

INFORME FINAL PREMIOS DE EXCELENCIA MARÍA JOSÉ CARRASCO MOTOS

Generación de ratones quiméricos gliales humanos basados en células madre pluripotentes inducidas para estudiar la patología de los oligodendrocitos en pacientes con esclerosis múltiple primariamente progresiva

Introducción divulgativa

En la esclerosis múltiple (EM), la capa protectora de mielina que rodea las neuronas se daña, lo que provoca entre otros síntomas problemas de movilidad, fatiga y ralentización de ciertas habilidades mentales. Curiosamente, hay pacientes con EM que son mucho mejores (o mucho peores) que otros a la hora de reparar la mielina. Para averiguar qué hace que los pacientes con EM sean "buenos" o "malos remielinizadores", debemos averiguar qué es lo que falla durante este proceso. Nosotros hipotetizamos que los oligodendrocitos (las células responsables de formar la mielina alrededor de los axones) tienen defectos "de base" en los pacientes con EM primariamente progresiva (EMPP), lo cual los hace más vulnerables y menos eficientes a la hora de remielinizar.

Resumen divulgativo de los resultados

En primer lugar seleccionamos pacientes del Cemcat con distintas formas clínicas de EM [EMPP y EM remitente-recurrente (RR)] y con distinta evolución de la enfermedad (progresión rápida o lenta), a los que se realizó una extracción de sangre para luego convertir esas células de la sangre en células madre neurales. Con el fin de averiguar el potencial de mielinización de los oligodendrocitos de pacientes con EMPP en condiciones no inflamatorias, se trasplantaron células neurales humanas en el cerebro en desarrollo de ratones mutantes inmunodeficientes que no tenían mielina. Los oligodendrocitos derivados de pacientes con EMPP (particularmente aquellos con una progresión rápida de la enfermedad) mielinizaron el cuerpo calloso del ratón con menor eficiencia que los oligodendrocitos derivados de pacientes con EMRR y de controles sanos. Cuando en otro modelo de ratón indujimos el ataque autoinmune inflamatorio característico de la EM, las células neurales humanas de pacientes con EMPP trasplantadas mostraron dificultades para generar oligodendrocitos, convirtiéndose principalmente en astrocitos. Actualmente estamos analizando qué genes están alterados en los oligodendrocitos de los pacientes con EMPP, para buscar posibles dianas terapéuticas que nos ayuden a promover la remielinización.

Objetivos

Evaluar en un ambiente fisiológicamente relevante (el cerebro y la médula espinal del ratón) si los oligodendrocitos de los pacientes con EMPP tienen una menor capacidad de mielinización/remielinización que los de los pacientes con EMRR y los individuos sanos, tanto en condiciones inflamatorias como no inflamatorias. Comparar los oligodendrocitos de pacientes con EMPP que muestren una progresión rápida de la enfermedad con otros que muestren una progresión lenta. Nuestra hipótesis es que los oligodendrocitos de pacientes con PPMS tienen alteraciones genéticas intrínsecas que los hacen más vulnerables durante la enfermedad y por tanto menos eficientes a la hora de remielinizar.

Resultados

1. Generación de nuevas líneas hiPSCs a partir de pacientes con EMPP y EMRR. En colaboración con P-CMR[C] – IDIBELL hemos generado 8 nuevas líneas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSCs), mediante la reprogramación de células de la sangre de 4 pacientes con EMPP y 4 con EMRR (2 progresores rápidos y 2 lentos por cada grupo) a hiPSCs de manera no integrativa, utilizando virus Sendai. Estos pacientes se emparejaron por sexo y edad con 4 controles sanos previamente generados en el Banco Nacional de Líneas Celulares (**Fig. 1**). Las tasas de progresión de la discapacidad en los pacientes se calcularon dividiendo los cambios de la EDSS (escala de estado de discapacidad ampliada) por el tiempo de seguimiento. Posteriormente, se seleccionaron pacientes con tasas de progresión por encima del percentil 75 y por debajo del percentil 25 de progresión de la discapacidad (progresores rápidos y lentos, respectivamente). Mediante el genotipado de la tag SNP rs3135388, se seleccionaron sólo aquellos pacientes positivos para el alelo *HLA-DRB1*15:01*, que es el principal factor genético de susceptibilidad asociado a la EM.

2. Diferenciación de hiPSCs a hGPCs. Las hiPSCs se diferenciaron a células progenitoras neurales (NPCs) mediante el protocolo de cultivo en monocapa STEMdiff Neural Induction Medium + SMADi (STEMCELL Technologies), durante 21 días *in vitro* (DIV). Seguidamente, las NPCs se sembraron en placas con geltrex y se expandieron durante 7 DIV en presencia de FGF2 y EGF para inducir su diferenciación a células progenitoras gliales humanas (hGPCs).

3. Generación de ratones dobles mutantes inmunodeficientes y deficientes en mielina. Se adquirieron al proveedor americano *The Jackson Laboratory* varias parejas de ratones de la cepa *Rag2 KO* (inmunodeficiente) y de la cepa *Shiverer* (deficientes en mielina), para poder criar y expandir dichas colonias en el estabulario del VHIR antes de cruzarlas entre ellas para los experimentos de trasplantes. La cepa *Rag2 KO* pudo estabularse directamente en condiciones SPF (libre de patógenos específicos), pero los ratones *Shiverer* llegaron contaminados con *Klebsiella* y hubo que realizar una rederiva de la colonia con el fin de poder estabularla también en SPF. Ambas colonias se cruzaron con éxito a lo largo de un año para conseguir generar ratones dobles mutantes *Rag2^{-/-}; MBP^{Shi/Shi}*, que combinan una inmunodeficiencia severa con una deficiencia en mielina.

4. Generación y análisis de ratones quiméricos gliales humanos.

• **4.1. Trasplante neonatal de hGPCs en ratones inmunodeficientes y deficientes en mielina.** El primero de nuestros modelos quiméricos se basó en el trasplante de células de pacientes en ratones neonatos y su posterior análisis en condiciones no inflamatorias (**Fig. 2**). Las hGPCs se trasplantaron en ratones *Shiverer* dobles mutantes para MBP y *Rag2*, y que por tanto son al mismo tiempo deficientes en mielina e inmunodeficientes. Las células se implantaron en ratones neonatos de 2 días de edad (P2), coincidiendo con la 3^a ola de oligodendrogenesis en el cuerpo calloso del ratón. Mediante cirugía estereotáxica, inyectamos 50.000 hGPCs bilateralmente (en cada uno de los dos hemisferios cerebrales de ratón), para un total de 100.000 hGPCs. Una vez trasplantadas las hGPCs, esperamos 3 meses para dar tiempo a las células a que se integrasen, se diferenciasen a oligodendrocitos y comenzasen a mielinizar el cuerpo calloso. El análisis inmunohistoquímico con marcadores de células humanas (STEM121), mielina (MBP) y oligodendrocitos (Olig2), reveló que las hGPCs de los pacientes con EMRR de progresión lenta y rápida se diferenciaron a oligodendrocitos maduros mielinizantes de manera similar a las hGPCs de controles sanos (**Fig. 3**; Miguez et al., resultados no publicados). Sin embargo, el número de oligodendrocitos mielinizantes disminuyó en los pacientes con EMPP de progresión lenta y fue casi inexistente en los de progresión rápida, donde se observaron células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) Olig2⁺/MBP⁻ incapaces de generar mielina (**Fig. 3**; Miguez et al., resultados no publicados). Cabe recordar que los ratones trasplantados carecen de la proteína básica de la mielina (MBP), y que por tanto toda la mielina observada ha sido generada forzosamente por los oligodendrocitos de los pacientes.

• **4.2. Trasplante embrionario de hGPCs en ratones inmunocompetentes.** El segundo de nuestros modelos quiméricos se basó en el trasplante de células de pacientes en embriones de ratón wild-type (WT) y su posterior análisis en condiciones inflamatorias, mediante la inducción de encefalitis autoinmune experimental (EAE) (**Fig. 4**). Para evitar el rechazo de las células en un ratón inmunocompetente se cambió la edad del modelo de EAE, inicialmente previsto en ratones neonatos. Las hGPCs se trasplantaron *in utero* en embriones de 14 días de edad embrionaria (E14.5), coincidiendo con la oligodendrogénesis del ratón en la médula espinal. Se inyectaron 50.000 hGPCs por embrión con la ayuda de un capilar de vidrio muy fino conectado a un microinyector FemtoJet 4i (Eppendorf). Las hGPCs se trasplantaron en el 4^o ventrículo embrionario, que desemboca en el canal central de la médula espinal, para que las células humanas lograsen alcanzar las regiones cervical (62%) y torácica (21%) de la médula espinal del ratón, además del tronco cerebral (16%). La supervivencia celular fue realmente buena (34%) para tratarse de un experimento de xenotrasplante en ratones inmunocompetentes. Al cabo de 2 meses, una vez integradas las células humanas en la médula espinal de ratón, procedimos a inducir la EAE mediante inmunización con MOG. 4 semanas después de la inducción (28 dpi), realizamos una extrusión hidráulica de la médula espinal de ratón y un análisis inmunohistoquímico del tejido quimérico, para evaluar la reactividad de las células humanas ante el ataque autoinmune y su posible participación en procesos de remielinización. Las hGPCs trasplantadas derivadas de pacientes con EMPP sobrevivieron al ataque autoinmune pero la mayoría se diferenciaron a astrocitos hGFAP-STEM123⁺, migrando hacia zonas con infiltrados inflamatorios y lesiones desmielinizantes donde se volvieron reactivos (**Fig. 5**; Miguez et al., resultados no publicados). Tan sólo pequeños grupos de células de pacientes con EMPP se diferenciaron a OPCs PDGFR α ⁺, mostrando claras

limitaciones a la hora de diferenciarse en oligodendrocitos maduros capaces de remielinizar (**Fig. 6**; Míguez et al., resultados no publicados).

• **4.3. Análisis genómico de las células oligodendrogliales trasplantadas.** En colaboración con el laboratorio del Prof. Castelo-Branco en el Instituto Karolinska (Estocolmo, Suecia), hemos comenzado a realizar transcriptómica espacial unicelular en nuestro tejido quimérico. Esta técnica permite la visualización y el análisis cuantitativo de genes expresados en secciones de tejido sin tener que extraer células de su contexto biológico, utilizando la plataforma de secuenciación in situ Xenium (10X Genomics). Así podremos saber qué genes se expresan de manera diferente en los OPCs y oligodendrocitos de los pacientes con EMPP, comparándolos con las células de pacientes con EMRR y controles sanos.

Conclusiones

- 1) Las hGPCs derivadas de pacientes con EM trasplantadas en ratones neonatos dobles mutantes (inmunodeficientes y deficientes en mielina) sobreviven hasta 3 meses y son capaces de diferenciarse en oligodendrocitos y mielinizar el cuerpo calloso del ratón.
- 2) En condiciones no inflamatorias, las hGPCs de los pacientes con EMRR se diferencian a oligodendrocitos maduros mielinizantes de manera similar a las hGPCs de controles sanos.
- 3) En condiciones no inflamatorias, las hGPCs de los pacientes con EMPP de progresión lenta se diferencian a oligodendrocitos mielinizantes con menor eficiencia que las hGPCs de pacientes con EMRR y los controles sanos.
- 4) En condiciones no inflamatorias, las hGPCs de los pacientes con EMPP de progresión rápida pueden generar OPCs, pero apenas pueden generar oligodendrocitos maduros.
- 5) Las hGPCs derivadas de pacientes con EM trasplantadas en embriones de ratón sobreviven durante al menos 3 meses y desde el canal central se distribuyen por la médula espinal cervical y torácica del ratón.
- 6) Tras inducir el ataque autoinmune inflamatorio característico de la EAE, las hGPCs de pacientes con EMPP muestran una diferenciación limitada hacia OPCs y fundamentalmente oligodendrocitos maduros, convirtiéndose principalmente en astrocitos reactivos que migran hacia las lesiones desmielinizantes.
- 7) Estudios transcriptómicos en curso en colaboración con el Prof. Castelo-Branco (Instituto Karolinska, Suecia) nos darán pistas sobre qué genes están alterados en las células oligodendrogliales de los pacientes con EMPP, para buscar posibles dianas terapéuticas que nos ayuden a promover la remielinización.

Relevancia científica

Uno de los puntos fuertes de nuestro proyecto es que nos ha permitido investigar posibles defectos primarios en oligodendrocitos de pacientes estableciendo 3 niveles diferentes de comparación:

- 1) Pacientes con EM vs controles sanos.
- 2) Pacientes con diferentes formas clínicas de la enfermedad: recurrente (EMRR) vs progresiva (EMPP).
- 3) Pacientes con EMRR o EMPP pero con distinta progresión de la enfermedad: rápida vs lenta.

Por otro lado, aunque los modelos de ratón se han utilizado ampliamente en la investigación de la EM, muchos compuestos que favorecen la remielinización en ratones fallan cuando se prueban en ensayos clínicos, lo que destaca la incapacidad de los modelos animales para replicar completamente las complejidades de la enfermedad humana. Por tanto, se requieren nuevos modelos experimentales que incorporen células de pacientes para investigar con mayor precisión la patología y el tratamiento de la EM. En este contexto, nuestros nuevos modelos basados en células madre humanas tienen un gran potencial traslacional para identificar nuevas estrategias terapéuticas en pacientes.

La ventaja de nuestros modelos humanizados de EM es que nos permitirán investigar los cambios genómicos que experimentan las células de los pacientes al inicio, en el pico y durante la progresión de la enfermedad, lo cual no se puede hacer con tejidos humanos post-mortem. Nuestro estudio contribuye por tanto a tres áreas de investigación traslacional de alto impacto en EM:

- 1) Desarrollar nuevos modelos humanizados *in vivo* que recapitulen mejor la complejidad de la enfermedad.
- 2) Determinar los mecanismos patológicos que subyacen al desencadenante inicial y evolución diferencial de la EM en los pacientes.
- 3) Descubrir nuevas terapias remielinizantes para frenar la neurodegeneración, particularmente en pacientes con EMPP.

Acciones divulgativas

Además de las presentaciones en congresos nacionales e internacionales detalladas a continuación, cabe destacar que los resultados finales de este proyecto se presentarán y discutirán en el próximo congreso ECTRIMS (Barcelona, 24-26 septiembre 2025).

Título del trabajo: Development of a new human iPSC-based EAE chimeric model to study glial pathology in multiple sclerosis patients

Autores: Andrés Míguez (1), Elisa Marín (1), Luciana Midaglia (1), Gloria López (1), Nicolás Fissolo (1), Clara Matute (1), Rucsanda Pinteac (1), Sunny Malhotra (1), Helena Bermejo (1), Begoña Aran (2), Bernd Kuebler (2), Silvia Selvitella (2), Anna Veiga (2), Xavier Montalban (1), Ángel Raya (2), Manuel Comabella (1) Afiliaciones: VHIR, Cemcat (1), IDIBELL (2)

Nombre congreso: 9th Joint ECTRIMS-ACTRIMS Meeting

Entidad organizadora: European & American Committees for Treatment and Research in Multiple Sclerosis

Fechas de celebración: 11/10/2023 - 13/10/2023

Lugar de celebración: Milan (Italia)

Tipo de participación: Póster

Cita: Miguez et al., Mult. Scler. J., 2023; 29: (3S)137-393; <https://doi.org/10.1177/13524585231196192>

Título del trabajo: Humanized preclinical models to study oligodendroglial pathology in patients with primary progressive multiple sclerosis

Autores: Andrés Míguez

Nombre congreso: Mediterranean Gironian Conferences on Multiple Sclerosis

Entidad organizadora: Girona Biomedical Research Institute

Fechas de celebración: 03/05/2024

Lugar de celebración: Girona (Cataluña)

Tipo de participación: Comunicación oral (ponencia invitada)

FIGURAS

Figura 1

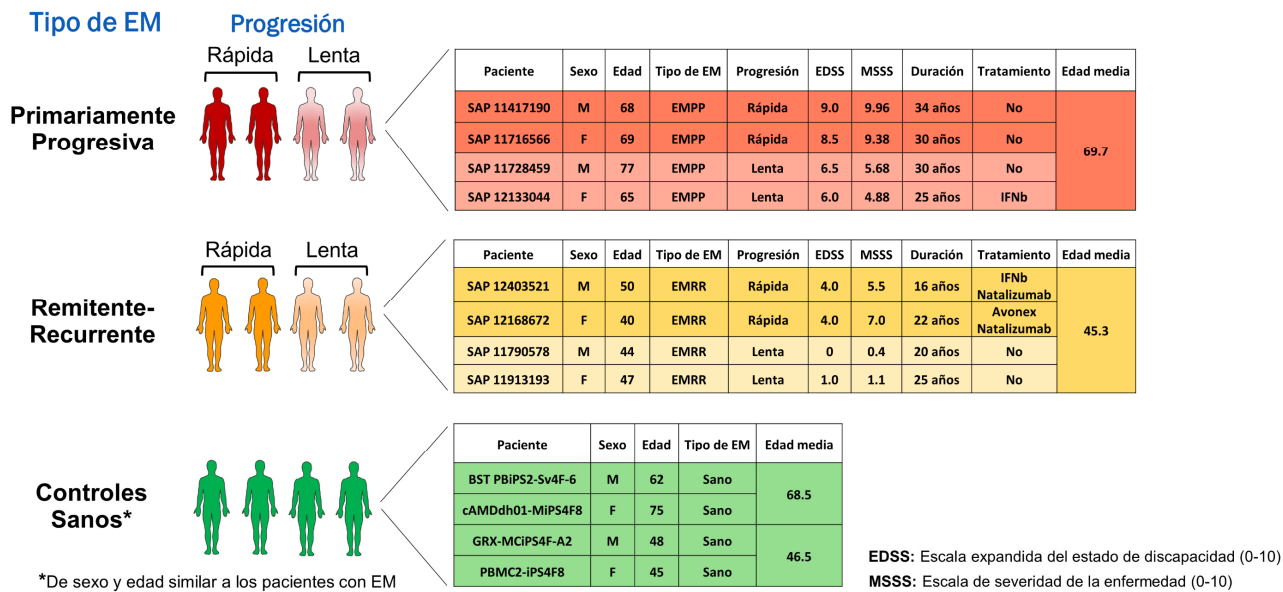


Figura 2

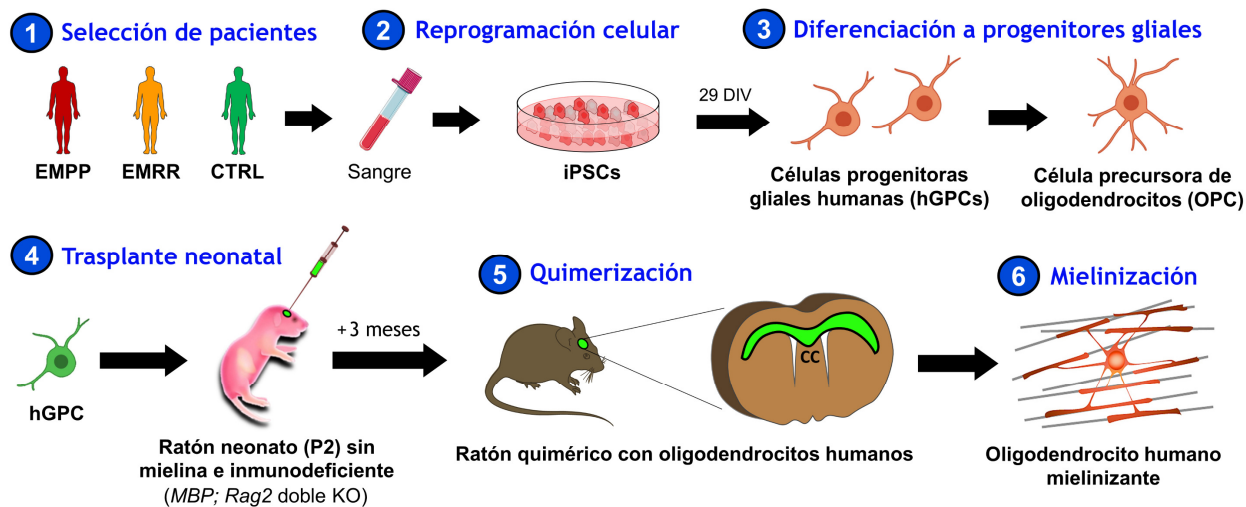


Figura 3

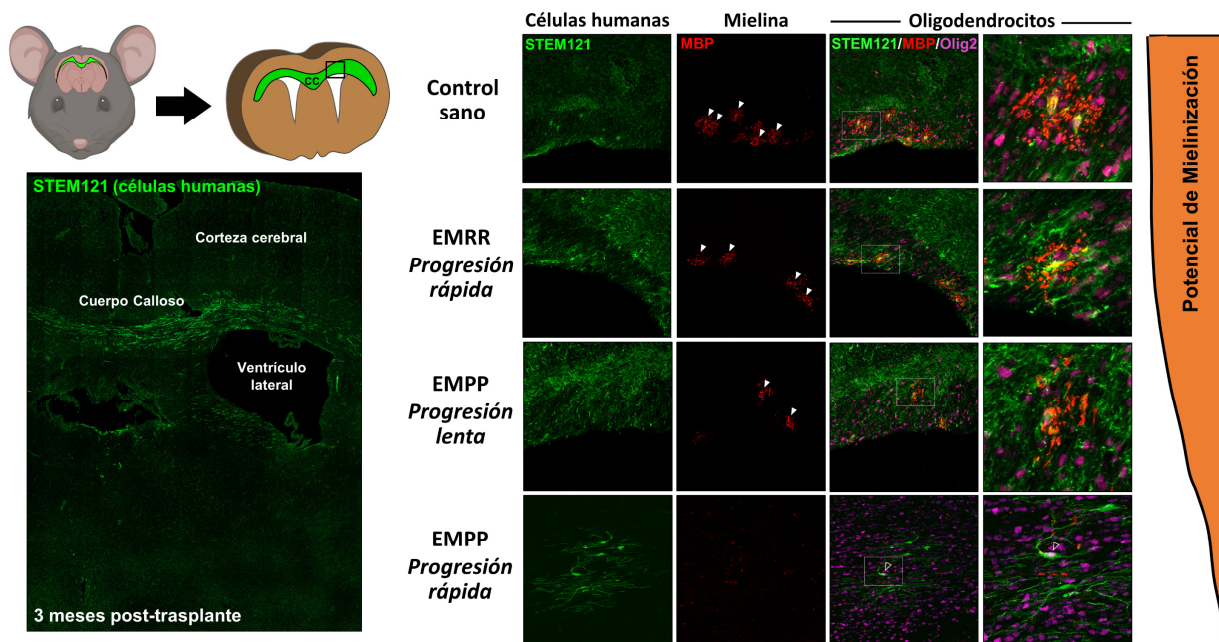


Figura 4

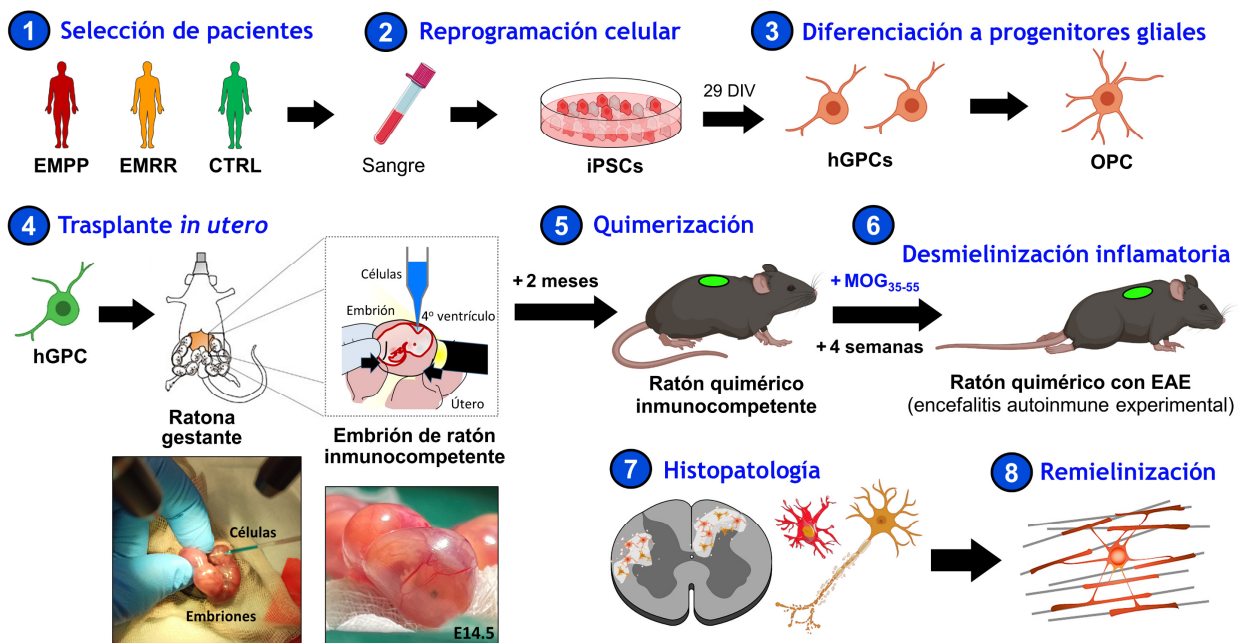
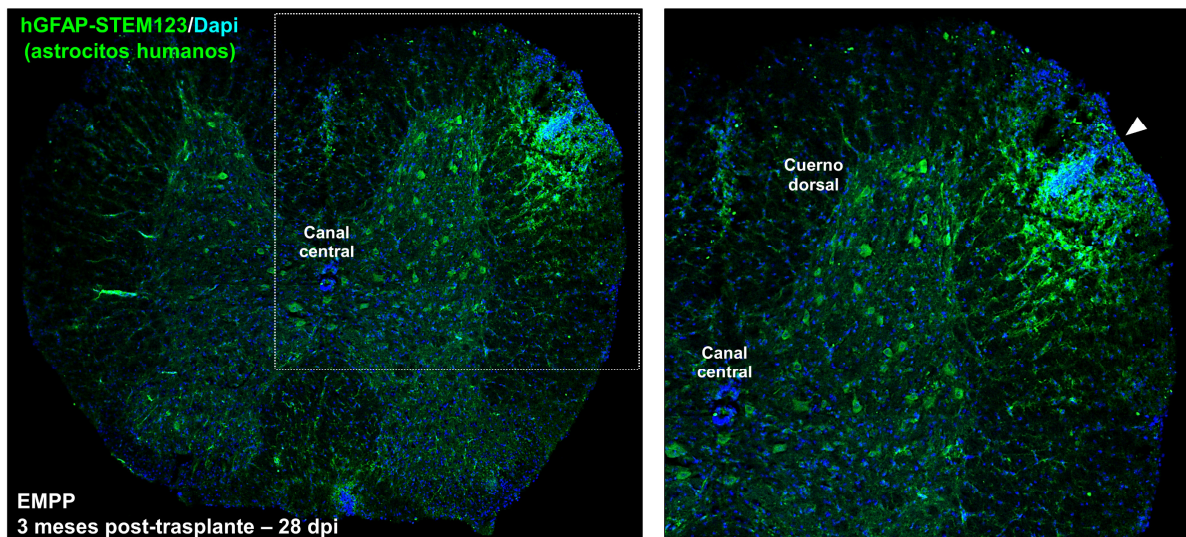


Figura 5



La mayoría de células de pacientes con EMPP trasplantadas se diferencian en astrocitos hGFAP-STEM123+, que muestran una morfología reactiva cuando rodean infiltrados inflamatorios de lesiones desmielinizantes en la médula espinal torácica del ratón

Figura 6

