



Fundació
La Marató de TV3
21º SIMPOSIUM
Enfermedades del corazón



CARDIOMIOCITOS DERIVADOS DE IPS PARA EL DAÑO Y LA REGENERACIÓN CARDÍACA

Antoni Bayés Genís

Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol

Mercè Martí Gaudes

Centre Medicina Regenerativa de Barcelona

1. Resumen

La epidemia mundial en insuficiencia cardíaca provoca una creciente necesidad de trasplantes que en la actualidad no se efectúan debido a la escasez de donaciones. El infarto de miocardio (IM) se produce después de la interrupción del suministro sanguíneo cardíaco y provoca una pérdida de músculo irreversible y la formación de una cicatriz no contráctil. Así, el proceso de autorregeneración es insuficiente después de un IM. Durante la última década los procedimientos de ingeniería de tejidos cardíaca han aparecido como una oportunidad muy avanzada para promover la regeneración de órganos enteros o de tejidos dañados localmente. En particular, esta nueva opción terapéutica se basa en la combinación de células madre con capacidad regenerativa, matrices biológicas, polímeros sintéticos biocompatibles y/o sistemas de registro en línea. En este contexto, nuestro grupo posee una muy relevante experiencia en diseño y desarrollo de prototipos de bioprótesis miocárdicas que contienen células madre. Además, algunas se han probado en modelos animales con resultados prometedores, aunque la contractilidad cardíaca y la restauración de los tejidos siguen siendo muy limitadas. Así, es necesario que se generen y se pongan a prueba nuevos injertos cardíacos con nuevos biomateriales y células precursoras más involucradas.

El presente proyecto representa un paso adelante en nuestro objetivo de desarrollar aún más los injertos cardíacos para una mayor eficiencia en la regeneración y reparación cardíaca. En particular, esperamos que haga posible abrir un enfoque completamente nuevo para la reparación cardíaca en aquellos pacientes que sufren IM que en la actualidad disponen de opciones muy agresivas o limitadas, y que pueda producir un mayor aumento de las fuerzas contráctiles y una mejor calidad de vida y una esperanza de vida más larga para dichos pacientes.

Asimismo, el desarrollo de cardiomiocitos humanos derivados de células madre pluripotentes inducidas (iPS) abre nuevas oportunidades para estudiar modelos *in vitro* de enfermedades cardíacas, realizar cribado de nuevos fármacos y diseñar nuevas formas de terapias cardíacas más específicas para estos pacientes. Los cardiomiocitos derivados de iPS pueden ser candidatos más adecuados, ya que efectúan autorrenovación y son un modelo celular altamente reproducible para el estudio de la fisiopatología y terapia de enfermedades humanas (en este caso la cardiomiopatía hipertrófica: HCM). Así, se propone crear nuevos implantes bioactivos combinando

cardiomiocitos derivados de iPS con injertos cardíacos biocompatibles, tanto en el modelo murino como en el de cerdo de IM. En particular, el objetivo principal del proyecto es la generación de cardiomiocitos derivados de iPS (iPS-CM), que podrían utilizarse para:

- 1) Analizar el valor de los cardiomiocitos derivados de iPS (iPS-CM) para la reparación cardíaca. En este contexto, tenemos previsto estimular electromecánicamente los cardiomiocitos derivados de iPS y probarlos en el modelo murino de IM o mediante una bioprótesis cardíaca de biomatriz descelularizada en el modelo porcino de IM.
- 2) Explorar el valor de los cardiomiocitos derivados de iPS (iPS-CM) en el estudio de las bases de la HCM. A tal efecto, las iPS se derivarán de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con HCM y después se diferenciarán en cardiomiocitos funcionales.

2. Resultados obtenidos

En primer lugar se generaron y caracterizaron con éxito iPS derivadas de fibroblastos dérmicos porcinos mediante un método no integrativo (Sendai Virus) con un vector que lleva los cuatro factores necesarios para la reprogramación de las células adultas, OCT4, SOX2, KLF4 y MYC. Seguidamente, las colonias p-iPS se singularizaron y se adaptaron a placas de cultivo de 6 pozos recubiertas de Matrigel. Tras la depuración del cultivo, el paso de línea y el suministro de células, iniciamos el proceso de cardiodiferenciación. En particular, se ha analizado el potencial de dos protocolos de cardiodiferenciación diferentes. Los protocolos son los basados en el uso de BMP4, activina A, ácido ascórbico y VEGF o bien CHIR99021, IWR-1 y restricción de glucosa. Siguiendo estos dos protocolos, las p-iPS no se han diferenciado completamente a linaje cardiomiogénico, ya que no hemos podido observar actividad contráctil espontánea en ninguno de los cultivos primarios tratados.

En segundo lugar, con el fin de inducir una estimulación de tipo mecánica eficiente, se dispensaron h-iPS-CM en un dispositivo de estiramiento biomimético a lo largo de 7 días. Este dispositivo, diseñado para reproducir la estimulación cíclica del corazón, ha sido fabricado con polidimetilsiloxano (PDMS) (Sylgard® 184, Dow Corning) en moldes

circulares (18 mm). Está fabricado con una membrana de silicona integrada en la superficie de una placa de cultivo de 6 pozos que contiene un orificio lateral que permite la entrada de aire. Así, la membrana está deformada y, en consecuencia, tira de la matriz celular colocada en su superficie. La estimulación concretamente es una frecuencia de 1 Hz (entrada 350 ms, salida de 650 ms). La evaluación mediante microscopía confocal mostró un aumento de expresión de troponina T cardíaca en los constructos estimulados mecánicamente en comparación con los no estimulados. Además, en el análisis mediante microscopía de transmisión electrónica, se manifestó una definición y un mayor número de estructuras sarcoméricas, así como un mayor número de uniones tipo gap en las iPS-CM estimuladas mecánicamente en comparación con las células controles o no estimuladas. En términos de expresión génica, se analizaron los genes ACTC1, CACNAC1, CONNEXIN43, cTNT, MLC2V, MYH6, MYH7 y RYR2 por qPCR utilizando tejido cardíaco humano como control. Los resultados mostraron valores incrementados de expresión de cTNT y MYH7 en condiciones de estimulación mecánica en comparación con la condición de no estimulación. Cabe señalar que los genes CACNAC1, CX43, cTNT, MYH6 y RYR2 mostraban valores del mismo orden de magnitud que el del ventrículo izquierdo humano normal. Con los resultados observados, puede concluirse que la estimulación mecánica de las iPS-CM produce un aumento de los parámetros de maduración cardíaca y, por tanto, este tipo de dispositivo puede ser útil para obtener cardiomiocitos maduros con fines terapéuticos.

A continuación se administraron iPS-CM maduras en un modelo de ratón con IM. La función cardíaca se evaluó a través de ecocardiografía basal, postinfarto y presacrificio. Un análisis más detallado no reveló diferencias significativas entre los diferentes grupos de animales respecto a los parámetros medidos de función cardíaca. Los resultados de los análisis de morfometría a partir de secciones del corazón no mostraron tampoco diferencias en cuanto a tamaño de infarto entre los distintos grupos de animales estudiados. Los análisis de la tinción de tricrómica de Masson de secciones transversales de corazones cortados corroboraron que los constructos implantados con y sin células se mantenían bien adheridos sobre el miocardio de los ratones recubriendo la cicatriz infartada. La inmunohistoquímica para detectar las células marcadas previamente con la proteína fluorescente GFP también demostró una implantación parcial de las células dentro del miocardio del huésped. Además, 30 días después del trasplante iPS-CM-GFP+, también se detectó la expresión *de novo* de alfa-

actinina y Cx43. La mayoría de iPS-CM-GFP+ exhibieron bandas Z bien organizadas, confirmando su fenotipo cardíaco. Curiosamente, en algunos animales las iPS-CM-GFP+ pudieron encontrarse dentro del tejido miocárdico del huésped; circunstancia que debe considerarse como un claro signo de migración celular desde el implante hacia el miocardio tratado.

Resulta interesante señalar el estudio realizado del potencial regenerativo de las iPS porcinas mediante el uso de una matriz tisular descelularizada en un modelo de IM en cerdo. La imagen por resonancia magnética cardíaca se realizó a 1,5 T en todos los animales mediante una bobina en superficie de 4 canales en fase. Los parámetros funcionales cardíacos y la masa necrótica miocárdica se midieron a nivel basal (antes de la inducción del infarto), dos días después del IM y previamente al sacrificio. Nuestros análisis de los parámetros de función cardíaca a lo largo del tiempo no mostraron diferencias ni tampoco hubo diferencias significativas respecto a la cantidad de masa necrótica entre los grupos de animales estudiados. El examen histopatológico del corazón y órganos periféricos confirmaron la ausencia de formación de teratomas. Además, no se encontró ninguna evidencia de p-iPS en ninguno de los constructos implantados ni en la zona de infarto ni en zonas remotas. Utilizando PCR en tiempo real, después de 30 y 90 días de seguimiento, el marcador GFP era indetectable en corazón, pulmón, ganglios, hígado, bazo, páncreas o riñón. El tamaño del infarto fue similar para todos los grupos de tratamiento. El conjunto de animales que combinaba matriz con el procedimiento quirúrgico denominado AGTP (trasposición de un *flap* de grasa cardíaca del propio receptor directamente sobre la zona infartada) mostró lo contrario, con una tendencia a un tamaño de infarto mayor que el grupo con matriz. Por otra parte, el grupo AGTP-matriz también mostró una vascularización significativamente mayor, independientemente de la presencia de p-iPS, en comparación con los otros grupos de tratamiento tanto en las zonas de infarto como en la frontera del infarto.

En tercer lugar, en cuanto a la generación de iPS-CM derivadas de cardiomiopatía hipertrófica, se obtuvieron PBMC de todos los miembros de una familia afectada por cardiomiopatía hipertrófica. Los PBMC fueron reprogramados en iPS mediante reprogramación con el virus Sendai llevando los factores OCT4, SOX2, KLF4 y MIC. Para confirmar la generación de iPS se marcaron las colonias con marcadores específicos de células madre como SSEA-4, TRA-1-60 y NANOG. Además, su

pluripotencia se evaluó mediante la formación de cuerpos embrionarios *in vitro*. Posteriormente, la cardiodiferenciación de las iPS obtenidas se realizó mediante un protocolo descrito anteriormente basado en la adición de una variedad de moléculas pequeñas (B-27, insulina, CHIR-99021 y IWR-1 endo).

En cuanto al análisis morfológico y funcional de las iPS-CM, el 90% de las células diferenciadas fueron positivas para marcadores cardíacos específicos como troponina T y alfa-actinina según estudio mediante citometría de flujo. En experimentos de inmunocitoquímica, confirmamos los niveles de troponina T cardíaca y tropomiosina I, así como la organización del sarcómero típico en las iPS-CM analizadas. Se pudieron medir también potenciales de acción de fenotipo ventricular y auricular representativos en los cultivos generados mediante la técnica denominada de *patch-clamp*. En su conjunto, estos resultados indicaron que la diferenciación de iPS hacia linaje cardiomiogénico fue positiva. Es importante destacar que las arritmias de la enfermedad se reprodujeron en forma de señales clásicas de despolarización tardía en los potenciales de acción cardíaca observados. Así, el comportamiento y el fenotipo de los CM en el contexto de la cardiomiopatía hipertrófica se han recreado *in vitro* para estudiar potencialmente genotipo y mecanismos de acción intrínsecos y para probar nuevos medicamentos.

Finalmente, aunque no estaba previsto en la propuesta original, se ha podido avanzar en el estudio de las iPS-CM generadas. En particular, hemos valorado las mutaciones genéticas potenciales en las células de algunos de los miembros de la familia, tanto asintomáticos como sintomáticos. Como resultado de esta parte del estudio, se han encontrado tres mutaciones génicas diferentes en toda la familia. Posteriormente nos hemos centrado en una de estas mutaciones, que se ha corregido mediante edición génica o tecnología CRISPR y a continuación confirmamos la normalización del registro de potencial de acción en las iPS-CM editadas o corregidas genéticamente.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Durante décadas se pensó que el corazón adulto de los mamíferos se diferenciaba de forma terminal o irreversible. Más tarde, nuestro equipo, tras detectar el destino del cromosoma Y tras trasplantes cardíacos entre individuos de diferente sexo, fue pionero

en el estudio del quimerismo cardíaco, fenómeno que implica la existencia de procesos de movilización activa de células extracardíacas (por ejemplo, de médula) dentro del miocardio del receptor. El microquimerismo fetal también se demostró en el corazón de mujeres que habían tenido a lo largo de su vida descendencia masculina. Tales descubrimientos, asimismo verificados por otros grupos, contribuyeron a cambiar el dogma existente e impulsaron definitivamente la medicina regenerativa en la lucha contra las enfermedades cardiovasculares. En este contexto, la ingeniería de tejidos cardíacos constituye una estrategia terapéutica innovadora para la regeneración del tejido miocárdico postinfarto. Estos planteamientos terapéuticos se basan en la administración de combinaciones de diferentes tipos de células madre (con gran capacidad regenerativa), matrices extracelulares de origen biológico o polímeros sintéticos biocompatibles, moléculas o factores multifuncionales (de crecimiento, diferenciación, etc.) y, en algunos casos, seguimiento en línea no invasivo electrónico y dispositivos de estimulación, preacondicionamiento o maduración celular.

En el presente proyecto, nuestras bioprótesis o constructos biocompatibles probados *in vivo* en modelos de IM muestran ciertos beneficios (en términos de revascularización) y seguridad cuando se colocan en modelos animales postinfarto (básicamente en cerdos, dada la similitud de su sistema cardiovascular). Sin embargo, hay que optimizar aún más el grado de supervivencia, diferenciación y acoplamiento eléctrico de las células implantadas. Con tal propósito, hemos logrado el preacondicionamiento o la maduración de nuestras células regenerativas utilizando cardiomiocitos humanos estimulados mecánicamente a partir de iPS (iPS-CM) antes de su implantación *in vivo*. Este enfoque induce una maduración celular más adecuada o eficaz en los constructos de TE probados, haciéndolos aún más adecuados para la regeneración y reparación cardíacas. Por ejemplo, los constructos estimulados que comprenden iPS-CM de origen humano muestran un aumento de la expresión de troponina T cardíaca y una mejor organización sarcomérica, así como un mayor número de uniones intercelulares tipo gap en comparación con los constructos no estimulados o controles. Cabe destacar que, con los resultados observados, podemos concluir que la estimulación mecánica de constructos de ingeniería tisular cardíaca bien diseñados produce un aumento del nivel de maduración cardíaca exhibido por las células regenerativas; por tanto, este tipo de estímulo puede ser útil para obtener cardiomiocitos más maduros y eficientes para terapia.

Por otra parte, las iPS han creado nuevas expectativas en el campo de la medicina regenerativa. Las iPS son células pluripotentes que evitan las restricciones éticas e inmunológicas asociadas al uso de células madre embrionarias. El desarrollo de cardiomiocitos derivados de iPS (iPS-CM) abre nuevas oportunidades para la obtención de modelos *in vitro* en el estudio de las enfermedades cardíacas, la realización de cribado de nuevos fármacos y el diseño de nuevas terapias basadas en TE más específicas para el paciente. Las iPS-CM pueden ser mejores candidatas porque efectúan autorrenovación y constituyen un modelo celular altamente reproducible para estudiar la fisiopatología cardíaca y para tratar el miocardio infartado. En el presente proyecto se han desarrollado diferentes injertos de ingeniería tisular cardíaca combinando iPS o iPS-CM con matrices biocompatibles, tanto en modelos de infarto de miocardio murino como porcino.

De forma alternativa, hemos usado iPS para la obtención de cardiomiocitos plenamente diferenciados que reproducen las mutaciones asociadas a la cardiomiopatía hipertrófica (HCM). Además, hemos podido corregir una de las mutaciones asociadas a HCM mediante edición génica o tecnología CRISPR. Como resultado, las iPS-CM corregidas normalizan sus registros de potenciales característicos. En su conjunto, ello es de una extrema complejidad porque, a través de este enfoque, pueden reducirse o simplificar organismos enteros dentro de una placa de cultivo. Es importante señalar que hemos logrado nuestro objetivo porque la derivación de iPS-CM de forma reproducible a partir de monocitos de sangre periférica, ya sea de miembros sanos o afectados de una familia de HCM, nos ha permitido comparar todas las iPS-CM generadas. Sin duda, nuestro modelo puede ser muy valioso para el estudio de los mecanismos específicos de la HCM o para nuevos medicamentos o tratamientos más eficientes contra este tipo de cardiomiopatía.

4. Bibliografía científica generada

Gálvez-Montón C, Soler-Botija C, Iborra-Egea O, Díaz-Güemes I, Martí M, Iglesias-García O, Prat-Vidal C, Crisóstomo V, Llucià-Valldeperas A, Perea-Gil I, Roura S, Sánchez-Margallo FM, Raya Á, Bayes-Genis A.

Preclinical Safety Evaluation of Allogeneic Induced Pluripotent Stem Cell-Based Therapy in a Swine Model of Myocardial Infarction.

Tissue Eng Part C Methods. 2017 Nov;23(11):736-744.

doi: 10.1089/ten.TEC.2017.0156. Factor de impacto: 4.065. Quartile 1 bioengineering, biomedical engineering and medicine.