

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Enfermedad de McArdle: generación de un modelo de
músculo esquelético humano basado en el uso de iPSCs**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Victoria Cerrada López

Directora

María Esther Gallardo Pérez

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Enfermedad de McArdle:
Generación de un modelo de músculo esquelético humano basado en el uso de iPSCs

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Victoria Cerrada López

DIRECTORA

M. Esther Gallardo Pérez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina



TESIS DOCTORAL

Enfermedad de McArdle:

Generación de un modelo de músculo esquelético humano basado en el
uso de iPSCs

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA PRESENTADA POR:

Victoria Cerrada López

DIRECTORA:

M. Esther Gallardo Pérez

Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, i+12

Madrid, 2023

*“El éxito es la habilidad
de ir de fracaso en fracaso
sin perder el entusiasmo”*

Winston Churchill

A mis padres, Balbi y Jose.

Decía Marco Aurelio en sus meditaciones que la vida se parece más al arte de la lucha que al de la danza, pues ante lo que le cae a uno de imprevisto hay que mantenerse preparado y aguantar. Sin duda, el camino que he recorrido hasta llegar hoy a estar escribiendo estas líneas ha sido una auténtica batalla, llena de contratiempos, golpes y caídas, pero ahora cuando está a punto de sonar la campana que marca el final sonrío al pensar que no he dejado de bailar ni de cantar durante todo el combate.

Todo comenzó el día que recibí esa llamada telefónica: Dra. Esther Gallardo. – Victoria, ¿te acuerdas de mí? Y no me lo pensé dos veces... GRACIAS Esther por haberme dado la oportunidad que tantos otros me negaron, por ver en mi que la ilusión y las ganas tienen más poder que la nota media. Gracias por enseñarme que yo solita puedo con todo, y que por muy gordo que parezca el problema al final siempre se sale, aunque Murphy me acompañó hasta el último día, podemos decir que hemos salido. Y sobre todo, gracias por hacerme ver que entre el blanco y el negro hay una escala de grises y que entre los 30 y los 50 te aceptan la tarjeta joven en el Carrefour.

Durante los primeros pasos de este recorrido coincidí con gente maravillosa como Sara, Cris, Fran y Chepa, que hicieron que los nervios se esfumaran y comenzasen las risas. Y esa primera semana conocí a la persona que me enseñó todo lo que sabía de las iPSCs: Mari Carmen. Eme! Gracias por enseñarme a tratar con tanta delicadeza a nuestras celulillas, por ser la templeanza y la cordura que a veces necesitaba. Gracias por escucharme cada vez que te asaltaba, con el *paper* de Chal en mano, porque había encontrado algún detalle que podría cambiar toda nuestra investigación. O cuando te abordaba con el cuadernito de la motivación y te soltaba alguna frase estoica, doooooong!. Porque superamos juntas un montón de disgustos que ni el mismísimo señor del paño pudo evitar... Gracias por estar siempre dispuesta a cantar éxitos de ayer y hoy, a reír con las aventuras del padre Bartolomé, a discutir sobre los usos de las comas o a llorar cuando todo lo veíamos negro. *Keep calm and trust Chal.*

Tras la mudanza al Hospital 12 de Octubre conocimos a nuestros queridos vecinos, el grupo de investigación en ELA, alias “los eladios”. Millones de gracias Dani por tu sinceridad sin filtros, tu espontaneidad y tus guarrerías crónicas, por entendernos tan bien como para hablar durante horas y reírnos de cualquier estupidez, pero sobre todo gracias porque sin tener la necesidad de hacerlo me echaste una mano miles de veces con PCRs y secuencias malditas. Gracias por tener tan gran corazón... y ahí te dejo el chiste... aunque si no te convence siempre puedes apuntarte conmigo al curso :). Gracias también a Currito y Chiquitín por hacer del tiempo que compartimos una de las etapas más divertidas. Aunque nos dio pena que se fueran, lo superé rápido con la llegada de Laura, mi fiel compañera para picar a Dani. Gracias por cada abrazo en el momento oportuno, por ofrecerme siempre tu ayuda, por tus mensajitos de suerte en el confocal y nuestras eternas charlas *fitness*. Tu sabes que “*the most important part of dance is music...*” y la parte más importante de un doctorado son los amigos que haces por el camino, así que gracias por formar parte de ellos.

Y un mes de Febrero, apareció con mi mismo jersey color mostaza Marta. Nunca se me olvidará tu primer aporte a la comedia: - Como osas! - Tía pues te vas a empachar!... Desde entonces has sido, eres y serás la aceituna de mi vermut, sencilla pero imprescindible para convertir en bueno cualquier momento de la vida. Gracias por acompañarme en todas mis locuras sin que te importe lo chalada que sea la ocurrencia. Por formar parte de Martolo y Vikito, liándola día tras día en el laboratorio pero saliendo airoas tras esquivar todos los calvarios. Gracias por ser

mi apoyo cuando alguna parte de mi se tambaleaba y por esos abrazos a primera hora de la mañana que me daban la fuerza necesaria para afrontar el día. Tu y yo estábamos destinadas a encontrarnos, más allá de ser una misión oculta de la RAE por eliminar a todos los laístas y leístas del país, para darnos cuenta de lo distinta que es la vida cuando tienes alguien tan guay como tú para compartirla. Gracias por existir *Soul Sister*.

Por supuesto, no puedo olvidarme de todos esos pequeños pupilos de TFG y TFM que inocentemente pasaron por nuestro labo saliendo de allí más pallá que pacá (o Francisca). A Cris, la dulzura hecha persona, gracias por enseñarme que los sueños hay que perseguirlos. Carmen, Sofía, Rubén! Gracias por enseñarme a contar un papelito, dos papelitos... por defender a capa y espada las fiestas de pueblo y traer al laboratorio esa chispa de alegría tan necesaria. Gracias Daniel, porque aunque la pandemia no nos permitió disfrutar de más comidas en *tupper*, nos regalaste las sobremesas más divertidas del mundo. Gracias Teresa por tu sonrisa infinita y tus "vale" a todo, a mi pequeña Sara (el Tato que Martolo y Vikito necesitaban) por enseñarnos que es mejor preguntar que quedarse con la duda, a Lidiamen por poner el toque *green* y a Sara, por sufrir conmigo cada vez que bajábamos a ver un gel y contagiarme tantas veces tu particular risa (Já). Y por supuesto, gracias a Lydia, por dejarme formar parte del selecto club de gente que no te cae mal. Gracias a todos por ayudarme, tanto a nivel de experimentos como a nivel personal.

Eskerrik asko al vecino del otro lado del laboratorio, Llaverín!! Por compartir con nosotros todo tu conocimiento, tanto de la ciencia como de la vida y por repetirme una y mil veces que pase lo que pase, yo ya soy doctora. Aaaaasssuuucaaa! Gracias a todos los compañeros de la séptima, a mis compis de fatigas en cultivos Bea Rubio, Bea Gil y Jacin por compartir tantísimas horas de cabina, tantísimas charlas y aguantar tantas canciones de cualquier época que os he cantado. Y por supuesto, gracias a las que tenían que soportar el griterío desde el otro lado de la puerta: Vicky, Paqui e Itziar. A los chicos de neurovascular Ana, Blanca, Lluís, Arturo y Álvaro por derrochar buenrollismo cada vez que pasabais por nuestro lado y a todos los compis de la sexta, en especial a Javi y Laura por las interminables charlas de pasillo.

Los años han pasado casi sin darnos cuenta y me gustaría también agradecer a grandes profesionales del Hospital 12 de Octubre con los que he compartido esta etapa y me han ayudado a conseguir mi objetivo. Al Marianito de la suerte por solventar todas las incidencias informáticas, a los chicos del nitrógeno por ser las personas más amables de todo el hospital y por supuesto, gracias a la Dra. Inés García Consuegra, la Dra. Ana Moreno y a la Dra. Irene Gómez Manjón por su ayuda con los análisis de inmunodetección y cariotipo.

Y en este camino, que ocupó tantas horas de mi día a día, fines de semana, puentes y vacaciones, tengo que dar el GRACIAS más grande a todos mis amigos, ajenos a la ciencia, que siempre tuvieron paciencia para aguantar mis cambios de humor y se acostumbraron a preguntarme con cautela por mi tesis. A las que vieron cómo se sembró esta semillita: A Temacín porque aguantó esos comienzos cuando compartíamos piso, vino y cánticos en el salón. A mi Ali, porque desde que nos conocimos en la residencia no ha dejado de darme su amor incondicional y a mi Martulis Margulis por hacer que la distancia no quiebre nuestra amistad y que sonría siempre al escuchar la ventanita del amor. Gracias infinitas por poner tu granito de arena con la portada tan bonita que te has currado. A mis amigas de Toledo y a mis amigos de la universidad Jaime, Marichi, Ross y Wii, por advertirme de dónde me metía y aún así darme ánimo siempre para continuar.

Gracias a mis amigos del pueblo, la familia que se elige, por escuchar cada turra científica y darme ánimos en tantas ocasiones, a veces con palabras y a veces con unas cervezas al sol. A mi Divi porque entre tus vaciles siempre ha habido espacio para los ánimos, a Leti por comprender tan de cerca que trabajar a turnos no te deja planear con tanta antelación. A Miguel porque esta no ha sido ni será la única vez que caminamos juntos por la vida y a la Magande por enseñarme a buscar una solución a cada problema. A Nico y Diana por contagiarme siempre con su alegría crónica. Por supuesto, gracias a mi trío estable, a mis Efitos que han vivido y sufrido esta tesis de principio a fin como si fuera suya y a mi Adri por ser ejemplo de vida. A Miriam por ofrecerse mil veces a ir a cuidarme las células. A mi pre Manu por estar siempre cerca para recordarme que la noche es más oscura justo antes del amanecer y a mi pre María, por levantarme una y mil veces, por escucharme, comprenderme y motivarme, espero que sigamos bailando Abracadabras juntas muchos años más y que nunca nos falten unas buenas pipas para el paseo!

Pero sin duda, la parte más importante de toda esta historia es mi familia. Gracias abuela por quererme y cuidarme siempre, por ser ejemplo de lucha y de vivir con alegría. Mamá, gracias por preguntar todos los días por lo que había hecho en el laboratorio, aunque no te enterases de nada en absoluto, por animarme a tomarme la vida con humor y por enseñarme desde pequeña a llevar cuidado porque cuando empiezo cantando acabo llorando. Papá, gracias por darme la paciencia, las ganas de hacer las cosas bien y animarme a seguir. Por la cantidad de días que canturreé para motivarme aquello que me cantabas: hoy puede ser un gran día, plantéatelo así... aprovecharlo o que pase de largo depende solo de ti. Gracias a los dos por educarme en la cultura del esfuerzo y el trabajo duro, ya que sin duda, estoy dónde estoy y soy lo que soy gracias a vosotros.

Y por último gracias Luismi, mi Tupi, la persona que sin duda más ha sufrido esta tesis, el que ha tenido que aguantar todos mis estados de ánimo en esta montaña rusa que ha sido el doctorado, quien ha tenido que sacrificar un montón de fines de semana y que me hizo tantas veces de chófer para que tardara menos en ir a “echar de comer a mis celullillas”. Gracias por tu paciencia, tu cariño y por los paseos interminables hablando de cómo solucionar los problemas del día a día. Gracias por tu ánimo incondicional, por meter mi cabeza en tu sudadera cuando ya no sabías cómo consolar mis lágrimas de frustración y por celebrar cada éxito por pequeño que fuera.

Cinco años después de comenzar este camino puedo decir con muchísimo orgullo y el corazón llenito de experiencias que hemos llegado a la meta, gracias a todos por acompañarme, porque esta tesis lleva un trocito de cada uno de vosotros y gracias por hacerme comprender que, como decían los Rolling Stones:

*You can't always get what you want...
but if you try sometimes you will find,
you get what you need.*



ÍNDICE

ÍNDICE	15
RESUMEN	21
ABREVIATURAS	27
INTRODUCCIÓN	33
<hr/>	
1. ENFERMEDAD DE MCARDLE	35
1.1 METABOLISMO DEL GLUCÓGENO	35
1.2 ENFERMEDADES DEL ALMACENAMIENTO DEL GLUCÓGENO	36
1.3 GLUCOGENOSIS TIPO V O ENFERMEDAD DE MCARDLE	36
1.4 ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DE LA MIOFOSFORILASA	37
1.5 DIVERSIDAD GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE MCARDLE	38
1.6 EVOLUCIÓN DEL DIAGNÓSTICO	39
1.7 MODELOS PRECLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD DE MCARDLE	40
1.8 ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS	41
2. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS	42
2.1 BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS MADRE	42
2.2 DESCUBRIMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS	43
2.3 APLICACIONES DE LAS iPSCs	43
3. GENERACIÓN DE MÚSCULO ESQUELÉTICO "IN VITRO"	45
3.1 ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO	45
3.2 DESARROLLO EMBRIONARIO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO	47
3.3 PROTOCOLOS DE DIFERENCIACIÓN "IN VITRO" A MÚSCULO ESQUELÉTICO	47
4. EDICIÓN GÉNICA: LA TECNOLOGÍA CRISPR	48
4.1 PRINCIPIOS BÁSICOS DEL SISTEMA CRISPR/Cas9	49
4.2 APLICACIONES DE LA EDICIÓN GÉNICA MEDIANTE CRISPR/Cas9 EN BIOMEDICINA	50
4.3 LIMITACIONES DE LA TECNOLOGÍA CRISPR	51
5. CHAPERONAS FARMACOLÓGICAS: NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS	51
OBJETIVOS	55
<hr/>	
MATERIALES Y MÉTODOS	59
<hr/>	
1. GENERACIÓN DE iPSCs	61
1.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCs)	61
1.2 REPROGRAMACIÓN DE PBMCs A iPSCs	62
1.3 CULTIVO DE iPSCs	63
2. ANÁLISIS DE PLURIPOTENCIA Y CALIDAD DE LAS LÍNEAS DE iPSCs	64
2.1 PRUEBAS DE ANÁLISIS DE LA PLURIPOTENCIA	64
2.2 PRUEBAS DE CALIDAD E INTEGRIDAD	67
3. DIFERENCIACIÓN A MÚSCULO ESQUELÉTICO	70
3.1 DIFERENCIACIÓN PRIMARIA	70
3.2 DIFERENCIACIÓN SECUNDARIA O FINAL	71
4. PRUEBAS DE VALIDACIÓN DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN A MÚSCULO ESQUELÉTICO	73
4.1 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MIOGÉNICOS	73
4.2 INMUNOFLUORESCENCIA DE CÉLULAS MIOGÉNICAS	73
5. PRUEBAS DE VALIDACIÓN DEL MODELO DE LA ENFERMEDAD DE MCARDLE	74
5.1 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PYGM	74
5.2 WESTERN BLOT	74
5.3 TINCIÓN PAS	75
5.4 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCÓGENO FOSFORILASA	75
6. EDICIÓN GENÉTICA MEDIANTE CRISPR-Cas9	76
6.1 DISEÑO DE LAS GUÍAS DE ARN (ARNsg)	76
6.2 DISEÑO DEL OLIGONUCLEÓTIDO DE EDICIÓN (ODNcs)	76
6.3 NUCLEOFECIÓN	76

6.4 ENSAYO DE EFICIENCIA DE CORTE CON LA T7 ENDONUCLEASA I	77
6.5 EFICIENCIA DE EDICIÓN	78
6.6 SUBCLONAJE Y AISLAMIENTO DE CLONES	78
6.7 GENOTIPADO Y SELECCIÓN DE CLONES EDITADOS	79
6.8 CONGELACIÓN DE CLONES	79

RESULTADOS 81

1. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS DE iPSCs	83
1.1 PRUEBAS DE PLURIPOTENCIA	83
1.2 PRUEBAS DE CALIDAD E INTEGRIDAD DE LAS LÍNEAS DE iPSCs	88
2. DIFERENCIACIÓN A MÚSCULO ESQUELÉTICO	91
2.1 DIFERENCIACIÓN PRIMARIA	91
2.2 DIFERENCIACIÓN SECUNDARIA O FINAL	94
3. VALIDACIÓN DEL MODELO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO GENERADO DE LA ENFERMEDAD DE McARDLE	98
3.1 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PYGM MEDIANTE ENSAYO DE QPCR	98
3.2 ENSAYO DE WESTERN BLOT	99
3.3 INMUNOFLUORESCENCIA	99
3.4 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE GLUCÓGENO	100
4. GENERACIÓN DE UN CONTROL ISOGÉNICO MEDIANTE CRISPR/Cas9	101
4.1 DISEÑO Y ANÁLISIS DE LAS GUÍAS DE ARN	101
4.2 DISEÑO DEL OLIGONUCLEÓTIDO DE EDICIÓN	102
4.3 NUCLEOFECIÓN Y CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE EDICIÓN	103
4.4 SUBCLONAJE, AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE POSIBLES CLONES EDITADOS	104
4.5 ANÁLISIS DE MODIFICACIONES EN DIANAS NO DESEADAS	104
4.6 COMPROBACIÓN DE LA PLURIPOTENCIA Y CALIDAD DE LA LÍNEA EDITADA MCA2.7HET12.	105
4.7 DIFERENCIACIÓN A MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA LÍNEA EDITADA EN HETEROCIGOSIS	107
4.8 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MIOFOSFORILASA EN LA LÍNEA MCA2.7HET12	108
5. ESTUDIO PILOTO DE CHAPERONAS FARMACOLÓGICAS EN EL MODELO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO GENERADO	109

DISCUSIÓN 111

1. GENERACIÓN DE UN MODELO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA ENFERMEDAD DE McARDLE BASADO EN EL USO DE iPSCs	112
1.1 REPROGRAMACIÓN DE PBMCs A iPSCs	114
1.2 DIFERENCIACIÓN DE LAS iPSCs A MÚSCULO ESQUELÉTICO	115
1.3 VALIDACIÓN DEL MODELO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA ENFERMEDAD DE McARDLE	117
2. EDICIÓN GÉNICA MEDIANTE EL SISTEMA CRISPR/Cas9	118
2.1 CORRECCIÓN DE LA VARIANTE PATOGENICA EN PYGM: C.2392T>C; P.TRP798ARG	118
2.2 VALIDACIÓN DE LA LÍNEA DE iPSCs MCA2.7HET12 PARA SU UTILIZACIÓN COMO CONTROL ISOGÉNICO	119
3. EVALUACIÓN DEL USO DE CHAPERONAS FARMACOLÓGICAS COMO TERAPIA PARA LA ENFERMEDAD DE McARDLE EN VARIANTES DE CAMBIO DE SENTIDO.	120
4. UTILIDAD DE LAS iPSCs DE LA ENFERMEDAD DE McARDLE Y DEL MODELO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO HUMANO GENERADO.	121

CONCLUSIONES 125

BIBLIOGRAFÍA 131

ANEXOS	143
--------	-----

RESUMEN

Enfermedad de McArdle: Generación de un modelo de músculo esquelético humano basado en el uso de iPSCs.

La enfermedad de McArdle es una enfermedad rara de herencia autosómica recesiva, que afecta a 1 de cada 100.000 personas en la población. Se engloba dentro de las patologías conocidas como enfermedades de almacenamiento de glucógeno, o glucogenosis, que son producidas por el déficit de alguna de las enzimas implicadas en el metabolismo de síntesis o degradación del glucógeno. En concreto, la enfermedad de McArdle, o glucogenosis tipo V, se produce por mutaciones en el gen *PYGM* que codifica para la glucógeno fosforilasa de músculo o miofosforilasa. Esta enzima cataliza el primer paso de la ruta de degradación del glucógeno, por lo que los pacientes con la enfermedad de McArdle presentan una incapacidad para degradar el glucógeno en el músculo que se manifiesta en una marcada intolerancia al ejercicio con calambres, mialgias, contracturas o incluso rhabdmiolisis y mioglobinuria en episodios más graves. En la actualidad no existe ningún tratamiento para la enfermedad de McArdle y las recomendaciones van dirigidas a prevenir y mitigar los síntomas de la enfermedad mediante la práctica de ejercicio moderado o la nutrición. Existe una gran variabilidad entre las variantes patogénicas encontradas en el gen *PYGM* que producen la enfermedad y los modelos de enfermedad disponibles hasta la fecha son limitados y no son útiles para llevar a cabo cribados farmacológicos de alto rendimiento. La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal la generación de un modelo de músculo esquelético humano de la enfermedad de McArdle, el principal tipo celular afectado en estos pacientes, utilizando la tecnología de las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). El objetivo final es que este modelo pueda emplearse como plataforma para la búsqueda de un tratamiento personalizado para la enfermedad. Para ello se reprogramaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de una paciente portadora en homocigosis de la segunda variante patogénica más frecuente en cohortes de pacientes españoles: c.2392T>C; p.Trp798Arg en el gen *PYGM*. Las iPSCs generadas se sometieron a una batería de pruebas estandarizadas y se comprobó que reunían todas las características de pluripotencia, calidad e integridad para ser consideradas líneas *bona fide*. A continuación, las iPSCs de la enfermedad de McArdle y una línea de iPSCs control previamente generada en el laboratorio, se diferenciaron a músculo esquelético siguiendo un protocolo basado en el uso de pequeñas moléculas que activan e inhiben determinadas rutas mimetizando los fenómenos que suceden *in vivo* en el desarrollo embrionario. El músculo esquelético generado presentaba marcadores de fibras musculares maduras, contracción espontánea en cultivo y mimetizaba los aspectos bioquímicos distintivos de la enfermedad como la ausencia de miofosforilasa y la presencia anormal de acúmulos de glucógeno. Partiendo de una línea de iPSCs de McArdle y mediante el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 se generó una línea de iPSCs control isogénica *bona fide* en la que se había eliminado, en uno de los alelos, la variante patogénica c.2392T>C; p.Trp798Arg en el gen *PYGM*. Esta línea era capaz de diferenciarse a músculo esquelético y contraerse espontáneamente constituyendo el control isogénico ideal para estudios del efecto de potenciales fármacos, ya que las diferencias encontradas, si las hubiera, serían debidas a la variante en cuestión y no al fondo genético propio de las células. Por último, empleando el modelo de músculo esquelético isogénico generado se realizó un estudio piloto con dos chaperonas farmacológicas (BAY U6751 y CP-91149), compuestos de bajo peso molecular que ayudan al correcto plegamiento de las proteínas. Las chaperonas farmacológicas están siendo utilizadas ampliamente en los últimos años para el tratamiento de enfermedades

producidas por variantes de cambio de sentido, como es el caso de la variante patogénica en la que se centra esta tesis doctoral. Desafortunadamente, no se observó la presencia de miofosforilasa en el músculo esquelético derivado de iPSCs de McArdle tras el tratamiento con ninguna de las dos moléculas. No obstante, este modelo será de gran utilidad para ser utilizado en la búsqueda de una posible terapia para los pacientes de McArdle y contribuirá a mejorar el conocimiento sobre los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad.

McArdle's disease: Generation of a human skeletal muscle model based on the use of iPSCs

McArdle disease is a rare autosomal recessive disease that affects 1 in every 100.000 people in the population. It is part of a group of diseases known as glycogen storage diseases, which are caused by a deficiency of one of the enzymes involved in the metabolism of glycogen synthesis or degradation. Specifically, McArdle disease, also known as glycogen storage disease type V is caused by mutations in the *PYGM* gene that encodes for the muscle isoform of glycogen phosphorylase or myophosphorylase. This enzyme catalyses the first step of the glycogen degradation pathway, so patients with McArdle disease exhibit an inability to break down glycogen in muscle, which manifests as a marked exercise intolerance with cramps, myalgias, contractures or even rhabdomyolysis and myoglobinuria in more severe episodes. There is currently no treatment for McArdle disease and recommendations are intended to prevent and mitigate the symptoms of the disease through moderate exercise or nutrition. There is great variability among the pathogenic variants found in the *PYGM* gene that cause the disease and the disease models available to date are limited and are not useful for high-throughput pharmacological screening. The main objective of this doctoral thesis is to generate a human skeletal muscle model, the main cell type affected in these patients, using induced pluripotent stem cells (iPSCs) technology that can be used as a platform for the search for new treatments. To this end, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were reprogrammed from a patient who is a homozygous carrier of the second most frequent pathogenic variant in the Spanish population: c.2392T>C; p.Trp798Arg in *PYGM* gene. The iPSCs generated were analysed with a battery of standardised tests and were found to meet all the characteristics of pluripotency, quality and integrity features to be considered *bona fide* lines. Next, McArdle's disease iPSCs and a control iPSC line previously generated in our laboratory were differentiated into skeletal muscle, following a protocol based on the use of small molecules that activate or inhibit certain pathways, mimicking phenomena that occur *in vivo* in embryonic development. The skeletal muscle generated showed markers of mature muscle fibres, spontaneous contraction in culture and mimicked the distinctive biochemical aspects of the disease such as the absence of myophosphorylase and the abnormal presence of glycogen accumulation. Using the CRISPR/Cas9 genome editing system, a *bona fide* isogenic control iPSC line was generated from a McArdle iPSC line in which the pathogenic variant c.2392T>C; p.Trp798Arg in the *PYGM* gene had been deleted in one of the alleles. This line was able to differentiate into skeletal muscle and contract spontaneously, constituting the ideal isogenic control for studies of the effect of potential drugs, since the differences found, if any, would be due to the variant in question and not to the genetic background of the cells themselves. Finally, using the isogenic skeletal muscle model generated, a pilot study was carried out with two pharmacological chaperones (BAY U6751 and CP-91149), low molecular weight compounds that help the correct folding of proteins. Pharmacological chaperones are being widely explored in recent years for the treatment of diseases caused by missense variants, as is the case of the pathogenic variant on which this thesis focuses. Unfortunately, no myophosphorylase was observed in skeletal muscle derived from McArdle iPSCs after treatment with either molecule. Nevertheless, this model will be useful to be used in the search for a possible therapy for McArdle patients and will contribute to improve the understanding of the pathophysiological mechanisms of the disease.

ABREVIATURAS

ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AFP	Alfa fetoproteína
AMP	Adenosina monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNcr	ARN CRISPR
ARNm	ARN mensajero
ARNsg	Guía de ARN
ARNtracr	ARN trans-activador
ATP	Adenosin trifosfato
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
BMP	Proteína morfogénica ósea
CK	Creatina quinasa
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbeco
DMSO	Dimetil sulfóxido
Ebs	Cuerpos embrionarios
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ESCs	Células madre embrionarias
EUROMAC	Registro europeo de pacientes de McArdle
FAM	Amidita de fluoresceína
FBS	Suero fetal bovino
F_{cut}	Fracción cortada
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
Fw	Cebador directo
GSD	Enfermedades de almacenamiento de glucógeno
HDR	Reparación mediante homología directa
hESC	Células madre embrionarias humanas
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HLA	Antígeno leucocitario humano
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
iPSCs	Células madre pluripotentes inducidas
ITS	Insulina transferrina selenio
KCl	Cloruro de potasio
KOS	Klf4, Oct3/4 y Sox2
KSR	Suero knock-out de reemplazo
MADA	Mioadenilato deaminasa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad

MIM	Herencia mendeliana en el hombre
MyHC	Cadenas pesadas de miosina
NaCl	Cloruro de sodio
NHEJ	Reparación por unión de extremos no homólogos
nt	Nucleótidos
ODNcs	Oligodesoxinucleótido de cadena sencilla
OMIM	Herencia mendeliana en el hombre en línea
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAS	Ácido peryódico de Schiff
PAM	Motivo adyacente del protoespaciador
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Fósforo inorgánico
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RNPs	Ribonucleoproteínas
Rv	Cebador inverso
SDS	Dodecilsulfato sódico
SMA	Alfa actina de músculo liso
T7E1	T7 Endonucleasa I
TALEN	Nucleasas de actividad similar a activadores de transcripción
TBS	Solución salina tamponada Tris
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TnT	Troponina-T
Tuj-1	Beta tubulina neuronal clase III
TTN	Titina
UDP Glucosa	Glucosa uridina difosfato
VIC	2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína
ZFN	Nucleasas de dedos de zinc

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de McArdle

1.1 Metabolismo del glucógeno

El glucógeno es el principal polisacárido de reserva energética del organismo. Se compone de cadenas de glucosa unidas entre sí mediante enlaces α 1-4 que se ramifican mediante enlaces α 1-6 hasta llegar a formar estructuras de 12 a 18 unidades de glucosa (Figura 1). Además, en su estructura presenta otros componentes como la glucosamina y el fosfato. Se almacena fundamentalmente en músculo e hígado para suplir la demanda en los tejidos cuando sea necesario [1].

En situaciones de emergencia o de ejercicio de alta intensidad, el glucógeno almacenado se hidroliza para la producción de ATP mediante el proceso denominado glucólisis. Este proceso se inicia por la acción coordinada de la glucógeno fosforilasa y la enzima desramificante de glucógeno, que funcionan rompiendo los enlaces α 1-4 y α 1-6 respectivamente para dar lugar a moléculas de glucosa-1-P [2]. A continuación, la enzima fosfoglucomutasa convierte la glucosa-1-P en glucosa-6-P en un proceso reversible de bajo requerimiento energético. La glucosa-6-P puede ser liberada al torrente sanguíneo en forma de glucosa mediante la glucosa-6-fosfatasa. También puede descomponerse para producir piruvato, que en condiciones aeróbicas se convierte en acetil coenzima A, que o bien entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos produciendo agua, dióxido de carbono y ATP o bien se emplea en la producción de ácidos grasos. En condiciones anaeróbicas, el piruvato se convierte en ácido láctico, que constituye la principal fuente energética en episodios de hipoglucemia [3].

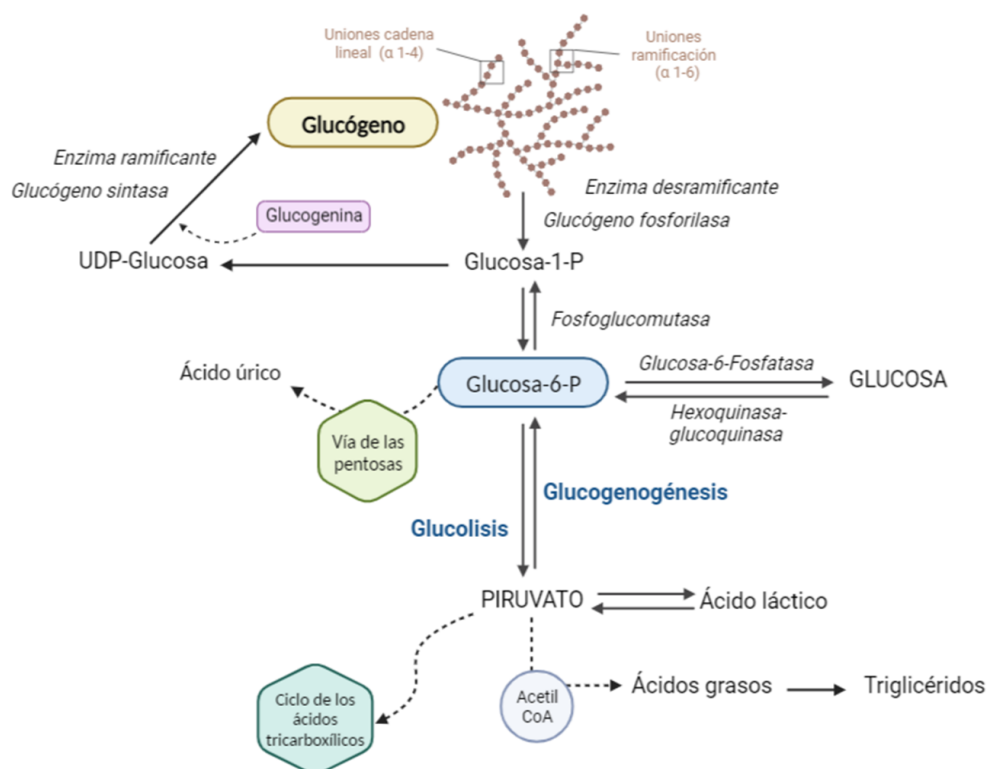



Figura 1. Representación esquemática del metabolismo del glucógeno. Imagen creada con Biorender.



Por el contrario, cuando los niveles de glucosa en sangre se elevan, la insulina activa el proceso de síntesis de glucógeno o glucogenogénesis mediante la incorporación repetida de unidades de UDP-glucosa. La glucogenina, al ser una proteína auto-glicosilante, va formando las uniones α 1-4 hasta que la molécula de glucógeno alcanza los 10-20 residuos. Tras la glicosilación, se completa la formación del glucógeno por la glucógeno sintasa y la enzima ramificante.

1.2 Enfermedades del almacenamiento del glucógeno

Se engloba bajo el término glucogenosis al conjunto de trastornos relacionados con el déficit de alguna de las enzimas implicadas en la síntesis y degradación del glucógeno, que en última instancia da lugar a la imposibilidad de utilizar el glucógeno almacenado como fuente de energía. Estas enfermedades, también conocidas como enfermedades del almacenamiento de glucógeno (GSD por sus siglas en inglés para *glycogen storage disease*), son de herencia autosómica recesiva o ligada al cromosoma X y la incidencia se estima de 1 entre 20.000-43.000 nacimientos.

Actualmente se han descrito más de 15 tipos de glucogenosis, la mayoría de ellas con afectación en hígado y músculo esquelético, que se clasificaron numéricamente según se fueron descubriendo en función de la enzima que esté ausente y el tejido afectado [4]. Entre las que afectan al músculo esquelético destacan la glucogenosis tipo II, más conocida como la enfermedad de Pompe, la glucogenosis tipo VII o enfermedad de Tarui y la glucogenosis tipo V o enfermedad de McArdle.

1.3 Glucogenosis tipo V o Enfermedad de McArdle

La enfermedad de McArdle (OMIM #232600), o glucogenosis tipo V, es causada por mutaciones en el gen *PYGM*, que codifica para la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa o miofosforilasa, enzima que inicia la descomposición del glucógeno al romper los enlaces α 1-4 de sus ramificaciones externas. La enfermedad de McArdle fue descrita por primera vez en 1951 por Brian McArdle tras observar a un paciente con incapacidad de producir lactato durante un ejercicio isquémico [5]. Posteriormente, en 1959, Schmidt y Mahler confirmaron la ausencia de la glucógeno fosforilasa en pacientes con síntomas similares [6].

Las personas afectadas con la enfermedad de McArdle presentan intolerancia al ejercicio, que se manifiesta con mialgias, contracturas y calambres (Figura 2). Esta sintomatología es debida a que el glucógeno es la principal fuente de energía en el músculo esquelético durante el ejercicio físico, por lo que la no disponibilidad de reservas de carbohidratos resulta en una incapacidad para realizar ejercicio, que queda aliviada finalmente al descansar. En pacientes que persisten con la actividad a pesar del dolor, puede aparecer daño muscular severo o rabdomiólisis, que se manifiesta con niveles elevados de creatina quinasa (CK por sus siglas en inglés para *creatine kinase*) en suero (>1000 U/l) y mioglobinuria, normalmente referido por los pacientes como “orina oscura” [7]. Por último, estos episodios de rabdomiólisis pueden desembocar en fallo renal agudo e hiperpotasemia.

Una particularidad de los pacientes de McArdle es que, tras un ejercicio dinámico moderado de entre 6 a 10 minutos o un breve descanso tras los primeros síntomas de

agotamiento, la capacidad para realizar ejercicio mejora notablemente [8]. Este hecho se conoce como “fenómeno del segundo aliento” o “segunda entrada” y probablemente se debe a la transición de la glucogenólisis anaeróbica (producción de ácido láctico a partir de glucógeno) a la fosforilación oxidativa, en la que tras el periodo de calentamiento con la subsecuente vasodilatación del músculo esquelético, los ácidos grasos y la glucosa extramusculares circulantes quedan disponibles para ser oxidados por las fibras musculares [7,9].

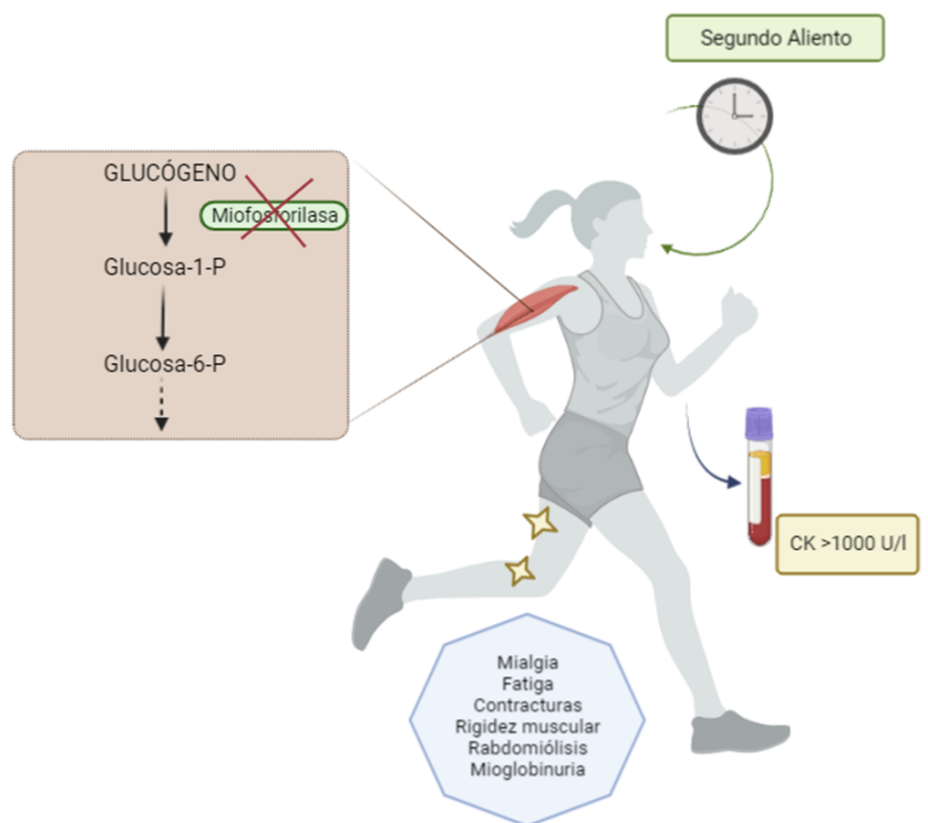


Figura 2. Características clínicas y bioquímicas de la enfermedad de McArdle.
Imagen creada con Biorender.

1.4 Estructura y regulación de la miofosforilasa

La glucógeno fosforilasa es una enzima muy conservada entre las distintas especies a lo largo de la escala evolutiva que en humanos presenta tres isoformas: glucógeno fosforilasa de músculo (PYGM, UniProt #P11217), de hígado (PYGL, #P06737) y de cerebro (PYGB, #P11216). Los tres genes que codifican para estas enzimas *PYGM*, *PYGL* y *PYGB* respectivamente, son parálogos y presentan una homología de más del 80% de su secuencia [10]. Aunque estas isoformas son específicas de tejido, se ha encontrado expresión de *PYGM*, además de en músculo esquelético, en otros tejidos aunque en menor medida, como en cerebro, amígdalas, granulocitos, glándulas salivares, aparato reproductor masculino o en tejido adiposo [11]. Además, se ha encontrado expresión de *PYGM* en cardiomiocitos y en células del epitelio pigmentario de la retina, por lo que

la función e implicación de *PYGM* en otros tejidos podría explicar algunas comorbilidades encontradas en algunos pacientes como retinopatías o afectaciones a nivel de tiroides [12,13].

Estructuralmente, la glucógeno fosforilasa es un homodímero con dos subunidades idénticas de 97 kDa que se asocian en tetrámeros en su forma activa. Además, contiene asociado su cofactor, el piridoxal fosfato (vitamina B6). Ambas subunidades de la glucógeno fosforilasa presentan un dominio N-terminal regulador desde los aminoácidos 1 hasta el 482 y un dominio C-terminal catalítico, que contiene el sitio activo de la enzima, desde el aminoácido 483 hasta el 842 [14]. La regulación de la interconversión entre la forma activa (a) e inactiva (b) de la glucógeno fosforilasa se lleva a cabo mediante dos mecanismos: Por un lado, la glucógeno fosforilasa se regula alostéricamente mediante ligandos, entre los que destacan los activadores adenosina monofosfato (AMP), fósforo inorgánico (Pi), glucosa-1-P y glucógeno y los inhibidores adenosina trifosfato (ATP), glucosa-6-P, glucosa y nucleósidos de purina [15]. Además, recientemente se ha descrito la implicación de pequeñas GTPasas de la superfamilia Ras como activadores alostéricos en células T [16]. Por otro lado, mediante mecanismos de fosforilación y desfosforilación en el residuo Ser15 se produce un tipo de regulación reversible. Este tipo de regulación se da en respuesta a hormonas como el glucagón, la insulina o la adrenalina y se produce por la acción de la fosforilasa quinasa y la proteína fosfatasa-1. Los cambios en la fosforilación conllevan un cambio conformacional de la proteína hacia un estado relajado (R), de alta afinidad por el sustrato (forma activa de la enzima). Por el contrario, la desfosforilación de la enzima hace que ésta cambie a un estado tenso (T) o inactivo con baja afinidad por el sustrato [17].

1.5 Diversidad genotípica y fenotípica de los pacientes con enfermedad de McArdle

El gen *PYGM* (MIM #608455) se encuentra en el brazo largo del cromosoma 11 (11q13.1). Presenta 20 exones, de los cuales el exón 1 es el que contiene mayor densidad de mutaciones. No obstante, en todos ellos se han encontrado variantes patogénicas causantes de la enfermedad de McArdle. Aproximadamente el 50% de las variantes encontradas son variantes sin sentido, seguido por deleciones en las que se pierden un par de nucleótidos, que aparecen en un 18% de los casos. Con menor frecuencia aparecen variantes patogénicas de cambio de sentido (13%) y variantes que afectan al sitio de corte y empalme de ARN o *splicing* (11%) [18].

Hasta la fecha se han descrito al menos 206 variantes patogénicas a lo largo del gen *PYGM* (según datos consultados en la base de datos pública de la Universidad de Leiden: <http://database.lovd.nl/shared/variants/PYGM>). La variante patogénica p.Arg50Ter es la más frecuente en la población caucásica tanto en homocigotos como en heterocigotos compuestos, sin embargo, esta variante no se ha encontrado en la población asiática, a excepción de un paciente coreano [19]. Algunas mutaciones son específicas de regiones geográficas bien localizadas o incluso de familias concretas, como es el caso de la variante p.Trp798Arg, que aparece con mayor frecuencia en la población española, siendo la segunda más frecuente en cohortes de pacientes españoles con un 10-17% de incidencia.

Actualmente, no existe una relación clara entre fenotipo y genotipo. Entre los pacientes con distintas variantes patogénicas responsables de la enfermedad de McArdle, existe un abanico muy amplio de síntomas y grados de afectación. Algunos pacientes se mantienen prácticamente asintomáticos durante la mayor parte de su vida mientras que otros presentan una marcada

intolerancia al ejercicio desde los primeros años de vida que les impide realizar tareas cotidianas como peinarse o subir escaleras [20].

En un estudio demográfico realizado en 2020 en una cohorte de pacientes de Brasil, no se encontró una asociación clara entre los niveles de ARNm de *PYGM*, la variante patogénica encontrada y el grado de afectación de los pacientes [21]. Por otro lado, algunos estudios han centrado su atención en los posibles moduladores del fenotipo de la enfermedad de McArdle, como los polimorfismos en la enzima mioadenilato deaminasa (MADA) o la enzima convertidora de angiotensina (ACE) [22]. Ambos trabajos coinciden en que la variabilidad en cuanto a la severidad de los síntomas podría deberse a la variabilidad individual en la eficiencia para utilizar otras rutas metabólicas en el metabolismo muscular. Por último, el estilo de vida de los pacientes en cuanto a ejercicio y dieta parece influir también en la severidad del fenotipo [23].

1.6 Evolución del diagnóstico

La enfermedad de McArdle se incluye en la lista de enfermedades raras o poco frecuentes debido a su baja incidencia en la población, aproximadamente 1 entre 100.000 según datos del registro europeo de pacientes de McArdle (EUROMAC). Se estima que el número real de personas afectadas con esta enfermedad es mucho mayor debido a que muchas veces se tarda en llegar a un diagnóstico. Los primeros síntomas aparecen a los 3 años de vida, pero el diagnóstico durante la infancia resulta difícil ya que los niños con síntomas de intolerancia al ejercicio suelen ser catalogados como perezosos por no querer hacer deporte. Por esta razón, un alto porcentaje de los pacientes con esta enfermedad reciben el diagnóstico en la tercera década de su vida, lo cual hace más difícil el manejo de la enfermedad [24].

Tradicionalmente, el diagnóstico de la enfermedad de McArdle se realizaba mediante detección de los niveles de ácido láctico en suero tras un test de isquemia en el antebrazo. Posteriormente el diagnóstico se confirmaba mediante la detección de acúmulos de glucógeno y la ausencia de actividad de la glucógeno fosforilasa en biopsias de músculo esquelético. Más tarde, con el desarrollo de las técnicas genéticas, el diagnóstico pasó a realizarse mediante el análisis de las variantes patogénicas más comunes en la población mediante secuenciación Sanger [25].

A día de hoy se han definido signos precisos que deben hacer sospechar al clínico de tener un caso de enfermedad de McArdle como son: intolerancia al ejercicio que empieza normalmente en una edad temprana, aparición del fenómeno del segundo aliento y niveles elevados de CK en suero [26]. La confirmación de los casos sospechosos, en la actualidad, se suele realizar mediante técnicas de secuenciación de exomas completos para el diagnóstico diferencial con otras miopatías metabólicas. Estas tecnologías de secuenciación de nueva generación han favorecido la mejora en el tiempo de diagnóstico y el descubrimiento de nuevas variantes patogénicas causantes de la enfermedad [27,28]. Por último, de Luna y colaboradores propusieron recientemente el análisis de expresión de *PYGM* en células T de sangre periférica como diagnóstico complementario y menos invasivo de la enfermedad de McArdle, evitando así realizar la confirmación del diagnóstico mediante biopsia muscular [29].

1.7 Modelos preclínicos de la enfermedad de McArdle

En la actualidad existen varios modelos preclínicos de la enfermedad de McArdle incluyendo modelos animales espontáneos y modelos generados en el laboratorio. Todos ellos han contribuido en mayor o menor medida al estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y a la búsqueda de posibles tratamientos (Figura 3).

El primer modelo espontáneo de la enfermedad de McArdle apareció en 1995 en una granja de terneras charolesas de Davis (California). Un becerro de escasos días de edad presentaba dificultad para ponerse de pie y aguantar su peso además de rigidez muscular tras el ejercicio. Los niveles de CK en suero eran anormalmente elevados y se encontró necrosis muscular por diversas partes del cuerpo. Posteriormente se detectaron problemas musculares en otras reses de la misma familia. En todos los animales afectados se detectó, mediante biopsia muscular, ausencia de la enzima miofosforilasa y un contenido anormalmente elevado de glucógeno. Los resultados de secuenciación de ADN revelaron que la mutación c.1468C>T (p.Arg490Trp) era la causante de la enfermedad [30]. En 1997, en Western (Australia), se describió otro modelo espontáneo de la enfermedad de McArdle, en este caso en un rebaño de ovejas de raza merina. Los animales presentaban intolerancia al ejercicio y las biopsias de músculo mostraron depósitos de glucógeno y ausencia de miofosforilasa. En este caso la mutación c.2380-1G>A en *PYGM* se postuló como causante de la enfermedad [31].

En 2012, un grupo de investigadores españoles generaron por primera vez un modelo de ratón *knock-in* para la variante patogénica más frecuente en la población caucásica c.148A>T (p.Arg50Ter). Los ratones generados presentaban la mayoría de las manifestaciones fenotípicas de la enfermedad de McArdle incluyendo niveles elevados de CK en suero, depósitos de glucógeno en el músculo esquelético e incluso episodios de mioglobinuria tras ejercicio intenso [32].

Otro organismo modelo que se utiliza con frecuencia como modelo para el estudio de miopatías humanas por la similitud que presenta su músculo esquelético con el músculo humano y por el alto grado de conservación filogenética (84%) es el pez cebra. En 2020, investigadores de Wraclaw (Polonia) generaron un modelo de pez cebra *knock-out* para los genes *pygma* y *pygmb*, ortólogos a la isoforma muscular humana de *PYGM*, mediante oligonucleótidos morfolinicos. Los peces generados presentaban acúmulos de glucógeno y estructuras musculares desorganizadas. Además en este modelo se ha podido estudiar como varían los niveles de ARNm y proteína *pygm* en las distintas etapas del desarrollo [33].

Por otra parte, la utilización de cultivos de células de músculo esquelético derivados de biopsias de pacientes podría ser un modelo celular ideal para esta enfermedad, pero presenta el problema de que a pesar de que en biopsias musculares de pacientes no se detecta actividad miofosforilasa, sí se detecta en cultivos de células de músculo esquelético derivadas de esas mismas biopsias [34]. Además, se ha observado que las células de músculo cultivadas "in vitro" no consiguen la suficiente madurez y expresan las isoformas *PYGB* y *PYGL*, presentes en músculo fetal [34]. Recientemente nuestro grupo ha generado un modelo de músculo esquelético humano portador en homocigosis de la variante más frecuente en la población caucásica en el gen *PYGM*: p.Arg50Ter, basado en la utilización de la tecnología de las células madre pluripotentes inducidas. Este modelo recapitula los principales rasgos bioquímicos de la enfermedad de McArdle [35].

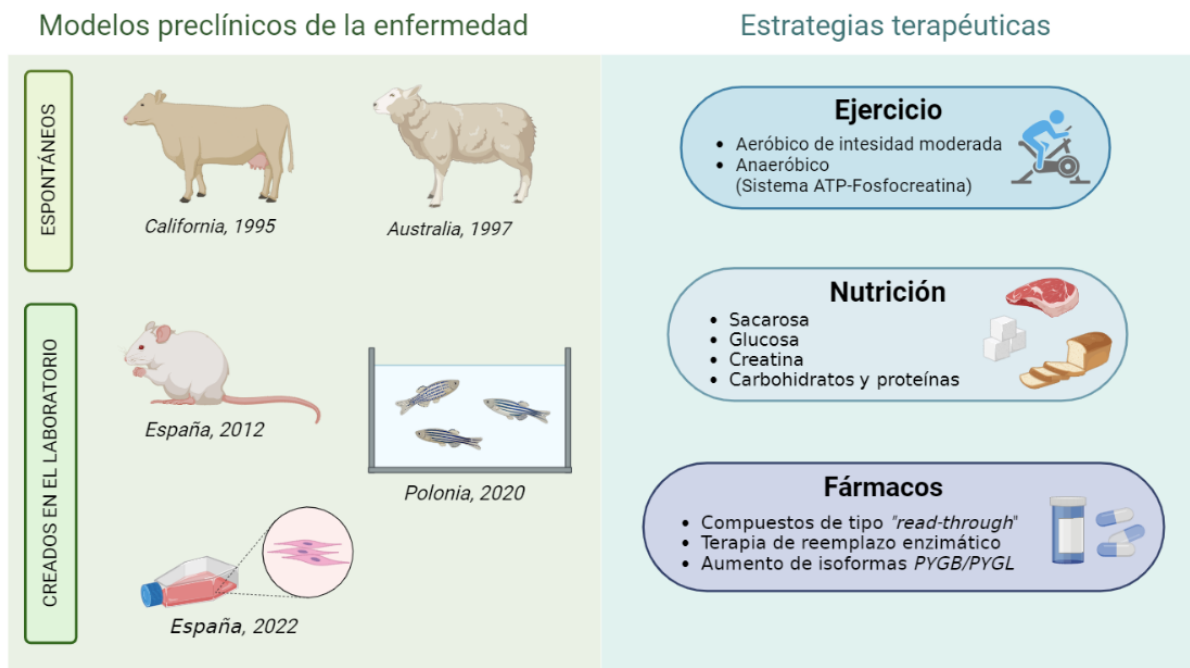
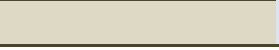


Figura 3. Modelos preclínicos de la enfermedad de McArdle y estrategias terapéuticas. Imagen creada con Biorender.

1.8 Estrategias terapéuticas

En la actualidad no existe ningún tratamiento para la enfermedad de McArdle. Los pacientes con esta enfermedad, bien por prescripción médica o bien por intentar evitar el empeoramiento de su patología, adquieren un estilo de vida sedentario, en el que su condición física empeora y se produce una disminución en la capacidad circulatoria de ácidos grasos y glucosa, así como una disminución de mitocondrias en el músculo esquelético [36]. Además, en pacientes con una vida sedentaria se ha observado también una salud ósea deficiente [37]. Aunque pueda parecer una contradicción, la realización de ejercicio controlado en estos casos es beneficiosa. Entre los años 2005 y 2007, se llevaron a cabo varios estudios basados en el entrenamiento aeróbico de intensidad moderada en los que se observó un aumento en la capacidad oxidativa debido al incremento de enzimas mitocondriales, una mejora en el fenómeno del segundo aliento y una disminución de la CK en suero [38]. Por esta razón, el ejercicio aeróbico controlado se ha empleado como terapia al mejorar la adaptación y tolerancia al ejercicio (Figura 3) [39]. Por otro lado, basándose en el funcionamiento del sistema ATP-fosfocreatina, el cual es independiente de la glucólisis y por tanto no está afectado en los pacientes con enfermedad de McArdle, García-Benitez y Santalla investigaron el posible beneficio del entrenamiento de fuerza. Sorprendentemente, la rutina de levantamiento de pesas en pacientes con enfermedad de McArdle mejoró la fuerza y masa muscular, que en última instancia mejoró también la calidad de vida de los pacientes [40].

Durante los primeros minutos de ejercicio el músculo de los pacientes con enfermedad de McArdle depende mucho de fuentes energéticas alternativas como aminoácidos y ácidos grasos, por lo que, paralelamente a los programas de entrenamiento se han implementado intervenciones nutricionales (Figura 3) [41]. Algunas de ellas son la ingestión de sacarosa previa al ejercicio [42] o



las dietas altas en carbohidratos o proteínas [43], que ayudan a mantener elevados tanto los depósitos hepáticos de glucógeno como la glucosa extra muscular. Todas estas intervenciones ayudan, en cierta medida, a mejorar la vida diaria de los pacientes, pero no llegan a ser suficientes para eliminar todos los síntomas.

En cuanto a tratamientos farmacológicos, se han realizado tres aproximaciones aprovechando los modelos preclínicos de enfermedad disponibles hasta la fecha. En primer lugar, se ha explorado el uso de compuestos de tipo “*read-through*” como aminoglucósidos y otras moléculas, que inducen al ribosoma a saltar el codón prematuro de parada durante la traducción y producir la proteína completa. Esta aproximación podría ser de utilidad en aquellas variantes patogénicas que generan un codón prematuro de parada y, de hecho, algunos de estos compuestos se han probado en el modelo de ratón p.Arg50Ter [44] y más recientemente en el modelo celular de la misma variante [35].

En el año 2008, se probó la terapia génica en el modelo ovino mediante la inyección intramuscular de ARN mensajero de *pygm* utilizando como vectores adenovirus y adenoasociados [45]. Los resultados fueron prometedores a pesar de que la expresión de *PYGM* disminuyó con el tiempo. Años más tarde, en 2019, se probó este tipo de terapia en el modelo de ratón pero la cantidad de *pygm* alcanzada resultó insuficiente para los requerimientos necesarios en ejercicio muscular de máximo esfuerzo del ratón (Figura 3) [46].

Como última estrategia se ha intentado aumentar la expresión de las isoformas *PYGB* y *PYGL*, que podría compensar en parte el defecto de *PYGM* (Figura 3). En este sentido, se han probado compuestos como la notexina y el ácido valproico, que por sus propiedades moduladoras del epigenoma podrían activar la expresión de genes metilados [47]. En concreto el ácido valproico se probó tanto en el modelo ovino como en el de ratón, obteniéndose resultados prometedores al comprobarse que aumentaba la expresión de *PYGB* [48]. Recientemente el ácido valproico ha sido probado en un ensayo clínico en pacientes con enfermedad de McArdle, pero los resultados obtenidos indicaron la ausencia de efectos terapéuticos en estos pacientes [49].

2. Células madre pluripotentes inducidas

2.1 Biología de las células madre

Las células madre son un tipo de células indiferenciadas que presentan la capacidad de autorrenovarse y dar lugar a células diferenciadas [50]. Según su potencial para diferenciarse pueden clasificarse en:

- *Células totipotentes*: Tienen la capacidad de dar lugar a un organismo completo, incluyendo los tejidos extraembrionarios (placenta) y la línea germinal. En concreto son un grupo de células que se forman en el desarrollo embrionario antes de la formación del blastocisto.
- *Células pluripotentes*: Son las células madre embrionarias ESCs (por sus siglas en inglés para *embryonic stem cells*), que derivan de la masa interna de embriones en estado de blastocisto. Pueden dar lugar a cualquier tipo celular, pero no a las células de la placenta.

- *Células multipotentes*: Son las células madre adultas presentes en algunos tejidos ya diferenciados y únicamente pueden dar lugar a células de su capa embrionaria (endodermo, ectodermo o mesodermo). Un ejemplo de ellas son las de la médula ósea o las del cordón umbilical.
- *Células unipotentes*: Son aquellas células que solo pueden dar lugar a células terminales.


La primera vez que se aislaron y cultivaron células madre embrionarias fue en 1981 a partir de la masa interna de blastocistos de ratón en desarrollo [51,52]. Desde ese momento se ha conseguido aislar ESCs de otras especies animales con gran potencial en la investigación [53]. En 1998 se emplearon por primera vez embriones humanos, producidos por técnicas de fertilización “*in vitro*”, para el aislamiento de ESCs humanas [54]. Sin embargo, este hito de la medicina ha suscitado mucho debate debido a los aspectos éticos asociados a su utilización, al implicar la destrucción de un embrión humano para su uso en investigación.

2.2 Descubrimiento de las células madre pluripotentes inducidas

Dos investigadores japoneses, Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka, enfocaron sus investigaciones en cómo determinados genes que se expresan en ESCs podrían transformar una célula somática en una célula parecida a una ESCs. Tal es así que en el año 2006 consiguieron por primera vez reprogramar fibroblastos de ratón a células pluripotentes, utilizando únicamente cuatro factores de transcripción: *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-myc* [55]. Estas células creadas en el laboratorio presentaban las mismas características que las células madre embrionarias: por un lado son células autorrenovables que presentan la capacidad de crecer indefinidamente y por otro lado son pluripotentes, por lo que son capaces de diferenciarse a cualquier tipo celular. Por ello, se denominaron células madre pluripotentes inducidas (iPSCs por sus siglas en inglés para *induced pluripotent stem cells*). Un año más tarde, Yamanaka consiguió dar un paso más y reprogramar fibroblastos humanos a iPSCs combinando los cuatro factores de reprogramación, denominados desde entonces como “factores de Yamanaka” [56]. El descubrimiento de las iPSCs marcó un antes y un después en el campo de la investigación biomédica ya que este tipo de células solventan todos los inconvenientes éticos y legales asociados a la utilización de ESCs. De hecho, en el año 2012, el doctor *Shinya Yamanaka* fue galardonado con el premio Nobel de Medicina y Fisiología compartido con el británico John Gurdon.

2.3 Aplicaciones de las iPSCs

Desde su descubrimiento, los métodos de generación de iPSCs se han ido optimizando, como por ejemplo el tipo de célula somática de partida (fibroblastos, células mononucleares de sangre periférica, células del epitelio urinario,...) o el tipo de vector utilizado para introducir los factores de reprogramación (retrovirus, virus sendai, adenovirus,...). Además, durante este tiempo también han evolucionado los protocolos de diferenciación de las iPSCs, consiguiéndose la diferenciación a células de tejidos concretos como neuronas, macrófagos, hepatocitos o incluso la creación de mini-órganos a partir de iPSCs [57,58].



La disponibilidad de una fuente ilimitada de células madre creadas en el laboratorio abrió un mundo de posibilidades en la investigación biomédica por su potencial para ser utilizadas en medicina regenerativa, en la búsqueda de nuevos fármacos o para generar modelos de enfermedades [59]. El hecho de poder estudiar el proceso y los factores implicados en la diferenciación de una célula embrionaria a un estado adulto también ha servido para esclarecer algunos procesos de investigación básica como el desarrollo embrionario.

Probablemente la aplicación más prometedora de las iPSCs es su uso potencial en terapia celular para el tratamiento de diversas enfermedades [60]. La primera aproximación en este sentido fue llevada a cabo en el instituto de investigación *RIKEN* de Japón, en 2017, en un paciente con degeneración macular asociada a la edad que recibió un trasplante autólogo de células del epitelio pigmentario de la retina generadas a partir de iPSCs [61]. Desde entonces, se han realizado algunos ensayos clínicos para otras patologías como la enfermedad de Parkinson o la anemia aplásica [62]. Debido al tiempo y coste tan elevados que conlleva el proceso de reprogramación, caracterización y establecimiento de una línea de iPSCs, el trasplante alogénico podría ser una solución más factible. Uno de los inconvenientes de este tipo de trasplante es el posible rechazo que pueda aparecer, por lo que la creación de un banco de iPSCs bien caracterizadas y tipadas por los distintos HLA (por sus siglas en inglés para *human leukocyte antigens*) podría ser de gran utilidad [63]. Así mismo, la existencia de estos bancos de iPSCs resulta muy valioso para investigadores que no pueden asumir el alto coste que supone la generación de una línea de iPSCs por cada paciente [64].

Otra de las aplicaciones que suscitan especial interés de las iPSCs es su uso como plataforma para el descubrimiento y testado de nuevos tratamientos farmacológicos. Tradicionalmente, las primeras fases de rastreo y prueba de fármacos se realizan en modelos animales antes de dar el salto a su prueba en humanos. Un gran porcentaje de ensayos clínicos con fármacos que parecían prometedores en ensayos preclínicos en modelos animales fallan en la siguiente fase debido fundamentalmente a las diferencias entre especies. Por esta razón, el uso de iPSCs derivadas de humanos puede ser de valiosa utilidad en la búsqueda de nuevos fármacos y en la evaluación de la toxicidad de los mismos [65]. Además, las iPSCs permiten realizar ensayos de alto rendimiento, que no serían posibles de realizar en animales por la cantidad de individuos necesarios para tal fin [66].

Hoy en día, más de 15 años después del descubrimiento de las células iPS, se ha conseguido la diferenciación con éxito a multitud de tipos celulares como retina, hígado o cerebro, entre otros. Esto ha permitido la generación de múltiples modelos de enfermedad, útiles para entender los mecanismos fisiopatogénicos de las mismas o, como hemos comentado anteriormente, la búsqueda de posibles tratamientos [67,68].

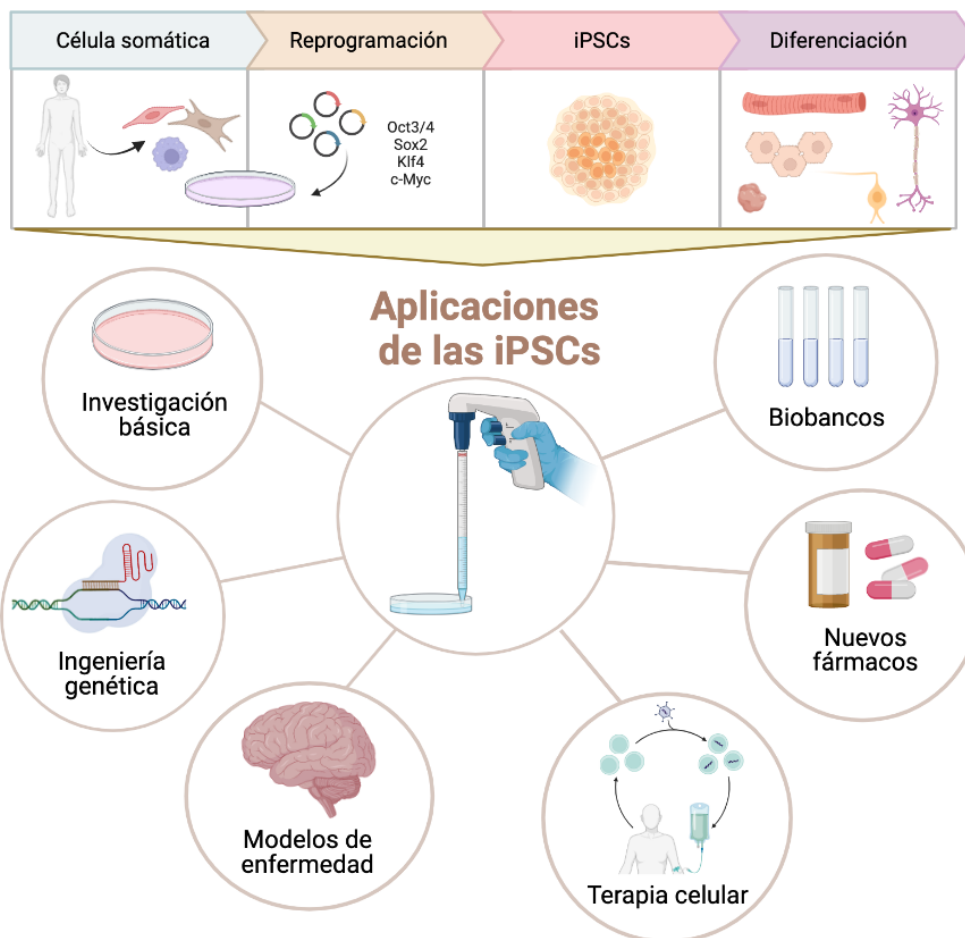


Figura 4. Aplicaciones de las iPSCs. A partir de células somáticas es posible obtener iPSCs mediante reprogramación y diferenciarlas potencialmente a cualquier tipo celular, que podrá ser utilizado posteriormente como modelo de enfermedad para su uso en investigación básica, terapia celular o para generar modelos de enfermedad con los que descubrir nuevos fármacos entre otras aplicaciones. Imagen creada con Biorender.

3. Generación de músculo esquelético “in vitro”

El principal tejido afectado en la enfermedad de McArdle es el músculo esquelético, que constituye aproximadamente el 40% del peso humano [69]. Entre las funciones en las que participa se encuentran la generación de fuerza para la locomoción, el control de la postura, la protección de los tejidos blandos, la respiración o la masticación. Además, presenta otras funciones metabólicas como el almacenamiento de sustratos para otros tejidos, el mantenimiento de la temperatura corporal o la obtención de energía.

3.1 Estructura y organización del músculo esquelético

El músculo esquelético es un tejido muy organizado que lleva asociado una red compleja de capilares, para permitir el flujo de nutrientes y metabolitos, y motoneuronas para recibir el impulso eléctrico necesario en la contracción muscular. La unidad celular básica es la fibra

muscular, o miofibr, formada por células alargadas y multinucleadas que se rodean de un tejido conectivo denominado endomisio. El tamaño del músculo está determinado por la cantidad de miofibras individuales que presente. A su vez, las miofibras se agrupan entre sí y se rodean de un tejido conectivo más robusto que se denomina perimisio. Estas agrupaciones de miofibras reciben el nombre de fascículos y se agrupan para formar el músculo completo, que a su vez se rodea de un tipo de tejido conectivo mucho más fuerte conocido como epimisio [70].

Las células madre del músculo esquelético se denominan células satélite y se encuentran entre la lámina basal que rodea las miofibras, actuando como progenitores para la reparación y crecimiento del músculo [71]. Ante un daño celular, las células satélite se activan y comienzan a diferenciarse a mioblastos, que finalmente se fusionan entre sí dando lugar a la miofibrá multinucleada y reparando pequeños daños del músculo esquelético.

Cada miofibrá está formada por cientos de miofibrillas, que se componen de subunidades repetidas y ordenadas de sarcómeros. Esta disposición ordenada es lo que le da el aspecto estriado característico al músculo. Los sarcómeros constituyen la unidad básica de contracción y están formados por las dos proteínas más abundantes de la miofibrá, la actina (filamentos delgados) y la miosina (filamentos gruesos). Otras proteínas que forman parte del sarcómero son las proteínas reguladoras troponina y tropomiosina, asociadas al filamento de actina o la proteína titina que se une a la línea Z y a la miosina estabilizando el filamento grueso de miosina [72].

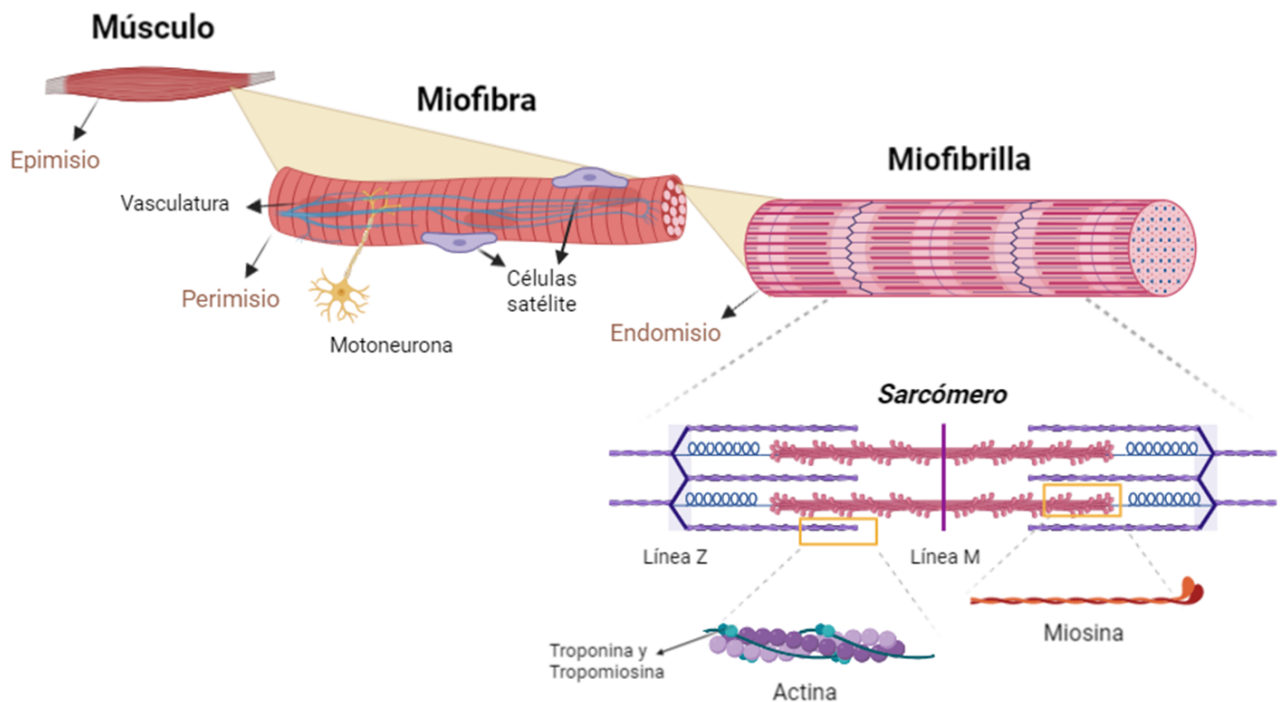


Figura 5. Estructura del músculo esquelético. El músculo se compone de miofibras, formadas a su vez por agrupaciones de miofibrillas que contienen la unidad básica de contracción, el sarcómero.

Imagen creada con Biorender.

3.2 Desarrollo embrionario del músculo esquelético

El músculo esquelético deriva del mesodermo paraxial, una de las tres zonas en las que se divide el mesodermo embrionario durante las etapas tempranas del desarrollo. Durante la embriogénesis, las oscilaciones locales de los niveles de expresión génica inducen la condensación del mesodermo paraxial en somitas desde la cabeza hasta la cola del embrión, que darán lugar al esqueleto y a la musculatura del tronco [73]. La especificación del mesodermo paraxial está controlada por la activación de las vías de señalización de Wnt y el factor de crecimiento de fibroblastos FGF (por sus siglas en inglés para *fibroblast growth factor*). La oscilación molecular que regula la formación de los somitas es un proceso altamente conservado que se conoce como reloj de segmentación [74].

La activación de Wnt y la inhibición de BMP produce la especificación de la región dorsal de los somitas hacia dermomiótomo, formado por progenitores miogénicos tempranos que expresan los factores de regulación *PAX3*, *PAX7* y *Myf5* [75]. Una parte del dermomiótomo madura y da lugar a una estructura muscular temprana denominada miótomo, cuyas células expresan *MyoD*, en lo que se conoce como miogénesis temprana o embrionaria. La segunda parte de la miogénesis se denomina miogénesis tardía o fetal y consiste en la fusión de los progenitores que expresan *Pax7* en fibras multinucleadas. A medida que avanza la miogénesis, la parte central del dermomiótomo se desintegra y algunos progenitores miogénicos se intercalan en el miótomo, formando la población de células satélite en el músculo adulto, regulado por la vía de señalización de Notch [76].

Al mismo tiempo, el proceso de fusión de los mioblastos para formar las fibras multinucleadas adultas durante la miogénesis tardía consta de dos fases [77]. La primera consiste en la formación de miofibras multinucleadas mediante la fusión de mioblastos, que ocurre de igual forma tanto durante la embriogénesis como en la regeneración del músculo adulto. La segunda fase consiste en la adición de nuevos mioblastos a miofibras ya formadas. No obstante, la regulación de estos procesos en vertebrados no se conoce con exactitud [75].

3.3 Protocolos de diferenciación “in vitro” a músculo esquelético

La primera vez que se consiguió generar músculo esquelético in vitro fue en el año 1988 mediante la introducción de ADN complementario del factor de regulación *MyoD1* en fibroblastos de ratón [78]. Desde ese momento se han desarrollado multitud de protocolos de diferenciación, que se pueden clasificar en dos grupos, los protocolos basados en la sobreexpresión de factores de transcripción y los protocolos basados en imitar el desarrollo embrionario [79].

- *Sobreexpresión de factores miogénicos*: El primer grupo de protocolos consiste en introducir ADN exógeno para forzar la sobreexpresión de alguno de los factores de transcripción claves en la miogénesis, como por ejemplo *MyoD1* o *Pax7* [80,81]. Este tipo de protocolos presentan una alta eficiencia y suelen ser rápidos. No obstante, entre los inconvenientes que presentan se encuentra la posible integración de los vectores utilizados en el genoma o la necesidad de purificar la población de progenitores obtenida, lo cual dificulta la traslación a la clínica.

- **Inducción miogénica mediante pequeñas moléculas:** El segundo grupo de protocolos se basa en imitar el proceso de desarrollo embrionario que sucede de manera natural en la formación del músculo esquelético mediante la adición escalonada a lo largo del tiempo de pequeñas moléculas al medio de cultivo, que activan o inhiben las distintas vías de señalización [82]. El desarrollo de esta metodología ha permitido estudiar en detalle el proceso de diferenciación miogénica. No obstante, aunque son más seguros en cuanto a su traslación a la clínica, la eficiencia de este tipo de protocolos es menor y su duración mayor.

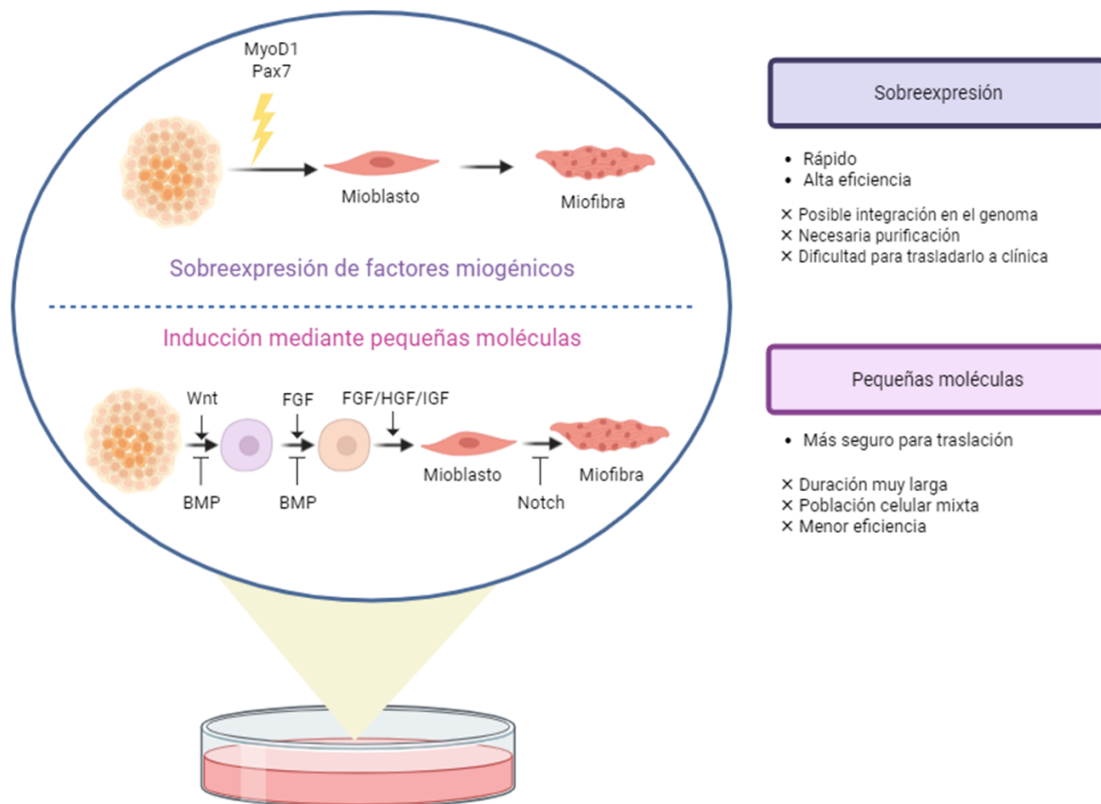


Figura 6. Protocolos para la diferenciación “*in vitro*” de músculo esquelético. Existen dos grandes grupos de protocolos: los basados en la sobreexpresión de factores miogénicos y los basados en la inducción mediante la adición de pequeñas moléculas al medio de cultivo.

Imagen creada con Biorender.

4. Edición génica: La tecnología CRISPR

Desde que se descubrió la doble hélice de ADN, científicos de casi todos los campos han intentado desarrollar técnicas de edición génica precisa con las que manipular el ADN. En los años 70 aparecieron las primeras aproximaciones de edición génica dirigida en ratones, pero no fue hasta la década de los 2000 cuando se desarrollaron los primeros sistemas de edición que reconocían secuencias específicas del ADN mediante nucleasas de dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés para *zinc finger nucleases*) y nucleasas de actividad similar a activadores de

transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés para *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) [83].

En el año 1987, investigadores japoneses describieron por primera vez una serie de repeticiones cortas agrupadas y regularmente interespaciadas en el genoma de *Escherichia coli*, denominadas CRISPR (por sus siglas en inglés para *Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat*). En 2005, Francis Mojica definió este sistema CRISPR como un sistema de inmunidad adaptativa mediante el cual, bacterias y arqueas son capaces de reconocer el genoma de virus y plásmidos [84]. A partir de entonces, el conocimiento sobre el sistema CRISPR se amplió enormemente hasta que en el año 2012, Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier desarrollaron la maquinaria CRISPR/Cas9 como herramienta de edición génica. Por ello, en el año 2020, ambas investigadoras recibieron el premio Nobel de Química.

Recientemente, mediante la reconstrucción *in silico* de proteínas ancestrales de organismos ya extintos, se han descubierto otras *Cas9* con actividad como herramienta CRISPR validada en células humanas, que podrían ser útiles para la edición génica [85].

4.1 Principios básicos del sistema CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas9 consta de dos elementos fundamentales: la endonucleasa *Cas9* y la guía de ARN. La guía de ARN (ARNsg) se encarga de dirigir la maquinaria hacia una región determinada del genoma. Presenta dos dominios, una secuencia de unos 20 nucleótidos complementaria a la región que se pretende modificar, que se denomina ARNcr (por sus siglas en inglés para *ARN CRISPR*) y un pequeño fragmento de ARN no codificante denominado ARN transactivador o ARNtracr, necesario para la maduración del ARNcr y su anclaje a la *Cas9* [86]. La endonucleasa *Cas9* (por sus siglas en inglés para *CRISPR associated protein 9*) deriva de *Streptococcus pyogenes* y es la responsable de producir el corte de doble cadena en el ADN [87]. Para que la maquinaria reconozca la secuencia de ADN y se produzca el corte, es necesario que exista un motivo adyacente protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés para *protospacer adjacent motif*). Cuando *Cas9* reconoce la secuencia PAM, normalmente NGG, produce el corte a 3 nucleótidos aguas arriba de su secuencia 5'.

Tras esta rotura en el ADN, los mecanismos de reparación endógenos de la célula son capaces de actuar mediante dos estrategias [88]:

- Por unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés *para non-homologous end joining*): Son mecanismos que actúan a lo largo del ciclo celular facilitando el ligamiento de extremos mediante inserción o deleción de nucleótidos al azar [89].
- Reparación dirigida por homología (HDR, por sus siglas en inglés *para homology-directed repair*): Este mecanismo requiere de un molde de ADN para realizar una recombinación homóloga entre el ADN diana y el molde [90].

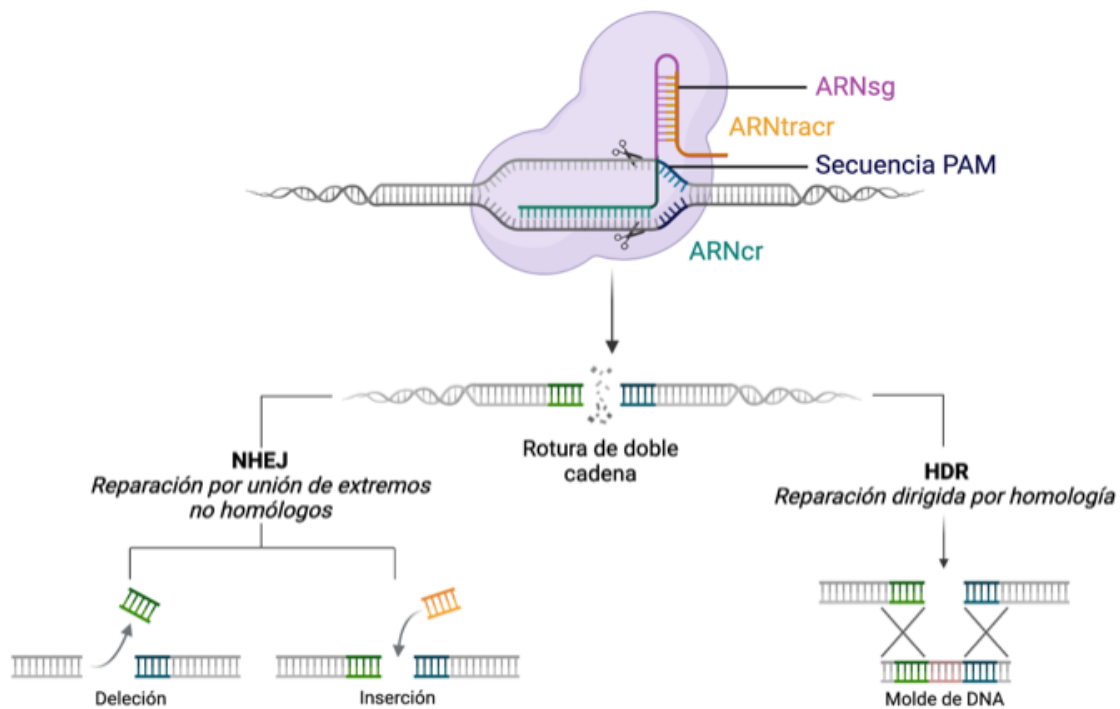


Figura 7. Sistema de edición CRISPR/Cas9 formado por la guía de ARN (ARNsg), que a su vez se compone de ARNtracr y ARNcr, y la enzima Cas9. Tras la rotura de la doble cadena los mecanismos de reparación actúan mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR).
Imagen creada con Biorender.

4.2 Aplicaciones de la edición génica mediante CRISPR/Cas9 en biomedicina

Entre las aplicaciones biomédicas de la edición génica de precisión mediante CRISPR/Cas9 destaca, por la sencillez, eficiencia y bajo coste de dicho sistema, la inactivación de un gen concreto (*knock-out*) o la introducción de secuencias (*knock-in*). Estas estrategias han permitido numerosos avances en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de determinadas enfermedades y el funcionamiento de los genes causantes, como por ejemplo enfermedades cardiovasculares [91], neurológicas [92] o en cáncer [93].

La combinación del sistema CRISPR y la tecnología de las iPSCs presenta un enorme potencial para la corrección del defecto genético de la enfermedad en las iPSCs de pacientes y su diferenciación al tipo celular diana afectado para su aplicación en terapia celular (trasplante autólogo) [94] o para generar controles isogénicos en modelos de enfermedad, ya que al proceder del mismo paciente presentarían un fondo genético idéntico [35]. Además, se ha conseguido producir iPSCs “universales” mediante la eliminación de los genes del sistema mayor de histocompatibilidad MHC (por sus siglas en inglés para *major histocompatibility complex*) con la tecnología de edición CRISPR, que evitarían el rechazo en posibles trasplantes alogénicos [95].

Por último, el uso más prometedor de la edición génica con CRISPR/Cas9 es la terapia génica, es decir, corregir el defecto genético causante de una enfermedad en las células del

paciente. En este sentido, se han realizado ya numerosas aproximaciones tanto *ex vivo* como *in vivo* [96]. La terapia basada en la edición génica *ex vivo* consiste fundamentalmente en el aislamiento de las células del paciente, corrección del defecto genético *in vitro* y posterior trasplante de dichas células de nuevo al paciente. Uno de los primeros ejemplos de esta estrategia fue la corrección en iPSCs derivadas de un paciente con beta talasemia y su posterior diferenciación a células hematopoyéticas funcionales, que podrían ser una fuente viable de células sanguíneas para el tratamiento de esta enfermedad, cuya única cura es el trasplante de células madre hematopoyéticas histocompatibles [97]. Por otro lado, las aproximaciones *in vivo* consisten en la administración directa a los pacientes de la maquinaria CRISPR para la corrección del defecto genético "*in situ*". En el año 2021 se obtuvieron los primeros datos positivos de un ensayo clínico realizado en pacientes con amiloidosis transtiretina utilizando CRISPR *in vivo* [98].

4.3 Limitaciones de la tecnología CRISPR

A pesar de que la tecnología CRISPR ha supuesto una revolución en la investigación biomédica, aún quedan algunos asuntos con los que se debe ser cauteloso en la traslación a la clínica de esta metodología.

En primer lugar, es importante la selección del método de expresión del sistema CRISPR en las células. Para ello existen dos estrategias, las que implican virus como adenovirus, adenoasociados o lentivirus y las que implican vectores no virales como ARNm, plásmidos o ribonucleoproteínas introducidos en las células mediante electroporación, nucleofección o partículas liposomales [99]. Además, el riesgo de que ocurran modificaciones en lugares no deseados, u *off-targets*, es algo que se debe considerar ya que conlleva posibles fenotipos no deseados o incluso la pérdida de función de otros genes [100]. Para intentar minimizar este efecto se han desarrollado estrategias como la optimización del diseño de las guías de ARN mediante predicciones *in silico* con programas informáticos.

5. Chaperonas farmacológicas: Nuevas alternativas terapéuticas

Las proteínas son sintetizadas y plegadas en el retículo endoplásmico de las células para ser transportadas a continuación al aparato de Golgi y dirigidas a su destino final donde realizan su función. Cuando las proteínas presentan algún defecto de plegamiento, los mecanismos de control de la calidad de la célula marcan dichas proteínas para su degradación [101].

La mayoría de las variantes patogénicas de cambio de sentido dan lugar a una proteína inestable y mal plegada que consecuentemente es marcada y degradada por el sistema de control de la célula, produciendo como consecuencia una pérdida de función. Este sistema de control de la calidad está formado por chaperonas moleculares y el sistema ubiquitina-proteasoma [102].

Las chaperonas farmacológicas son compuestos de bajo peso molecular que se unen selectivamente y de forma reversible a la proteína mal plegada durante su síntesis estabilizando su estructura y previniendo su degradación [103]. La interacción de estas chaperonas con la proteína mutante provoca la formación de uniones no covalentes como enlaces iónicos y uniones covalentes como puentes disulfuro que estabilizan la estructura y la asemejan a su conformación

nativa [104]. De esta manera, se promueve el tráfico de las proteínas en el retículo endoplásmico evitando su degradación prematura y recuperando su función.

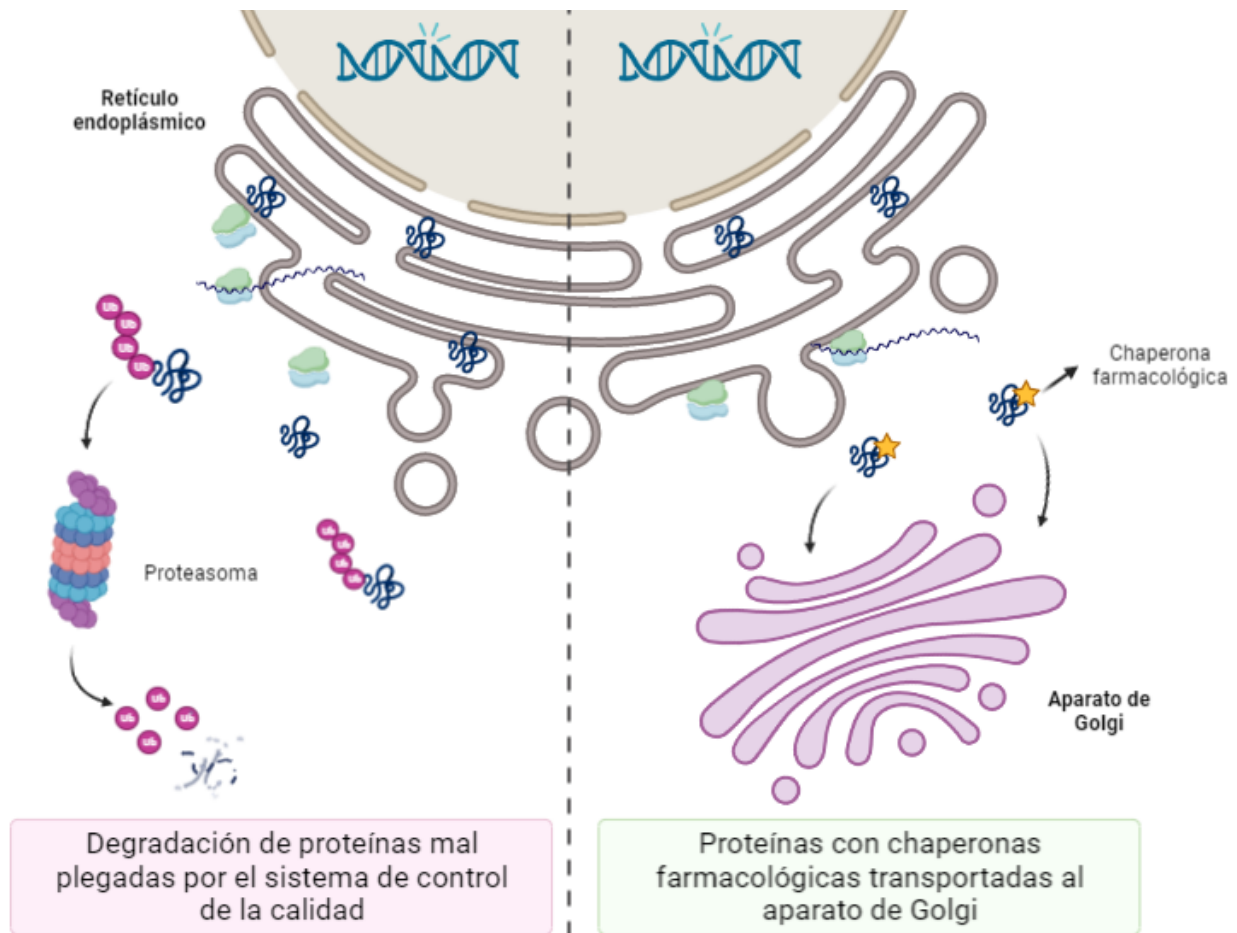


Figura 8. Síntesis y plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico. Las proteínas mal plegadas son marcadas y degradadas por el sistema de control de calidad de la célula. Las chaperonas farmacológicas se unen a la proteína mal plegada estabilizándola y favoreciendo su transporte hacia el aparato de Golgi. Imagen creada con Biorender.

Desde su descubrimiento, las chaperonas farmacológicas se han postulado como potenciales estrategias terapéuticas para tratar enfermedades que cursan con un plegamiento incorrecto. Las primeras chaperonas farmacológicas surgieron a comienzos de los 2000 y eran en su mayoría inhibidores competitivos [105]. Al unirse específicamente al sitio activo estabilizan el plegamiento, no obstante, el equilibrio entre el aumento de la actividad de la proteína y su inhibición en ocasiones puede no controlarse adecuadamente y producir el efecto contrario [106,107]. Este tipo de chaperonas farmacológicas, denominadas de primera generación, han sido ampliamente estudiadas por sus numerosas ventajas como la vía oral de administración, su facilidad para atravesar la barrera hematoencefálica y los bajos costes de fabricación. Tanto es así, que en 2018 se aprobó por la FDA el Galafold™, la primera chaperona farmacológica empleada para el tratamiento de la enfermedad de Fabry [108,109].

En los últimos años se han explorado otros compuestos que no son inhibidores competitivos, conocidos como chaperonas farmacológicas de segunda generación [110]. Estas chaperonas estabilizan la proteína sin unirse al sitio activo, minimizando así el riesgo de competición con el sustrato. La búsqueda de este tipo de compuestos resulta más complicada e implica predicciones *in silico* de posibles sitios alostéricos de unión. En este sentido, a pesar de la dificultad implícita en la búsqueda de nuevos compuestos, se han conseguido algunos avances mediante estudios de reposicionamiento de fármacos, como por ejemplo el ciclopirox, un antimicótico que podría ser útil para el tratamiento de la porfiria eritropoyética congénita [111].

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral ha sido la generación de un modelo de músculo esquelético humano de la enfermedad de McArdle, basado en la utilización de la tecnología de las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), que pueda resultar de utilidad para la búsqueda de una terapia.

Los **objetivos específicos** son:

1. Generación y caracterización de iPSCs a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de una paciente con la enfermedad de McArdle, portadora en homocigosis de la segunda variante patogénica más frecuente en las cohortes de pacientes de la población española: gen *PYGM*, NM_005609.4: c.2392T>C; p.Trp798Arg.
2. Diferenciación de las iPSCs generadas a músculo esquelético maduro.
3. Validación del modelo de músculo esquelético de la enfermedad de McArdle generado “*in vitro*”.
4. Corrección mediante el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 de la variante patogénica en el gen *PYGM*: c.2392T>C; p.Trp798Arg en una de las líneas de iPSCs generadas.
5. Evaluación de una posible terapia con chaperonas farmacológicas como potencial tratamiento de la enfermedad de McArdle en pacientes con la variante patogénica en el gen *PYGM*, c.2392T>C; p.Trp798Arg.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Generación de iPSCs

La generación de iPSCs se llevó a cabo mediante reprogramación de células mononucleares de sangre periférica de una paciente con la enfermedad de McArdle, portadora en homocigosis de la variante patogénica en el gen *PYGM*: NM_005609.4: c.2392T>C; p.Trp798Arg, empleando una metodología no integrativa que implica la utilización de virus Sendai.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se empleó como línea de iPSCs control la línea NSV44.1, generada previamente en el laboratorio mediante reprogramación de fibroblastos obtenidos a partir de un individuo sano [112].

1.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés para *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) se parte de una muestra de 40 ml de sangre periférica obtenida mediante punción venosa, previa firma del correspondiente consentimiento informado por parte del paciente.

El protocolo seguido para el aislamiento de PBMCs se basa en una separación de los componentes de la sangre por gradiente de densidad. Para ello, en primer lugar se realiza una dilución 1:1 de la sangre con 2% de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés para *Fetal Bovine Serum*) (Sigma Aldrich, F7524-500ml) en tampón Fosfato Salino 1x (PBS, por sus siglas en inglés para *Phosphate Buffered Saline*). Para la preparación del PBS se sigue el protocolo descrito en el manual de laboratorio "*Molecular Cloning*" de Sambrook y Maniatis [113]. A continuación se añade cuidadosamente la mezcla sobre un tubo estéril de 50 ml que contenga 15 ml de Lymphoprep (Stemcell Technologies, 7851) previamente atemperado. Se centrifuga 30 minutos a 800 g con aceleración rápida y deceleración lenta para evitar que las fases se junten. Tras la centrifugación se descarta la capa superior de plasma para facilitar la recogida de las PBMCs en otro tubo Falcon de 50 ml estéril y finalmente se realizan dos lavados de 10 minutos con FBS al 2% en PBS.

1.1.1 Congelación y descongelación de PBMCs

Para la criopreservación de las PBMCs, las células se resuspenden en FBS con DMSO al 10% (Sigma Aldrich, D2650-100 mL) y se reparten en crioviales que se almacenan durante 24 h en un contenedor tipo Nalgene *Mr. Frosty* (VWR, 479-3200) a -80 °C. Tras 24 h se trasladan los crioviales a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

Para el proceso de descongelación se sumerge un criovial sacado del nitrógeno en un baño termostatizado a 37 °C. Una vez descongelado, el contenido del vial se vierte en un tubo Falcon de 15 ml sobre el que se añade, gota a gota, medio StemSpam SFEM II (Stemcell Technologies, 9655) precalentado a 37 °C. Una parte se utiliza para contar las células y el resto se centrifuga durante 10 min a 200 g. Finalmente el precipitado celular se resuspende en 1 ml de medio StemSpam SFEM II y las células se siembran en una placa de cultivo celular con medio StemSpam SFEM II a distintas diluciones en función de la aplicación posterior.

1.2 Reprogramación de PBMCs a iPSCs

Para la reprogramación de las PBMCs a iPSCs se empleó una metodología no integrativa que implica la utilización de virus Sendai. Para ello se siguió el protocolo de reprogramación *feeder-free* (no dependiente de una capa de células alimentadoras) del kit comercial CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (ThermoFisher, A16517) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones.

Se plaquean $5 \cdot 10^5$ PBMCs por pocillo en una placa P24 en 1 ml de medio StemSpan SFEM II y se incuban a 37 °C 5% CO₂ durante al menos cuatro días con cambio de medio diario. Cuando la confluencia celular es de aproximadamente 95% se realiza la transducción con tres vectores de reprogramación basados en virus Sendai: KOS (Klf4–Oct3/4–Sox2), cMyc y Klf4 con una multiplicidad de infección de 5, 5 y 3 respectivamente. Para ello, se pipetea $5 \cdot 10^5$ células en un tubo con fondo redondo sobre el que se añade 1 ml de medio de PBMCs (Tabla 1) conteniendo los virus y polibreno 4 µg/ml (Sigma Aldrich, TR-1003).

Medio de PBMCs		
Componente	Casa comercial y referencia	Concentración
StemSpan SFEM II	Stemcell technologies, 9655	
SCF (C-Kit ligand)	Stemcell technologies, 78062.1	100 ng/ml
FLT-3 Ligand	Stemcell technologies, 78009.1	100 ng/ml
IL-3	Stemcell technologies, 78040.1	20 ng/ml
IL-6	ThermoFisher, PHC 0064	20 ng/ml

Tabla 1: Composición del medio empleado para el cultivo de PBMCs en la reprogramación.

Tras una centrifugación de 30 minutos a 1000 g a 32 °C se añade 1 ml adicional de medio de PBMCs con polibreno y todo ello se plaquea en un pocillo de P12. Se incuba durante 24 h a 37 °C 5% CO₂. Al día siguiente se transfiere todo el contenido del pocillo a un tubo de 15 ml y se centrifuga 10 minutos a 200 g para eliminar los virus. El pellet celular se resuspende en 1 ml de medio de PBMCs, se realiza un conteo con *Trypan Blue* (Sigma Aldrich, 93595-50ML) y se plaquean dos densidades celulares, entre $1 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$, en dos pocillos de P6. Tras 24 h de incubación se añade StemSpan SFEM II sin retirar el medio. En los días 3 y 5 tras la transducción se añade ReproTeSR™ (Stemcell Technologies, 5926) sin retirar el medio [114]. A partir del día 6 se realizan cambios de medio con ReproTeSR™, intentando evitar perder las posibles células reprogramadas que aún no se han adherido a la placa. Para ello, se recoge todo el contenido del pocillo en un tubo Falcon de 15 ml, se centrifuga 10 minutos a 200 g, se resuspende en el medio fresco ReproTeSR™ y se vuelve a depositar en el pocillo original [115]. Cuando emergen las primeras colonias de iPSCs se cambia a medio mTeSR™1 (Stemcell Technologies, 85850) y se realizan cambios de medio diario. Cuando las colonias alcanzan un tamaño suficiente se aíslan mediante disgregación mecánica con ayuda de un *Stripper* (Gynetics, 3000) con capilares (Embiol, GYN3005) utilizando un microscopio digital con cámara integrada (Leica, DMS1000).

1.3 Cultivo de iPSCs

1.3.1 Mantenimiento y expansión de iPSCs

Las iPSCs cultivadas en condiciones libres de células alimentadoras o *feeder* se crecen sobre placas cubiertas con el soporte específico para iPSCs, hESC-Matrigel *qualified matrix* (Corning, 45354277). Para la preparación de placas cubiertas con Matrigel se siguen las instrucciones del fabricante en función del lote empleado. Las alícuotas de Matrigel se preparan manteniendo durante todo el proceso una temperatura similar a 4 °C para evitar que se solidifique antes de tiempo. Cada alícuota de Matrigel se resuspende en 25 ml de medio DMEM/F12 (ThermoFisher, 11320-082) utilizando para ello pipetas serológicas frías. La mezcla se reparte, según necesidad, en placas de cultivo que se almacenan hasta su utilización en nevera como máximo durante una semana. Para la utilización de las placas de Matrigel se dejan solidificar a temperatura ambiente durante al menos una hora. Posteriormente se retira el exceso de Matrigel y se añade el medio de cultivo que se va a utilizar, dependiendo del protocolo a seguir.

Las iPSCs se incuban a 37 °C y 5% CO₂ en medio mTeSR™1, con cambio de medio diario. Para su expansión se emplean dos tipos de técnicas: disgregación mecánica y disgregación mediante agentes no enzimáticos.

- Disgregación mecánica:


Cuando las colonias de iPSCs alcanzan un tamaño adecuado se fragmentan mecánicamente con ayuda de un *Stripper* con un capilar acoplado de 150 µm usando un microscopio digital con cámara integrada (Leica, DMS1000). A continuación se transfieren las colonias a otra placa nueva con Matrigel y medio de cultivo mTeSR™1.

- Disgregación con métodos no enzimáticos:

Cuando el cultivo celular alcanza una confluencia de aproximadamente 70% se realizan dos lavados con PBS 1x y se añade ReLeSR™ (Stemcell Technologies, 100-0484) con una cantidad suficiente para que cubra toda la superficie de la placa. Tras 30 segundos se retira el ReLeSR™ y se incuban las placas durante 5 min a 37 °C y 5% CO₂. Transcurrido este tiempo las células se levantan con la ayuda de una micropipeta P1000 y se transfieren a otra placa con Matrigel y medio mTeSR™1 diluyéndolas en función de la aplicación posterior.

1.3.2 Congelación y descongelación de iPSCs

Para la criopreservación de las iPSCs se emplea un medio de congelación compuesto por dos medios, por un lado el medio A, que lleva mTeSR™1 y *Knock-Out Serum Replacement* (KSR) (ThermoFisher, 11520366) (1:1) y por otro el medio B, que se compone de mTeSR™1 y DMSO (4:1). Para su congelación, las células se levantan, se resuspenden en 5 ml de medio mTeSR™1 y se centrifugan a 300 g durante 5 min. El sedimento celular se despega dando unos toques ligeros al tubo y se resuspende en medio A. A continuación se añade el medio B suavemente, dejándolo caer gota a gota por la pared del tubo mientras se golpea con cuidado. Por último se reparte la



suspensión celular en crioviales. Los viales se guardan durante 24 h a -80 °C y posteriormente se almacenan en nitrógeno líquido.

La descongelación se realiza sumergiendo un vial de células en un baño termostatzado a 37 °C y resuspendiendo el contenido del vial en medio mTeSR™1 suplementado con Rock *inhibitor* Y27632 a una concentración 10 µM (Miltenyi, 130-103-922). Tras una centrifugación a 300 g durante 5 minutos el sedimento celular se resuspende en 1 ml de medio mTeSR™1 y se añade en una placa previamente preparada con Matrigel y medio mTeSR™1 con *Rock inhibitor* 10 µM. Para que las células se repartan bien y crezcan adecuadamente, una vez dentro del incubador se mueve la placa haciendo movimientos en forma de cuadrado.

2. Análisis de pluripotencia y calidad de las líneas de iPSCs

Para evaluar la pluripotencia y calidad de las líneas de iPSCs generadas se lleva a cabo una batería de pruebas estandarizadas que se describen a continuación.

2.1 Pruebas de análisis de la pluripotencia

2.1.1 Fosfatasa alcalina

La actividad de la fosfatasa alcalina se determina empleando el kit comercial *Alkaline phosphatase blue membrane substrate solution* (Sigma Aldrich, AB0300). Para ello, las placas de iPSCs se lavan dos veces con PBS 1x y se cubren entre 3 y 5 minutos con una solución de fijado preparada previamente, compuesta por una dilución 9:1 de PBS 1x y formaldehído 37%. Transcurrido ese tiempo las placas se cubren con solución sustrato y se incuban en oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras un lavado con PBS 1x, las colonias que son positivas para la fosfatasa alcalina se visualizan y fotografían con la ayuda de un microscopio digital con cámara integrada (Leica, DMS1000).

2.1.2 Expresión de genes de pluripotencia

Mediante una PCR cuantitativa (qPCR) se analizan y cuantifican la expresión de los genes asociados a pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *CRIPTO* y *NANOG*. Para ello, a partir de precipitados celulares se extrae ARN mediante el método clásico fenol-cloroformo. A continuación, el ARN se retrotranscribe a ADN complementario (ADNc) empleando el kit *RevertAid RT Reverse Transcription Kit* (ThermoFisher, K1691). La qPCR se realiza con 1 µl de ADNc utilizando los reactivos de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, A6001). La reacción se lleva a cabo en un sistema de PCR a tiempo real *Applied Biosystems™ 7500 Fast*. Los valores se normalizan frente al gen constitutivo *GAPDH*. Los oligonucleótidos y las condiciones de reacción se detallan en la tabla 2.

Cebadores (5'-3') Fw/Rv		Condiciones de PCR		
Endo OCT4	GGGTTTTGGGATTAAGTTCTTCA/ GCCCCACCCCTTGTGTT	95°C	10 min	X 35 ciclos
Endo SOX2	CAAAAATGGCCATGCAGGTT/ AGTTGGGATCGAACAAAAGCTATT	95°C	15 s	
CRIPTO	CGGAACTGTGAGCACGATGT/ GGGCAGCCAGGTGTCATG	60°C	1 min	
NANOG	ACAACTGGCCGAAGAATAGCA/ GGTCCCAGTCGGGTTAC			
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC/ AGGGATCTCGCTCCTGGAA			

Tabla 2: Condiciones y oligonucleótidos empleados en la qPCR de análisis de la pluripotencia.

2.1.3 Inmunofluorescencia

La presencia de marcadores de superficie típicos de células embrionarias como SSEA-4, TRA-1-81 y TRA-1-60, y de factores de transcripción como OCT4, NANOG y SOX2 se analiza mediante técnicas de inmunofluorescencia. Para ello las células se fijan con Paraformaldehído al 4% (Sigma Aldrich, 158127) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realiza una permeabilización con 0,1% Tritón X-100 (Sigma, T8787-50ML) en solución salina tamponada Tris (TBS, por sus siglas en inglés *Tris Buffered Saline*). El bloqueo se lleva a cabo incubando las células con 3% de suero de burro (Sigma, D9963) en TBS con 0,3% Tritón X-100. La incubación con los anticuerpos primarios se realiza durante la noche a 4 °C y con los anticuerpos secundarios durante 2 h a temperatura ambiente. Para la tinción de los núcleos se emplea DAPI (Sigma, 28718-90-3). Las imágenes se obtienen con un microscopio confocal (Espectral LSM510 META ConfoCor 3, ZEISS) y se procesan con el software Zen 2009 (ZEISS). Los anticuerpos utilizados aparecen detallados en la tabla 3.

Anticuerpos primarios			
Diana	Especie	Dilución	Casa y Referencia
Anti-SOX2	Conejo	1:100	ThermoFisher, PA1_16968
Anti-NANOG	Cabra	1:25	R&D Systems, AF1997
Anti-OCT4	Ratón	1:100	Santa Cruz Biotechnology, sc_5279
Anti-SSEA-4	Ratón	1:10	Abcam, ab16287
Anti-TRA-1-81	Ratón	1:150	Milipore, MAB4381
Anti-TRA-A-60	Ratón	1:150	Milipore, MAB4360
Anticuerpos secundarios			
Diana	Especie	Dilución	Casa y Referencia
CyTM2 anti ratón IgG (H + L)	Cabra	1:50	Jackson ImmunoResearch, 111-225-144
CyTM3 anti ratón IgG, Fc3	Cabra	1:250	Jackson ImmunoResearch, 115-165-209
CyTM2 anti ratón IgG, Fc2b	Ratón	1:50	Jackson ImmunoResearch, 115-225-207

CyTM2 anti cabra IgG (H + L)	Burro	1:50	Jackson Inmunoresearch, 705–225-147
------------------------------	-------	------	-------------------------------------

Tabla 3: Anticuerpos empleados en los análisis por inmunofluorescencia de la pluripotencia.

2.1.4 Ensayo de diferenciación *in vitro*

Una de las características de las iPSCs es su capacidad para diferenciarse a las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. Para comprobar si las líneas generadas presentan esta capacidad, se realiza un ensayo de diferenciación *in vitro* a partir de cuerpos embrionarios (Embryoid bodies, EBs) generados por agregación forzada. Brevemente, las iPSCs se llevan a célula única utilizando acutasa (ThermoFisher, A1110501) y la suspensión celular se distribuye en una placa de cultivo con fondo en V (Deltalab, 900012). La placa se centrifuga a 800 g 10 minutos para facilitar que las células se agreguen y se incuba durante 3 días en medio mTeSR™1 en un incubador a 37 °C y 5% CO₂. Cuando los cuerpos embrionarios formados alcanzan un tamaño adecuado se pasan a placas de cultivo P35 no tratadas con medio EBs (tabla 4), con la ayuda de una micropipeta P1000 a la que previamente hemos cortado la punta con una cuchilla de bisturí estéril.

Medio EBs		
Componente	Casa comercial y referencia	Concentración
DMEM Knock-out	Gibco, 10829-018	
KO-Serum replacement	ThermoFisher, 11520366	20%
GlutaMAX™	Gibco, 35050038	1% (vol/vol)
Penicilina/Estreptomicina	Sigma Aldrich, P0781	1% (vol/vol)
Aminoácidos no esenciales	Sigma Aldrich, M7145	1% (vol/vol)
β-Mercaptoetanol	ThermoFisher, 21985023	100 μM

Tabla 4: Composición del medio de cultivo de los cuerpos embrionarios (EBs).

Tras 4 días de cultivo se transfieren entre 4 y 5 cuerpos embrionarios a un pocillo de P12 recubierto con gelatina para el caso de endodermo y mesodermo o de Matrigel para el caso de ectodermo. Se realizan cambios de medio cada dos días con los medios correspondientes para la diferenciación a endodermo, mesodermo o ectodermo (Tabla 5) durante 2 o 3 semanas hasta que se observen células con morfología típica de cada capa embrionaria. Transcurrido este tiempo se realiza un análisis de inmunofluorescencia empleando para ello anticuerpos contra α-fetoproteína (AFP) (marcador de endodermo) (Sigma Aldrich, WH0000174M1), α-actina de músculo liso (SMA) (marcador de mesodermo) (Sigma Aldrich, A2547) y β-tubulina neuronal clase III (Tuj1) (marcador de ectodermo) (Sigma Aldrich, T8660).

Medio de diferenciación a endodermo y mesodermo		
Componente	Casa comercial y referencia	Concentración
DMEM-F12	ThermoFisher, 11320-082	
FBS Hyclone	ThermoFisher, 10703464	20%
L- Glutamina	Gibco, 25030081	1% (vol/vol)
Penicilina/Estreptomicina	ThermoFisher, P0781	1% (vol/vol)
β -Mercaptoetanol	ThermoFisher, 21985023	100 μ M
Aminoácidos no esenciales	Sigma Aldrich, M7145	1% (vol/vol)
+ Ácido ascórbico (solo para mesodermo)	Sigma Aldrich, M4403	100 μ M

Medio de diferenciación a ectodermo		
Componente	Casa comercial y referencia	Concentración
DMEM-F12	ThermoFisher, 11320-082	50%
Neurobasal	ThermoFisher, 21103049	50%
GlutaMAX™	Gibco, 35050038	1% (vol/vol)
Penicilina/Estreptomicina	ThermoFisher, P0781	1% (vol/vol)
β -Mercaptoetanol	ThermoFisher, 21985023	100 μ M
Aminoácidos no esenciales	Sigma Aldrich, M7145	1% (vol/vol)
Suplemento N2	ThermoFisher, 17502-048	1% (vol/vol)
B27	ThermoFisher, 17504-044	1% (vol/vol)

Tabla 5: Composición de los medios empleados en el ensayo de diferenciación *in vitro* a partir de cuerpos embrionarios.

2.2 Pruebas de calidad e integridad

2.2.1 Análisis del cariotipo

Con el objetivo de descartar anomalías cromosómicas en las líneas de iPSCs generadas o en cultivo se lleva a cabo un análisis del cariotipo. Para ello, se parte de un cultivo con más de 12 pases. Las células se tratan con 10 μ g/ml de colchicina (Gibco, 10116784) durante 90 min a 37 °C. Posteriormente, las células se levantan empleando Tripsina (Sigma Aldrich, T3924) y se pasan a una solución hipotónica de KCl 0,075 M. A continuación, las células se fijan con solución de Carnoy colocándose en un portaobjetos para microscopio. Para el bandeado G se emplea la tinción de *Wright* y se analizan al menos 20 metafases. Todos los análisis de cariotipo presentados en esta tesis doctoral han sido realizados en el Servicio de Genética del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre por la Dra. Ana Moreno Izquierdo o la Dra. Irene Gómez Manjón.

2.2.2 Comprobación de la variante patogénica

Para confirmar la presencia de la variante patogénica c.2392T>C; p.Trp798Arg en el gen *PYGM* en las iPSCs generadas, se obtiene ADN genómico a partir de un cultivo de células y se realiza una PCR. Para la extracción de ADN genómico se emplea el Kit comercial *NucleoSpin Tissue*

Mini kit (Macherey-Nagel, 740952.50) siguiendo las indicaciones especificadas por el fabricante. A continuación se realiza una PCR con las condiciones y los oligonucleótidos señalados en la tabla 6.

Cebadores (5'-3')	Condiciones de PCR
W798R Fw TGCCAGGAGAAAGTCAGCGCC	95°C 2 min
W798R Rv CTGGCGGGAAGGCTCCACAC	95°C 30 s
Tamaño amplicón: 262 pb	69°C 1 min X 35 ciclos
	72°C 15 s
	72°C 5 min

Tabla 6: Condiciones de la PCR realizada para la comprobación de la presencia de la variante patológica c.2392T>C; p.Trp798Arg en el gen *PYGM*.

El producto de PCR se visualiza en un gel de agarosa al 2% y se purifica utilizando el Kit *NZYGelpure* (NZYTech, MB01102) siguiendo las especificaciones del fabricante. A continuación se secuencia el producto de PCR en un secuenciador capilar ABI 3730 (Applied Biosystems) y el resultado se visualiza con el programa informático *Chromas Lite*.

2.2.3 Análisis de huella genética

La identidad celular de las líneas de iPSCs generadas se comprueba mediante un análisis de fragmentos de marcadores localizados a lo largo del genoma. Los marcadores microsatélites que se han analizado en este estudio se han escogido teniendo en cuenta que presentaran un alto porcentaje de heterocigosidad en la población. Estos marcadores son: D2S1338, D7S820, D8S1179, D13S317, D19S433, D21S11 y VWA) y la amelogenina para la determinación del sexo. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados y las condiciones de PCR se indican en la tabla 7.

Cebadores (5'-3') Fw/Rv	Condiciones de PCR
D2S1338 [FAM]CCAGTGGATTTGGAACAGA / ACCTAGCATGGTACCTGCAG	95°C 2 min
D7S820 [FAM]TGTCATAGTTTAGAACGAACTAACG/ CTGAGGTATCAAAAAGTCTCAGAGG	95°C 30 s
D8S1179 [FAM]TTTTGTATTTTCATGTGTACATTCG/ CGTAGCTATAATTAGTTCATTTTCA	62°C 1 min X 35 ciclos
D13S317 [FAM]ACAGAAGTCTGGGATGTGGA/ GCCCAAAAAGACAGACAGAA	72°C 20 s
D19S433 [FAM]CCTGGGCAACAGAATAAGAT/ TAGGTTTTAAGGAACAGGTGG	72°C 6 min
D21S11 [FAM]GTGAGTCAATTCCCAAG/ GTTGTATTAGTCAATGTTCTCC	
VWA [FAM]CCCTAGTGGATGATAAGAATAATC/ GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG	
Amelogenina [FAM]CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG/ ATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG	

Tabla 7: Secuencias de los marcadores analizados y condiciones de PCR empleadas en el análisis de la huella genética.

A continuación, con los productos de PCR se lleva a cabo un análisis de fragmentos. Este análisis se llevó a cabo en la empresa Secugen S.L. Los resultados obtenidos se visualizan con el programa *Peak Scanner*TM (ThermoFisher, 4381867) y se comparan los tamaños de los fragmentos obtenidos de la línea de iPSCs con las PBMCs de las que proceden para verificar que son idénticos.

2.2.4 Ausencia de micoplasma

Para descartar posibles contaminaciones en los cultivos, se comprueba periódicamente la ausencia de micoplasma. Para ello se recoge 1 ml de medio de cultivo de células con una confluencia del 90% y se incuba durante 5 min a 95 °C. Posteriormente se centrifuga a 13000 rpm durante 5 s y 1 µl de este sobrenadante se utiliza como molde para llevar a cabo una PCR en un termociclador Verity Thermal Cycler (Applied BiosystemsTM). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados y las condiciones de PCR se detallan en la tabla 8.

Cebadores (5'-3')		Condiciones de PCR	
GPO-3	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCT	95°C	2 min
MGSO	TGCACCATCTGTCACCTCTGTAAACCTC	95°C	30 s
		55°C	1 min
		72°C	1 min
		72°C	5 min
Tamaño amplicón: 300 pb		X 35 ciclos	

Tabla 8: Condiciones de la PCR y oligonucleótidos empleados en la prueba de análisis de micoplasma.

2.2.5 Silenciamiento viral

Para comprobar que las líneas de iPSCs generadas han eliminado los virus Sendai tras la reprogramación, se realiza una RT-PCR empleando como muestra ADN complementario (ADNc) obtenido a partir de células con más de 10 pases. Las condiciones de PCR y los oligonucleótidos empleados aparecen detallados en la tabla 9. Como control positivo se utiliza ADNc sintetizado a partir de ARN de PBMCs recogidas en los primeros días de la reprogramación a iPSCs, ya que en ese momento las células acaban de ser transducidas con los virus Sendai y por lo tanto presentarán todavía los virus Sendai. El resultado de la PCR se analiza mediante electroforesis en un gel de agarosa 2% y se visualiza en un transiluminador.

Cebadores (5'-3') Fw/Rv		Condiciones de PCR	
SeV	GGATCACTAGGTGATATCGAGC/ ACCAGACAAGAGTTAAGAGATATGTATC	95°C	7 min
KOS	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC/ ACCTTGACAATCCTGATGTGG	95°C	30 s
Klf4	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC/ AATGTATCGAAGGTGCTCAA	55°C	30 s
c-Myc	TAACTGACTAGCAGGCTTGTCG/ TCCACATACAGTCCTGGATGATGATG	72°C	30 s
		72°C	6 min
		X 32 ciclos	

Tabla 9: Oligonucleótidos y condiciones de PCR empleadas en la qPCR para análisis del silenciamiento viral.

3. Diferenciación a músculo esquelético

Para la diferenciación de las iPSCs a músculo esquelético se ha llevado a cabo una combinación de protocolos, previamente publicados, en la que se distinguen dos partes: diferenciación primaria desde iPSCs a progenitores miogénicos y diferenciación secundaria o final desde progenitores a fibras musculares. Por una parte, para la diferenciación de iPSCs a progenitores miogénicos se sigue el protocolo de Chal y colaboradores [82]. Por otro lado, para la diferenciación final a fibra muscular se sigue el protocolo descrito por Pourquié y colaboradores [116]. Ambos protocolos se basan en la adición de pequeñas moléculas que activan o inhiben determinadas rutas implicadas en el desarrollo embrionario del músculo esquelético.

3.1 Diferenciación primaria

Para comenzar el proceso de diferenciación es necesario partir de un cultivo de iPSCs con buen aspecto, en el que las colonias tengan bordes brillantes y definidos. Este punto es crítico para el correcto desarrollo del protocolo. Cuando el cultivo de iPSCs alcanza el 70% de confluencia se tratan las células con 10 μ M Rock *inhibitor* durante al menos dos horas. Mientras, se preparan las placas de cultivo con Matrigel y medio mTeSRTM1 suplementado con Rock *inhibitor* a una concentración de 10 μ M. Transcurrido este tiempo las células se levantan con acutasa y se centrifugan en 10 ml de DMEM/F12 a 300 g durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspende en 1 ml de mTeSRTM1 con Rock *inhibitor* a una concentración de 10 μ M. A continuación, se cuentan las células y se plaquean $1,2 \cdot 10^5$ células en un pocillo de una placa P12 o $2,8 \cdot 10^5$ células en una placa P6. Las placas se mueven cuidadosamente y se incuban a 37 °C y 5% CO₂ durante 24 h. La correcta distribución de las células en la superficie de la placa en este punto también es crítico para el buen desarrollo del protocolo. El medio mTeSRTM1 se cambia diariamente hasta que los cultivos alcanzan una confluencia del 15-20%. En ese momento se comienza la diferenciación primaria mediante cambios de medio sucesivos siguiendo la secuencia que se detalla en la tabla 10. El día que se pasa de medio mTeSRTM1 al primer medio de diferenciación (DiCL) se considera día 0. A partir de este momento los medios se cambian diariamente. En el día 3 se cambia a medio DiCLF. A día 6 se cambia a medio DK-HiFL y a día 8 se pasa a medio DK-I. A partir del día 12 se realizan cambios de medio cada dos días con medio DK-HI hasta el día 32. Durante este tiempo se debe monitorizar el proceso visualizando los cambios de morfología al microscopio. Además, se recogen precipitados celulares a días 0, 8, 16 y 24 para analizar la expresión de los marcadores miogénicos característicos de cada etapa del proceso de diferenciación.

DiCL/DiCLF		
Componente	Casa comercial y referencia	Concentración
DMEM-F12	ThermoFisher, 11320-082	
ITS (Insulina-transferrina-selenio)	ThermoFisher, 41400-045	1% (vol/vol)
Aminoácidos no esenciales	Sigma Aldrich, M7145	1% (vol/vol)
Penicilina/Estreptomicina	ThermoFisher, P0781	0.2%
CHIR-99021	Stemcell Technologies, 72054	3 μ M
LDN-193189	Stemcell Technologies, 72147	0.5 μ M
(Solo para DiCLF) + b-FGF	Miltenyi, 130-093-839	20 ng/ml

DK-HiFL		
Componente	Casa comercial y referencia	Concentración
DMEM-F12	ThermoFisher, 11320-082	
KO-Serum Replacement	ThermoFisher, 11520366	15%
Aminoácidos no esenciales	Sigma Aldrich, M7145	1% (vol/vol)
Penicilina/Estreptomicina	ThermoFisher, P0781	0.2%
β -Mercaptoetanol	ThermoFisher, 21985023	0.1 mM
HGF	Stemcell Technologies, 78019.1	10 ng/ml
IGF	Stemcell Technologies, 78022.1	2 ng/ml
bFGF	Miltenyi, 130-093-839	20 ng/ml
LDN-193189	Stemcell Technologies, 72147	0.5 μ M
DK-I/DK-HI		
Componente	Casa comercial y referencia	Concentración
DMEM-F12	ThermoFisher, 11320-082	
KO-Serum Replacement	ThermoFisher, 11520366	15%
Aminoácidos no esenciales	Sigma Aldrich, M7145	1% (vol/vol)
Penicilina/Estreptomicina	ThermoFisher, P0781	0.2%
β -Mercaptoetanol	ThermoFisher, 21985023	0.1 mM
IGF	Stemcell Technologies, 78022.1	2 ng/ml
(Solo para DK-HI) + HGF	Stemcell Technologies, 78019.1	10 ng/ml

Tabla 10: Medios empleados en la diferenciación primaria a músculo esquelético.

3.2 Diferenciación secundaria o final

A partir del día 32 el cultivo consiste en una población de precursores miogénicos que se pueden expandir y congelar. Para ello el cultivo se trata con Rock *inhibitor* durante 2 h. A continuación las células se disocian con acutasa durante 5-7 minutos a 37 °C y se fragmentan mecánicamente con la ayuda de una aguja de 25G. Las células se transfieren a un tubo de 50 ml con medio DMEM con 10% FBS. Es posible que se necesite más de un ciclo de incubación con acutasa para poder disociar las células si los cultivos son muy densos. Para garantizar que las células se han disociado en célula única se emplea un colador de células de 70 μ M (BD Falcon, 352350) para filtrar la solución celular y se centrifuga 300 g 5 minutos. El sedimento celular se resuspende en medio de expansión de progenitores VkGM. Este medio se desarrolló en el laboratorio y su composición se detalla en la tabla 11. Se cuentan las células y se plaquean $2,5 \cdot 10^5$ células en un pocillo de P6 con Matrigel en medio VkGM con 10 μ M de Rock *inhibitor*. Las placas se incuban a 37 °C y 5% de CO₂. El medio se cambia en días alternos durante 3 días hasta alcanzar el 90% de confluencia. Una parte de estos progenitores se pueden criopreservar para posteriores análisis. Para ello las células se levantan con acutasa y se centrifugan a 300 g 5 min. A continuación el sedimento de células se resuspende en FBS al 20% de DMSO y la suspensión se reparte en crioviales. Cada pocillo de P6 con una confluencia aproximada del 90% permite congelar 5 crioviales. Los crioviales se almacenan durante 24 h en un contenedor tipo Nalgene *Mr. Frosty* (VWR, 479-3200) a -80 °C. Tras 24 h se trasladan a un tanque de Nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

Medio VkGM		
Componente	Casa comercial y referencia	Concentración
DMEM-F12	ThermoFisher, 11320-082	
FBS	ThermoFisher, 11520366	18%
Insulina	Sigma Aldrich, I9278	1% (vol/vol)
Penicilina/Estreptomicina	ThermoFisher, P0781	0.2%
bFGF	Miltenyi, 130-093-839	20 ng/ml
HGF	Stemcell Technologies, 78019.1	10 ng/ml
EGF	Stemcell Technologies, 78006.1	20 ng/ml
Dexametasona	Sigma Aldrich, D4902	10 μ M

Tabla 11: Medio de expansión de progenitores miogénicos.

Para continuar la diferenciación de los progenitores miogénicos a fibras musculares se plaquean 100.000 cels/cm² en placas cubiertas de Matrigel y se incuban con medio VkGM a 37 °C y 5% de CO₂. Cuando los cultivos alcanzan el 90% de confluencia se induce la diferenciación final mediante la adición de medio de diferenciación (KCTiP) durante 7 y 14 días en función de la aplicación posterior con cambio de medio en días alternos (Tabla 12). Durante estos días se observa el cambio de morfología celular y la orientación de las miofibras en cultivo.

Medio KCTiP		
Componente	Casa comercial y referencia	Concentración
DMEM-F12	ThermoFisher, 11320-082	
KO-Serum replacement	ThermoFisher, 11520366	2%
CHIR-99021	Stemcell Technologies, 72054	1 μ M
Penicilina/Estreptomicina	ThermoFisher, P0781	0.2%
ITS	ThermoFisher, 41400-045	1% (vol/vol)
SB-431542	Stemcell Technologies, 72234	10 μ M
Prednisolona	Sigma Aldrich, P6004	10 μ M

Tabla 12: Composición del medio de diferenciación secundaria o final KCTiP.

4. Pruebas de validación del proceso de diferenciación a músculo esquelético

4.1 Cuantificación de la expresión de marcadores miogénicos

La expresión de los marcadores de músculo *MYOD1*, *PAX3*, *PAX7*, *MYH2*, *MYH3* y *MYH8* se analizó mediante una PCR a tiempo real partiendo de ADNc sintetizado a partir de ARNm obtenido de precipitados celulares de cultivos tanto de diferenciación primaria a días 0, 8, 16 y 24 como de diferenciación secundaria a días 7 y 14. Todos los valores obtenidos se normalizaron frente al gen de expresión constitutiva *GAPDH*. Los oligonucleótidos empleados en este ensayo y las condiciones de qPCR se detallan en la tabla 13.

Cebadores (5'-3') Fw/Rv	Condiciones de PCR
<i>PAX3</i> TACAGGTCTGGTTAGCAAC/ GATCTGACACAGCTTGTGGA	95°C 10 min
<i>PAX7</i> CAGACAGGTGGCGACTCC/ CGCGGCTAATCGAACTCAC	95°C 15 s
<i>MyoD1</i> GACGGCATGATGGACTACAG/ AGGCAGTCTAGGCTCGACAC	60°C 1 min
<i>MYH2</i> GGAGCTGGTGGAGGGGCCAA/ TGCTCCATGGCACCAGGAGTTT	X 35 ciclos
<i>MYH3</i> GCTTGTGGGCGGAGGTCTGG/ AGGGCTGTTCTGAGCCTCGAT	
<i>MYH8</i> TCCACCAAGAACCAGAGAGTGG/ TGGGCCTCAATCCGCTCCTT	
<i>Titina</i> CCGAAATGCATCAGTCAGCG/ CCTTGCAAGCTGTGTACC	

Tabla 13: Cebadores y condiciones de PCR utilizados en el ensayo de qPCR para células miogénicas.

4.2 Inmunofluorescencia de células miogénicas

Los cultivos miogénicos se lavan dos veces con PBS 1x y se fijan incubándolos con formalina (Sigma Aldrich, HT501128-4L) durante 20 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C si se trata de fibras musculares. A continuación se lavan con PBS 1x tres veces y se realiza el paso de permeabilización y bloqueo a la vez, incubando las células con PBS-BSA 3%-Triton 0,4 % durante 1h a temperatura ambiente. Seguidamente se incuban con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavan con PBS 1x y se incuban con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente. Por último se realiza un lavado con PBS 1x y se añade DAPI (1:1000) durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se montan las muestras utilizando medio de montaje antidecoloración ProLong Diamond (ThermoFisher, P36961). Los anticuerpos utilizados se detallan en la tabla 14. Las imágenes se obtienen con un microscopio confocal (Spectral LSM510 META ConfoCor 3, ZEISS) y se procesan con el software Zen 2009 (ZEISS).

Anticuerpos primarios			
Diana	Especie	Dilución	Casa y Referencia
Anti-PAX7	Conejo	1:50	Abcam, ab187339
Anti-Miogenina	Ratón	1:25	Abcam, ab212668
Anti-MyHC	Ratón	1:250	Sigma Aldrich, M4276
Anti-Actinina	Ratón	1:500	Sigma Aldrich, A7811
Anti-cTnT	Conejo	1:500	Sigma Aldrich, HPA015774
Anti-Titina	Ratón	1:100	SantaCruz Biotechnology, sc-271945
Anti-PYGM	Conejo	1:50	Sigma, HPA056003
Anticuerpos secundarios			
Diana	Especie	Dilución	Casa y Referencia
Alexa Fluor 488 anti ratón	Cabra	1:500	ThermoFisher, A-11029
Alexa Fluor 568 anti conejo	Cabra	1:150	ThermoFisher, A-11011

Tabla 14: Anticuerpos empleados en los ensayos de inmunocitoquímica en las células miogénicas.

5. Pruebas de validación del modelo de la enfermedad de McArdle

5.1 Cuantificación de la expresión de PYGM

La cuantificación de los niveles de expresión del gen *PYGM* se realiza mediante una PCR a tiempo real con sondas TaqMan empleando *TaqManTM gene expresion master mix* (ThermoFisher, 4369016). Las sondas utilizadas son *PYGM-FAM* (Hs00989942_m1, 10794597) y *GAPDH-VIC* (Hs02786624_g1, 11957021) como gen de expresión constitutiva para la normalización. La reacción se lleva a cabo en el sistema *Applied BiosystemsTM 7500 Fast Real-Time PCR System*. Las condiciones del ensayo dúplex de qPCR son las siguientes: una primera fase de desnaturalización de 2 minutos a 50 °C seguida de una fase de anillamiento de 10 minutos a 95 °C y por último 40 ciclos de extensión a 95 °C durante 15 segundos y a 60 °C durante 1 minuto.

5.2 Western Blot

Para detectar la presencia o ausencia de miofosforilasa en los cultivos miogénicos se realizaron ensayos de inmunodetección o *Western Blot*. Para ello se recogen las células de cultivos miogénicos a días 7 y 14 de diferenciación final utilizando un raspador de células. A continuación se realiza la extracción de proteína utilizando como tampón de lisis Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y SDS 0,1%, suplementado con inhibidores de proteasas (Roche, 11873580001). Para la cuantificación de proteínas se emplea el kit de ensayo de proteínas DCTM (BioRad, 5000112) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último se lleva a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) utilizando geles comerciales preformados 4-20% Mini-PROTEAN TGCTM (BioRad, 4561094). Para realizar la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa se emplea el sistema *Trans-Blot Turbo Transfer* (BioRad, 1704158). A continuación, la membrana se bloquea

con TBS con leche desnatada al 5% y TWEEN 20 (Sigma, P1379) al 0,1% durante 1 h a temperatura ambiente y después se incuba con anticuerpo primario anti-PYGM (Sigma, HPA056003) durante 17 horas a 4 °C en agitación empleando una dilución 1:50. El anticuerpo secundario de cabra anti conejo (*Molecular Probes*, G21234) se diluye 1:2500 y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Ambos anticuerpos (primario y secundario) se diluyen en TBS-TWEEN 20 al 0,1% con leche desnatada en polvo al 1%. Para el revelado de las membranas se emplea *Clarity Max™ Western ECL Blotting Substrates* (BioRad, 1705062). Como control de carga se utiliza α -tubulina-HRP (Abcam, ab40742) 1:5000 y β -actina-HRP 1:2500 (Abcam, ab499000).

Los análisis de inmunodetección mediante *Western Blot* presentados en esta tesis doctoral fueron realizados por la Dra. Inés García Consuegra del Servicio de Proteómica del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, i+12.

5.3 Tinción PAS

Para detectar polisacáridos como el glucógeno en muestras histológicas se suele realizar una tinción con ácido periódico de Schiff (PAS). Con el objetivo de detectar posibles acúmulos de glucógeno en las fibras de músculo esquelético generadas por diferenciación de las iPSCs, se realizan tinciones PAS en muestras de músculo esquelético a día 7 de diferenciación final. Para ello, las células se fijan con formaldehído al 3,7% en etanol 90% durante 1 h a 4 °C. A continuación se tratan con ácido periódico al 1% (Sigma Aldrich, P0430-25G) durante 5 minutos y se lavan con agua de grifo durante 1 minuto y agua estéril durante 5 segundos. Seguidamente, se incuban las muestras con reactivo de *Schiff* (Sigma Aldrich, 3952016-500ml) a temperatura ambiente durante 15 minutos, se aclaran con agua estéril durante 5 segundos y se realiza un lavado con agua del grifo de 10 minutos en agitación. Por último las células se montan con Prolong y se visualizan en un microscopio de fluorescencia (ZEISS AX10).

Para verificar si las observaciones con la técnica PAS corresponden a acúmulos de glucógeno se añadió un paso de permeabilización al protocolo de tinción PAS general, esta modificación se realizó basándonos en el protocolo descrito por Hesselink y colaboradores [117]. Para ello, las células se fijan con formalina durante 1 h a 4 °C. A continuación se realiza un lavado con PBS 1x durante 5 minutos y se tratan las células con 0,1% Tritón-X-100 en PBS 1X. Tras este tiempo se lavan con PBS 1x durante 5 minutos y con agua estéril durante 5 segundos. Seguidamente, se continúa el protocolo de tinción PAS explicado anteriormente desde el tratamiento con ácido periódico al 1% durante 5 minutos.

5.4 Cuantificación de la actividad de la glucógeno fosforilasa

Para cuantificar la actividad de la enzima glucógeno fosforilasa presente en el músculo esquelético generado a partir de las iPSCs se ha llevado a cabo un ensayo colorimétrico. Para ello se empleó el Kit comercial *Glycogen Phosphorylase Colorimetric Assay Kit* (Sigma Aldrich, MAK417) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

6. Edición genética mediante CRISPR/Cas9

Con el fin de obtener un control isogénico a partir de las iPSCs generadas del paciente con la enfermedad de McArdle portador de la variante patogénica en homocigosis c.2392T>C, p.Trp798Arg en el gen *PYGM* se utilizó el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9. El protocolo utilizado se ha basado en el método descrito por Bruentraeger y colaboradores [118] de nucleofección con ribonucleoproteínas (RNPs), formadas por la endonucleasa *Cas9* y las ARNsg diseñadas.

6.1 Diseño de las guías de ARN (ARNsg)

Las guías de ARN (ARNsg) son secuencias de ARN específicas para la región del genoma que se pretende modificar que dirigen a la enzima *Cas9* en el proceso de edición. Se componen de una secuencia de nucleótidos complementario a la región a editar (ARNcr) y un dominio transactivador (ARNtracr) que sirve de anclaje de la *Cas9*. Para el diseño de los ARNcr se utilizó la herramienta *online* de la casa comercial *Integrated DNA Technologies* (itddna.com). Los elementos que se tuvieron en cuenta para seleccionar las guías fueron:

- Que contuviesen la variante patogénica a corregir, lo cual aumenta la eficacia de corte de la *Cas9* en el lugar deseado.
- Que presenten un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) en sentido 3': NGG.
- Que tengan una longitud entre 18-20 nucleótidos.
- Que la eficiencia en la diana de interés sea elevada, al mismo tiempo que la probabilidad de modificación en regiones no deseadas sea baja.

6.2 Diseño del oligonucleótido de edición (ODNcs)

Para la corrección de la variante patogénica c.2392T>C, p.Trp798Ar en el gen *PYGM* a través de mecanismos de reparación por homología directa (HDR) se diseñó un oligodesoxinucleótido de cadena sencilla (ODNcs) que sirviera como molde en el proceso de reparación del daño de doble cadena inducido por la *Cas9*. Para ello se utilizó la herramienta *online* de *Integrated DNA technologies*. Este ODNcs se diseñó con dos brazos de homología de unos 90 nucleótidos a cada lado del nucleótido que se pretende editar, en el caso de la variante patogénica c.2392T>C el nucleótido en cuestión fue una timina (T). Además, para facilitar el suceso de reparación mediante homología directa se empleó un potenciador comercial, Alt-R™ HDR Enhancer V2 (IDT, 10007910), que se añadió en el momento de la nucleofección.

6.3 Nucleofección

Cuando los cultivos están aproximadamente a un 70% de confluencia se puede comenzar el protocolo de nucleofección. Este proceso se lleva a cabo empleando el kit de la casa comercial Lonza™ P3 *Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit L* (Lonza, 13429329). Es importante asegurarse de que los cultivos presenten buen aspecto y que las células hayan sido pasadas entre 3 y 5 días antes de la nucleofección. En primer lugar las células se tratan con Rock *inhibitor* a una concentración de 10 µM durante dos horas. Durante este tiempo se preparan los reactivos que se van a utilizar en la nucleofección. Para formar los complejos de las guías (ARNg) se resuspende tanto el ARNcr como

el ARNtracr en solución IDTE (IDT, 11-05-01-05) a una concentración final de 200 μM y se mezclan en concentraciones equimolares hasta una concentración final de 45 μM con *dúplex buffer* libre de nucleasas (IDT, 11-05-01-12). A continuación se anillan los complejos de las guías calentándolos a 95 °C durante 2 minutos y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Por otra parte se prepara la solución de nucleofección compuesta por 82 μl de buffer P3 y 18 μl de suplemento, proporcionados en el kit de nucleofección (Lonza, 13429329). Por último se forman las ribonucleoproteínas (RNPs) combinando 2 μl de la nucleasa de alta fidelidad Alt-R® *S.p.* Cas9 Nuclease (IDT, 1081058) con 5 μl los complejos guías (ARNg) y 3 μl de PBS 1x.

Transcurridas las 2 h de incubación con Rock *inhibitor*, las células se levantan con acutasa y se centrifugan a 300 g durante 5 min. El precipitado celular se resuspende en 1 ml de medio mTeSR™1 con Rock *inhibitor* a 10 μM y Alt-R™ HDR Enhancer V2 (IDT, 10007910) y se cuentan las células. A continuación se separan $1 \cdot 10^6$ células en un tubo Eppendorf y se centrifugan a 300 g durante 5 min. El sedimento celular se resuspende en la solución de nucleofección preparada anteriormente y se añaden las RNPs y 500 pmol del oligonucleótido de edición (ODNcs). Las células se transfieren cuidadosamente a la cubeta de nucleofección y se electroporan siguiendo el programa CA-137 del Nucleofector-4D (Lonza). Las células nucleofectadas se plaquean en dos pocillos de P6 previamente preparados con Matrigel y medio mTeSR™1 con Rock *inhibitor* a 10 μM y el potenciador *Alt-R™ HDR Enhancer V2* a 1 μM . Tras 24 h de incubación a 37 °C y 5% de CO₂ se cambia el medio a mTeSR™1 sin Rock *inhibitor* y se renueva diariamente hasta que las células alcancen aproximadamente un 70% de confluencia. Un pocillo de la P6 se levanta con ReleSR™ y se centrifuga a 300 g durante 5 minutos. Del precipitado celular se extrae ADN genómico, que se utilizará para calcular la eficiencia de corte (ver apartado 6.4) o calcular el porcentaje de edición (ver apartado 6.5). El otro pocillo de P6 se utiliza para realizar el subclonaje de los clones (ver apartado 6.6).

6.4 Ensayo de eficiencia de corte con la T7 endonucleasa I

Una vez seleccionadas las dos mejores guías posibles para la variante patológica c.2392T>C, p.Trp798Arg en el gen *PYGM* se calcula el porcentaje de eficiencia de corte de cada guía mediante un ensayo con la T7 endonucleasa I (T7EI). Para ello se realiza una nucleofección de las iPSCs, tal y como se describe en la sección 6.3, sin la adición del oligonucleótido de edición. Seguidamente, con 1 μl del ADN extraído del conjunto de células nucleofectadas, se realiza una PCR para amplificar la región de interés con los cebadores y las condiciones de PCR detallados en la tabla 15.

Cebadores (5'-3')	Condiciones de PCR
W798R edit Fw GCAGGCTTGGCCCTTGACCT	95°C 2 min
W798R edit Rv ACCCTCTGCATGAGGTGC	95°C 30 s
	62°C 1 min X 35 ciclos
Tamaño amplicón: 448 pb	72°C 17 s
	72°C 5 min

Tabla 15: Condiciones de PCR y cebadores utilizados para amplificar la región editada tras la edición con CRISPR/Cas9.

El producto de PCR se corre en un gel de agarosa al 0,8% y se realiza una purificación de las bandas amplificadas utilizando el kit de purificación *NZYGelpure* (NZYTech, MB01102). A continuación, se cuantifica la cantidad de ADN en un espectrofotómetro NanoDrop™ One (ThermoFisher) y se incuban 200 ng de producto purificado de PCR con el buffer de la enzima *T7 endonuclease I* (NewEngland Biolabs, M0302L) y agua con las siguientes condiciones: 5 minutos a 95 °C, rampa de temperaturas hasta 85 °C a razón de -2 °C por segundo y para finalizar una rampa de temperaturas hasta 25 °C a razón de -0,1 °C por segundo. Durante la etapa final de incubación a 4 °C se añade la enzima T7 y se incuba 20 minutos a 37 °C. La reacción se para añadiendo 2 µl de EDTA 0,25 M y se corre el producto de la reacción en un gel de poliacrilamida al 10%.

El porcentaje de eficiencia de corte se calcula utilizando la herramienta “*Label Peaks*” del programa de procesamiento de imágenes *ImageJ*. Para estimar la eficiencia de corte (porcentaje de modificaciones) se emplea la siguiente fórmula [119], donde la fracción cortada (F_{cut}) es igual a la suma de las intensidades de las bandas digeridas entre la suma de la intensidad total de las bandas:

$$\% \text{ modificaciones} = 100 \times [1 - \sqrt{(1 - F_{cut})}]$$

6.5 Eficiencia de edición

El cálculo del porcentaje de eficiencia de edición se realiza de forma similar al ensayo de la T7E1. En este caso se extrae ADN genómico del cultivo de células obtenido tras la edición y se realiza una PCR con las condiciones y el oligonucleótido Rv listados en la tabla 15. El oligonucleótido Fw empleado en este caso es el siguiente: 5'-CAGGGCTTTGGTGGCCCT-3'.

Se corre 1 µl del producto de PCR en un gel de agarosa al 2% para verificar que la PCR se ha realizado correctamente y el resto se purifica. Con el producto purificado se realiza un ensayo de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) incubando con la enzima *BstXI* (NewEngland Biolabs, R0113L) durante 1 h a 37 °C. Con el resultado se corre de nuevo un gel de agarosa al 2% y se calcula el porcentaje de eficiencia de edición como se describe en el apartado anterior.

6.6 Subclonaje y aislamiento de clones

Cuando el cultivo de células editadas presenta alrededor de un 70% de confluencia se realiza un lavado con PBS 1x y se trata con acutasa para llevarlo a célula única. Tras una centrifugación a 300 g durante 5 minutos el sedimento de células se resuspende en 1 ml de medio mTeSR™1 suplementado con CloneR™ (Stemcell technologies, 05888). Este reactivo es un suplemento comercial diseñado para aumentar la eficiencia de clonación y mejorar la supervivencia de células individuales. Seguidamente se cuentan las células y se plaquean $1 \cdot 10^3$ células en una placa P100 tratada con Matrigel, medio mTeSR™1 y CloneR™ y se incuba durante 48 h sin cambio de medio. Los días posteriores se realizan cambios de medio mTeSR™1 sin CloneR™, observando cuidadosamente el cultivo para asegurarse de que las colonias seleccionadas para el subclonaje vengan de una sola célula y que tengan aspecto redondeado y compacto con bordes definidos. Cuando las colonias alcanzan un tamaño aproximado de 1-2 mm

de diámetro se procede al aislamiento de clones individuales. Para ello, previamente se preparan dos placas de cultivo P96 con Matrigel y 100 μ l de medio mTeSRTM1 con Rock *inhibitor* a 10 μ M y una placa de P96 con fondo en U sin Matrigel con 100 μ l de mTeSRTM1 y Rock *inhibitor* a 10 μ M. Cada colonia seleccionada se disgrega mecánicamente con la ayuda de un Stripper con un capilar acoplado y se transfiere a un pocillo de la placa P96 con fondo en U preparada anteriormente. A continuación se trituran los fragmentos de colonias pipeteando arriba y abajo entre 3 y 4 veces y se transfieren 50 μ l a cada placa de P96 con el objetivo de tener dos réplicas, una que será empleada para genotipar y la otra para expandir y congelar los clones editados y aislados.

6.7 Genotipado y selección de clones editados

En el momento en que la placa P96 de clones destinada al genotipado alcanza un 80% de confluencia se lisan las células empleando tampón de lisis *Yolk Sac* (10mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2mM MgCl₂, 0,45% IGEPAL y 0,45% Tween-20) suplementado con proteinasa K (Qiagen, 19131), tal y como se describe en el protocolo de Bruntraeguer y colaboradores [118]. Con los lisados celulares obtenidos se realiza una PCR, una purificación y un ensayo RFLP con las mismas condiciones utilizadas para el cálculo de la eficiencia de edición. Los clones editados, identificados en el ensayo de RFLP, se secuencian en un analizador ABI 3730 para confirmar que la edición ha tenido lugar de forma correcta (Applied Biosystems).

6.8 Congelación de clones

Cuando los clones aislados alcanzan un tamaño adecuado, aproximadamente en 8 o 10 días, la placa P96 se procesa para ser congelada. Para ello se realiza primero un lavado con PBS 1x y después se añade acutasa durante 6 min a 37 °C. Tras este tiempo se añaden 75 μ l por pocillo de *Knock-Out Serum Replacement* para detener la reacción de la acutasa y se trituran los clones un par de veces. A continuación se añaden 100 μ l más de *Knock-Out Serum Replacement* con 20% DMSO y se transfiere el contenido de cada pocillo a una placa de congelación (ThermoFisher, 3712-11). Para sellar la placa de congelación se añade aceite mineral (Sigma Aldrich, M8410-100ML) en los pocillos y, una vez sellada, se lleva al contenedor de -80 °C. Tras 24 h la placa se almacenan en nitrógeno líquido hasta el momento de ser utilizadas.

RESULTADOS

1. Generación y caracterización de las líneas de iPSCs

La generación de las iPSCs se llevó a cabo a partir de PBMCs obtenidas de una muestra de sangre periférica de una paciente con la enfermedad de McArdle portadora de la variante patogénica en homocigosis en el gen *PYGM*, NM_005609.4: c.2392T>C; p.Trp798Arg (Figura 9).

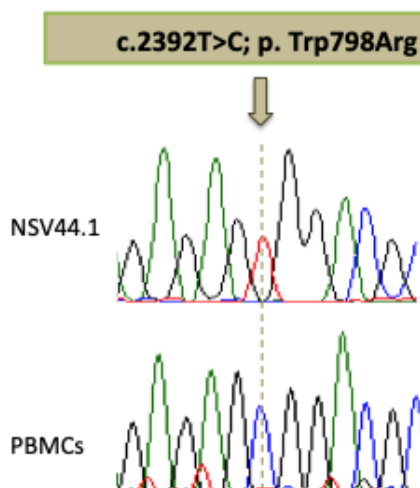


Figura 9. Secuenciación por el método de Sanger de ADN genómico amplificado por PCR de un control (NSV44.1) y de una paciente con enfermedad de McArdle, portadora de la variante patogénica en el gen *PYGM*, NM_005609.4: c.2392T>C; p.Trp798Arg. En los electroferogramas se muestra la presencia de la variante patogénica c.2392T>C; p.Trp798Arg en el fragmento de PCR amplificado de la paciente y su ausencia en el control NSV44.1 que no tienen esta variante.

Las PBMCs de la paciente se aislaron y reprogramaron siguiendo los métodos descritos en el apartado 1 de la sección de Materiales y Métodos. Para la reprogramación celular se ha empleado un método no integrativo basado en la utilización de virus Sendai para la liberación en el interior de las células de los factores de reprogramación de Yamanaka: KOS (Klf4–Oct3/4–Sox2), cMyc y Klf4. Además, la reprogramación se ha llevado a cabo utilizando un protocolo *feeder-free*, es decir, sin utilizar células alimentadoras como soporte. Cuando aparecieron las colonias de iPSCs se marcaron y monitorizaron durante los días posteriores hasta que su tamaño permitió que fueran picadas mediante disgregación mecánica y expandidas como clones independientes. Por su morfología y su comportamiento al crecer en cultivo, se seleccionaron dos clones de iPSCs de entre los más de 40 que se obtuvieron en el proceso de reprogramación. Estos clones denominados McA2.7 y McA2.31 fueron expandidos y se sometieron a una batería estandarizada de pruebas para comprobar su calidad y pluripotencia.

1.1 Pruebas de pluripotencia

1.1.1 Ensayo de actividad de la fosfatasa alcalina

El análisis de la actividad de la fosfatasa alcalina es una de las pruebas rápidas clásicas que se llevan a cabo para comprobar que las líneas de iPSCs generadas son pluripotentes. Las colonias de las líneas McA2.7 y McA2.31 analizadas eran compactas y tenían una morfología típica de células madre embrionarias presentando bordes definidos y una alta relación núcleo/citoplasma (Figura 10 A y B). Como se puede observar en la Figura 10 C y D ambos clones mostraron una tinción azul, indicando una actividad fosfatasa alcalina positiva.

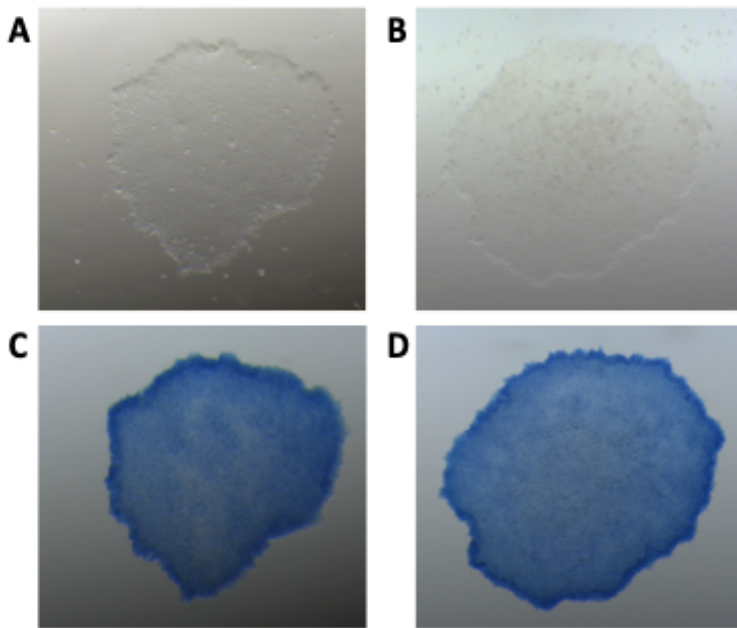


Figura 10. Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina en las iPSCs generadas. Imágenes de microscopía en campo claro en las que se muestra como las iPSCs McA2.7 (A) y McA2.31 (B) tienen una morfología característica de células madre embrionarias con los bordes definidos típicos de este tipo de células y una alta relación núcleo/citoplasma. Además, se observa actividad fosfatasa alcalina positiva (tinción azul) en las líneas McA2.7 (C) y McA2.31 (D).

1.1.2 Cuantificación de la expresión de genes de pluripotencia

Mediante PCR cuantitativa a tiempo real se analizó y cuantificó la expresión de los genes asociados a pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *CRIPTO* y *NANOG*. La expresión relativa de dichos genes en las iPSCs generadas McA2.7 y McA2.31 se comparó tanto con las PBMCs de partida como con la línea comercial de células madre embrionarias H9 (Celprogen, 36101). Como se puede observar en la figura 11, las líneas de iPSCs de McA2.7 y McA2.31 presentaban un perfil de expresión similar al de la línea de células madre embrionarias comercial H9. Además, existe un aumento de la expresión de los marcadores de pluripotencia analizados de estas tres líneas con respecto a las PBMCs de partida, que no los expresan.

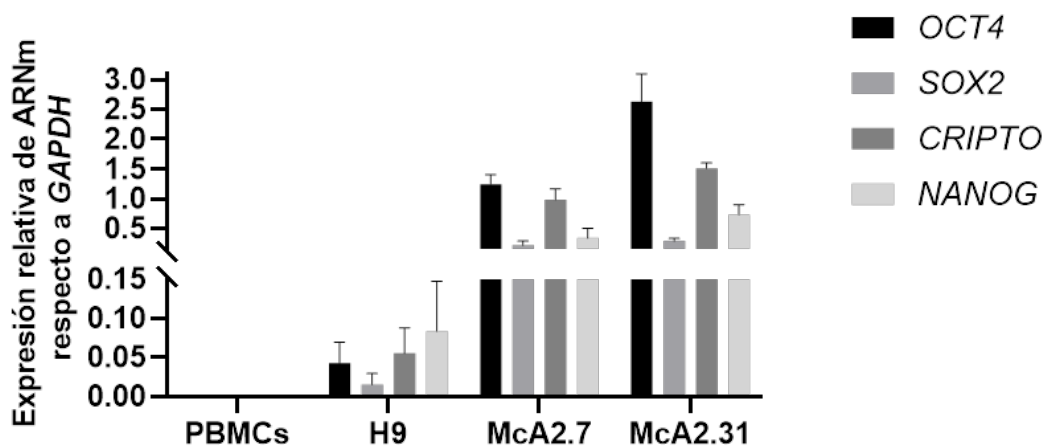
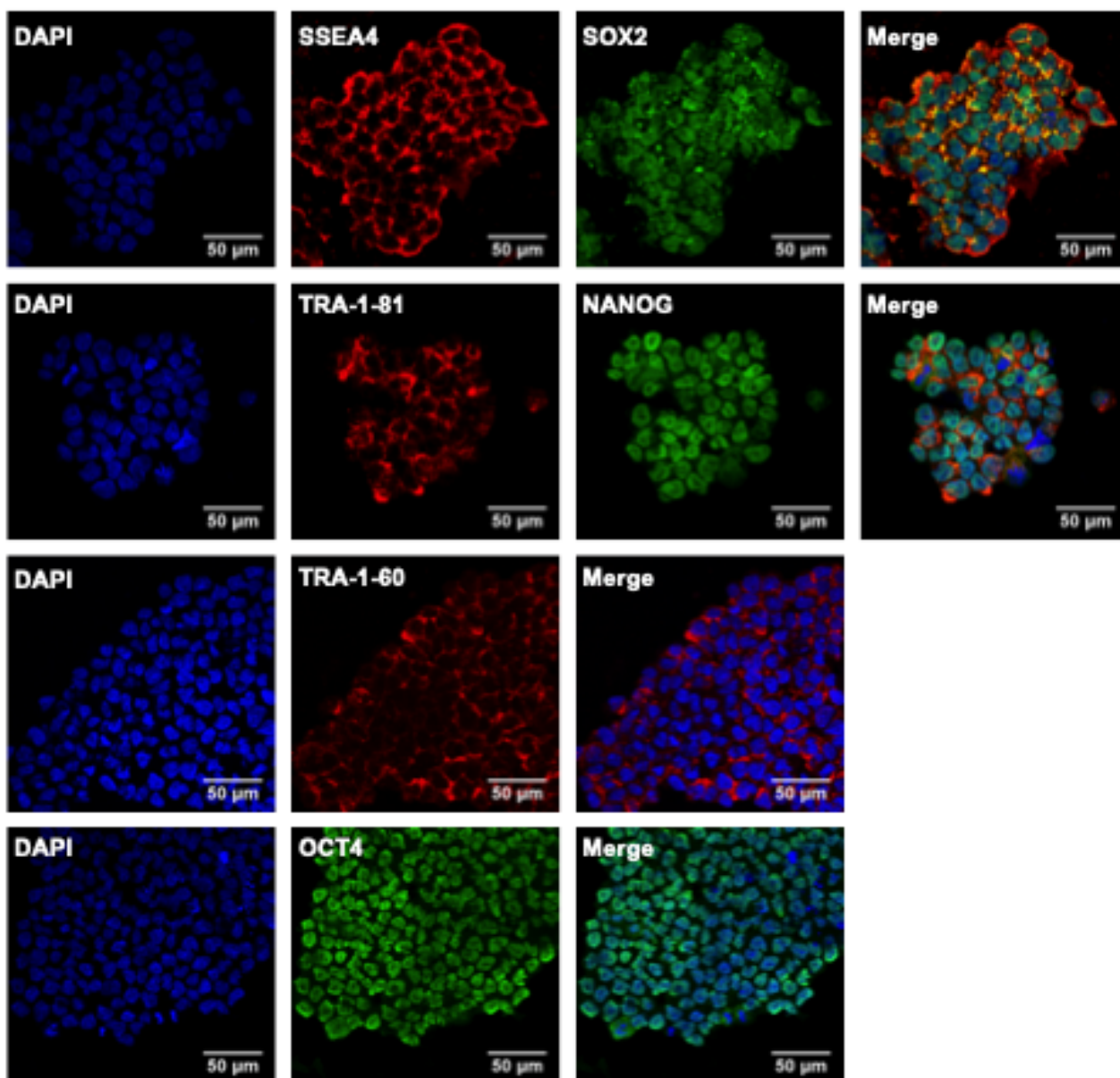


Figura 11. Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de los genes de pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *CRIPTO* y *NANOG*. Representación de los valores obtenidos en las PBMCs, la línea de células madre embrionarias H9 y las líneas de iPSCs generadas, McA2.7 y McA2.31. Los valores representan la media de al menos tres réplicas independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

1.1.3 Análisis por inmunofluorescencia de marcadores de pluripotencia

De manera paralela se realizó un ensayo de inmunocitoquímica en las iPSCs generadas para comprobar de forma cualitativa la expresión de marcadores de pluripotencia. Como se puede observar en la figura 12, todas las líneas de iPSCs generadas muestran un marcaje positivo de los marcadores de superficie típicos de células madre embrionarias: SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 y de los factores de transcripción: NANOG, SOX2 y OCT4.

A

B

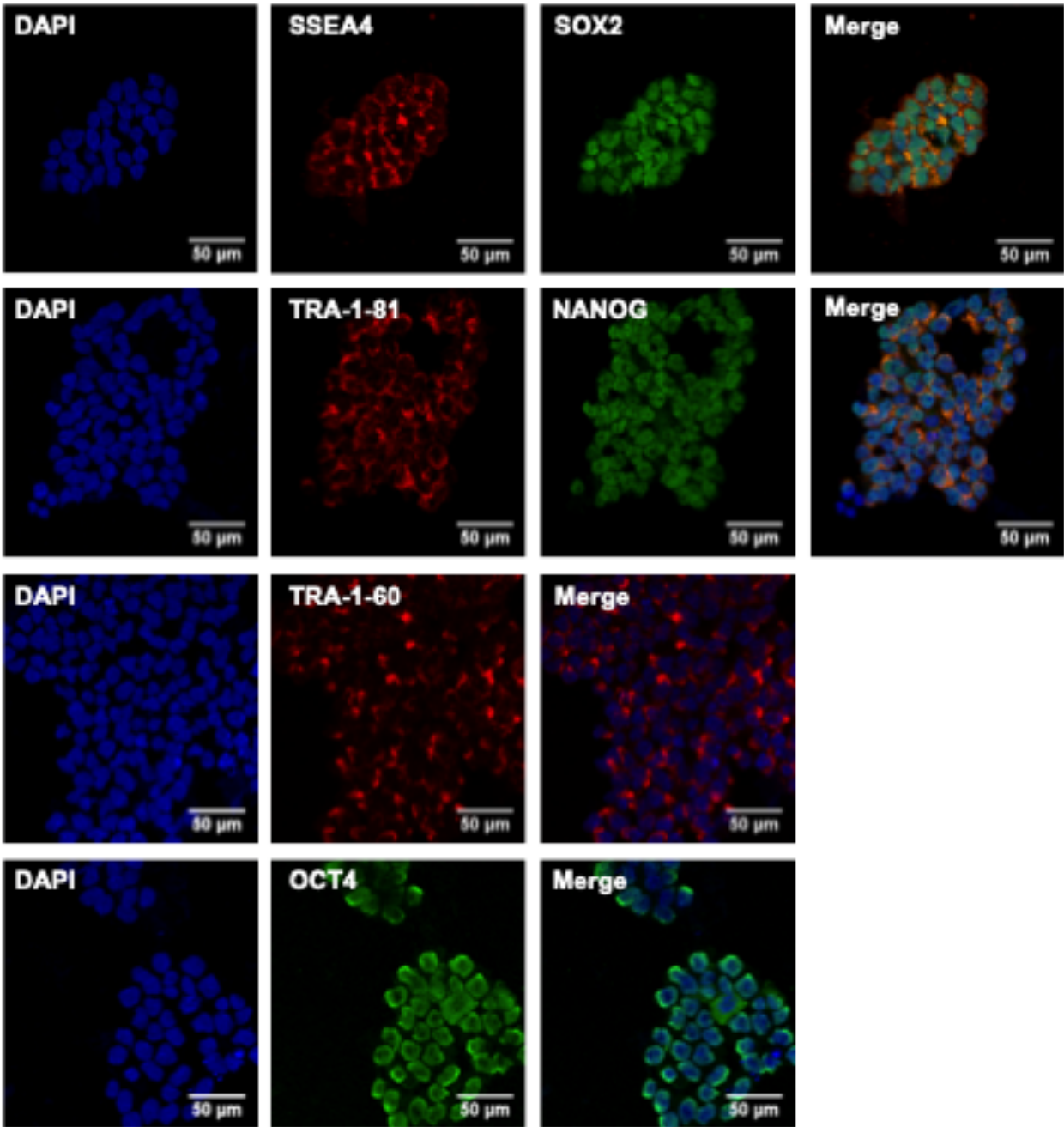


Figura 12. Análisis mediante inmunofluorescencia de marcadores de pluripotencia. En la figura se muestran las imágenes de microscopía confocal adquiridas en el análisis por inmunofluorescencia de los marcadores de superficie: SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 y los factores de transcripción: NANOG, SOX2 y OCT4 en las líneas McA2.7 (A) y McA2.31 (B). Ambas líneas presentan un marcaje positivo para todos los marcadores analizados. Barras de escala: 50 µm.

1.1.4 Ensayo de diferenciación *in vitro*

Una forma inequívoca de confirmar la pluripotencia de las iPSCs generadas, desde un punto de vista funcional, es estudiar su potencial de diferenciación hacia linajes de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo). Para ello se llevó a cabo un ensayo de diferenciación *in vitro* de las iPSCs generadas, para lo cual primero se generaron cuerpos embrionarios mediante agregación forzada y después se realizó una diferenciación espontánea hacia endodermo, mesodermo y ectodermo. Como se puede observar en la figura 13, los ensayos de inmunofluorescencia llevados a cabo muestran que las líneas de iPSCs McA2.7 y McA2.31 eran capaces de diferenciarse a endodermo (marcaje positivo para α -fetoproteína, AFP), a mesodermo (marcaje positivo para la α -actina de músculo liso, SMA) y hacia ectodermo (marcaje positivo para β -tubulina, Tuj1).

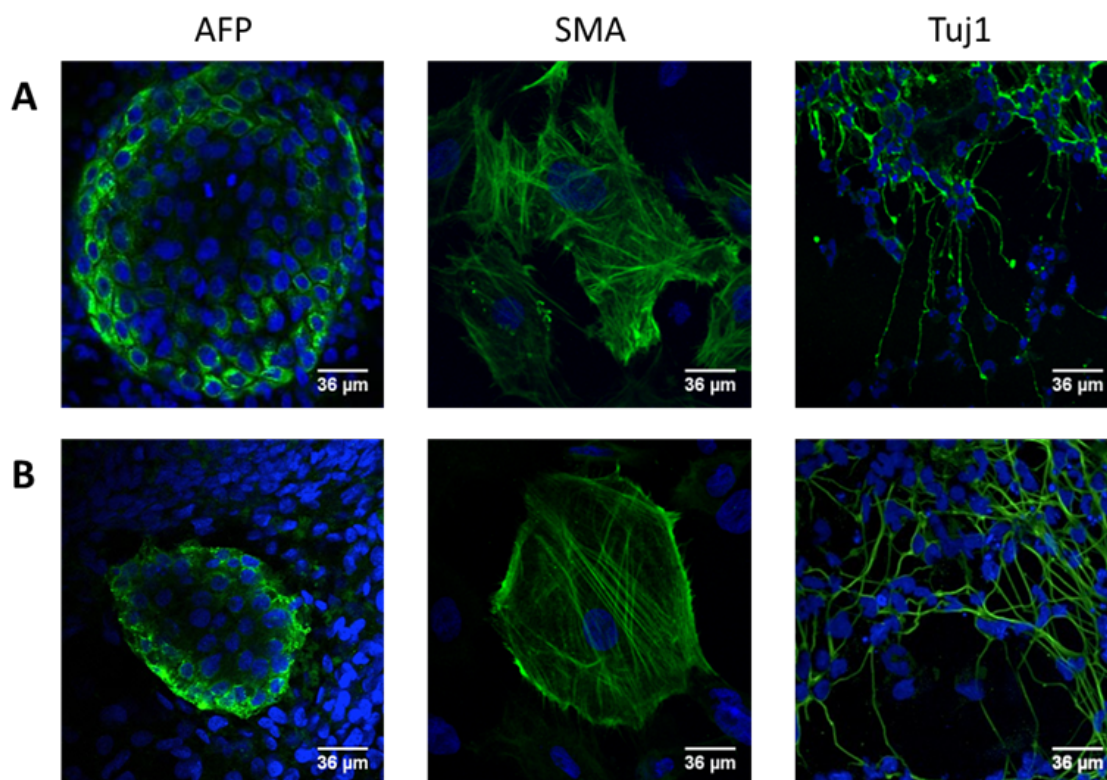


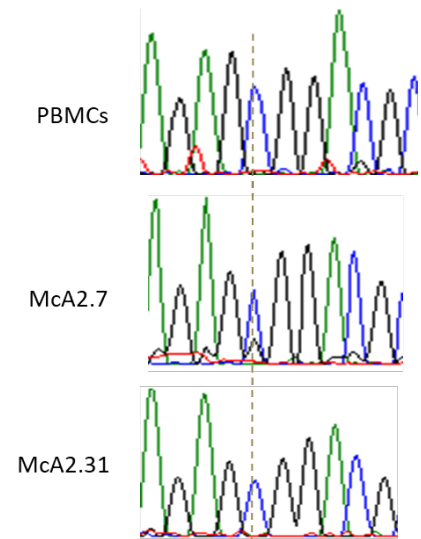
Figura 13. Análisis de inmunofluorescencia de los resultados obtenidos en el ensayo de diferenciación *in vitro*. Imágenes de microscopía confocal que muestran marcaje positivo para los marcadores característicos de endodermo (α -fetoproteína, AFP), mesodermo (α -actina de músculo liso, SMA) y ectodermo (β -tubulina, Tuj1) tanto en la línea de iPSCs McA2.7 (A) como en McA2.31 (B). Barras de escala: 36 μ m.

1.2 Pruebas de calidad e integridad de las líneas de iPSCs

1.2.1 Análisis de la presencia de la mutación en las iPSCs generadas

Para comprobar que las líneas de iPSCs McA2.7 y McA2.31 presentaban la mutación en homocigosis en el gen *PYGM*: c.2392T>C; p.Trp798Arg, al igual que las PBMCs de la paciente de partida, se llevó a cabo un análisis de secuenciación por el método de Sanger. En la Figura 14 se observa que las iPSCs generadas eran portadoras de la mutación presente en la paciente original.

Figura 14. Secuenciación por el método de Sanger para verificar que las líneas de iPSCs generadas presentan la variante patológica en el gen *PYGM*: c.2392T>C; p.Trp798Arg. En los electroferogramas obtenidos se muestra la presencia de la variante patológica c.2392T>C; p.Trp798Arg en las líneas de iPSCs McA2.7 y McA2.31, así como en las PBMCs de la paciente original.



1.2.2 Análisis del cariotipo

En los cultivos de iPSCs es frecuente que, en el propio proceso de reprogramación y con los pases sucesivos de las células, se acumulen anomalías cromosómicas que pueden alterar el correcto funcionamiento de la línea en experimentos posteriores. Con el fin de analizar si existían alteraciones cromosómicas en las líneas generadas se realizó, tras la reprogramación, un análisis del cariotipo. Para ello se analizaron al menos 20 metafases en cultivos con más de 20 pases y se concluyó que ambas líneas, tanto McA2.7 como McA2.31, presentaban un cariotipo normal (46, XX) (Figura 15). Además, estos análisis del cariotipo se repitieron de manera periódica durante su mantenimiento en cultivo y aplicaciones posteriores.

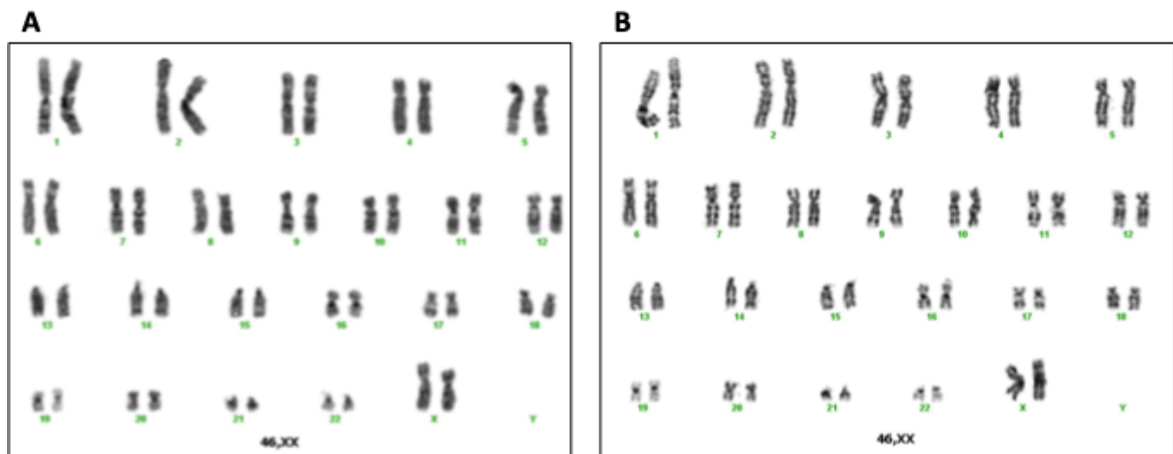


Figura 15. Análisis citogenético del cariotipo mediante bandejo G. Cariotipo de las líneas de iPSCs McA2.7 (A) y McA2.31 (B) realizado a partir de cultivos con 10 pases. Ambas líneas presentaron un cariotipo normal 46, XX, en todas las metafases analizadas.

1.2.3 Eliminación de los Virus Sendai

La tecnología no integrativa empleada para la generación de las iPSCs permite llevar a cabo la reprogramación a iPSCs mediante virus citoplasmáticos que tienen la peculiaridad de ser eliminados tras los pases sucesivos de cultivo. Para demostrar que las iPSCs han eliminado los vectores de reprogramación empleados (SeV, KOS, Klf4 y c-Myc) se realizó un análisis mediante RT-PCR utilizando iPSCs con 8 pases en cultivo. El análisis realizado permitió confirmar que ninguna de las líneas generadas amplifica las regiones analizadas del genoma del virus, mostrando así la ausencia de virus Sendai en su citoplasma.

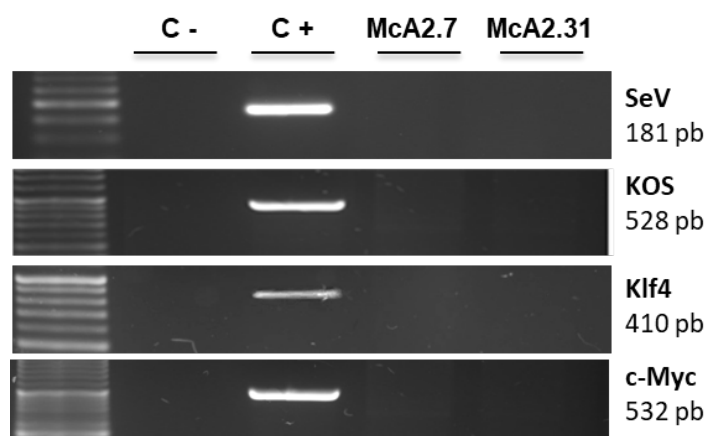


Figura 16. Análisis de comprobación de eliminación de los Virus Sendai. Imagen de un gel de agarosa al 2 % en el que se visualiza el producto de las PCRs realizadas para la comprobación de la eliminación de los vectores de reprogramación con los pases de cultivo. C+: Control positivo, el molde utilizado para la PCR es ADNc obtenido por retrotranscripción a partir de ARN procedente de iPSCs recogidas un día después de la transducción; C-: Control negativo, H₂O. Los resultados obtenidos muestran que en ninguna de las líneas de iPSCs generadas (McA2.7 y McA2.31) existe amplificación del genoma del *virus Sendai* ni de las regiones amplificadas de los transgenes introducidos (KOS, Klf4 y cMyc).

1.2.4 Estudio de la huella genética

Para confirmar que las líneas de iPSCs generadas procedían de las PBMCs de partida se llevó a cabo un estudio de la huella genética mediante un análisis de fragmentos de algunos marcadores microsatélites localizados a lo largo del genoma. Los marcadores analizados fueron seleccionados por presentar un alto porcentaje de heterocigosidad en la población. Como marcador para la determinación del sexo se eligió el gen de la amelogenina. En la tabla 16 se muestra el número de repeticiones de cada marcador analizado y se puede ver que tanto las líneas de iPSCs generadas como las PBMCs de partida tienen el mismo número de repeticiones, lo que indica que las iPSCs McA2.7 y McA2.31 proceden de las PBMCs originales.

	PBMCs		McA2.7		McA2.31	
Amelogenina	X	X	X	X	X	X
D2S1338	180	192	180	192	180	192
D7S820	214	218	214	218	214	218
D8S1179	172	180	172	180	172	180
D13S317	182	190	182	190	182	190
D19S433	199	204	199	204	199	204
D21S11	227	233	227	233	227	233
VWA	141	154	141	154	141	154

Tabla 16. Estudio de huella genética mediante análisis de fragmentos en las PBMCs de partida y en las líneas de iPSCs generadas McA2.7 y McA2.31. Se analizaron los siguientes marcadores: D2S1338, D7S820, D8S1179, D13S317, D19S433, D21S11 y VWA, junto con amelogenina para la determinación del sexo. La tabla refleja la coincidencia en todos los casos en el número de repeticiones para cada fragmento analizado, confirmando que las iPSCs generadas proceden de las PBMCs originales.

1.2.5 Ausencia de micoplasma

En los cuartos de cultivos suelen ser bastante frecuentes las contaminaciones por micoplasma, hecho que puede afectar negativamente al crecimiento y diferenciación de las iPSCs. Por esta razón, tras la generación de las iPSCs y también de manera periódica, se comprueba en todas las líneas generadas que no existe contaminación por micoplasma mediante un ensayo de amplificación por PCR, empleando como control positivo una muestra de ADN obtenido a partir de un cultivo contaminado por micoplasma. Como se puede ver en la figura 17, no se observa amplificación del fragmento del genoma de micoplasma analizado en las líneas de iPSCs McA2.7 y McA2.31 lo que indica que estas líneas no presentan contaminación por micoplasma.

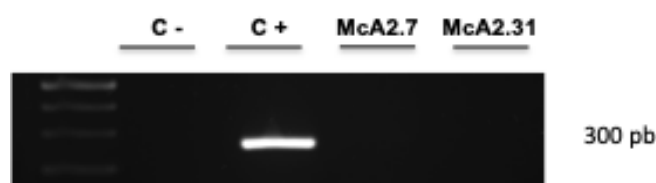


Figura 17. Comprobación mediante PCR de la ausencia de micoplasma en las líneas de iPSCs McA2.7 y McA2.31. Imagen de un gel de agarosa al 2% en el que se corren los productos de la PCR. C-: Control negativo, H₂O. C+: Control positivo, muestra contaminada por micoplasma. La ausencia de amplificación en las muestras McA2.7 y McA2.31 indica que no existe contaminación por micoplasma, al contrario que en el control positivo, en el que se puede apreciar una banda de 300 pb que corresponde a la amplificación de un fragmento del genoma de micoplasma.

2. Diferenciación a músculo esquelético

Con el objetivo de crear un modelo celular humano de la enfermedad de McArdle del tipo celular clásico afectado en los pacientes, las células iPSCs generadas se diferenciaron a músculo esquelético siguiendo una combinación de protocolos tal y como se detalla en el apartado 3 de la sección materiales y métodos. El proceso de diferenciación se compone de tres etapas: generación de progenitores miogénicos (diferenciación primaria), expansión y congelación de progenitores y obtención de músculo esquelético maduro funcional (diferenciación secundaria o final). La figura 18 muestra una representación esquemática del protocolo utilizado para diferenciar a músculo esquelético en esta tesis doctoral.

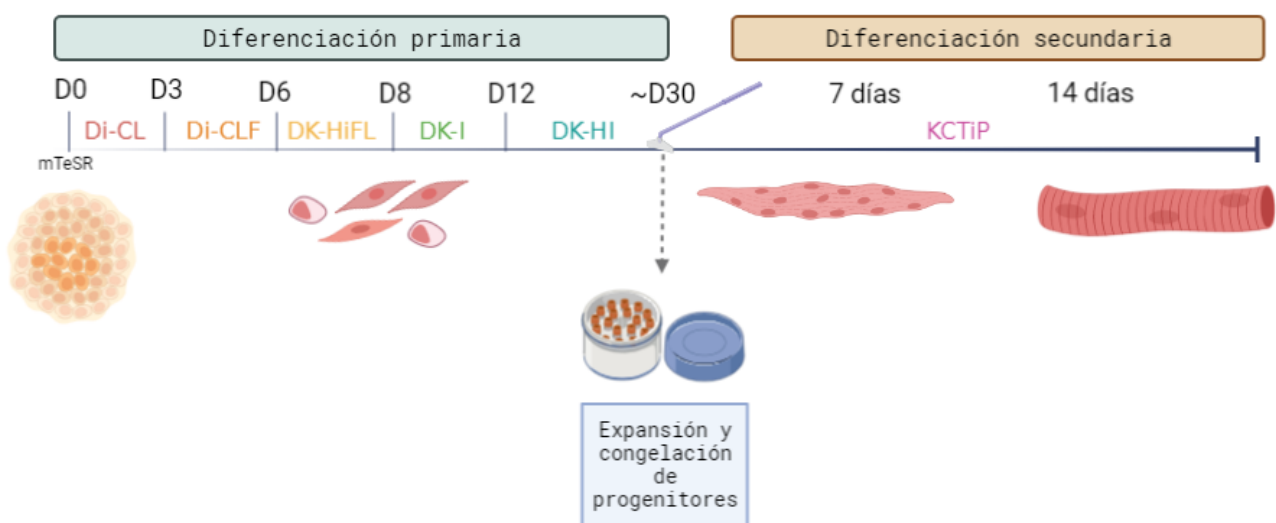


Figura 18. Representación esquemática del protocolo de diferenciación a músculo esquelético. El proceso de diferenciación se compone de dos partes fundamentales: la diferenciación primaria comprende desde el inicio del protocolo partiendo de iPSCs hasta el día 30. Durante este periodo de tiempo se realizan cambios de medio de cultivo sucesivos con los medios denominados Di-CL, Di-CLF, DK-HiFL, DK-I y DK-HI. La composición de los medios se detalla en la tabla 10 de materiales y métodos. La segunda parte del protocolo consiste en la diferenciación secundaria o final desde mioblastos hasta la formación de fibras de músculo esquelético maduro, durante este tiempo se emplea el medio de diferenciación final KCTiP, detallado en la tabla 12. La expansión y congelación de progenitores se puede realizar a partir del día 30 empleando el medio de cultivo VkGM, cuya composición aparece detallada en la tabla 11.

2.1 Diferenciación primaria

Las líneas de iPSCs derivadas de la paciente con enfermedad de McArdle (McA2.7 y McA2.31) y la línea de iPSCs control NSV44.1 se diferenciaron a progenitores miogénicos siguiendo el protocolo descrito por Chal y colaboradores [82]. Para ello se sembraron 120.000 células/cm² en placas de cultivo de 6 y 12 pocillos y se realizaron cambios de medio en los días oportunos, tal y como se detalla en el apartado 3.1 de la sección materiales y métodos. El proceso de diferenciación desde iPSCs a célula miogénica se monitorizó mediante visualización al microscopio y se tomaron fotografías de los cultivos en los días 0, 8, 16 y 24 (Figura 19).

A día 0 se observa una morfología típica de iPSCs con colonias compactas y bordes redondeados. A partir del día 8 se comienzan a observar células redondeadas con morfología de progenitores saliendo del borde de agrupaciones celulares de origen mesodérmico (flecha naranja). En los días sucesivos las células comienzan a dirigirse hacia mesodermo paraxial, adquiriendo una morfología ovalada el día 16. Tras 24 días de diferenciación, las células presentan una forma más alargada (flecha verde) y se disponen de forma circular alrededor de acúmulos más oscuros, que corresponden a un conjunto de células todavía indiferenciadas.

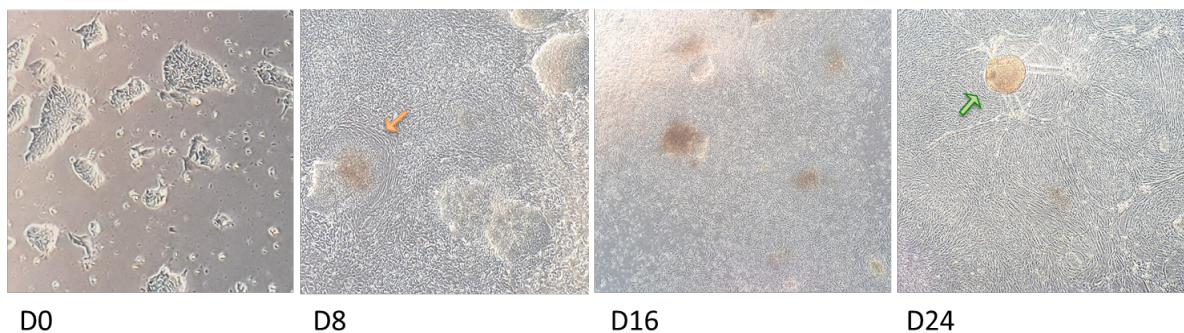


Figura 19. Diferenciación primaria a progenitores miogénicos. Fotografías tomadas durante el proceso de diferenciación primaria a los días 0, 8, 16 y 24 donde se aprecia el cambio de morfología desde iPSCs hasta progenitores miogénicos, primero más redondeados (flecha naranja) y luego más alargados (flecha verde). Objetivo 10x.

2.1.1 Cuantificación de la expresión de marcadores miogénicos de la diferenciación primaria

Paralelamente, se evaluó mediante qPCR la expresión de una batería de genes específicos miogénicos a días 0, 8, 16 y 24 de la diferenciación primaria. Como se puede observar en la figura 20, a día 0 no se detectó expresión de dichos genes ya que los cultivos en ese momento eran totalmente de iPSCs. A día 8 comienza la expresión de *PAX3* que corresponde a un estadio de progenitores específicos del dermomiótomo, ya que *PAX3* codifica para factores de transcripción implicados en el desarrollo miogénico. A partir del día 16 continúa elevada la expresión de *PAX3* y comienza a expresarse *PAX7*, otro factor de regulación miogénico, que alcanza el pico máximo a día 24 en todas las líneas. A día 16 se observa también la expresión de otro factor de transcripción clave en la diferenciación miogénica, *MyoD1*, que aumenta a día 24. La expresión conjunta de estos factores, *PAX3*, *PAX7* y *MyoD1* es propia de los progenitores en división en la etapa de miogénesis temprana. Por último, se detectaron algunas isoformas de las cadenas pesadas de miosina *MyHC* (por sus siglas en inglés para *myosin heavy chain*), en concreto a día 24 se puede observar la expresión de la isoforma embrionaria *MYH3* y cómo comienza a expresarse la isoforma perinatal *MYH8*.

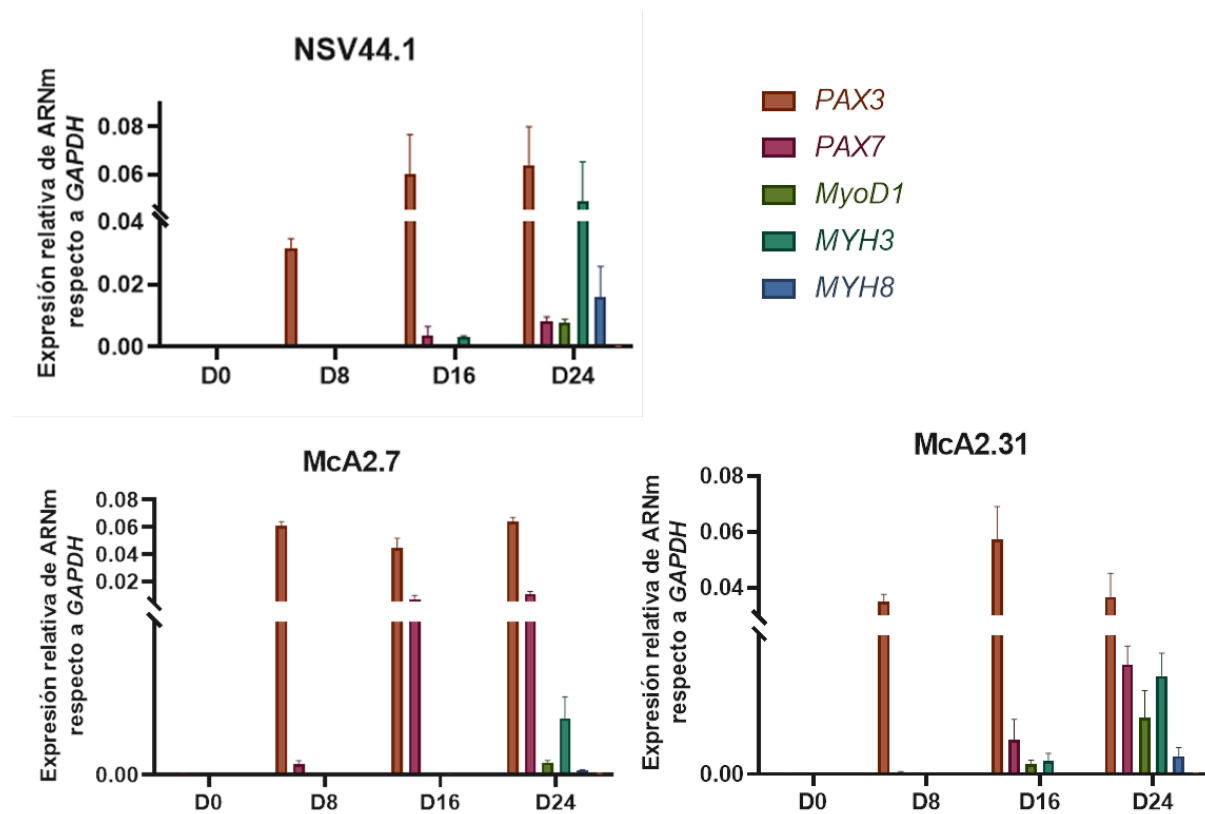


Figura 20. Análisis mediante qPCR de la expresión relativa de genes miogénicos durante la diferenciación primaria. Se analizaron los genes *PAX3*, *PAX7*, *MyoD1*, *MYH3* y *MYH8* a días 0, 8, 16 y 24 del proceso de diferenciación primaria a músculo esquelético. Los valores representan la media de tres réplicas independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

2.1.2 Caracterización de los progenitores miogénicos

A día 30 del proceso de diferenciación los cultivos miogénicos se disociaron y los progenitores se expandieron en el medio VkGM. En este punto del protocolo también se congelaron progenitores de todas las líneas de iPSCs diferenciadas a músculo esquelético. Mediante inmunocitoquímica se comprobó que los progenitores miogénicos obtenidos eran positivos para *PAX7*, marcador característico de mioblastos en división y células satélites (Figura 21A). Además, mediante una PCR a tiempo real se cuantificó la expresión de los genes *PAX3* y *PAX7* (Figura 21B). La expresión conjunta de estos marcadores es característica de una población de progenitores miogénicos que se mantienen en división y es crucial durante el desarrollo y la regeneración del músculo esquelético [120].

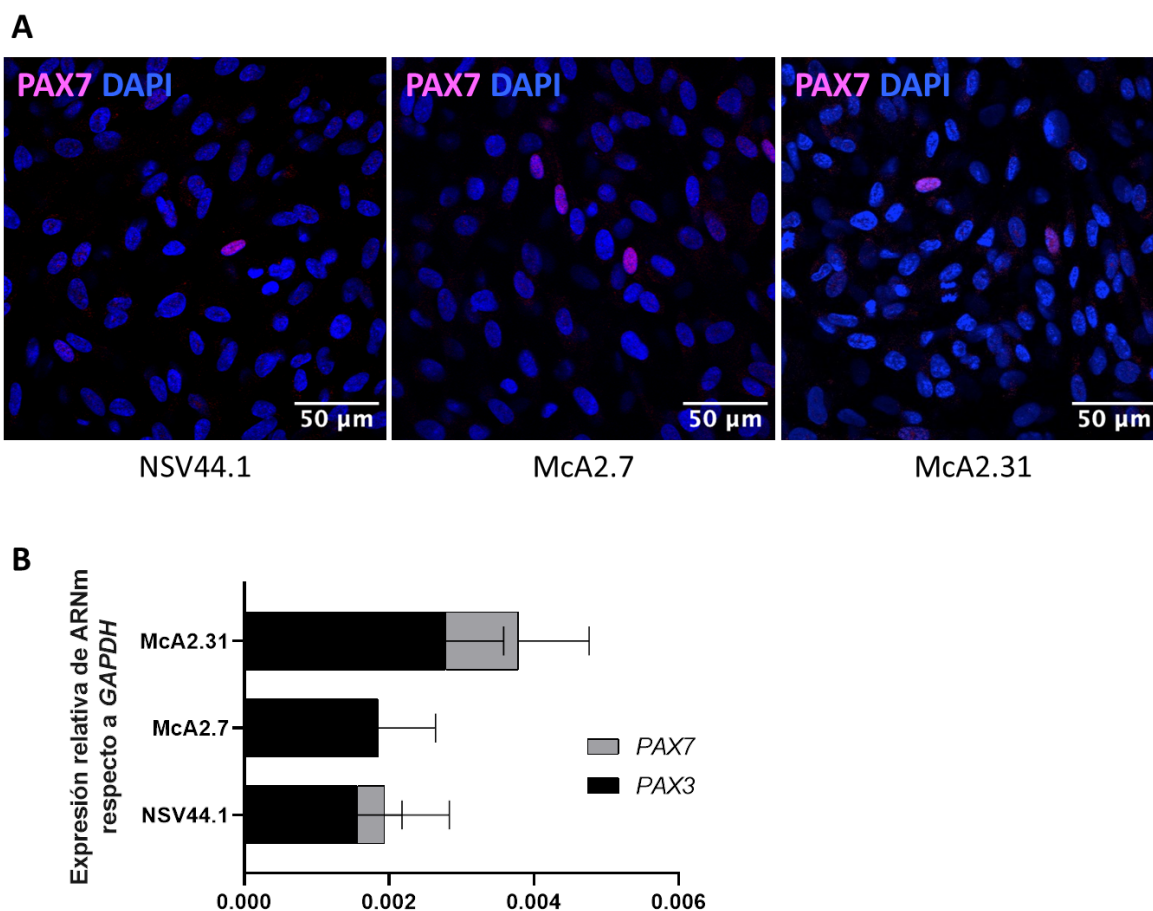


Figura 21. Progenitores miogénicos derivados de iPSCs. **A.** Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias realizadas para detectar el marcador nuclear PAX7. Barra de escala: 50 µm **B.** Diagrama de la expresión relativa de ARNm de PAX7 y PAX3 en las tres líneas de iPSCs diferenciadas a progenitores miogénicos, NSV44.1, McA2.7 y McA2.31. Los valores son representativos de al menos tres réplicas independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

2.2 Diferenciación secundaria o final

Para llevar a cabo la diferenciación final se siguió el protocolo descrito por Pourquié y colaboradores [116]. Para ello los precursores miogénicos se plaquearon a distintas densidades y se incubaron con medio VkgM hasta alcanzar aproximadamente un 90% de confluencia, tal y como se detalla en el apartado 3.2 de la sección materiales y métodos. En este punto se reemplaza el medio VkgM por el medio KCTiP para inducir la diferenciación final y los cultivos se mantuvieron 7 o 14 días en este medio. Durante dos semanas se observó el cambio de morfología que iba sucediendo en los cultivos desde el estadio de mioblastos, con una morfología redondeada, (Figura 22A) hasta el alargamiento y fusión de los mismos para la formación de miofibras, tanto a una semana de diferenciación final (Figura 22B) como a dos semanas (Figura 22C).

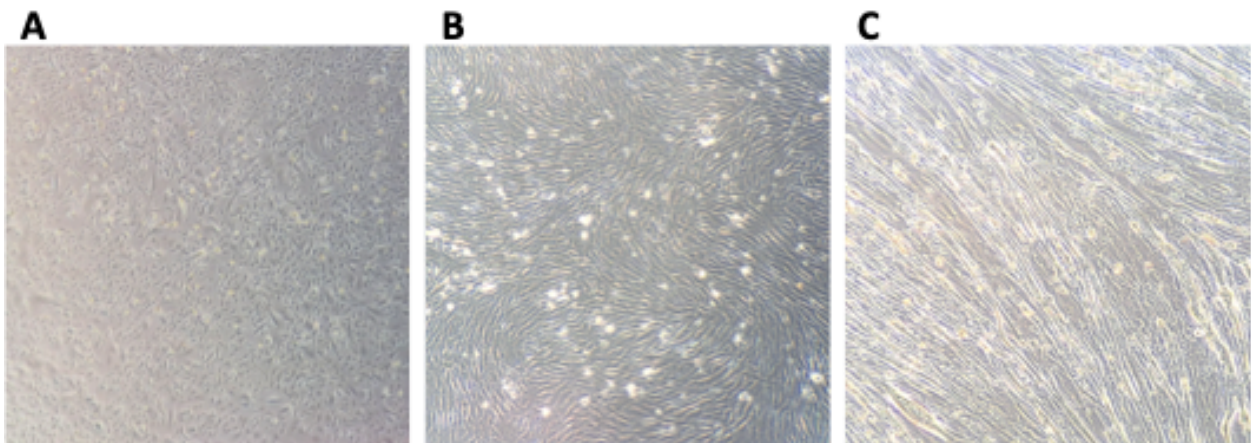


Figura 22. Imágenes de campo claro adquiridas al microscopio. A. Progenitores; **B.** Fibras a 1 semana de diferenciación en medio KCTiP; **C.** Fibras a 2 semanas de diferenciación final. Objetivo 40x.

2.2.1 Cuantificación de la expresión de marcadores miogénicos de la diferenciación final

A una y dos semanas de diferenciación secundaria se obtuvieron precipitados celulares de los cultivos miogénicos y se realizó un análisis de la expresión de genes característicos de fibras maduras mediante qPCR. Como se puede observar en la figura 23, las tres líneas diferenciadas presentan expresión de las isoformas de la cadena pesada de la miosina *MYH3* y *MYH8*. Por su parte, el marcador de fibras maduras de tipo rápido *MYH2* comienza a expresarse a las dos semanas de diferenciación final. Por último, tanto a una como a dos semanas de diferenciación final se puede observar un aumento de expresión de la proteína Titina (*TTN*), marcador característico del sarcómero de fibras maduras.

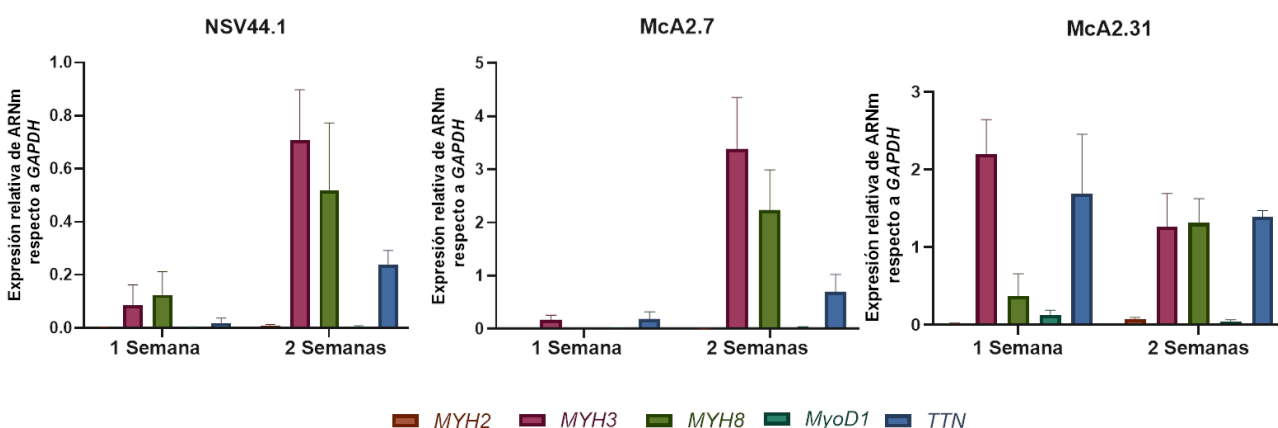


Figura 23. Análisis mediante qPCR de la expresión relativa de genes característicos de fibras adultas. Se analizaron los genes *MYH2*, *MYH3*, *MYH8*, *MyoD1* y *TTN* a una y dos semanas de diferenciación secundaria. Los valores son representativos de al menos tres réplicas independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

2.2.2 Caracterización mediante inmunofluorescencia de fibras de músculo esquelético

La presencia de proteínas típicas de fibras musculares en el músculo diferenciado se verificó mediante ensayos de inmunocitoquímica. En primer lugar pudimos observar cómo los mioblastos se iban fusionando para formar las miofibrillas y posteriormente la miofibra adulta. Esto se pone de manifiesto por la presencia de miofibras alargadas y multinucleadas, positivas para α -actinina (Figura 24A), cuyos núcleos eran positivos también para miogenina (Figura 24B), este último marcador fundamental para la regulación del desarrollo muscular. Además, se pueden observar fibras estriadas, positivas para MyHC (por sus siglas en inglés para *myosin heavy chain*) junto con células positivas para PAX7, marcador de células satélite (Figura 24C).

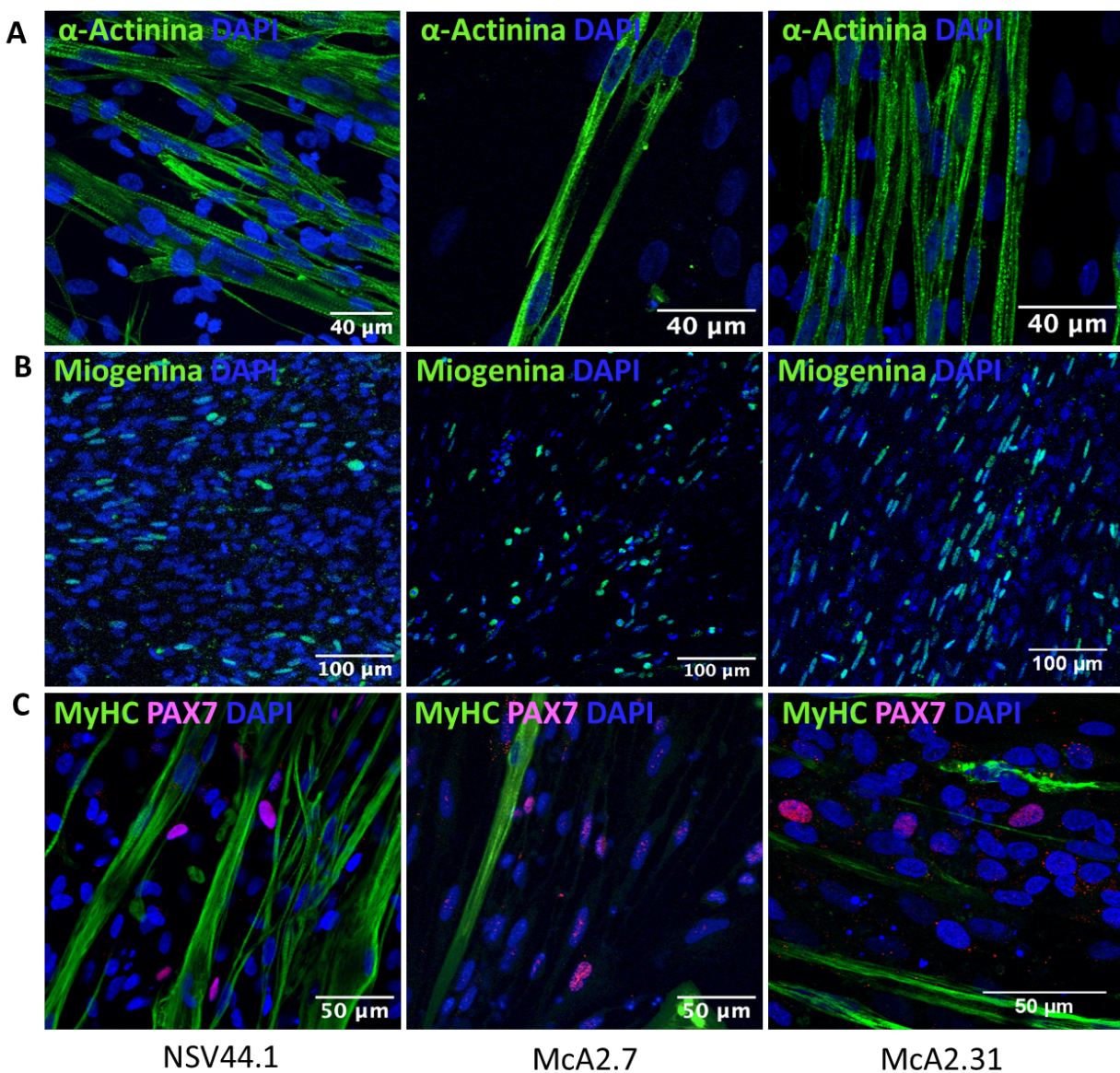


Figura 24. Imágenes de microscopía confocal de fibras musculares obtenidas por diferenciación de las líneas de iPSCs: NSV44.1, McA2.7 y McA2.31. Las fibras musculares obtenidas presentan marcaje positivo para los siguientes marcadores: A. α -Actinina. Barras de error: 40 μm . B. Miogenina. Barras de error: 100 μm . C. MyHC, PAX7 y DAPI. Barras de error: 50 μm .

2.2.3 Determinación de la madurez del músculo esquelético generado

Para que el músculo esquelético sea funcional debe de ser maduro, por ello, con el fin de determinar el grado de madurez que presentaba nuestro músculo diferenciado a partir de iPSCs llevamos a cabo el estudio de tres aspectos clave en la madurez del músculo “*in vivo*”.

Por una parte, el músculo maduro presenta entre sus características más notables un alto grado de orden y alineamiento de sus miofibras para formar las fibras esqueléticas maduras. La direccionalidad de los cultivos generados se estudió empleando la herramienta de “*directionality*” del software *ImageJ*. La figura 25A muestra los histogramas obtenidos en dicho estudio. Como se puede ver, en todas las líneas se observó un pico claro en cuanto al grado de dirección de sus fibras, lo que da idea de la preferencia de orientación de las mismas.

Otro punto determinante en la madurez del músculo esquelético es la estructura de los sarcómeros. En la Figura 25B se muestra un análisis por inmunofluorescencia en el que se observa el patrón sarcomérico característico de las fibras musculares con un marcaje positivo para α -actinina de los discos Z y troponina-T (TnT), en las tres líneas diferenciadas.

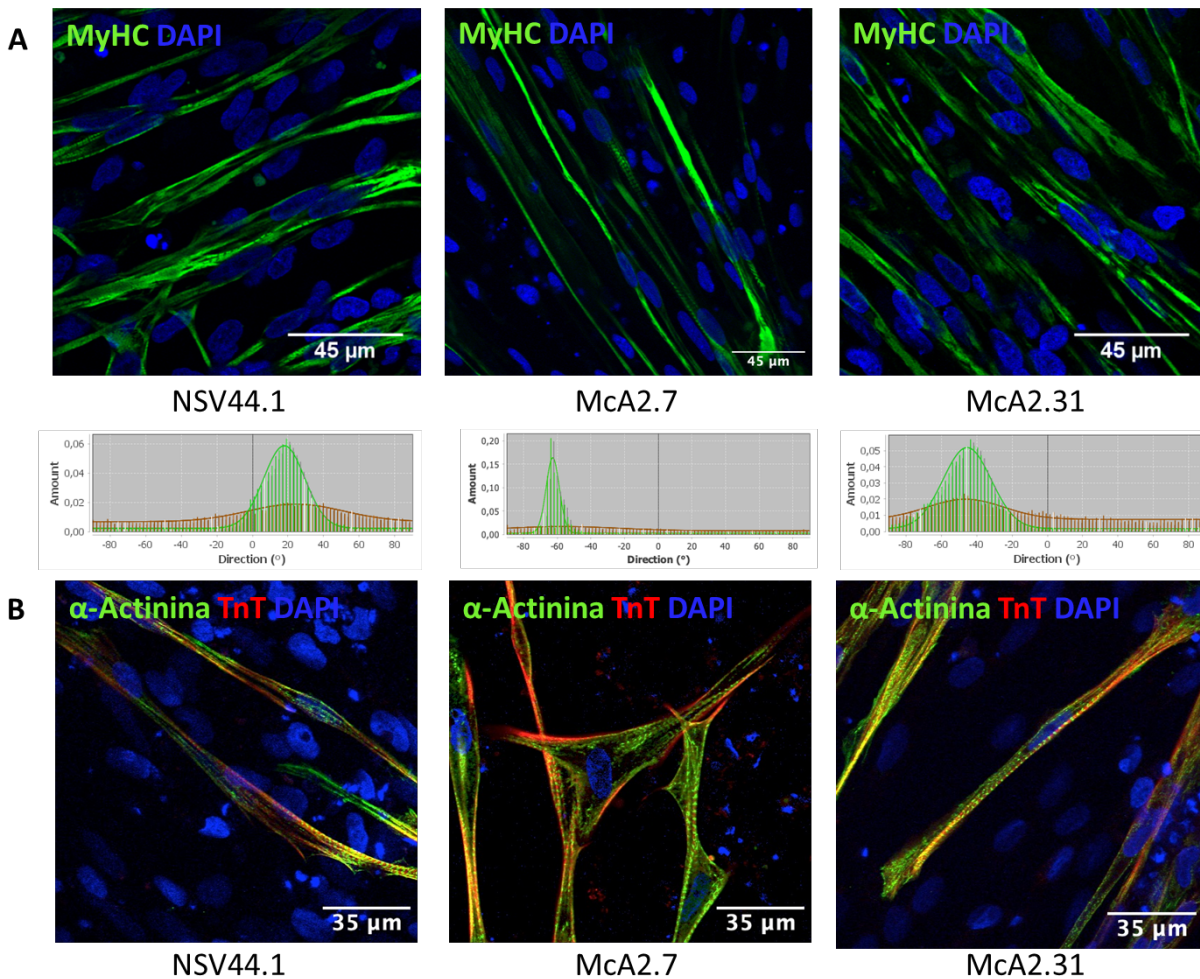


Figura 25. Análisis de la madurez del músculo esquelético generado por diferenciación dirigida de las líneas NSV44.1, McA2.7 y McA2.31. A. Imágenes de inmunofluorescencia de fibras musculares con el marcador MyHC e histograma de direccionalidad. Barras de error: 45 μ m. **B.** Inmunocitoquímicas representativas de la estructura de los sarcómeros empleando los marcadores α -actinina de los discos Z y troponina-T (TnT). Barras de error: 35 μ m.

Por último, a partir del día 10 de diferenciación final, se observó en los cultivos de fibras diferenciadas a partir de las iPSCs control NSV44.1, contracción espontánea. Este fenómeno, signo indudable de la madurez y funcionalidad del músculo esquelético, se mantuvo durante al menos 7 semanas desde el inicio de la contracción (Vídeo S1, S2 y S3). En las fibras musculares diferenciadas a partir de iPSCs de la paciente de McArdle no se observó contracción espontánea.

3. Validación del modelo de músculo esquelético generado de la enfermedad de McArdle

Para demostrar la validez del modelo celular generado para la enfermedad de McArdle se realizaron distintas pruebas funcionales para comprobar si el modelo mimetiza los principales rasgos bioquímicos de la enfermedad.

3.1 Análisis de la expresión de PYGM mediante ensayo de qPCR

La expresión del gen *PYGM* se cuantificó mediante qPCR utilizando sondas TaqMan®. Como se puede observar en la figura 26, tras 1 y 2 semanas de diferenciación, las células de músculo esquelético generado a partir de las líneas de iPSCs de paciente (McA2.7 y McA2.31) y control (NSV44.1) no muestran diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *PYGM* según el análisis estadístico Mann-Whitney.

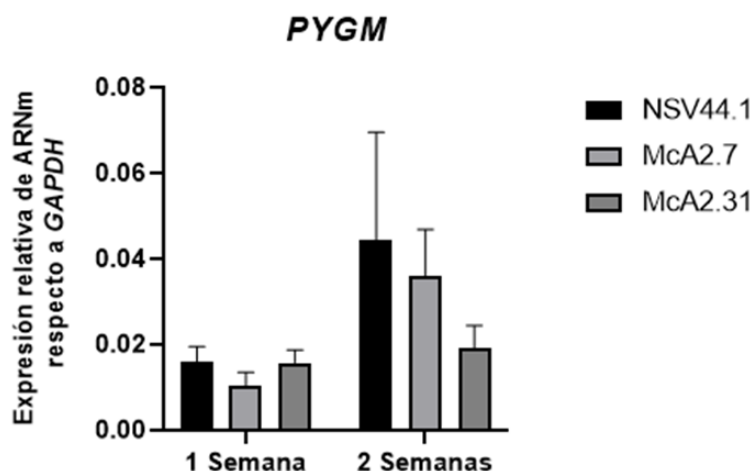


Figura 26. Estudio de la expresión de PYGM en músculo esquelético derivado de iPSCs. Ensayo de expresión relativa mediante qPCR con sondas TaqMan en músculo esquelético de NSV44.1, McA2.7 y McA2.31. Los valores son representativos de la media de tres réplicas independientes y son relativos a la expresión de *GAPDH*. Las barras de error muestran la desviación estándar.

3.2 Ensayo de Western Blot

Para confirmar la presencia o ausencia de la proteína miofosforilasa se realizó un ensayo de *Western Blot*, tanto en el músculo diferenciado a partir de iPSCs de pacientes como de iPSCs controles. Como se muestra en la figura 27A, se detecta proteína miofosforilasa en músculo esquelético derivado de la línea control NSV44.1 y no así en el músculo esquelético derivado de la línea de iPSCs de la paciente con enfermedad de McArdle, McA2.7. Por el contrario, en el músculo esquelético derivado de la línea de iPSCs McA2.31 se observa una banda de intensidad moderada a la altura de la miofosforilasa (Figura 27B), por lo que esta línea fue descartada como modelo y se seleccionó la línea McA2.7 para los experimentos posteriores.

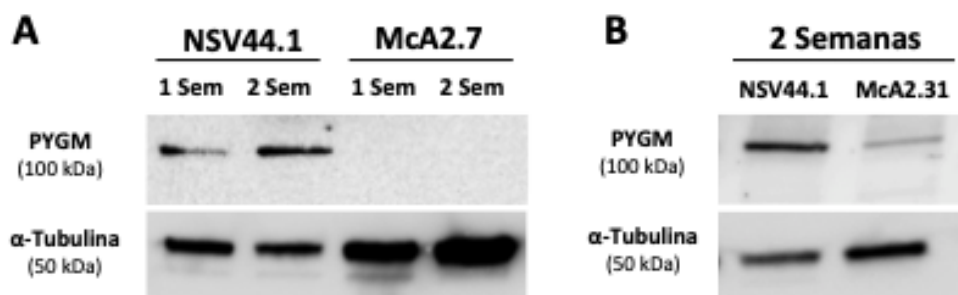


Figura 27. Ensayo de inmunodetección de PYGM en el músculo esquelético generado. A. Análisis del músculo derivado de iPSCs control (NSV44.1) y de paciente con la enfermedad de McArdle (McA2.7). **B.** Análisis del músculo derivado de iPSCs control (NSV44.1) y paciente con la enfermedad de McArdle (McA2.31). El ensayo se realizó tanto a 1 como a 2 semanas de diferenciación final. Como control de carga se empleó α -tubulina. Los análisis demuestran la presencia de miofosforilasa en el músculo esquelético control (derivado de la línea NSV44.1) y del paciente (derivado de la línea McA2.31).

3.3 Inmunofluorescencia

Además, mediante un ensayo de inmunofluorescencia se detectó la presencia de la proteína miofosforilasa alrededor del núcleo en fibras musculares generadas a partir de la línea control NSV44.1 (Figura 28). No se encontró presencia de la proteína en el músculo derivado de la línea de iPSCs McA2.7.

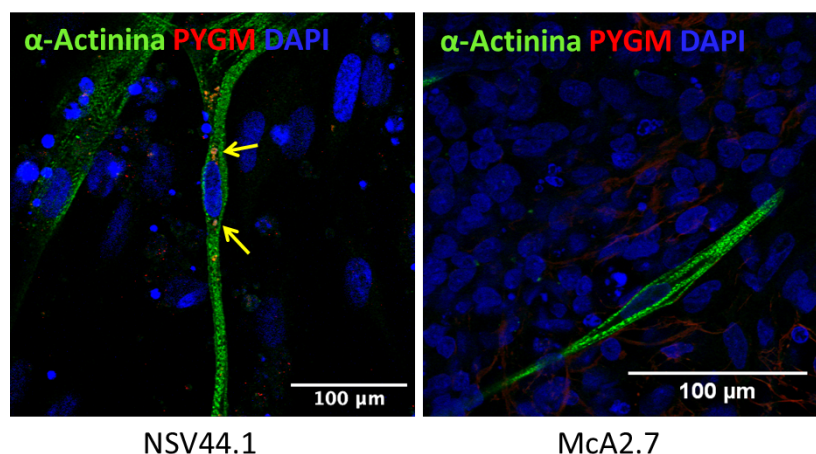


Figura 28. Imágenes de microscopía confocal de fibras de músculo esquelético obtenidas tras la diferenciación de las líneas de iPSCs NSV44.1 y McA2.7. En la figura se observan fibras representativas de las dos líneas de iPSCs con marcaje positivo para α -actinina. Las fibras de la línea NSV44.1 son también positivas para el marcador de miofosforilasa PYGM, señalado con flechas amarillas. Barra de escala: 100 μ m.

3.4 Análisis del contenido de glucógeno

Un rasgo patognomónico de la enfermedad de McArdle es la aparición de acúmulos de glucógeno en el sarcoplasma de las células musculares en biopsias de músculo de los pacientes. Para la detección de dichos acúmulos realizamos la tinción de PAS. En la figura 29A se observa, mediante tinción de PAS, cómo las células musculares derivadas de la línea de iPSCs del paciente McA2.7 presentan un marcaje más intenso del reactivo de *Schiff*. Al permeabilizar dichas células y realizar la tinción de PAS, como se observa en la figura 29B, las células de músculo esquelético derivado de iPSCs control NSV44.1 no presentan tinción intensa de acúmulos de glucógeno, mientras que las de la línea de McA2.7 muestran pequeños acúmulos teñidos intensamente de morado alrededor del núcleo, que representa la acumulación de glucógeno característica de la enfermedad de McArdle.

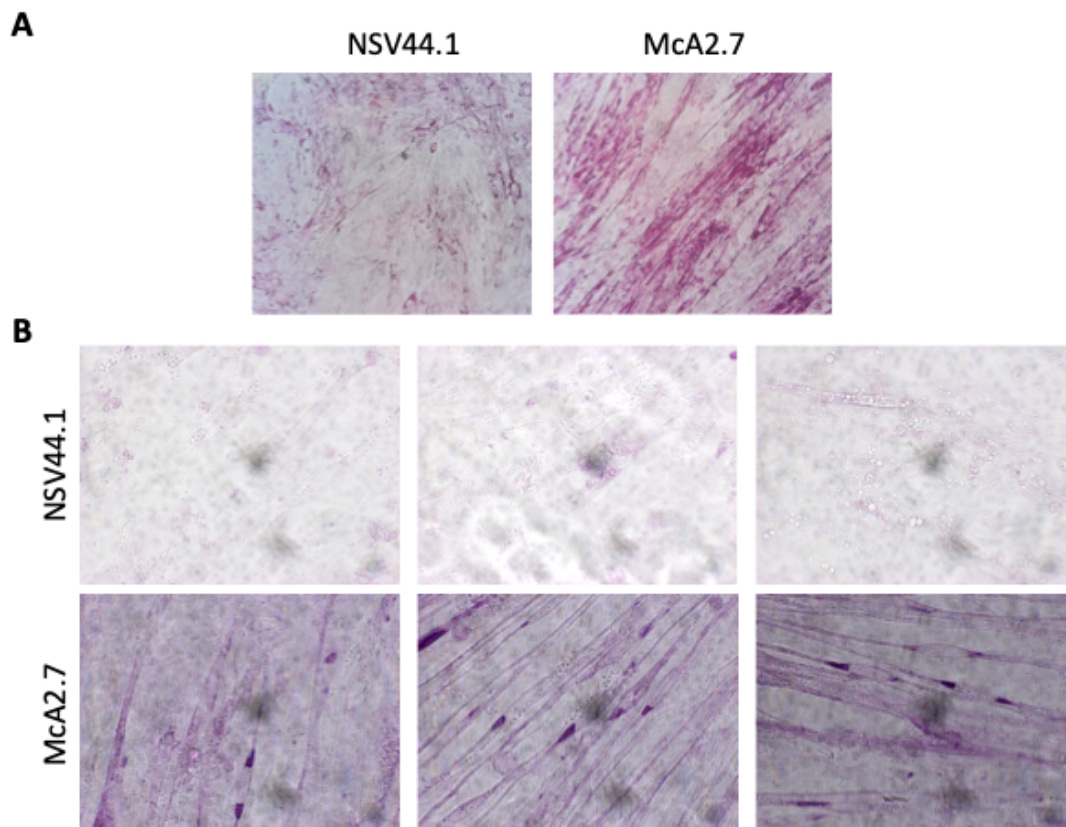


Figura 29. Imágenes representativas de la tinción PAS en las líneas NSV44.1 y McA2.7. A. Tinción de PAS sin permeabilización. Se observa una tinción más acusada en la línea de músculo esquelético derivada del paciente McA2.7. Objetivo 10x. **B.** Tinción de PAS tras permeabilización de las células. Se muestran tres imágenes representativas por cada línea. Destaca la presencia de acúmulos de color morado alrededor del núcleo de las fibras de las líneas McArdle. Por el contrario las fibras esqueléticas de la línea control NSV44.1 no presentan dichos acúmulos de glucógeno. Objetivo 63x.

4. Generación de un control isogénico mediante CRISPR/Cas9

Con el objetivo de generar un control isogénico de la línea de iPSCs de McA2.7 portadora en homocigosis de la variante patogénica c.2392T>C; p.Trp798Arg en el gen *PYGM*, se empleó la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9. Para ello se siguió el protocolo de edición basado en el uso de complejos de ribonucleoproteínas descrito en el apartado 6 de la sección materiales y métodos.

4.1 Diseño y análisis de las guías de ARN

En primer lugar se realizó el diseño de las guías de ARN (ARNsg) empleando la herramienta *online* de la casa comercial IDT, teniendo las precauciones que se describen detalladamente en el apartado 6.1 de materiales y métodos. Las guías seleccionadas (ARNsg1 y ARNsg 2) se encuentran en la hebra positiva de ADN e inducen un corte de doble cadena aproximadamente a 2 y 7 pb aguas abajo respectivamente de la variante patogénica de interés (Figura 30).

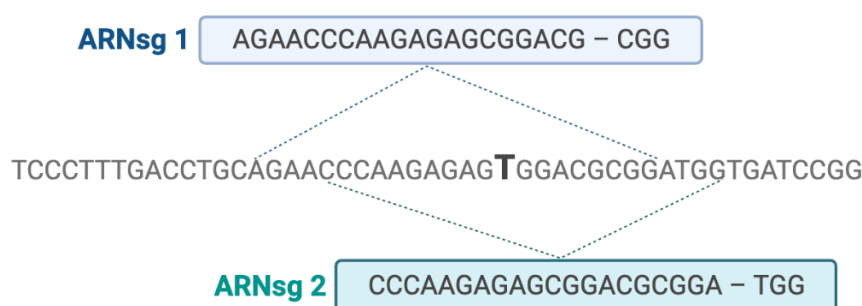


Figura 30. Esquema del diseño de guías de ARN seleccionado para la corrección de la variante patogénica c.2392T>C en el gen *PYGM*. La figura muestra el fragmento de ADN que contiene la variante patogénica a corregir (T) y a ambos lados se representan las guías de ARN seleccionadas, ARNsg1 y ARNsg2, con sus secuencias PAM (NGG), ambas en la hebra positiva.

Una vez diseñadas las guías de ARN se procedió a la evaluación de su eficiencia de corte en la diana de interés en la línea de iPSCs McA2.7. Para ello se nucleofectaron en paralelo iPSCs de McA2.7 con complejos de ribonucleoproteínas formados por la enzima *Cas9* y cada una de las guías por separado y se extrajo ADN genómico del conjunto de células nucleofectadas. A continuación se realizó una PCR para amplificar la región de interés (448 pb) y se llevó a cabo un ensayo con la endonucleasa *T7E1*, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4 de materiales y métodos. Cuando la endonucleasa *T7E1* encuentra un desajuste entre las hebras de ADN (reflejo del corte de la *Cas9* y posterior reparación por los mecanismos celulares) realiza un corte del amplicón en dos fragmentos de 250 pb y 198 pb. El resultado se corrió en un gel de poliacrilamida al 10% (Figura 31) y se analizaron los cortes con el programa *ImageJ*. Con los resultados obtenidos se estimó la eficiencia de corte de cada guía y se obtuvo una eficiencia de aproximadamente 16% para la guía ARNsg1 y un 11% para la guía ARNsg2.

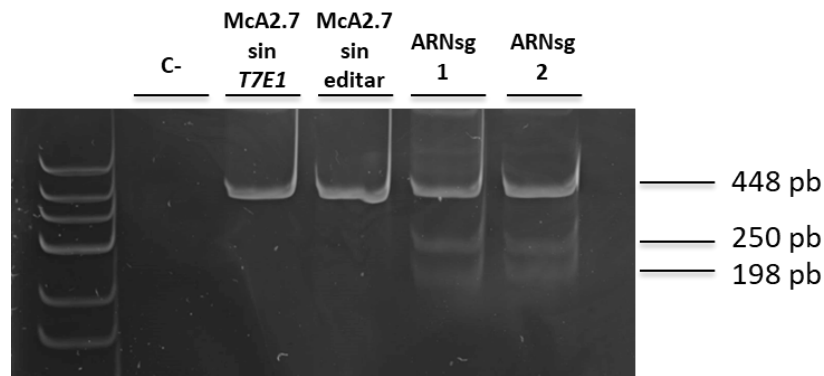


Figura 31. Imagen del gel de poliacrilamida 10% del ensayo de la endonucleasa T7E1 para el cálculo de la eficiencia de corte. Como controles se utilizó por un lado el conjunto de células editadas sin añadir la enzima *T7E1* y por otro lado la línea de iPSCs McA2.7 sin editar. La endonucleasa *T7E1* detecta desajustes entre las hebras de ADN y genera un corte del producto de PCR produciendo dos fragmentos de 250 pb y 198 pb. La eficiencia de corte estimada de la guía ARNsg1 es del 16%, algo mayor que la de la guía ARNsg2 del 11%. C-: H₂O.

Debido a la baja eficiencia de corte de las guías analizadas, para los experimentos posteriores se decidió realizar una combinación de ambas guías para intentar mejorar la eficiencia de corte y edición. En primer lugar las células se nucleofectaron con la guía 1 y posteriormente, el conjunto de células se nucleofectó nuevamente con la guía 2.

4.2 Diseño del oligonucleótido de edición

Para llevar a cabo la edición de la variante patogénica c.2392T>C en el gen *PYGM* de las células McA2.7 se introdujo, junto el complejo de ribonucleoproteínas, la guía de ARN, la enzima *Cas9* y un oligonucleótido de cadena sencilla (ODNcs) que sirvió como molde de reparación para la variante patogénica mediante la vía de modificación HDR. Este ODNcs fue diseñado con dos brazos de homología de 90nt a cada lado del nucleótido que se pretendía modificar. En la parte central se resalta en negrita el nucleótido corrector de la variante patogénica p.2392T>C. La secuencia del oligonucleótido de edición (ODNcs) utilizado es la siguiente:

Brazo de homología 1 (5'-3'):

TGGTGGCCCTGGTTGGGATGAGGCAGAAGGTGGAGATCCTGCCAGCAGAGTGAACCAAGAGCTTCCCTTTG
ACCTGCAGAACCCAAGAGAG

Centro: T

Brazo de homología 2 (5'-3'):

GGACGCGGATGGTGATCCGGAACATAGCCACCTCTGGCAAGTTCTCCAGTGACCGCACCATTGCCAGTAT
GCCCCGGAGATCTGGGGTG

4.3 Nucleofección y cálculo del porcentaje de edición

El proceso de edición se realizó en dos ciclos, en primer lugar se nucleofectó la línea de iPSCs McA2.7 con la guía ARNsg1 y el oligonucleótido de edición. Una vez terminada la nucleofección, se dejó un tiempo de 2-3 días para que las células se recuperasen y se expandiesen. Tras este tiempo, el conjunto de células editadas con la guía ARNsg1 se nucleofectó nuevamente, pero esta vez empleando la guía ARNsg2.

Para determinar la eficiencia de edición obtenida con la guía ARNsg1 o con las dos guías (Re-edición ARNsg2) se obtuvo ADN genómico del conjunto de células supuestamente editadas y se amplificó mediante PCR la región de interés. Sobre el producto de PCR, de unos 315 pb se realizó un ensayo de RFLP con la endonucleasa de restricción *BstXI*. La secuencia de reconocimiento de *BstXI* contiene la variante patogénica editada, es decir, que si las células se han editado, la enzima corta el producto de PCR en dos fragmentos, uno de 218 pb y otro de 97 pb. Como control positivo del ensayo de RFLP se utilizó ADN de las iPSCs control NSV44.1, que no presentan la variante patogénica.

La eficiencia de edición en el conjunto de células editadas con ARNsg1, tal y como se aprecia en la figura 32, resultó ser de aproximadamente un 2%. Sin embargo, la eficiencia de edición siguiendo la estrategia de re-edición con la guía ARNsg2 del conjunto editado con ARNsg1, resultó ser de un 8%. A pesar de que el incremento de mejora fue escaso, decidimos continuar el subclonaje con las células re-editadas con ambas guías.

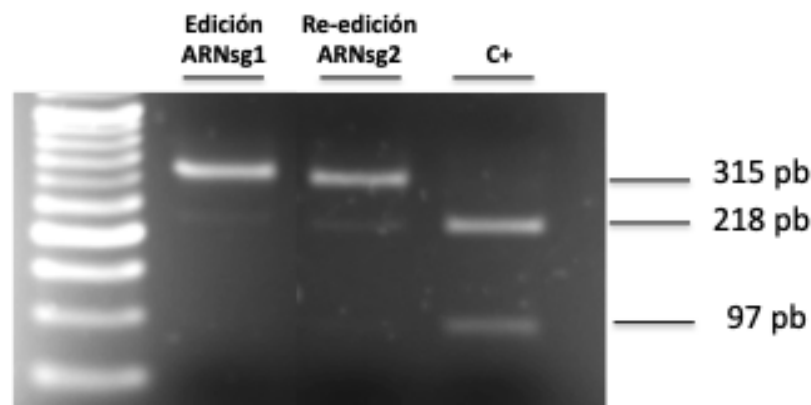


Figura 32. Evaluación de la eficiencia de edición mediante un ensayo de RFLP. Empleando la enzima de restricción *BstXI* se calculó la eficiencia de edición tanto con la guía ARNsg1 como de la re-edición con la guía ARNsg2. Como control positivo se empleó ADN de la línea de iPSCs control NSV44.1. Esta línea no presenta la variante patogénica c.2392T>C por lo que el producto de PCR generado se corta en dos fragmentos (uno de 218 pb y otro de 97 pb).

4.4 Subclonaje, aislamiento y análisis de posibles clones editados

Durante el proceso de subclonaje se seleccionaron aquellos clones que procedían de una célula única con el fin de garantizar que la posible línea editada no procediera de una mezcla de células editadas y sin editar. Todos los clones aislados se expandieron y se pasaron por duplicado a dos placas de 96 pocillos mediante picado manual por disgregación mecánica. Una de estas placas se utilizó para la expansión y criopreservación de los clones y la otra placa se utilizó para el genotipado. Para el genotipado, se realizó la extracción de ADN genómico y se analizó mediante PCR y RFLP cada uno de los clones, siguiendo el protocolo mencionado anteriormente. Los clones positivos en el ensayo de RFLP con la enzima *BstXI* fueron analizados mediante secuenciación Sanger para confirmar que la edición había ocurrido correctamente. Tras analizar dichos clones confirmamos que en aquellos que había tenido lugar la edición de la variante patogénica, ésta había ocurrido en heterocigosis. De entre los siete clones heterocigotos obtenidos se eligió uno por presentar un crecimiento normal y una morfología propia de las iPSCs, a partir de ahora denominado McA2.7^{Het12} (Figura 33).

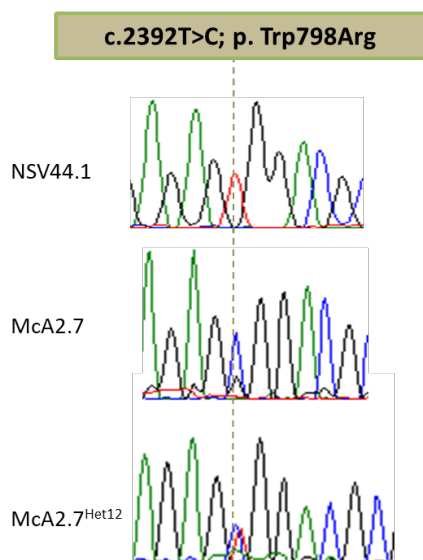


Figura 33. Secuenciación por el método de Sanger para verificar si la variante patogénica en el gen *PYGM*: c.2392T>C; p.Trp798Arg había sido corregida en el clon McA2.7^{Het12}. En los electroferogramas obtenidos se muestra la comparación entre la línea de iPSCs control NSV44.1, la línea de iPSCs McA2.7 y la corrección en heterocigosis de la variante patogénica c.2392T>C; p.Trp798Arg en la línea de iPSCs McA2.7^{Het12}.

4.5 Análisis de modificaciones en dianas no deseadas

Durante el proceso de edición con el sistema CRISPR existe la posibilidad de que las guías reconozcan una región del genoma distinta a la variante que se pretende corregir y se modifique una diana no deseada. Para evitar en la medida de lo posible ese riesgo, se tiene especial cuidado durante el proceso de diseño de las guías ARNsg. No obstante, con el fin de descartar que hubiera ocurrido un evento no deseado durante el proceso de edición, se analizó mediante secuenciación Sanger la única diana no deseada predicha por el algoritmo de diseño para la guía ARNsg2. No se encontró ninguna diana no deseada en región codificante para la guía ARNsg1. Esta diana se situaba en el gen *PRPF31* y presentaba 3 desajustes con respecto a la secuencia original de ADN. El fragmento de interés se analizó mediante PCR y posterior secuenciación por el método de Sanger.

El resultado obtenido mostró que no existía ningún tipo de modificación en la secuencia de la diana analizada (Figura 34).

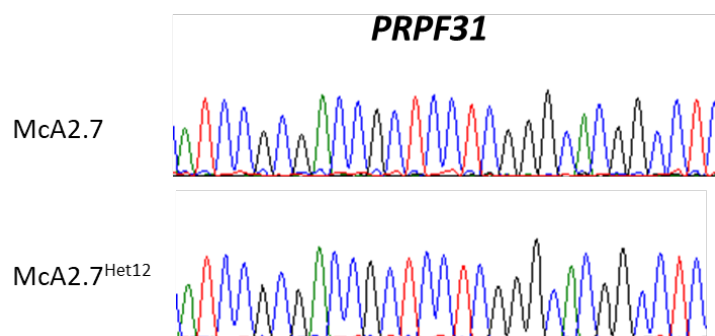


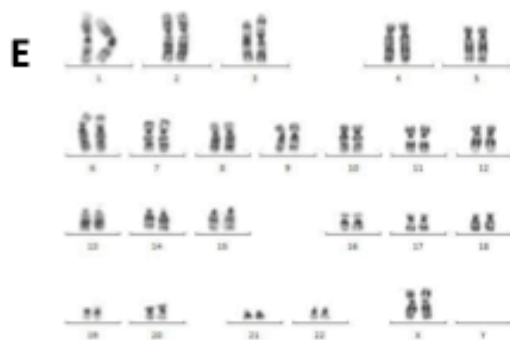
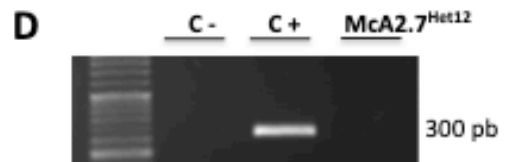
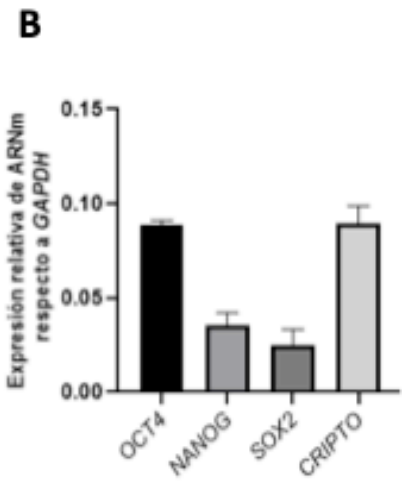
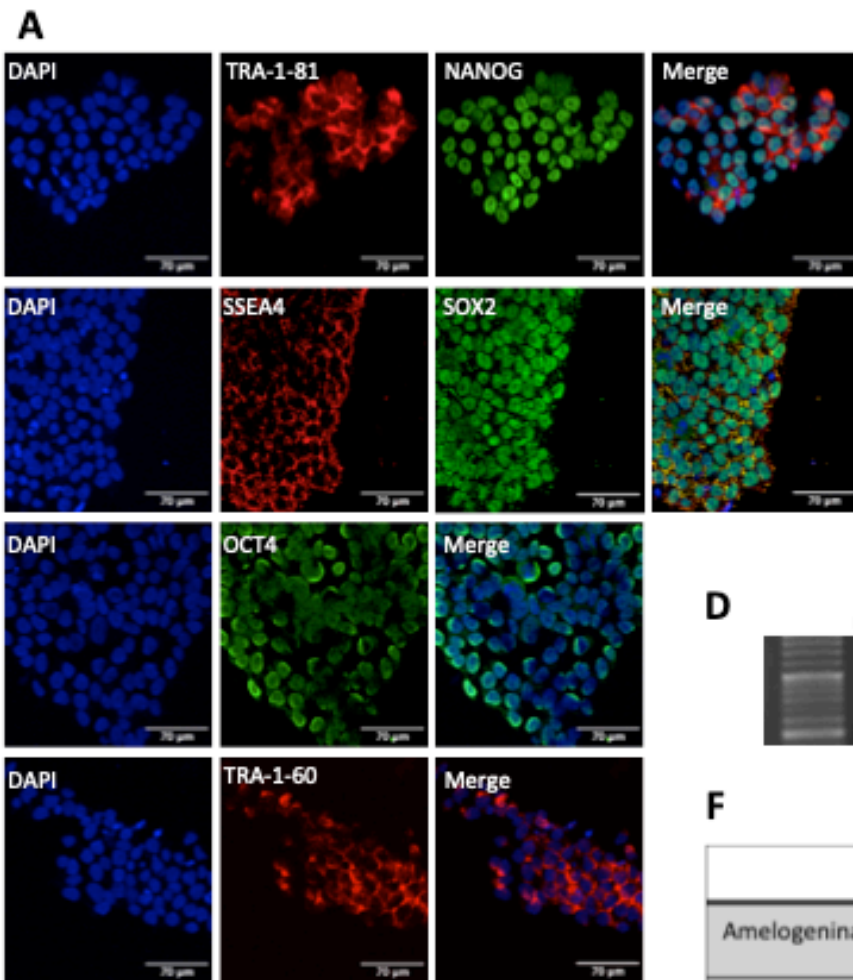
Figura 34. Electroferogramas obtenidos por secuenciación tipo Sanger del fragmento de interés del gen *PRPF31*. Tras la secuenciación del fragmento de PCR con la posible modificación en una diana no deseada en el gen *PRPF31* se observa que la línea editada *McA2.7*^{Het12} no presentaba ninguna modificación comparada con la línea de iPSCs *McA2.7* en la región de la secuencia de la diana similar a la guía ARNsg2. En la figura se muestra un fragmento de la secuencia analizada.

4.6 Comprobación de la pluripotencia y calidad de la línea editada *McA2.7*^{Het12}.

Una vez seleccionada la línea de iPSCs editada en heterocigosis *McA2.7*^{Het12} el siguiente paso fue confirmar que las características de pluripotencia y calidad propias de las iPSCs no se habían alterado tras el proceso de edición.

Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo un ensayo de inmunocitoquímica para detectar marcadores característicos de pluripotencia, tanto de superficie (TRA-1-81, SSEA4 y TRA-1-60) como nucleares (OCT4, NANOG y SOX2) (Figura 35A). Además, mediante un ensayo de qPCR se verificó la expresión de los factores de transcripción *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* y *CRIPTO*, comprobando así que la pluripotencia no había sido alterada en el proceso de edición génica (Figura 35B). Como ensayo funcional de la pluripotencia, se realizó un ensayo de diferenciación in vitro a las tres capas embrionarias, quedando demostrado mediante inmunocitoquímica que la línea de iPSCs editada era positiva para los marcadores de endodermo (AFP), ectodermo (Tuj1) y mesodermo (SMA) (Figura 35C).

En segundo lugar, entre las pruebas de calidad que se realizaron, se comprobó la ausencia de contaminación por micoplasma en los cultivos (Figura 35D) y que la línea *McA2.7*^{Het12} seguía presentando un cariotipo normal (46, XX) (Figura 35E). Por último, se llevó a cabo un análisis de la huella genética que nos permitió confirmar que la línea editada procedía de la línea *McA2.7* (Figura 35F).



F

	McA2.7		McA2.7 ^{Het12}	
Amelogenina	X	X	X	X
D2S1338	180	192	180	192
D7S820	214	218	214	218
D8S1179	172	180	172	180
D13S317	182	190	182	190
D19S433	199	204	199	204
D21S11	227	233	227	233
VWA	141	154	141	154

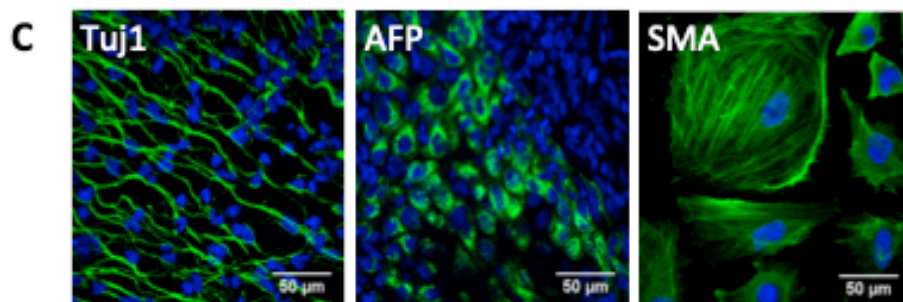


Figura 35. Pruebas de pluripotencia y calidad realizadas en la línea McA2.7^{Het12}. **A.** Ensayo de inmunocitoquímica con los marcadores TRA-1-81, TRA-1-60, NANOG, SSEA4, SOX3 y OCT4. Las iPSCs de McA2.7^{Het12} son positivas para todos los marcadores analizados. **B.** Análisis de la expresión relativa de los genes *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* y *CRIPTO* en la línea McA2.7^{Het12} frente a *GAPDH*. Los valores representan la media de al menos tres réplicas independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar. **C.** Ensayo de diferenciación in vitro a las tres capas embrionarias: Se observa marcaje positivo para endodermo (AFP), ectodermo (Tuj1) y mesodermo (SMA). **D.** Análisis de la ausencia de micoplasma. **E.** El cariotipo de la línea McA2.7^{Het12} es normal (46, XX). **F.** Estudio de la huella genética en el que se confirma que la línea de iPSCs McA2.7^{Het12} procede de la línea McA2.7 ya que los valores de los tamaños de los marcadores analizados coinciden.

4.7 Diferenciación a músculo esquelético de la línea editada en heterocigosis

Por último, se llevó a cabo la diferenciación a músculo esquelético de la línea editada en heterocigosis McA2.7^{Het12} tal y como se describe en el apartado 3 de materiales y métodos. Siguiendo los mismos métodos de validación del proceso de diferenciación que estudiamos con las líneas NSV44.1, McA2.7 y McA2.31, a días 0, 8, 16 y 24 de diferenciación primaria se analizaron por qPCR distintos marcadores miogénicos (Figura 36A).

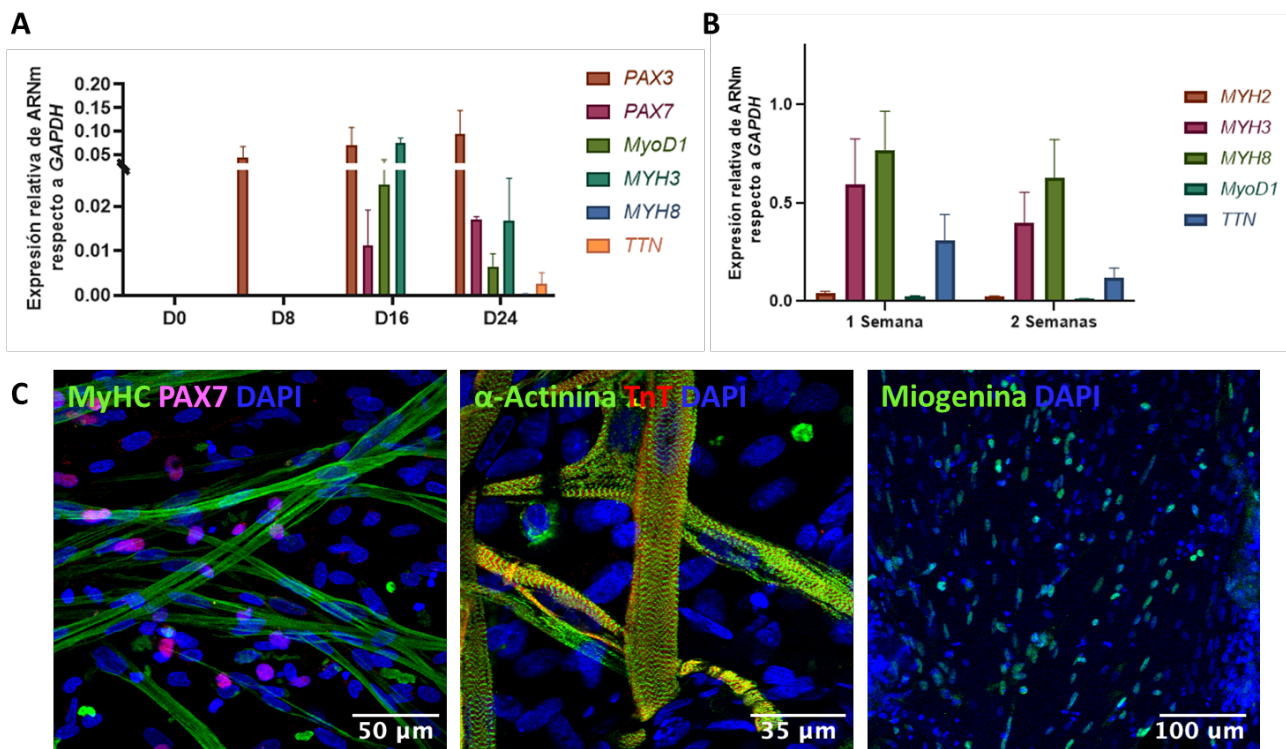


Figura 36. Pruebas de validación de la diferenciación a músculo esquelético de línea McA2.7^{Het12}. **A.** Análisis mediante qPCR de la expresión relativa de genes miogénicos durante la diferenciación primaria. Se analizaron los genes *PAX3*, *PAX7*, *MyoD1*, *MYH3*, *MYH8* y *TTN* a días 0, 8, 16 y 24 del proceso de diferenciación primaria a músculo esquelético. **B.** Análisis mediante qPCR de la expresión relativa de genes característicos de fibras adultas. Se analizaron los genes *MYH2*, *MYH3*, *MYH8*, *MyoD1* y *TTN* a días 0, 8, 16 y 24 del proceso de diferenciación primaria a músculo esquelético. Los valores son representativos de al menos tres réplicas independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar. **C.** Imágenes de microscopía confocal de ensayo de inmunofluorescencia. En la figura se muestra que las fibras musculares

obtenidas son positivas para los marcadores MyHC y PAX7 (Barra de escala: 50 μm), α -Actinina y TnT (Barra de escala: 35 μm) y Miogenina (Barra de escala: 100 μm).

Así mismo, la diferenciación final se evaluó mediante qPCR (Figura 36B) y mediante inmunocitoquímica (Figura 36C). Como se puede observar, las fibras diferenciadas a partir de la línea McA2.7^{Het12} son positivas para el marcador MyHC y presentan también células satélites positivas para PAX7. Mediante el ensayo de inmunofluorescencia con los marcadores α -Actinina y troponina-T (TnT) se distingue la estructura sarcomérica característica de las fibras adultas. Además, las miofibras multinucleadas son positivas para miogenina. Finalmente, se observó contracción espontánea de la línea de músculo esquelético diferenciada a partir de la línea de iPSCs McA2.7^{Het12} desde el día 10 de diferenciación final (Vídeo S5, S6 y S7).

4.8 Análisis de la expresión de miofosforilasa en la línea McA2.7^{Het12}

Para analizar la presencia o ausencia de proteína miofosforilasa en la línea de iPSCs editada en heterocigosis se llevó a cabo un ensayo de inmunodetección (*Western Blot*). Como se puede observar en la figura 37A, el músculo esquelético derivado de McA2.7^{Het12} presentaba proteína miofosforilasa al igual que el derivado de la línea control NSV44.1. A continuación, se cuantificó la actividad específica de la glucógeno fosforilasa mediante el ensayo colorimétrico descrito en la sección 5.4 de materiales y métodos (Figura 37B). El análisis estadístico realizado mediante el test de Mann-Whitney muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de actividad glucógeno fosforilasa del músculo esquelético obtenido a partir de la línea NSV44.1 y de la línea editada McA2.7^{Het12}.

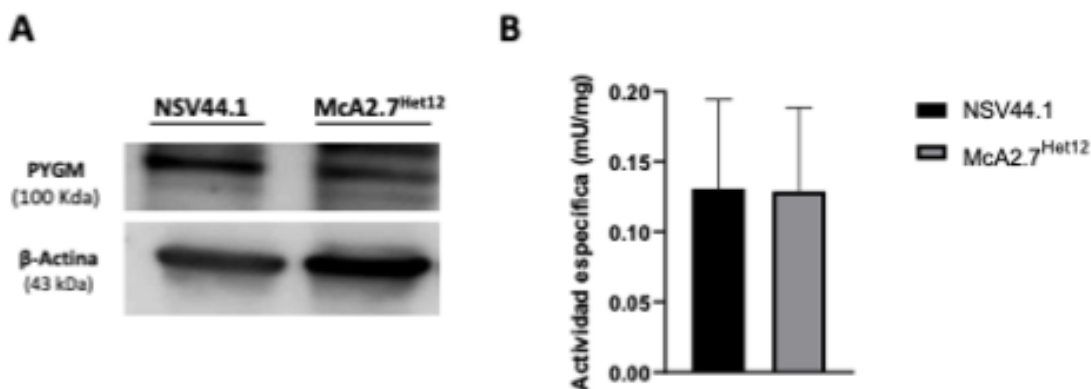


Figura 37. Análisis de la expresión de miofosforilasa en el músculo esquelético derivado de la línea McA2.7^{Het12}. A. Ensayo de inmunodetección de PYGM en el músculo esquelético generado a partir de iPSCs control (NSV44.1) y de iPSCs editadas en heterocigosis (McA2.7^{Het12}). Como control de carga se empleó β -actina. Los análisis demuestran la presencia de miofosforilasa tanto en el músculo esquelético control como en McA2.7^{Het12}. B. Actividad específica de la glucógeno fosforilasa del músculo esquelético generado a partir de NSV44.1 y McA2.7^{Het12}. No existen diferencias significativas mediante el test de Mann-Whitney entre los niveles de actividad glucógeno fosforilasa de NSV44.1 y McA2.7^{Het12}. Los valores son representativos de al menos tres réplicas independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

5. Estudio piloto de chaperonas farmacológicas en el modelo de músculo esquelético generado

La generación de un modelo de músculo esquelético humano de la enfermedad de McArdle con la variante patogénica c.2392T>C; p.Trp798Arg en el gen *PYGM* que recapitula las características más notables de la enfermedad, puede constituir una herramienta muy útil en la búsqueda de posibles aproximaciones terapéuticas. En esta tesis doctoral quisimos explorar el uso de chaperonas farmacológicas como tratamiento de enfermedades causadas por mutaciones de cambio de sentido. Para ello se seleccionaron dos compuestos con potencial para ser considerados chaperonas farmacológicas, BAY U6751 y CP-91149 que habían sido descritos en la bibliografía como inhibidores de la glucógeno fosforilasa [121,122].

Para llevar a cabo el estudio piloto en las condiciones idóneas eliminando el fondo genético se utilizó músculo esquelético diferenciado a partir de las siguientes líneas de iPSCs: McA2.7^{Het12} como control isogénico y McA2.7 como línea de paciente con enfermedad de McArdle. Tras dos semanas de diferenciación final, las chaperonas seleccionadas (BAY U6751 y CP-91149) se añadieron al medio de cultivo de músculo esquelético diferenciado a partir de iPSCs de McA2.7 durante 2 horas a la siguiente concentración: BAY U6751 a 5 μ M y CP-91149 a 3 μ M. Seguidamente se analizó mediante *Western blot* la presencia o ausencia de miofosforilasa. Como se puede observar en la figura 38 no se ha conseguido rescatar los niveles de PYGM con ninguna de las chaperonas testadas.

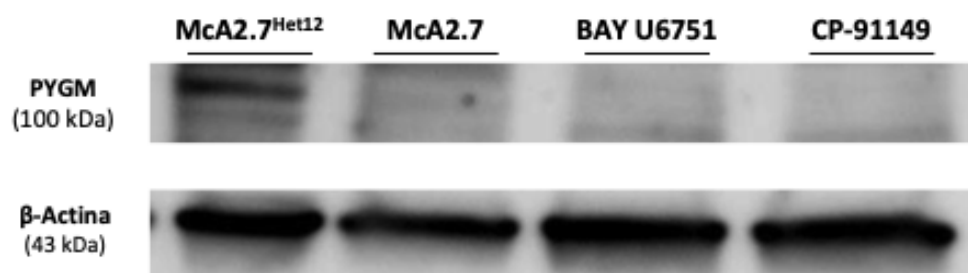


Figura 38. Ensayo de inmunodetección para la comprobación del rescate de miofosforilasa en el músculo esquelético de paciente de McArdle (McA2.7) tras el tratamiento con las chaperonas BAY U6751 o CP-91149. Como control de carga se empleó β -actina. Los análisis demuestran la presencia de miofosforilasa únicamente en el músculo esquelético derivado del control isogénico McA2.7^{Het12}. No se detecta proteína miofosforilasa en el músculo esquelético derivado de iPSCs de paciente de McArdle (McA2.7) ni tampoco rescate tras el tratamiento con las chaperonas farmacológicas.

DISCUSIÓN

1. Generación de un modelo de músculo esquelético de la enfermedad de McArdle basado en el uso de iPSCs

La enfermedad de McArdle afecta a 1 de cada 100.000 personas en España, por lo que se engloba dentro de las enfermedades raras o poco frecuentes [123]. Los pacientes con esta enfermedad presentan una marcada intolerancia al ejercicio debido a mutaciones en el gen *PYGM*, que codifica para la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa. Esta enzima es la responsable de romper los enlaces α 1-4 de las ramificaciones externas del glucógeno para dar lugar a glucosa-1-P en la primera etapa de la glucólisis, por lo que la ausencia de la miofosforilasa produce un bloqueo en la obtención de energía en el músculo esquelético que se manifiesta en mialgias, calambres, rigidez muscular e incluso episodios más graves de rabdomiólisis y mioglobinuria.

Hasta la fecha, no existe cura para la enfermedad de McArdle y los únicos tratamientos que hay están enfocados en mitigar los síntomas, como por ejemplo la realización de ejercicio controlado y supervisado o la suplementación nutricional previa al ejercicio. Además, a pesar de que los modelos disponibles para el estudio de la enfermedad han permitido aumentar el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos e incluso probar posibles fármacos para el tratamiento [31], ninguno de ellos resulta de utilidad para poder llevar a cabo estudios de cribado farmacológico de alto rendimiento.

El descubrimiento de las iPSCs ha supuesto un cambio en el paradigma de la medicina regenerativa. Además de ser una valiosa fuente de material con potencial en terapia celular, las iPSCs constituyen una herramienta muy versátil para la generación de modelos de enfermedad. En los últimos años se han conseguido modelizar numerosas enfermedades utilizando iPSCs, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer [124], cardiomiopatías [125] o incluso se han desarrollado modelos celulares para el estudio de la COVID-19 [126]. Recientemente, en nuestro laboratorio hemos obtenido por primera vez un modelo de músculo esquelético humano de la enfermedad de McArdle, basado en la utilización de la tecnología de las iPSCs, para la variante patogénica más frecuente en la población caucásica, c.148C>T; p.Arg50Ter [35].

En esta tesis doctoral se ha generado un modelo de músculo esquelético humano de la enfermedad de McArdle portador de la segunda variante patogénica más frecuente en las cohortes de pacientes con enfermedad de McArdle publicadas en la población española en el gen *PYGM*, NM_005609.4: c.2392T>C; p.Trp798Arg. Para ello, se han reprogramado PBMCs obtenidas de una paciente con la enfermedad de McArdle portadora en homocigosis de esta mutación y se han generado iPSCs que posteriormente han sido diferenciadas a músculo esquelético maduro. Este modelo es el primero que se ha generado para la variante c.2392T>C; p.Trp798Arg y el único modelo celular humano de la enfermedad de McArdle para una variante de cambio de sentido. El modelo que aquí se presenta será de gran ayuda para el estudio de los mecanismos subyacentes de esta variante en concreto y para la búsqueda de posibles aproximaciones terapéuticas entre las que se incluyen rastreos farmacológicos de alto rendimiento.

1.1 Reprogramación de PBMCs a iPSCs

Durante los últimos años, los métodos de reprogramación han ido evolucionando, optimizando el proceso en cuanto a eficiencia y duración del protocolo. El tipo celular de partida más utilizado para reprogramar a iPSCs son los fibroblastos por su facilidad de obtención y mantenimiento en cultivo, no obstante, este tipo celular presenta numerosas desventajas como por ejemplo el hecho de que sea necesario un procedimiento invasivo como es la realización de una biopsia de piel para su aislamiento o el tiempo necesario para su expansión [127]. En este sentido, en los últimos años se ha estado intentando poner a punto los métodos de reprogramación de otros tipos celulares como PBMCs, células del epitelio urinario o queratinocitos [128].

En esta tesis doctoral, se eligió como material de partida para la reprogramación PBMCs, por la facilidad de aislamiento a partir de muestras de sangre total obtenidas mediante punción venosa, método menos invasivo que la tradicional biopsia de piel. Como vector para la introducción de los factores de Yamanaka utilizamos los virus *Sendai*, ampliamente utilizados por la seguridad de su uso al tratarse de virus no integrativos y por presentar mayor eficacia de reprogramación que otros vectores [129]. Además, se puso a punto un protocolo de reprogramación libre de capa de células alimentadoras (*feeder-free*). Estas células alimentadoras, ampliamente utilizadas en reprogramación, pueden interferir a la hora de realizar estudios funcionales con las iPSCs por lo que previamente es necesario adaptar las células a unas condiciones de cultivo libres de células alimentadoras, proceso que suele ser largo y tedioso en muchas ocasiones. Por esta razón, realizar una reprogramación sin ellas tendría enormes ventajas de cara a evitar problemas de interferencias en los estudios posteriores, a ahorrar tiempo, al no ser necesario realizar una adaptación a cultivo libre de células alimentadoras y a solventar posibles problemas debidos a diferencias entre lotes de células alimentadoras.

De este modo, partiendo de PBMCs de la paciente con enfermedad de McArdle se establecieron dos líneas de iPSCs independientes denominadas McA2.7 y McA2.31. Ambas líneas fueron analizadas mediante una batería de pruebas estandarizadas para verificar su pluripotencia y calidad. En primer lugar, mediante un ensayo de la fosfatasa alcalina se determinó, de una forma rápida y sencilla, la pluripotencia de las colonias de iPSCs obtenidas. Las células positivas para fosfatasa alcalina se ha visto que son capaces de propagarse rápidamente como células indiferenciadas y las células que dejan de ser positivas para dicha enzima comienzan a diferenciarse [130]. Mediante qPCR se cuantificó la expresión de otros marcadores típicos de pluripotencia como *OCT4*, *SOX2*, *CRIPTO* y *NANOG*. Paralelamente, se realizó un ensayo cualitativo mediante inmunofluorescencia de distintos marcadores de pluripotencia tanto nucleares (*SOX2*, *NANOG* y *OCT4*) como de superficie (*SSEA4*, *TRA-1-81* y *TRA-1-60*). Por último, se llevó a cabo un ensayo de diferenciación *in vitro*, que confirmó la capacidad de las líneas de iPSCs McA2.7 y McA2.31 de diferenciarse a las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. Estos análisis son de obligado cumplimiento para el depósito de las iPSCs en el Banco Nacional de Líneas Celulares [131,132].


Por otro lado, para garantizar la calidad e integridad de las líneas de iPSCs, se confirmó, en primer lugar, mediante secuenciación Sanger que tanto McA2.7 como McA2.31 presentaban la variante patogénica c.2392T>C; p.Trp798Arg en homocigosis en el gen *PYGM*. A continuación, se verificó la eliminación de los virus *Sendai* utilizados en el proceso de reprogramación. Una de las principales ventajas del uso de estos vectores es que al tratarse de virus de ARN citoplasmáticos

no entran al núcleo y por tanto no hay riesgo de que se inserten en el genoma en un lugar no deseado. Además, las células son capaces de eliminarlos con los sucesivos pases en cultivo [133]. Seguidamente, se realizó un análisis del cariotipo y se confirmó que las dos líneas de iPSCs generadas (McA2.7 y McA2.31) presentaban un cariotipo normal (46, XX). Esta comprobación es crítica ya que las líneas de iPSCs presentan tendencia a acumular alteraciones cromosómicas durante el proceso de reprogramación en sí mismo, o como resultado de la propia manipulación de las líneas en cultivo, hecho que podría influir negativamente en la diferenciación o incluso en la traslación a la clínica de las iPSCs [134]. Por último, se confirmó que las iPSCs procedían de las PBMCs de partida mediante un estudio de la huella genética, así como la ausencia de micoplasma en los cultivos, ambas pruebas de gran importancia en la obtención de iPSCs de grado clínico [135].

1.2 Diferenciación de las iPSCs a músculo esquelético

Existen dos grupos de protocolos para la diferenciación de iPSCs a músculo esquelético: el primero de ellos consiste en la sobreexpresión de factores de transcripción claves en el desarrollo miogénico como *PAX7* o *MyoD1*. Estos protocolos suelen tener una duración corta y han demostrado una eficiencia de diferenciación a células miogénicas bastante aceptable. No obstante, la introducción de vectores virales en las células supone un riesgo para su futura traslación a la clínica [80]. El segundo grupo de protocolos consiste en la diferenciación dirigida mediante la suplementación del medio de cultivo con pequeñas moléculas que activan o inhiben determinadas rutas, imitando así los procesos del desarrollo embrionario [136]. Este último grupo de protocolos presenta como principal ventaja que son más seguros para su traslación a la clínica por el hecho de no requerir el uso de virus. A pesar de ello suelen ser protocolos largos, con menores eficiencias y la mayor parte de las veces dan lugar a una población heterogénea de células diferenciadas [69].

Con el objetivo de crear un modelo de músculo esquelético de la enfermedad de McArdle se diferenciaron las dos líneas de iPSCs generadas a partir de la paciente con la enfermedad de McArdle (McA2.7 y McA2.31) y una línea de iPSCs control (NSV44.1) previamente obtenida en el laboratorio [112]. El método de diferenciación elegido consiste en una combinación de dos protocolos [82,116], ambos basados en la suplementación de los medios de cultivo con pequeñas moléculas. Para ello, en primer lugar se siguió el protocolo descrito por Chal y colaboradores mediante el que se obtuvieron células miogénicas en aproximadamente 30 días [82]. Esta primera fase recapitula las primeras etapas de la diferenciación del mesodermo paraxial y miogénesis temprana. Durante los ocho primeros días del protocolo se indujo una modulación dual de dos vías de señalización, claves para la generación de grandes cantidades de progenitores del mesodermo paraxial y su posterior especificación hacia dermomiótomo. Para ello se emplearon dos moléculas: CHIR99021, que induce la diferenciación a mesodermo paraxial temprano mediante la activación de la vía de Wnt y LDN193189, que es un inhibidor de la ruta de señalización BMP que bloquea la diferenciación hacia progenitores endoteliales de los progenitores del mesodermo paraxial. La adición del factor de crecimiento FGF (factor de crecimiento de fibroblastos, por sus siglas en inglés para *fibroblast growth factor*) junto con la activación de la vía de Wnt favorece la agregación y especificación de los progenitores mesodérmicos [137]. Este proceso se caracteriza por una elevación marcada de los niveles de expresión de *PAX3* de las células. Mediante qPCR se comprobó que todas las líneas diferenciadas



expresaban *PAX3* a partir del día 8. A continuación, se incorporaron los factores de crecimiento HGF (factor de crecimiento de hepatocitos, por sus siglas en inglés para *hepatocyte growth factor*) e IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina I, por sus siglas en inglés para *Insulin-like growth Factor I*). Estos factores están implicados en la activación de las células satélites e inducen a la diferenciación de los progenitores presomíticos hacia un destino miogénico, aumentando la expresión de *PAX7* [75]. A partir del día 16 de diferenciación las células comenzaron a expresar *PAX7*, *MyoD1* y *MYH3*, marcadores característicos de la miogénesis temprana, que alcanzaron su pico de expresión a día 24.

A partir del día 30 de diferenciación, los cultivos consistían en una mezcla de progenitores miogénicos y mioblastos. El hecho de poder expandir y congelar estos progenitores fue clave para la generación del modelo de músculo esquelético, por la disponibilidad de un stock de células congeladas para aplicaciones posteriores. La expansión de progenitores miogénicos no ha sido un proceso sencillo por tratarse de unas células especialmente delicadas que reducen su capacidad de crecimiento y multiplicación al diferenciarse a miofibras [138]. Existen medios de cultivo comerciales para expandir y congelar células miogénicas, pero debido a la falta de suministro de los mismos, desarrollamos un medio de cultivo basándonos en los componentes principales de los medios comerciales y el trabajo publicado por Jarocha y colaboradores [139]. Con este medio de cultivo, que denominamos VkGM, no solo comprobamos que las células mantenían su carácter miogénico tras la descongelación, sino que también eran capaces de resistir a los pases, crecían sin problemas y los cultivos se enriquecían en progenitores miogénicos. Los progenitores miogénicos en VkGM presentaban marcaje positivo para *PAX7* por inmunofluorescencia y expresión conjunta de los genes *PAX3* y *PAX7*.

La segunda etapa del protocolo consistió en la diferenciación final a fibras de músculo esquelético adulto. Para ello nos hemos basado en el protocolo desarrollado por Al Tanoury y colaboradores [116]. Para inducir la diferenciación de los mioblastos a fibras musculares maduras, el medio de cultivo se suplementó con CHIR99021 y suero *knock-out*. Además, se añadió SB-431542, un inhibidor del factor de crecimiento transformante TGF- β (por sus siglas en inglés para *transforming growth factor type β*) que mejora la eficiencia de fusión de las miofibras [140] y prednisolona, un glucocorticoide sintético conocido por promover la diferenciación miogénica [141]. Las fibras musculares obtenidas presentaban valores de expresión elevados de *MYH3*, *MYH8* y *TTN*, todos ellos marcadores típicos de fibras musculares. Asimismo, exhibían un marcaje positivo para los marcadores característicos de las fibras musculares α -actinina, miogenina, MyHC y para *PAX7*, marcador propio de las células satélites.

Uno de los principales problemas que se deben abordar a la hora de diferenciar a células miogénicas a partir de iPSCs es la falta de maduración que se consigue, en la mayor parte de los casos, con los protocolos de diferenciación *in vitro*. El método de diferenciación utilizado en esta tesis doctoral permitió conseguir fibras multinucleadas alineadas con una estructura sarcomérica definida que además presentaban contracción espontánea *in vitro*. Todos estos factores eran claros indicadores de la madurez de los cultivos de músculo esquelético obtenidos empleando este método.

1.3 Validación del modelo de músculo esquelético de la enfermedad de McArdle

Una vez generado músculo esquelético a partir de las líneas de iPSCs de la paciente con la enfermedad de McArdle (McA2.7 y McA2.31) el siguiente paso fue comprobar que mimetizaba los aspectos bioquímicos principales de la enfermedad. Para ello se realizó un análisis de la expresión de *PYGM* en todas las líneas de músculo esquelético generadas mediante qPCR con sondas TaqMan®. Tanto en el músculo generado a partir de iPSCs control NSV44.1 como en el músculo derivado de iPSCs de paciente de McArdle (McA2.7 y McA2.31) se detectó expresión de *PYGM*. Este hecho ya se había observado anteriormente en pacientes con variantes de cambio de sentido, cuyos niveles de ARNm eran similares o de al menos el 40% respecto a los controles sanos [21,142].

Por otro lado, en el músculo esquelético derivado de la línea de iPSCs control NSV44.1 se detectó la presencia de proteína miofosforilasa tanto por inmunodetección como por inmunofluorescencia. Por el contrario, no se detectó miofosforilasa en el músculo esquelético generado a partir de la línea de iPSCs del paciente McA2.7. Estos resultados concuerdan con los publicados anteriormente por García-Consuegra y colaboradores [142] sobre las consecuencias inesperadas de las variantes de cambio de sentido en pacientes con enfermedad de McArdle, como es el caso de la variante que se ha estudiado en la presente tesis doctoral. Estos autores indican que la mayor parte de variantes de cambio de sentido en el gen *PYGM* producen una parada del ribosoma durante la traducción y la posterior degradación del producto proteico aberrante generado [142]. Sin embargo, en el músculo esquelético derivado de iPSCs McA2.31 se detectó una ligera banda a la altura de la miofosforilasa mediante el ensayo de *Western blot*. El hecho de que apareciera miofosforilasa en el músculo derivado de paciente McA2.31 podría deberse a un efecto clonal de esa línea de iPSCs en el que una parte de las proteínas defectuosas de miofosforilasa evitaría la maquinaria de control de la calidad de la célula y por tanto no se estuviera degradando. De cualquier modo, a partir de este momento el clon de iPSCs McA2.31 se descartó para los experimentos posteriores, ya que no cumplía los criterios de validación del modelo.

Otro de los rasgos característicos de la enfermedad de McArdle es la acumulación anormal de glucógeno en las fibras musculares debido a la imposibilidad de degradarlo por el déficit de miofosforilasa. La presencia en exceso de acúmulos de glucógeno en el modelo generado se detectó mediante la tinción de PAS. Esta tinción es de uso rutinario en biopsias de pacientes de McArdle para el diagnóstico de la enfermedad. El músculo esquelético derivado de la línea de iPSCs de la paciente con enfermedad de McArdle McA2.7 presentaba acúmulos anormales de glucógeno, por el contrario, la línea de músculo esquelético control no presentaba dichos acúmulos especialmente intensos en la tinción PAS. Por último, cabe destacar que la contracción espontánea del músculo esquelético generado, únicamente se detectó en la línea control NSV44.1 y no en McA2.7. Este hecho coincide con las observaciones publicadas anteriormente de que los pacientes de McArdle presentan una contractilidad muscular reducida como consecuencia de la reducción de su capacidad de obtención de energía [143].

2. Edición génica mediante el sistema CRISPR/Cas9

El descubrimiento del sistema CRISPR hace más de 10 años revolucionó el campo de la biología ampliando el abanico de aplicaciones de la edición génica en todo tipo de genomas. Mediante el mecanismo CRISPR/Cas9 es posible la edición precisa de un nucleótido determinado para la corrección de una variante patogénica, la introducción de mutaciones para la generación de modelos *knock-in* o la eliminación de genes completos para la generación de modelos *knock-out*, todo ello de una manera sencilla, con una alta eficiencia y a un coste reducido [84].

La combinación de la tecnología de las iPSCs y el sistema de edición CRISPR constituye una valiosa herramienta a la hora de generar modelos de enfermedad, ya que es posible generar líneas de iPSCs isogénicas mediante la corrección de la variante patogénica causante de la enfermedad, que constituirían el control ideal para el modelo generado ya que se elimina el fondo genético en comparación con la línea de estudio [35]. En este sentido, en la presente tesis doctoral se ha llevado a cabo la corrección de la variante patogénica c.2392T>C; p.Trp798Arg en el gen *PYGM* en la línea de iPSCs McA2.7, generando así una línea de iPSCs independiente que podría servir como control isogénico del modelo de músculo esquelético de la enfermedad de McArdle. El protocolo de edición elegido fue el desarrollado por Bruntraeger y colaboradores, basado en el uso de complejos de ribonucleoproteínas para la introducción de la maquinaria CRISPR/Cas9 en las células [118].

2.1 Corrección de la variante patogénica en *PYGM*: c.2392T>C; p.Trp798Arg

Las iPSCs de partida portaban la variante patogénica c.2392T>C; p.Trp798Arg en homocigosis en el gen *PYGM*, por lo que para la generación de una línea control isogénica, en un principio, se intentó realizar una corrección de la mutación en los dos alelos. Tras numerosos intentos de edición con la guía de ARN más prometedora, no se consiguió ningún clon editado en homocigosis.

La eficiencia del proceso de edición puede depender, entre otras cosas, de la eficacia de corte de la guía de ARN. La secuencia de dicha guía es importante tanto para la especificidad de reconocimiento de la zona de interés como para la eficacia de corte de la enzima *Cas9* [144]. Por esta razón, el proceso de diseño previo y el análisis de las posibles guías fueron cruciales. En primer lugar, merece la pena destacar la baja eficiencia de las guías obtenida, razón por la cual se decidió emplear una estrategia de edición con la combinación de las dos guías de ARN, realizando una nucleofección con una y posteriormente con la otra. Esta estrategia mejoró la eficiencia de edición, pero aun así no se consiguió la corrección de la variante patogénica en homocigosis, obteniendo únicamente clones con un solo alelo editado. Además, durante los procesos de edición llevados a cabo se obtuvieron numerosos clones que presentaban inserciones y deleciones de un número variable de nucleótidos al azar. Este hecho podría deberse a que los mecanismos de reparación de la célula que han actuado de forma preferente son del tipo NHEJ o unión de extremos no homólogos. Cuando se realiza un corte de doble cadena en el ADN la reparación puede realizarse mediante la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la vía de reparación dirigida por homología (HDR), la elección de uno u otro depende de la región de ADN, la fase del ciclo celular en que se encuentren las células o del empaquetamiento de la cromatina en esa zona concreta [145]. Para la edición precisa de un nucleótido se necesita que tenga lugar la reparación por la vía HDR, por lo que con el fin de fomentar esta vía se empleó un compuesto comercial que


permitía su potenciación. Además se tuvo especial cuidado en que los cultivos de iPSCs presentasen un crecimiento normal y un buen aspecto los días previos a la nucleofección.

Finalmente, aun teniendo todas las precauciones citadas anteriormente, no se obtuvo edición en homocigosis en ningún clon. Por lo que, de entre todos los clones editados en heterocigosis obtenidos, se seleccionó uno para los experimentos posteriores denominado McA2.7^{Het12}. La dificultad experimentada para obtener una edición de la variante patogénica c.2392T>C; p.Trp798Arg en los dos alelos podría deberse al empaquetamiento local de la cromatina. Se ha descrito que en el proceso de reprogramación las iPSCs presentan una proporción de heterocromatina-eucromatina particular. Se sabe que la cromatina sufre un proceso de reorganización dinámico durante el proceso de adquisición de la pluripotencia y la diferenciación de las iPSCs [146]. Así mismo, se ha estudiado cómo afecta el estado de la cromatina en la reparación tras el corte inducido por la *Cas9*, concluyendo que en situaciones de eucromatina hay una tendencia a la reparación por la vía NHEJ y que la reparación por la vía HDR aumenta cuando se adquiere un estado de heterocromatina [147]. Todo esto nos hace pensar que la dificultad de edición en homocigosis podría deberse al estado concreto de la cromatina en esa región del genoma de la línea de iPSCs McA2.7.

2.2 Validación de la línea de iPSCs McA2.7^{Het12} para su utilización como control isogénico

Una vez establecida la línea de iPSCs McA2.7^{Het12} corregida en heterocigosis se analizaron las posibles modificaciones en dianas no deseadas que pudiesen haber ocurrido durante el proceso de edición. A pesar de la especificidad de las guías de ARN utilizadas, en ocasiones puede ocurrir que la secuencia de dichas guías presente similitud con otras regiones del genoma y se dirija la maquinaria CRISPR hacia esa región, produciendo modificaciones no deseadas que causen problemas como reordenamientos cromosómicos o incluso la pérdida de actividad de genes funcionales alterando tanto el crecimiento adecuado de las células como sus funciones fisiológicas [148]. El primer paso para evitar estas modificaciones no deseadas es el diseño previo de las guías, como se ha comentado anteriormente. En concreto, se tuvo especial cuidado en que las guías presentasen más de tres desajustes con respecto a la secuencia de las posibles dianas, ya que se ha observado que en estos casos es menos probable que se produzca un corte de doble cadena [118]. En segundo lugar, para insertar en las células la maquinaria CRISPR se eligió el método de las ribonucleoproteínas por su menor toxicidad, mayor eficiencia y su rápida degradación tras la edición [149]. Por último, para minimizar el riesgo, se empleó una enzima *Cas9* de alta fidelidad. No obstante, a pesar de todas estas precauciones, la evaluación de las posibles modificaciones en dianas no deseadas se realizó mediante predictores informáticos y posterior secuenciación Sanger de las regiones susceptibles, no encontrándose ninguna modificación en región codificante en la línea de iPSCs McA2.7^{Het12}.

La enfermedad de McArdle presenta un patrón de herencia autosómica recesiva por lo que la presencia de un alelo funcional de *PYGM* sería suficiente para que no se manifiesten síntomas, prueba de ello son la mayoría de personas portadores en heterocigosis de alguna mutación causante de la enfermedad de McArdle que se mantienen asintomáticos durante toda su vida [150]. En este sentido la línea McA2.7^{Het12} podría ser válida como control isogénico de nuestro modelo de músculo esquelético. Una vez confirmado que la línea McA2.7^{Het} obtenida mediante edición con el sistema CRISPR mantenía su pluripotencia y calidad, se diferenció *in vitro* a músculo



esquelético, obteniéndose fibras alargadas que a diferencia de la línea McA2.7, sí presentaban capacidad de contracción espontánea. Este fenómeno de contracción se mantuvo en el tiempo durante al menos 4 semanas (el tiempo máximo que estuvo en cultivo) y era comparable a la contracción de la línea de músculo control NSV44.1. Así mismo, se detectó la presencia de proteína miosforilasa en la línea de músculo esquelético derivada de McA2.7^{Het12} mediante un ensayo de inmunodetección y se comprobó que la actividad específica de la glucógeno fosforilasa presentaba niveles similares a la línea de músculo control NSV44.1, por lo que la línea McA2.7^{Het12} es realmente un buen control isogénico para el modelo de músculo esquelético generado en la presente tesis doctoral. Todas estas pruebas funcionales nos sirvieron también para reforzar la teoría de que no habían ocurrido modificaciones indeseadas en otras regiones del genoma. En consecuencia, este modelo isogénico de músculo esquelético de la enfermedad de McArdle es una herramienta idónea para ser utilizada como plataforma para el rastreo de fármacos.

3. Evaluación del uso de chaperonas farmacológicas como terapia para la enfermedad de McArdle en variantes de cambio de sentido.

La variante patogénica c.2392T>C localizada en el exón 20 del gen *PYGM* produce un cambio de un aminoácido aromático (Trp) en la posición 798 de la proteína por un aminoácido básico (Arg). Ese triptófano, en concreto, es un aminoácido muy conservado tanto en las otras isoformas de la glucógeno fosforilasa (de cerebro y de hígado) como en otras especies más alejadas filogenéticamente, por lo que tiene un papel muy importante en la función de la miofosforilasa [14]. Tal es así, que el cambio en la posición 798 se cree que podría afectar al dominio catalítico c-terminal de la enzima, produciendo un cambio en la estructura secundaria de la proteína y su rápida degradación por los mecanismos de control de la calidad de la célula [151]. Esto concuerda con los resultados obtenidos en nuestro análisis de expresión de ARNm mediante qPCR e inmunodetección, en los que fuimos capaces de detectar niveles de ARNm de *PYGM* pero no de detectar la proteína miofosforilasa en el *Western blot*. Una posible explicación a esto podría ser que la proteína estaría plegándose mal como consecuencia de la presencia de la variante patogénica c.2392T>C; p.Trp798Arg y en consecuencia estaría siendo eliminada por los sistemas de control de calidad de la célula.


Las chaperonas farmacológicas son compuestos de bajo peso molecular que se unen específicamente y de forma reversible a las proteínas mal plegadas estabilizándolas y favoreciendo un plegamiento correcto para que no sean eliminadas por los sistemas de control de calidad de la célula [152]. En los últimos años se está explorando su uso para el tratamiento de enfermedades originadas por variantes patogénicas de cambio de sentido. Las primeras aproximaciones de chaperonas farmacológicas se realizaron con inhibidores competitivos específicos del sitio activo, conocidas como chaperonas farmacológicas de primera generación [104]. Para que una chaperona farmacológica sea útil debe inducir un cambio conformacional en la proteína mal plegada, para poder evitar su degradación por los mecanismos de control de la calidad de la célula. Esta unión debe ser reversible ya que si la proteína consigue saltar los mecanismos de calidad pero se mantiene inhibida no se rescataría la función enzimática de la miofosforilasa. Es por ello que ese equilibrio en la inhibición debe ser muy controlado [152].

En esta tesis doctoral hemos realizado una primera aproximación terapéutica, basada en el uso de chaperonas farmacológicas, utilizando como plataforma el modelo de músculo esquelético isogénico generado a partir de iPSCs obtenidas de una paciente con la enfermedad de McArdle portadora de la variante patogénica c.2392T>C; p.Trp798Arg en el gen *PYGM*. Para ello, se han elegido dos inhibidores de la glucógeno fosforilasa, que podrían actuar como chaperonas farmacológicas: BAY U6751 y CP-91149. BAY U6751 es un inhibidor alostérico específico de la glucógeno fosforilasa muscular que compite con el AMP por su unión al sitio activo, provocando el cambio conformacional de la glucógeno fosforilasa al estado tenso (T) [153]. Por su parte, CP-91149 es un inhibidor selectivo de la glucógeno fosforilasa que provoca el cambio conformacional hacia un estado desfosforilado de la enzima mediante la unión al sitio de dimerización. En el estudio piloto que se ha llevado a cabo con BAY U6751 y CP-91149 no se ha encontrado rescate de la miofosforilasa a nivel proteico con ninguna de las dos moléculas utilizadas. El estudio realizado hasta el momento es muy preliminar. Aunque las concentraciones y tiempos de exposición a los dos posibles fármacos se ajustaron de acuerdo a la bibliografía, probablemente sea necesaria una optimización de las condiciones y estudios más amplios y específicos para poder confirmar que las chaperonas elegidas no ejercen ningún tipo de rescate de la miofosforilasa. Por lo tanto, entre las aproximaciones que se deberían realizar a continuación estaría, en primer lugar, realizar una titulación de distintas concentraciones de BAY U6751 y CP-91149 para optimizar el equilibrio de inhibición o no inhibición, probar distintos tiempos de exposición a las chaperonas o buscar nuevas moléculas pertenecientes al grupo de las chaperonas de segunda generación que estabilicen la proteína sin inhibirla.

4. Utilidad de las iPSCs de la enfermedad de McArdle y del modelo de músculo esquelético humano generado.

La enfermedad de McArdle ha sido considerada tradicionalmente como una miopatía pura por su afectación principal en músculo esquelético. Durante los últimos años, han aparecido casos de pacientes con comorbilidades en otros tejidos que hacen sospechar que la enfermedad de McArdle no sea una miopatía pura y que la ausencia de miofosforilasa no afectaría solo al músculo esquelético sino que podría afectar a otros tejidos con una alta demanda energética y que dependen del glucógeno como fuente de energía. Así se han encontrado pacientes con la enfermedad de McArdle que también presentaban retinopatías [12], afectaciones tiroideas [154], manifestaciones cardíacas [155] o incluso algunos casos de deterioro cognitivo [155]. La investigación en profundidad de las consecuencias de la ausencia de miofosforilasa en otros tejidos diferentes al músculo esquelético sería muy importante a la hora de dilucidar cuál es su relación con la enfermedad de McArdle. En este sentido, las iPSCs generadas en esta tesis doctoral pueden resultar de gran utilidad porque permitirían generar modelos personalizados humanos de epitelio pigmentario de la retina, cardiomiocitos, astrocitos, tiroides, etc... y facilitarían el estudio de los mecanismos fisiopatológicos implicados en su metabolismo.

Por otro lado, la posibilidad de editar las iPSCs generadas y corregir la variante patogénica causante de la enfermedad, además de ser muy útil para ser utilizado como control isogénico, constituye una posible vía hacia la terapia celular. Esta aproximación a la terapia celular de las iPSCs ya se ha llevado a cabo en la degeneración macular asociada a la edad [61] y se está probando en otras patologías entre las que se incluye la enfermedad de Parkinson [156]. De este



modo, las iPSCs de paciente de McArdle editadas mediante CRISPR/Cas9 podrían ser diferenciadas a células miogénicas corregidas, que podrían ser explorables en aplicaciones futuras de terapia celular, con el objetivo de restaurar, en última instancia, la expresión y función *in vivo* de la miofosforilasa.

Por último, el modelo de músculo esquelético isogénico humano portador de la segunda variante patogénica más frecuente en la población española: c.2392T>C; p.Trp798Arg en el gen *PYGM*, que se ha generado en esta tesis doctoral será una herramienta de gran utilidad para el rastreo farmacológico a gran escala. En primer lugar, mediante la realización de cribados farmacológicos de alto rendimiento cuya realización sería viable gracias al hecho de poder generar y expandir progenitores miogénicos para obtener músculo esquelético maduro *in vitro* a mayor escala. En segundo lugar, y en relación con el estudio piloto de chaperonas farmacológicas realizado en la presente tesis doctoral, mediante el cribado a gran escala de pequeñas moléculas que puedan actuar como chaperonas farmacológicas de segunda generación.

Por todo ello, el modelo humano generado constituye una herramienta con gran potencial para la ampliación del conocimiento de la enfermedad de McArdle por parte de la comunidad científica. Este modelo contribuirá además a la posible búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para la segunda variante patogénica más frecuente en cohortes de pacientes de la población española, que en última instancia serviría para mejorar la calidad de vida de estos pacientes, objetivo principal de nuestra investigación.



CONCLUSIONES

1. Se han generado dos líneas de iPSCs independientes, McA2.7 y McA2.31, mediante la reprogramación de PBMCs de una paciente con la enfermedad de McArdle, portadora en homocigosis de la segunda variante patogénica más frecuente en cohortes de pacientes con enfermedad de McArdle en la población española: NM_005609.4: c.2392T>C; p.Trp798Arg.
2. Las líneas de iPSCs McA2.7 y McA2.31 generadas cumplen los criterios de calidad y pluripotencia establecidos para ser consideradas líneas de iPSCs *bona fide*.
3. Se han diferenciado con éxito a músculo esquelético maduro la línea de iPSCs control NSV44.1 y las dos líneas de iPSCs de McArdle, McA2.7 y McA2.31. Para ello, se ha empleado una combinación de protocolos basados en la suplementación de los medios de cultivo con pequeñas moléculas que imitan los procesos que suceden en el desarrollo embrionario. Todas las líneas diferenciadas presentan marcadores miogénicos propios de fibras, así como una estructura sarcomérica estriada y la alineación ordenada de sus miofibras característica de músculo esquelético maduro.
4. El músculo esquelético obtenido a partir de la línea de iPSCs control NSV44.1 presenta contracción espontánea *in vitro* que se mantiene al menos durante siete semanas. No se ha observado contracción en el músculo esquelético generado a partir de las líneas de iPSCs derivadas de la paciente con enfermedad de McArdle McA2.7 y McA2.31.
5. El músculo esquelético control obtenido por diferenciación de la línea NSV44.1 presenta miofosforilasa. Por el contrario, el músculo esquelético derivado de iPSCs de la paciente con enfermedad de McArdle, McA2.7 no presenta miofosforilasa y en él se detectaron los acúmulos de glucógeno característicos de la enfermedad.
6. Se ha editado la línea de iPSCs de McArdle McA2.7 con el sistema de CRISPR/Cas9 corrigiendo, en uno de los alelos, la variante patogénica c.2392T>C; p.Trp798Arg en el gen *PYGM*. La línea generada, denominada McA2.7^{Het12} mantuvo su pluripotencia, calidad e integridad tras el proceso de edición.
7. Se ha diferenciado con éxito la línea McA2.7^{Het12} a músculo esquelético contráctil. Se ha confirmado también que tiene proteína miofosforilasa y una actividad glucógeno fosforilasa similar al músculo obtenido a partir de la línea de iPSCs control NSV44.1. Además se ha observado que la corrección de la mutación en heterocigosis rescata la contracción espontánea de las fibras, fenómeno que no se observó en la línea McA2.7. Esto la valida como control isogénico funcional de nuestro modelo de músculo esquelético humano.
8. El tratamiento con las chaperonas farmacológicas BAY U6751 y CP-91149, en las condiciones testadas, no consigue rescatar los niveles de proteína miofosforilasa del músculo esquelético generado a partir de la línea de iPSCs McA2.7.
9. El modelo de músculo esquelético humano de la enfermedad de McArdle generado a partir de iPSCs constituye una plataforma de gran utilidad para la búsqueda de nuevas

aproximaciones terapéuticas, así como para la mejora del conocimiento de las bases fisiopatológicas que se asocian con la variante c.2392T>C; p.Trp798Arg en el gen *PYGM*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roach, P.J.; Depaoli-roach, A.A.; Hurley, T.D.; Tagliabracci, V.S. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *2016*, *441*, 763–787.
2. Bezborodkina, N.N.; Chestnova, A.Y.; Vorobev, M.L.; Kudryavtsev, B.N. Spatial Structure of Glycogen Molecules in Cells. *Biochem.* **2018**, *83*, 467–482.
3. Özen, H. Glycogen storage diseases: New perspectives. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 2541–2553.
4. Godfrey, R.; Quinlivan, R. Skeletal muscle disorders of glycogenolysis and glycolysis. *Nat. Rev. Neurol.* **2016**, *12*, 393–402.
5. McARDLE, B. Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clin. Sci.* **1951**, *10*, 13–35.
6. City, B. Demonstration of a Glycogenolytic Defect. **1959**, 2044–2058.
7. Santalla, A.; Nogales-Gadea, G.; Ørtenblad, N.; Brull, A.; de Luna, N.; Pinós, T.; Lucia, A. McArdle Disease: A Unique Study Model in Sports Medicine. *Sport. Med.* **2014**, *44*, 1531–1544.
8. Nogales-Gadea, G.; Godfrey, R.; Santalla, A.; Coll-Cantí, J.; Pintos-Morell, G.; Pinós, T.; Arenas, J.; Martín, M.A.; Lucia, A. Genes and exercise intolerance: insights from McArdle disease. *Physiol. Genomics* **2016**, *48*, 93–100.
9. Haller, R.; Vissing, J. Spontaneous “Second Wind” and Glucose-Induced Second “Second Wind” in McArdle Disease. **2016**, *59*.
10. Nogales-Gadea, G.; Santalla, A.; Brull, A.; de Luna, N.; Lucia, A.; Pinós, T. The pathogenomics of McArdle disease—genes, enzymes, models, and therapeutic implications. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2015**, *38*, 221–230.
11. Migocka-Patrzałek, M.; Elias, M. Muscle Glycogen Phosphorylase and Its Functional Partners in Health and Disease. *Cells* **2021**, *1–9*, 268–279.
12. Mahroo, O.A.; Khan, K.N.; Wright, G.; Ockrim, Z.; Scalco, R.S.; Robson, A.G.; Tufail, A.; Michaelides, M.; Quinlivan, R.; Webster, A.R. Retinopathy Associated with Biallelic Mutations in PYGM (McArdle Disease). *Ophthalmology* **2019**, *126*, 320–322.
13. Scalco, R.S.; Lucia, A.; Santalla, A.; Martinuzzi, A.; Vavla, M.; Reni, G.; Toscano, A.; Musumeci, O.; Voermans, N.C.; Kouwenberg, C. V.; et al. Data from the European registry for patients with McArdle disease and other muscle glycogenoses (EUROMAC). *Orphanet J. Rare Dis.* **2020**, *15*, 1–8.
14. Rubio, J.C.; Martín, M.A.; Campos, Y.; Auciello, R.; Cabello, A.; Arenas, J. A missense mutation W797R in the myophosphorylase gene in a spanish patient with McARDLE’S disease. *Muscle and Nerve* **2000**, *23*, 129–131.
15. Katz, A. A century of exercise physiology: key concepts in regulation of glycogen metabolism in skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2022**, *122*, 1751–1772.
16. Llaveró, F.; Arrazola Sastre, A.; Luque Montoro, M.; Martín, M.A.; Arenas, J.; Lucia, A.; Zugaza, J.L. Small GTPases of the Ras superfamily and glycogen phosphorylase regulation in T cells. *Small GTPases* **2021**, *12*, 106–113.
17. Llaveró, F.; Sastre, A.A.; Montoro, M.L.; Gálvez, P.; Lacerda, H.M.; Parada, L.A.; Zugaza, J.L. McArdle disease: New insights into its underlying molecular mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–15.
18. Nogales-Gadea, G.; Brull, A.; Santalla, A.; Andreu, A.L.; Arenas, J.; Martín, M.A.; Lucia, A.; de Luna, N.; Pinós, T. McArdle Disease: Update of Reported Mutations and Polymorphisms in the PYGM Gene. *Hum. Mutat.* **2015**, *36*, 669–678.
19. Sohn, E.H.; Kim, H.S.; Lee, A.Y.; Fukuda, T.; Sugie, H.; Kim, D.S. A novel PYGM mutation in a Korean patient with McArdle disease: The role of nonsense-mediated mRNA decay.

- Neuromuscul. Disord.* **2008**, *18*, 886–889.
20. Ollivier, K.; Hogrel, J.Y.; Gomez-Merino, D.; Romero, N.B.; Laforêt, P.; Eymard, B.; Portero, P. Exercise tolerance and daily life in McArdle's disease. *Muscle and Nerve* **2005**, *31*, 637–641.
 21. Carvalho, A.A.S.; Christofolini, D.M.; Perez, M.M.; Alves, B.C.A.; Rodart, I.; Figueiredo, F.W.S.; Turke, K.C.; Feder, D.; Junior, M.C.F.; Nucci, A.M.; et al. PYGM mRNA expression in McArdle disease: Demographic, clinical, morphological and genetic features. *PLoS One* **2020**, *15*, 1–10.
 22. Martinuzzi, A.; Sartori, E.; Fanin, M.; Nascimbeni, A.; Valente, L.; Angelini, C.; Siciliano, G.; Mongini, T.; Tonin, P.; Tomelleri, G.; et al. Phenotype modulators in myophosphorylase deficiency. *Ann. Neurol.* **2003**, *53*, 497–502.
 23. Quinlivan, R.; Buckley, J.; Twist, A.; Ball, S.; Duno, M.; Bruno, C.; Cassandrini, D.; Roberts, M.; Winer, J.; Quinlivan, R.; et al. McArdle Disease : a clinical review. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, *2010* **2011**, *81*, 1182.
 24. Scalco, R.S.; Morrow, J.M.; Booth, S.; Chatfield, S.; Godfrey, R.; Quinlivan, R. Misdiagnosis is an important factor for diagnostic delay in McArdle disease. *Neuromuscul. Disord.* **2017**, *27*, 852–855.
 25. Rubio, J.C.; Garcia-Consuegra, I.; Nogales-Gadea, G.; Blazquez, A.; Cabello, A.; Lucia, A.; Andreu, A.L.; Arenas, J.; Martín, M.A. A proposed molecular diagnostic flowchart for myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in blood samples from Spanish patients. *Hum. Mutat.* **2007**, *28*, 203–204.
 26. Lucia, A.; Nogales-Gadea, G.; Pérez, M.; Martín, M.A.; Andreu, A.L.; Arenas, J. McArdle disease: What do neurologists need to know? *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2008**, *4*, 568–577.
 27. Taylor, R.L.; Davis, M.; Turner, E.; Brull, A.; Pinos, T.; Cabrera, M.; Nowak, K.J. Clinical utility gene card for McArdle disease. *Eur. J. Hum. Genet.* **2018**, *26*, 758–764.
 28. Kang, J.-H.; Park, J.-H.; Park, J.-S.; Lee, S.-K.; Lee, S.; Baik, H.-W. Molecular diagnosis of McArdle disease using whole-exome sequencing. *Exp. Ther. Med.* **2021**, *22*, 1–7.
 29. de Luna, N.; Brull, A.; Lucia, A.; Santalla, A.; Garatachea, N.; Martí, R.; Andreu, A.L.; Pinós, T. PYGM expression analysis in white blood cells: A complementary tool for diagnosing McArdle disease? *Neuromuscul. Disord.* **2014**, *24*, 1079–1086.
 30. Angelos, S.; Valberg, S.J.; Smith, B.P.; McQuarrie, P.S.; Shanske, S.; Tsujino, S.; DiMauro, S.; Cardinet, G.H. Myophosphorylase deficiency associated with rhabdomyolysis and exercise intolerance in 6 related charolais cattle. *Muscle Nerve* **1995**, *18*, 736–740.
 31. Villarreal-Salazar, M.; Brull, A.; Nogales-Gadea, G.; Andreu, A.L.; Martín, M.A.; Arenas, J.; Santalla, A.; Lucia, A.; Vissing, J.; Krag, T.O.; et al. Preclinical Research in McArdle Disease: A Review of Research Models and Therapeutic Strategies. *Genes (Basel)*. **2022**, *13*, 1–18.
 32. Nogales-Gadea, G.; Pinós, T.; Lucia, A.; Arenas, J.; Camara, Y.; Brull, A.; De Luna, N.; Martín, M.A.; Garcia-Arumí, E.; Martí, R.; et al. Knock-in mice for the R50X mutation in the PYGM gene present with McArdle disease. *Brain* **2012**, *135*, 2048–2057.
 33. Migocka-Patrzałek, M.; Lewicka, A.; Elias, M.; Daczewska, M. The effect of muscle glycogen phosphorylase (Pygm) knockdown on zebrafish morphology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2020**, *118*, 105658.
 34. Nogales-Gadea, G.; Mormeneo, E.; García-Consuegra, I.; Rubio, J.C.; Orozco, A.; Arenas, J.; Martín, M.A.; Lucia, A.; Gómez-Foix, A.M.; Martí, R.; et al. Expression of glycogen phosphorylase isoforms in cultured muscle from patients with McArdle's disease carrying the p.R771PfsX33 PYGM mutation. *PLoS One* **2010**, *5*.
 35. Ortuño-Costela, M. del C.; Cerrada, V.; Moreno-Izquierdo, A.; García-Consuegra, I.; Laberthonnière, C.; Delourme, M.; Garesse, R.; Arenas, J.; Fuster García, C.F.; García García,

- G.G.; et al. Generation of the First Human In Vitro Model for McArdle Disease Based on iPSC Technology. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13964.
36. Munguía-Izquierdo, D.; Santalla, A.; Lucia, A. Cardiorespiratory fitness, physical activity, and quality of life in patients with mcardle disease. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2015**, *47*, 799–808.
 37. Rodríguez-Gómez, I.; Santalla, A.; Díez-Bermejo, J.; Munguía-Izquierdo, D.; Alegre, L.M.; Nogales-Gadea, G.; Arenas, J.; Martín, M.Á.; Lucía, A.; Ara, I. A New Condition in McArdle Disease: Poor Bone Health - Benefits of an Active Lifestyle. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2018**, *50*, 3–10.
 38. Nogales-Gadea, G.; Santalla, A.; Ballester-Lopez, A.; Arenas, J.; Martín, M.A.; Godfrey, R.; Pinís, T.; Pintos-Morell, G.; Coll-Cantí, J.; Lucia, A. Exercise and preexercise nutrition as treatment for McArdle disease. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2016**, *48*, 673–679.
 39. Quinlivan, R.; Vissing, J.; Hilton-Jones, D.; Buckley, J. Physical training for McArdle disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2009**.
 40. Pietrusz, A.; Scalco, R.S.; Quinlivan, R. Resistance Exercise Training in McArdle Disease: Myth or Reality? *Case Rep. Neurol. Med.* **2018**, *2018*, 1–6.
 41. Quinlivan, R.; Martinuzzi, A.; Schoser, B. Pharmacological and nutritional treatment for McArdle disease (Glycogen Storage Disease type V). *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**, *2014*.
 42. O'Reilly, D.S.J. The effect of oral sucrose on exercise tolerance in patients with McArdle's disease. *Ann. Clin. Biochem.* **2004**, *41*, 255.
 43. Andersen, S.T.; Vissing, J. Carbohydrate- and protein-rich diets in McArdle disease: Effects on exercise capacity. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2008**, *79*, 1359–1363.
 44. Tarrasó, G.; Real-Martinez, A.; Parés, M.; Romero-Cortadellas, L.; Puigros, L.; Moya, L.; Luna, N.; Brull, A.; Martín, M.A.; Arenas, J.; et al. Absence of p.R50X Pygm read-through in McArdle disease cellular models. *DMM Dis. Model. Mech.* **2020**, *13*.
 45. Howell, J.M.C.; Walker, K.R.; Davies, L.; Dunton, E.; Everaardt, A.; Laing, N.; Karpati, G. Adenovirus and adeno-associated virus-mediated delivery of human myophosphorylase cDNA and LacZ cDNA to muscle in the ovine model of McArdle's disease: Expression and re-expression of glycogen phosphorylase. *Neuromuscul. Disord.* **2008**, *18*, 248–258.
 46. McNamara, E.L.; Taylor, R.L.; Clayton, J.S.; Goullee, H.; Dilworth, K.L.; Pinós, T.; Brull, A.; Alexander, I.E.; Lisowski, L.; Ravenscroft, G.; et al. Systemic AAV8-mediated delivery of a functional copy of muscle glycogen phosphorylase (Pygm) ameliorates disease in a murine model of McArdle disease. *Hum. Mol. Genet.* **2020**, *29*, 20–30.
 47. Detich, N.; Bovenzi, V.; Szyf, M. Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 27586–27592.
 48. Howell, J.M.C.; Dunton, E.; Creed, K.E.; Quinlivan, R.; Sewry, C. Investigating sodium valproate as a treatment for McArdle disease in sheep. *Neuromuscul. Disord.* **2015**, *25*, 111–119.
 49. Scalco, R.S.; Stemmerik, M.; Løkken, N.; Vissing, C.R.; Madsen, K.L.; Michalak, Z.; Pattni, J.; Godfrey, R.; Samandouras, G.; Bassett, P.; et al. Results of an open label feasibility study of sodium valproate in people with McArdle disease. *Neuromuscul. Disord.* **2020**, *30*, 734–741.
 50. Arias, M.E.; Felmer, R. Biology of embryonic stem cells (ES cells) in different species: potential applications in biomedicine. *Arch Med Vet* **2009**, *41*, 185–195.
 51. Martin, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 7634–7638.
 52. Evans M J; Kaufman M H Establishment in culture of pluripotential cells from mouse

- embryos. *Nature* **1981**, *292*, 154–156.
53. Mora, C.; Serzanti, M.; Consiglio, A.; Memo, M.; Dell’Era, P. Clinical potentials of human pluripotent stem cells. *Cell Biol. Toxicol.* **2017**, *33*, 351–360.
 54. Thomson, J.A. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (80-.)*. **1998**, *282*, 1145–1147.
 55. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676.
 56. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872.
 57. Nassor, F.; Jarray, R.; Biard, D.S.F.; Maïza, A.; Papy-Garcia, D.; Pavoni, S.; Deslys, J.P.; Yates, F. Long Term Gene Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells and Cerebral Organoids to Model a Neurodegenerative Disease. *Front. Cell. Neurosci.* **2020**, *14*, 1–7.
 58. Takeishi, K.; Collin, A.; Wang, Y.; Soto-Gutierrez, A. Assembly and Function of a Bioengineered Human Liver for Transplantation Generated Solely from Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* **2020**, *31*, 498–503.
 59. Karagiannis, P.; Takahashi, K.; Saito, M.; Yoshida, Y.; Okita, K.; Watanabe, A.; Inoue, H.; Yamashita, J.K.; Todani, M.; Nakagawa, M.; et al. Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 79–114.
 60. Ortuño-Costela, M.D.C.; Cerrada, V.; García-López, M.; Gallardo, M.E. The Challenge of Bringing iPSCs to the Patient. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–16.
 61. Mandai, M.; Watanabe, A.; Kurimoto, Y.; Hirami, Y.; Morinaga, C.; Daimon, T.; Fujihara, M.; Akimaru, H.; Sakai, N.; Shibata, Y.; et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1038–1046.
 62. Ilic, D.; Devito, L.; Miere, C.; Codognotto, S. Human embryonic and induced pluripotent stem cells in clinical trials. *Br. Med. Bull.* **2015**, *116*, 19–27.
 63. Taylor, C.J.; Peacock, S.; Chaudhry, A.N.; Bradley, J.A.; Bolton, E.M. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell* **2012**, *11*, 147–52.
 64. Huang, C.Y.; Liu, C.L.; Ting, C.Y.; Chiu, Y.T.; Cheng, Y.C.; Nicholson, M.W.; Hsieh, P.C.H. Human iPSC banking: barriers and opportunities. *J. Biomed. Sci.* **2019**, *26*, 87.
 65. Elitt, M.S.; Barbar, L.; Tesar, P.J. Drug screening for human genetic diseases using iPSC models. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, R89–R98.
 66. Ryu, S.; Chu, P.H.; Malley, C.; Braisted, J.; Ormanoglu, P.; Huang, R.; Itkin, M.; Itkin, Z.; Shinn, P.; Klumpp-Thomas, C.; et al. Human Pluripotent Stem Cells for High-Throughput Drug Screening and Characterization of Small Molecules. *Methods Mol. Biol.* **2022**, *2454*, 811–827.
 67. Imaizumi, Y.; Okano, H. Modeling human neurological disorders with induced pluripotent stem cells. *J. Neurochem.* **2014**, *129*, 388–399.
 68. Nakamura, K.; Hirano, K.; Wu, S.M. iPSC Cell Modeling of Cardiometabolic Diseases. *J. cardiovascular Transl. Res.* **2013**, *6*, 46–53.
 69. del Carmen Ortuño-Costela, M.; García-López, M.; Cerrada, V.; Gallardo, M.E. iPSCs: A powerful tool for skeletal muscle tissue engineering. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 3784–3794.
 70. Exeter, D.; Connell, D.A. Skeletal muscle: Functional anatomy and pathophysiology. *Semin. Musculoskelet. Radiol.* **2010**, *14*, 97–105.
 71. Collins, C.A.; Olsen, I.; Zammit, P.S.; Heslop, L.; Petrie, A.; Partridge, T.A.; Morgan, J.E. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle

- satellite cell niche. *Cell* **2005**, *122*, 289–301.
72. Frontera, W.R.; Ochala, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif. Tissue Int.* **2015**, *96*, 183–195.
 73. Bentzinger, C.F.; Wang, Y.X.; Rudnicki, M.A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*.
 74. Pourquié, O. A brief history of the segmentation clock. *Dev. Biol.* **2022**, *485*, 24–36.
 75. Chal, J.; Pourquié, O. Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Dev.* **2017**, *144*, 2104–2122.
 76. Gioftsidi, S.; Relaix, F.; Mourikis, P. The Notch signaling network in muscle stem cells during development, homeostasis, and disease. *Skelet. Muscle* **2022**, *12*, 1–12.
 77. Lehka, L.; Rędownicz, M.J. Mechanisms regulating myoblast fusion: A multilevel interplay. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2020**, *104*, 81–92.
 78. Tapscott, S.J.; Davis, R.L.; Thayer, M.J.; Cheng, P.F.; Weintraub, H.; Lassar, A.B. MyoD1: A nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science (80-)*. **1988**, *242*, 405–411.
 79. Yan, L.; Rodríguez-de-laRosa, A.; Pourquié, O. Human muscle production in vitro from pluripotent stem cells: Basic and clinical applications. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2021**, *119*, 39–48.
 80. Rao, L.; Qian, Y.; Khodabukus, A.; Ribar, T.; Bursac, N. Engineering human pluripotent stem cells into a functional skeletal muscle tissue. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 126.
 81. Uchimura, T.; Otomo, J.; Sato, M.; Sakurai, H. A human iPS cell myogenic differentiation system permitting high-throughput drug screening. *Stem Cell Res.* **2017**, *25*, 98–106.
 82. Chal, J.; Al Tanoury, Z.; Hestin, M.; Gobert, B.; Aivio, S.; Hick, A.; Cherrier, T.; Nesmith, A.P.; Parker, K.K.; Pourquié, O. Generation of human muscle fibers and satellite-like cells from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 1833–1850.
 83. Kozovska, Z.; Rajcaniova, S.; Munteanu, P.; Dzacovska, S.; Demkova, L. CRISPR: History and perspectives to the future. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *141*, 111917.
 84. Doudna, J.A.; Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (80-)*. **2014**, *346*.
 85. Alonso-Lerma, B.; Jabalera, Y.; Samperio, S.; Morin, M.; Fernandez, A.; Hille, L.T.; Silverstein, R.A.; Quesada-Ganuza, A.; Reifs, A.; Fernández-Peñalver, S.; et al. Evolution of CRISPR-associated endonucleases as inferred from resurrected proteins. *Nat. Microbiol.* **2023**, *8*, 77–90.
 86. Jiang, F.; Doudna, J.A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **2017**, *46*, 505–529.
 87. Anders, C.; Niewoehner, O.; Duerst, A.; Jinek, M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. **2015**, *513*, 569–573.
 88. Hussmann, J.A.; Ling, J.; Ravisankar, P.; Yan, J.; Cirincione, A.; Xu, A.; Simpson, D.; Yang, D.; Bothmer, A.; Cotta, C.; et al. Mapping the Genetic Landscape of DNA Double-strand Break Repair. **2022**, *184*, 5653–5669.
 89. Zhao, B.; Rothenberg, E.; Ramsden, D.A.; Lieber, M.R.; Angeles, L.; Angeles, L.; Comprehensive, N.; Angeles, L.; Section, C.B.; Hill, C. The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *21*, 765–781.
 90. Yang, H.; Ren, S.; Yu, S.; Pan, H.; Li, T.; Ge, S.; Zhang, J.; Xia, N. Methods favoring homology-directed repair choice in response to crispr/cas9 induced-double strand breaks. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–20.
 91. Roshanravan, N.; Tutunchi, H.; Najafipour, F.; Dastouri, M.; Ghaffari, S.; Jebeli, A. A glance at

- the application of CRISPR/Cas9 gene-editing technology in cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Thorac. Res.* **2022**, *14*, 77–83.
92. Kurishev, A.O.; Karpov, D.S.; Nadolinskaia, N.I.; Goncharenko, A. V.; Golimbet, V.E. CRISPR/Cas-Based Approaches to Study Schizophrenia and Other Neurodevelopmental Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*.
93. Akhtar, M.; Jamal, T.; Khan, M.; Khan, S.R.; Haider, S.; Jalil, F. CRISPR Cas System: An efficient tool for cancer modelling. *J. Pak. Med. Assoc.* **2021**, *71*, 718–724.
94. Dhoke, N.R.; Kim, H.; Selvaraj, S.; Azzag, K.; Zhou, H.; Oliveira, N.A.J.; Tungtur, S.; Ortiz-Cordero, C.; Kiley, J.; Long Lu, Q.; et al. A universal gene correction approach for FKR- associated dystroglycanopathies to enable autologous cell therapy. *Cell Rep.* **2021**, *13*.
95. Kuscu, C.; Kuscu, C.; Bajwa, A.; Eason, J.D.; Maluf, D.; Mas, V.R. Applications of CRISPR technologies in transplantation. *Am. J. Transplant.* **2020**, *20*, 3285–3293.
96. Savić, N.; Schwank, G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Transl. Res.* **2016**, *168*, 15–21.
97. Xie, F.; Ye, L.; Chang, J.C.; Beyer, A.I.; Wang, J.; Muench, M.O.; Kan, Y.W. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res.* **2014**, *24*, 1526–1533.
98. Gillmore, J.D.; Gane, E.; Taubel, J.; Kao, J.; Fontana, M.; Maitland, M.L.; Seitzer, J.; O’Connell, D.; Walsh, K.R.; Wood, K.; et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 493–502.
99. Luther, D.; Lee, Y.; Nagaraj, H.; Scaletti, F.; Rotello, V.. Delivery Approaches for CRISPR/Cas9 Therapeutics In Vivo: Advances and Challenges. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2018**, *15*, 905–913.
100. Naeem, M.; Majeed, S.; Hoque, M.Z.; Ahmad, I. Latest Developed Strategies to Minimize the Off-Target Effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing. *Cells* **2020**, *9*, 1–23.
101. Araki, K.; Nagata, K. Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, 1–25.
102. Chaudhuri, T.K.; Paul, S. Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS J.* **2006**, *273*, 1331–1349.
103. Boyd, R.E.; Lee, G.; Rybczynski, P.; Benjamin, E.R.; Khanna, R.; Wustman, B.A.; Valenzano, K.J. Pharmacological chaperones as therapeutics for lysosomal storage diseases. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2705–2725.
104. Leidenheimer, N.J. Pharmacological chaperones: Beyond conformational disorders. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2018**, *245*, 135–153.
105. Fan, J.Q. A counterintuitive approach to treat enzyme deficiencies: Use of enzyme inhibitors for restoring mutant enzyme activity. *Biol. Chem.* **2008**, *389*, 1–11.
106. Loo, T.W.; Clarke, D.M. Chemical and pharmacological chaperones as new therapeutic agents. *Expert Rev. Mol. Med.* **2007**, *9*, 1–18.
107. Parenti, G. Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: From concept to clinics. *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 268–279.
108. Moran, N. FDA approves Galafold, a triumph for Amicus. *Nat. Biotechnol.* **2018**, *36*, 913.
109. McCafferty, E.H.; Scott, L.J. Migalastat: A Review in Fabry Disease. *Drugs* **2019**, *79*, 543–554.
110. Tran, M.L.; Génisson, Y.; Ballereau, S.; Dehoux, C. Second-Generation Pharmacological Chaperones : *Molecules* **2020**, *25*, 3145.
111. Urquiza, P.; Laín, A.; Sanz-Parra, A.; Moreno, J.; Bernardo-Seisdedos, G.; Dubus, P.; González, E.; Gutiérrez-De-Juan, V.; García, S.; Eraña, H.; et al. Repurposing ciclopirox as a pharmacological chaperone in a model of congenital erythropoietic porphyria. *Sci. Transl.*

- Med.* **2018**, *10*.
112. Galera-Monge, T.; Zurita-Díaz, F.; Canals, I.; Hansen, M.G.; Rufián-Vázquez, L.; Ehinger, J.K.; Elmér, E.; Martin, M.A.; Garesse, R.; Ahlenius, H.; et al. Mitochondrial dysfunction and calcium dysregulation in leigh syndrome induced pluripotent stem cell derived neurons. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*.
 113. Maniatis T, Fritsch E, S.J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*; 1982; Vol. 11; ISBN 0-87969-136-0.
 114. Sharma, A.; Mücke, M.; Seidman, C.E. Human Induced Pluripotent Stem Cell Production and Expansion from Blood using a Non-Integrating Viral Reprogramming Vector. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2018**, *122*, e58.
 115. Kim, Y.; Rim, Y.A.; Yi, H.; Park, N.; Park, S.H.; Ju, J.H. The Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Blood Cells: An Efficient Protocol Using Serial Plating of Reprogrammed Cells by Centrifugation. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*.
 116. Al Tanoury, Z.; Zimmerman, J.F.; Rao, J.; Sieiro, D.; McNamara, H.M.; Cherrier, T.; Rodríguez-DelaRosa, A.; Hick-Colin, A.; Bousson, F.; Fugier-Schmucker, C.; et al. Prednisolone rescues Duchenne muscular dystrophy phenotypes in human pluripotent stem cell-derived skeletal muscle in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, *118*, 1–12.
 117. Schaart, G.; Hesselink, R.P.; Keizer, H.A.; Van Kranenburg, G.; Drost, M.R.; Hesselink, M.K.C. A modified PAS stain combined with immunofluorescence for quantitative analyses of glycogen in muscle sections. *Histochem. Cell Biol.* **2004**, *122*, 161–169.
 118. Bruntraeger, M.; Byrne, M.; Long, K.; Bassett, A.R. Editing the Genome of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; 2019; Vol. 1961, pp. 153–183.
 119. Imanishi, M.; Negi, S.; Sugiura, Y. A Rapid and General Assay for Monitoring Endogenous Gene Modification. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *649*, 337–349.
 120. Relaix, F.; Rocancourt, D.; Mansouri, A.; Buckingham, M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* **2005**, *435*, 948–953.
 121. Pudelko-Malik, N.; Wiśniewski, J.; Drulis-Fajdasz, D.; Mlynarz, P. Validated liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of glycogenolysis phosphorylase inhibitor in mouse tissues – 5-isopropyl-4-(2-chlorophenyl)-1-ethyl-1,4-dihydro-6-methyl-2,3,5-pyridinetricarboxylic acid ester disodium salt h. *J. Sep. Sci.* **2022**, *45*, 3791–3799.
 122. Rocha, S.; Lucas, M.; Araújo, A.N.; Corvo, M.L.; Fernandes, E.; Freitas, M. Optimization and validation of an in vitro standardized glycogen phosphorylase activity assay. *Molecules* **2021**, *26*, 1–15.
 123. Santalla, A.; Nogales-Gadea, G.; Encinar, A.B.; Vieitez, I.; González-Quintana, A.; Serrano-Lorenzo, P.; Consuegra, I.G.; Asensio, S.; Ballester-Lopez, A.; Pintos-Morell, G.; et al. Genotypic and phenotypic features of all Spanish patients with McArdle disease: A 2016 update. *BMC Genomics* **2017**, *18*.
 124. Sahlgren Bendtsen, K.M.; Hall, V.J. The Breakthroughs and Caveats of Using Human Pluripotent Stem Cells in Modeling Alzheimer’s Disease. *Cells* **2023**, *12*.
 125. Álvarez, M.; Ruiz-Sala, P.; Pérez, B.; Desviat, L.R.; Richard, E. Dysregulated Cell Homeostasis and miRNAs in Human iPSC-Derived Cardiomyocytes from a Propionic Acidemia Patient with Cardiomyopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2182.
 126. Karami, Z.; Moradi, S.; Eidi, A.; Soleimani, M.; Jafarian, A. Induced pluripotent stem cells: Generation methods and a new perspective in COVID-19 research. *Front. Cell Dev. Biol.* **2023**, *10*, 1–15.

127. Ray, A.; Joshi, J.M.; Sundaravadivelu, P.K.; Raina, K.; Lenka, N.; Kaveeshwar, V.; Thummer, R.P. An Overview on Promising Somatic Cell Sources Utilized for the Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev. Reports* **2021**, *17*, 1954–1974.
128. Raab, S.; Klingenstein, M.; Liebau, S.; Linta, L. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells Int.* **2014**, *2014*.
129. Schlaeger, T.M. Nonintegrating human somatic cell reprogramming methods. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2018**, *163*, 1–21.
130. O'Connor, M.D.; Kardel, M.D.; Iosfina, I.; Youssef, D.; Lu, M.; Li, M.M.; Vercauteren, S.; Nagy, A.; Eaves, C.J. Alkaline Phosphatase-Positive Colony Formation Is a Sensitive, Specific, and Quantitative Indicator of Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **2008**, *26*, 1109–1116.
131. Feng, C.; Jia, Y.D.; Zhao, X.Y. Pluripotency of Induced Pluripotent Stem Cells. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* **2013**, *11*, 299–303.
132. Zhang, Y.; Wei, J.; Cao, J.; Zhang, K.; Peng, Y.; Deng, H.; Kang, J.; Pan, G.; Zhang, Y.; Fu, B.; et al. Requirements for human-induced pluripotent stem cells. *Cell Prolif.* **2022**, *55*, 1–7.
133. Malik, N.; Rao, M.S. A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *997*, 23–33.
134. Vaz, I.M.; Borgonovo, T.; Kasai-Brunswick, T.H.; Dos Santos, D.S.; Mesquita, F.C.P.; Vasques, J.F.; Gubert, F.; Rebelatto, C.L.K.; Senegaglia, A.C.; Brofman, P.R.S. Chromosomal aberrations after induced pluripotent stem cells reprogramming. *Genet. Mol. Biol.* **2021**, *44*.
135. Rehakova, D.; Souralova, T.; Koutna, I. Clinical-grade human pluripotent stem cells for cell therapy: Characterization strategy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*.
136. Xu, N.; Wu, J.; Ortiz-Vitali, J.L.; Li, Y.; Darabi, R. Directed differentiation of human pluripotent stem cells toward skeletal myogenic progenitors and their purification using surface markers. *Cells* **2021**, *10*.
137. Tani, S.; Chung, U. il; Ohba, S.; Hojo, H. Understanding paraxial mesoderm development and sclerotome specification for skeletal repair. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 1166–1177.
138. Kino-Oka, M.; Chowdhury, S.R.; Muneyuki, Y.; Manabe, M.; Saito, A.; Sawa, Y.; Taya, M. Automating the expansion process of human skeletal muscle myoblasts with suppression of myotube formation. *Tissue Eng. - Part C Methods* **2009**, *15*, 717–728.
139. Jarocho, D.; Stangel-Wojcikiewicz, K.; Basta, A.; Majka, M. Efficient myoblast expansion for regenerative medicine use. *Int. J. Mol. Med.* **2014**, *34*, 83–91.
140. Melendez, J.; Sieiro, D.; Salgado, D.; Morin, V.; Dejardin, M.J.; Zhou, C.; Mullen, A.C.; Marcelle, C. TGF β signalling acts as a molecular brake of myoblast fusion. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1–11.
141. Braun, S.; Tranchant, C.; Vilquin, J.T.; Labouret, P.; Warter, J.M.; Poindron, P. Stimulating effects of prednisolone on acetylcholine receptor expression and myogenesis in primary culture of newborn rat muscle cells. *J. Neurol. Sci.* **1989**, *92*, 119–131.
142. Garcia-Consuegra, I.; Asensio-Peña, S.; Ballester-Lopez, A.; Francisco-Velilla, R.; Pinos, T.; Pintos-Morell, G.; Coll-Cantí, J.; González-Quintana, A.; Andreu, A.L.; Arenas, J.; et al. Missense mutations have unexpected consequences: The McArdle disease paradigm. *Hum. Mutat.* **2018**, *39*, 1338–1343.
143. Rae, D.E.; Noakes, T.D.; San Juan, A.F.; Pérez, M.; Nogales-Gadea, G.; Ruiz, J.R.; Morán, M.; Martín, M.A.; Andreu, A.L.; Arenas, J.; et al. Excessive skeletal muscle recruitment during strenuous exercise in McArdle patients. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2010**, *110*, 1047–1055.
144. Hiranniramol, K.; Chen, Y.; Chen, Y.; Liu, W.; Liu, W.; Wang, X. Generalizable sgRNA design for improved CRISPR/Cas9 editing efficiency. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 2684–2689.

145. Schep, R.; Brinkman, E.K.; Leemans, C.; Vergara, X.; van der Weide, R.H.; Morris, B.; van Schaik, T.; Manzo, S.G.; Peric-Hupkes, D.; van den Berg, J.; et al. Impact of chromatin context on Cas9-induced DNA double-strand break repair pathway balance. *Mol. Cell* **2021**, *81*, 2216-2230.e10.
146. Pelham-Webb, B.; Murphy, D.; Apostolou, E. Dynamic 3D Chromatin Reorganization during Establishment and Maintenance of Pluripotency. *Stem Cell Reports* **2020**, *15*, 1176–1195.
147. Janssen, J.M.; Chen, X.; Liu, J.; Gonçalves, M.A.F.V. The Chromatin Structure of CRISPR-Cas9 Target DNA Controls the Balance between Mutagenic and Homology-Directed Gene-Editing Events. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2019**, *16*, 141–154.
148. Manghwar, H.; Li, B.; Ding, X.; Hussain, A.; Lindsey, K.; Zhang, X.; Jin, S. CRISPR/Cas Systems in Genome Editing: Methodologies and Tools for sgRNA Design, Off-Target Evaluation, and Strategies to Mitigate Off-Target Effects. *Adv. Sci.* **2020**, *7*.
149. Bloomer, H.; Khirallah, J.; Li, Y.; Xu, Q. CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein-mediated genome and epigenome editing in mammalian cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2022**, *181*, 1–42.
150. Andersen, S.T.; Dunø, M.; Schwartz, M.; Vissing, J. Do carriers of PYGM mutations have symptoms of McArdle disease? *Neurology* **2006**, *67*, 716–718.
151. Fcmandcz, R.; Navarro, C.; Andren, A.L.; Bruno, C.; Shanskic, S.; Gámecz, J.; Teijcira, S.; Hemándcz, I.; Teijeiro, A.; Fernándcz, J.M.; et al. A novel missense mutation (W797R) in the myophosphorylase gene in spanish patients with McArdle disease. *Arch. Neurol.* **2000**, *57*, 217–219.
152. Gil-Martínez, J.; Bernardo-Seiseddos, G.; Mato, J.M.; Millet, O. The use of pharmacological chaperones in rare diseases caused by reduced protein stability. *Proteomics* **2022**, 1–12.
153. Zographos, S.E.; Oikonomakos, N.G.; Tsitsanou, K.E.; Leonidas, D.D.; Chrysina, E.D.; Skamnaki, V.T.; Bischoff, H.; Goldmann, S.; Watson, K.A.; Johnson, L.N. The structure of glycogen phosphorylase b with an alkyl-dihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor. *Structure* **1997**, *5*, 1413–1425.
154. Pizzamiglio, C.; Mahroo, O.A.; Khan, K.N.; Patasin, M.; Quinlivan, R. Phenotype and genotype of 197 British patients with McArdle disease: An observational single-centre study. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2021**, *44*, 1409–1418.
155. Jones, D.M.; Lopes, L.; Quinlivan, R.; Elliott, P.M.; Khanji, M.Y. Cardiac manifestations of McArdle disease. *Eur. Heart J.* **2019**, *40*, 397.
156. Yeap, Y.J.; Teddy, T.J.W.; Lee, M.J.; Goh, M.; Lim, K.L. From 2D to 3D: Development of Monolayer Dopaminergic Neuronal and Midbrain Organoid Cultures for Parkinson’s Disease Modeling and Regenerative Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*.

ANEXOS

Anexo I:

Vídeos suplementarios

Nota: Los vídeos suplementarios S1-S7 se encuentran adjuntos en formato MPEG-4 en la memoria que se adjunta a esta tesis doctoral.

Vídeos S1-S4: Ejemplos representativos de la contracción espontánea del músculo esquelético derivado de la línea de iPSCs NSV44.1 tras 2 semanas de diferenciación (S1 y S2), 4 semanas de diferenciación (S3) y 6 semanas de diferenciación (S4).

Vídeos S5-S7: Ejemplos representativos de la contracción espontánea del músculo esquelético derivado de la línea de iPSCs McA2.7^{Het12} tras 2 semanas de diferenciación.

Anexo II:

Relación de publicaciones obtenidas durante el desarrollo de la presente tesis doctoral.

1. Ortuño-Costela MDC*, **Cerrada V***, García-López M*, Arenas J, Martínez J, Lucía A, Garesse R, Gallardo ME. (2019). *Derivation of an aged mouse induced pluripotent stem cell line, IISHDOi005-A*. Stem Cell Research 36, 101418. * Estos autores han contribuido equitativamente.
2. Ortuño-Costela, M.C*, **Cerrada, V***, García-López, M*, Gallardo, ME. (2019). *iPSCs: a powerful tool for skeletal muscle tissue engineering*. Journal of Cellular and Molecular Medicine 23 (6), 3784-3794. * Estos autores han contribuido equitativamente.
3. **Cerrada V**, García-López M, Moreno-Izquierdo A, Villaverde C, Zurita O, Martín-Merida MI, Arenas J, Ayuso C, Gallardo ME. (2019). *Derivation of a human DOA iPSC line, IISHDOi006-A, with a mutation in the ACO2 gene: c.1999G>A; p.Glu667Lys*. Stem Cell Research 40, 101566.
4. Ortuño-Costela MDC*, **Cerrada V***, García-López M*, Gallardo ME. (2019). *The challenge of bringing iPSCs to the patient*. International Journal of Molecular Sciences 20 (24), 6305. * Estos autores han contribuido equitativamente.
5. **Cerrada V**, García-López M, Alvarez-Galeano S, Moreno-Izquierdo A, Lucía A, Rabasa Pérez M, Arenas J, Gallardo ME. (2020). *Generation of the iPSC line IISHDOi007-A from peripheral blood mononuclear cells from a patient with McArdle disease harbouring the mutation c.2392 T > C; p.Trp798Arg*. Stem Cell Research 49, 102108.
6. Ortuño-Costela MDC, **Cerrada V**, Moreno-Izquierdo A, García-Consuegra I, Laberthonnière C, Delourme M, Garesse R, Arenas J, Fuster García C, García García G, Millán JM, Magdinier F, Gallardo ME. (2022). *Generation of the First Human In Vitro Model for McArdle Disease Based on iPSC Technology*. International Journal of Molecular Sciences 23 (22), 13964.



Lab Resource: Stem Cell Line

Derivation of an aged mouse induced pluripotent stem cell line, IISHDOI005-A



María del Carmen Ortuño-Costela^{a,b,c,1}, Victoria Cerrada^{c,1}, Marta García-López^{c,1}, Joaquín Arenas^{c,d}, Jesús Martínez^e, Alejandro Lucia^{c,f}, Rafael Garesse^{a,b,c,d}, M. Esther Gallardo^{c,d,*}

^a Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

^b Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", UAM-CSIC, Madrid, Spain

^c Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

^d Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERER), Madrid, Spain

^e Departamento de Investigación Básica, División de Biomedicina Epitelial, CIEMAT, Madrid, Spain

^f Universidad Europea de Madrid, Spain

ABSTRACT

A mouse iPSC line, IISHDOI005-A, generated from fibroblasts obtained from a mouse C57BL/6J with an age of 1 year and a half, has been obtained. For this purpose, reprogramming factors Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc were delivered using Sendai virus.

Resource table.

Unique stem cell line identifier	IISHDOI005-A
Alternative name(s) of stem cell line	CmC57-FiPS4F1
Institution	Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, i + 12. Madrid, Spain
Contact information of distributor	Dr. M. Esther Gallardo egallardo.imas12@h12o.es
Type of cell line	iPSC
Origin	Mouse
Additional origin info	Age: 1.5 years Sex: Female Ethnicity if known: N/A
Cell Source	Skin fibroblasts
Clonality	Clonal
Method of reprogramming	Transgene free (Sendai virus)
Genetic Modification	NO
Type of Modification	N/A
Associated disease	N/A
Gene/locus	N/A
Method of modification	N/A
Name of transgene or resistance	N/A
Inducible/constitutive system	N/A

Date archived/stock date 20 September 2017

Cell line repository/bank N/A

Ethical approval This study was reviewed and approved by the Institutional Ethical Committee of the "Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols", CSIC-UAM, 406 329 1

Resource utility

The main biological hallmarks of aging include stem cell exhaustion and cellular senescence. Nowadays, there are increasing research efforts to look for anti-aging therapies. The iPSC line reported here could be a very useful resource for modelling aging and for designing therapeutic strategies against it.

Resource details

The mouse iPSC line, IISHDOI005-A, has been generated using a non-integrative methodology that involves the use of Sendai viruses containing the reprogramming factors Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc (Takahashi et al., 2007). For this purpose, fibroblasts from a C57BL/6J mouse with an age of 1 year and a half have been obtained from skin. IISHDOI005-A iPSC colonies displayed a typical ES-like colony morphology and growth behaviour (Fig. 1A) and they stained positive for alkaline phosphatase activity (Fig. 1B). The line was confirmed by PCR

* Corresponding author at: Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i + 12), Madrid, Spain.

E-mail address: egallardo.imas12@h12o.es (M.E. Gallardo).

¹ These authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101418>

Received 5 October 2018; Received in revised form 5 March 2019; Accepted 11 March 2019

Available online 12 March 2019

1873-5061/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

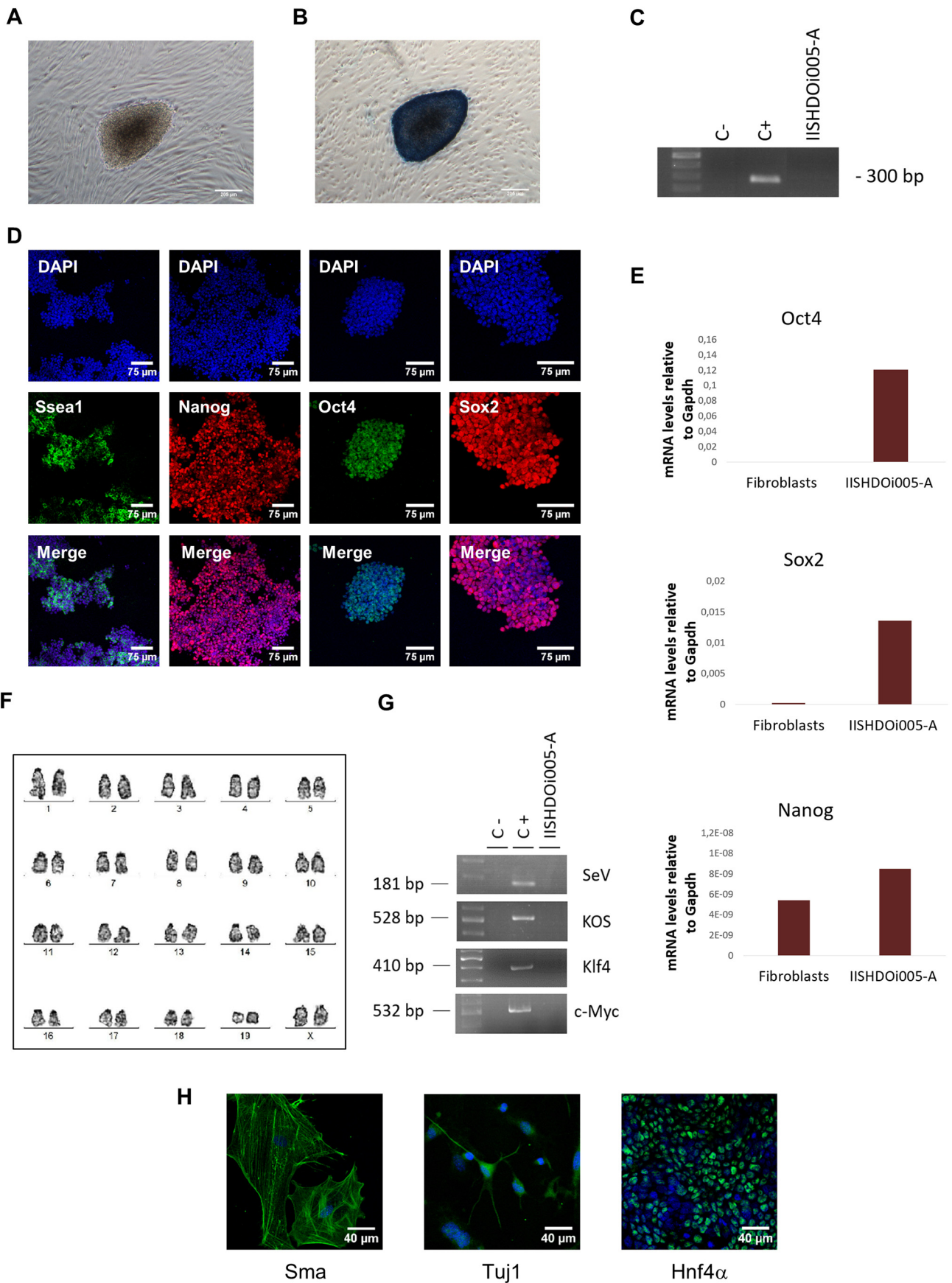


Fig. 1. Molecular and functional characterization of the IISHDOI005-A iPSC line.

analysis to be mycoplasma-negative (Fig. 1C). Immunofluorescence analysis revealed expression of transcription factors Oct4, Nanog and Sox2, and the ES cells surface marker, SSEA1 (Fig. 1D). The endogenous expression of the pluripotency associated transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog was evaluated by quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) (Fig. 1E). The iPSC line has been adapted to feeder-free culture conditions and a karyotype analysis after more than 20 culture passages has been performed (Fig. 1F). This analysis displayed a normal (40, XX) karyotype. In addition, we confirmed by DNA fingerprinting analysis that the line IISHDOI005-A was derived from the initial mouse fibroblasts (available with the author). The clearance of the vectors and the exogenous reprogramming factor genes was also confirmed by RT-PCR after twelve culture passages. Primers used allow the specific detection of both human and mouse transgenes because sequences hybridize with both species (Fig. 1G). Finally, the capacity of the IISHDOI005-A iPSC line to differentiate into the three germ layers (endoderm, mesoderm and ectoderm) was analysed *in vitro* using an embryoid body based assay (Fig. 1H).

Materials and methods

Generation of iPSCs

Fibroblasts from an aged C57BL/6J mouse were reprogrammed using the CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit following the instructions of the manufacturer, with minor modifications (MOI for KLF4 = 5). This line was maintained and expanded first on feeder layers (CRL-2429, ATCC), inactivated using mitomycin-C (10 µg/mL for 2 h), using 2i/LIF medium with gelatin as matrix. The composition of the 2i/LIF medium is: neurobasal medium and DMEM/F-12 Glutamax (1:1), supplemented with 2% B27, 1% N2, 385 nM β-mercaptoethanol, 0.5% L-Glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 1 µM PD0325901, 3 µM CT99021, 10³ U/mL LIF. The line was afterwards adapted to feeder-free conditions, using ES-Cult™ Maintenance Medium (StemCell Technologies) and gelatin. Cells were passaged when reaching a 80–90% confluence using Accumax® (Millipore) without rock inhibitor, approximately once a week and with a 1:5 ratio of split. The incubator conditions used are 37 °C and 5% CO₂.

Phosphatase alkaline analysis

The iPSC line IISHDOI005-A was seeded on a feeder layer plate. After one week, direct phosphatase alkaline activity was determined using the phosphatase alkaline blue membrane substrate solution kit

Table 1
Characterization and validation.

Classification	Test	Result	Data
Morphology	Photography	Normal	Fig. 1 panel A
Phenotype	Qualitative analysis: alkaline phosphatase activity	Positive	Fig. 1 panel B
	Qualitative analysis: immunocytochemistry	Positive for the pluripotency markers: SSEA1, Nanog, Oct4 and Sox2	Fig. 1 panel D
Genotype	Quantitative analysis: gene expression (qPCR)	Positive for the pluripotency markers: Oct4, Sox2 and Nanog	Fig. 1 panel E
	Karyotype (G-banding) and resolution	40, XX Resolution 450–500	Fig. 1 panel F
Identity	Microsatellite PCR (mPCR) OR	N/A	N/A
	STR analysis	8 loci, all matched	Available with the author
Mutation analysis (IF APPLICABLE)	Sequencing	N/A	N/A
	Southern Blot OR WGS	N/A	N/A
Microbiology and virology	Mycoplasma	Mycoplasma testing by PCR: negative	Fig. 1 panel C
Differentiation potential	Embryoid body formation and directed differentiation	Positive for: smooth muscle actin (Sma), β-tubulin (Tuj1) and hepatocyte nuclear factor 4 alpha (Hnf4α)	Fig. 1 panel H
Donor screening (OPTIONAL)	HIV 1 + 2 Hepatitis B, Hepatitis C	N/A	N/A
Genotype additional info (OPTIONAL)	Blood group genotyping	N/A	N/A
	HLA tissue typing	N/A	N/A

(Sigma, AB0300), (Table 1).

qPCR analysis

Total mRNA was isolated using TRI Reagent® and 1 µg was used to synthesize cDNA using the Thermo Scientific RevertAid RT Kit. The qPCR was carried out with PowerSYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), and analysed using an Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System. One µl of the reaction was used to quantify by qPCR the expression of the endogenous pluripotency associated genes Oct4, Sox2 and Nanog (Table 1). Primers are listed in Table 2. All the expression values were normalized to the *Gapdh* gene. Plots are representative of at least three independent experiments.

Karyotype analysis

Karyotype analyses were carried out using cells with more than twenty culture passages. Briefly, cells were treated with 10 µg/mL of Colcemid (Gibco) for 90 min at 37 °C, trypsinized, treated with hypotonic solution KCl 0.075 M, and fixed with Carnoy's fixative. Cells were then dropped on a microscope glass slide and dried. Metaphase cells were G banded using Wright staining. At least 20 metaphases were karyotyped.

Immunofluorescence analysis

Cells were grown on 0.1% gelatin-coated 35 mm culture plates (81,156, Ibidi), fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at RT and permeabilized using TBS + (0.1% Triton X-100 in Tris-buffered saline, TBS) for 45 min. Then the cells were incubated in TBS + + (3% donkey serum, 0.3% Triton X-100 in TBS) for two hours at RT. Primary antibodies were applied overnight at 4 °C. Secondary antibodies, for two hours at RT. Nuclei were stained with DAPI (Sigma, 28718-90-3). The antibodies were diluted in TBS buffer with 3% donkey serum and 0.3% triton and are listed in Table 2.

In vitro differentiation assay

The *in vitro* pluripotency capacity of the line IISHDOI005-A was tested by spontaneous embryoid body differentiation. The protocol used has been described in detail by Galera et al., 2016, with minor modifications, using ES-Cult™ Maintenance Medium without LIF.

Table 2
Reagents details.

Antibodies used for immunocytochemistry/flow-cytometry			
	Antibody	Dilution	Company Cat # and RRID
Pluripotency markers	Mouse anti-SSEA1	1:100	Abcam Cat# ab16285, RRID: AB_870663
	Rabbit anti-Nanog	1:150	Abcam Cat# ab80892, RRID: AB_2150114
	Mouse anti-Oct4	1:100	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-5279, RRID: AB_628051
	Rabbit anti-Sox2	1:100	Thermo Fisher Scientific Cat# PA1-16968, RRID: AB_2195781
Differentiation markers	Mouse anti- β tubulin isotype III	1:400	Sigma-Aldrich Cat# T8660, RRID: AB_477590
	Mouse anti-Hnf4 α	1:250	Thermo-Fisher Cat# K9218, RRID: AB_2633309
	Mouse anti-Sma	1:400	Sigma-Aldrich Cat# A2547, RRID: AB_476701
Secondary antibodies	Goat anti-mouse IgG (H + L), Alexa Fluor 488	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# A-11029, RRID: AB_2534088
	Goat anti-rabbit IgG (H + L), Alexa Fluor 488	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# A-11034, RRID: AB_2576217

Primers			
	Target	Expected size (bp)	Forward/Reverse primer (5'-3')
Pluripotency markers (qPCR)	<i>Endo-Oct4</i>	367	GCCAGACCACCATCTGTC/CCCTGTAGCCTCATACTCT
	<i>Endo-Sox2</i>	290	GAGCTAGACTCCGGGCGATG/CTTAAACAAGACCACGAAAACGG
	<i>Nanog</i>	219	GTCTGATTCAGAAGGGCTC/CTGGACCCTCAGTCCCTG
House-Keeping Genes (qPCR)	<i>Gapdh</i>	122	AGGTGCGTGTGAACGGATTG/TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
	Virus silencing	SeV	GGATCACTAGGTGATATCGAGC/ACCAGACAAGAGTTAAGAGATATGTATC
STR analysis	KOS	528	ATGCACCCTACGAGCTGAGCGC/ACCTTGACAATCTGTATGTGG
	<i>Klf4</i>	410	TTCTGTCATGCCAGAGGAGCCC/AATGTATCGAAGGTGCTCAA
	<i>c-Myc</i>	532	TAACTGACTAGCAGGCTTGTGCG/TCCACATACAGTCTGGATGATGATG
	18-3	149	[6FAM]TCTTTCTCCTTTTGTGTCATGC/GTTTCTTGCTAAATACTAAGCAAGTGAACAGA
	4-2	300	[6FAM]AAGCTTCTCTGGCCATTGA/GTTTATAAACTCAAGCAATGACA
	6-7	420	[6FAM]AGTCCACCAGTGCATTCTC/GTTTCTTCATGTGGCTGGTATGCTGTT
	9-2	400	[6FAM]GGATTGCCAAGAATTGAGG/GTTTCTTCTGAGTTGTGGACAGGGTTA
Mycoplasma detection	15-3	300	[6FAM]TCTGGGCGTGTCTGCATAA/GTTTCTTTTCTCAGGGAGGAGTGTGCT
	6-4	295	[6FAM]TTTGCAACAGCTCAGTTTCC/GTTTCTTAATCGCTGGCAGATCTTAGG
	12-1	220	[6FAM]CAAAATTGTCAATTGAACACATGTAA/GTTTCTTCAATGGTCAAGAAAATACTGAAGTACAA
	5-5	280	[6FAM]CGTTTTACCTGGCTGACACA/GTTTCTTGGTTTAAAACCTCAATACCAACAA
	<i>Gpo-3/Mgso</i>	300	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC

Mycoplasma detection

Mycoplasma detection was performed by PCR analysis using 1 mL of the cell culture supernatant (3 days culture, 90% confluence). After initial denaturation at 95 °C for 2 min, 35 cycles of amplification at 95 °C for 30 s, at 55 °C for 30 s, and at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C of 3 min were performed in an Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). Primers used are specified in Table 2. The 300 bp band represents a mycoplasma-positive sample available in our laboratory (positive control, C+).

DNA fingerprinting analysis

For DNA fingerprinting analysis eight different markers (Almeida et al., 2014) have been amplified by PCR and analysed by ABI PRISM 3100 Genetic analyzer and Peak Scanner v3.5 (Applied Biosystems), (Table 2).

Acknowledgments

This work was supported by grants from: 1) the “Fondo de

Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III cofunded by FEDER funds”: PI13/00556 and PI16/00789 to RG, PI15/00484 and PI18/00151 to MEG and PI15/00558 to AL. 2) “Comunidad Autónoma de Madrid” (grant number S2010/BMD-2402 to RG. MdC.O-C receives grant support from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU16/03895). M.GL is supported by a grant from Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, i+12. ME.G is supported by a “Miguel Servet” contract (CP16/00046) from Instituto de Salud Carlos III and FEDER funds.

References

- Almeida, J., Hill, C., Cole, K., 2014. Mouse cell line authentication. *Cytotechnology* 66 (1), 133–147.
- Galera, T., Zurita, F., González-Páramos, C., Moreno-Izquierdo, A., Fraga, M.F., Fernández, A.F., Garesse, R., Gallardo, M.E., 2016. Generation of a human iPSC line from a patient with Leigh syndrome. *Stem Cell Res.* 16 (1), 63–66.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 (5), 861–872.

REVIEW

iPSCs: A powerful tool for skeletal muscle tissue engineering

María del Carmen Ortuño-Costela^{1,2,3*} | Marta García-López^{3*} | Victoria Cerrada^{3*} |
 María Esther Gallardo^{3,4} 

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Universidad Autónoma de Madrid, Spain, (UAM-CSIC), Madrid, Spain

²Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

³Grupo de Investigación, Traslacional con células iPS, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERER), Madrid, Spain

Correspondence

María Esther Gallardo, Grupo de Investigación Traslacional con Células iPS, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain.
 Email: egallardo.imas12@h12o.es

Funding information

Fondo de Investigación Sanitaria; FEDER Funds; Ministerio de Educación, Cultura y Deporte; Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, i+12

Abstract

Both volumetric muscle loss (VML) and muscle degenerative diseases lead to an important decrease in skeletal muscle mass, condition that nowadays lacks an optimal treatment. This issue has driven towards an increasing interest in new strategies in tissue engineering, an emerging field that can offer very promising approaches. In addition, the discovery of induced pluripotent stem cells (iPSCs) has completely revolutionized the actual view of personalized medicine, and their utilization in skeletal muscle tissue engineering could, undoubtedly, add myriad benefits. In this review, we want to provide a general vision of the basic aspects to consider when engineering skeletal muscle tissue using iPSCs. Specifically, we will focus on the three main pillars of tissue engineering: the scaffold designing, the selection of the ideal cell source and the addition of factors that can enhance the resemblance with the native tissue.

KEYWORDS

biomaterials, induced pluripotent stem cells, iPSCs, iPS-skeletal muscle, personalized medicine, regenerative medicine, scaffold, tissue engineering, volumetric muscle loss

1 | INTRODUCTION**1.1 | Skeletal muscle: A brief overview**

The most abundant tissue of the human body is skeletal muscle, constituting 40% of the total weight. It is a highly specialized tissue and participates in many dynamic functions, including force generation, locomotion, posture control, respiration and mastication, as well as other metabolic functions such as storage of substrates for other tissues or heat generation for the maintenance of body temperature.¹ Therefore, skeletal muscle requires a very organized structure and a complex network of capillaries that support the constant flow of nutrients and metabolites.

Skeletal muscle is composed of bundles of several aligned multinucleated muscle fibres (also known as myofibres) encoding thousands of myofibrils (Figure 1A).² Each myofibril acts as a contraction unit as a result of the calcium-dependent movement of thick (myosin) and thin (actin) myofilaments. This structural unit of the myofibril is called sarcomere. A specialized membrane, the sarcolemma, surrounds muscle fibres, where motor neurons carry electrical signals and the flow of calcium ions is regulated. Myofibres are connected to motor neurons forming the neuromuscular junction; this structure includes the pre-synaptic axon, the synaptic cleft and the post-synaptic area of myofibres. After the release of acetylcholine in the synaptic cleft, the cell is depolarized and triggers an action

*These authors contributed equally.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

potential along the muscle fibre with the release of calcium and the contraction of the muscle.³ Vascularization in skeletal muscle is provided by several primary arteries organized in parallel to muscle fibres and numerous arterioles diverging inside them. Myofibres also have a specialized extracellular matrix, composed of basal lamina and reticular lamina.

Satellite cells (so called because of their peripheral location) are a population of muscle stem cells residing between basal lamina and sarcolemma. These cells can either differentiate and proliferate, promoting muscle growth and regeneration or self-renew to maintain the satellite cells pool. Usually, satellite cells are found in a quiescent state (G_0 phase) and they activate and expand in response to damage or stress.⁴

1.2 | The paradigm of tissue regeneration

It is well known that skeletal muscle has a remarkable ability to regenerate after minor injuries such as lacerations, sprains, contusions and small wounds. The repair process comprises three overlapping phases: destruction/inflammation phase, repair phase and remodelling phase (Figure 1B).⁵ After damage, the broken muscle fibres start an inflammatory response with the activation of the complement cascade. Inflammatory cells (neutrophils and macrophages) migrate to the injury zone and start the phagocytosis of necrotic myofibres and cellular debris;³ moreover, these cells amplify the inflammatory response releasing cytokines and growth factors and recruiting satellite cells, which differentiate into myoblasts to form new skeletal muscle by fusing to each other or to existing myofibres. In this second stage, adjacent nerves and blood vessels invade the healing area and a population of

- 1 Introduction
- 1.1 Skeletal muscle: a brief overview
- 1.2 The paradigm of tissue regeneration
- 1.3 iPSCs as the key to personalized medicine
- 1.4 Regenerative medicine and iPSCs: opening new gateways in cell replacement therapy
- 1.5 Tissue engineering: an appealing platform for recreating skeletal muscle
- 2 The basics of skeletal muscle tissue engineering
- 2.1 Designing a suitable scaffold
- 2.2 The art of creating an artificial matrix
- 2.3 The cellular component
- 2.4 From iPSCs to skeletal muscle at a glance
- 2.5 What remains to be done?
- 3 Concluding remarks
- Acknowledgements
- Authors' Contributions
- Conflict of interest
- References

fibro/adipogenic progenitors start the formation of a provisional scar tissue by collagen deposition.⁶ Finally, new myofibres reorganize themselves and the fibrotic tissue is remodelled to form the definitive muscle structure.

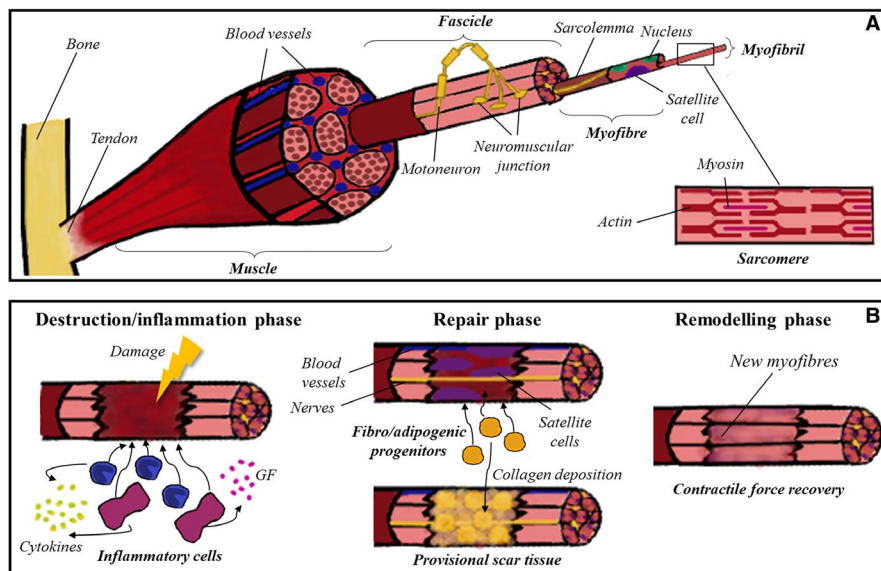


FIGURE 1 Skeletal muscle tissue. A, Skeletal muscle tissue comprises several bundles of aligned myofibres, each one containing thousands of myofibrils. In the image it is detailed the ultrastructure of the sarcomere, which is the final responsible of the contraction of the muscle due to the movement of myosin and actin myofilaments. B, The repair process of skeletal muscle is divided into three overlapping phases: destruction/inflammation, repair and remodelling. In the first stage, inflammatory cells are recruited to the damaged zone, secreting cytokines and growth factors which attract satellite cells. Then, adjacent blood vessels and nerves invade the healing area, and fibro/adipogenic progenitors co-operate to form the provisional scar tissue. Finally, new myofibres are formed, and the repairing process concludes when contractile force is recovered

This orchestrated repair concludes successfully with the contractile force recovery. However, this process does not always happen correctly. In cases of volumetric muscle loss (VML) like accidents, surgical procedures and resection of tumours, or even in degenerative processes like muscle dystrophies and sarcopenia, the anatomy of the muscle is so disturbed that the regeneration of the tissue is inefficient, leading to scarring, denervation and even loss of function.

Current treatments for VML, such as muscle flaps or amputation, are limited and show poor efficacy. Nowadays, cell therapy approaches and bioengineering muscle tissues are postulated as great promises for regenerative medicine in the near future.

1.3 | iPSCs as the key to personalized medicine

The discovery of induced pluripotent stem cells (iPSCs) has marked a milestone in biomedical research. In 2006, murine adult fibroblasts were successfully reprogrammed by introducing only four transcription factors (Oct3/4, Sox2, c-Myc and Klf4) into the cells using retroviral vectors.⁷ These reprogrammed cells, designated as iPSCs, displayed a typical embryonic stem (ES) cell-like morphology and growth behaviour, and they exhibited distinctive ES marker genes. Only 1 year later, in 2007, human adult fibroblasts were effectively reprogrammed to become pluripotent using the same four factors.⁸

Mainly due to the integrative nature of retroviral vectors, in the last years there has been an increasing interest in reprogramming by using non-integrative methods, such as adenovirus, episomal vectors, Sendai virus, synthetic mRNAs and recombinant proteins.⁹ Besides, distinct types of somatic cells like fibroblasts,¹⁰ urine cells¹¹ and even blood cells¹² have already been reprogrammed with success.

The huge potential of iPSCs is based both on their self-renewal capacity and their ability to differentiate into practically any cell type. Thus, iPSCs have provided valuable information in the field of stem-cell differentiation and developmental biology.¹³ However, their contributions go beyond the building up of knowledge. Somatic

cells from a patient with a certain disease of interest can be reprogrammed to iPSCs and, afterwards, differentiated into the specific cell type affected, developing a model *in vitro* that can recapitulate the main features of the disorder. This model could potentially shed light on the pathophysiological mechanisms or possible therapeutic approaches, allowing to perform, for instance, a high-throughput drug screening, among other applications (Figure 2).^{14,15} Different iPSCs models have already been developed for a wide variety of disorders, like neurological diseases,¹⁶ optical atrophies,¹⁷ mitochondrialopathies¹⁸ and even psychiatric disorders.¹⁹ Nevertheless, complex diseases without a clear genetic background, with low penetrance, late onset or with an unknown affected cellular phenotype are much more complicated to model using this technology.²⁰

The differentiation process to the disease target cell type is a pivotal phase in the development of a model. iPSCs have already been differentiated towards an extensive range of cell types, including skeletal muscle cells. Briefly, there are two different approaches to differentiate iPSCs into myogenic precursors.²¹ The first one is based on the overexpression of myogenic transcription factors in the iPSCs, generally MyoD and Pax7, using integrative vectors such as lentivirus.²² This kind of approach is highly efficient, but the integration of the vectors can lead to genotoxicity. The other alternative is based on the supplementation with defined factors for a myogenic induction in iPSCs, trying to mimic the embryonic development.²³ Although it may have a lower efficiency, this approach is safer and allows the use of the differentiated cells for therapeutic applications.

1.4 | Regenerative medicine and iPSCs: Opening new gateways in cell replacement therapy

As stated before, nowadays there is an increasing necessity for new approaches to deal with VML. Regenerative medicine is highly expected to heal patients with difficult-to-treat diseases and physically impaired function, aiming to restore or repair injured or degenerated tissues (and even organs) by the transplantation of cells

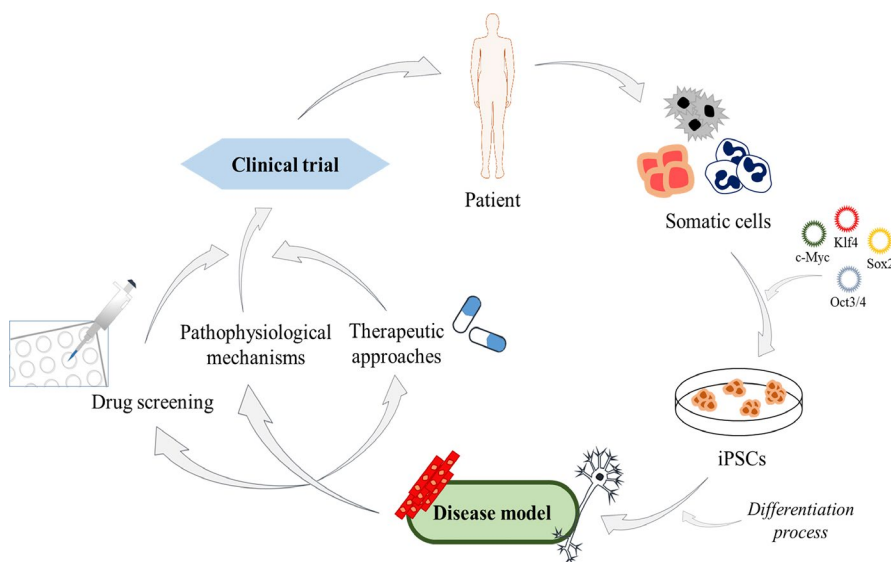


FIGURE 2 Main applications of patient-derived iPSCs. Somatic cells from a patient can be reprogrammed using the Yamanaka factors (c-Myc, Klf4, Sox2 and Oct3/4) into iPSCs. These generated iPSCs can be differentiated into the specific cell type affected in the disease, a step absolutely essential to create a cellular model. The potential applications of those models include drug screening, the elucidation of the pathophysiological mechanisms of the disease and even the discovery of new therapeutic approaches. Finally, all of this can lead to the development of a clinical trial, which could have a very positive impact on the patients themselves

to the site of injury or degeneration.²⁴ To carry out this purpose, it is required to have access to unlimited numbers of functional cells on demand to replenish the cells lost as a result of the disease.²⁵

In this sense, human pluripotent stem cells seem to be useful cell sources for cell-based regeneration, given their capacity to self-renew and to potentially differentiate into all cell types of adult tissues.¹⁴ Specifically, iPSCs turn out to be the more suitable alternative for these applications, considering that the cells transplanted into the patients would be directly differentiated from iPSCs generated by reprogramming their somatic cells.

In the context of personalized medicine, iPSCs represent an ideal source to produce patient and disease-specific adult cells that could be clinically applied in the future. Thus, these iPSCs generated would produce immunologically matched donor cells, which implies the elimination of the immune rejection issue associated with transplant processes.²⁶ Moreover, there is a possibility of repairing disease-causing mutations accurately in iPSCs with the recent advanced tools of genomic edition, being afterwards those iPSCs differentiated and re-engrafted back into the patient.^{27,28}

One of the most remarkable events in regenerative medicine has been the first clinical trial based on human iPSCs, which took place in 2014, to treat age-related macular degeneration. In this trial, patient iPSCs-derived retinal pigment epithelium was non-tumorigenic and the transplant did not cause immune rejection; moreover, data obtained suggest an improvement in visual acuity in the patient.²⁹ However, the eye is an immune-privileged organ, and maybe the translation of these results to other diseases could result in additional and unexpected problems.

A drawback of transplanting cells alone in the site of injury is the fact that many cells are known to be lost in a short time after transplantation, which leads to marginal effects. To overcome this limitation, tissue engineering has emerged as a promising strategy that opens up new therapeutic possibilities.³⁰

1.5 | Tissue engineering: An appealing platform for recreating skeletal muscle

Tissue engineering combines the principles of material sciences, cell transplantation and engineering, aiming the regeneration of failing or damaged tissues.³¹ To accomplish this goal, the idea is to produce suitable biological constructs, preferably autologous, which can be implanted as medical devices inducing the formation of new functional tissues. This entails a promising alternative to traditional surgical procedures for treating VML and its complications.¹

As it has been mentioned before, the repair of damaged skeletal muscle tissue is limited by the regenerative capacity of the native tissue itself. Tissue engineering represents an appropriate alternative for restoring this tissue, as it is possible to seed and culture cells onto a designed scaffold that mimics the native extracellular matrix, capable of supporting skeletal muscle tissue formation.³²

There are two main approaches to engineering musculoskeletal tissues: *in vitro* or *in vivo*. The *in vitro* tissue engineering strategy is based on developing muscle constructs in order to transplant the

tissue into the patient after differentiation has taken place. On the other hand, the *in vivo* strategy attempts to inject isolated muscle precursor cells into the damaged tissue site to promote muscle regeneration.^{31,33} Although both techniques have showed to improve muscle function, the *in vivo* approach requires a large number of cells and additional sites to be injected into.³⁴

In order to design muscle constructs, it is required to take into account three main pillars: scaffolds, defined cell populations and bioactive agents (growth factors and/or physical stimuli).³⁵ In the present review, we will focus on *in vitro* tissue engineering strategy, delving into the three different aspects on which tissue engineering is supported (Figure 3).

2 | THE BASICS OF SKELETAL MUSCLE TISSUE ENGINEERING

2.1 | Designing a suitable scaffold

In order to achieve an engineered muscle tissue similar to the native one, it is essential to design and fabricate an appropriate scaffold. A scaffold is defined as a three-dimensional (3D) solid biomaterial that plays an indispensable role in tissue regeneration, trying to mimic the extracellular matrix, as both of them present analogous functions.^{36,37} The main features that must be taken into account when designing and choosing a certain scaffold are:

1. **Architecture:** the scaffold should provide a solid framework, allowing cells to attach, proliferate, migrate and differentiate into myotubes to finally form skeletal muscle constructs.³² In this context, apart from the external geometry, it is also essential that the presence of an interconnected pore structure to ensure cell trafficking and an adequate diffusion of nutrients, gases and regulatory factors to the cells; in addition, it is also important to remove waste products out of the scaffold.³⁸ Besides, a highly porous structure is also required to have elevated surface density, favouring cell attachment and having enough space to facilitate neovascularization and support new tissue formation.³⁶
2. **Biocompatibility:** the scaffold should be biocompatible, what means that it has to support the appropriate cellular activity being non-cytotoxic to the cells without inducing any inflammatory responses in the host muscle.³⁹ There is a huge number of available surface treatments to optimize the biocompatibility of the scaffold with the tissue, for example using different coatings.⁴⁰ For example, plasma treatment has been used to increase hydrophilicity inducing a better cellularization of the scaffold.⁴¹
3. **Biodegradability:** the idea is that the scaffold must remain intact long enough to provide physical support in the early stages of tissue formation, acting as a temporary matrix where the neo-generated extracellular matrix is going to be deposited. Once cells are organized, the scaffold must biodegrade to gradually be replaced by the newly formed tissue, ideally at a controllable degradation level that approximates the rate of tissue regeneration. It is

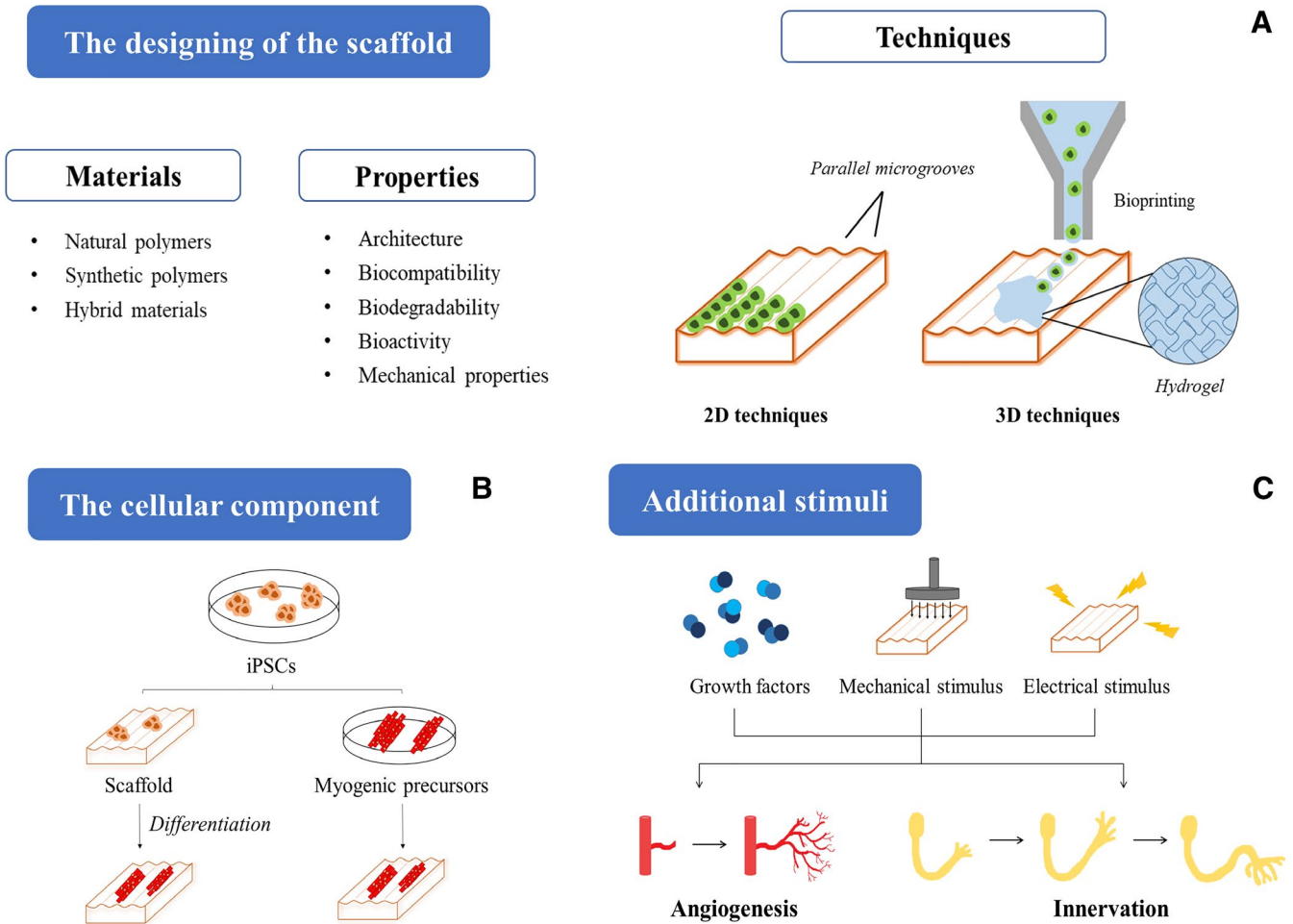


FIGURE 3 Schematic representation of the three main pillars of skeletal muscle tissue engineering based on iPSCs. A, The scaffolds should present the right properties to ensure the correct engineering of the tissue, and they can be fabricated using natural, synthetic or hybrid polymers. In the image it is highlighted the main two-dimensional and three-dimensional techniques that can be employed for the generation of the scaffolds. B, iPSCs can be implemented to this technology following two strategies: either being seeded directly into the scaffold and then differentiated there, or cultivated in the scaffold once differentiated into myogenic precursors. C Finally, with the purpose of achieving vascularization and innervation in the construct, it is possible the addition of bioactive factors, as well as the implementation of mechanical or electrical stimuli

important that the generated by-products do not cause any damage to the tissue.⁴² Scaffolds can be modified in order to achieve the desired biodegradability, using techniques as irradiation or oxidation of the material to promote susceptibility to hydrolysis.⁴³

4. **Bioactivity:** the scaffold has to facilitate interactions with cellular components and cell adhesion in order to favour proliferation, migration, differentiation and subsequent tissue organization. These interactions between cells and biomaterials depend on the surface characteristics of the scaffold, such as chemical composition or electric charge.³⁷ Scaffolds made from natural biomaterials, as opposed to synthetic ones, are capable of promoting these interactions. Synthetic biomaterial scaffolds need ligands or chemical groups to be incorporated on their surface to enhance cell attachment. Many strategies are feasible for this purpose; for instance, it is possible the addition of extracellular matrix or even collagen coatings.⁴⁴

5. **Mechanical properties:** the scaffold should provide mechanical integrity and stability to the engineered tissue and similar mechanical properties to those of the tissue that is going to be replaced.³⁷ It has to hold enough stiffness to allow cell exposure to relevant mechanical forces, but at the same time appropriate elasticity to accommodate contractile functionality if it is necessary in the tissue.^{32,45}

In general terms, an ideal scaffold should fulfil all these criteria mentioned above. In particular, considering that the scaffold will support the engineering of functional skeletal muscle tissue, it should mimic the structure and morphology of the native tissue. As we have previously explained, skeletal muscle tissue is composed of highly oriented and unidirectional aligned myofibres that are disposed forming myotubes, being this organization which dictates muscle tissue function.

The microenvironment, then, is crucial for the maturation, alignment, orientation and definition of the skeletal muscle tissue itself.⁴⁶

Thus, when designing the scaffold it should be taken into account the guidance of cellular orientation to efficiently organize muscle cells and get a functional construct.⁴⁷ Recently, some technologies have been applied to mimic the myotubes alignment: for instance, the fabrication of parallel linear microchannels⁴⁸ or the nano or micro-patterning of the substrate.^{49,50}

Besides, it is of great relevance the advances recently achieved in bioprinting and how this approach has been widely applied to many different tissues. Although there are not many studies in skeletal muscle tissue yet, it would be interesting to implement these procedures, since this approach allows the accurate control of cell distribution at the micrometre scale.⁵¹

Upon the generation of the muscle construct, two different strategies are feasible with the use of iPSCs. They could be directly seeded onto the scaffold to promote their differentiation, or, conversely, myogenic precursors generated from those iPSCs could be seeded to finish the differentiation process on the 3D environment. One approach or another, a key point to consider is that the scaffold should behave as a muscle stem cell niche, by recreating the native microenvironment in order to promote muscle tissue generation. Therefore, it has to influence myogenic cell differentiation while allowing self-renewal maintenance of stem cells.⁴² Furthermore, the scaffold should promote angiogenesis, since vascularization is critical for the survival and integration of the engineered skeletal muscle tissue.^{31,52} Finally, the ultimate goal of skeletal muscle tissue engineering is to obtain a biomimetic, functional and contractile system (named myobundle) that mimics the responses of the native tissue as a model.⁵³

2.2 | The art of creating an artificial matrix

Once settled above the main characteristics that a scaffold must fulfil, we are going to focus on the creation of the matrix itself, in particular in the materials and methods used in order to construct the base of the tissue engineered.

The different materials utilized as scaffolds in skeletal muscle tissue engineering can be separated in four main clusters:

1. **Natural polymers:** they permit cell attachment, interaction and proliferation, and prompt a very limited inflammatory response. However, they have a poor mechanical performance and do not confer an ordered structure.⁴⁴ Some examples widely used as scaffolds are collagen, gelatin, alginate, fibrin and chitosan, each one with their own specific characteristics.
2. **Synthetic polymers:** one of their main advantages is that their structural and mechanical features can be adjusted to the ones of the tissue engineered. Although they do not count with adhesive sites, they can be modified in order to permit cell adhesion.⁵⁴ Some of the main synthetic polymers employed are poly (glycolic acid) (PGA) and poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA).
3. **Hybrid materials:** the combination of synthetic and natural materials as composites can have many advantages, benefitting from the characteristics of each component. Whereas natural

materials tend to contribute to cell adhesion and proliferation, synthetic polymers usually help mimicking the mechanical properties of the tissue engineered.³⁵

4. **Decellularized scaffolds:** they are, basically, tissues or organs that have undergone a process of removal of the cellular and nuclear content in order to leave only the basic structure and composition of the extracellular matrix. Thus, the biomechanical properties of the tissue are conserved.⁵⁵ Apart from being totally biocompatible, one of their main points to highlight is that they count with growth factors and proteins that can be beneficial to the engineering applications, permitting vascularization and angiogenesis. However, a deficient process of decellularization can lead to undesired immune responses.

Apart from the materials, the architecture of the scaffold is another key point to consider. The details to engineer the substrate should be based on the nature of the native tissue itself, and more specifically on the features of the microenvironment and the extracellular matrix that surrounds and supports that tissue. For instance, taking into account the general diameter of the collagen fibres in skeletal muscle tissue, Yang et al. designed the dimensions of the scaffold nanogrooves, determining that 800-800-600 nm (ridge width-groove width-height) was the optimal ones for the substrate.⁵⁶ The topography of the scaffold is certainly pivotal for the needed uniaxial orientation of the cells, promoting myotube formation, alignment and maturation, and it has been fully proven that flat substrates do not endorse all these features.⁵⁶ Additionally, the elasticity and flexibility of the matrix can be decisive for the maturation of the engineered tissue, permitting contraction and functionality.⁵⁷

The different techniques to obtain this desired anisotropy, both in the micro and nano-scale, can be differentiated in two groups:

1. **Two-dimensional (2D) techniques:** they are based on the modification of the cell-growing surface itself with parallel microgrooves.⁵⁸ These grooves, which can have different depth and width in order to fulfil the necessities of the tissue engineered, can be induced by distinct methods, like lithography techniques, electrospinning or surface patterning of natural or synthetic polymers. However, cells do not reach a state of complete maturation in this kind of surfaces.
2. **3D techniques:** they seek to obtain a geometry closer to skeletal muscle, permitting a further growth and maturation of the cells.⁵⁹ The encapsulation of cells within a hydrogel is one of the most employed techniques. Hydrogels are a family of biocompatible water-containing materials which tend to form crosslinked networks in 3D.⁶⁰ Although they are highly eligible as scaffolds because of their analogy to biological soft tissues, they do not confer orientation to the cells, and sometimes their density can be a drawback. That is why it is important to take advantage of other adjuvant methods to achieve this alignment. For instance, bioprinting can be extremely useful, permitting to obtain a composite of stem cells and scaffold polymers in hydrogels with the 3D architecture desired.⁶¹

The generation of 3D devices has the advantage of simulating the environments in which cells grow *in vivo*, increasing motility and intercellular communication to influence cell fate specification. Furthermore, 3D micropatterned scaffolds can lead to further alignment of myotubes in comparison with that existing in a 2D matrix. Likewise, the phenomenon of angiogenesis requires a 3D microenvironment to achieve the correct scale of complexity of the different blood vessels. Thus, the engineered tissue in a 3D structure can be directly implanted for muscle repair, being tough to achieve with 2D micropatterned surfaces.^{62,63}

Apart from all these technologies, the so-called scaffold-free approaches are based on the culture of skeletal muscle cells together with satellite cells to obtain monolayers that are able to assemble by themselves in 3D structures.³¹ However, the main limitation of this technique is based on the impossibility to scale the construct.

Although the matrix materials and structure are crucial for the engineering of skeletal muscle, the environment plays a fundamental role as well. Thus, the addition of growth factors and certain peptides in the engineering process can contribute to cell growth, cell differentiation or vascularization, for instance.⁴⁰

2.3 | The cellular component

Regarding the cell types for being used in skeletal muscle tissue engineering, the preferred ones are autologous cells. The most important features that the cellular component must gather are high proliferative capacity and the ability of efficiently differentiate into skeletal muscle cells, in order to obtain a huge pool of engraftable muscle precursor cells. Satellite cells have been the most regularly studied starting cell reservoir for this application, because of being the native precursors of muscle tissue and having a critical role in physiological processes related to muscle regeneration. However, satellite cells are tedious to isolate and purify, and their proliferative capacity is limited *in vitro*.^{32,64} Nowadays, most strategies are proposing stem cells for the regeneration of skeletal muscle tissue, for instance mesenchymal stem cells, a multipotent adult stem cell population that has shown capacity for myogenic differentiation.³² The problem is that these cells do not present an optimal mode of delivery and their long-term therapeutic contribution is limited.⁶⁵ In this review, we focus on the use of iPSCs in muscle tissue engineering, as a result of all their advantages, which turn these cells into an improved stem cell source for these therapies.

2.4 | From iPSCs to skeletal muscle at a glance

Mouse models have been traditionally used to study human diseases. Notwithstanding, they do not always provide the best results. In fact, it is well known that mouse models do not always mimic human disorders in a reliable way. Besides, it is not feasible to perform a high-throughput drug screening assay as a result of the high number of animals that would be necessary for that purpose. In this sense, iPSCs-based disease models generated from patients could be a very useful tool to provide personalized treatments and

to better understand the genetic and epigenetic features of each patient.⁶⁶ Furthermore, iPSCs derived from healthy donors or edited iPSCs could be an excellent option for cell therapy.⁶⁷

Until date, several attempts of making skeletal muscle *in vitro* have been performed successfully in both 2D and 3D cultures with skeletal muscle myoblast cell lines, such as the widely used mouse myoblast cell line C2C12,⁶⁸ human skeletal myoblasts⁶⁹ or even with purified satellite cells.⁷⁰

Despite the good results obtained in the aforementioned studies, there are three points that make iPSCs a better choice for engineering skeletal muscle, instead of adult myoblasts: unlimited proliferative capacity, non-invasive source of donor cells and better results when tested in mouse models.⁶⁷ In the last few years, there have been many attempts to differentiate iPSCs into skeletal muscle precursors, trying to create reliable cellular models of the main muscular diseases. Although overexpression methods such as Pax7 or MyoD transfection lead to higher efficiency rates, genome integration still constitutes the most significant disadvantage for clinic translation. Mondragon-Gonzalez et al.⁷¹ generated myogenic progenitors through Pax7 induction which could not only be successfully expanded *in vitro*, but also achieved myotube maturation. Conversely, small molecule methods do not yield a pure expandable myogenic population, but improved transgene-free protocols could represent a promising alternative. For instance, van der Wal et al.⁷² propose the combination of a small molecules differentiation followed by fluorescence-activated cell sorting, in order to achieve expansion of progenitors and finally maturation to myotubes with high fusion index.

In the Table 1 several examples of skeletal muscle differentiation methods from iPSCs have been included. The main achievements in each study, such as gene edition, functionality of the cells/constructs, disease modelling, etc. have also been highlighted.

Until date there are very few examples regarding skeletal muscle tissue engineering using iPSCs. In the first one, authors differentiate iPSCs by transient overexpression of Pax7 and were able to generate functional and contractile myobundles in 3D using a fibrin-based hydrogel as scaffold.⁷³ They achieved Ca²⁺ transients and observed vascularization by the host when grafted these myobundles into a mouse model.

Concurrently, MyoD transfection to differentiate iPSCs from healthy donors and patients with Duchenne muscular dystrophy, limb girdle and congenital muscular dystrophies was performed by Maffioletti et al.⁷⁴ As scaffold, fibrin hydrogels under tension were employed to favour cell alignment. The main achievement of this work has been the co-culture of skeletal myogenic cells with vascular endothelial cells, pericytes and motor neurons in order to mimic the native tissue, trying to show that the collaboration of these cell types is optimal to obtain a 3D artificial skeletal muscle.

Finally, the ultimate attainment in skeletal muscle tissue engineering has been performed by Osaki et al.⁷⁵ In this group, a 3D amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model has been produced by using the organ-on-a-chip technology. For this purpose, a co-culture of iPSC-derived motor neurons spheroids, from a patient with sporadic

TABLE 1 Reported examples of skeletal muscle differentiation from iPSCs

Study	Differentiation method	Modelled disease	Some achievements
84	MyoD transfection	Facioscapulohumeral muscular dystrophy	Generation of isogenic control clones. Gene correction (CRISPR/Cas9)
85	MyoD transfection	Duchenne muscular dystrophy	Evaluation of exon skipping in disease-specific myocytes
72	Small molecules	Pompe disease	Gene correction (CRISPR/Cas9) Large-scale expansion
71	Pax7 transfection	Myotonic dystrophy 1	NA
86	Small molecules	Duchenne muscular dystrophy	Generation of transplantable myogenic cells
87	MyoD transfection	Muscular dystrophy	High-throughput drug screening
88	MyoD transfection	Infantile-onset Pompe disease	NA
89	MyoD transfection	Limb girdle muscular dystrophy type 2C	iPSCs derived from urine cells Gene correction (CRISPR/Cas9)
90	MyoD transfection	Amyotrophic lateral sclerosis	Study of neuromuscular microenvironment and generation of functional myotubes

NA, not applicable.

ALS, along with iPSC-derived three-dimensional muscle fibre bundles has been performed. This model gets closer to the physiological conditions of the tissue and the pathology of this disease, achieving neuromuscular junction formation, muscle contraction force and synchronized Ca^{2+} transients.

2.5 | What remains to be done?

Advances in iPSCs technology and tissue engineering have been a breakthrough in the field of regenerative medicine. Many researchers have focused their efforts on the generation of 3D engineered muscle tissues that mimic the native muscle. However, there are still several aspects that need to be improved or explored. One of the main challenges is the proper diffusion of nutrients and oxygen to the entire construct. It has been exhaustively studied that the lack of vascularization limits the size of the tissue; furthermore, an insufficient nutrient supply in the central parts of the structure might cause necrotic cores.⁷⁶ Until date, two different approaches have been performed to improve engineered tissue vascularization: *in vivo* or *in vitro*.⁷⁷ *In vitro* strategies rely on creating constructions capable of making mature vessel networks before implantation, for example co-culturing fibroblasts, myoblasts and endothelial cells to create a suitable microenvironment to promote vasculogenesis.⁷⁸ Another option could be to incorporate growth factors (such as the vascular endothelial growth factor), into hydrogels or patterned scaffolds to promote angiogenesis. Borselli et al.⁷⁹ devised an injectable and degradable hydrogel, made of alginate and a mixture of VEGF and IGF-I, and observed that the sustained delivery of these factors enhanced the recovery of ischaemic injured skeletal muscle. In the context of scaffolds, Chiu et al.⁵² proposed a micropatterned polydimethylsiloxane (PDMS) substrate coated with collagen-chitosan hydrogel containing angiogenic factors as a platform to improve the vascularization of

engineered tissues. On the other hand, *in vivo* strategies consist of generating a viable vessel network after the construct transplantation. At this point it is essential the control of the host response and the regeneration capacity, since host vessels should integrate and replace the engineered construct. Modifying the mechanical characteristics of the scaffold can enhance this balance of the healing phases between the host and the device.⁸⁰

Innervation of the engineered tissue is essential for long-term survival and for the recovery and maintenance of contractile activity. For this purpose, there are some strategies to enhance force generation and to develop the neuromuscular junctions, for example, co-culturing myoblasts and neural cells⁸¹ or using bio-factors that promote acetylcholine receptors clustering like agrin or laminin.^{79,82}

To the best of our knowledge, 3D engineered skeletal muscle must be vascularized and innervated to mature and resemble native adult muscle function. In addition to these previous strategies, external stimulation techniques such as electrical or mechanical stimulation have been developed. Electrical stimulation can improve myogenic differentiation and maturation, induce myotube contraction or control basic parameters such as cellular morphology, migration or gene expression.³¹ Moreover, electrical stimulation is the key to develop advanced cellular models for drug screening with muscle hypertrophy, properly structural organization, force generation and metabolic flux.⁸³ Otherwise, mechanical stimulation can mimic the passive stretch that occurs during embryonic muscle development; furthermore, aged-related muscle atrophy could be studied by varying tension in mechanical stimulation devices.⁵⁹

Regarding the reproduction of specific muscle diseases, engineered tissue models must involve different types of cells to recapitulate the function and microenvironment of skeletal muscle. This denotes the need for a 'universal' culture media that supports the maturation of multiple tissue cells and the stem cell niche

requirements. The different cell populations must be pure and should be expandable and the final construct must achieve an adult-like phenotype.

Once all these challenges are overcome, tissue engineering could be postulated as one of the most promising tools for VML and personalized medicine in muscular diseases.

3 | CONCLUDING REMARKS

In the last few years there has been an increasing interest in the field of skeletal muscle tissue engineering, turning into one of the most promising tools in regenerative medicine to create functional muscle constructs. This approach opens up a wide range of possibilities: (a) The generation of 3D models to study the physiopathology of certain diseases; (b) The performance of high-throughput drug screenings and (c) The development of a hopeful option to avoid the problems derived of transplants. Additionally, the combination of all these features with the advantages of iPSCs provides an ideal scenario for the implementation of this technology in personalized medicine.

However, the translation to the clinics is not straightforward, and there are many aspects that must be taken into consideration: (a) iPSCs should be exhaustively verified in order to guarantee that they are not tumorigenic at all. (b) As sometimes iPSCs maintain epigenetic memory from the original somatic cells, it is important to assure that a homogeneous population in terms of epigenetic signatures has been achieved. (c) Immune rejection could be one of the main concerns in the application of iPSCs in the clinic. That is why the creation of a completely characterized iPSCs bank concerning human leukocyte antigens (HLA) could represent in the future a powerful tool to choose the best cell source to create a personalized skeletal muscle construct.

In summary, although the progress in skeletal muscle tissue engineering has been remarkable, there are still many aspects left that could be implemented. For instance, gene editing with CRISPR/Cas9 can be extremely useful to correct genetic defects from patient cells, and subsequently use the generated constructs in transplant procedures. There is no doubt that, once these aspects have been upgraded, skeletal muscle tissue engineering using iPSCs will prompt a huge breakthrough in the field of regenerative and personalized medicine.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the 'Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III cofunded by FEDER Funds': PI15/00484 and PI18/00151 to MEG. MdC.O-C receives grant support from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU16/03895). M.GL is supported by a grant from Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, i+12. ME.G is supported by a 'Miguel Servet' contract (CP16/00046) from Instituto de Salud Carlos III and FEDER funds.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

M.d.C.-O.C., M.-G.L., V.C. and M.E.-G. contributed in manuscript drafting. M.E.-G. contributed to manuscript critical revision. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that there is no conflict of interest.

ORCID

María Esther Gallardo  <https://orcid.org/0000-0002-8699-8734>

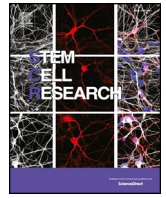
REFERENCES

- Ostrovidov S, Hosseini V, Ahadian S, et al. Skeletal muscle tissue engineering: methods to form skeletal myotubes and their applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014;20:403-436.
- Tabebordbar M, Wang ET, Wagers AJ. Skeletal muscle degenerative diseases and strategies for therapeutic muscle repair. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2013;8:441-475.
- Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84:822-832.
- Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev*. 2013;93:23-67.
- Turner NJ, Badyak SF. Regeneration of skeletal muscle. *Cell Tissue Res*. 2012;347:759-774.
- Wosczyzna MN, Rando TA. A muscle stem cell support group: coordinated cellular responses in muscle regeneration. *Dev Cell*. 2018;46:135-143.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663-676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861-872.
- Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17:183-193.
- Ortuño-Costela M del C, Rodríguez-Mancera N, García-López M, et al. Establishment of a human iPSC line (IISHDOI001-A) from a patient with McArdle disease. *Stem Cell Res*. 2017;23:188-192.
- Guo Y, Zeng Q, Liu S, et al. Generation of an iPSC cell line via a non-integrative method using urine-derived cells from a patient with USH2A-associated retinitis pigmentosa. *Stem Cell Res*. 2018;29:139-142.
- Liu J, Brzeszczynska J, Samuel K, et al. Efficient episomal reprogramming of blood mononuclear cells and differentiation to hepatocytes with functional drug metabolism. *Exp Cell Res*. 2015;338:203-213.
- Omole AE, Fakoya AOJ. Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *PeerJ*. 2018;6:e4370.
- Singh VK, Kalsan M, Kumar N, et al. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:2.
- Galera T, Zurita-Díaz F, Garesse R, et al. iPSCs, a future tool for therapeutic intervention in mitochondrial disorders: pros and cons. *J Cell Physiol*. 2016;231:2317-2318.
- Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009;136:964-977.

17. Galera-Monge T, Zurita-Díaz F, Moreno-Izquierdo A, et al. Generation of a human iPSC line from a patient with an optic atrophy 'plus' phenotype due to a mutation in the OPA1 gene. *Stem Cell Res.* 2016;16:673-676.
18. Zurita-Díaz F, Galera-Monge T, Moreno-Izquierdo A, et al. Generation of a human iPSC line from a patient with a mitochondrial encephalopathy due to mutations in the GFM1 gene. *Stem Cell Res.* 2016;16:124-127.
19. Brennand KJ, Simone A, Jou J, et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011;473:221-225.
20. Avior Y, Sagi I, Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17:170-182.
21. Kodaka Y, Rabu G, Asakura A. Skeletal muscle cell induction from pluripotent stem cells. *Stem Cells Int.* 2017;2017:1376151.
22. Maffioletti SM, Gerli MFM, Ragazzi M, et al. Efficient derivation and inducible differentiation of expandable skeletal myogenic cells from human ES and patient-specific iPSCs. *Nat Protoc.* 2015;10:941-958.
23. Chal J, Al Tanoury Z, Hestin M, et al. Generation of human muscle fibers and satellite-like cells from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc.* 2016;11:1833-1850.
24. Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: current therapies and future directions. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112:14452-14459.
25. Tabar V, Studer L. Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress. *Nat Rev Genet.* 2014;15:82-92.
26. Hirschi KK, Li S, Roy K. Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014;16:277-294.
27. Chun YS, Byun K, Lee BC. Induced pluripotent stem cells and personalized medicine: current progress and future perspectives. *Anat Cell Biol.* 2011;44:245-255.
28. Liu P, Li K, Xu S. The future of iPSC cells in advancing regenerative medicine. *Genet Res (Camb).* 2016;98:e4.
29. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous `ion. *N Engl J Med.* 2017;376:1038-1046.
30. Matsuura K, Utoh R, Nagase K, et al. Cell sheet approach for tissue engineering and regenerative medicine. *J Control Release.* 2014;190:228-239.
31. Qazi TH, Mooney DJ, Pumberger M, et al. Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends. *Biomaterials.* 2015;53:502-521.
32. Jana S, Levengood SKL, Zhang M. Anisotropic materials for skeletal-muscle-tissue engineering. *Adv Mater.* 2016;28:10588-10612.
33. Stern-Straeter J, Riedel F, Bran G, et al. Advances in skeletal muscle tissue engineering. *Vivo (Brooklyn).* 2007;21:435-444.
34. Haycock J. Muscle tissue engineering of muscle. *Clin Plast Surg.* 2003;30:589-599.
35. Beldjilali-Labro M, Garcia AG, Farhat F, et al. Biomaterials in tendon and skeletal muscle tissue engineering: current trends and challenges. *Materials (Basel).* 2018;11:1116.
36. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *Int J Polym Sci.* 2011;2011:19.
37. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J.* 2008;17:467-479.
38. Ahadian S, Civitarese R, Bannerman D, et al. Organ-on-a-chip platforms: a convergence of advanced materials, cells, and microscale technologies. *Adv Healthc Mater.* 2018;7:1700506.
39. O'Brien FJ. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Mater Today.* 2011;14:88-95.
40. Fuoco C, Petrilli LL, Cannata S, et al. Matrix scaffolding for stem cell guidance toward skeletal muscle tissue engineering. *J Orthop Surg Res.* 2016;11:1.
41. de Valence S, Tille J-C, Chaabane C, et al. Plasma treatment for improving cell biocompatibility of a biodegradable polymer scaffold for vascular graft applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85:78-86.
42. Rossi CA, Pozzobon M, De Coppi P. Advances in musculoskeletal tissue engineering: moving towards therapy. *Organogenesis.* 2010;6:167-172.
43. Wang L, Shansky J, Borselli C, et al. Design and fabrication of a biodegradable, covalently crosslinked shape-memory alginate scaffold for cell and growth factor delivery. *Tissue Eng Part A.* 2012;18:2000-2007.
44. Grasman JM, Zayas MJ, Page RL, et al. Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries. *Acta Biomater.* 2015;25:2-15.
45. Pollot BE, Rathbone CR, Wenke JC, et al. Natural polymeric hydrogel evaluation for skeletal muscle tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2018;106:672-679.
46. Jiao A, Moerk CT, Penland N, et al. Regulation of skeletal myotube formation and alignment by nanotopographically controlled cell-secreted extracellular matrix. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2018;106:1543-1551.
47. Gattazzo F, De Maria C, Rimessi A, et al. Gelatin-genipin-based biomaterials for skeletal muscle tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 2018;106:2763-2777. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34057>.
48. Sun Y, Duffy R, Lee A, et al. Optimizing the structure and contractility of engineered skeletal muscle thin films. *Acta Biomater.* 2013;9:7885-7894.
49. Zatti S, Zoso A, Serena E, et al. Micropatterning topology on soft substrates affects myoblast proliferation and differentiation. *Langmuir.* 2012;28:2718-2726.
50. Tsui JH, Janebodin K, Ieronimakis N, et al. Harnessing sphingosine-1-phosphate signaling and nanotopographical cues to regulate skeletal muscle maturation and vascularization. *ACS Nano.* 2017;11:11954-11968.
51. Mandrycky C, Wang Z, Kim K, et al. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv.* 2016;34:422-434.
52. Chiu LLY, Montgomery M, Liang Y, et al. Perfusable branching microvessel bed for vascularization of engineered tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:E3414-E3423.
53. Madden L, Juhas M, Kraus WE, et al. Bioengineered human myobundles mimic clinical responses of skeletal muscle to drugs. *Elife.* 2015;4:e04885.
54. Mertens JP, Sugg KB, Lee JD, et al. Engineering muscle constructs for the creation of functional engineered musculoskeletal tissue. *Regen Med.* 2014;9:89-100.
55. Urciuolo A, De Coppi P. Decellularized tissue for muscle regeneration. *Int J Mol Sci.* 2018;19:2392.
56. Yang HS, Ieronimakis N, Tsui JH, et al. Nanopatterned muscle cell patches for enhanced myogenesis and dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Biomaterials.* 2014;35:1478-1486.
57. Smith AST, Davis J, Lee G, et al. Muscular dystrophy in a dish: engineered human skeletal muscle mimetics for disease modeling and drug discovery. *Drug Discov Today.* 2016;21:1387-1398.
58. Ngan CGY, Quigley A, Kapsa RMI, et al. Engineering skeletal muscle - from two to three dimensions. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12:e1-e6.
59. Khodabukus A, Prabhu N, Wang J, et al. In vitro tissue-engineered skeletal muscle models for studying muscle physiology and disease. *Adv Healthc Mater.* 2018;7:1701498.
60. Lev R, Seliktar D. Hydrogel biomaterials and their therapeutic potential for muscle injuries and muscular dystrophies. *J R Soc Interface.* 2018;15:20170380.
61. García-Lizarribar A, Fernández-Garibay X, Velasco-Mallorquí F, et al. Composite Biomaterials as Long-Lasting Scaffolds for 3D Bioprinting of Highly Aligned Muscle Tissue. *Macromol Biosci.* 2018;18:1800167.
62. Chen S, Nakamoto T, Kawazoe N, et al. Engineering multi-layered skeletal muscle tissue by using 3D microgrooved collagen scaffolds. *Biomaterials.* 2015;73:23-31.

63. Kim JJ, Hou L, Yang G, et al. Microfibrous scaffolds enhance endothelial differentiation and organization of induced pluripotent stem cells. *Cell Mol Bioeng*. 2017;10:417-432.
64. Pantellic MN, Larkin LM. Stem cells for skeletal muscle tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2018;24:373-391.
65. Fishman JM, Tyraskis A, Maghsoudlou P, et al. Skeletal muscle tissue engineering: which cell to use? *Tissue Eng Part B Rev*. 2013;19:503-515.
66. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Skeletal muscle generated from induced pluripotent stem cells - induction and application. *World J Stem Cells*. 2017;9:89-97.
67. Roca I, Requena J, Edel M, et al. Myogenic precursors from iPSC cells for skeletal muscle cell replacement therapy. *J Clin Med*. 2015;4:243-259.
68. Soliman E, Bianchi F, Sleight JN, et al. Engineered method for directional growth of muscle sheets on electrospun fibers. *J Biomed Mater Res, Part A*. 2018;106:1165-1176.
69. Takahashi H, Shimizu T, Okano T. Engineered human contractile myofiber sheets as a platform for studies of skeletal muscle physiology. *Sci Rep*. 2018;8:1-11.
70. Prüller J, Mannhardt I, Eschenhagen T, et al. Satellite cells delivered in their niche efficiently generate functional myotubes in three-dimensional cell culture. *PLoS ONE*. 2018;13:e0202574.
71. Mondragon-Gonzalez R, Perlingeiro RCR. Recapitulating muscle disease phenotypes with myotonic dystrophy 1 induced pluripotent stem cells: a tool for disease modeling and drug discovery. *Dis Model Mech*. 2018;11:dmm034728.
72. van der Wal E, Herrero-Hernandez P, Wan R, et al. Large-scale expansion of human iPSC-derived skeletal muscle cells for disease modeling and cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Rep*. 2018;10:1975-1990.
73. Rao L, Qian Y, Khodabukus A, et al. Engineering human pluripotent stem cells into a functional skeletal muscle tissue. *Nat Commun*. 2018;9:126.
74. Maffioletti SM, Sarcar S, Henderson ABH, et al. Three-dimensional human iPSC-derived artificial skeletal muscles model muscular dystrophies and enable multilineage tissue engineering. *Cell Rep*. 2018;23:899-908.
75. Osaki T, Uzel SGM, Kamm RD. Microphysiological 3D model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) from human iPSC-derived muscle cells and optogenetic motor neurons. *Sci Adv*. 2018;4:eaat5847.
76. Karande TS, Ong JL, Agrawal CM. Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing. *Ann Biomed Eng*. 2004;32:1728-1743.
77. Cittadella Vigodarzere G, Mantero S. Skeletal muscle tissue engineering: strategies for volumetric constructs. *Front Physiol*. 2014;5:362.
78. Jain RK, Au P, Tam J, et al. Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol*. 2005;23:821-823.
79. Borselli C, Storrie H, Benesch-Lee F, et al. Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:3287-3292.
80. Koffler J, Kaufman-Francis K, Shandalov Y, et al. Improved vascular organization enhances functional integration of engineered skeletal muscle grafts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:14789-14794.
81. Morimoto Y, Kato-Negishi M, Onoe H, et al. Three-dimensional neuron-muscle constructs with neuromuscular junctions. *Biomaterials*. 2013;34:9413-9419.
82. Zhang BGX, Quigley AF, Bourke JL, et al. Combination of agrin and laminin increase acetylcholine receptor clustering and enhance functional neuromuscular junction formation In vitro. *Dev Neurobiol*. 2016;76:551-565.
83. Khodabukus A, Madden L, Prabhu NK, et al. Electrical stimulation increases hypertrophy and metabolic flux in tissue-engineered human skeletal muscle. *Biomaterials*. 2018;198:259-269.
84. Sasaki-Honda M, Jonouchi T, Arai M, et al. A patient-derived iPSC model revealed oxidative stress increases facioscapulo-humeral muscular dystrophy-causative DUX4. *Hum Mol Genet*. 2018;00:1-12.
85. Zhao M, Shoji E, Sakurai H. In vitro evaluation of exon skipping in disease-specific iPSC-derived myocytes. *Methods Mol Biol*. 2018;1828:173-189.
86. Sakai-Takemura F, Narita A, Masuda S, et al. Premyogenic progenitors derived from human pluripotent stem cells expand in floating culture and differentiate into transplantable myogenic progenitors. *Sci Rep*. 2018;8:1-12.
87. Uchimura T, Otomo J, Sato M, et al. A human iPSC cell myogenic differentiation system permitting high-throughput drug screening. *Stem Cell Res*. 2017;25:98-106.
88. Yoshida T, Awaya T, Jonouchi T, et al. A skeletal muscle model of infantile-onset pompe disease with patient-specific iPSC cells. *Sci Rep*. 2017;7:13473.
89. Kim EY, Page P, Dellefave-Castillo LM, et al. Direct reprogramming of urine-derived cells with inducible MyoD for modeling human muscle disease. *Skelet Muscle*. 2016;6:1-16.
90. Lenzi J, Pagani F, De Santis R, et al. Differentiation of control and ALS mutant human iPSCs into functional skeletal muscle cells, a tool for the study of neuromuscular diseases. *Stem Cell Res*. 2016;17:140-147.

How to cite this article: Ortuño-Costela MDC, García-López M, Cerrada V, Gallardo ME. iPSCs: A powerful tool for skeletal muscle tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 2019;23:3784-3794. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14292>



Lab resource: Stem Cell Line

Derivation of a human DOA iPSC line, IISHDOI006-A, with a mutation in the *ACO2* gene: c.1999G > A; p.Glu667Lys



Victoria Cerrada^a, Marta García-López^a, Ana Moreno-Izquierdo^b, Cristina Villaverde^{c,d}, Olga Zurita^{c,d}, Maria Inmaculada Martin-Merida^{c,d}, Joaquín Arenas^{d,e}, Carmen Ayuso^{c,d}, M. Esther Gallardo^{a,d,*}

^a Grupo de investigación traslacional con células iPS, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

^b Servicio de Genética, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

^c Departamento de Genética, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD, UAM), Madrid, Spain

^d Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERER), Madrid, Spain

^e Grupo de Enfermedades raras, mitocondriales y neuromusculares, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

ABSTRACT

Human iPSC line, IISHDOI006-A, was obtained from fibroblasts of a patient with Dominant Optic Atrophy (DOA) carrying a heterozygous mutation in the gene *ACO2*: c.1999G > A; p.Glu667Lys. Reprogramming factors Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc were delivered using a non-integrative methodology that involves the use of Sendai virus.

Resource utility

DOA is a genetically heterogeneous mitochondrial blinding disease (Kjer, 1959). We report here a human iPSC line obtained from a patient with DOA harbouring a heterozygous mutation in the *ACO2* gene. This iPSC line will be very useful for modelling this disorder and as a platform for pharmacological screening.

Resource details

The human iPSC line, IISHDOI006-A, has been reprogrammed using Sendai viruses containing the reprogramming factors OCT3/4, SOX2, KLF4 and c-MYC (Takahashi et al., 2007). For this purpose, fibroblasts from a patient with dominant optic atrophy harbouring a heterozygous mutation in the gene *ACO2* (c.1999G > A; p.Glu667Lys) have been obtained from a skin biopsy. IISHDOI006-A iPSC colonies displayed a typical ES-like colony morphology and growth behaviour (Fig. 1A) and they stained positive for alkaline phosphatase activity (Fig. 1B). In addition, the line was confirmed by PCR analysis to be mycoplasma-negative (Supplementary Fig. S1). The 300 bp band represents a mycoplasma-positive sample available in our laboratory (positive control, C+). As a negative control (C-) water instead DNA has been used as a sample for the PCR reaction. Immunofluorescence analysis revealed expression of transcription factors OCT4, NANOG and SOX2, and typical ES cells surface markers SSEA4, TRA-1-60 and TRA-1-81 (Fig. 1C).

We also confirmed the clearance of the vectors and the exogenous reprogramming factor genes by RT-PCR after eight culture passages (Fig. 1D). As a positive control (C+), RNA obtained from fibroblasts set aside seven days after transduction with Sendai viruses has been used. As a negative control (C-) we have employed RNA extracted from the original fibroblasts. We have also verified the presence of the mutation in the iPSCs (Fig. 1E). The endogenous expression of the pluripotency associated transcription factors OCT4, SOX2, NANOG and CRIPTO was evaluated by quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) (Fig. 1F). The iPSC line has been adapted to feeder-free culture conditions and a karyotype analysis after more than 18 culture passages has been carried out (Fig. 1G). This analysis displayed a normal karyotype (46, XY). We also confirmed that the line IISHDOI006-A was derived from the patient's fibroblasts by DNA fingerprinting analysis (archived at SCR journal). Finally, we evaluated the capacity of the IISHDOI006-A iPSC line to differentiate into the three germ layers (endoderm, mesoderm and ectoderm) using an *in vitro* embryoid body based assay (Fig. 1H).

Materials and methods

Generation of iPSCs

Fibroblasts from a patient with DOA harbouring the mutation c.1999G > A; p.Glu667Lys in the *ACO2* gene were reprogrammed using

* Corresponding author at: Grupo de Investigación Traslacional con células iPS, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain.
E-mail address: egallardo.imas12@h12o.es (M.E. Gallardo).

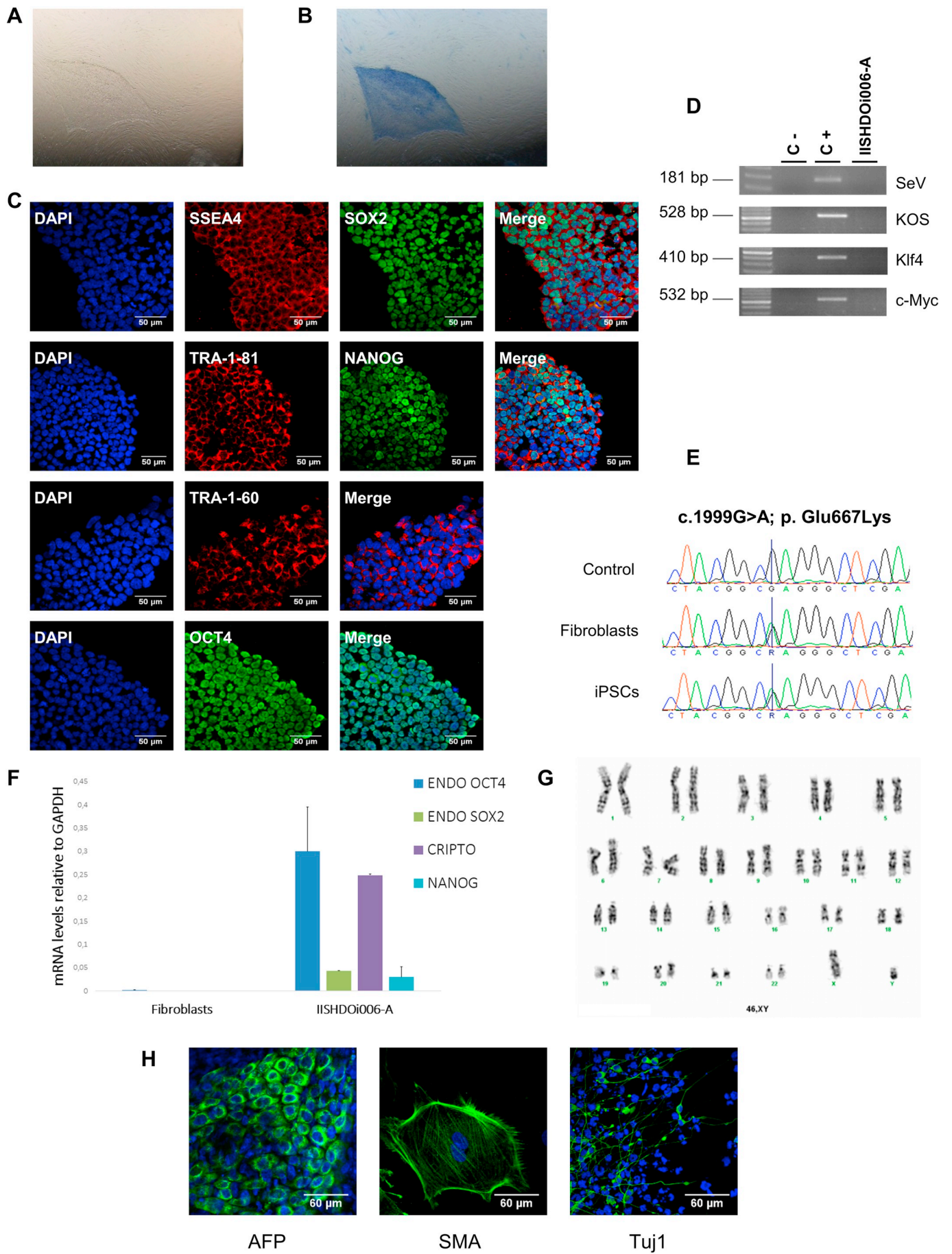


Fig. 1.

Table 1
Characterization and validation.

Classification	Test	Result	Data
Morphology Phenotype	Photography	Normal	Fig. 1 panel A
	Qualitative analysis: Alkaline phosphatase activity	Positive	Fig. 1 panel B
	Qualitative analysis: Immunocytochemistry	Positive for the pluripotency markers: SSEA4, SOX2, NANOG, TRA-1-81, TRA-1-60 and OCT4.	Fig. 1 panel C
Genotype Identity	Quantitative analysis Gene expression (qPCR)	Positive for the pluripotency markers: <i>OCT4</i> , <i>SOX2</i> , <i>CRIPTO</i> and <i>NANOG</i>	Fig. 1 panel F
	Karyotype (G-banding) and resolution STR analysis	46XY Resolution 450-500 DNA Profiling performed 8 loci, all matched (D2S1338, D7S820, D8S1179, D13S317, D19S433, D21S11, VWA, amelogenin)	Fig. 1 panel G Submitted to SCR journal for archiving
Mutation analysis	Sequencing	Confirmation of the mutation: c.1999G > A; p.Glu667Lys	Fig. 1 panel E
Microbiology and virology	Mycoplasma	Mycoplasma testing by PCR: Negative	Supplementary Fig. S1
Differentiation potential	Embryoid body formation and directed differentiation	Positive for: smooth muscle actin (SMA), β -tubulin (Tuj1) and alpha-fetoprotein (AFP)	Fig. 1 panel H
Donor screening	HIV 1 + 2 Hepatitis B, Hepatitis C	N/A	N/A
Genotype additional info	Blood group genotyping	N/A	N/A
	HLA tissue typing	N/A	N/A

Table 2
Reagents details.

Antibodies used for immunocytochemistry/flow-citometry			
	Antibody	Dilution	Company Cat # and RRID
Pluripotency Markers	Mouse anti TRA-1-81	1:150	Millipore Cat# MAB4381, RRID: AB_177638
	Mouse anti TRA-1-60	1:150	Millipore Cat# MAB4360, RRID: AB_11211864
	Rabbit anti SOX2	1:100	ThermoFisher Scientific Cat# PA1_16968, RRID: AB_2195781
	Mouse anti SSEA4	1:10	Abcam Cat# ab16287, RRID: AB_778073
	Goat anti NANOG	1:25	R&D Systems Cat# AF1997, RRID: AB_355097
Differentiation Markers	Mouse anti OCT4	1:100	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc.5279, RRID: AB_628051
	Mouse anti AFP	1:300	Sigma Aldrich Cat# WH0000174M1, RRID: AB_1839587
	Mouse anti SMA	1:400	Sigma Aldrich Cat# A2547, RRID: AB_476701
Secondary antibodies	Mouse anti β -Tubulin isotype III	1:300	Sigma Aldrich Cat# T8660, RRID: AB_477590
	Cy [™] 2-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit IgG (H + L)	1:50	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 111-225-144, RRID: AB_2338021
	Cy [™] 3-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG, Fc γ Subclass 3 Specific	1:250	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 115-165-209, RRID: AB_2338698
	Cy [™] 2-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG, Fc γ Subclass 2b Specific	1:50	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 115-225-207, RRID: AB_2338749
	Cy [™] 2-conjugated AffiniPure Donkey anti-Goat IgG (H + L) Goat anti Mouse IgG (H + L), Alexa Fluor 488	1:50 1:500	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 705-225-147, RRID: AB_2307341 ThermoFisher Scientific Cat# A-11029, RRID: AB_2534088
Primers			
	Target	Forward/Reverse primer (5'-3')	
Pluripotency Markers (qPCR)	Endo <i>OCT4</i>	GGGTTTTGGGATTAAGTTCCTCA / GCCCCACCCTTTGTGTT	
	Endo <i>SOX2</i>	CAAAAATGGCCATGCAGGTT / AGTTGGGATCGAACAAAAGCTATT	
	<i>CRIPTO</i>	CGGAAGTGTGAGCAGCATGT / GGGCAGCCAGGTGTCATG	
House-Keeping Genes (qPCR)	<i>NANOG</i>	ACAACTGGCCGAGAATAGCA / GGTTCCAGTCGGGTTTCC	
	<i>GAPDH</i>	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC / AGGGATCTCGCTCTCGGAA	
	<i>ACO2</i>	CAGACAGGTGAGGACGGT / GGCAGGAGAGTGACCTTG	
Targeted mutation analysis/sequencing	SeV	GGATCACTAGGTGATATCGAGC / ACCAGACAAGAGTTAAGAGATATGTATC	
	KOS	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC / ACCTTGACAATCCTGATGTGG	
Virus silencing	Klf-4	TTCTGTCATGCCAGAGGAGCCC / AATGTATCGAAGGTGCTCAA	
	c-Myc	TAACTGACTAGCAGGCTTGTGCG / TCCACATACAGTCTGGATGATGATG	
STR analysis	Amelogenin	[6-FAM] CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGT / ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG	
	D2S1338	[6-FAM] CCAGTGGATTTGGAAACAGA / ACCTAGCATGGTACCTGCAG	
	D7S820	[6-FAM] TGTCATAGTTTAGAACGAACAAACG / CTGAGGTATCAAAAACCTCAGAGG	
	D8S1179	[6-FAM] TTTTGTATTTCATGTGTACATTCC / CGTAGCTATAATTAGTTCATTITCA	
	D13S317	[6-FAM] ACAGAAGTCTGGGATGTGGA / GCCCAAAAAGACAGACAGAA	
	D19S433	[6-FAM] CCTGGGCAACAGAATAAGAT / TAGGTTTTAAGGAACAGGTGG	
	D21S11	[6-FAM] GTGAGTCAATTCCTCAAG / GTTGTATTAGTCAATGTCTTCC	
	VWA	[6-FAM] CCCTAGTGGATGATAAGAATAATC / GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG	
Mycoplasma detection	<i>GPO-3 / MGSO</i>	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT / TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	

the CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit following the instructions of the manufacturer. IISHDOI006-A line was maintained and expanded both on feeder and feeder-free conditions as described in Galera et al., 2016.

Phosphatase alkaline analysis

Direct phosphatase alkaline activity was analyzed on IISHDOI006-A iPSCs seeded on feeder plates using the phosphatase alkaline blue

membrane substrate solution kit (Sigma, AB0300) (Table 1).

Mutation analysis

To confirm the mutation, a PCR was carried out with total DNA, from fibroblasts and iPSCs, extracted using a commercial kit (primers shown in Table 2). The PCR conditions were as follows: 95 °C for 7 min, 35 cycles at 95 °C for 30 s, at 62 °C for 1 min, and at 72 °C for 20 s, and a final extension at 72 °C of 6 min (Applied Biosystems Verity Thermal Cycler). Amplicons were sequenced in an ABI 3730 analyzer (Applied Biosystems).

qPCR analysis

The expression of the endogenous pluripotency associated genes *OCT4*, *SOX2*, *CRIP1* and *NANOG* (Table 1) was quantified by qPCR. Total mRNA was isolated using TRI Reagent® and 1 µg was used to synthesize cDNA using the Thermo Scientific RevertAid RT Kit. The qPCR was carried out with GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), and analyzed using an Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System (primers listed in Table 2). All the expression values were normalized to the *GAPDH* gene. Plots are representative of at least three independent experiments.

Karyotype analysis

Cells with more than twenty culture passages were treated with 10 µg/mL of Colcemid (Gibco) for 90 min at 37 °C. Subsequently, they were trypsinized, treated with hypotonic solution KCl 0.075 M and fixed with Carnoy's fixative. Metaphase cells were G banded using Wright staining. At least 20 metaphases were karyotyped.

Immunofluorescence analysis

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at RT and permeabilized using TBS+ (0.1% Triton X-100 in Tris-buffered saline, TBS) for 45 min. Then, the cells were incubated in TBS++ (3% donkey serum, 0.3% Triton X-100 in TBS) for 2 h at RT. Primary antibodies were applied overnight at 4 °C and secondary antibodies for 2 h at RT (shown in Table 2). Nuclei were stained with DAPI (Sigma, 28718-90-3).

In vitro differentiation assay

The *in vitro* pluripotency capacity of the line IISHDOI006-A was tested by a spontaneous embryoid body differentiation. The protocol used has been described in detail by Galera et al., 2016.

DNA fingerprinting analysis

Markers D13S317, D7S820, VWA, D8S1179, D21S11, D19S433, D2S1338 and amelogenin for sex determination have been amplified by PCR and analyzed by ABI PRISM 3100 Genetic analyzer and Peak Scanner v3.5 (Applied Biosystems), (Table 2).

Mycoplasma detection

A PCR analysis using 1 mL of the cell culture supernatant (90% confluence) was carried out with the primers specified in Table 2. After initial denaturation at 95 °C for 2 min, 35 cycles of amplification at 95 °C for 30 s, at 55 °C for 30 s, and at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C of 3 min were performed in an Applied Biosystems

Verity Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Key resources table

Unique stem cell line identifier	IISHDOI006-A
Alternative name(s) of stem cell line Institution	DOA2259-FiPS4F-8 Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, i + 12
Contact information of distributor	Dr. M. Esther Gallardo egallardo.imas12@h12o.es
Type of cell line	iPSC
Origin	Human
Additional origin info	Age: N/A Sex: Male Ethnicity if known: N/A
Cell source	Skin Fibroblasts
Clonality	Clonal
Method of reprogramming	Transgene free (Sendai Virus)
Genetic modification	Yes
Type of modification	Hereditary
Associated disease	Dominant Optic Atrophy
Gene/locus	Gene ACO2 NM_001098: c.1999G > A; p.Glu667Lys; Chromosome: 22q13.2
Method of modification	N/A
Name of transgene or resistance	N/A
Inducible/constitutive system	N/A
Date archived/stock date	July 2019
Cell line repository/bank	N/A
Ethical approval	Patient informed consent was obtained. This study was reviewed and approved by the Institutional Research Committee of the "Fundación Jiménez Díaz", 03/14; 404327 1.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101566>.

Declaration of Competing Interest

There are no conflicts of interest in this study.

Acknowledgments

This work was supported by grants from: 1) "Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III cofunded by European Regional Development Funds (ERDF) funds": PI15/00484 and PI18/00151 to MEG and PI16/00425 to CA. 2) FUNDALUCE 2015 to CA. 3) RAREGenomics-CM Regional Government of Madrid cofunded by European Regional Development Funds (ERDF) funds (CAM, B2017/BMD-3721) to CA. M.GL is supported by a grant from Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, i+12. MEG is supported by a "Miguel Servet" contract (CP16/00046) from Instituto de Salud Carlos III and European Regional Development Funds (ERDF) funds.

References

- Galera, T., Zurita, F., González-Páramos, C., Moreno-Izquierdo, A., Fraga, M.F., Fernández, A.F., Garesse, R., Gallardo, M.E., 2016. Generation of a human iPSC line from a patient with Leigh syndrome. *Stem Cell Res.* 16 (1), 63–66.
- Kjer, P., 1959. Infantile optic atrophy with dominant mode of inheritance: a clinical and genetic study of 19 Danish families. *Acta Ophthalmol. Suppl.* 164 (54), 1–147.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 (5), 861–872.



Review

The Challenge of Bringing iPSCs to the Patient

María del Carmen Ortuño-Costela ^{1,2,†}, Victoria Cerrada ^{2,†}, Marta García-López ^{2,†} and M. Esther Gallardo ^{2,3,*} 

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Spain. Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, (UAM-CSIC), 28029 Madrid, Spain; mcortuno.imas12@h12o.es

² Grupo de Investigación Traslacional con células iPS, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), 28041 Madrid, Spain; vcerralopez.imas12@h12o.es (V.C.); martagl.imas12@h12o.es (M.G.-L.)

³ Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERER), 28029 Madrid, Spain

* Correspondence: egallardo.imas12@h12o.es

† These authors contributed equally to this work.

Received: 27 November 2019; Accepted: 11 December 2019; Published: 13 December 2019



Abstract: The implementation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) in biomedical research more than a decade ago, resulted in a huge leap forward in the highly promising area of personalized medicine. Nowadays, we are even closer to the patient than ever. To date, there are multiple examples of iPSCs applications in clinical trials and drug screening. However, there are still many obstacles to overcome. In this review, we will focus our attention on the advantages of implementing induced pluripotent stem cells technology into the clinics but also commenting on all the current drawbacks that could hinder this promising path towards the patient.

Keywords: iPSCs; induced pluripotent stem cells; clinics; clinical trial; drug screening; personalized medicine; regenerative medicine

1. The Evolution of a Revolution

In 2006, a team of scientists headed by Dr. Shinya Yamanaka reported one of the greatest breakthroughs in stem cell research: the reprogramming of mouse somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs) [1]. Only one year later, in 2007, this challenge was also accomplished in humans by two independent groups [2,3]. Since then, the hope placed in iPSCs-based therapies in personalized medicine has increased considerably, and many groups are trying to take advantage of this new and promising technology.

Due to their self-renewal capacity and their potential to differentiate into any cell type of the three germ layers (endoderm, mesoderm, and ectoderm), iPSCs have been postulated as potential substitutes for embryonic stem cells (ESCs). This is essentially because iPSCs circumvent all the ethical concerns that surround ESCs, the gold standard of human stem cell lines until now. Moreover, the molecular and functional similarity between iPSCs and ESCs is well established [4]. For all these reasons, iPSCs currently represent a great promise in personalized cell therapies, disease modeling, and drug development.

Nowadays, more than a decade after their discovery, the iPSCs technology has evolved rapidly (Figure 1). The scientific community is joining efforts to solve the issues inherent to the use of iPSCs for cell therapy applications, such as their immunogenicity, the risk of teratoma formation, the genomic instability, or the variability among iPSC clones derived from the same donor cells [5].

Although the translation to the clinics may seem easy, this is a very long and complex process with some hurdles that must be still overcome [6]. Notwithstanding these obstacles, as we will see here within, the step from bench to bedside is closer to becoming a reality rather than an unreachable dream.

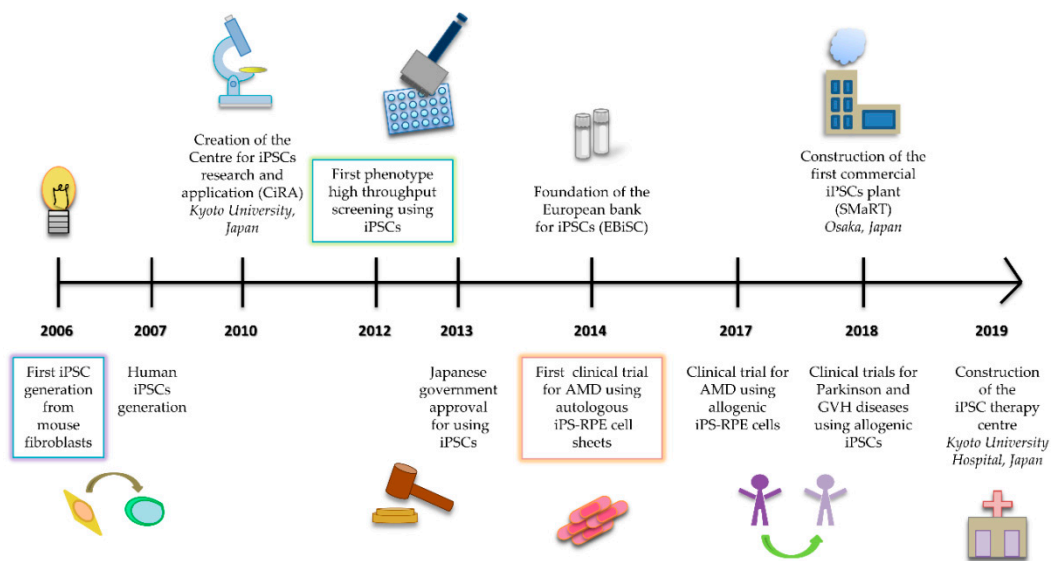


Figure 1. Timeline of the most important milestones from the discovery of induced pluripotent stem cells (iPSCs) in 2006 to now in 2019.

In this review, we summarize the main applications of iPSCs in the clinics, the progress achieved to date, and the path towards the patient, including the possible drawbacks that might appear in this process.

2. The Giant Leap from the Lab to the Clinics

From a practical perspective, iPSCs could be translated to the clinics in two different manners. On the one hand, they could be indirectly used as a platform to produce cell derivatives, such as platelets, or even to develop new drugs. On the other hand, they could be directly employed in regenerative medicine, as an ideal source for cell therapy or even whole tissue transplantation.

In the following sections, we will delve into the indirect and direct uses of iPSCs in the clinics, highlighting some interesting examples and concluding with an overview of the latest clinical trials.

2.1. Indirect Uses of iPSCs: a Helpful Tool for the Patient

2.1.1. Platelet Factory

During recent years the number of performed transfusions has significantly increased, mainly due to the upsurge of hematologic diseases. Consequently, to supply the blood demand in hospitals or transfusion centers, the development of new sources of non-immunogenic blood cells is urgently needed. One of the most required cell types is platelets. These are widely used in thrombocytopenic patients, chemotherapy receptors, complex surgeries, etc., but they are not always available due to their short shelf-life, their difficult storage, and the scarcity of donations [7]. In this context, the scalable *ex vivo* production of iPSCs-derived platelets could solve these technical limitations, as well as the allogeneic problems related to the transfusions [8,9].

Despite the natural safety of platelets conferred by their lack of nucleus, platelet refractoriness is one of the main problems in severe alloimmunized patients who have been transfused on multiple occasions with platelets from donors with different human leukocyte antigen (HLA). This has been overcome by gene editing with CRISPR-Cas9 to generate compatible platelets from iPSCs-derived megakaryocytes [10]. Other approaches have included to knockdown a certain HLA locus, to correct it according to the host or even to generate an HLA-universal iPSC line [11,12].

In addition to the generation of universal platelets, the upscaling of this process is an important consideration before introducing it into the clinics. *In vitro* platelet production (0.5 platelets/megakaryocyte) is significantly lower than *in vivo* megakaryopoiesis (>1000

platelets/megakaryocyte) [13]. To improve this ratio, the development of bioreactors has been crucial to yield scalable quantities of functional platelets derived from iPSCs-megakaryocytes. Based on *in vivo* observations, turbulences are important regulators of thrombopoiesis. For that reason, turbulent flow-based bioreactors have been designed for the production and release of high yield and quality platelets. Furthermore, the successful transplantation of these iPSCs-derived platelets into two animal models has been demonstrated by hemostatic and circulation tests [14]. At this moment, numerous research groups are turning their efforts towards the refinement of the iPSCs-derived platelet production in terms of platelet generation techniques and bioreactor designing. Indeed, this application of iPSCs is actually leading the regenerative medicine race.

2.1.2. The New Age of Drug Discovery

Traditionally, drug discovery and development have been accomplished by mimicking human diseases in animal models, heterologous expression systems, or immortalized cell lines. Over the years, these resources have been very valuable in the pharmaceutical industry. However, when candidate compounds identified using these models are tested in clinical trials, they usually lead to unexpected results. For example, these compounds could cause cardiotoxicity, safety problems, or other undesirable consequences. This is probably due to the limitations of these models to completely mimic the human disease phenotype. In addition, the high inherent costs and the decline in productivity make it necessary to adapt the drug development process to the paradigm shift and develop new procedures in the drug research area.

The capacity to differentiate into many disease-relevant cell types, the availability, and quick evolution of the technology has empowered iPSCs as the perfect tool for the generation of patient-specific cellular models and the so-called personalized medicine. Patient-derived iPSCs could better address specific disease characteristics and sum up the genetic background of the patient. Therefore, iPSCs may be very useful in understanding the interaction between genotype, phenotype, and drug response [15].

In terms of the discovery of novel therapeutic compounds, iPSCs represent a very suitable and almost endless source of cells to perform high throughput drug screenings to identify new drugs among large chemical libraries. This platform also opens up the possibility to carry out drug repurposing studies, *i.e.*, finding new medical uses for existing drugs. As an example, the anti-epileptic drug ezogabine was found to be effective in an iPSC model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and a clinical trial is currently ongoing [16]. In this study, iPSC-derived motor neurons from ALS patients not only displayed the characteristic disease phenotype (hyperexcitability, increased spontaneous action potentials, and reduced survival) but also showed reduced neuronal excitability and improved cell survival after treatment with ezogabine. Another example of iPSC-based drug screening was accomplished in a patient-derived iPSC model of dystroglycanopathies [17]. This group of congenital muscular dystrophies, often associated with brain malformations, are caused by defective glycosylation of α -dystroglycan. In this case, Kim *et al.* generated, for the first time, an iPSC line from a dystroglycanopathy patient with severe central nervous system abnormalities. Once they verified that the iPSCs recapitulated the pathological hallmarks of the disease, they successfully differentiated them into cortical neurons. Afterward, 31,954 compounds were screened and, among all of them, one was identified and validated as a potential candidate to treat this disease.

Recently, there has been a resurging interest in phenotypic drug screening, which could complement the actual target-based assays. The former relies on the identification of small molecules, peptides, or interference RNA that might modify the phenotype of the cells in the desired manner [18], whereas the latter measures the effect of compounds on a purified target protein using *in vitro* assays [19]. In the latest years, a significant percentage of the drugs discovered and validated were found using target-based assays, and, in fact, the traditional phenotypic drug screening was left aside [20]. As mentioned before, one great advantage of iPSCs is that they can better mimic the disease phenotype, covering the whole patient background. That might be the reason why the drug industry is now paying special attention to the retrieval of phenotypic drug screening, despite the great results of target-based

assays. Therefore, a combination of empirical (phenotypic) and molecular (target) approaches would be the ideal challenge for a successful drug screening [21]. One of the first studies in phenotypic drug screening was published by Lee et al. in 2012. They reported the identification of new compounds in familial dysautonomia-iPSCs by phenotypic high throughput screening [22]. This rare genetic disorder entails a marked reduction in the I κ B kinase complex-associated protein (IKAP), caused by mutations in the *IKBKAP* gene. Their first hit was the identification of multiple disease-specific phenotypes by the generation of several iPSCs lines from patients with dysautonomia. After that, a primary screen of 6912 small molecules was accomplished in the iPSC-derived neural crest progenitors, performing fold-difference analysis in the gene expression. Finally, eight compounds that significantly rescued IKAP expression were found. Several signs of progress have also been made in the knowledge of fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) by modeling the phenotypes with patient-derived iPSCs [23]. In this case, the correction of the causal mutation of FOP in the generated iPSC lines was crucial to elucidate the key genes associated with FOP onset and their role during chondrogenesis. Moreover, rapamycin has been postulated as a promising therapeutic compound to prevent the development of ossification in patients.

The fact that iPSCs can be derived from the patient and mimic the biochemical or metabolic aspects of the disease could be very useful to probe the bioactivity and toxicity of the drug in the early clinical stages of drug development. Actually, there are some studies focused on comparing the drug effect concurrently in patients and their iPSCs [24]. Moreover, pre-clinical safety and efficacy tests could be performed on patient-derived iPSCs, control iPSCs, and corrected iPSCs from patients to find potential side-effects. In that sense, the generation of isogenic iPSC lines with the correction of the disease-causing mutation could solve the problems related to the genetic background variance [25]. In 2018, Japanese researchers revealed ropinirole hydrochloride as a potential candidate drug for ALS treatment. They generated spinal motor neurons derived from patient-iPSCs and performed, successfully, the hit validation. At the present time, this promising study is in phase I/IIa, with tolerability and efficacy of the aforementioned drug also being explored using patient-derived iPSCs. This illustrates well how iPSCs have joined the drug discovery field [26].

The latest trend in iPSCs and drug discovery is the organ-on-a-chip (OOC) technology. These are micro-devices that combine microfluidics, iPSCs, and tissue engineering to generate three-dimensional self-organizing tissues. These platforms aim to replicate the physiological characteristics of tissues and organs of a certain group of patients or individuals to predict human global responses to drug treatments [27]. Several OOCs examples of different organs (liver, lung, heart, intestine, or blood-brain barrier) have been constructed and are now a powerful tool for the study of drug pharmacodynamics, pharmacokinetics, and toxicity profiling [28].

The use of iPSCs in drug screening foreshadows, presumably, a promising near future in the research field and the pharmaceutical industry, shortening the drug development time and reaching a unique goal: finding the maximum benefit with better drugs.

2.2. The Potential of iPS Cell-Based Therapeutics

Apart from those applications mentioned previously, it is feasible to use iPSCs in the clinics in a more direct way. Cell therapy turns out to be a relatively novel technique that aims to implant human cells into a patient to repair or replace an injured tissue or restore the functionality of an organ [29]. This is especially useful for organs with poor regenerative capacity, such as the heart, since adult stem cells are unable to unravel the serious problem of tissue damage or disease [30].

In this context, endogenous stem cells have been broadly explored to be applied to these approaches [31]. For example, cell therapeutics with mesenchymal stem cells (MSCs) have proven evidence for efficacy and safety in animal models. This fact, along with the ease of manipulation, has boosted the approval of various clinical trials with MSCs [32]. However, the short lifespan associated with adult stem cells strongly limits their use in the clinics [33]. At the present time, iPSCs are almost certainly the most promising source for cell replacement therapies and tissue engineering. This is

mainly due to their self-renewal capacity and the possibility to potentially give rise to any kind of cell [34]. Nevertheless, iPSCs differentiation protocols towards different cell types require vast enhancement of efficiency rates to obtain the proper maturation, as we will discuss later [35]. Once this is accomplished, the application of iPSCs technology could ideally satisfy the demand that cannot be fulfilled only by organ transplantation [36].

iPSCs technology opens a wide range of therapeutic possibilities, employing different strategies for different necessities. Functional cells could be engrafted, either as stem cells or differentiated to another cell type, to replace the damaged ones [37]. It is also possible that injected stem cells secrete growth factors stimulating the repair of non-functional cells [38]. Occasionally, the use of iPSC-derivatives for regenerative medicine is limited by the low therapeutic efficacy of transplanting cells alone, as their survival and differentiation potentials may be compromised [39]. Thus, tissue engineering emerges as the combination of cells with the optimal biomaterials for achieving organ or tissue regeneration. The development of a suitable scaffold to support cells *in vivo* could ameliorate cell viability and their structural stability, guiding the growth of the new tissue [40].

In stem cell therapy, autologous transplantation would be idyllic to overcome the complications associated with immune rejection. The likelihood of generating iPSCs from the patient's somatic cells has revolutionized the field, considering that these iPSCs could possibly be differentiated into the cells affected in the particular disease and eventually transplanted back into the patient [41]. In this scenario, and thanks to the great advances in genome editing technologies, personalized medicine is now on the horizon. Disease-causing mutations could be precisely corrected in patient-derived iPSC lines as a means to achieve more specific clinical treatments [30]. The main problem associated with autologous transplants is that they imply the necessity to carry out the whole extensive procedure for each individual. The process of somatic cell reprogramming and iPSC cell differentiation is very time-consuming and presents technical difficulties, without contemplating the elevated costs [42].

On the other side, allogeneic transplantation is associated with the concomitant requirement of administering immunosuppressive drugs. Although long-term administration appears to be indispensable in most cases for preventing rejection, the immunosuppression degree needs to be determined for each concrete engraftment [43]. To solve these issues, another possibility would be the allogeneic transplantation of iPSCs obtained from a donor who is HLA compatible with the patient, which would reduce immune rejection [44]. In this regard, the feasibility of creating a genomic stability-validated iPSC bank containing homozygous cell lines to allow the HLA matching for a large number of potential recipients is being widely explored. Those biobanks would enable fast access to a high amount of cells, which is actually the main purpose [45].

2.3. Preclinical Studies and Ongoing Clinical Trials

It is important to highlight that translation into the clinics still entails a long road ahead. In the preclinical stage, the therapeutic response has to be predicted. In this sense, animal modeling is a highly valuable tool to foresee if grafted cells could integrate and fulfill their function correctly [46]. After that, the different clinical trial phases assure that essential parameters, such as tumorigenicity, dose toxicity, and immunogenicity, are assessed before finally approving the product to be grafted into the patients [44].

At the present time, iPSC technologies have reached a point where several cellular therapies have started their way towards the clinics [43]. In this section, we will focus on the main achievements in iPSC-based therapies, going through the development of every remarkable clinical trial (Table 1).

Table 1. Clinical trials for the therapeutic application of induced pluripotent stem cells (iPSC) derivatives.

Disease	Cell Type	Transplant Type	Institution and Country	Study Start Date *	Registration Number	Status	Reference
Age-related macular degeneration	Retinal pigment epithelial cells	Autologous	RIKEN Centre for Developmental Biology (Japan)	October 2013	UMIN000011929	Phase I (suspended)	[47]
Age-related macular degeneration	Retinal pigment epithelial cells	Allogeneic	RIKEN Centre for Developmental Biology (Japan)	Unknown	Unknown	Phase I	[48]
Limbal stem cell deficiency	Corneal stem cells	Allogeneic	Osaka University (Japan)	Unknown	Unknown	Phase I	[49]
Parkinson	Dopamine precursor cells	Allogeneic	Kyoto University (Japan)	July 2018	UMIN000033564	Phase I/II	[50]
Cancer	Natural killer cells	Allogeneic	University of Minnesota (US) and Fate Therapeutics (US)	February 2019	NCT03841110	Phase I	[51]
Graft-versus-host disease	Mesenchymal stem cells	Allogeneic	Cynata Therapeutics (Australia)	October 2016	NCT02923375	Phase I completed	[52]
Spinal cord injury	Neural progenitor cells	Allogeneic	Keio University (Japan)	N/A	N/A	Not yet recruiting	[53]
Heart failure	Cardiomyocytes	Allogeneic	Osaka University (Japan)	June 2018	UMIN000032989	Not yet recruiting	[54]
Aplastic anemia	Platelets	Autologous	Kyoto University (Japan)	N/A	N/A	Not yet recruiting	[55]

* The study start date refers to the date at which the study was registered for the first time.

To date, the more notable progress has been made for retinal degeneration diseases, specifically for age-related macular degeneration (AMD). In 2009, preclinical data demonstrated for the first time the recovery of visual function when injecting retinal pigment epithelium (RPE) differentiated from iPSCs in a rat model's retina [56]. A great leap forward was taken when the group headed by Masayo Takahashi at the Riken Centre for Developmental Biology in Japan generated iPSC-RPE cell sheets in 2014. They characterized them to meet clinical use requirements and reported successful transplantation in a primate model, without any complications [57].

These events led to the initiation of the first iPSCs clinical trial in the same year. Investigators at the Riken Centre grafted an autologous iPSC-RPE cell sheet under the affected retina, without immunosuppression, in a 77-year-old woman with AMD [47]. However, the trial was suspended the following year, due to the detection of a genetic copy-number alteration in the iPSCs of the second patient who was enrolled [58]. One year post-transplantation, the progression of the degeneration was halted, an area with photoreceptors recovery was observed, and her vision remained stable [47,59]. There were no signs of immune rejection or tumor formation. Hence, they concluded that the transplantation was safe [60]. However, it was doubted if the sheet was tolerated because of the eye's immunoprivileged nature and whether this would be ever accomplished in other organs [61]. Recently, investigators involved in this clinical trial have shifted their approach toward the use of HLA-matched allogeneic iPSCs. After a successful proof-of-concept in non-human primates [62], in March 2017, they announced that a 60-year-old man was the first patient to receive iPSC-RPE cells derived from another person [48]. Furthermore, a clinical-grade iPSC bank from healthy HLA homozygous donors is now being established at the Centre for iPS Cell Research and Application (CiRA) in Kyoto (Japan) [63]. The latest advance has only recently taken place in July 2019, when Kohji Nishida and colleagues at Osaka University initiated a clinical trial for limbal stem cell deficiency, a condition in which corneal stem cells are lost. They grafted a sheet of iPSC-derived corneal cells into the cornea of a patient, and just one month later, her vision seemed to have improved [49].

Neurological disorders have likewise attracted a lot of attention, with therapies for Parkinson's disease clearly being the most advanced. Since Wernig et al. confirmed in 2008 that symptoms and dopaminergic function of rat models improved when injecting iPSC-derived dopaminergic neurons [64], significant progress has been made in this sector. Just a few years ago, in Japan, dopaminergic progenitor cells differentiated from iPSCs were transplanted into a primate model of Parkinson's disease and showed to proper function [65]. Moreover, dopamine precursor cells were derived from iPSCs established out of HLA-homozygous healthy individuals by Jun Takahashi's research group at Kyoto University. In October 2018, the second clinical trial using iPSCs started when these precursors were implanted into the brain of a patient in his 50 s, amongst a total of seven patients recruited [50].

Furthermore, iPSCs-derived products are also highly valuable in immunotherapy for patients with solid tumors. In 2016, the administration of iPSC-derived natural killer (NK) cells into a mouse model provided proof of their potential for effective immunotherapy treatment of ovarian cancer [66]. Quite recently, in February 2019, allogeneic iPSC-derived NK cells generated by a research group at the University of Minnesota, in collaboration with Fate Therapeutics, were approved for a clinical trial. Their aim is to treat up to 64 patients with diverse cancer types using either monotherapy alone or in combination with immune inhibitors [51]. In addition, iPSC-based therapies are being conducted for graft-versus-host disease (GVHD). The Australian company Cynata Therapeutics received approval to proceed with a clinical trial of allogeneic iPSC-derived mesenchymal stem cells (MSCs). They established CymerusTM iPSC-MSCs and tested preclinical efficacy in a humanized mouse model [67]. In 2018, phase I of the trial was completed in 16 steroid-resistant GVHD patients with positive results, supporting progression to a phase II trial [52].

Following these steps, other diseases have a prospective therapy in their developmental path. For spinal cord injuries, preclinical studies with iPSCs-neural progenitor cells in a non-human primate model provided evidence for remyelination and locomotor function recovery [68]. In February 2018, the

Japan government gave the go-ahead to Professor Hideyuki Okano for a clinical trial aimed at treating patients with spinal cord injuries at Keio University (Tokyo) [53,69]. Conversely, in 2017, iPSC-derived cardiomyocytes were transplanted by Kawamura et al. in a porcine model of ischemic cardiomyopathy using a cell-sheet technique. Cardiac function was markedly improved, and neovasculogenesis was stimulated [70]. Recently, Yoshiki Sawa and colleagues at Osaka University have attained the approval for a clinical trial to graft allogeneic sheets of tissue derived from iPSCs onto diseased hearts of three patients [54]. Likewise, a group from Kyoto University has obtained the endorsement to begin a transfusion trial using platelets derived from iPSCs of an individual with aplastic anemia [55].

In addition to all the clinical trials performed up to now, preclinical studies are also being explored for other diseases [71]. Clearly, iPSC-based cellular therapies have progressed largely, considering that only a few years ago, iPSCs had not been tested in clinics, and, now, clinical trials are increasingly emerging.

3. Where We Are and Where We Are Heading to

It is absolutely without doubt that the emergence of iPSCs technology marked a turning point in biomedical research [72]. The ten-year anniversary of the iPSCs breakthrough in the scientific landscape was celebrated in 2016. This was a point where many researchers reflected if the initial enthusiasm about all the potential of these cells had only been an illusion, or if they could actually take the leap from the culture dish to the patient.

The advantages of iPSCs are extremely well-known at many distinct levels, for instance, their capacity to differentiate to any cell type or even their potential to create a patient-derived disease model [73]. However, there are many barriers to encounter that, unfortunately, nowadays block their way to the patient. After reviewing some of the main applications of iPSCs in the clinics, we will now discuss the principal drawbacks which are trying to be surpassed in the path towards a clinical translation (Figure 2).

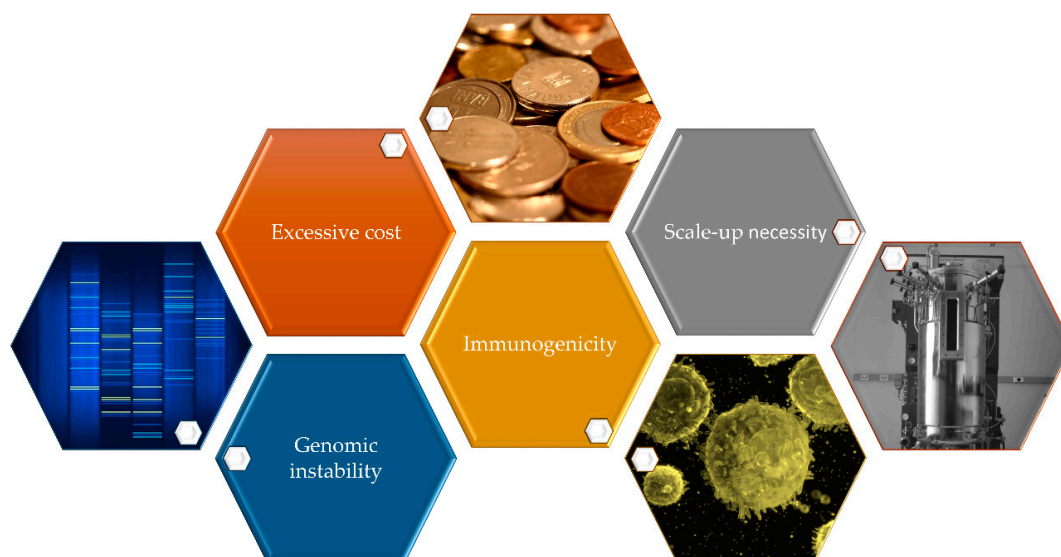


Figure 2. Principal hurdles encountered when translating iPSCs to the clinics.

3.1. Economic Issues

First, iPSC technology is rather costly. It is estimated that the generation and expansion of an iPSC line, along with all the necessary tests to assess its pluripotency and safety, cost between 10–20,000 US dollars and require between 4 and 6 months for its production [74]. However, when preparing the cell line for the clinics, these costs can reach up to 1 million dollars. It is reasonable to think that there is an urgent need to find a cost-effective manner to overcome this hurdle, which would definitely ease

the iPSCs translation to the clinics. In this regard, although autologous therapies can be particularly attractive in terms of personalized treatments [75], the current cost of such therapies would indeed be prohibitive and definitely time-consuming [76]. That is why allogeneic therapies may be a good alternative, as they are more economical and could reach a wider number of patients. Nonetheless, several additional difficulties exist which could hold up their immediate application.

3.2. Genomic Instability, an Old Enemy

One of the main concerns that arose soon after the development of iPSCs was their genomic stability. Chromosomal aberrations are quite common during the reprogramming process, and other types of mutations have been found at a significant frequency [77]. In fact, as presented before, the first clinical trial involving iPSCs-derivatives was suspended because of the identification of copy number alterations in the second patient's iPSCs, which were not found in the primary fibroblasts [78].

Mutations present in iPSCs can arise from three different origins: they can be induced by the subsequent passages of these cells, induced by the reprogramming process itself, or they can be mutations already existing in the primary cells [79]. However, the principal issue is the consequences of those mutations, as some of them could lead to an increased tumorigenic potential. It is necessary to address this safety issue for iPSCs in clinical use and optimize the reprogramming and manufacturing conditions of these cells in a very strict manner to ensure the possibility of a derived therapy.

3.3. Immunogenicity: the Main Obstacle?

The announcement in 2011 that iPSC-derived teratomas could elicit a T-dependent immune response in syngeneic mice soon derived in a general skepticism about the therapeutic options for these cells, as even autologous iPSCs seemed to be immunogenic [80]. After that, many groups started to investigate the immunogenicity of iPSCs, since if it was confirmed that they could trigger an immune response in the host, their possible applications in the clinics would be ruled out immediately. However, several posterior studies started to question this statement, indicating that iPSC-derived cells are not immunogenic by themselves and are well tolerated by the immune system [81,82]. Subsequently, Zhao and co-workers utilized a humanized mouse model to test the immunogenicity of several distinct iPSC-derived cells, finding that the immune response was different from one kind of derivative to another [83]. Thus, the immune response elicited by iPSCs or their derivatives seems different depending on the cell line in question. This response may be triggered by epigenetic alterations present in the cell lines or even genomic abnormalities that give rise to aberrant immunogenic products [84]. Although the complete lack of immunosuppressive drugs in iPSC-derived therapies maybe a difficult goal to reach, the deep understanding of the immune response occasioned by these cells can be a huge step forward towards greater safety and a decrease in the necessity of immunosuppressive treatments in the case of iPSCs transplants [85].

3.4. Biobanking the iPSCs

As reviewed earlier, the cost and time required for autologous therapies to become a reality for the patients are, unfortunately, two of the main reasons why they seem to be far from the clinics [35]. Perhaps the alternative of allogeneic transplants could be the optimal solution, but the problems associated with immunogenicity are the main drawback. In theory, there could be three different scenarios in which the immune rejection could be minimal: whether the iPSCs are remaining for a short period inside the patient, whether they are not immunogenic by themselves, or whether they are to be injected into an immune-privileged site [86]. However, in many cases, the immunogenicity cannot be excluded from the equation, constituting one of the main problems criticized in the clinical translation of iPSCs. For this reason, many researchers began proposing the possibility of creating an iPSCs biobank characterized in terms of the HLA, to not only reduce the costs of the technology itself but to minimize the immune rejection problem and facilitate the possibility of bringing the iPSCs therapy to reality [45].

As the HLA system is highly polymorphic, it has been suggested that considering only the loci HLA-A, HLA-B, and HLA-DR would be sufficient to reduce the rejection and the doses of immunosuppression required. The proposal would be to create an iPSCs bank from HLA-homozygous and blood group O donors, simplifying the patient-donor matching [87]. In fact, it has been estimated that 150 HLA-homozygous iPSC lines would be sufficient to match 93% of United Kingdom recipients [88], and 140 selected donors would be enough for the 90% of Japan population [89]. Maybe the creation of several biobanks with selected lines considering the HLA diversity on different populations, could cover the majority of the iPSC lines required worldwide. Additionally, it is pivotal to remark that HLA-characterized iPSCs biobanks for a clinical application would also need specific requirements, standardized manufacturing protocols, and safety controls much stricter than for research to ensure the security of the potential treatments developed [90].

3.5. Loose Ends in the Clinical iPSCs Application

The application of iPSCs in the clinics seems to have many ups and downs. The huge potential of this technology is absolutely unquestionable, but the blockade due to some aspects mentioned previously still remain to be resolved. Moreover, the standardization of the reprogramming protocols and the implementation of good manufacturing procedures for the manipulation of these cells seem crucial to obtain a good translational product [91].

Currently, the production of iPSCs is still restricted to the laboratory, which greatly limits their applicability. It would be necessary to adjust the conditions and methods for a large-scale expansion of the iPSCs production, mainly since cellular therapies would need large quantities of them to be feasible [92]. The monitoring of the toxicity and tumorigenicity, as well as the assessment of the safety of the cells, is absolutely indispensable for the clinical application of iPSCs [93].

Additionally, there is a present need to optimize the differentiation procedures to derive iPSCs to the specific lineage of interest [94]. Theoretically, the potential of iPSCs is based on their capacity to differentiate virtually to any cell type, but in practice, the reality is rather different. It is frequent that the differentiation gives rise to an undesirable phenotypic heterogeneity and a lack of maturity, with low-efficiency rates [95]. In terms of iPSCs differentiation, there are several distinct approaches that could be implemented. Some protocols are based on the introduction of a certain critical transcriptional factor related to the cell type in question, often with the use of viral vectors [96]. The main problem here would be the integration within the genome, which could compromise the safety of the iPSCs-derivatives. Another kind of protocol is centered on mimicking embryonic development with the addition or elimination of strategic molecules in the cell culture medium, trying to activate or inhibit certain key pathways and distance iPSCs from their pluripotency [97,98]. However, the incapacity of any of these protocols to achieve a complete maturity is the main drawback, especially in certain cell types, such as cardiomyocytes, and diseases where the affected phenotype is only exhibited at a very late stage [99,100]. That is why new approaches are being tested to resolve this issue. For instance, some groups are trying to achieve a more mature differentiation state based on the use of different small molecules cocktails, the manipulation of the cellular growth environment, or even the implementation of 3D approaches [101,102].

3.6. A Glimpse of the Future

There are several novel strategies that seek to overcome some of the pitfalls previously mentioned, shedding light on the possibility of widespread utilization of iPSCs in the clinics. For instance, the introduction of a suicide gene based on the herpes simplex virus thymidine kinase could incorporate some sort of “emergency switch” which could be activated by a non-toxic drug when the iPSCs were not needed anymore or in case of a problem, such a tumorigenic risk [103]. Alternatively, Deuse and colleagues have tried to overcome the problem of immunogenicity by inactivating some key components of the major histocompatibility complex (MHC) class I and II with CRISPR/Cas9 technology and overexpressing the transmembrane protein CD47 [104]. This way, they have created

hypoinmunogenic cells, which elude the host's immune response, opening the door to the possibility of creating universal non-immunogenic cells [105]. Although all these new approaches are still at the early stages of development, it does seem clear that the advances in the field are taking place at a high velocity. Therefore, it would not be surprising that the translation of iPSCs to the clinics would continue to grow with more clinical trials and cellular therapies appearing in the near future.

4. Concluding Remarks

The potential of iPSCs is not only restricted to basic research in a laboratory as disease models or pathophysiological studies but nowadays, they have already taken the leap from bench to bedside. Cell therapy illustrates this huge advance with several ongoing clinical trials and many more to come. The examples in age-related macular degeneration and Parkinson's unveil that, after the scientific efforts to develop the technology, and despite their inherent hurdles, iPSCs can successfully treat the patient. In the meantime, iPSCs are already a very powerful tool in the development of new therapeutic drugs, and they can even be used as an intermediate to generate other products of interest as platelets. Nevertheless, many issues related to the clinical employment of iPSCs are still controversial, such as immunogenicity, genome instability, or tumorigenicity. Furthermore, the elevated cost of their production, along with the necessity to standardize the technical protocols, restrain the scaling up of this promising technology, which would be necessary to bring it to a greater number of patients. With this in mind, it is important to note that new strategies are being developed to solve these pitfalls, which will prompt the definitive implementation of this technology on a wider scale.

Author Contributions: M.d.C.O.-C., M.G.-L., V.C., and M.E.G. contributed to manuscript drafting. M.E.G. contributed to manuscript critical revision. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Funding: This work was funded by grants from the 'Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III co-funded by European Regional Development Funds': PI15/00484 and PI18/00151 to M.E.G. M.d.C.O.-C. receives grant support from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU16/03895). M.G.-L. is supported by a grant from Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, i+12. M.E.G. is supported by a 'Miguel Servet' contract (CP16/00046) from Instituto de Salud Carlos III and European Regional Development Funds.

Acknowledgments: We are very grateful to Karen Heath for proofreading the manuscript and correcting English language use and style.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

iPSCs	induced pluripotent stem cells
ESCs	embryonic stem cells
HLA	human leukocyte antigen
ALS	amyotrophic lateral sclerosis
FOP	fibrodysplasia ossificans progressiva
IKAP	I κ B kinase complex-associated protein
OOC	organ-on-a-chip
MSCs	mesenchymal stem cells
AMD	age-related macular degeneration
RPE	retinal pigment epithelium
CiRA	center for iPS cell research and application
NK	natural killer
GVHD	graft-versus-host disease
MHC	major histocompatibility complex

References

1. Takahashi, K.; Yamanaka, S.; Zhang, Y.; Li, Y.; Feng, C.; Li, X.; Lin, L.; Guo, L.; Wang, H.; Liu, C.; et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Yu, J.; Vodyanik, M.A.; Smuga-Otto, K.; Antosiewicz-Bourget, J.; Frane, J.L.; Tian, S.; Nie, J.; Jonsdottir, G.A.; Ruotti, V.; Stewart, R.; et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **2007**, *318*, 1917–1920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Choi, J.; Lee, S.; Clement, K.; Mallard, W.; Tagliazucchi, G.M.; Lim, H.; Choi, I.Y.; Ferrari, F.; Tsankov, A.; Pop, R.; et al. A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *25*, 289–313. [[CrossRef](#)]
5. Shi, Y.; Inoue, H.; Wu, J.C.; Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 115–130. [[CrossRef](#)]
6. Ratajczak, M.Z.; Bujko, K.; Wojakowski, W. Stem cells and clinical practice: New advances and challenges at the time of emerging problems with induced pluripotent stem cell therapies. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **2016**, *126*, 879–890. [[CrossRef](#)]
7. Strassel, C.; Gachet, C.; Lanza, F. On the way to in vitro platelet production. *Front. Med.* **2018**, *5*, 220–227. [[CrossRef](#)]
8. Sugimoto, N.; Eto, K. Platelet production from induced pluripotent stem cells. *J. Thromb. Haemost.* **2017**, *15*, 1717–1727. [[CrossRef](#)]
9. Feng, Q.; Shabrani, N.; Thon, J.N.; Huo, H.; Thiel, A.; Machlus, K.R.; Kim, K.; Brooks, J.; Li, F.; Luo, C.; et al. Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* **2014**, *3*, 817–831. [[CrossRef](#)]
10. Lawrence, M.; Mueller, A.; Ghevaert, C. Using genome editing to engineer universal platelets. *Emerg. Top. Life Sci.* **2019**, *3*, 301–311.
11. Jang, Y.; Choi, J.; Park, N.; Kang, J.; Kim, M.; Kim, Y.; Ju, J.H. Development of immunocompatible pluripotent stem cells via CRISPR-based human leukocyte antigen engineering. *Exp. Mol. Med.* **2019**, *51*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Börger, A.K.; Eicke, D.; Wolf, C.; Gras, C.; Aufderbeck, S.; Schulze, K.; Engels, L.; Eiz-Vesper, B.; Schambach, A.; Guzman, C.; et al. Generation of HLA-universal iPSC-derived megakaryocytes and platelets for survival under refractoriness conditions. *Mol. Med.* **2016**, *22*, 274–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hansen, M.; von Lindern, M.; van den Akker, E.; Varga, E. Human induced pluripotent stem cell-derived blood products: State of the art and future directions. *FEBS Lett.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ito, Y.; Nakamura, S.; Sugimoto, N.; Shigemori, T.; Kato, Y.; Ohno, M.; Sakuma, S.; Ito, K.; Kumon, H.; Hirose, H.; et al. Turbulence activates platelet biogenesis to enable clinical scale ex vivo production. *Cell* **2018**, *174*, 636–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Engle, S.J.; Puppala, D. Integrating human pluripotent stem cells into drug development. *Cell Stem Cell* **2013**, *12*, 669–677. [[CrossRef](#)]
16. McNeish, J.; Gardner, J.P.; Wainger, B.J.; Woolf, C.J.; Eggan, K. From dish to bedside: lessons learned while translating findings from a stem cell model of disease to a clinical trial. *Cell Stem Cell* **2015**, *17*, 8–10. [[CrossRef](#)]
17. Kim, J.; Lana, B.; Torelli, S.; Ryan, D.; Catapano, F.; Ala, P.; Luft, C.; Stevens, E.; Konstantinidis, E.; Louzada, S.; et al. A new patient-derived iPSC model for dystroglycanopathies validates a compound that increases glycosylation of α -dystroglycan. *EMBO Rep.* **2019**, *20*, e47967. [[CrossRef](#)]
18. Kokubu, Y.; Nagino, T.; Sasa, K.; Oikawa, T.; Miyake, K.; Kume, A.; Fukuda, M.; Fuse, H.; Tozawa, R.; Sakurai, H. Phenotypic drug screening for dysferlinopathy using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* **2019**. [[CrossRef](#)]
19. Kotz, J. Phenotypic screening, take two. *Sci. Exch.* **2012**, *5*, 380. [[CrossRef](#)]
20. Eder, J.; Sedrani, R.; Wiesmann, C. The discovery of first-in-class drugs: Origins and evolution. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 577–587. [[CrossRef](#)]
21. Swinney, D.C. Phenotypic vs. Target-based drug discovery for first-in-class medicines. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2013**, *93*, 299–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lee, G.; Ramirez, C.N.; Kim, H.; Zeltner, N.; Liu, B.; Radu, C.; Bhinder, B.; Kim, Y.J.; Choi, I.Y.; Mukherjee-Clavin, B.; et al. Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells identifies compounds that rescue IKBKAP expression. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 1244–1248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Nakajima, T.; Ikeya, M. Insights into the biology of fibrodysplasia ossificans progressiva using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Regen. Ther.* **2019**, *11*, 25–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Garbes, L.; Heesen, L.; Hölker, I.; Bauer, T.; Schreml, J.; Zimmermann, K.; Thoenes, M.; Walter, M.; Dimos, J.; Peitz, M.; et al. VPA response in SMA is suppressed by the fatty acid translocase CD36. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 398–407. [[CrossRef](#)]
25. Zhang, N.; Bailus, B.J.; Ring, K.L.; Ellerby, L.M. iPSC-based drug screening for Huntingtons disease. *Brain Res.* **2016**, *1638*, 42–56. [[CrossRef](#)]
26. Morimoto, S.; Takahashi, S.; Fukushima, K.; Saya, H.; Suzuki, N.; Aoki, M.; Okano, H.; Nakahara, J. Ropinirole hydrochloride remedy for amyotrophic lateral sclerosis—Protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, and open-label continuation phase I/IIa clinical trial (ROPALS trial). *Regen. Ther.* **2019**, *11*, 143–166. [[CrossRef](#)]
27. Jodat, Y.A.; Kang, M.G.; Kiaee, K.; Kim, G.J.; Martinez, A.F.H.; Rosenkranz, A.; Bae, H.; Shin, S.R. Human-derived organ-on-a-chip for personalized drug development. *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *24*, 5471–5486. [[CrossRef](#)]
28. Cavero, I.; Guillon, J.-M.; Holzgreffe, H.H. Human organotypic bioconstructs from organ-on-chip devices for human-predictive biological insights on drug candidates. *Expert Opin. Drug Saf.* **2019**, *18*, 651–677. [[CrossRef](#)]
29. Mao, A.S.; Mooney, D.J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 14452–14459. [[CrossRef](#)]
30. Chun, Y.S.; Byun, K.; Lee, B.C.-. 3254878 Induced pluripotent stem cells and personalized medicine: current progress and future perspectives. *Anat Cell Biol.* **2011**, *44*, 245–255. [[CrossRef](#)]
31. Bhagavati, S. Stem Cell Therapy: Challenges Ahead. *Indian J. Pediatr.* **2015**, *82*, 286–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Duncan, T.; Valenzuela, M. Alzheimer’s disease, dementia, and stem cell therapy. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Steens, J.; Klein, D. Current strategies to generate human mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells Int.* **2018**, *2018*, 24–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wang, F.; Kong, J.; Cui, Y.-Y.; Liu, P.; Wen, J.-Y. Is human-induced pluripotent stem cell the best optimal? *Chin. Med. J.* **2018**, *131*, 852–856. [[CrossRef](#)]
35. Doss, M.X.; Sachinidis, A. Current challenges of iPSC-based disease modeling and therapeutic implications. *Cells* **2019**, *8*, 403. [[CrossRef](#)]
36. De Vos, J.; Assou, S. Induced pluripotent stem cells: An unlimited source of organs for transplantation. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2017**, *41*, 249–253. [[CrossRef](#)]
37. Liras, A.; Segovia, C.; Gabán, A.S. Induced pluripotent stem cells: Therapeutic applications in monogenic and metabolic diseases, and regulatory and bioethical considerations. *Intech* **2016**, *i*, 13.
38. Glicksman, M.A. Induced pluripotent stem cells: The most versatile source for stem cell therapy. *Clin. Ther.* **2018**, *40*, 1060–1065. [[CrossRef](#)]
39. Rami, F.; Beni, S.N.; Kahnmooui, M.M.; Rahimmanesh, I.; Salehi, A.R.; Salehi, R. Recent advances in therapeutic applications of induced pluripotent stem cells. *Cell. Reprogram.* **2017**, *19*, 65–74. [[CrossRef](#)]
40. O’Brien, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today* **2011**, *14*, 88–95.
41. De Lázaro, I.; Yilmazer, A.; Kostarelos, K. Induced pluripotent stem (iPS) cells: A new source for cell-based therapeutics? *J. Control. Release* **2014**, *185*, 37–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Li, C.; Chen, S.; Zhou, Y.; Zhao, Y.; Liu, P.; Cai, J. Application of induced pluripotent stem cell transplants: Autologous or allogeneic? *Life Sci.* **2018**, *212*, 145–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Martin, U. Therapeutic application of pluripotent stem cells: Challenges and risks. *Front. Med.* **2017**, *4*, 229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Neofytou, E.; Brien, C.G.O.; Couture, L.A.; Wu, J.C. Hurdles to clinical translation of human induced pluripotent stem cells. **2015**, *125*, 2551–2557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. de Rham, C.; Villard, J. Potential and limitation of HLA-based banking of human pluripotent stem cells for cell therapy. *J. Immunol. Res.* **2014**, *2014*, 518135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Trounson, A.; DeWitt, N.D. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 194–200. [[CrossRef](#)]

47. Mandai, M.; Watanabe, A.; Kurimoto, Y.; Hiram, Y.; Morinaga, C.; Daimon, T.; Fujihara, M.; Akimaru, H.; Sakai, N.; Shibata, Y.; et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1038–1046. [[CrossRef](#)]
48. Cyranoski, D. Japanese man is first to receive “reprogrammed” stem cells from another person. *Nature* **2017**, *10*. [[CrossRef](#)]
49. Cyranoski, D. Woman is first to receive cornea made from “reprogrammed” stem cells. *Nature* **2019**. [[CrossRef](#)]
50. Cyranoski, D. “Reprogrammed” stem cells implanted into patient with Parkinson’s disease. *Nature* **2018**. [[CrossRef](#)]
51. Nianias, A.; Themeli, M. Induced pluripotent stem cell (iPSC)–derived lymphocytes for adoptive cell immunotherapy: Recent advances and challenges. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **2019**, 261–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Rasko, J.E.J.; Patel, A.; Griffin, J.E.; Gillece, M.H.; Radia, R.; Yeung, D.T.; Slukvin, I.; Kelly, K.; Bloor, A.J. Results of the first completed clinical trial of an iPSC-derived product: CYP-001 in steroid-resistant acute GvHD. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2019**, *25*, S255–S256. [[CrossRef](#)]
53. Cyranoski, D. “Reprogrammed” stem cells to treat spinal-cord injuries for the first time. *Nature* **2019**. [[CrossRef](#)]
54. Cyranoski, D. “Reprogrammed” stem cells approved to mend human hearts for the first time. *Nature* **2018**. [[CrossRef](#)]
55. Akabayashi, A.; Nakazawa, E.; Jecker, N.S. The world’s first clinical trial for an aplastic anemia patient with thrombocytopenia administering platelets generated from autologous iPSCs. *Int. J. Hematol.* **2019**, *109*, 239–240. [[CrossRef](#)]
56. Carr, A.J.; Vugler, A.A.; Hikita, S.T.; Lawrence, J.M.; Gias, C.; Chen, L.L.; Buchholz, D.E.; Ahmado, A.; Semo, M.; Smart, M.J.K.; et al. Protective effects of human iPSC-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e8152. [[CrossRef](#)]
57. Kamao, H.; Mandai, M.; Okamoto, S.; Sakai, N.; Suga, A.; Sugita, S.; Kiryu, J.; Takahashi, M. Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Rep.* **2014**, *2*, 205–218. [[CrossRef](#)]
58. Garber, K. RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 890–891. [[CrossRef](#)]
59. Scudellari, M. A decade of iPSC cells. *Nature* **2016**, *534*, 310–312. [[CrossRef](#)]
60. Apatoff, M.B.L.; Sengillo, J.D.; White, E.C.; Bakhoun, M.F.; Bassuk, A.G.; Mahajan, V.B.; Tsang, S.H. Autologous stem cell therapy for inherited and acquired retinal disease. *Regen. Med.* **2018**, *13*, 89–96. [[CrossRef](#)]
61. Streilein, J.W.; Ma, N.; Wenkel, H.; Fong Ng, T.; Zamiri, P. Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res.* **2002**, *42*, 487–495. [[CrossRef](#)]
62. Sugita, S.; Iwasaki, Y.; Makabe, K.; Kamao, H.; Mandai, M.; Shiina, T.; Ogasawara, K.; Hiram, Y.; Kurimoto, Y.; Takahashi, M. Successful transplantation of retinal pigment epithelial cells from MHC homozygote iPSCs in MHC-matched models. *Stem Cell Rep.* **2016**, *7*, 635–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Umekage, M.; Sato, Y.; Takasu, N. Overview: an iPSC cell stock at CiRA. *Inflamm. Regen.* **2019**, *39*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Wernig, M.; Zhao, J.P.; Pruszak, J.; Hedlund, E.; Fu, D.; Soldner, F.; Broccoli, V.; Constantine-Paton, M.; Isacson, O.; Jaenisch, R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson’s disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 5856–5861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Kikuchi, T.; Morizane, A.; Doi, D.; Magotani, H.; Onoe, H.; Hayashi, T.; Mizuma, H.; Takara, S.; Takahashi, R.; Inoue, H.; et al. Human iPSC cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson’s disease model. *Nature* **2017**, *548*, 592–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Hermanson, D.L.; Bendzick, L.; Pribyl, L.; McCullar, V.; Vogel, R.I.; Miller, J.S.; Geller, M.A.; Kaufman, D.S. Induced pluripotent stem cell-derived natural killer cells for treatment of ovarian cancer. *Stem Cells* **2016**, *34*, 93–101. [[CrossRef](#)]
67. Ozay, E.I.; Vijayaraghavan, J.; Gonzalez-Perez, G.; Shanthalingam, S.; Sherman, H.L.; Garrigan, D.T.; Chandiran, K.; Torres, J.A.; Osborne, B.A.; Tew, G.N.; et al. Cymerus™ iPSC-MSCs significantly prolong

- survival in a pre-clinical, humanized mouse model of Graft-vs-host disease. *Stem Cell Res.* **2019**, *35*, 1–29. [[CrossRef](#)]
68. Kobayashi, Y.; Okada, Y.; Itakura, G.; Iwai, H.; Nishimura, S.; Yasuda, A.; Nori, S.; Hikishima, K.; Konomi, T.; Fujiyoshi, K.; et al. Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52787. [[CrossRef](#)]
69. Tsuji, O.; Sugai, K.; Yamaguchi, R.; Tashiro, S.; Nagoshi, N.; Kohyama, J.; Iida, T.; Ohkubo, T.; Itakura, G.; Isoda, M.; et al. Concise review: laying the groundwork for a first-in-human study of an induced pluripotent stem cell-based intervention for spinal cord injury. *Stem Cells* **2019**, *37*, 6–13. [[CrossRef](#)]
70. Kawamura, M.; Miyagawa, S.; Fukushima, S.; Saito, A.; Miki, K.; Funakoshi, S.; Yoshida, Y.; Yamanaka, S.; Shimizu, T.; Okano, T.; et al. Enhanced therapeutic effects of human iPSC cell derived-cardiomyocyte by combined cell-sheets with omental flap technique in porcine ischemic cardiomyopathy model. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–11. [[CrossRef](#)]
71. Kimbrel, E.A.; Lanza, R. Pluripotent stem cells: the last 10 years. *Regen. Med.* **2016**, *11*, 831–847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Omole, A.E.; Fakoya, A.O.J. Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: Historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *PeerJ* **2018**, *6*, e4370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Karagiannis, P.; Nakauchi, A.; Yamanaka, S. Bringing induced pluripotent stem cell technology to the bedside. *JMA J.* **2018**, *1*, 6–14.
74. Bravery, C.A. Do human leukocyte antigen-typed cellular therapeutics based on induced pluripotent stem cells make commercial sense? *Stem Cells Dev.* **2015**, *24*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Kimbrel, E.A.; Lanza, R. Current status of pluripotent stem cells: Moving the first therapies to the clinic. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 681–692. [[CrossRef](#)]
76. D'Antonio, M.; Woodruff, G.; Nathanson, J.L.; D'Antonio-Chronowska, A.; Arias, A.; Matsui, H.; Williams, R.; Herrera, C.; Reyna, S.M.; Yeo, G.W.; et al. High-throughput and cost-effective characterization of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* **2017**, *8*, 1101–1111.
77. Turinetto, V.; Orlando, L.; Giachino, C. Induced pluripotent stem cells: Advances in the quest for genetic stability during reprogramming process. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1952. [[CrossRef](#)]
78. Attwood, S.; Edell, M. iPSC-cell technology and the problem of genetic instability—can it ever be safe for clinical use? *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 288. [[CrossRef](#)]
79. Yoshihara, M.; Hayashizaki, Y.; Murakawa, Y. Genomic instability of iPSCs: Challenges towards their clinical applications. *Stem Cell Rev. Rep.* **2017**, *13*, 7–16. [[CrossRef](#)]
80. Zhao, T.; Zhang, Z.-N.; Rong, Z.; Xu, Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* **2011**, *474*, 212–215. [[CrossRef](#)]
81. de Almeida, P.E.; Meyer, E.H.; Kooreman, N.G.; Diecke, S.; Dey, D.; Sanchez-Freire, V.; Hu, S.; Ebert, A.; Odegaard, J.; Mordwinkin, N.M.; et al. Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Guha, P.; Morgan, J.W.; Mostoslavsky, G.; Rodrigues, N.P.; Boyd, A.S. Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **2017**, *21*, 144–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Zhao, T.; Zhang, Z.; Westenskow, P.D.; Todorova, D.; Hu, Z.; Lin, T.; Rong, Z.; Kim, J.; He, J.; Wang, M.; et al. Humanized mice reveal differential immunogenicity of cells derived from autologous induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **2015**, *17*, 353–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Liu, X.; Li, W.; Fu, X.; Xu, Y. The immunogenicity and immune tolerance of pluripotent stem cell derivatives. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 645. [[CrossRef](#)]
85. Chhabra, A. Inherent immunogenicity or lack thereof of pluripotent stem cells: implications for cell replacement therapy. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Solomon, S.; Pitossi, F.; Rao, M.S. Banking on iPSC—is it doable and is it worthwhile. *Stem Cell Rev. Rep.* **2015**, *11*, 1–10. [[CrossRef](#)]
87. Nakajima, F.; Tokunaga, K.; Nakatsuji, N. Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy. *Stem Cells* **2007**, *25*, 983–985. [[CrossRef](#)]

88. Taylor, C.J.; Peacock, S.; Chaudhry, A.N.; Bradley, J.A.; Bolton, E.M. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell* **2012**, *11*, 147–152. [CrossRef]
89. Okita, K.; Matsumura, Y.; Sato, Y.; Okada, A.; Morizane, A.; Okamoto, S.; Hong, H.; Nakagawa, M.; Tanabe, K.; Tezuka, K.; et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 409–412. [CrossRef]
90. Huang, C.Y.; Liu, C.L.; Ting, C.Y.; Chiu, Y.T.; Cheng, Y.C.; Nicholson, M.W.; Hsieh, P.C.H. Human iPSC banking: Barriers and opportunities. *J. Biomed. Sci.* **2019**, *26*, 87. [CrossRef]
91. Blackford, S.J.I.; Ng, S.S.; Segal, J.M.; King, A.J.F.; Austin, A.L.; Kent, D.; Moore, J.; Sheldon, M.; Ilic, D.; Dhawan, A.; et al. Validation of current good manufacturing practice compliant human pluripotent stem cell-derived hepatocytes for cell-based therapy. *Stem Cells Transl. Med.* **2019**, *8*, 124–137. [CrossRef] [PubMed]
92. Lavon, N.; Zimmerman, M.; Itskovitz-Eldor, J. Scalable expansion of pluripotent stem cells. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*; Springer: Berlin, Germany, 2018; Volume 163, pp. 23–37.
93. Andrews, P.W.; Ben-David, U.; Benvenisty, N.; Coffey, P.; Egan, K.; Knowles, B.B.; Nagy, A.; Pera, M.; Reubinoff, B.; Rugg-Gunn, P.J.; et al. Assessing the safety of human pluripotent stem cells and their derivatives for clinical applications. *Stem Cell Rep.* **2017**, *9*, 1–4. [CrossRef] [PubMed]
94. Li, K.; Kong, Y.; Zhang, M.; Xie, F.; Liu, P.; Xu, S. Differentiation of pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *471*, 1–4. [CrossRef] [PubMed]
95. Piga, D.; Salani, S.; Magri, F.; Brusa, R.; Mauri, E.; Comi, G.P.; Bresolin, N.; Corti, S. Human induced pluripotent stem cell models for the study and treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2019**, *12*, 1–28. [CrossRef] [PubMed]
96. Maffioletti, S.M.; Gerli, M.F.M.; Ragazzi, M.; Dastidar, S.; Benedetti, S.; Loperfido, M.; Vandendriessche, T.; Chuah, M.K.; Tedesco, F.S. Efficient derivation and inducible differentiation of expandable skeletal myogenic cells from human ES and patient-specific iPSCs. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 941–958. [CrossRef] [PubMed]
97. Chal, J.; Tanoury, Z.A.; Hestin, M.; Gobert, B.; Aivio, S.; Hick, A.; Cherrier, T.; Nesmith, A.P.; Parker, K.K.; Pourquié, O. Generation of human muscle fibers and satellite-like cells from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*. [CrossRef] [PubMed]
98. Teotia, P.; Chopra, D.A.; Dravid, S.M.; Van Hook, M.J.; Qiu, F.; Morrison, J.; Rizzino, A.; Ahmad, I. Generation of functional human retinal ganglion cells with target specificity from pluripotent stem cells by chemically defined recapitulation of developmental mechanism. *Stem Cells* **2017**, *35*, 572–585. [CrossRef]
99. Yoshida, Y.; Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cells 10 years later for cardiac applications. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 1958–1968. [CrossRef]
100. Penney, J.; Ralvenius, W.T.; Tsai, L.H. Modeling Alzheimer’s disease with iPSC-derived brain cells. *Mol. Psychiatry* **2019**, 1–20. [CrossRef]
101. Selvaraj, S.; Mondragon-Gonzalez, R.; Xu, B.; Magli, A.; Kim, H.; Lainé, J.; Kiley, J.; Mckee, H.; Rinaldi, F.; Aho, J.; et al. Screening identifies small molecules that enhance the maturation of human pluripotent stem cell-derived myotubes. *Elife* **2019**, *8*.
102. Machiraju, P.; Greenway, S.C. Current methods for the maturation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *World J. Stem Cells* **2019**, *11*, 33–43. [CrossRef] [PubMed]
103. Sułkowski, M.; Konieczny, P.; Chlebanowska, P.; Majka, M. Introduction of exogenous HSV-TK suicide gene increases safety of keratinocyte-derived induced pluripotent stem cells by providing genetic “emergency exit” switch. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 197. [CrossRef] [PubMed]
104. Deuse, T.; Hu, X.; Gravina, A.; Wang, D.; Tediashvili, G.; De, C.; Thayer, W.O.; Wahl, A.; Garcia, J.V.; Reichenspurner, H.; et al. Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 252–258. [CrossRef] [PubMed]
105. Shani, T.; Hanna, J.H. Universally non-immunogenic iPSCs. *Nat. Biomed. Eng.* **2019**, *3*, 337–338. [CrossRef]





Lab resource: Stem Cell Line

Generation of the iPSC line IISHDOI007-A from peripheral blood mononuclear cells from a patient with McArdle disease harbouring the mutation c.2392 T > C; p.Trp798Arg

Victoria Cerrada^a, Marta García-López^a, Soffia Alvarez-Galeano^a, Ana Moreno-Izquierdo^b, Alejandro Lucia^c, María Rabasa Pérez^d, Joaquín Arenas^{e,f}, M. Esther Gallardo^{a,f,*}

^a Grupo de Investigación Traslacional con Células iPS, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

^b Servicio de Genética. Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

^c Faculty of Sports Sciences, Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain

^d Neurología, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Fuenlabrada, Madrid, Spain

^e Grupo de Enfermedades Raras, Mitocondriales y neuromusculares. Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

^f Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERER), Madrid, Spain

ABSTRACT

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from a McArdle patient carrying a homozygous mutation in the *PYGM* gene: c.2392 T > C; p.Trp798Arg were used for the generation of the human iPSC line, IISHDOI007-A. For the delivery of the reprogramming factors Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc, a non-integrative methodology that implies the use of Sendai virus has been applied.

1. Resource table:

Unique stem cell line identifier	IISHDOI007-A
Alternative name(s) of stem cell line	McA2.7
Institution	Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, i + 12
Contact information of distributor	Dr. M. Esther Gallardo egallardo.imas12@h12o.es
Type of cell line	iPSC
Origin	Human
Additional origin info	Age: 70 Sex: Female Ethnicity if known: Caucasian
Cell Source	Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)
Clonality	Clonal
Method of reprogramming	Transgene free Sendai virus vectors: Klf4, Oct3/4, Sox2 and cMyc
Genetic Modification	Yes
Type of Modification	Hereditary
Associated disease	McArdle disease
Gene/locus	Gene <i>PYGM</i> NM_005609: c.2392 T > C; p.Trp798Arg; Chromosome: 11q13.1
Method of modification	N/A

(continued on next column)

(continued)

Name of transgene or resistance	
Inducible/constitutive system	N/A
Date archived/stock date	June 2020
Cell line repository/bank	National Bank of Stem Cell Lines, ISCIII, Madrid, Spain
Ethical approval	Patient informed consent was obtained. This study was reviewed and approved by the Institutional Research Ethical Committee of the "Hospital Universitario 12 de Octubre", 18/474.

2. Resource utility

McArdle disease (glycogen storage disease type V) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the *PYGM* gene (Nogales-Gadea et al., 2015). The main characteristic of this disease is exercise intolerance, manifested by myalgia, rhabdomyolysis and even myoglobinuria. Here, we report the generation of the iPSCs line IISHDOI007-A. This line will be very useful for modelling McArdle disease and searching for therapeutic approaches.

* Corresponding author at: Grupo de Investigación Traslacional con células iPS, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain.
E-mail address: egallardo.imas12@h12o.es (M.E. Gallardo).

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102108>

Received 16 July 2020; Received in revised form 19 November 2020; Accepted 28 November 2020

Available online 3 December 2020

1873-5061/© 2020 The Author(s).

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

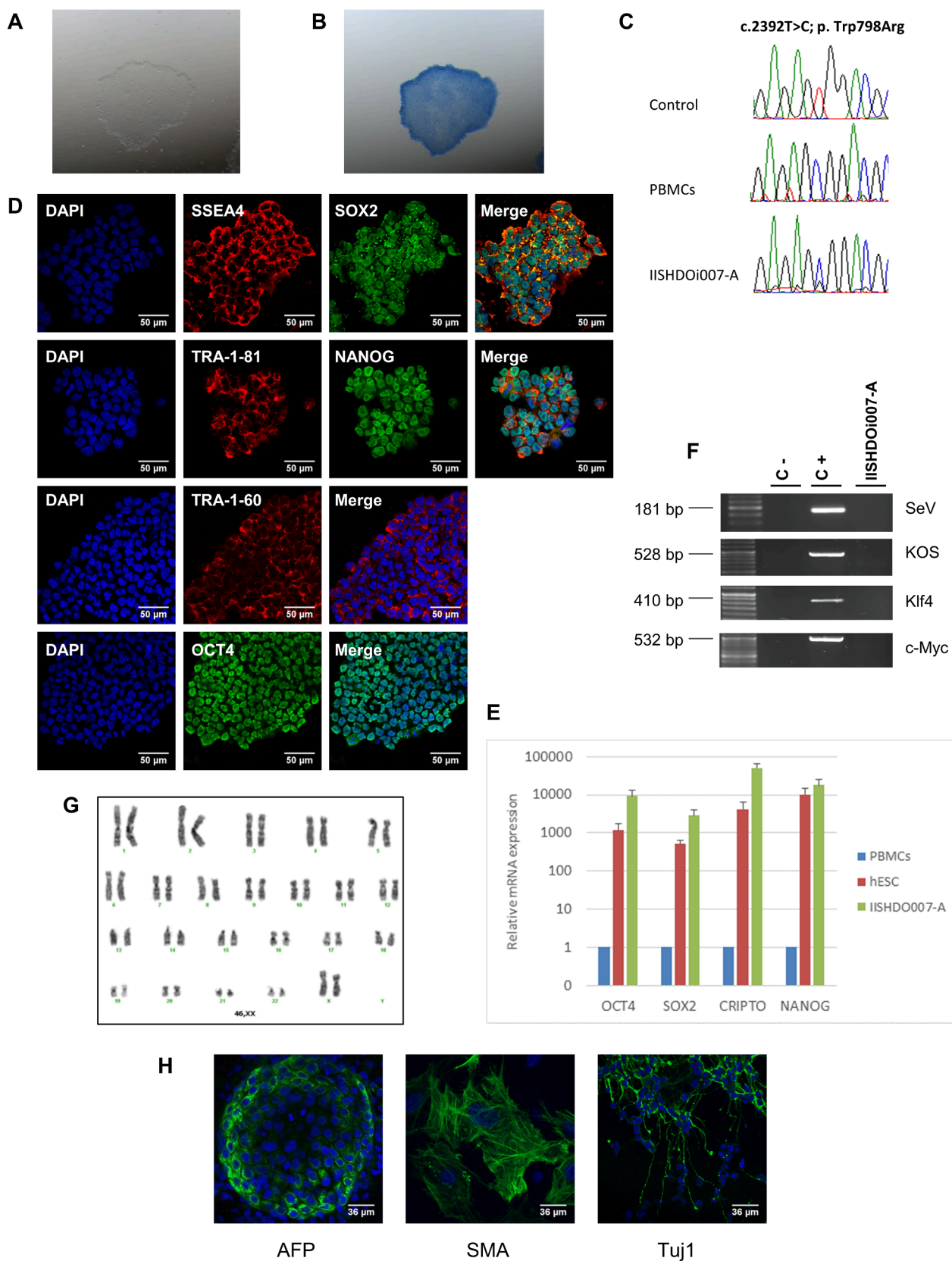


Fig. 1. Molecular and functional characterization of the IISHDOi007-A iPSC line.

3. Resource details

The human iPSC line, IISHDOI007-A, has been established using Sendai viruses containing the reprogramming factors Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc (Takahashi et al., 2007). For this purpose, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from a McArdle patient, harbouring a homozygous mutation in the gene *PYGM* (c.2392 T > C; p.Trp798Arg), have been isolated from whole blood. IISHDOI007-A iPSC colonies displayed a typical ES-like colony morphology and growth behavior (Fig. 1A) and they stained positive for alkaline phosphatase activity (Fig. 1B). The line was tested by PCR analysis to be mycoplasma-negative (Supplementary Fig. S1). In addition, the presence of the mutation, c.2392 T > C; p.Trp798Arg, in the iPSCs was confirmed (Fig. 1C). Immunofluorescence analyses revealed expression of the transcription factors OCT4, NANOG and SOX2, and typical ES cells surface markers SSEA4, TRA-1-60 and TRA-1-81 (Fig. 1D). The endogenous expression of the pluripotency associated transcription factors OCT4, SOX2, NANOG and CRIPTO was also evaluated by quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR). Total RNA from human embryonic stem cells (hESC) (Celprogen, 36101RNA) has been used as a reference for the gene expression levels of stemness markers (Fig. 1E). Additionally, the clearance of the vectors and the exogenous reprogramming factor genes was confirmed by RT-PCR after eight culture passages (Fig. 1F). We confirmed by DNA fingerprinting analysis that the line, IISHDOI007-A, was derived from the patient's PBMCs (archived at SCR journal). Karyotype analysis after more than 15 culture passages has been carried out, displaying a normal karyotype (46, XX) (Fig. 1G). Finally, we evaluate the capacity of the IISHDOI007-A iPSC line to differentiate into the three germ layers (endoderm, mesoderm and ectoderm) using an *in vitro* embryoid body based assay (Fig. 1H).

4. Materials and methods

4.1. Isolation of PBMCs

A peripheral blood sample was collected from a McArdle patient harbouring the homozygous mutation c.2392 T > C; p.Trp798Arg in the *PYGM* gene. PBMCs were isolated from the whole blood by a density gradient centrifugation method using LymphoprepTM (StemCell, 07851). PBMCs were cultured for 4 days in StemSpamTM SFEM II medium (StemCell, 09605) supplemented with SCF (C-Kit ligand) (StemCell, 78062.1), Flt-3 Ligand (StemCell, 78009.1), IL-3 (StemCell, 78040.1) and IL-6 (ThermoFisher, PHC 0064).

4.2. Generation of iPSCs

PBMCs were reprogrammed in feeder-free conditions using the CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit following the manufacturer's guide. IISHDOI007-A was maintained and expanded using mTeSR Plus medium (StemCell, 05825) in a 5% CO₂ incubator at 37 °C. Cells were passaged at a confluence of 80% employing ReLeSRTM (StemCell, 05873).

4.3. Phosphatase alkaline analysis

Direct phosphatase alkaline activity was determined using the phosphatase alkaline membrane substrate solution kit (Sigma, ABO300), Table 1.

4.4. Mutation analysis

Total DNA was extracted using a commercial kit (IllustraTM blood genomicPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare, 28-9042-65). Subsequently, a PCR was performed to confirm the mutation (primers shown in Table 2) with the following conditions: 95 °C for 2 min, 35 cycles at 95 °C for 30 s, at 69 °C for 1 min, and at 72 °C for 15 s, and a final

Table 1
Characterization and validation.

Classification	Test	Result	Data
Morphology Phenotype	Photography	Normal	Fig. 1 panel A
	Qualitative analysis: Alkaline phosphatase activity	Positive	Fig. 1 panel B
	Qualitative analysis: Immunocytochemistry	Positive for the pluripotency markers: SSEA4, SOX2, NANOG, TRA-1-81, TRA-1-60 and OCT4	Fig. 1 panel D
	Quantitative analysis: Gene expression (qPCR)	Positive for the pluripotency markers: OCT4, SOX2, CRIPTO and NANOG	Fig. 1 panel E
Genotype	Karyotype (G-banding) and resolution	46XX Resolution 450-500	Fig. 1 panel G
Identity	STR analysis	DNA profiling performed 8 loci, all matched (D2S1338, D7S820, D8S1179, D13S317, D19S433, D21S11, VWa, amelogenin)	Submitted to SCR journal for archiving
Mutation analysis	Sequencing	Confirmation of the mutation: c.2392 T > C; p.Trp798Arg	Fig. 1 panel C
Microbiology and virology	Mycoplasma	Mycoplasma testing by PCR: Negative	Supplementary Fig. S1
Differentiation potential	Embryoid body formation and directed differentiation	Positive for: smooth muscle actin (SMA), β -tubulin (Tuj1) and α -feto protein (AFP).	Fig. 1 panel H
Donor screening	HIV 1 + 2 Hepatitis B, Hepatitis C	N/A	N/A
Genotype additional info	Blood group genotyping HLA tissue typing	N/A	N/A

extension at 72 °C of 5 min (Applied BiosystemsTM Verity Thermal Cycler). Amplicons were sequenced in an ABI 3730 analyzer (Applied Biosystems).

4.5. qPCR analysis

A qPCR analysis was performed to quantify the expression of the pluripotency associated genes *OCT4*, *SOX2*, *CRIPTO* and *NANOG*. Total mRNA was isolated using TRI Reagent[®] and cDNA was synthesized using the Thermo Scientific RevertAid RT Kit. The qPCR was carried out with GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega), and analysed using an Applied BiosystemsTM 7500 Fast Real-Time PCR System (primers listed in Table 2). All the expression values were normalized to the *GAPDH* gene. Plots are representative of at least four independent experiments.

4.6. Karyotype analysis

iPSCs with more than 15 passages were treated with 10 μ g/ml of Colcemid (Gibco) for 90 min at 37 °C. Afterwards they were trypsinized, treated with hypotonic solution KCl 0.075 M and fixed with Carnoy's fixative. Twenty metaphases were G banded using Wright staining and analyzed.

Table 2
Reagents details.

Antibodies used for immunocytochemistry/flow-citometry			
	Antibody	Dilution	Company Cat # and RRID
Pluripotency Markers	Mouse anti TRA-1-81	1:150	Millipore Cat# MAB4381, RRID: AB_177638
	Mouse anti TRA-1-60	1:150	Millipore Cat# MAB4360, RRID: AB_11211864
	Rabbit anti SOX2	1:100	ThermoFisher Scientific Cat# PA1_16968, RRID: AB_2195781
	Mouse anti SSEA4	1:10	Abcam Cat# ab16287, RRID: AB_778073
	Goat anti NANOG	1:25	R&D Systems Cat# AF1997, RRID: AB_355097
	Mouse anti OCT4	1:100	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc_5279, RRID: AB_628051
Differentiation Markers	Mouse anti α -feto protein (AFP)	1:300	Sigma Aldrich Cat# WH0000174M1, RRID: AB_1839587
	Mouse anti smooth muscle actin (SMA)	1:400	Sigma Aldrich Cat# A2547, RRID: AB_476701
	Mouse anti β -Tubulin isotype III (Tuj1)	1:300	Sigma Aldrich Cat# T8660, RRID: AB_477590
Secondary antibodies	CyTM2-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit IgG (H + L)	1:50	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 111-225-144, RRID: AB_2338021
	CyTM3-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG, Fc \square Subclass 3 Specific	1:250	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 115-165-209, RRID: AB_2338698
	CyTM2-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG, Fc \square Subclass 2b Specific	1:50	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 115-225-207, RRID: AB_2338749
	CyTM2-conjugated AffiniPure Donkey anti-Goat IgG (H + L)	1:50	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 705-225-147, RRID: AB_2307341
	Goat anti Mouse IgG (H + L), Alexa Fluor 488	1:500	ThermoFisher Scientific Cat# A-11029, RRID: AB_2534088
Primers			
	Target	Forward/Reverse primer (5'-3')	
Pluripotency Markers (qPCR)	Endo <i>OCT4</i>	GGGTTTTTGGGATTAAGTTCITCA / GCCCCACCCCTTTGTGTT	
	Endo <i>SOX2</i>	CAAAAATGGCCATGCAGGTT / AGTTGGGATCGAACAAAAGCTATT	
	<i>CRIPTO</i>	CGGAAGTGTGAGCACGATGT / GGGCAGCCAGGTGTCATG	
House-Keeping Genes (qPCR)	<i>NANOG</i>	ACAACCTGGCCGAAGAATAGCA / GGTTCACAGTCGGGTTTAC	
	<i>GAPDH</i>	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC / AGGGATCTCGCTCCTGGAA	
	<i>PYGM</i>	TGCCAGGAGAAAGTCAGCGCC / CTGGCGGGAAGGCTCCACAC	
Targeted mutation analysis/sequencing Virus silencing	SeV	GGATCACTAGGTGATATCGAGC / ACCAGACAAGAGTTAAGAGATATGTATC	
	KOS	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC / ACCTTGACAATCCTGATGTGG	
	Klf-4	TTCTTGCATGCCAGGAGGCC / AATGTATCGAAGGTGCTCAA	
	c-Myc	TAACGTACTAGCAGGCTTGTCG / TCCACATACAGTCTGGATGATGATG	
	STR analysis	Amelogenin	[6-FAM] CCCTGGGCTCTGTAAGAATAGT / ATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG
D2S1338		[6-FAM] CCAGTGGATTTGGAAACAGA / ACCTAGCATGGTACCTGCAG	
D7S820		[6-FAM] TGTTCATAGTTTGAACGAACTAAG / CTGAGGTATCAAAAACCTAGAGG	
D8S1179		[6-FAM] TTTTGTATTTCATGTGTACATTTCG / CGTAGCTATAAATAGTTTCAATTTCA	
D13S317		[6-FAM] ACAGAAGTCTGGGATGTGGA / GCCCAAAAAGACAGACAGAA	
D19S433		[6-FAM] CCTGGGCAACAGAATAAGAT / TAGGTTTTTAAAGGAACAGGTGG	
D21S11		[6-FAM] GTGAGTCAATTCGCCAAG / GTTGTATTAGTCAATGTTCTCC	
Mycoplasma detection	VWA	[6-FAM] CCCTAGTGGATGATAAGAATAATC / GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG	
	<i>GPO-3 /MGSO</i>	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT / TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	

4.7. Immunofluorescence analysis

Cells were fixed using 4% paraformaldehyde (30 min at RT). Subsequently, a permeabilization step with 0.1% Triton X-10 in Tris-buffered saline (TBS) was performed. Then, cells were incubated with TBS++ (3% donkey serum, 0.3% Triton X-100 in TBS). Primary antibodies were applied overnight at 4 °C and secondary antibodies for 2 h at RT (Table 2). Nuclei were stained with DAPI (Sigma, 28718–90-3). Images were obtained with a confocal microscope (Espectral LSM510 META ConfoCor 3, ZEISS) and processed with Zen 2009 software (ZEISS).

4.8. In vitro differentiation assay

The *in vitro* pluripotency capacity of the line IISHDOI007-A was evaluated by a spontaneous embryoid body differentiation assay. The protocol used has been detailed by Galera et al., 2016.

4.9. DNA fingerprinting analysis

A PCR amplification of the markers D13S317, D7S820, VWA, D8S1179, D21S11, D19S433, D2S1338 and amelogenin for sex determination (Table 2), was carried out. Amplicons were analyzed in the ABI

PRISM 3100 Genetic analyzer and by Peak Scanner v3.5 (Applied Biosystems).

4.10. Mycoplasma detection

When cultures reached 90% of confluence, 1 ml of the cell culture supernatant was extracted to perform a PCR in an Applied Biosystems™ Verity Thermal Cycler, using the primers described in Table 2 and the following conditions: An initial denaturation at 95 °C for 2 min, 35 cycles of amplification at 95 °C for 30 s, at 55 °C for 1 min, and at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C of 5 min.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by grants from: 1) “Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III cofunded by European Regional Development Funds (ERDF)”: PI15/00484 and PI18/00151 to MEG. S.

AG is supported by a grant from “Fundación Investigación Biomédica del Hospital 12 de Octubre”. M.GL is supported by a PFIS grant (FI19/00043) from Instituto de Salud Carlos III and European Regional Development Funds (ERDF). ME.G is supported by a “Miguel Servet” contract (CP16/00046) from Instituto de Salud Carlos III and European Regional Development Funds (ERDF).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102108>.

References

- Galera, T., Zurita, F., González-Páramos, C., Moreno-Izquierdo, A., Fraga, M.F., Fernández, A.F., Garesse, R., Gallardo, M.E., 2016. Generation of a human iPSC line from a patient with Leigh syndrome. *Stem Cell Res.* 16 (1), 63–66.
- Nogales-Gadea, G., Brull, A., Santalla, A., Andreu, A.L., Arenas, J., Martín, M.A., Pinós, T., 2015. McArdle Disease: Update of Reported Mutations and Polymorphisms in the PYGM Gene. *Human Mutation* 36 (7), 669–678.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 (5), 861–872.



Article

Generation of the First Human In Vitro Model for McArdle Disease Based on iPSC Technology

María del Carmen Ortuño-Costela ^{1,2} , Victoria Cerrada ¹, Ana Moreno-Izquierdo ³, Inés García-Consuegra ^{4,5}, Camille Laberthonnière ⁶ , Mégane Delourme ⁶ , Rafael Garesse ², Joaquín Arenas ^{4,5}, Carla Fuster García ^{5,7} , Gema García García ^{5,7} , José María Millán ^{5,7} , Frédérique Magdinier ⁶ and María Esther Gallardo ^{1,*}

- ¹ Grupo de Investigación Traslacional con células iPS, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12), 28041 Madrid, Spain
 - ² Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, (UAM-CSIC), 28029 Madrid, Spain
 - ³ Servicio de Genética, Hospital 12 de Octubre, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12), 28041 Madrid, Spain
 - ⁴ Laboratorio de Enfermedades Mitocondriales y Neuromusculares, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12), 28041 Madrid, Spain
 - ⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), 28029 Madrid, Spain
 - ⁶ Aix-Marseille University, INSERM, MMG, 13385 Marseille, France
 - ⁷ Grupo de Investigación en Biomedicina Molecular, Celular y Genómica, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), 46029 Valencia, Spain
- * Correspondence: egallardo.imas12@h12o.es



Citation: Ortuño-Costela, M.d.C.; Cerrada, V.; Moreno-Izquierdo, A.; García-Consuegra, I.; Laberthonnière, C.; Delourme, M.; Garesse, R.; Arenas, J.; Fuster García, C.; García García, G.; et al. Generation of the First Human In Vitro Model for McArdle Disease Based on iPSC Technology. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13964. <https://doi.org/10.3390/ijms232213964>

Academic Editor: Alessandro Romano

Received: 4 October 2022

Accepted: 10 November 2022

Published: 12 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: McArdle disease is a rare autosomal recessive disorder caused by mutations in the *PYGM* gene. This gene encodes for the skeletal muscle isoform of glycogen phosphorylase (myophosphorylase), the first enzyme in glycogenolysis. Patients with this disorder are unable to obtain energy from their glycogen stored in skeletal muscle, prompting an exercise intolerance. Currently, there is no treatment for this disease, and the lack of suitable in vitro human models has prevented the search for therapies against it. In this article, we have established the first human iPSC-based model for McArdle disease. For the generation of this model, induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a patient with McArdle disease (harbouring the homozygous mutation c.148C>T; p.R50* in the *PYGM* gene) were differentiated into myogenic cells able to contract spontaneously in the presence of motor neurons and generate calcium transients, a proof of their maturity and functionality. Additionally, an isogenic skeletal muscle model of McArdle disease was created. As a proof-of-concept, we have tested in this model the rescue of *PYGM* expression by two different read-through compounds (PTC124 and RTC13). The developed model will be very useful as a platform for testing drugs or compounds with potential pharmacological activity.

Keywords: iPSCs; McArdle disease; *PYGM*; disease modelling; skeletal muscle differentiation; gene editing; CRISPR/Cas9; isogenic control; read-through drugs

1. Introduction

McArdle disease (also known as glycogen storage disease type V, OMIM 232600) is an autosomal recessive rare disorder caused by mutations in the *PYGM* gene [1]. This gene encodes for the muscle isoform of glycogen phosphorylase (myophosphorylase), which catalyses and regulates glycogen breakdown to glucose-1-phosphate during glycogenolysis in skeletal muscle [2]. To date, more than 150 mutations have been described in the *PYGM* gene associated with McArdle disease, the nonsense mutation c.148C>T; p.R50* being the most prevalent in the Caucasian population [3].

As a consequence of deficient myophosphorylase activity, McArdle disease patients are unable to obtain energy from their muscle glycogen stores and experience exercise intolerance [4]. This translates into acute crisis of fatigue and weakness when exercising,

especially at the beginning, accompanied by muscle cramps, myalgia, and contractures. Rhabdomyolysis also occurs often, as reflected by high serum levels of creatine kinase (hyperCKaemia) or myoglobinuria [5], with the risk of developing renal failure [6].

Currently, there is no treatment for the disease. Several pharmacological options, such as branched-chain amino acids, verapamil, and valproic acid, among others, have been tested without showing any promising or conclusive results [7,8]. The only therapy that seems to have some benefits is the recommendation of low to moderate exercise, as physically active patients have demonstrated major exercise tolerance [9].

There are four animal models available for the study of McArdle disease: two spontaneous models in Charolais cattle [10] and Merino sheep [11], a knock-in the mouse model for the *PYGM* p.R50* mutation [12] and a zebrafish model [13]. Although they have improved the knowledge about McArdle disease, they fail to completely mimic the human disorder phenotype [14]. Additionally, none allows the implementation of a high-throughput drug screening. The generation of an *in vitro* human model becomes imperative to explore the possibility of a pharmacological option for McArdle disease patients.

Since their discovery in 2006 by Dr Yamanaka, induced pluripotent stem cells (iPSCs) have marked a milestone in biomedical research [15,16]. Due to their auto-renewal capacity and potential to virtually differentiate to any cell type of the human body, the applications of iPSCs are innumerable [17]. In the last decade, iPSCs have become an essential tool for understanding embryonic development, modelling diseases, and searching for new treatments [18–20], with many on-going clinical trials that underline the significance of this technology [21]. To generate a particular disease model, patient-derived iPSCs must be differentiated to the disease target cell type. Several differentiation protocols have already been developed in the last years to generate skeletal muscle from iPSCs, with diverse strategies. Some protocols are based on the overexpression of selected myogenic transcription factors (like PAX7 or MYOD1) to force iPSCs to differentiate towards a myogenic lineage [22,23], whereas others try to mimic embryonic development by supplementing the iPSCs culture media with different small molecules and defined factors [24]. The selection of the most appropriate differentiation protocol for each application must be performed carefully, considering their main advantages and possible drawbacks [25].

Establishing the most suitable control for a specific disease model is essential to draw the correct conclusions during the evaluation of pathological mechanisms or possible therapies. Genetic variability between individuals is a key factor that should be considered when comparing a “control” versus a pathogenic cell line. Isogenic controls have gained prominence in recent years, representing the finest reference values. A few years ago, the creation of isogenic controls from iPSCs could constitute an obstacle, but nowadays the development of the CRISPR technology has provided the scientific community with an invaluable tool for gene editing [26], allowing the generation of the ideal controls for *in vitro* disease models in an easy, affordable, and rapid manner.

In this article, the first human iPSC-based model for McArdle disease was generated. For this purpose, iPSCs of a McArdle patient harbouring the homozygous mutation in the *PYGM* gene c.148C>T; p.R50* were successfully differentiated into innervated mature skeletal muscle, able to spontaneously contract. Additionally, using the CRISPR system, we have also created an iPSC-based isogenic model of McArdle disease. This model will be very useful as a platform to perform high-throughput drug screenings to search for a therapy for this disorder. As a proof of concept two read-through drugs (PTC124 and RTC13) were tested using the developed model.

2. Results

2.1. Establishment of the iPSC Lines C10 and MA4

The iPSC line C10, generated as a control, has the same origin as the previously published line IISHDOi002-A [27]. Likewise, the iPSC line MA4 has the same origin as the previously published iPSC line IISHDOi001-A (named here as MA1) [28], and their evaluation in conjunction would allow avoiding clonal effects in further experiments.

A complete battery of tests was performed to confirm the pluripotency and integrity of the established lines after the reprogramming event. Both stained positive for alkaline phosphatase, as we can observe in Figures S1a and S2b, showing a typical human embryonic stem cell (hESC)-like morphology. The presence of the mutation c.148C>T; p.R50* in the *PYGM* sequence of the MA4 iPSC line was confirmed by Sanger sequencing (Figure S2a). The lines also exhibited positive expression of certain pluripotency markers, analysed by immunofluorescence, such as NANOG, OCT4, and SOX2 as nuclear markers, along with SSEA4, SSEA3, TRA-1-81, and TRA-1-60 as surface markers (Figures S1b and S2d). We also verified the expression of the pluripotency genes *OCT4*, *SOX2*, *CRIPTO*, *NANOG*, and *REX1* by RT-qPCR, as it shows in Figures S1c and S2c. Additionally, we performed an in vitro differentiation assay to demonstrate the functional pluripotency of the lines, finding that they had the ability to differentiate to cells of all three germ layers: endoderm, ectoderm, and mesoderm (Figures S1d and S2e). The lines were mycoplasma free (Figures S1e and S2h) and were demonstrated to have the same origin as the previously published lines IISHDOI002-A and IISHDOI001-A respectively, using a DNA fingerprinting analysis (data available upon request). We also confirmed the clearance of the vectors and the exogenous reprogramming factor genes by RT-PCR (Figures S1f and S2g). The iPSC lines MA4 and C10 exhibited a normal 46, XX and 46, XY karyotype respectively (Figures S1g and S2f).

2.2. Differentiation to Innervated Skeletal Muscle Cells

For the establishment of a McArdle disease model, the next step after the generation of the iPSC lines would be their differentiation towards the cell lineage mainly affected in the disease: skeletal muscle cells. The control iPSC lines C10 and AG09G (previously generated by Dr Magdinier's group), and the McArdle disease iPSCs MA1 [28] and MA4 were differentiated towards innervated skeletal muscle cells following the protocol described by Mazaleyrat et al., 2020 [29]. With the progress of differentiation, some gradual changes in morphology in the cell culture were observed (Figure 1). At first, cells maintained some degree of stemness growing as colonies (Figure 1a), but soon cells with defined morphologies started to appear in the periphery (Figure 1b). Afterwards, the cells started aligning and fusing to form myofiber-like structures (Figure 1c–f), innervated thanks to the additional differentiation towards motor neurons. The innervated myogenic cells began to spontaneously contract around day 20, and they continued with stronger and more frequent contractions for all the processes of differentiation (Videos S1 and S2). This fact suggests the maturity and functionality of the differentiated cultures.

We evaluated the evolution of the expression of different myogenic and motor neuron markers along the differentiation process by RT-qPCR (Figure 2). The *PAX3* and *PAX7* genes code for transcription factors implicated in the cell induction of myogenic progenitors [30]. The *PAX7* gene is a key marker expressed in satellite cells, the stem cells present in skeletal muscle. We could observe how in our differentiated cultures the expression of these factors is maintained over the process, with *PAX7*⁺ cells present even at day 45 of differentiation (Figure 2a,b). This reflected the maintenance of a sufficient satellite cell population in the culture to assure its renewal. Titin and Desmin are related to the sarcomere structure, and they are markers of terminal differentiation [31]. We could observe the increase in their expression from day 17 onwards (Figure 2c,d). We also checked the expression of some isoforms of the myosin heavy chain, like the embryonic isoform (*MyH3*) and the adult isoform (*MyH2*), related to myotubes formation [32]. Both genes started to express around day 17 of differentiation, and although the embryonic isoform had a greater expression than the adult one, the detection of *MyH2* certified a mature differentiated culture (Figure 2e,f). The positive expression of *MyoD1*, a classic myogenic regulatory factor [33], was also confirmed (Figure 2g). Finally, we checked the expression of the motor neuron gene choline O-acetyltransferase (*ChAT*), which is related to the synthesis of acetylcholine [34]. Its expression was also maintained from day 17, when motor-neuron differentiation is induced with the Notch antagonist DAPT [29], onwards (Figure 2h).

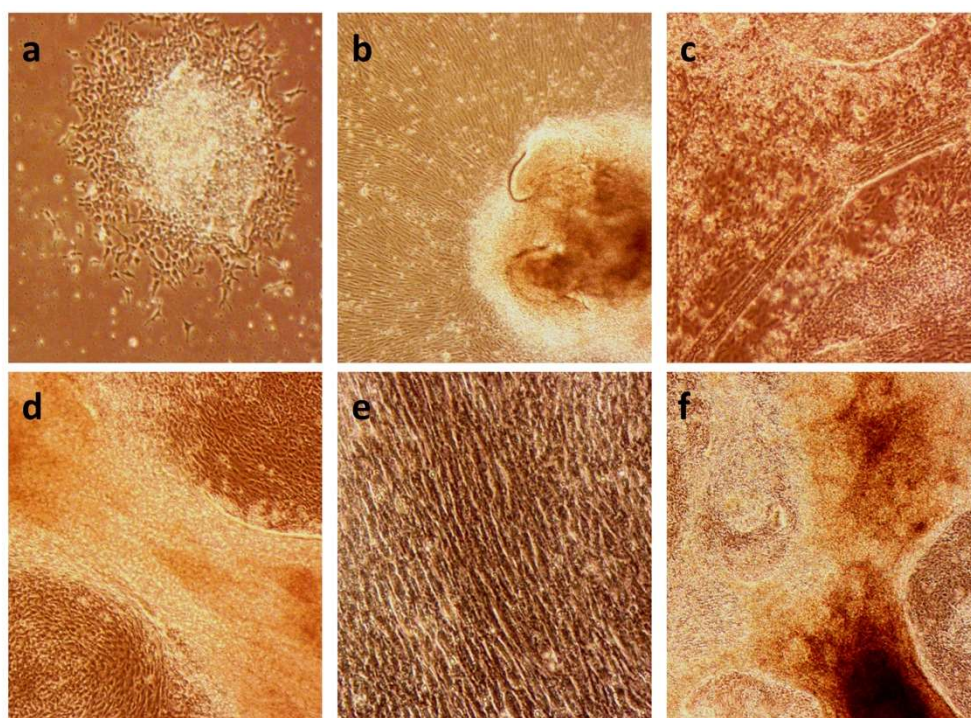


Figure 1. Changes in morphology of the cell cultures throughout the differentiation protocol. (a) MA1 line at day 4 of differentiation (10 \times). We can observe the centre of the clump still maintaining its stemness, whereas the border starts the differentiation process. (b) MA1 line at day 10 of differentiation (10 \times). The cells start to align while expanding from the undifferentiated clump. (c) C10 line at day 22 of differentiation (10 \times). Formation of myofiber-like structures. (d) C10 line at day 25 of differentiation (20 \times). We can observe in detail the structure of the myofibers formed in the differentiated culture. (e) C10 line at day 25 of differentiation (20 \times). Details of the alignment of the cells in the differentiated culture. (f) MA4 line at day 28 of differentiation (10 \times). The culture exhibits a great density, with formed myofiber-like structures.

The expression of some key myogenic and motor neuron proteins was evaluated by immunocytochemistry at day 30 of differentiation (Figure 3). Differentiated cells expressed Titin and Desmin (sarcomere-related proteins) and they even exhibited a striated pattern and an aligned disposition typical of skeletal muscle cells (Figure 3a). The presence of neuromuscular junctions was also confirmed with an α -bungarotoxin (BTX) staining as we can observe in Figure 3b, with Titin-positive myogenic cells and Neurofilament-positive motor neuron cells. Finally, the presence of motor neurons in the culture was confirmed with the positive staining for markers like homeobox 9 (HB9), neurofilament (NF) and ChAT (Figure 3c).

Subsequently, the functionality of the differentiated cultures was assessed using a fluorescent calcium-binding dye (FLUO-8[®] AM), which allowed to evaluate calcium transients and contraction capacity at days 35 and 42 (Videos S3 and S4). For calcium transients, we took the values of intensity mean of 50 different myogenic fibres from three distinct differentiation experiments. The normalized amplitude of the intensity mean values can be visualized in Figure 4a. There was no significant difference between the values of the distinct lines (statistical analysis performed using a Brown–Forsythe and Welch ANOVA test). In the case of contraction capacity, at least 4000 contraction events from three distinct differentiation experiments were evaluated. In Figure 4b, we can observe the representation of the contraction length values for all the lines evaluated. There were no significant differences between them (statistical analysis carried out with a Kruskal–Wallis test).

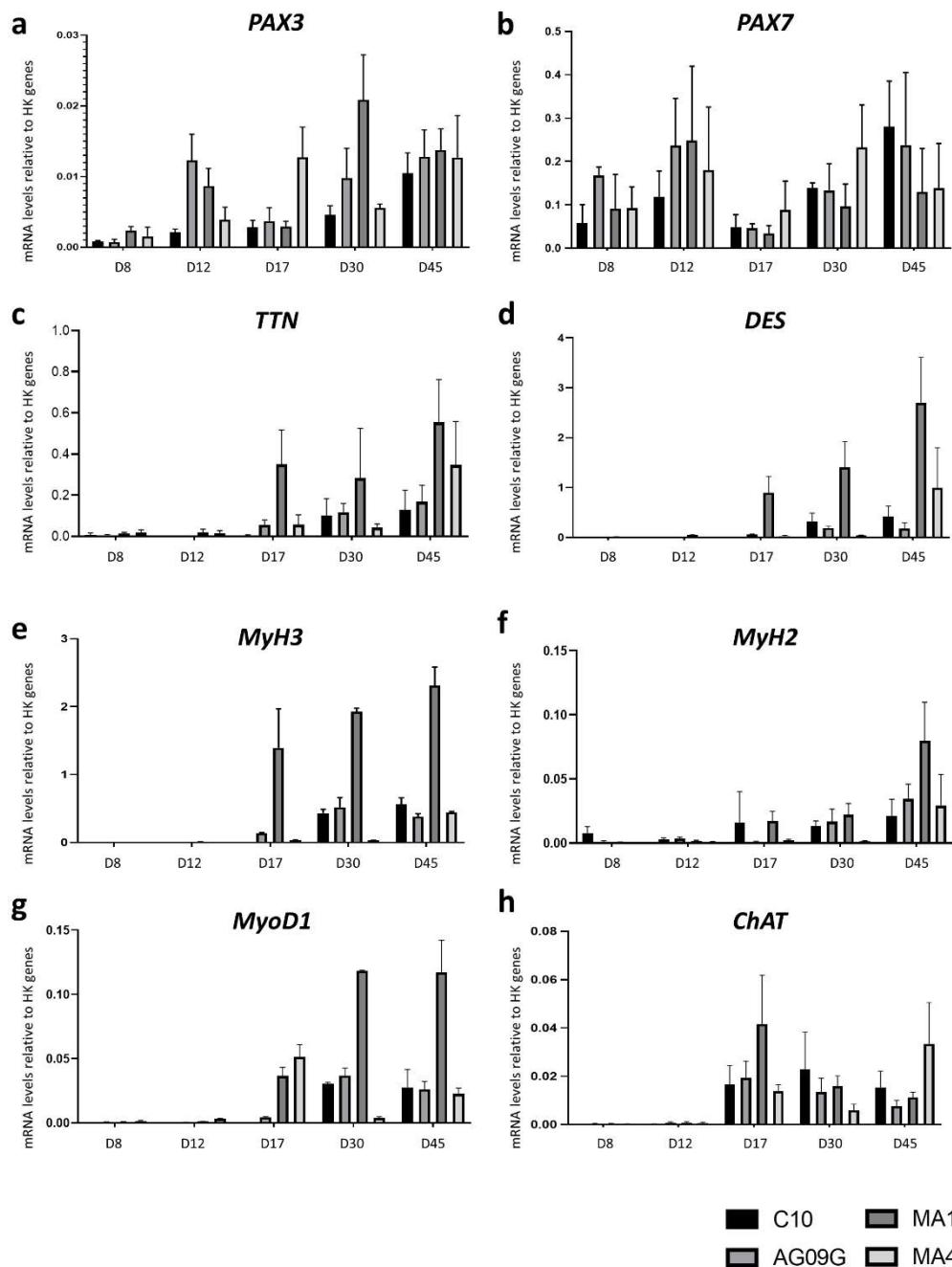


Figure 2. RT-qPCR analysis to assess the differentiation process from iPSCs to innervated skeletal muscle cells. The lines were evaluated at different time points during the differentiation process, at days (D) 8, 12, 17, 30 and 45. We analysed the evolution of the expression of different myogenic genes like *PAX3* (a), *PAX7* (b), *TTN* (c), *DES* (d), *MyH3* (e), *MyH2* (f) and *MyoD1* (g), in addition to the motor neuron marker *ChAT* (h). The values represent the mean of at least three replicates, and they are relative to the expression mean of two housekeeping (HK) genes (*HPRT* and *PPIA*). Error bars show standard deviation.

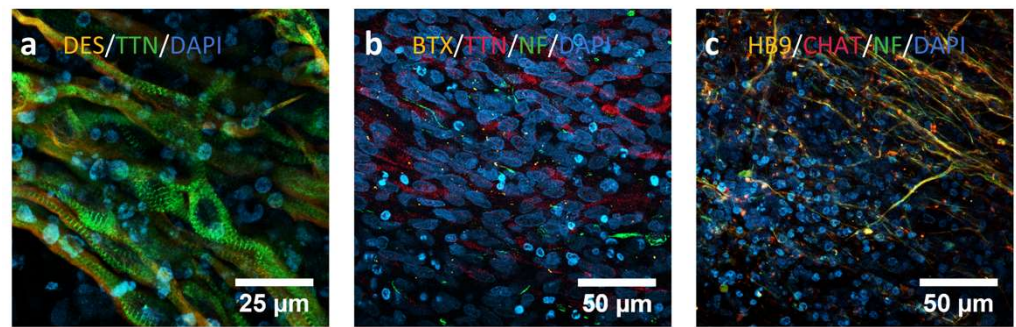


Figure 3. Immunocytochemistry analysis to assess the differentiation process from iPSCs towards innervated skeletal muscle. (a) C10 line at day 30, showing positive staining for Desmin (orange) and Titin (green), both mature myogenic markers. We can even observe a typical skeletal muscle alignment and striation pattern. (b) MA1 line at day 30. We can observe cells positive for Titin (TTN, red) as myogenic marker, and for neurofilament (NF, green) as motor neuron marker. The neuromuscular junctions are marked in orange with an α -bungarotoxin staining. (c) AG09G line at day 30. We can observe here the presence of motor neurons in the culture after the differentiation process, positive for markers like homeobox9 (HB9, orange), choline O-acetyltransferase (ChAT, red) and NF (green).

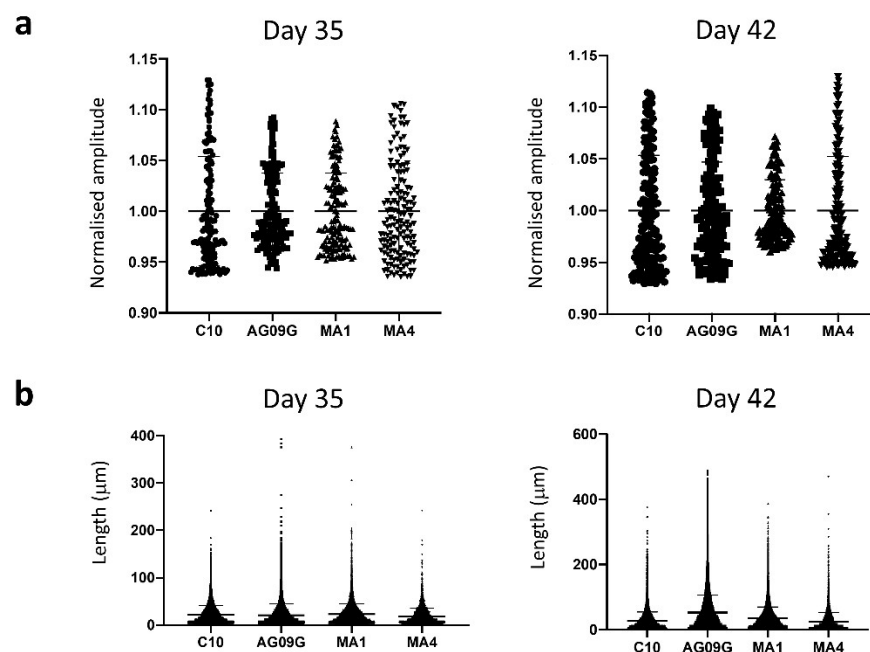


Figure 4. Functional assessment of the differentiated cultures. (a) Analysis of calcium transients. The characterization of calcium transients was performed at days 35 and 42 of differentiation, respectively, in the lines C10, AG09G, MA1 and MA4 by taking the values of intensity mean of at least 50 different fibres. There were no significant differences in the calcium transients of the four cell lines analysed (statistical analysis carried out with a Brown–Forsythe and Welch ANOVA test). (b) Contraction length analysis. We evaluated at least 4000 contraction events from three distinct differentiation experiments at days 35 and 42 in the lines C10, AG09G, MA1 and MA4. There were no significant differences between the values of contraction length of the four lines analysed (statistical analysis carried out with a Kruskal–Wallis test).

2.3. Validation of the McArdle Disease Model

The validation of the created McArdle disease model was performed by evaluating the expression of *PYGM* and myophosphorylase after the differentiation protocol (Figure 5). First, we performed a TaqMan™ gene expression assay with *PYGM* as the target

and *GAPDH* as the housekeeping gene at day 45 of differentiation in all the iPSC lines differentiated in this study. As we can observe in Figure 5a, both control lines (C10 and AG09G) did express *PYGM* after the differentiation, whereas the McArdle lines (MA1 and MA4) maintained only some negligible expression levels, with significant differences with respect to the control lines (statistical analysis carried out using a Holm–Sidak’s one-way ANOVA test with multiple comparisons). Additionally, an immunocytochemistry analysis revealed the expression of myophosphorylase at day 30 of differentiation for both the C10 and AG09G lines (Figure 5b). A Western Blot assay also confirmed the presence of myophosphorylase for C10 and AG09G and the absence for MA1 and MA4 (Figure 5c).

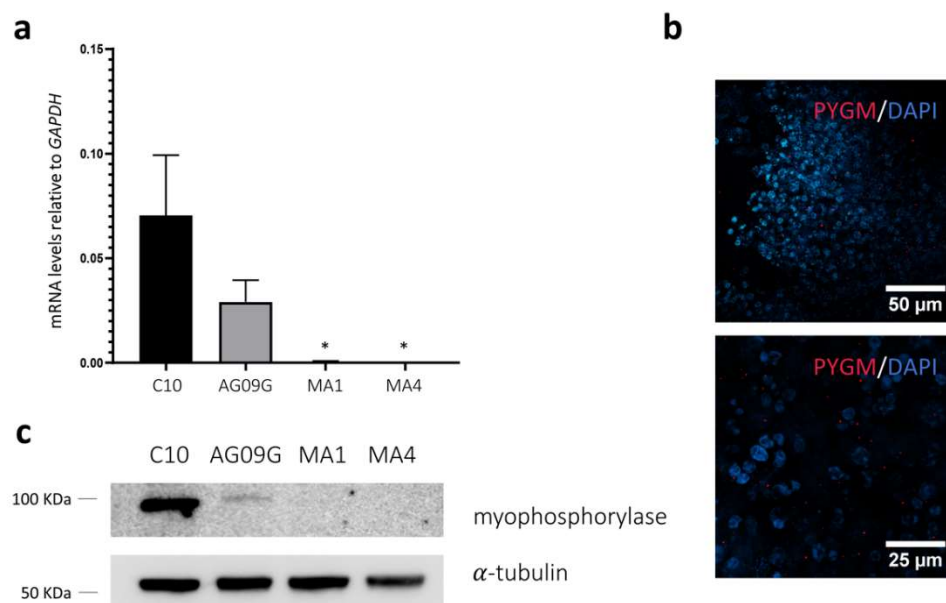


Figure 5. Evaluation of the expression of *PYGM* in the differentiated cell lines. (a) TaqMan™ assay to assess *PYGM* expression in the differentiated cell lines C10, AG09G, MA1, and MA4 at day 45. We can observe how the control cell lines do express *PYGM* as myogenic cultures, whereas both McArdle lines only maintain some negligible levels of expression. Values represent the expression mean of at least three independent replicates, relative to *GAPDH* as housekeeping gene. Error bars show standard deviation. * p -value < 0.05 versus control lines, one-way ANOVA with Holm–Sidak’s multiple comparisons test. (b) Immunocytochemistry analysis for the lines AG09G (above) and C10 (below). We can observe marked in red the presence of myophosphorylase in the differentiated cultures at day 30. (c) Western Blot analysis of the expression of myophosphorylase in the lines C10, AG09G, MA1 and MA4 at day 45 of differentiation. We can observe the presence of myophosphorylase in the control and its absence in the McArdle lines.

2.4. Gene Editing

2.4.1. Design of the sgRNAs and Evaluation of their On-Target Efficiency

To create the isogenic control for the previously generated iPSC cell line IISHDOi001-A (named MA1 in this article) [20], two different sgRNAs to edit the *PYGM* c.148C>T; p.R50* mutation by CRISPR/Cas9 guided homology-directed repair (HDR) mechanisms were designed. For this purpose, two different design web pages (see the Materials and Methods section) were used to select the most suitable single guide RNAs (sgRNAs), based on their predictions of higher on-target and lower off-target activities. We considered only the guides that would induce a Cas9 cleavage close enough to the target mutation to enhance the editing event. The efficiency of two different sgRNAs (sgRNA.1 and sgRNA.2), both 20-nt long and with an NGG Protospacer Adjacent Motif (PAM) at the 3’ end of their sequence, was tested. Whereas sgRNA.1 was situated on the positive strand and would prompt a double-strand break 14 bp upstream of the mutation, sgRNA.2 was located on

the negative strand and would induce the break just 1 bp downstream the mutation. The location of the two sgRNAs and their PAMs can be visualized in Figure 6a.

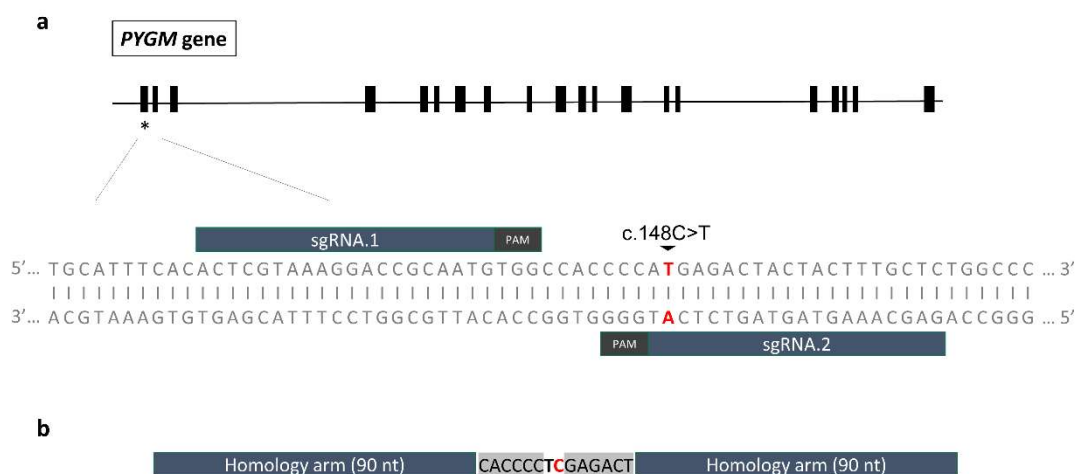


Figure 6. General scheme of the gene editing strategy. (a) Representation of the localization of the two designed sgRNAs targeting exon 1 of the *PYGM* gene. Both were selected to be placed as close to the c.148C>T; p.R50* mutation as possible, maintaining high on-target and low off-target activities. (b) ssODN repair template design. The 90-nt long homology arms leave two mutations in the centre: the edition of the c.148C>T; p.R50* target mutation (marked in red), and the introduction of a silent mutation to create a restriction site for the enzyme *XhoI* (c.147A>T; p.P49P, marked in bold).

To evaluate and compare the on-target efficiency of the designed sgRNAs, a classic T7E1 assay was performed. To that end, the iPSC line MA1 was nucleofected in the presence of ribonucleoproteins (RNPs) formed with the combination of a high-fidelity Cas9 and either sgRNA.1 or sgRNA.2. We extracted the genomic DNA for each case and amplified the region of interest with specific primers, obtaining a PCR product of 620 nt. After heteroduplex formation, the T7 endonuclease generates two cleaved fractions in the case of finding mismatches (reflection of the genome targeting, Cas9 cleavage, and posterior repair by different mechanisms). We estimated the frequency of gene modification by determining the percentage of T7-cleaved products. In our case, the calculated on-target efficacy for sgRNA.2 (28.8%) was higher than the one for sgRNA.1 (5.6%), (Figure 7). For that reason, sgRNA.2 was selected for the posterior edition experiments.

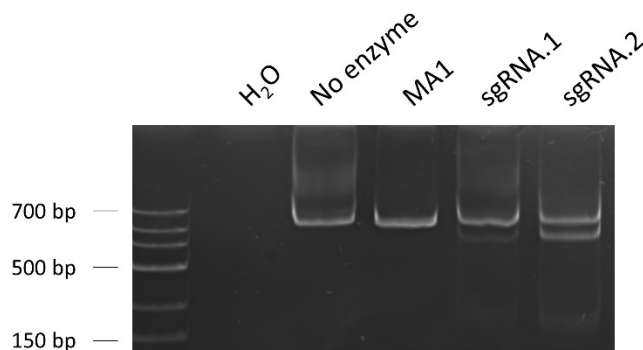


Figure 7. T7 endonuclease I assay to evaluate the on-target efficiency of the designed sgRNAs. The percentage of gene modification was calculated considering the band intensities of the T7-cleaved fractions, a reflexion of the Cas9 on-target activity. sgRNA.2 showed a greater on-target efficiency (28.8%) than sgRNA.1 (5.6%), being selected for the posterior edition experiments. Loading order: negative control (water as sample)—control without T7 enzyme—unedited iPSC line MA1—MA1 line nucleofected with Cas9/sgRNA.1 RNPs—MA1 line nucleofected with Cas9/sgRNA.2 RNPs.

2.4.2. Design of the ssODN Repair Template and Evaluation of the Edition Efficiency

In the case of single-nucleotide editions via HDR mechanisms, it has been demonstrated that single-stranded oligodeoxynucleotides (ssODNs) give rise to better efficiency [21]. Considering this, and having selected the best sgRNA, we designed a ssODN repair template to correct the *PYGM* c.148C>T; p.R50* mutation (Figure 6b). The 90-nt long homology arms of the ssODN employed in this study leave in the core two-point mutations: the first one would be the correction of the *PYGM* c.148C>T; p.R50* mutation, whereas the second one would be the introduction of a silent mutation (c.147A>T; p.P49P) in the sequence. This second modification would prevent the Cas9 from further cleavage as it would introduce a mismatch in the sequence. Additionally, it would create a restriction site for the enzyme *XhoI* to be used for the estimation of the edition efficiency by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). That way, if the edit had taken place correctly, the enzyme *XhoI* would digest the PCR amplicon and would generate two bands of 452 and 168 nt long.

For the gene editing, iPSCs were nucleofected in the presence of Cas9/sgRNA.2 RNPs and the ssODN repair template to force HDR mechanisms to edit the sequence as desired. After the expansion of the edited pool, we extracted genomic DNA, amplified the region of interest, and performed a digestion with the enzyme *XhoI*. As we can observe in Figure 8, RFLP showed a high editing efficiency (30%), revealing that the edit had taken place correctly in a relatively high percentage of cells.

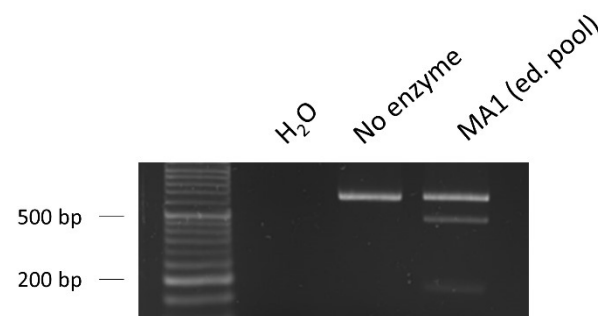


Figure 8. RFLP assay to evaluate the editing efficiency. The percentage of edit (30%) was calculated based on the band intensities of the fraction cleaved by the restriction enzyme *XhoI*, showing an acceptable number of edited cells present in the pool. Loading order: negative control (water as sample)—control without *XhoI* enzyme—edited pool of the iPSC line MA1 nucleofected with Cas9/sgRNA.2 RNPs and ssODN repair template.

2.4.3. Subcloning and Verification of the Gene Edition

After the confirmation of the gene editing by RFLP, subcloning of the nucleofected iPSCs pool was carried out. At this point, it was particularly important to assure that the clones generated came from a single cell, otherwise the established lines could be a mixing of successfully edited cells and either unedited or wrongly edited cells. We evaluated the edit event in 96 different clones by Sanger sequencing, finding evidence of a correct edit in 26 of them. We selected the edited clone B9 for further experiments, as it showed a typical embryonic stem cell-like morphology and normal growth behaviour. After expanding the clone, the edit was checked again by Sanger sequencing (Figure 9). The established edited line was named MA1-B9.

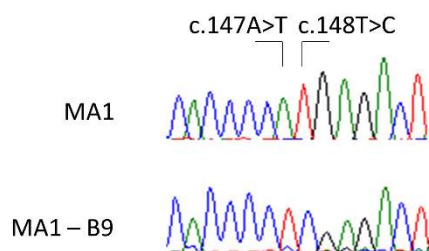


Figure 9. Validation of the successful edition of the selected clone MA1—B9 (below) by Sanger sequencing, compared to the MA1 origin line (above). We can observe both the modifications introduced in the edited sequence: c.147A>T and c.148T>C.

2.4.4. Off-Targets Analysis

One of the main concerns with the CRISPR technology is the possibility of modifying the sequence of undesired targets. We tried to minimise this with different strategies, like delivering the CRISPR system using RNPs, selecting a high-fidelity Cas9, or designing carefully the sgRNAs. However, the chances of off-target modifications are always present. We selected six off-targets between the most probable ones predicted by the two design pages employed in this study (see Materials and Methods section). All of them were located in either coding sequences or RNA genes and had between three and four mismatches (the selected guides did not have possible off-targets with a lower number of mismatches). We amplified each region of interest and we sequenced all of them by Sanger. None of the selected off-targets presented any modification (Figure 10).

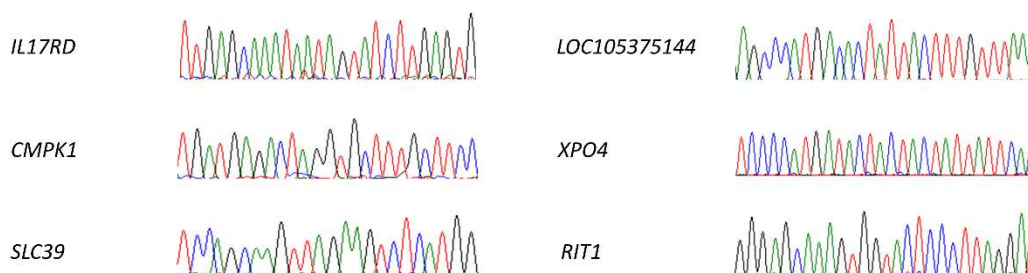


Figure 10. Off-targets analysis. We selected six different off-targets (*IL17RD*, *CMPK1*, *SLC39*, *LOC105375144*, *XPO4*, and *RIT1*), being the most likely ones to be modified according to the prediction algorithms. We evaluated the possible variations in their sequence by Sanger, finding no modifications in any of them. The areas shown in the image correspond to the sequences analogous to sgRNA.2, all of them identical to the reference sequence.

2.4.5. Pluripotency and Integrity Assessment

To evaluate if the edited iPSC line MA1-B9 preserved its integrity and stem cell features, a battery of assays was performed. First, the positive expression of several stemness markers (*OCT4*, *NANOG*, and *TRA-1-81*) was confirmed by immunofluorescence (Figure S3a). Second, RT-qPCR analysis of *OCT4*, *SOX2*, *CRIPTO*, *NANOG*, and *REX1* also verified the pluripotency of the line. To this end, total RNA from human embryonic stem cells (hESCs, Celprogen) and from the iPSC line IISHDOi007-A [22] were used as a reference for the gene expression levels of stemness markers (Figure S3b).

In addition, an *in vitro* differentiation assay was carried out as functional evidence of pluripotency. As shown in Figure S3c, the edited line can generate cell types related to the three germ layers: mesoderm (positive for SMA), endoderm (AFP), and ectoderm (positive for Tuj1). The MA1-B9 also presented a normal karyotype 46, XX (Figure S3d), revealing that the edition protocol had not induced the appearance of karyotypic abnormalities. The line was also checked to be mycoplasma-free (Figure S3e). Finally, a DNA fingerprinting

was performed to prove the genetic identity of the isogenic control MA1-B9 from the previously created iPSC line MA1 (IISHDOi001-A; data available upon request).

2.5. Pilot Study to Evaluate Two Read-Through Compounds in the iPSC-Based McArdle Disease Model

The isogenic iPSC model for McArdle disease (composed by the line MA1-B9 as isogenic control and the line MA1 as McArdle line harbouring the mutation c.148C>T; p.R50* in the *PYGM* gene) was employed to evaluate the action of two read-through compounds as possible therapy. First, both lines were differentiated towards innervated skeletal muscle using the protocol developed by Mazaleyrat et al. [29]. After 40 days of differentiation the expression of myogenic markers (*PAX3*, *PAX7*, *TTN*, *DES* and *MYOD1*) and a motor neuron marker (*ChAT*) was evaluated by RT-qPCR in both lines. A positive expression of all the markers assessed was observed, certifying that the process of differentiation had originated both myogenic and motor neuron cells in the culture (Figure 11).

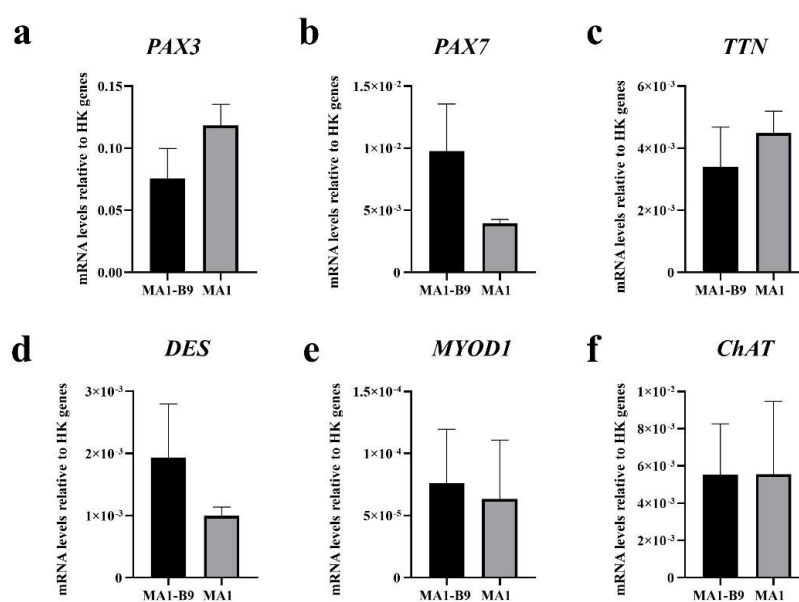


Figure 11. Analysis by RT-qPCR of the expression of myogenic and motor neuron genes to evaluate the process of differentiation at day 40 of the lines MA1-B9 and MA1. The expression of the genes *PAX3* (a), *PAX7* (b), *TTN* (c), *DES* (d), and *MYOD1* (e) as myogenic markers, along with *ChAT* (f) as a motor neuron marker, was assessed. The positive expression of all of them certifies the presence of myogenic cells and motor neurons in the differentiated culture. The values represent the mean of at least three replicates, and they are relative to the expression of two housekeeping (HK) genes: *HPRT* and *PPIA*. Error bars show standard deviation.

Subsequently, both differentiated lines were treated between days 41 and 43 of differentiation with two read-through drugs: PTC124 (treatment at 2, 5, 10, and 50 μ M, in absence or presence of 0.5 mM caffeine) and RTC13 (treatment at 2, 5, 10, and 50 μ M).

Cell pellets were collected after 24 h of treatment. A TaqMan™ assay was used to evaluate the possible rescue of *PYGM* expression after the treatments with the different drugs: PTC124 (Figure 12), PTC124 with caffeine (Figure 13), and RTC13 (Figure 14). The vehicle employed for the dilution of the drugs (DMSO) did not induce any type of effect or alteration in the differentiated lines. Statistical studies were performed with a Sidak or Dunnet's multiple comparisons tests, comparing the expression levels between the mutant and the control lines. We also assessed that there were no significant differences with respect to the absence of treatment (0 μ M). In the case of PTC124 (Figure 12), with 2, 5, and 10 μ M treatment, there were no significant differences between the lines MA1-B9 and MA1, with a possible tendency to increase *PYGM* expression in the mutant line. The

combined treatment with PTC124 and caffeine (Figure 13) rescues *PYGM* levels in the MA1 line with all the concentrations assessed. Regarding RTC13 (Figure 14), none of the tested concentrations equated to the expression levels of the lines MA1-B9 and MA1. There were no significant differences between each treatment and its absence for all the drugs in the line MA1-B9.

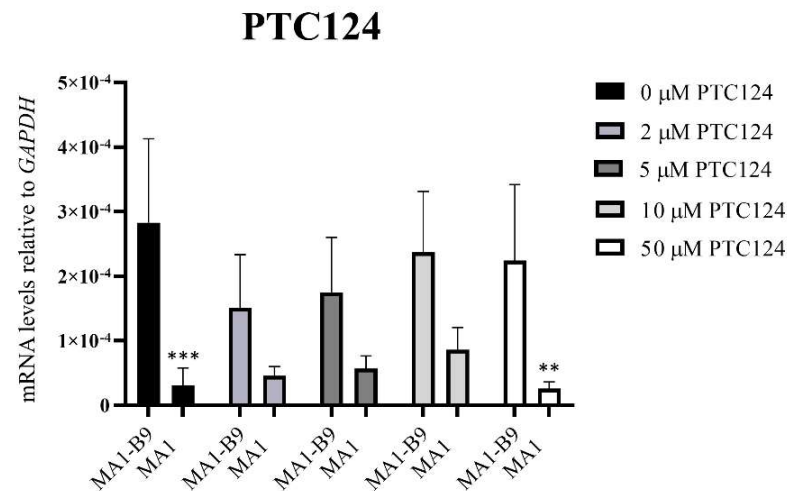


Figure 12. *PYGM* expression analysis using TaqMan™ assays after the treatment with different concentrations of PTC124 (2, 5, 10, and 50 μM) in the differentiated lines MA1-B9 and MA1. We observed no significant differences with the treatments at 2, 5, and 10 μM between the control and the mutant line. The values are representative of at least three independent replicates, relative to *GAPDH* as housekeeping gene. Error bars show standard deviation. The statistical analysis was performed using a two-way ANOVA analysis with Sidak's multiple comparisons test between the control and the mutant line for each of the concentrations (** *p*-value < 0.01 and *** *p*-value < 0.001). None of the evaluated concentrations showed significant differences with respect to the absence of treatment in the control line (*p*-value > 0.05, two-way ANOVA analysis with Sidak's multiple comparisons test).

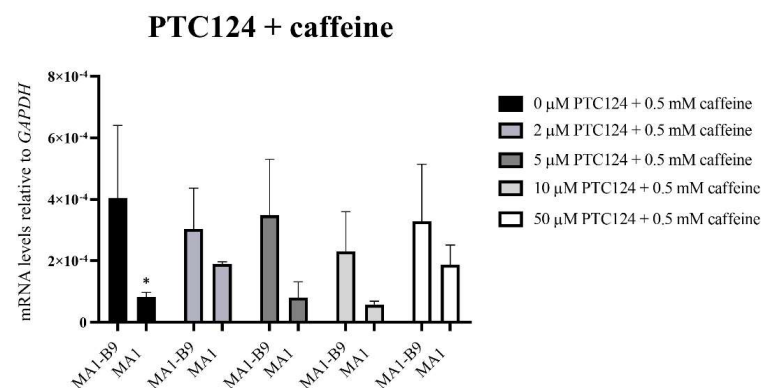


Figure 13. *PYGM* expression analysis using TaqMan™ assays after the treatment with different concentrations of PTC124 (2, 5, 10, and 50 μM) in conjunction with 0.5 mM caffeine in the differentiated lines MA1-B9 and MA1. We observed no significant differences with all the treatments evaluated between the control and the mutant line. The values are representative of at least three independent replicates, relative to *GAPDH* as housekeeping gene. Error bars show standard deviation. The statistical analysis was performed using a two-way ANOVA analysis with Sidak's multiple comparisons test between the control and the mutant line for each of the concentrations (* *p*-value < 0.05). There were no differences between each concentration and the absence of treatment for the line MA1-B9 (*p*-value > 0.05, two-way ANOVA analysis with Dunnet's multiple comparisons test).

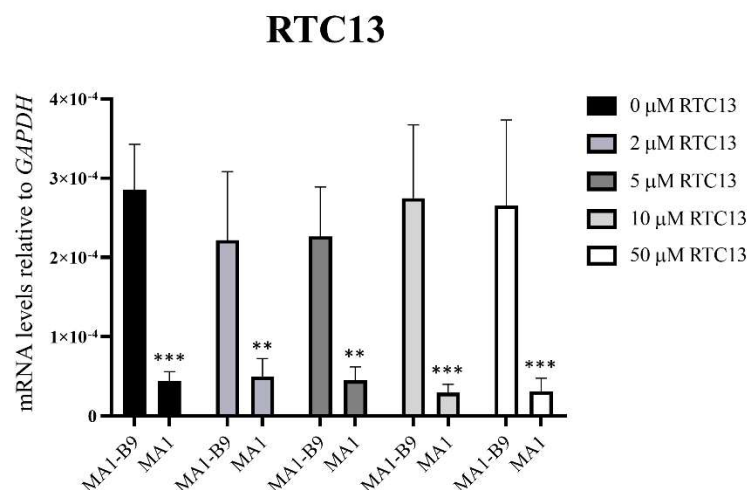


Figure 14. *PYGM* expression analysis using TaqMan™ assays after the treatment with different concentrations of RTC13 (2, 5, 10, and 50 μM) in the differentiated lines MA1-B9 and MA1. None of the assessed concentrations rescued the levels of *PYGM* expression in the mutant line in comparison to the isogenic control. The values are representative of at least three independent replicates, relative to *GAPDH* as housekeeping gene. Error bars show standard deviation. The statistical analysis was performed using a two-way ANOVA analysis with Sidak's multiple comparisons test between the control and the mutant line for each of the concentrations (** *p*-value < 0.01 and *** *p*-value < 0.001). None of the evaluated concentrations showed significant differences with respect to the absence of treatment in the control line (*p*-value > 0.05, two-way ANOVA analysis with Dunnet's multiple comparisons test).

3. Discussion

McArdle disease is an autosomal recessive rare disorder in which glycogen breakdown is blocked in skeletal muscle, impairing the use of glycogen as the primary energy source during exercise and causing a major exercise intolerance [1]. The lack of an ideal human *in vitro* model for the disease could be one of the main reasons why there is no treatment associated. The iPSC-based models are a very promising alternative to recapitulate in a dish the main features of a disease, as they are generated from somatic cells of a patient, they have auto-renewal capacity and they can be differentiated towards the specific tissue or tissues affected [35]. Skeletal muscle is one of the most complex tissues in the human body, with an extraordinary degree of organization and molecular intricacy [36]. Perhaps due to this complexity, skeletal muscle has always represented a difficult tissue to be modelled *in vitro*. Additionally, its embryonic development and maturation are still not fully understood [37]. Up to now, several protocols have been published to differentiate iPSCs to skeletal muscle tissue following distinct strategies [38]; however, the selection of the best protocol should be performed carefully, considering its safety and efficacy, among other parameters.

The main aim of this study was the establishment of an iPSC-derived skeletal muscle model of McArdle disease, which could be a valuable tool for the search of a therapy against this disease. For this purpose, two control and two McArdle iPSC lines were differentiated to innervated skeletal muscle cells. A protocol that induces a double differentiation towards skeletal muscle and motor neurons was selected [29], based on the supplementation of small molecules and defined factors to the culture media. The success of the differentiation strategy was confirmed with positive expression of typical myogenic and motor neuron markers, assessed by RT-qPCR and immunofluorescence. The presence of calcium transients and contraction capacity also suggested the functionality and maturity of the generated skeletal muscle cultures.

Myogenic and motor neuron gene expression levels differ between the cell lines employed in this study. This can be explained by the type of differentiation protocol

selected. With the addition of selected transcription factors and small molecules in the culture media, we can only direct the differentiation towards a certain lineage, but each line can respond differently to these stimuli. This only emphasizes the need to standardise the differentiation protocols and develop techniques without line-to-line fluctuations.

Contraction force is a hallmark trait previously reported to be reduced in McArdle disease patients [39] and in the McArdle mouse model [40]. Additionally, the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 1 (SERCA1) has been described to be downregulated in McArdle patients, which could prejudice calcium transport in type II muscle fibres [41]. However, when we analysed the possible differences between calcium transients and contraction capacity between the controls and the McArdle lines, we found no significant differences. This could be attributed to the differences between the disorder itself and the aspects that indeed can be modelled *in vitro*. Perhaps forcing the model to only use glycogen as energetic source (removing glucose from the medium, for instance) could constitute a way to bring the model closer to the disease and detect possible differences between McArdle and control lines at this level.

The lack of myophosphorylase protein in muscle is another distinctive feature of patients with McArdle disease carrying the p.R50* mutation [42]. We confirmed the absence of myophosphorylase in the McArdle iPSC-derived skeletal muscle model and the presence in the control ones after the differentiation process, validating the generated model. Expression of *PYGM* would not be expected due to nonsense-mediated decay (NMD) mechanisms, previously confirmed to occur in cells harbouring the nonsense mutation c.148C>T; p.R50* [43]. We have observed that whereas the expression of *PYGM* was clear in the control lines, we still detected some residual expression in the McArdle lines. As we were employing TaqMan™ probes, perhaps their sensitivity still allows us to detect residual transcripts not yet removed, or maybe NMD mechanisms are not fully understood in these cells. There is also a difference in the levels of *PYGM* expression between both control lines, C10 and AG09G, with consistent results confirmed by RT-qPCR and Western Blot. This could be due to the different genetic background of the lines, or even to the differentiation process itself, which can differ between the lines as remarked above. Anyhow, the presence of myophosphorylase in the controls and absence in the McArdle lines, proved by immunodetection, validates the iPSC-based model of McArdle disease. This way, the possible rescue of myophosphorylase expression in this model could be used as a readout to evaluate potential drug candidates.

Nowadays, the use of isogenic control iPSCs has become an ideal tool to be used for drug screenings, as they eliminate the genetic background as a modifier. CRISPR/Cas9 technology has opened the door to not only editing but also regulating and targeting the genome in an easier, faster and more elegant fashion [44]. Using this technology, the establishment of isogenic controls can be performed very easily. In this study, we report the generation of an isogenic control of the iPSC line MA1 using CRISPR/Cas9 technology. For this purpose, we targeted exon 1 of the *PYGM* gene using RNPs formed by the enzyme Cas9 and a pre-designed sgRNA with good on-target efficiency, in the presence of a ssODN repair template to drive HDR mechanisms to edit the genome in the desired way. The edited line (MA1-B9) maintained its pluripotency and integrity after the editing protocol. Additionally, six different possible off-targets were evaluated by Sanger sequencing, finding no modifications in any of them.

Using the isogenic skeletal muscle McArdle iPSC-based model, we performed a pilot study to evaluate the possible rescue of myophosphorylase expression after the treatment with two read-through compounds: PTC124 (with and without caffeine, as caffeine is supposed to enhance its effect [45]) and RTC13. The treatment with 2, 5, and 10 µM of PTC124 increased the *PYGM* expression levels in the McArdle line, like with all the conditions tested in the presence of caffeine. However, none of the concentrations of RTC13 rescued the levels of expression in the McArdle lines. The results obtained with PTC124 contrast with a previously published study [46]. In this study, the authors evaluated the efficiency of different read-through compounds (including PTC124) in three

different cellular models. These models were primary skeletal muscle cells derived from the McArdle murine model, HeLa cells transiently transfected with p.R50* plasmid constructs or HEK293T cells stably expressing these constructs. The differences observed in terms of PTC124 read-through efficiency could be explained as these models may diverge from the actual human disorder due to inter-species differences or because of constituting cell lineages distinct from the one mainly affected in McArdle disease, which are skeletal muscle cells. Thus, the skeletal muscle iPSC-based model, reported in this work, may be closer to reality in this sense, offering a more accurate approach to the human disorder. Although our study is still preliminary, a deeper analysis of the effects of PTC124 with and without caffeine (or even other read-through compounds) should be performed in the generated model, as they could be a promising therapy.

4. Materials and Methods

This study was reviewed and approved by the Institutional Ethical Committee of the “Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols”, CSIC-UAM, 406 329 1.

4.1. Establishment of the iPSC Lines C10 and MA4: Cell Reprogramming

We reprogrammed primary fibroblasts from a commercial source (Lonza, CC2509) to generate the control iPSC line named C10, and fibroblasts from a McArdle patient harbouring the *PYGM* mutation c.148C>T; p.R50* in homozygosis for the iPSC line MA4. We used the CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #A16517), following the manufacturer’s instructions. After the expansion of the reprogrammed lines, we selected two of them to continue the battery of pluripotency and integrity tests. The control line C10 has been originated from the same source as the previously published line IISHDOi002-A [27], whereas the line MA4 comes from the same fibroblasts as the published line IISHDOi001-A (named in this article as MA1) [28]. The maintenance and expansion of the iPSC lines were performed both on feeder and feeder-free conditions, as described by Galera et al., 2016 [47]. The presence of the *PYGM* mutation c.148C>T; p.R50* in the reprogrammed McArdle line was confirmed by Sanger sequencing.

4.2. Pluripotency and Integrity Assessment of the iPSC Lines

4.2.1. Alkaline Phosphatase Staining

The positive alkaline phosphatase staining was assessed using the phosphatase alkaline blue membrane substrate solution kit (Merck, Darmstadt, Germany; #AB0300), following the instructions provided by the manufacturer.

4.2.2. Immunocytochemistry for Pluripotency Assessment

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature (RT) and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in Tris-buffered saline (TBS) for 45 min at RT. Blocking was carried out with 3% donkey serum, 0.3% Triton in TBS for 2 h at RT. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C and secondary antibodies at RT for 2 h in the dark (Table 1). Nuclei were counterstained with DAPI (Merck, Darmstadt, Germany; #28718-90-3).

Table 1. Primary and secondary antibodies to evaluate the expression of pluripotency markers by immunocytochemistry.

Primary Antibodies		
Name	Dilution	Reference
Goat anti-NANOG	1:25	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; #sc-5279
Mouse anti-OCT4	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; #sc-5279
Rabbit anti-SOX2	1:100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #PA1-16968
Mouse anti-SSEA4	1:10	Millipore, Burlington, MA, USA; #MAB4304
Rat anti-SSEA3	1:20	Abcam, Cambridge, UK; #ab16286
Mouse anti-TRA-1-81	1:150	Millipore, Burlington, MA, USA; #MAB4381
Mouse anti-TRA-1-60	1:150	Millipore, Burlington, MA, USA; #MAB4360
Secondary Antibodies		
Name	Dilution	Reference
Cy TM 2-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H + L)	1:50	Jackson ImmunoResearch Labs, Ely, UK; #705-225-147
Cy TM 2-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fcγ subclass 2b specific	1:50	Jackson ImmunoResearch Labs, Ely, UK; #115-225-207
Cy TM 3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgM, μ chain specific	1:250	Jackson ImmunoResearch Labs, Ely, UK; #715-165-020
Cy TM 2-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)	1:50	Jackson ImmunoResearch Labs, Ely, UK; #111-225-144
Cy TM 3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgM, μ chain specific	1:250	Jackson ImmunoResearch Labs, Ely, UK; #112-165-075
Cy TM 3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fcγ subclass 3 specific	1:250	Jackson ImmunoResearch Labs, Ely, UK; #115-165-209

4.2.3. RT-qPCR for Pluripotency Assessment

We performed the RNA extraction with TRI[®] Reagent Solution (Invitrogen, Waltham, MA, USA; #AM9738). The retrotranscription of 1 μg of RNA was carried out using the RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA; #K1691). The qPCR amplification was performed in a 7500 Fast Real-Time PCR System, by Applied Biosystems (Waltham, MA, USA), using the GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA; #A6002) following the instructions provided by the manufacturer. The expression levels were normalized relative to *GAPDH*, and they represent at least three independent replicates. The sequence of the qPCR primers employed can be found in Ortuño-Costela et al., 2017 [28].

4.2.4. In Vitro Differentiation

We followed the protocol described by Galera-Monge et al., 2019 [48] for the embryoid bodies generation and posterior in vitro spontaneous differentiation to cell types of the three germ layers. The positive expression of selected markers was assessed by immunocytochemistry as described in Section 4.2.3, using the antibodies listed in Table 2: α-fetoprotein (AFP) for endoderm, α-smooth muscle actin (SMA) for mesoderm, and β-III-tubulin (Tuj1) for ectoderm.

4.2.5. Elimination of the Sendai Virus

The removal of the Sendai virus employed to deliver the pluripotency factors inside the cells was assessed by RT-PCR. For this purpose, total RNA extraction and retrotranscription were performed as described in Section 4.2.3, followed by a PCR reaction designed according to the specific recommendations provided by the CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA; #A16517).

Table 2. Primary and secondary antibodies used for the immunocytochemistry analysis of the markers for ectoderm (Tuj1), endoderm (AFP) and mesoderm (SMA) after the in vitro spontaneous differentiation assay.

Primary Antibodies		
Name	Dilution	Reference
Mouse anti- β tubulin isotype III (ectoderm)	1:300	Merck, Darmstadt, Germany; #T8660
Mouse anti-AFP (endoderm)	1:300	Merck, Darmstadt, Germany; #WH0000174M1
Mouse anti-SMA (mesoderm)	1:400	Merck, Darmstadt, Germany; #A2547
Secondary Antibodies		
Name	Dilution	Reference
Goat anti-mouse IgG (H + L), Alexa Fluor 488	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA #A-11029

4.2.6. Karyotype Analysis

For the evaluation of the karyotype, cells with more than 20 passages were treated with 10 μ g/mL of ColcemidTM (Gibco, Waltham, MA, USA; #15212012) for 90 min at 37 °C and trypsinised. Cells were then placed in a KCl 0.075 M hypotonic solution and fixed with Carnoy's solution, being dropped on a microscope glass slide. Wright staining was used for the G-banding, analysing at least 20 metaphases. The FISH analysis was performed with specific DNA probes for centromeric regions DXZ1/DYZ1. Slides were denatured at 72 °C for 2 min and incubated at 37 °C for 16 h for hybridization. Afterwards, they were washed in SSC with 0.1% Tween-20 and mounted using DAPI. A Nikon fluorescent microscope was used to analyse 200 interphase cells. Digital images were acquired with a monochrome CCD camera linked to Metasystem software.

4.2.7. Mycoplasma Detection

The established iPSC lines were evaluated to be mycoplasma-free by PCR. To this aim, the supernatant of a 3-day confluent culture was boiled at 95 °C for 5 min and centrifuged at 13,000 g for 5 sec. For the PCR we used the primers MGSO-Fw (5'-TGCACCATCTGTCACCTCTGTAAACCTC-3') and GPO-Rv (5'-GGGAGCAAACAGGATTA GATACCCT-3'). The product of the PCR was resolved in a 1% agarose gel. The band at 300 bp represents that the sample is positive for mycoplasma.

4.2.8. STR Analysis

A DNA fingerprinting analysis was performed to demonstrate the origin of the established iPSC lines from the starting fibroblasts. The subsequent markers were amplified by PCR, followed by a fragment analysis: D13S317, D7S820, VWA, D8S1179, D21S11, D19S433, D2S1338, and amelogenin for sex determination. The analysis was carried out using the software ABI PRISM 3100 Genetic analyser and Peak Scanner v3.5 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The PCR primers can be consulted in Ortuño–Costela, et al., 2017 [28].

4.3. iPSC Culture

The iPSCs were cultured at 37 °C and 5% CO₂ on hESC-qualified Matrigel-coated plates (Corning, New York; #354277) using mTeSRTM1 medium (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; #85850). The cells were dissociated and passaged when they reached about 80% confluence using RELeSRTM (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; #100-0484), following the instructions of the manufacturer.

4.4. Differentiation to Innervated Skeletal Muscle Cells

The differentiation to innervated skeletal muscle was performed following the protocol previously described by Mazaleyrat et al., 2020 [29]. After reaching a high confluence, iPSCs growing in mTeSRTM1 were manually picked and seeded on hESC-qualified Matrigel-

coated plates. For the differentiation of iPSCs to skeletal muscle cells the basal medium for the maintenance of the cells is composed by Neurobasal™ (Gibco, Waltham, MA, USA; 21103-049), supplemented with GlutaMAX™ 1× (Invitrogen, Waltham, MA, USA; 35050-038), Penicillin-Streptomycin 1× (Gibco, Waltham, MA, USA; 15140122), non-essential amino acids 1× (Merck, Darmstadt, Germany; M7145), N-2 supplement 1× (Gibco, Waltham, MA, USA; 17502048) and B-27™ supplement 1× (Gibco, Waltham, MA, USA; 17504044). To induce myogenic and motor neuron differentiation subsequent medium daily changes were performed with the basal medium supplemented with the compounds shown in Table 3 [49]. The iPSC lines which were differentiated towards skeletal muscle cells in this study were C10 [27] and AG09G (kindly gifted by Dr Magdinier's group) as control lines and MA1 [28] and MA4 as McArdle lines.

Table 3. Compounds to be added to the basal medium employed in the distinct stages of the differentiation protocol from iPSCs towards innervated myogenic cells.

Differentiation Days (D)	Supplements to Be Added
From D0 to D5	Insulin-transferrin-selenium (ITS) 1× (Gibco, Waltham, MA, USA; 41400045); LDN193189 0.5 µM (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; 72147); CHIR99021 3 µM (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; 72054) *D1: additional supplementation with 2 µM Thiazovivin
From D6 to D7	IGF-I 4 ng/mL (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; 78022.1); HGF 10 ng/mL (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; 78019.1); LDN193189 0.5 µM (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; 72147); β-mercaptoethanol 100 µM (Gibco, Waltham, MA, USA; 21985023)
From D8 to D11	IGF-I 4 ng/mL (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; 78022.1); β-mercaptoethanol 100 µM (Gibco, Waltham, MA, USA; 21985023)
From D1 to D16	IGF-I 4 ng/mL (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; 78022.1); β-mercaptoethanol 100 µM (Gibco, Waltham, MA, USA; 21985023); DAPT 10 µM (Merck, Darmstadt, Germany; D5942)
From D17-onwards	IGF-I 4 ng/mL (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; 78022.1); β-mercaptoethanol 100 µM (Gibco, Waltham, MA, USA; 21985023)

4.4.1. Immunocytochemistry for Differentiation Assessment

Cells for immunocytochemistry were fixed at day 30 of differentiation with 4% paraformaldehyde overnight at 4 °C. Permeabilization and blocking were performed with 3 % BSA, 0.4 % Triton in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h at RT. Incubation with primary antibodies was performed overnight at 4 °C, and with the secondary antibodies at RT for 1 h in the dark, both diluted in blocking solution (Table 4). The mounting of the slides was performed using Vectashield® mounting medium with DAPI to stain the nuclei (Vector laboratories, Newark, CA; #H-1200-10). For detection of neuromuscular junctions, we performed a staining using Alexa Fluor® 555 α-bungarotoxin conjugate diluted 1:400 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #B35451).

Table 4. Primary and secondary antibodies used to assess the expression of myogenic and motor neuron proteins.

Primary Antibodies		
Name	Dilution	Reference
Mouse anti-titin	96:1000	DSHB, Iowa, IA, USA; #9D10
Rabbit anti-desmin	1:100	Abcam, Cambridge, UK; #AB15200
Chicken anti-neurofilament	1:2000	Biologend, San Diego, CA; USA; #PCK-593P
Rabbit anti-MNX1 (HB9)	1:100	Millipore, Burlington, MA, USA; #ABN174
Goat anti-ChAT	1:100	Millipore, Burlington, MA, USA; #AB144P
Secondary antibodies		
Name	Dilution	Reference
Goat anti-mouse IgG (H + L) Alexa Fluor [®] 647	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #A-21236
Goat anti-chicken IgG (H + L) DyLight [™] 488	1:1000	Rockland, Pottstown, PA, USA; #603-141-126
Goat anti-rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor [®] 594	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #A-11012
Goat anti-mouse IgG (H + L) Alexa Fluor [®] 488	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #A28175
Goat anti-rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor [®] 555	1:1000	Cell Signalling, Danvers, MA, USA; #4413
Donkey anti-goat IgG (H + L) Alexa Fluor [®] 633	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #A-21082

4.4.2. RT-qPCR for Differentiation Assessment

Cell pellets were obtained at different time points during the differentiation process (days 8, 12, 17, 30, and 45, respectively) using RELeSR[™] (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; #100-0484). Total RNA extraction was performed using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany; #74104) following the manufacturer's instructions. We carried out the retrotranscription of 1 µg of RNA using the Superscript IV kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA; #18091200) according to the instructions provided by the manufacturer. The qPCR was performed using LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche, Basel, Switzerland; #04707516001) with 1 µL of the retrotranscription product, following the manufacturer's instructions. All the values are representative of at least three independent replicates, and the expression levels were normalized to the mean of two different housekeeping genes (*HPRT* and *PPIA*). The qPCR primers are listed in Table 5.

Table 5. Primers for the evaluation of the expression of several myogenic and motor neuron genes by RT-qPCR.

Target	Forward Primer (5' → 3')	Reverse Primer (5' → 3')
<i>MyH2</i>	GGAGCTGGTGGAGGGGCCAA	TGCTCCATGGCACCAGGAGTTT
<i>MyH3</i>	GCTTGTGGGCGGAGGTCTGG	AGGGCTGGTTCTGAGCCTCGAT
<i>MyoD</i>	TGCGCAACGCCATCCGCTA	GGGCCGCTGTAGTCCATCATGC
<i>TTN</i>	CCGAAATGCATCAGTCAGCG	CCTTGCAAGCTTGTGTACC
<i>DES</i>	CCGCCATCTGCGGAGTACC	TGCTCAGGGCTGGTTTCTCGGA
<i>PAX3</i>	CACCAGGCATGGATTTCC	TGTGTCAGGAGTCCCATTACCT
<i>PAX7</i>	CCACAGCTTCTGCAGCTACTCTG	GGGTTGCCAAGATGCTG
<i>ChAT</i>	AGAAGCAGAAATGCAGCCCT	GTCTCACAAAAGCCAGTGC
<i>HPRT</i>	CATTATGCTGAGGATTTGGAAAGG	CTTGAGCACACAGAGGGCTACA
<i>PPIA</i>	GGCAAATGCTGGACCCAACACA	TGCTGGTCTTGCCATTCTGGA

4.4.3. Calcium Transients and Contraction Capacity Analyses

Calcium transients and contraction capacity were analysed at days 35 and 42 of differentiation. Cells were incubated at 37 °C for 30 min in the presence of 5 µM FLUO-8[®] AM fluorescent Ca²⁺ binding dye (AAT Bioquest, #1345980-40-6) and 0.08 % Pluronic acid. After exciting at 488 nm, fluorescence images were taken as time series at different regions in an Imaging Observer system (Axio Observer.Z1/7, Zeiss, Jena, Germany) at 10x (151 images in total for 30 sec with 200 msec intervals). The analysis was performed

using the Imaris 9.9 software (Oxford Instruments, Abingdon, UK). Calcium transients were analysed taking the values for intensity mean of 50 different fibres representative of at least three separate differentiation experiments. We performed a multiple comparison using a Brown–Forsythe and Welch ANOVA test to search for statistical differences. For contraction analysis, we took the values of contraction length of a minimum of 4000 different contraction events from at least three separate differentiation experiments. The statistical analysis was performed using a Kruskal–Wallis test.

4.5. Validation of the Skeletal Muscle iPSC-Based Model for the Study of McArdle Disease

4.5.1. RT-qPCR

For the expression analysis of *PYGM*, we designed a TaqMan[®] gene expression assay. We performed a duplex assay with two different probes, in conjunction with the TaqMan[®] gene expression master mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA; #4369016): *PYGM*-FAM as target (assay ID Hs00989942_m1, #10794597) and *GAPDH*-VIC as housekeeping gene for the normalization of the expression levels (assay ID Hs02786624_g1, #11957021), both from Applied Biosystems (Waltham, MA, USA). The qPCR with the TaqMan[®] probes was performed in a 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The values represent the mean of at least three replicates. The statistical study was performed with a one-way ANOVA Holm–Sidak’s multiple comparisons test, considering as statistically significant a *p*-value < 0.05.

4.5.2. Western Blot

We evaluated the expression of myophosphorylase using a Western Blot analysis. Cell pellets were collected at day 45 of differentiation using RELeSR[™] (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; #100-0484). Protein extraction was carried out using a lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1 % SDS) with protease inhibitors (Roche, Basel, Switzerland; #11873580001). Protein quantification was performed using the DC[™] protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; #5000112), according to the manufacturer’s instructions. We performed an SDS-PAGE in 4–20% Mini-PROTEAN[®] TGX[™] precast protein gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; #4561094) and transferred the proteins to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; #1704158) with the Trans-Blot Turbo Transfer system by Bio-Rad. The blocking of the membrane was performed with 5% non-fat dry milk, 0.1 % Tween-20 (Merck, Darmstadt, Germany; #P1379) in TBS for 1 h at RT. The *PYGM* primary antibody (Merck, Darmstadt, Germany; #HPA056003) was diluted 1:50 in 0.1 % Tween-20, 1 % non-fat dry milk in TBS, with an incubation period of 17 h at 4 °C with gentle agitation. GARPO secondary antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, USA; #G21234) was diluted 1:2500 in the same solution as the primary antibody, and it was incubated at RT for 1 h. The membrane was revealed with Clarity Max[™] Western ECL Blotting Substrates (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; #1705062). α -Tubulin-HRP (Abcam, Cambridge, UK; #ab40742) was used as a loading control, diluted 1:5000. Western Blot analyses were performed by Dr García-Consuegra, from the Proteomics Service in the Research Institute of Hospital 12 de Octubre.

4.5.3. Immunocytochemistry

The assessment of the myophosphorylase expression by immunocytochemistry was performed following the protocol described in Section 4.4.1, using the primary antibody rabbit anti-*PYGM* (Merck, Darmstadt, Germany; #HPA056003) at a 1:100 dilution.

4.6. Gene Editing with CRISPR/Cas9

4.6.1. Design of the sgRNAs

We designed the crRNA domain of two possible sgRNAs (named sgRNA.1 and sgRNA.2), targeting exon 1 of the *PYGM* gene. For this purpose, we took into account the proximity of the guides to the c.148C>T; p.R50* mutation, along with the predictions of higher on-target efficiency and lower possibility of off-targets modifications provided by

two different tools: the design page integrated by IDT “https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM (accessed on 30 January 2022)” and the prediction software CRISPOR [50]. The sequence of the selected crRNA domains is specified in Table 6, along with the 3′-situated PAM for each case.

Table 6. Sequence of the crRNA domain and PAM of the two sgRNAs designed.

	crRNA Domain Sequence (5′ → 3′)	PAM
sgRNA.1	ACTCGTAAAGGACCGCAATG	TGG
sgRNA.2	GAGCAAAGTAGTAGTTCAT	GGG

The tracrRNA domain was acquired separately (IDT, Newark, NJ, USA; #1072532). The crRNA and the tracrRNA domains were assembled into the complete sgRNA by mixing both at equimolar concentrations and annealing at 95 °C for 2 min.

4.6.2. Design of the ssODN

A ssODN repair template for the correction of the *PYGM* c.148C>T; p.R50* mutation via the HDR pathway was designed. An additional silent mutation (c.147A>T; p.P49P) was introduced as well to prevent Cas9 from further cleavage and to create a restriction site for the enzyme *XhoI*, facilitating the posterior evaluation of the edition efficiency. This other change did not introduce any additional splicing sites, assessed with the NetGene2 server “<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2> (accessed on 15 February 2022)” [51]. The ssODN, with 90 nt-long homology arms at both sides of the modifications, was ordered as an Ultramer oligonucleotide to IDT. The complete sequence of the ssODN is specified below (the correction of the c.148C>T mutation is marked in bold, and the new silent mutation introduced is underlined, flanked by the homology arms).

Homology arm 1:

GCCGGCGTGGAGAACGTGACTGAGCTGAAAAAGAACTTCAACCGGCACCTG
CATTTCACACTCGTAAAGGACCGCAATGTGGCCACCCC

Core: TC

Homology arm 2:

GAGACTACTACTTTGCTCTGGCCATACCGTGCGGACCACCTCGTGGGGCGC
TGGATCCGCACGCAGCAGCACTACTATGAGAAGGACC

4.6.3. Gene Editing

We started from a 10 cm culture plate of the McArdle iPSC line MA1 [28] at approximately 70% confluence and treated with StemMACS™ Y27632 Rock inhibitor for about 2 h (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany; #130-103-922). The gene editing was performed following the protocol previously described by Bruntraeger et al., 2019 [52]. This protocol is based on the generation of CRISPR/Cas9 RNP complexes and the use of ssODNs to drive HDR mechanisms. We used a high-fidelity Cas9 Alt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3 (IDT, Newark, NJ, USA; #1081060) to form the RNPs. That way a more precise editing and lower off-targets risk was ensured. The nucleofection was performed in a single-cell suspension of 1·10⁶ cells using the P3 Primary Cell 4D-Nucleofector® X Kit L (Lonza, Basel, Switzerland; #V4XP-3012) in a 4D Nucleofector System by Lonza (Program CA-137) following the manufacturer’s instructions. Subsequently, the potentially edited iPSCs were cultured and expanded for further experiments as described above.

4.6.4. Evaluation of the On-Target Efficiency: T7E1 Assay

The on-target cleavage efficiency of the Cas9 enzyme in combination with the two different sgRNAs designed was evaluated using a classic T7 endonuclease I assay. To this end, we nucleofected the cells in the presence only of the RNPs formed by the Cas9 and either sgRNA.1 or sgRNA.2, just to check which one of the designed sgRNAs displayed a higher efficiency. We extracted genomic DNA from the pool of nucleofected cells with the NucleoSpin® Tissue kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany; #740952.50)

following the manufacturer's instructions. Then we amplified the region of interest using the primers PYGM-Fw (5'-CAGAAGACCATGTGCAAGGC-3') and PYGM-Rv (5'-CTTAAGTCAAGATCGCCAGCTC-3') for 35 cycles with the GoTaq[®] G2 Hot Start Polymerase (Promega, Madison, WI, USA; #M7406). The PCR products were purified from the gel using the NZYGelpure kit (NzyTech, Lisbon, Portugal; #MB01102). Subsequently, 200 ng of the purified PCR product were employed to perform the heteroduplex formation followed by a digestion with the enzyme T7 endonuclease I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA; #M0302S) as described by the manufacturer. The digested product was loaded in a 10% polyacrylamide gel, and run at 140 V for 90 min. We stained the gel with GreenSafe Premium (NzyTech, Lisbon, Portugal; #MB13201) for 30 min in darkness. The percentage of gene modification was estimated following the formula described by Fuster et al., 2017 [53].

4.6.5. Evaluation of the Edition Efficiency: RFLP

The edition efficiency was evaluated with a Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). For this purpose, we extracted the genomic DNA of the edited cells with the Cas9/sgRNA.2 RNPs and the ssODN repair template. Subsequently, we amplified and purified the region of interest as described in the previous section. Using 500 ng of the purified product we performed the digestion with the enzyme *XhoI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA; #R0146S), following the manufacturer's instructions. We loaded the product in a 2% agarose gel, stained with GreenSafe Premium. The percentage of editing was calculated taking into account the band intensities of the cleaved fractions, using the ImageJ software (NIH).

4.6.6. Subcloning

After reaching approximately 70% confluence, the pool of edited iPSCs was detached using Accutase[™] (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; #07920) to create a single-cell suspension. We seeded 1000 cells on hESC-qualified Matrigel-coated 10 cm plates with cloning medium, composed of mTeSR[™]1 and CloneR[™] (StemCell Technologies, Vancouver, Canada; #05888), and we left the plates undisturbed for 48 h. After that, we changed the cloning medium as described by the manufacturer. The culture was maintained until the colonies had an approximate 1–2 mm diameter.

4.6.7. Freezing and Analysis of the Clones

We manually picked round shaped and good-looking colonies, discarding the ones that were uncertain to come from a single cell. We picked a total of 96 colonies, which were split into two different wells from two separate hESC-qualified Matrigel-coated 96-well plates to create replicates. When they reached an appropriate size, we froze the colonies from one of the 96-well plates in Gibco[™] KnockOut[™] Serum Replacement (Gibco, Waltham, MA, USA; #10828010) with 10% final DMSO. The colonies from the duplicate 96-well plate were lysate using Yolk Sac lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.45% IGEPAL CA-630, 0.45% Tween 20) supplemented with Proteinase K (GE Healthcare, Chicago, IL, USA; #406172). We incubated the plate at 60 °C for 1 h, followed by an inactivation at 95 °C for 10 min. We then performed a PCR with a 1:10 dilution of the lysates using the same conditions described above. The PCR products were purified using the MultiScreen PCR_μ96 filtration plates (Millipore, Burlington, MA, USA; #LSKMPCR10) and sequenced by Sanger to assess the edition. One of the successfully edited clones (labelled as clone B9) was selected for further experiments. This clone was thawed from the frozen 96-well backup plate and expanded as described above. The correct edition of the mutation was double-checked by Sanger sequencing.

4.6.8. Off-Targets Analysis

We selected six different possible off-targets from the most likely ones (with 3–4 mismatches and affecting either a coding region or an RNA gene) predicted by both IDT and CRISPOR design tools to check if the CRISPR/Cas9 system had modified their sequences.

We amplified each region by PCR using the primers listed in Table 7. Subsequently, we purified the PCR products as described above and sequenced them by Sanger.

Table 7. Primers designed for the PCR amplification of the selected off-target regions.

Target	Forward Primer (5' → 3')	Reverse Primer (5' → 3')
IL17RD	CCACCTCAACAGAGACCACC	GGGGCCAGAGAGTTTTCTT
CMPK1	GCATTCCTACTCACATAAGTG	GTCATATTATCTCAATCAACTC
SLC39	TTCTCTAGATATACTCAGCC	TATAAGGCAGCCATCCATG
LOC105375144	GCTGGTAGCACAAAGCAGAG	AGTCCAGTGTGATAGGAGCC
XPO4	CAGCATTGGGCAGATTACTTCTT	GGGGACAGAATAGTTTCATAGGCA
RIT1	AGGGACCACTACTCAGAGCT	AGACATCAGGGGTGTGGTA

4.6.9. Pluripotency and Integrity Assessment

To verify if MA1-B9 was a bona fide iPSC line, a complete battery of tests was performed to evaluate its integrity and pluripotency after the edition. The pluripotency of the lines was evaluated by immunofluorescence, RT-qPCR and in vitro differentiation. The quality of the line was demonstrated by STR analysis, mycoplasma detection and karyotype analysis. All the protocols are detailed in Section 4.2.

4.7. Pilot Study to Evaluate Two Read-Through Compounds in the Isogenic McArdle Disease Model

The line MA1 and its matched isogenic control MA1-B9 were differentiated towards innervated skeletal muscle following the protocol described in Section 4.4. The expression of some myogenic markers (*PAX3*, *PAX7*, *TTN*, *DES* and *MYOD1*) and a motor neuron marker (*ChAT*) were assessed by RT-qPCR at day 40 of differentiation, following the protocol detailed in Section 4.4.1.

Both cell lines were treated, between days 41 and 43 of differentiation, with two read-through compounds to evaluate the possible rescue of the *PYGM* expression. The drugs tested were the following:

- PTC124 (Merck, Darmstadt, Germany; #5309180001). Treatment at 2, 5, 10 and 50 μM .
- RTC13 (Merck, Darmstadt, Germany; #SML1725). Treatment at 2, 5, 10 and 50 μM .

Cell pellets were collected after 24 h of treatment with both drugs. Additionally, the possible effect of caffeine (Merck, Darmstadt, Germany; #C0750) to enhance the action of PTC124 [45] was also evaluated. To do so, cells were treated with 0.5 mM caffeine along with the previously described concentrations of PTC124, collecting cell pellets after 24 h. Subsequently, the effect of the different drugs on the expression of *PYGM* was compared by RT-qPCR. For this purpose, total RNA was extracted from cell pellets using a classic protocol with TRI[®] reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #AM9738), and 1 μg of RNA was retrotranscribed using the RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #K1691), according to the manufacturer's instructions. *PYGM* expression analysis was performed with a multiplex gene expression assay using TaqMan[™] probes, as described in Section 4.5.1. The values are representative of, at least, three independent replicates. Statistical analyses were performed with a Sidak or Dunnett's multiple comparisons two-way ANOVA tests, considering as statistically significant a *p*-value < 0.05.

5. Conclusions

We have established the first human in vitro model for McArdle disease based on iPSC technology. This model can constitute the perfect platform to perform high-throughput drug screenings or drug repurposing studies, which could help to identify a therapy for McArdle disease.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232213964/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.E.G.; methodology, M.d.C.O.-C., V.C., A.M.-I., I.G.-C., C.L. and M.D.; software, C.L., M.D.; validation, C.L., M.D., A.M.-I., I.G.-C. and C.F.G.; formal analysis, M.d.C.O.-C., C.L., M.D., C.F.G. and G.G.G.; investigation, M.d.C.O.-C., V.C., A.M.-I. and I.G.-C.; resources, J.M.M., F.M., J.A., R.G. and M.E.G.; data curation, M.d.C.O.-C.; writing—original draft preparation, M.d.C.O.-C.; writing—review and editing, J.M.M., F.M. and M.E.G.; visualization, M.d.C.O.-C.; supervision, M.E.G.; project administration, M.E.G.; funding acquisition, M.E.G.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work has been funded by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII): PI15/00484, CP16/00046 and PI18/00151 to MEG and PI17/02052 to JA (co-funded by European Regional Development Fund “A way to make Europe”); PI21/00162 and CPII21/00011 co-funded by the European Union to MEG. MdCOC receives grant support from the ‘Ministerio de Educación, Cultura y Deporte’ (FPU16/03895), ‘Fundación para la Investigación Biomédica Hospital 12 de Octubre’ (2022/0065, i+12-AY20220114-1) and EMBO Grant 8917. CL and MD were recipient of a fellowship from the French Ministry of Education. The work in FM’s laboratory was funded by “Association Française contre les Myopathies” (AFM; TRIM-RD and MoThARD) and from the Excellence Initiative of Aix-Marseille University-A*Midex, a French “investissement d’avenir programme” AMX-19-IET-007 through the Marseille Maladies Rares (MarMaRa) Institute (phD fellowship to CL).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethical Committee of the “Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols”, CSIC-UAM, 406 329 1.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or supplementary material.

Acknowledgments: We thank Marta García López her experimental support in the initial stages of the project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Santalla, A.; Nogales-Gadea, G.; Ørtenblad, N.; Brull, A.; de Luna, N.; Pinós, T.; Lucía, A. McArdle disease: A unique study model in sports medicine. *Sports Med.* **2014**, *44*, 1531–1544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Migocka-Patrzałek, M.; Elias, M. Muscle glycogen phosphorylase and its functional partners in health and disease. *Cells* **2021**, *10*, 883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Taylor, R.L.; Davis, M.; Turner, E.; Brull, A.; Pinos, T.; Cabrera, M.; Nowak, K.J. Clinical utility gene card for McArdle disease. *Eur. J. Hum. Genet.* **2018**, *26*, 758–764. [[CrossRef](#)]
4. Nogales-Gadea, G.; Godfrey, R.; Santalla, A.; Coll-Cantí, J.; Pintos-Morell, G.; Pinós, T.; Arenas, J.; Martín, M.A.; Lucia, A. Genes and exercise intolerance: Insights from McArdle disease. *Physiol. Genom.* **2016**, *48*, 93–100. [[CrossRef](#)]
5. Quinlivan, R.; Buckley, J.; James, M.; Twist, A.; Ball, S.; Duno, M.; Vissing, J.; Bruno, C.; Cassandrini, D.; Roberts, M.; et al. McArdle disease: A clinical review. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2010**, *81*, 1182–1188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lucía, A.; Nogales-Gadea, G.; Pérez, M.; Martín, M.A.; Andreu, A.L.; Arenas, J. McArdle disease: What do neurologists need to know? *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2008**, *4*, 568–577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Quinlivan, R.; Martinuzzi, A.; Schoser, B. Pharmacological and nutritional treatment for McArdle disease (Glycogen Storage Disease type V). *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**, *2014*, CD003458. [[CrossRef](#)]
8. de Luna, N.; Brull, A.; Guiu, J.M.; Lucia, A.; Martín, M.A.; Arenas, J.; Martí, R.; Andreu, A.L.; Pinós, T. Sodium valproate increases glycogen phosphorylase brain isoform: Looking for a compensation mechanism in McArdle disease. *Dis. Model. Mech.* **2015**, *8*, 467–472. [[CrossRef](#)]
9. Lucía, A.; Quinlivan, R.; Wakelin, A.; Martín, M.A.; Andreu, A.L. The ‘McArdle paradox’: Exercise is a good advice for the exercise intolerant. *Br. J. Sports Med.* **2013**, *47*, 728–729. [[CrossRef](#)]
10. Angelos, S.; Valberg, S.J.; Smith, B.P.; McQuarrie, P.S.; Shanske, S.; Tsujino, S.; DiMauro, S.; Cardinet, G.H. Myophosphorylase deficiency associated with rhabdomyolysis and exercise intolerance in 6 related charolais cattle. *Muscle Nerve* **1995**, *18*, 736–740. [[CrossRef](#)]
11. Tan, P.; Allen, J.G.; Wilton, S.D.; Akkari, P.A.; Huxtable, C.R.; Laing, N.G. A splice-site mutation causing ovine McArdle’s disease. *Neuromuscul. Disord.* **1997**, *7*, 336–342. [[CrossRef](#)]

12. Nogales-Gadea, G.; Pinós, T.; Lucia, A.; Arenas, J.; Camara, Y.; Brull, A.; de Luna, N.; Martín, M.A.; Garcia-Arumí, E.; Martí, R.; et al. Knock-in mice for the R50X mutation in the PYGM gene present with McArdle disease. *Brain* **2012**, *135*, 2048–2057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Migocka-Patrzałek, M.; Lewicka, A.; Elias, M.; Daczewska, M. The effect of muscle glycogen phosphorylase (Pygm) knockdown on zebrafish morphology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2020**, *118*, 105658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Van Norman, G.A. Limitations of animal studies for predicting toxicity in clinical trials: Is it time to rethink our current approach? *JACC Basic Transl. Sci.* **2019**, *4*, 845–854. [[CrossRef](#)]
15. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872. [[CrossRef](#)]
17. Ortuño-Costela, M.D.C.; Cerrada, V.; García-López, M.; Gallardo, M.E. The challenge of bringing iPSCs to the patient. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6305. [[CrossRef](#)]
18. Liu, G.; David, B.T.; Trawczynski, M.; Fessler, R.G. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev. Rep.* **2020**, *16*, 3–32. [[CrossRef](#)]
19. Bonaventura, G.; Munafò, A.; Bellanca, C.M.; La Cognata, V.; Iemmolo, R.; Attaguile, G.A.; Di Mauro, R.; Di Benedetto, G.; Cantarella, G.; Barcellona, M.L.; et al. Stem Cells: Innovative Therapeutic Options for Neurodegenerative Diseases? *Cells* **2021**, *10*, 1992. [[CrossRef](#)]
20. Wang, Z.; Zheng, J.; Pan, R.; Chen, Y. Current status and future prospects of patient-derived induced pluripotent stem cells. *Hum. Cell* **2021**, *34*, 1601–1616. [[CrossRef](#)]
21. Kim, J.Y.; Nam, Y.; Rim, Y.A.; Ju, J.H. Review of the Current Trends in Clinical Trials Involving Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev. Rep.* **2022**, *18*, 142–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Maffioletti, S.M.; Gerli, M.F.M.; Ragazzi, M.; Dastidar, S.; Benedetti, S.; Loperfido, M.; VandenDriessche, T.; Chuah, M.K.; Tedesco, F.S. Efficient derivation and inducible differentiation of expandable skeletal myogenic cells from human ES and patient-specific iPSCs. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 941–958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Shoji, E.; Woltjen, K.; Sakurai, H. Directed Myogenic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1353*, 89–99.
24. Chal, J.; Oginuma, M.; Al Tanoury, Z.; Gobert, B.; Sumara, O.; Hick, A.; Bousson, F.; Zidouni, Y.; Mursch, C.; Moncuquet, P.; et al. Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 962–969. [[CrossRef](#)]
25. Kodaka, Y.; Rabu, G.; Asakura, A. Skeletal muscle cell induction from pluripotent stem cells. *Stem Cells Int.* **2017**, *2017*, 1376151. [[CrossRef](#)]
26. Broeders, M.; Herrero-Hernandez, P.; Ernst, M.P.T.; van der Ploeg, A.T.; Pijnappel, W.W.M.P. Sharpening the molecular scissors: Advances in gene-editing technology. *iScience* **2020**, *23*, 100789. [[CrossRef](#)]
27. Ortuño-Costela, M.d.C.; Moreno-Izquierdo, A.; Garesse, R.; Gallardo, M.E. Generation of a human iPSC line, IISHDOi002-A, with a 46, XY/47, XYY mosaicism and belonging to an African mitochondrial haplogroup. *Stem Cell Res.* **2018**, *28*, 131–135. [[CrossRef](#)]
28. Ortuño-Costela, M.d.C.; Rodríguez-Mancera, N.; García-López, M.; Zurita-Díaz, F.; Moreno-Izquierdo, A.; Lucía, A.; Martín, M.Á.; Garesse, R.; Gallardo, M.E. Establishment of a human iPSC line (IISHDOi001-A) from a patient with McArdle disease. *Stem Cell Res.* **2017**, *23*, 188–192. [[CrossRef](#)]
29. Mazaleyra, K.; Badja, C.; Broucqsa, N.; Chevalier, R.; Laberthonnière, C.; Dion, C.; Baldasseroni, L.; El-Yazidi, C.; Thomas, M.; Bachelier, R.; et al. Multilineage differentiation for formation of innervated skeletal muscle fibers from healthy and diseased human pluripotent stem cells. *Cells* **2020**, *9*, 1531. [[CrossRef](#)]
30. Buckingham, M.; Bajard, L.; Chang, T.; Daubas, P.; Hadchouel, J.; Meilhac, S.; Montarras, D.; Rocancourt, D.; Relaix, F. The formation of skeletal muscle: From somite to limb. *J. Anat.* **2003**, *202*, 59–68. [[CrossRef](#)]
31. Frontera, W.R.; Ochala, J. Skeletal muscle: A brief review of structure and function. *Behav. Genet.* **2015**, *45*, 183–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ulman, A.; Kot, M.; Skrzypek, K.; Szewczyk, B.; Majka, M. Myogenic Differentiation of iPSCs Shows Different Efficiency in Simultaneous Comparison of Protocols. *Cells* **2021**, *10*, 1671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chal, J.; Pourquié, O. Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* **2017**, *144*, 2104–2122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Selvaraj, S.; Perlingeiro, R.C.R. Induced pluripotent stem cells for neuromuscular diseases: Potential for disease modeling, drug screening, and regenerative medicine. In *Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; Volume 1–3, pp. 471–481. ISBN 9780128136997.
35. Karagiannis, P.; Takahashi, K.; Saito, M.; Yoshida, Y.; Okita, K.; Watanabe, A.; Inoue, H.; Yamashita, J.K.; Todani, M.; Nakagawa, M.; et al. Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 79–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Morgan, J.; Partridge, T. Skeletal muscle in health and disease. *Dis. Model. Mech.* **2020**, *13*, dmm042192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Bentzinger, C.F.; Wang, Y.X.; Rudnicki, M. Building muscle: Molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a008342. [[CrossRef](#)]

38. Nogami, K.; Blanc, M.; Takemura, F.; Takeda, S.; Miyagoe-Suzuki, Y. Making skeletal muscle from human pluripotent stem cells. In *Muscle Cell and Tissue—Current Status of Research Field*; InTech: Rijeka, Croatia, 2018.
39. Howell, J.M.M.C.; Walker, K.R.R.; Creed, K.E.E.; Dunton, E.; Davies, L.; Quinlivan, R.; Karpati, G. Phosphorylase re-expression, increase in the force of contraction and decreased fatigue following notexin-induced muscle damage and regeneration in the ovine model of McArdle disease. *Neuromuscul. Disord.* **2014**, *24*, 167–177. [[CrossRef](#)]
40. Krag, T.O.; Pinós, T.; Nielsen, T.L.; Brull, A.; Andreu, A.L.; Vissing, J. Differential muscle involvement in mice and humans affected by McArdle disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2016**, *75*, 441–454. [[CrossRef](#)]
41. Nogales-Gadea, G.; Consuegra-García, I.; Rubio, J.C.; Arenas, J.; Cuadros, M.; Camara, Y.; Torres-Torronteras, J.; Fiuza-Luces, C.; Lucia, A.; Martín, M.A.; et al. A transcriptomic approach to search for novel phenotypic regulators in McArdle disease. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31718. [[CrossRef](#)]
42. García-Consuegra, I.; Asensio-Peña, S.; Ballester-Lopez, A.; Francisco-Velilla, R.; Pinos, T.; Pintos-Morell, G.; Coll-Cantí, J.; González-Quintana, A.; Andreu, A.L.; Arenas, J.; et al. Missense mutations have unexpected consequences: The McArdle disease paradigm. *Hum. Mutat.* **2018**, *39*, 1338–1343. [[CrossRef](#)]
43. Nogales-Gadea, G.; Rubio, J.C.; Fernandez-Cadenas, I.; Garcia-Consuegra, I.; Lucia, A.; Cabello, A.; Garcia-Arumi, E.; Arenas, J.; Andreu, A.L.; Martín, M.A. Expression of the muscle glycogen phosphorylase gene in patients with McArdle disease: The role of nonsense-mediated mRNA decay. *Hum. Mutat.* **2008**, *29*, 277–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wang, F.; Qi, L.S. Applications of CRISPR genome engineering in cell biology. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 875–888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lentini, L.; Melfi, R.; Cancemi, P.; Pibiri, I.; Di Leonardo, A. Caffeine boosts Ataluren's readthrough activity. *Heliyon* **2019**, *5*, e01963. [[CrossRef](#)]
46. Tarrasó, G.; Real-Martinez, A.; Parés, M.; Romero-Cortadellas, L.; Puigros, L.; Moya, L.; de Luna, N.; Brull, A.; Martín, M.A.; Arenas, J.; et al. Absence of p.R50X Pygm read-through in McArdle disease cellular models. *Dis. Model. Mech.* **2019**, *12*, dmm.043281. [[CrossRef](#)]
47. Galera, T.; Zurita, F.; González-Páramos, C.; Moreno-Izquierdo, A.; Fraga, M.F.; Fernández, A.F.; Garesse, R.; Gallardo, M.E. Generation of a human iPSC line from a patient with Leigh syndrome. *Stem Cell Res.* **2016**, *16*, 63–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Galera-Monge, T.; Zurita-Díaz, F.; Garesse, R.; Gallardo, M.E. The mutation m.13513G>A impairs cardiac function, favoring a neuroectoderm commitment, in a mutant-load dependent way. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 19511–19522. [[CrossRef](#)]
49. Delourme, M.; Broucqsaault, N.; Mazaleyrat, K.; Magdinier, F. Production of Innervated Skeletal Muscle Fibers Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol. Biol.* **2022**, *2454*, 231–239. [[CrossRef](#)]
50. Concordet, J.-P.; Haessler, M. CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W242–W245. [[CrossRef](#)]
51. Brunak, S.; Engelbrecht, J.; Knudsen, S. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J. Mol. Biol.* **1991**, *220*, 49–65. [[CrossRef](#)]
52. Bruntraeger, M.; Byrne, M.; Long, K.; Bassett, A.R. Editing the genome of human induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1961*, 153–183.
53. Fuster-García, C.; García-García, G.; González-Romero, E.; Jaijo, T.; Sequedo, M.D.; Ayuso, C.; Vázquez-Manrique, R.P.; Millán, J.M.; Aller, E. USH2A gene editing using the CRISPR system. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2017**, *8*, 529–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]