

## ¿ES POSIBLE EL REJUVENECIMIENTO CELULAR?

por IGNACIO RAMÍREZ PARDO

GRADUADO EN BIOQUÍMICA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA. FACULTAD DE CIENCIAS. AV. DE CERVANTES, 2, 29071 MÁLAGA (ESPAÑA)

IRAMPARDO@GMAIL.COM

*Palabras clave:* rejuvenecimiento, iPSCs, CRISPR-CAS9

*Keywords:* rejuvenation, anti-aging, iPSCs, CRISPR/Cas9, muscular dystrophy

Enviado: 1 de diciembre de 2016

Aceptado: 5 de diciembre de 2016

El envejecimiento es un proceso gradual e intrínseco de las células influenciado por las condiciones de vida, donde se altera la homeostasis celular. La generación de iPSCs permitió reprogramar e incluso, rejuvenecer las células. Por otro lado, las herramientas de edición genómica como CRISPR/Cas9 junto con cambios en el medio de cultivo podrían usarse para producir iPSCs de individuos envejecidos. En este artículo se muestra cómo estas dos tecnologías revolucionarias podrían emplearse para tratar enfermedades asociadas al envejecimiento.

*Aging is a gradual and intrinsic cellular process influenced by lifestyle that alters cellular homeostasis. iPSCs generation allowed cellular reprogramming and even rejuvenate cells. Moreover, genome editing tools such as CRISPR/Cas9 and culture medium changes may allow iPSCs production of aged individuals. This article shows how the combination of these revolutionary technologies can be used to treat aging-associated diseases.*

### Envejecimiento y rejuvenecimiento

Los pasos agigantados en el avance de la medicina han supuesto el incremento de la esperanza de vida humana más allá de lo previsto por la propia selección natural<sup>[1,2]</sup>. Esto ha puesto de manifiesto patologías asociadas al envejecimiento antes desconocidas, por ello ha estimulado a investigar a nivel celular y molecular cómo se alteran las células humanas con la edad.

El envejecimiento celular consiste en la pérdida de la homeostasis celular por un proceso de deterioro molecular<sup>[3]</sup>. Se trata de un proceso inexorable, que sigue una programación biológica influenciada por agentes externos que generan un estrés celular, por lo que tiene un alto componente multifactorial. A grandes rasgos, ocurre una acumulación de macromoléculas o estructuras subcelulares dañadas, tanto en el núcleo como en el citoplasma, e incluso a nivel sistémico del individuo<sup>[3,4]</sup>. En primera instancia, este deterioro es subsanado por los mecanismos de reparación del ADN, de proteostasis y de biogénesis de los distintos orgánulos. Sin embargo, con la acumulación del daño y el estrés celular externo persistente todos estos sistemas se saturan. Esto causa que las células reduzcan su viabilidad, desencadenando respuestas como la apoptosis o la senescencia que disminuyen la funcionalidad del órgano en el que se encuentran; y en los nichos de células madre, su potencial regenerativo<sup>[5]</sup>. Dado que el envejecimiento tiene lugar en todas las células, el organismo sufre un

envejecimiento sistémico, donde cabe destacar el deterioro del sistema inmune y endocrino. Visiblemente, esto supone un cambio fenotípico en el individuo. Sin embargo, a nivel molecular se correlaciona con la aparición de ciertas patologías como las enfermedades neurodegenerativas, el cáncer, la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, sarcopenia muscular o enfermedades metabólicas<sup>[3]</sup>. Por otro lado, los defectos en la maquinaria de reparación del ADN o de la lámina nuclear dan lugar a diversas formas de progeria o envejecimiento acelerado. Por ello, el rejuvenecimiento celular consistiría en revertir todos estos mecanismos que causan el deterioro de la maquinaria celular. Para ello sería necesario subsanar o eliminar la acumulación del deterioro macromolecular suprimiendo el estrés metabólico y la generación de ROS. Alternativamente, la activación temprana de la maquinaria de reparación del ADN o de los mecanismos de proteostasis podría también suponer otra forma de rejuvenecer las células.

### La lucha contra el envejecimiento celular

Se ha comprobado cómo la práctica habitual de ejercicio físico tiene numerosos efectos beneficiosos para la salud, como retrasar el envejecimiento<sup>[6]</sup>. Durante el envejecimiento, la vía de mTOR se activa de forma persistente ante la abundancia de nutrientes y señales mitógenas, lo que estimula el anabolismo celular. Esto genera un estrés metabólico ante la síntesis aberrante de proteínas, que no pueden ser eli-

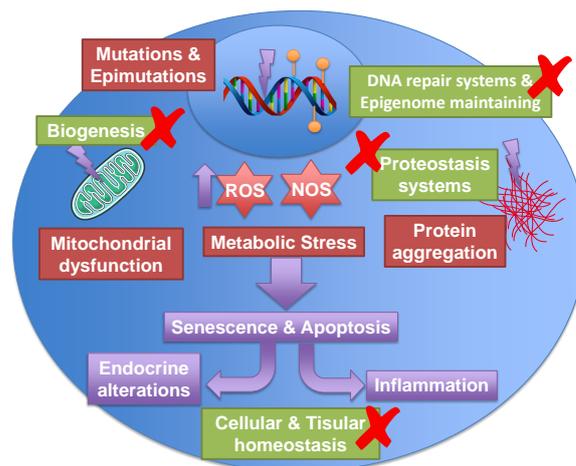
minadas porque mTOR también bloquea el complejo de iniciación de la autofagia, un importante mecanismo de proteostasis. El ejercicio físico limita la fuente de nutrientes e indirectamente inhibe mTOR, lo que reestablece los mecanismos de proteostasis para que eliminen el exceso de proteínas mal plegadas o de orgánulos dañados. Además, el ejercicio físico activa las sirtuinas, una familia de desacetilasas dependientes de NAD<sup>+</sup> presentes en núcleo, citosol y mitocondrias<sup>[6]</sup>. Estas enzimas tienen un efecto antagónico a mTOR, favoreciendo el correcto plegamiento proteico y modulando el epigenoma celular a la vez que activan la maquinaria de reparación del ADN.

Los fármacos diseñados para rejuvenecer las células tienen varias dianas moleculares que tratan de mimetizar los efectos del ejercicio físico<sup>[7]</sup>. Para ello, inhiben mTOR o activan las sirtuinas, ya sea directamente o elevando los niveles de NAD<sup>+</sup>. Sin embargo, estos fármacos no son capaces de rejuvenecer las células, ya que los telómeros se acortan, se acumula el deterioro macromolecular y el envejecimiento sistémico del individuo sigue afectando a las células del mismo. Por ello, estos fármacos suelen emplearse como prevención, tratamiento complementario ante el diagnóstico de alguna patología o para ralentizar el envejecimiento en los casos de progeria.

### El horizonte del rejuvenecimiento

El descubrimiento de las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) de ratón<sup>[8]</sup> y humanos<sup>[9]</sup>, por Yamanaka y otros en 2006 y 2007, respectivamente, supuso una revolución para la biología celular. Las iPSCs se obtienen mediante la transfección de células somáticas con los factores de Yamanaka o factores OSKM (Oct-4, Sox2, Klf-4 y c-Myc).

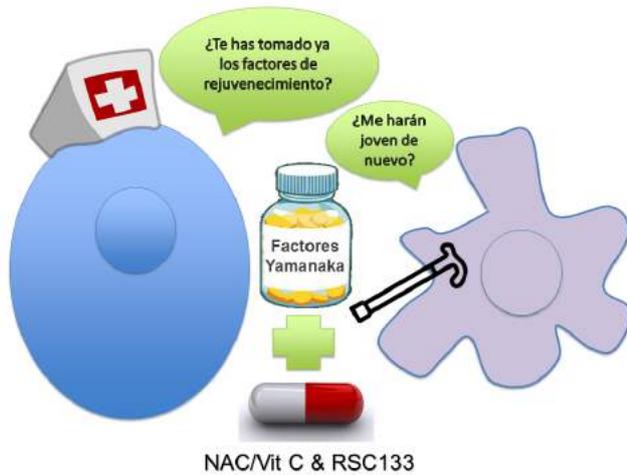
A diferencia de las aproximaciones terapéuticas mencionadas anteriormente, se ha comprobado que la generación de estas iPSCs supone la reprogramación de las células somáticas a un estado rejuvenecido<sup>[10,11,12]</sup>. Esto ocurre porque la generación de iPSCs restaura el patrón epigenético celular, los mecanismos de proteostasis y reactiva parcialmente la telomerasa, a la par que promueve la biogénesis mitocondrial y regeneración tisular.



**Figura 1. Modelo de los mecanismos implicados en el envejecimiento celular.** El ambiente celular así como el envejecimiento celular intrínseco producen el deterioro de las estructuras subcelulares y macromoleculares (rojo) donde los sistemas de reparación (verde) tratan de subsanarlos. Estos sistemas se saturan y dan lugar a las respuestas celulares de senescencia y apoptosis (violeta) que tienen un efecto local y/o sistémico a nivel de inflamación o alteraciones endocrinas. Todo ello culmina con la alteración de la homeostasis celular y tisular, que eventualmente se correlacionará con la aparición de alguna patología asociada al envejecimiento del individuo. Fuente: Elaboración propia.

En términos generales, la capacidad de las células de reprogramarse está limitada por su estado epigenético<sup>[13]</sup>. Con el envejecimiento celular aumenta el estrés oxidativo y el daño del ADN en forma de mutaciones y epimutaciones, lo que dispara la respuesta DDR (del inglés, *DNA, Damage Response*) de forma persistente. En primera instancia, se activa la maquinaria de reparación de ADN; sin embargo ante la magnitud del daño o su persistencia el sistema se satura y se dispara la senescencia. Con la respuesta senescente se altera el patrón epigenético donde algunas regiones se ven enriquecidas de marcas represoras. Entre las enzimas que generan y mantienen estas marcas cabe destacar DOT1L<sup>[14]</sup>, una histona metiltransferasa que comienza a activarse ante la DDR y mantiene la compactación de la cromatina. Por tanto, la forma de obtener iPSCs a partir de células senescentes consiste en inhibir DOT1L mediante antioxidantes como la NAC (N-Acetil Cisteína) o la vitamina C; o pequeñas moléculas como la RSC133 que además retrasan o debilitan la senescencia<sup>[15]</sup>. Por otro lado, si la senescencia se disparó debido al acortamiento telomérico, a pesar de que la célula adquiera la pluripotencialidad inducida, ésta no será viable porque la longitud telomérica no es suficiente para soportar las primeras mitosis. De forma que sería óptimo incluir una expresión transitoria de la

telomerasa para generar iPSCs de individuos envejecidos.

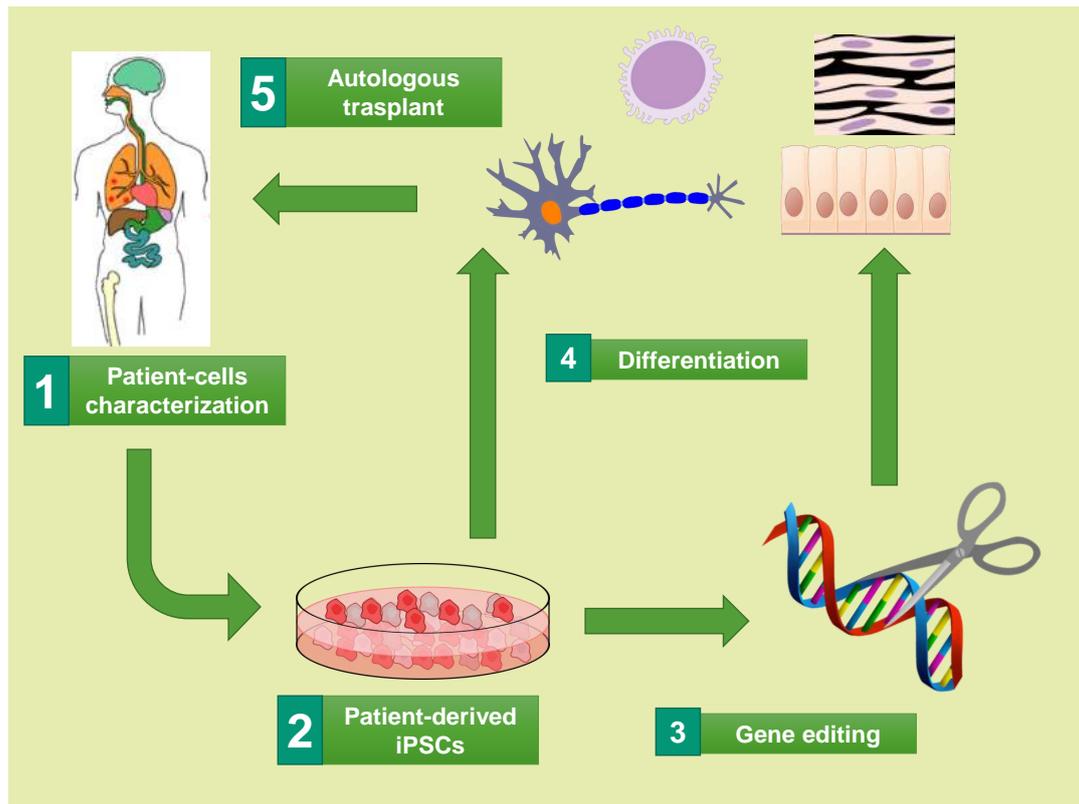


**Figura 2. Representación gráfica de los factores necesarios para rejuvenecer la célula.** Por un lado, los factores de Takahashi para inducir la pluripotencialidad y por otro lado antioxidantes como Vitamina C o NAC (N-Acetil-Cisteína) y la pequeña molécula RSC133 para superar el estado senescente de las células. Adicionalmente la expresión transitoria de la telomerasa podría incrementar las probabilidades de éxito del proceso. Fuente: Elaboración propia

Gracias a estas dos aproximaciones se ha conseguido obtener iPSCs *in vitro* de individuos envejecidos, incluso centenarios. Sin embargo, para poder obtener un tejido rejuvenecido existen varios obstáculos que superar. Continuar optimizando los procedimientos de transfección (1); de diferenciación celular para poder obtener una población de iPSCs homogénea que sea capaz de diferenciarse en un mismo tipo celular (2) y; que se integren correctamente en el tejido a reparar (3). Por ello, obtener órganos e incluso organismos rejuvenecidos es mucho más complicado porque requeriría un rejuvenecimiento sistémico, ya que una vez se trasplantan las células éstas volverían a envejecer ante las señales estresantes del medio. Adicionalmente hay que añadir el carácter multifactorial del envejecimiento, donde el estilo de vida así como el fondo genético del individuo influyen sobre el proceso.

## Terapia génica y terapia celular, una herramienta combinada

En la actualidad, las iPSCs obtenidas a partir de pacientes con algún defecto genético se cultivan y diferencian para modelar dicha enfermedad *in vitro*, y adicionalmente realizar un *screening* de fármacos<sup>[10]</sup>. ¿Y si se pudieran corregir estos defectos? Se podrían obtener células somáticas sanas a partir de individuos con un defecto genético gracias a la edición del genoma de las iPSCs generadas del paciente. En este principio se basan las nuevas estrategias que pretenden combinar la obtención de iPSCs junto con la revolucionaria tecnología de edición del genoma CRISPR-CAS9<sup>[16]</sup>. Estas tecnologías no solamente podrían ayudar a corregir el defecto genético, sino también a mejorar tanto los protocolos de obtención y diferenciación de iPSCs<sup>[16]</sup>. Esto se lograría mediante el bloqueo de la expresión de ciertos genes, como *DOT1L*<sup>[10]</sup> que dificulta la reprogramación de células senescentes. A pesar de ello, siguen habiendo grandes obstáculos que superar: Es prácticamente imposible a la par que altamente costoso rejuvenecer todas las células de un individuo adulto. Por tanto, esta terapia está encaminada a rejuvenecer tejidos concretos e incluso órganos con una patología determinada. De esta forma, podrían tratarse enfermedades como la distrofia muscular de Duchenne<sup>[18]</sup>, caracterizada por un defecto genético en la distrofina. Mediante CRISPR-CAS9 sobre iPSCs del paciente se generarían células rejuvenecidas que tuvieran subsanado este defecto genético. Posteriormente, habría que realizar una cirugía al paciente para sustituir el tejido muscular dañado y comprobar si existe una correcta integración del trasplante. Diferentes estrategias para tratar la distrofia muscular de Duchenne se han probado, y precisamente la integración de las nuevas células musculares parece ser uno de los mayores obstáculos que superar, debido principalmente a la posibilidad de rechazo. Por tanto, si dicho procedimiento se lleva a cabo con iPSCs generadas del propio paciente los riesgos se minimizarían.



**Figura 3. Representación esquemática del procedimiento a seguir como tratamiento para rejuvenecer células, tejidos u órganos.** Primeramente habría que realizar una caracterización del paciente del que se obtendrían iPSCs. Posteriormente, se aplicarían estrategias de edición de genoma para corregir mutaciones o defectos genéticos y se diferenciarían las células para llevar a cabo un trasplante autólogo. Alternativamente, si el paciente carece de mutaciones corregibles o severas podría realizarse la diferenciación de iPSCs directamente para proceder a su trasplante. Fuente: Elaboración propia.

## Conclusión

El descubrimiento de las nuevas tecnologías de generación de iPSCs y CRIPR-CAS9 han abierto nuevos horizontes en la investigación dentro del campo de la biomedicina. Concretamente, se ha comprobado como efectivamente la reprogramación celular a través de iPSC tiene un efecto rejuvenecedor para las células. Sin embargo, aún no se ha conseguido diferenciar las iPSCs en todos los tipos celulares del organismo, dado que no todos los protocolos de diferenciación están optimizados. Por ello, dentro del campo del rejuvenecimiento celular, una de las estrategias que se siguen actualmente consiste en reactivar los mecanismos rejuvenecedores mencionados anteriormente, sin llegar a desdiferenciar las células hasta el estado de pluripotencialidad. El hecho de comprender mejor como ocurre la activación de estos mecanismos durante la inducción de la pluripotencialidad celular es clave para rejuvenecer las células, ya que generar iPSCs para rediferenciarlas en el mismo tipo celular, además de ser altamente costoso, supone un rodeo poco eficiente. Además, la tecnología de CRISPR-CAS9 permite no solo opti-

mizar aún más el protocolo de generación de iPSCs y a dirigir su diferenciación, sino para corregir incluso defectos genéticos presentes en el paciente. De manera que la optimización y el uso combinado de ambas terapias podría suponer una cura efectiva y viable para patologías relacionadas con el envejecimiento del organismo.

## Referencias

- <sup>1</sup>Williams G. George Williams antagonistic pleiotropy theory of aging. *Evolution* 11(4): 398-411, 1957.
- <sup>2</sup>Kirkwood T. Evolution of ageing. *Mechanisms of ageing and development* 123(7) 37-745, 2002.
- <sup>3</sup>López-Otín C y otros. The hallmarks of aging. *Cell* 153(6): 1194-1207, 2013.
- <sup>4</sup>Zhang R y otros. The Four Layers of Aging. *Cell Systems* 1(3): 180-186 <http://doi.org/10.1016/j.cels.2015.09.002>.
- <sup>5</sup>Geiger H y Jasper H. Stem Cell Aging: Mechanisms, Consequences, Rejuvenation. *Vienna: Springer Vienna*, 2015.
- <sup>6</sup>Garatachea N y otros. Exercise Attenuates the Major Hallmarks of Aging. *Rejuvenation Research*, 18(1): 57-89, 2015. <http://doi.org/10.1089/rej.2014.1623>.
- <sup>7</sup>Lee J y otros. Beta-Lapachone, a Modulator of NAD Metabolism, Prevents Health Declines in Aged Mice. *PLoS ONE*, 7(10), 2012 <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0047122>.
- <sup>8</sup>Takahashi, K. y Yamanaka, S. (2006). Induction of Plu-

- ripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- <sup>9</sup>Takahashi K y otros. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5):861–872, 2007.
- <sup>10</sup>Soria-Valles C y López-Otín C. iPSCs: On the Road to Reprogramming Aging. *Trends in Molecular Medicine*, vol. xx: 1–12, 2016.
- <sup>11</sup>Oh J y otros. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nature Medicine*, 20(8):870–880, 2014. <http://doi.org/10.1038/nm.365>.
- <sup>12</sup>Rando S y otros. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: Resetting the aging clock. *Cell*, 148(1–2):46–57, 2012. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.003>.
- <sup>13</sup>Pareja-Galeano H y otros. iPSCs-based anti-aging therapies: Recent discoveries and future challenges. *Ageing Research Review*, 27:37–41, 2016.
- <sup>14</sup>Nguyen A y otros. The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes and development*; 3:1345–1358. <http://doi.org/10.1101/gad.2057811.ute>
- <sup>15</sup>Rony I y otros. Inducing pluripotency in vitro: Recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell Proliferation*, 48(2):140–156, 2015. <http://doi.org/10.1111/cpr.12162>.
- <sup>16</sup>Mojica FJM y otros. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3): 733–740, 2009.
- <sup>17</sup>Merkle FT y otros. Efficient CRISPR-Cas9-Mediated Generation of Knockin Human Pluripotent Stem Cells Lacking Undesired Mutations at the Targeted Locus. *Cell Reports*, 11(6):875–883, 2015.
- <sup>18</sup>Guiraud, S y otros. Advances in genetic therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy. *Experimental Physiology* 12:1458–1467,2015. <http://doi.org/10.1113/EP085308>.
- 
-