



**Fundació**  
La Marató de TV3

21è SIMPOSIUM  
Malalties del cor



## **CARDIOMIÒCITS DERIVATS D'IPS PER AL DANY I LA REGENERACIÓ 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. Resum

L'epidèmia mundial en insuficiència cardíaca provoca una necessitat creixent de trasplantaments que actualment no es produeixen, atesa l'escassetat de donacions. L'infart de miocardi (IM) es produeix després de la interrupció del subministrament sanguini cardíac i provoca una pèrdua de múscul irreversible i la formació d'una cicatriu no contràctil. L'autoregeneració és insuficient després d'un IM. Durant l'última dècada els procediments d'enginyeria de teixits cardíaca han aparegut com una oportunitat molt avançada per promoure la regeneració d'òrgans sencers o de teixits danyats localment. Concretament, aquesta nova opció terapèutica es basa en la combinació de cèl·lules mare amb capacitat regenerativa, matrius biològiques, polímers sintètics biocompatibles i/o sistemes de registre en línia. En aquest context, el nostre grup té una experiència molt rellevant en el disseny i desenvolupament de prototips de biopròtesis miocardiàques que contenen cèl·lules mare. A més, algunes s'han provat en models animals amb resultats prometedors, però la contractilitat cardíaca i la restauració dels teixits continuen sent molt limitades. Així, cal que es generin i es posin a prova nous empelts cardíacs amb nous biomaterials i cèl·lules precursoras més implicades.

El projecte presentat representa un pas endavant en el nostre objectiu de desenvolupar encara més els empelts cardíacs perquè siguin més eficients per a la regeneració i reparació cardíaca. Particularment, esperem que això pugui obrir un enfocament completament nou per a la reparació cardíaca en aquells pacients que pateixen IM per als quals les opcions actuals són molt agressives o limitades, i que pugui produir un augment més significatiu de les forces contràctils i una millor qualitat de vida i una esperança de vida més llarga per a aquests pacients.

Així mateix, el desenvolupament de cardiomiòcits humans derivats de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPS) obre noves oportunitats per estudiar models *in vitro* de malalties cardíques, fer cribratge de nous fàrmacs i desenvolupar noves teràpies cardíques més específiques per a aquests pacients. Els cardiomiòcits derivats d'iPS poden ser candidats més adequats, ja que fan autorenovació i són un model cel·lular altament reproduïble per estudiar la fisiopatologia i teràpia de malalties humanes (en aquest cas la cardiomiopatia hipertròfica: HCM). Així, es proposa crear nous implants bioactius combinant cardiomiòcits derivats d'iPS amb empelts cardíacs biocompatibles,

tant en el model murí com en el de porc d'IM. Concretament, l'objectiu principal del projecte és la generació de cardiomiòcits derivats d'iPS (iPS-CM), que podrien utilitzar-se per:

1) Analitzar el valor dels cardiomiòcits derivats d'iPS (iPS-CM) per a la reparació cardíaca. En aquest context, tenim previst estimular electromecànicament els cardiomiòcits derivats d'iPS i provar-los en el model murí d'IM o mitjançant una biopròtesi cardíaca de biomatriu descel·lularitzada en el model porcí d'IM.

2) Explorar el valor dels cardiomiòcits derivats d'iPS (iPS-CM) en l'estudi de les bases de l'HCM. A aquest efecte, les iPS es derivaran de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) de pacients amb HCM i després es diferenciaran en cardiomiòcits funcionals.

## **2. Resultats obtinguts**

En primer lloc es van generar i caracteritzar amb èxit iPS derivades de fibroblasts dèrmics porcins mitjançant un vector de transfecció no integrador (Sendai Virus) que porta els factors OCT4, SOX2, KLF4 i MYC. Després les colònies p-iPS es van singularitzar i es van adaptar a plaques de cultiu de 6 pous recobertes de Matrigel. Després de la depuració del cultiu, el pas de línia i el subministrament de cèl·lules, vam iniciar el procés de cardiodiferenciació. En particular, s'ha analitzat el potencial de dos protocols de cardiodiferenciació diferents. Els protocols són els basats en l'ús de BMP4, activina A, àcid ascòrbic i VEGF o bé CHIR99021, IWR-1 i restricció de glucosa. Seguint aquests dos protocols, les p-iPS no s'han diferenciat completament a llinatge cardiomiogènic, ja que no hem pogut observar activitat contràctil espontània en cap dels cultius primaris tractats.

En segon lloc, amb l'objectiu d'induir estimulació mecànica eficient, es van dispensar h-iPS-CM en un dispositiu d'estirament biomimètic durant 7 dies. Aquest dispositiu, dissenyat per reproduir l'estimulació cíclica del cor, ha estat fabricat amb polidimetilsiloxà (PDMS) (Sylgard® 184, Dow Corning) en motlles circulars (18 mm). Està fabricat amb una membrana de silicona integrada a la superfície d'una placa de cultiu de 6 pous que conté un forat lateral que permet que hi entri l'aire. Així, la

membrana està deformada i, en conseqüència, estira la matriu cel·lular col·locada a la superfície. L'estimulació concretament és a una freqüència d'1 Hz (entrada 350 ms, sortida de 650 ms). L'avaluació mitjançant microscòpia confocal va mostrar un augment d'expressió de troponina T cardíaca als constructes estimulats mecànicament en comparació amb els no estimulats. A més, en l'anàlisi mitjançant microscòpia de transmissió electrònica, hi va haver una definició i un nombre més gran d'estructures sarcomèriques, així com un major nombre d'unions tipus gap en les iPS-CM estimulades mecànicament en comparació amb les controls o no estimulades. En termes d'expressió gènica, es van analitzar els gens ACTC1, CACNAC1, CONNEXIN43, cTNT, MLC2V, MYH6, MYH7 i RYR2 per qPCR utilitzant teixit cardíac humà com a control. Els resultats van mostrar valors incrementats d'expressió de cTNT i MYH7 en condicions d'estimulació mecànica en comparació amb la condició de no estimulació. Cal destacar que els gens CACNAC1, CX43, cTNT, MYH6 i RYR2 mostraven valors del mateix ordre de magnitud que el del ventricle esquerre humà normal. Amb els resultats observats, podem concloure que l'estimulació mecànica de les iPS-CM produeix un augment dels paràmetres de maduració cardíaca i, per tant, aquest tipus de dispositiu pot ser útil per obtenir cardiomiòcits madurs amb finalitats terapèutiques.

A continuació es van administrar iPS-CM madures en un model de ratolí amb IM. La funció cardíaca es va avaluar mitjançant ecocardiografia basal, postinfart i presacrifici. Una anàlisi més detallada no va revelar diferències significatives entre els diferents grups d'animals respecte dels paràmetres mesurats de funció cardíaca. Els resultats de les anàlisis de morfometria de seccions del cor no van mostrar tampoc diferències en la mida de l'infart entre els grups experimentals. Les anàlisis de la tinció de tricròmica de Masson de seccions transversals de cors tallats van corroborar que els constructes implantats amb i sense cèl·lules es mantenen ben adherits damunt del miocardi dels ratolins recobrint la cicatriu infartada. La immunohistoquímica per detectar les cèl·lules marcades prèviament amb la proteïna fluorescent GFP també va demostrar una implantació parcial de les cèl·lules dins del miocardi de l'hoste. A més, 30 dies després del trasplantament iPS-CM-GFP+, també es va detectar l'expressió *de novo* d'alfa-actinina i Cx43. La majoria d'iPS-CM-GFP+ van exhibir bandes Z ben organitzades, tot confirmant el seu fenotip cardíac. Curiosament, en alguns animals les iPS-CM-GFP+ es van poder trobar dins del teixit miocardiàc de l'hoste; fet que cal considerar com un clar signe de migració cel·lular des de l'implant cap al miocardi tractat.

Cal remarcar que es va estudiar el potencial regeneratiu de les iPS porcines a través d'una matriu tissular descel·lularitzada en un IM en porc. La imatge per ressonància magnètica cardíaca es va realitzar a 1,5 T en tots els animals mitjançant una bobina en superfície de 4 canals en fase. Els paràmetres funcionals cardíacs i la massa necròtica es van mesurar a nivell basal (abans de la inducció de l'infart), dos dies després de l'IM i just abans del sacrifici. Les nostres anàlisis dels paràmetres de funció cardíaca al llarg del temps no van mostrar diferències ni tampoc en la quantitat de massa necròtica entre grups. L'examen histopatològic del cor i òrgans perifèrics van confirmar l'absència de formació de teratomes. A més, no es va trobar cap evidència de p-iPS en cap dels constructes implantats ni a la zona d'infart ni en zones remotes. Utilitzant PCR en temps real, després de 30 i 90 dies de seguiment, el marcador GFP era indetectable al cor, pulmó, ganglis, fetge, melsa, pàncrees o ronyó. La mida de l'infart va ser similar per a tots els grups de tractament. El conjunt d'animals que combinava matriu amb AGTP (transposició d'un *flap* o penjall de greix cardíac del propi receptor directament sobre la zona infartada) va mostrar el contrari, amb una tendència a una mida d'infart més gran que el grup amb matriu. D'altra banda, el grup AGTP-matriu també va mostrar una vascularització significativament més elevada, independentment de la presència de p-iPS, en comparació amb els altres grups de tractament tant a les zones d'infart com a la frontera de l'infart.

En tercer lloc, pel que fa a la generació d'iPS-CM derivades de cardiomiopatia hipertròfica, es van obtenir PBMC de tots els membres d'una família afectada per cardiomiopatia hipertròfica. Els PBMC van ser reprogramats a iPS mitjançant reprogramació amb el virus Sendai portant els factors OCT4, SOX2, KLF4 i MIC. Per confirmar la generació d'iPS es van marcar les colònies amb marcadors específics de cèl·lules mare com SSEA-4, TRA-1-60 i NANOG. A més, la seva pluripotència es va avaluar mitjançant la formació de cossos embrionaris *in vitro*. Posteriorment la cardiodiferenciació de les iPS obtingudes es va fer mitjançant un protocol descrit anteriorment basat en l'addició d'una varietat de molècules petites (B-27, insulina, CHIR-99021 i IWR-1 endo).

Pel que fa a l'anàlisi morfològica i funcional de les iPS-CM, el 90% de les cèl·lules diferenciades van ser positives per a marcadors cardíacs específics com troponina T i alfa-actinina per citometria de flux. En experiments d'immunocitoquímica vam confirmar els nivells de troponina T cardíaca i tropomiosina I, així com l'organització

sarcomèrica típica en les iPS-CM analitzades. Els potencials d'acció representatius del fenotip ventricular i auricular també es van poder mesurar als nostres cultius mitjançant la tècnica de *patch-clamp*. En el seu conjunt, aquests resultats van indicar que la diferenciació d'iPS cap a llinatge cardiomiogènic va ser positiva. És important destacar que les arrítmies de la malaltia es van reproduir en forma de despolarització tardana en els potencials d'acció cardíaca observats. Així, el comportament i el fenotip dels CM en el context de la cardiomiopatia hipertròfica s'han recreat *in vitro* per estudiar potencialment genotip i mecanismes d'acció intrínsecs i per provar nous medicaments.

Finalment, tot i que no estava previst a la proposta original, hem avançat més aprofitant les iPS-CM generades. Especialment, hem valorat mutacions genètiques potencials en alguns membres de la família. Com a resultat, s'han trobat tres mutacions genètiques diferents a tota la família. Posteriorment ens hem centrat en una d'aquestes mutacions, que s'ha corregit mitjançant edició genètica o tecnologia CRISPR i, després, hem confirmat la normalització del registre de potencial d'acció en les iPS-CM editades o corregides genèticament.

### **3. Rellevància i possibles implicacions futures**

Durant dècades es va pensar que el cor adult dels mamífers es diferenciava definitivament. Més tard, el nostre equip, després de detectar el destí del cromosoma Y en els trasplantaments cardíacs entre individus de diferent sexe, va ser pioner en l'estudi del quimerisme cardíac, fenomen que implica la mobilització de cèl·lules extracardíaques (per exemple, de la medul·la) dins del miocardi del receptor. El microquimerisme fetal també es va demostrar en el cor de dones amb descendència masculina. Aquests descobriments, que van ser verificats per altres grups, van contribuir a canviar el dogma existent i van impulsar la medicina regenerativa contra les malalties cardiovasculars. En aquest context, l'enginyeria de teixits cardíaca és una estratègia terapèutica innovadora per a la regeneració del teixit miocardiàc postinfart. Aquests plantejaments terapèutics es basen en l'administració de combinacions de diferents tipus de cèl·lules mare (amb gran capacitat regenerativa), matrius extracel·lulars d'origen biològic o polímers sintètics biocompatibles, molècules o factors multifuncionals (de creixement, diferenciació, etc.) i, en alguns casos, seguiment en

línia no invasiu electrònic i dispositius estimuladors o de preconditionament o maduració cel·lular.

En aquest projecte les nostres biopròtesis o constructes biocompatibles provats mostren certs beneficis (en termes de revascularització) i seguretat quan es col·loquen en models animals postinfart (bàsicament en porcs, atenent a la similitud del seu sistema cardiovascular). Tanmateix, cal optimitzar encara més el grau de supervivència, diferenciació i acoblament elèctric de les cèl·lules implantades. Per a aquest propòsit, hem aconseguit el preconditionament o la maduració de les nostres cèl·lules regeneratives utilitzant cardiomiòcits humans estimulats mecànicament a partir d'íPS (iPS-CM) abans de la seva implantació *in vivo*. Aquest enfocament indueix una maduració cel·lular més adequada o eficaç en els constructes de TE provats, tot fent-los encara més adequats per a la regeneració i reparació cardíques. Per exemple, els constructes estimulats que comprenen iPS-CM mostren un augment de l'expressió de troponina T cardíaca i una millor organització sarcomèrica, així com un nombre més gran d'unions intercel·lulars tipus gap en comparació amb els constructes no estimulats o controls. Cal destacar que, amb els resultats observats, podem concloure que l'estimulació mecànica de constructes de TE ben dissenyats produeix un augment del nivell de maduració cardíaca exhibit per les cèl·lules regeneratives; per tant, aquest tipus d'estímul pot ser útil per obtenir cardiomiòcits més madurs i eficients per a teràpia.

D'altra banda, les iPS han creat noves expectatives en el camp de la medicina regenerativa. Les iPS són cèl·lules pluripotencials que eviten les restriccions ètiques i immunològiques associades a l'ús de cèl·lules mare embrionàries. El desenvolupament de cardiomiòcits derivats d'íPS (iPS-CM) obre noves oportunitats per obtenir models *in vitro* per estudiar les malalties cardíques, fer cribratge de nous fàrmacs i dissenyar noves teràpies basades en TE més específiques per al pacient. Les iPS-CM poden ser millors candidats perquè fan autorenovació i són un model cel·lular altament reproduïble per estudiar la fisiopatologia cardíaca i per tractar el miocardi infartat. En aquest projecte hem desenvolupat diversos empelts d'enginyeria tissular cardíaca combinant iPS o iPS-CM amb matrius biocompatibles, tant en models d'infart de miocardi murí com porcí.

De manera alternativa, hem utilitzat iPS per obtenir cardiomiòcits plenament diferenciats que reproduïen les mutacions associades a la cardiomiopatia hipertròfica (HCM). A més, hem pogut corregir una de les mutacions associades a l'HCM mitjançant edició gènica o tecnologia CRISPR. Com a resultat, les iPS-CM corregides normalitzen els seus registres de potencials característics. En conjunt, això és d'una complexitat extrema pel fet que, mitjançant aquest enfocament, es poden reduir o simplificar organismes sencers dins d'una placa de cultiu. És important destacar que hem aconseguit el nostre objectiu perquè la derivació d'iPS-CM de forma reproduïble a partir de monòcits de sang perifèrica, ja sigui de membres sans o afectats d'una família de HCM, ens ha permès comparar totes les iPS-CM generades. Sens dubte, el nostre model pot ser molt valuós per estudiar els mecanismes específics de l'HCM o trobar nous medicaments o tractaments més eficients contra aquest tipus de cardiomiopatia.

#### **4. Bibliografia 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 d'impacte: 4.065. Quartile 1 bioengineering, biomedical engineering and medicine.