando en ensayos clínicos para este tipo de pacientes(25).

En otro estudio realizado por Griesi-Oliveira y cols. evaluaron el impacto biológico de las alteraciones genéticas y su relación funcional con la etiología del autismo no sindrómico a través de varios análisis utilizando células de la pulpa dental de los individuos afectados, modelos de ratón y células neuronales derivadas de iPSCs(8).

Su protocolo generó una población de neuronas del cerebro anterior, pero no se detectaron neuronas periféricas ni medianas del cerebro. No observaron una variabilidad significativa en estos subtipos de neuronas entre las muestras control y las muestras de individuos con TEA. Las neuronas mutantes provenientes de iPSCs de individuos con TEA y una mutación en el gen TRPC6 eran más cortas en longitud total y menos arborizadas que las neuronas controles. Además, la densidad de las espinas dendríticas también estaba reducida. Para rescatar estos fenotipos morfológicos utilizaron un vector lentiviral que ayudaba a la hiperforina a activar TRPC6, e hizo aumentar la longitud neuronal total, la arborización y la densidad dendrítica a los niveles control(8).

El TRPC6 regula la transcripción de genes implicados en la adhesión neuronal, el crecimiento de las neuritas y la orientación axonal. La interrupción de TRPC6 conduce a una haploinsuficiencia de la proteína correspondiente y por ende, a la afectación de la formación de sinapsis glutamatérgicas. En este estudio observaron que la sobreexpresión del gen TRPC6 rescataba el número de sinapsis(8).

Ciertos fenotipos neuronales asociados a la pérdida de función de TRPC6 son similares a los descritos por la pérdida de función de MeCP2 en neuronas humanas. Las alteraciones genéticas en MeCP2 han estado reconocidas en varios individuos con TEA no sindrómico. Además, dos estudios independientes informaron que MeCP2 regula la expresión de TRPC6 en cerebros de ratón, probablemente a través de un mecanismo indirecto. Se ha observado que los niveles de MeCP2 afectan en la expresión de TRPC6, y que actúan en la misma vía molecular para afectar la morfología neuronal y la formación de sinapsis(8).

Hasta ahora, los datos sugieren que la vía molecular que implica MeCP2 y TRPC6 es un factor limitante en la velocidad de regulación del número de sinapsis glutamatérgicas en neuronas humanas. Griesi-Oliveira, Brito, Chailangkarn y cols. observaron que la administración del IGF-1 promueve la inversión de los síntomas en un modelo de ratón y de alteraciones moleculares en neuronas humanas con síndrome de Rett. El tratamiento con IGF-1 rescató el número de sinapsis glutamatérgicas en las neuronas

mutantes, lo que sugiere que este tratamiento farmacológico podría corregir dicho fenotipo neuronal. Además, actualmente se encuentra en ensayos clínicos para pacientes con síndrome de Rett(6,8,12).

En este estudio de Griesi-Oliveira y cols. reprogramar las DPSCs del individuo con TEA a un estado pluripotente permitió explorar las consecuencias funcionales de la interrupción de TRPC6 en las células neuronales humanas. Observaron que la afluencia de Ca^{2+} era aberrante en las NSCs derivadas de un individuo con TEA, lo que sugiere que los mecanismos dependientes de la señalización de Ca^{2+} se vieron comprometidos en estas células. Las vías de señalización de Ca^{2+} ya han estado implicadas previamente en la etiología del TEA; mutaciones en diferentes canales de Ca^{2+} activados y en moléculas de señalización reguladas por Ca^{2+} ya se han identificado(8).

Aunque éstas variantes genéticas son penetrantes incompletas, es decir, no se pueden considerar mutaciones causales, pueden representar factores de riesgo para el TEA. Los resultados sugieren que TRPC6 es un nuevo gen predisponente para los TEA, que probablemente actúa en combinación con otras variantes genéticas para contribuir a los fenotipos autistas(8).

Por último, un proyecto de investigación del TEA dirigido por la Universidad de São Paulo es el llamado *Tooth Fairy Project Initiative*. Para modelar el TEA no sindrómico secuenciaron el genoma de todos los individuos participantes y usaron la tecnología de reprogramación celular produciendo iPSCs a partir de células madre de dientes temporales exfoliados humanos. A continuación diferenciaron las iPSCs en células madre neurales (NSCs) y luego en neuronas o astrocitos(5).

Finalmente, encontraron diferencias fenotípicas en la población neuronal del grupo con TEA respecto al grupo control (Ilustración 3)(5):

1. En primer lugar, observaron la reducción de la expresión de las proteínas presinápticas como SYN1 y las proteínas postsinápticas como PSD95 y Homer1.
2. También hallaron una reducción del número de sinapsis, conllevando a una menor conectividad entre ellas.

3. Por otro lado, encontraron una disminución significativa de la actividad espontánea, revelando una actividad reducida de las neuronas, lo que refuerza los datos anteriores.
4. Por último, encontraron niveles reducidos de glutamato, principal neurotransmisor excitador en el cerebro, en los medios cultivados con neuronas derivadas de individuos con TEA.

Asimismo, este estudio indica la presencia de alteraciones entre las conexiones neuronales que podrían explicar la dificultad de interacción social de los individuos afectados de TEA. Además, Russo y cols. derivaron astrocitos de iPSCs de DPCs para estudiar la relación entre este tipo celular y las neuronas mediante cultivos y co-cultivos.

Los astrocitos son responsables de varias funciones que van desde el desarrollo del sistema nervioso hasta el apoyo neuronal, el mantenimiento de las sinapsis, la nutrición de las neuronas, la sinaptogénesis, etc. Los astrocitos también son responsables del mantenimiento del entorno metabólico neuronal, como el aclaramiento de neurotransmisores, y también desempeñan un papel en la prevención del estrés oxidativo neuronal y la señalización de las citoquinas. Durante el estudio de Russo y cols., los astrocitos derivados de individuos con TEA mostraron un aumento significativo de los niveles de ROS en comparación con los astrocitos derivados del control, hecho que ya se había relacionado previamente con el TEA(5).

Otro parámetro interesante para evaluar la fisiología de los astrocitos es la capacidad de estos últimos para captar glutamato extracelular, teniendo en cuenta que un alto nivel de glutamato se ha relacionado previamente con el autismo sintomático. A pesar de que no encontraron diferencias significativas entre los astrocitos derivados de individuos con TEA y derivados de individuos control, observaron una ligera tendencia hacia un aumento de los niveles de glutamato en los astrocitos(5).

Por último, observaron la liberación de IL-6 astrocítica en los medios de los astrocitos humanos derivados de iPSCs, ya que esta IL se ha implicado previamente en el autismo. Anteriormente se ha encontrado la IL-6 significativamente aumentada en plasma, cerebro *post mortem* y líquido cefalorraquídeo de niños con autismo. En el estudio de Russo y cols., aunque en todos los astrocitos derivados de individuos con TEA no sintomático aumentaron significativamente los niveles de IL-6, encontraron que un

individuo con TEA tenía un nivel mucho más alto en comparación con otros astrocitos derivados también de individuos con TEA(5).

Hay evidencia de que los astrocitos contribuyen a la fisiopatología de los trastornos del neurodesarrollo como el autismo. Por eso, para evaluar el impacto de los astrocitos humanos en el fenotipo neuronal de los individuos con TEA Russo y cols. observaron la morfología neuronal y pudieron ver que neuronas derivadas de individuos con TEA tenían una morfología celular menos compleja cuando se cultivan encima de astrocitos derivados de individuos con TEA en comparación con su cultivo con astrocitos derivados de individuos control. Curiosamente, por un lado, cuando las neuronas derivadas de individuos control se cultivaron sobre los astrocitos derivados de individuos con TEA, pudimos ver un deterioro de la morfología neuronal. Por otro lado, las neuronas derivadas de individuos con TEA cultivadas sobre los astrocitos derivados de individuos control parecían mejorar el fenotipo neuronal del TEA. Los eventos sinápticos en la condición de co-cultivo también se analizaron mediante la localización de puncta para las cuatro condiciones probadas. Era evidente que el número de sinapsis también podía aumentar utilizando astrocitos derivados de individuos control para apoyar a las neuronas derivadas de individuos con TEA. En contraste, los astrocitos derivados de individuos con TEA interfirieron con la sinaptogénesis neuronal, como demostró un menor número de puncta y una co-localización de puntos en sus dendritas positivas para MAP2. A continuación, dado que la IL-6 es una citosina proinflamatoria bien conocida, probaron el papel de la toxicidad de IL-6 en neuronas y astrocitos derivados de iPSCs humanas en el modelo de co-cultivo. Cuando la actividad de IL-6 fue bloqueada por anti-IL-6 durante 2 semanas en las neuronas derivadas de individuos con TEA, pudieron observar un aumento en la co-localización de puntos y una mejoría de la sinaptogénesis. Sin embargo, cuando añadieron IL-6 humana recombinante en cantidades más altas a los medios de cultivo de las neuronas derivadas de individuos control, observaron una disminución significativa en la co-localización de puntos, influyendo negativamente en la sinaptogénesis. En conclusión, a pesar de que funciona bien *in vitro*, el tratamiento con anti-IL-6 en humanos debe investigarse cuidadosamente, ya que hay algunos informes que sugieren un empeoramiento de la neuroinflamación después del tratamiento con anti-IL-6, lo que sugiere un efecto protector de IL-6 en el sistema nervioso central(5).

Es decir, los hallazgos revelaron que las neuronas derivadas de iPSCs provenientes de individuos con TEA son menos activas fisiológicamente y muestran menos eventos sinápticos en comparación con las neuronas derivadas de individuos sin autismo(5).

Así pues, este estudio demuestra por primera vez el papel de los astrocitos en la fisiopatología del TEA no sindrómico utilizando la tecnología de las iPSCs(5).

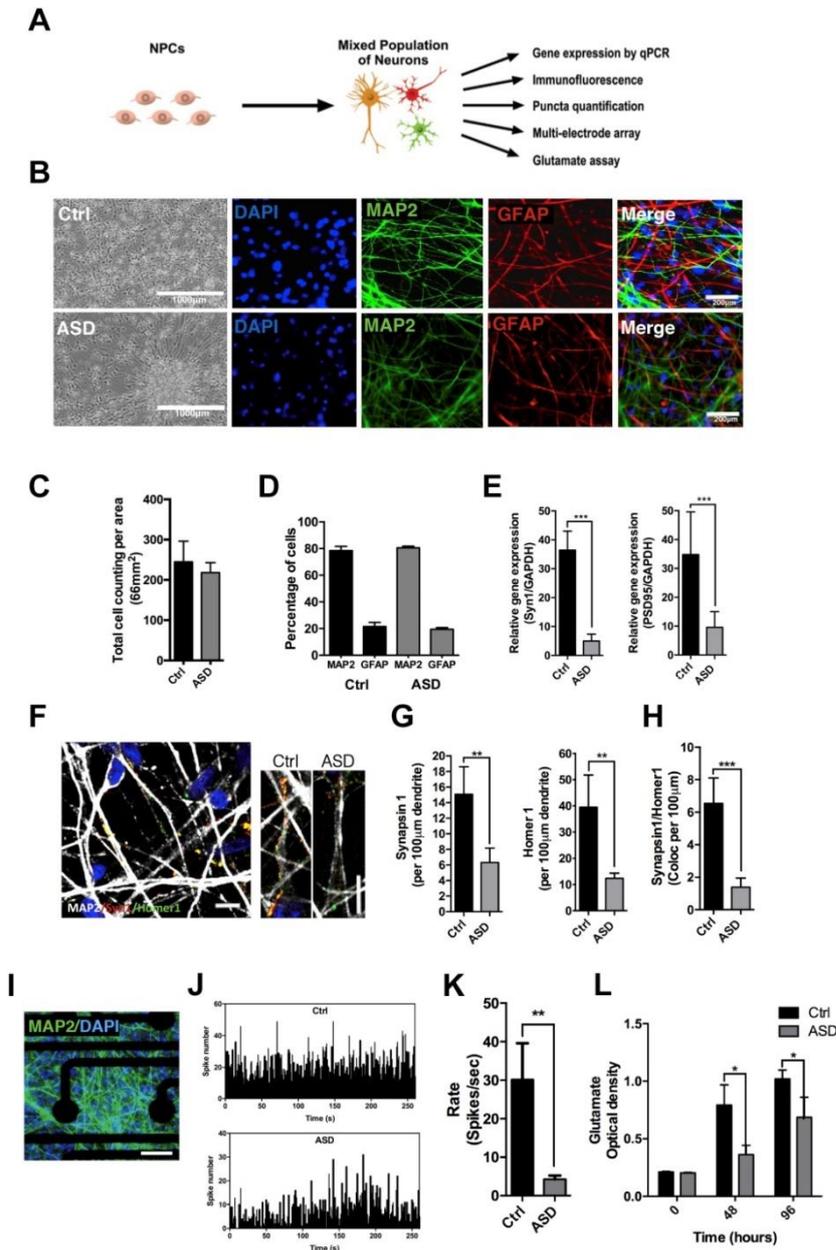


Ilustración 3. Neuronas derivadas de individuos con TEA muestran una reducción de la sinaptogénesis y de la producción de glutamato. (A) Esquema del proceso en poblaciones celulares. (B) Imágenes representativas de células neurales tras la diferenciación. (C) Correlación entre líneas celulares neurales de individuos con TEA e individuos control (recuento total). (D) Correlación entre líneas celulares neurales de individuos con TEA e individuos control (porcentaje de células positivas para MAP2 y

CFAP. (E) Expresión génica de SYN1 y PSD95. Las neuronas derivadas de individuos con TEA muestran una reducción significativa de su expresión comparadas con las neuronas control. (F) Imagen representativa de puntos sinápticos que co-localizan. (G) Reducción del número de proteínas presinápticas y postsinápticas en neuronas derivadas de individuos con TEA. (H) Reducción de puntos sinápticos SYN1 y HOMER1 co-localizados en neuronas derivadas de individuos con TEA. (I) Imagen representativa de los electrodos de una placa llamada matriz multi-electrodo. (J) Defectos funcionales en la red neuronal de individuos con TEA. (K) Tasa de picos eléctricos comparando neuronas derivadas de individuos con TEA y controles. (L) Niveles reducidos de neurotransmisores de glutamato en neuronas derivadas de individuos con TEA(5).

En conclusión, a lo largo de estos últimos años se ha modelado el autismo tanto sindrómico como no sindrómico mediante iPSCs y se han visto ciertas similitudes entre estos estudios. Además, se han propuesto fármacos para rescatar estos fenotipos neuronales.

5.2. Organoides o cultivos 3D

Para abordar los problemas derivados de la complejidad del cerebro y sus mecanismos y la inaccesibilidad del embrión o feto humano, recientemente se están desarrollando, a partir de iPSCs, estructuras tridimensionales o 3D llamadas “organoides” que conservan elementos importantes de la organización celular del tejido, pueden reproducir efectos clave del desarrollo del cerebro(24).

Normalmente, los protocolos usados para obtener neuronas a partir de iPSCs producen cultivos 2D monocapa de neuronas de diferentes tipos, mayoritariamente corticales. Estos cultivos 2D contienen células progenitoras que muestran un grado de diferenciación espacial: las células se organizan en estructuras en forma de roseta, con progenitores gliales radiales situados en el centro y progenitores situados hacia la periferia de las rosetas, de forma que los tipos neuronales característicos de las seis capas corticales se generan con éxito en cultivos 2D de PSCs humanas, pero no forman las capas características que normalmente se encuentran en la corteza. Los cultivos 2D reproducen claramente varios aspectos del desarrollo cortical normal, pero como no tienen la organización 3D y la arquitectura del tejido de la corteza cerebral normal, los procesos de desarrollo que dependen de este aspecto son poco probables de sucedan(24). Considerando que se pretende entender enfermedades del desarrollo, se está contemplando el uso de estas estructuras que recapitulan con mayor fidelidad las anomalías del cerebro típicas de estos trastornos(19).

Mientras que los cultivos celulares en 2D han proporcionado importantes ideas en la biología celular, estos cultivos homogéneos lamentablemente han fracasado cuando se trataba de entender el desarrollo de los tejidos animales, que están compuestos por un gran repertorio de tipos celulares organizados en disposiciones complejas en 3D. Por lo tanto, para poder modelar con mayor precisión el desarrollo del tejido, se adoptó este nuevo enfoque, uno que modelara la organización 3D adecuada y el desarrollo de todo el repertorio de tipos de células de tejido. Estos cultivos replican no sólo la complejidad del tipo de células presentes en el cerebro y los procesos de auto organización del tejido, sino también la principal organización de todo el órgano, en este contexto, las distintas regiones del cerebro. Es decir, los cultivos 3D se parecen más a la corteza en desarrollo y por tanto, son modelos más precisos(19).

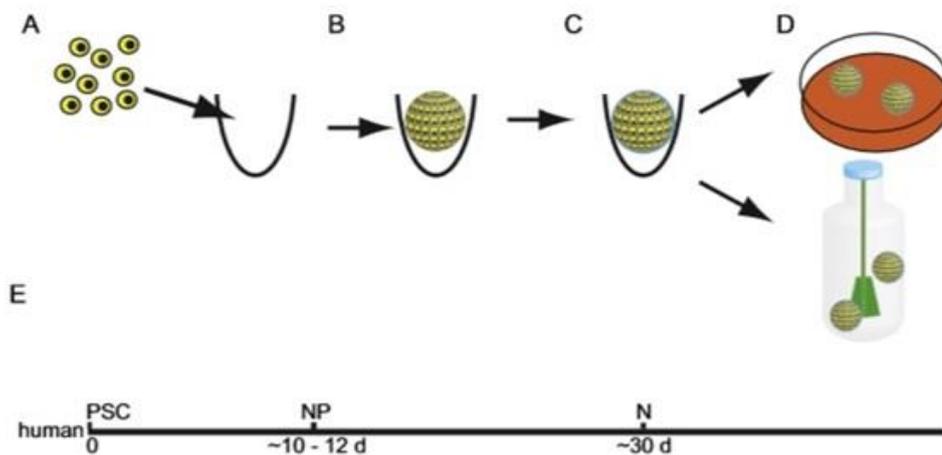


Ilustración 4. Protocolo para cultivar organoides cerebrales de PSCs. (A) Las células se introducen en pozos de cultivo celular. (B) Agregación de PSCs. (C) Incorporación de Matrigel (azul) en los agregados de PSCs. (D) Los organoides se transfieren a medios de diferenciación y cultivo. (E) Seguimiento del tiempo de diferenciación de las PSCs humanas(24).

Los organoides contienen una variedad de tipos celulares especializados, la disposición y el comportamiento de los cuales se parecen al proceso *in vivo* de la organogénesis(18,24). Estas estructuras tienen el potencial de modelar el proceso de desarrollo y la enfermedad, incluso más que las PSCs por separado, representando así una herramienta para pruebas de fármacos así como para un enfoque terapéutico(18). Los primeros organoides se derivaron de células madre intestinales y es probablemente el tipo de órgano mejor caracterizado descrito hasta ahora(24). Ahora ya se han descrito protocolos para derivar organoides correspondientes a un amplio abanico de tipos de

tejidos, incluyendo pulmón, hígado, fovea óptica (retina), adenohipofisis, tubo neural y cerebro. El más relevante en este trabajo es el organoide cerebral, que se parece a la corteza cerebral embrionaria y se ha derivado tanto de PSCs de ratón como de humanos (Ilustración 4)(18,24).

Hacer organoides cerebrales a partir de iPSCs representa una potente herramienta nueva para investigar los mecanismos de desarrollo de los trastornos específicos del neurodesarrollo, sean o no identificados los genes alterados en individuos afectados. Una de las principales ventajas clave en el uso de organoides humanos para desentrañar los mecanismos de la enfermedad del neurodesarrollo es que algunas de estas enfermedades han sido difíciles de reproducir en ratones mutados. Lancaster y cols. demostraron de manera muy efectiva la eficacia de un enfoque basado en organoides para estudiar los trastornos del desarrollo neurológico humano, derivaron iPSCs de un paciente microcefálico que tenía una mutación en un gen específico y cultivaron organoides cerebrales de las células derivadas del paciente. En otros estudios recientes, los organoides cerebrales que se formaron a partir de iPSCs específicas del paciente se utilizaron para investigar las anomalías del desarrollo neurológico que subordinan los trastornos del espectro autista idiopático o no sindrómico(24).

Los organoides tienen muchas ventajas incluyendo la fuente directa del paciente y la mayor complejidad estructural respecto a los cultivos 2D. Esto significa que todas las células diferenciadas llevarán no sólo la mutación sino también el fondo genético completo del paciente el cual, en algunos casos es crucial para ver correctamente y evaluar la patología(18).

6. DISCUSIÓN

6.1. Limitaciones del modelaje del TEA mediante iPSCs derivadas de DPCs

El tratamiento y el diagnóstico del TEA sindrómico y no sindrómico sigue siendo un gran reto para muchos médicos en todo el mundo. El modelaje de trastornos a través de iPSCs se ha usado muchísimo por científicos de todo el mundo con el objetivo de mejorar el conocimiento y abrir nuevas posibilidades para tratamientos más específicos(6).

Sin embargo, como con cualquier tecnología, este modelo tiene limitaciones. Por ejemplo, las condiciones fisiológicas en el cultivo de células imitan las neuronas, pero no es el cerebro real, lo que puede afectar la comprensión completa de cualquier condición. Por lo tanto, para confirmar lo que se ve *in vitro*, se debe utilizar un modelo genuino para validar los datos(6). Además, es posible que falte información de señalización o sobreestimulación importante, enmascarando fenotipos celulares potenciales o creándolos artificialmente(12). Otro punto es el problema del uso de controles adecuados, principalmente para el TEA no sindrómico o cualquier otra enfermedad con antecedentes genéticos no específicos. El control ideal sería utilizar líneas celulares del paciente, que contienen el mismo genoma pero sin mutación(6). La manipulación dirigida de las iPSCs para introducir mutaciones genéticas en líneas celulares control o para restaurar la mutación de una línea celular del paciente es una herramienta prometedora. Hoy en día, este enfoque será posible, cuando la tecnología CRISPR para la edición del genoma esté disponible(6,12). Otro reto es la derivación de subtipos neuronales relevantes y aunque actualmente se están desarrollando protocolos específicos para subtipos de neuronas, sigue siendo un terreno desconocido. Lamentablemente, la caracterización de subtipos neuronales humanos es modesta a causa de la falta de conocimiento de la expresión temporal de genes específicos y de la activación respectiva del promotor. Los esfuerzos recientes en realizar mapas de expresiones del cerebro humano ayudarán sin duda(12).

6.2. Limitaciones organoides como modelos de desarrollo del cerebro

Mediante estos cultivos 3D se ha intentado superar las limitaciones que ofrecen las iPSCs. Más concretamente, los organoides cerebrales representan una buena aproximación a las primeras etapas del desarrollo del cortex cerebral *in vivo*. No obstante, tiene algunas deficiencias importantes, probablemente a causa de limitaciones

en los métodos de cultivo existentes. Por ejemplo, los organoides no consiguen desarrollar el patrón laminar claro que se encuentra en la corteza cerebral embrionaria, lo que sugiere que la migración radial de las neuronas corticales que se produce en el bebé no se reproduce de manera normal. En la actualidad, es probable que los organoides sean más útiles para estudios del desarrollo cortical precoz. No obstante, la tecnología cerebral de un organoide está en sus inicios, i es probable que las mejoras de los protocolos existentes permitan una modelización más precisa del desarrollo cortical, incluyendo sus etapas posteriores(24).

Lo más probable es que las diferencias entre organoides y cerebros embrionarios resulten de diferencias en el entorno en el que se desarrollan. Claramente, *in vivo*, la corteza no se desarrolla de manera aislada, está rodeada por otros tejidos que afectan a su desarrollo. Esto incluye los vasos sanguíneos, las meninges y las eminencias ganglionares, a partir de las cuales surgen las neuronas inhibitoras GABAérgicas, necesarias para los circuitos corticales y que posteriormente migran hacia la corteza en desarrollo. La falta de vascularización tiene consecuencias evidentes en el intercambio de gases, el suministro de nutrientes y la eliminación de productos residuales a medida que los organoides aumentan, pero cultivar organoides en un bioreactor giratorio o en presencia de niveles de O₂ altos podría compensar esto(24).

Aun así, el mayor problema para el estudio de las PSCs o de los organoides reside en su inmadurez funcional. En el proceso de reprogramación, las células se someten a un “rejuvenecimiento” que producirá células terminales diferenciadas que exhiban características similares a la contraparte fetal o embrionaria. Aunque en algunos experimentos la edad celular es un detalle despreciable, sería apropiado lograr un cierto grado de maduración al modelar trastornos relacionados con la edad, por ejemplo, los neurodegenerativos o de desarrollo neurológico(18).

6.3. Futuras líneas de investigación

Si el objetivo principal de los científicos es entender mejor la complejidad del cerebro humano examinando su desarrollo, un gran reto para ellos sobre el cerebro autista es el gran espectro de condiciones que se clasifican como TEA, porque presentan muchas diferencias en el fenotipo. Los pocos estudios existentes que comparen los diferentes subgrupos autistas entre sí da a entender que las diferencias más significativas aún pueden ser desconocidas(4).

Debido a la heterogeneidad clínica y genética de los TEA, no es de extrañar que actualmente no haya tratamientos aprobados para sus síntomas principales. Sin embargo, con la caracterización adicional de los genes y la secuenciación de genes a millones de familias, podremos desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y preventivas para los TEA(4). La tecnología de secuenciación ha demostrado ser útil para descubrir la complejidad de la variación estructural del autismo(9) y para la identificación de mutaciones funcionales subyacentes, y su asociación con tecnologías relacionadas con modelos biológicos permitiría sugerir correcciones genéticas específicas en genes aislados o en redes biológicas completas y dirigir el camino hacia el tratamiento de los TEA(4). La tecnología con iPSCs, asociada a la información genómica, también podría ofrecer nuevas formas de estratificar los tipos de autismos y personalizar el tratamiento(6). Esta estratificación podría resultar en el reconocimiento de nuevos trastornos con manifestaciones clínicas específicas, que en última instancia ayudarán tanto a los investigadores como a los profesionales de la salud(7). Además, la posibilidad de seleccionar individuos para ensayos clínicos específicos podría acelerar el desarrollo de nuevos tratamiento, ya que las pruebas de drogas podrían realizarse *in vitro* en una cohorte previamente definida. Asimismo, la plataforma de iPSCs también se puede utilizar para probar las contribuciones ambientales al autismo(6).

El uso de la tecnología con iPSCs específica para cada categoría de TEA podría permitir una comprensión más amplia del autismo y, idealmente, mejorar la detección de medicamentos. Sin embargo, dada la complejidad de los TEA, esto requeriría la colaboración y la inversión de varias disciplinas, desde el ámbito de la neurociencia molecular hasta la bioinformática y la psicología cognitiva, para así optimizar el desarrollo de un tratamiento(4).

No obstante, igual que con cualquier otro tipo de terapia, la determinación del uso de células madre para un uso adecuado de la terapia celular depende inevitablemente del nivel de seguridad y de si existen efectos secundarios sobre el tejido. Finalmente, si las instituciones combinasen sus bancos personales de iPSCs y métodos de detección de medicamentos en un consorcio de investigación, la combinación de diferentes pacientes con diagnósticos mejorados podría conducir a un mejor tratamiento farmacológico que mejorara los síntomas de este trastorno y nos pudiera dirigir hacia una cura(4,12).

Por otra parte, la comparación adecuada de células neurales generadas *in vitro* con sus equivalentes putativos *in vivo* aún representa un desafío importante para el campo de las células madre humanas. Además, la gran diversidad de individuos humanos en comparación con los ratones consanguíneos, así como la complejidad prácticamente ilimitada de los trastornos neurológicos, sigue siendo un problema difícil. Se espera el refinamiento de la tecnología para permitir que el desarrollo de subtipos específicos de células neurales, en combinación con enfoques para la caracterización molecular de células individuales, proporcionen una plataforma para la identificación y validación de la diana del medicamento y también para la selección de fármacos y nuevos diagnósticos(20). Es más, un nuevo enfoque para la investigación biomédica, basado en el mapeo de las rutas de las enfermedades humanas en múltiples escalas biológicas, permitiría que los nuevos tratamientos progresasen de manera más rápida y rentable(3).

De hecho, hay estudios que dan soporte a la investigación de nuevos fármacos en los TEA como la hiperforina, un fármaco que activa específicamente el TRPC6 o la IGF-1, que podría aumentar no solo los niveles de proteína TRPC6, sino también otros componentes sinápticos. Por lo tanto, los individuos con alteraciones en esta vía podrían beneficiarse de estos medicamentos(8).

Al fin y al cabo, una mejor comprensión de la fisiopatología humana es esencial para desarrollar una terapia dirigida más efectiva para un tratamiento personalizado. Es decir, si el objetivo de la investigación biomédica es avanzar en la medicina humana, debemos alejarnos decisivamente de la búsqueda de mejorar los modelos animales, que a menudo no son lo suficientemente relevantes o confiables, e ir hacia el uso prioritario de métodos basados en la biología humana(3).

7. CONCLUSIONES

1. El TEA es un trastorno crónico del desarrollo basado en un conjunto de síntomas y signos, variables en cada individuo. A día de hoy no poseemos un diagnóstico claro porque no está clara la causa exacta que lo origina, pero la mejor terapia se basa en la identificación precoz y el consiguiente tratamiento psicopedagógico y conductual adaptado a cada paciente.

2. Desde la aparición de las iPSCs una década atrás, el conocimiento de las claves necesarias para diferenciar células pluripotentes en células precursoras neurales específicas y en subtipos neuronales funcionales ha crecido enormemente. Dichos avances han hecho posible el estudio del neurodesarrollo humano, la neurofisiología celular y los trastornos neurológicos esporádicos y familiares, como el autismo, de manera específica en el donante.

3. Aunque ésta tecnología aún está en fase inicial, está demostrando la capacidad de recapitular defectos neuronales relevantes de éstas condiciones. Este modelo tiene la capacidad de unificar datos generados a partir de imágenes cerebrales, trabajos animales y genética, generando hipótesis que se podrían probar en experimentos bien controlados con el fin de descubrir nuevos compuestos para tratar diferentes trastornos del neurodesarrollo.

4. Se han conseguido reprogramar varios tipos de células somáticas, entre las cuales se ha visto que los fibroblastos de la pulpa dental ofrecen una fuente fascinante de células adultas con propiedades excelentes para ser reprogramadas. Varios estudios están utilizando ésta fuente de células no invasiva para estudiar y entender el TEA, así como para dirigir la búsqueda hacia un diagnóstico más claro y un tratamiento válido.

5. La formación de organoides *in vitro* derivados de iPSCs ha proporcionado una oportunidad excepcional para caracterizar y estudiar el desarrollo temprano a partir de un trastorno neurológico con la base genética de dicha condición preservada, lo cual es particularmente importante para enfermedades complejas o multifactoriales como el TEA. Esto es potencialmente útil en el diagnóstico precoz y para entender el desarrollo y progreso de los trastornos neurológicos.

7. CONCLUSIONS

1. ASD is a life-long developmental disorder based on a set of symptoms and signs, variables in each individual. Nowadays, we do not have a clear diagnosis because the exact cause that originates it is not clear, but the best therapy is based on early identification and the subsequent psychopedagogical and behavioral treatment adapted to each patient.

2. Since the appearance of the iPSCs a decade ago, the knowledge of the necessary keys to differentiate pluripotent cells in specific neural precursor cells and in functional neuronal subtypes has grown enormously. These advances have made possible the study of human neurodevelopment, cellular neurophysiology and sporadic and familial neurological disorders, such as autism, specifically in the donor.

3. Although this technology is still in the initial phase, it is demonstrating the ability to recapitulate relevant neuronal defects to these conditions. This model has the ability to unify data generated from brain images, animal work and genetics, generating hypotheses that could be tested in well controlled experiments in order to discover new compounds to treat different neurodevelopmental disorders.

4. Several types of somatic cells have been reprogrammed, among which it has been seen that fibroblasts of the dental pulp offer a fascinating source of adult cells with excellent properties to be reprogrammed. Several studies are using this non-invasive source of cells to study and understand ASD, as well as to direct the research towards a clearer diagnosis and a valid treatment.

5. The formation of *in vitro* organoids derived from iPSCs has provided an exceptional opportunity to characterize and study early development from a neurological disorder with the genetic basis of said preserved condition, which is particularly important for complex or multifactorial diseases such as ASD. This is potentially useful in early diagnosis and to understand the development and progress of neurological disorders.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Muotri AR. The Human Model: Changing focus on autism. *Biol Psychiatry*. 2016;79(8):642-49.
2. Beltrão-braga PCB, Muotri AR. Modeling autism spectrum disorders with human neurons. *Brain Res*. 2017;1656:49-54.
3. Langley GR, Adcock IM, Busquet F, Crofton KM, Csernok E, Giese C, et al. Towards a 21st-century roadmap for biomedical research and drug discovery: consensus report and recommendations. *Drug Discov Today*. 2017;22(2).
4. Freitas BCG, Trujillo CA, Carromeu C, Yusupova M, Herai RH, Muotri AR. Stem cells and modeling of autism spectrum disorders. *Exp Neurol*. 2014;260:33-43.
5. Russo FB, Freitas BC, Pignatari GC, Fernandes IR, Sebat J, Muotri AR, et al. Modeling the interplay between neurons and astrocytes in autism using human induced pluripotent stem cells. *Biol Psychiatry*. 2018;83(7):569-78.
6. Brito A, Russo FB, Muotri AR, Beltrão-Braga PCB. Autism spectrum disorders and disease modeling using stem cells. *Cell Tissue Res*. 2018;371:153-60.
7. Muotri AR. Autism spectrum disorders: challenges and perspectives. *Dev Neurobiol*. 2018;xxx:431-33.
8. Griesi-Oliveira K, Acab A, Gupta AR, Sunaga DY, Chailangkarn T, Nicol X, et al. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Mol Psychiatry*. 2015;20:1350-65.
9. Brandler WM, Antaki D, Gujral M, Noor A, Rosanio G, Chapman TR, et al. Frequency and complexity of de novo structural mutation in autism. *Am J Hum Genet*. 2016;98(4):667-79.
10. Fernandes IR, Cruz ACP, Ferrasa A, Phan D, Herai RH, Muotri AR. Genetic variations on SETD5 underlying autistic conditions. *Dev Neurobiol*. 2018;xxx:500-18.
11. Toral JF, Rivas IL. Las distintas formas del autismo y sus causas genéticas. *Bol*

- Pediatr. 2010;50:113-21.*
12. Chailangkarn T, Acab A, Muotri AR. Modeling neurodevelopmental disorders using human neurons. *Curr Opin Neurobiol. 2012;22(5):785-90.*
 13. Zhao X, Moore DL. Neural stem cells: developmental mechanisms and disease modeling. *Cell Tissue Res. 2018;371:1-6.*
 14. Magallanes M, Carmona B, Álvarez MA. Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. *Rev Odont Mex. 2010;14:15-20.*
 15. Rodríguez I. Development of xenobiotic-free conditions towards the generation and propagation of clinically-safe human pluripotent stem cells [Master's thesis]. *Barcelona: Universitat Pompeu Fabra;2010. 131 p.*
 16. Tatullo M, Marrelli M, Paduano F. The regenerative medicine in oral and maxillofacial surgery : the most Important innovations in the clinical application of mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci. 2015;12:72-77.*
 17. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell. 2006;2:663-76.*
 18. Mora C, Serzanti M, Consiglio A, Memo M, Dell'Era PD. Clinical potentials of human pluripotent stem cells. *Cell Biol Toxicol. 2017;33:351-60.*
 19. Kelava I, Lancaster MA. Dishing out mini-brains : Current progress and future prospects in brain organoid research. *Dev Biol. 2016;420(2):199-09.*
 20. Mertens J, Marchetto MC, Bardy C, Gage FH. Evaluating cell reprogramming , differentiation and conversion technologies in neuroscience. *Nat Publ Gr. 2016;17(7):424-37.*
 21. Kaitlyn A, Reiter LT. Dental pulp stem cells for the study of neurogenetic disorders [Master's thesis]. *Memphis: UTHSC Department of Neurology;2017. 18p.*
 22. Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, White LJ. Dental pulp stem cells: function , isolation and applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med. 2015;9:1205-16.*

23. Guadarrama O, Guadarrama LJ, Robles NL. Aplicaciones odontológicas de las células madre pulpares de dientes temporales y permanentes. Revisión de estudios in vivo. *Revista ADM*. 2018;75(3):127-34.
24. Mason JO, Price DJ. Building brains in a dish : prospects for growing cerebral organoids from stem cells. *Neuroscience*. 2016;334:105-18.
25. Marchetto MCN, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo G, Mu Y, et al. A model for neural development and treatment of Rett Syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2010;143(4):527-39.