

Cardiomiocitos derivados de células pluripotentes inducidas (hiPSC-CM) con progerina inducible para estudiar envejecimiento cardiaco.

Elisa Garrido Huéscar^{1,2}, Lauran Vandeweyer³, Laura García-Mendivil^{1,2}, Natalia Hernández-Bellido^{1,2}, Esther Pueyo^{1,2,4}, Winnok H. De Vos³ and Laura Ordovás^{1,2,5}

¹ Biomedical Signal Interpretation and Computational Simulation (BSICoS), Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A) – Universidad de Zaragoza, Mariano Esquillor s/n, 50018, Zaragoza, Spain

² BSICoS, IIS Aragón, 50009, Zaragoza, Spain

Tel. +34-876 55 43 32, e-mail: elisagarrido18@unizar.es

³ Lab Cell Biology and Histology & Antwerp Centre for Advanced Microscopy, Universiteit Antwerpen, Universiteitsplein 1, 2610 Wilrijk, Belgium

⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)

⁵ Fundación ARAID, Gobierno de Aragón, 50018, Zaragoza, Spain

Resumen

Las bases moleculares del envejecimiento cardiaco no se conocen en profundidad. Los hiPSC-CM son una herramienta útil para este tipo de estudios, pero presentan un fenotipo inmaduro. En este estudio, proponemos una estrategia de maduración y definimos las condiciones de inducción de progerina para el posterior estudio del envejecimiento *in vitro*.

Introducción

El envejecimiento es uno de los mayores factores de riesgo para la enfermedad cardiaca. Sin embargo, las bases moleculares que lo provocan no se conocen en humanos, debido sobre todo a la falta de modelos relevantes.

Los pacientes que padecen el Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford, tienen una mutación en el gen *LMNA* la cual da lugar a una variante tóxica de la lamina A llamada progerina. La acumulación de progerina en la lámina del núcleo celular provoca envejecimiento acelerado en los pacientes, con defectos en el sistema cardiovascular similares a los observados en el envejecimiento natural (Scaffidi, Misteli 2006).

Por tanto, el objetivo de este trabajo es aprovechar este envejecimiento acelerado que provoca la progerina para establecer un modelo celular de envejecimiento inducible humano. Para ello, primero perseguimos obtener un estadio maduro de cardiomiocitos que sean capaces de mimetizar el proceso de una manera más fiel.

Métodos

Se ha generado una línea de hiPSC con un sistema de expresión inducible de progerina mediante la adición de doxiciclina al medio para la expresión controlada en el locus *AAVS1* (Ordovás et al. 2015). Además, se ha desarrollado una estrategia de maduración de hiPSC-CM multifactorial para que el modelo sea consistente y lo más representativo posible.

Se han empleado técnicas de fenotipado avanzado (De Vos et al. 2010) mediante el uso de microscopía de alto contenido y PCR cuantitativa (qPCR) para evaluar tanto el estado de maduración como las condiciones ideales de inducción de progerina para conseguir el envejecimiento acelerado.

Resultados.

Fenotipado de la estrategia de maduración.

Mediante qPCR, se ha analizado la expresión de genes relacionados con diferentes funciones de los cardiomiocitos (Figura 1). La combinación de estimulación hormonal (MM) con cambios en el estado de la heterocromatina (PiC) muestra cierto efecto sinérgico en el aumento de expresión de genes implicados en la transiente de calcio (*SERCA2A*, *PLN*) función sarcomérica (*MYH6*, *MCLV2*) y en los codificantes para canales iónicos implicados en la repolarización cardiaca (*KCNH2*, *KCNJ2*). Las modificaciones en la dureza de la superficie de cultivo sin embargo (PDMS), no parecen tener impacto en la expresión de los genes estudiados.

El análisis de imagen apoya esta sinergia, ya que se observa un aumento de la población de células positivas en el marcador de maduración TNNI3 y con

disminución del marcador fetal cardíaco TNNI1, así como hipertrofia celular (Figura 2). De forma cualitativa, se puede apreciar también un aumento en la organización de los sarcómeros en esta condición.

Establecimiento de las condiciones de inducción en hiPSC-CM inmaduros.

El análisis de imagen muestra que 15 días de inducción son necesarios para obtener un porcentaje de hiPSC-CM positivos en progerina del 33%. Además, se ha visto que el aumento de la dosis de doxiciclina no varía de forma significativa este porcentaje, aunque sí aumenta la intensidad de la señal.

Conclusiones

El medio de maduración parece conseguir mejoras tanto en la estructura sarcomérica como en la expresión de genes implicados en la electrofisiología y en el manejo del calcio de los cardiomiocitos, aunque la variabilidad entre replicados biológicos observada en algunos marcadores pone de manifiesto la necesidad de ampliar la muestra en el estudio.

En cuanto a la inducción de envejecimiento acelerado, la línea celular es capaz de inducir la expresión de progerina, aunque en un porcentaje subóptimo. Dosis más altas de doxiciclina parecen aumentar la expresión de la proteína, pero la prolongación del tiempo podría ser también necesaria.

Además, aunque muchos marcadores relacionados con el envejecimiento se han optimizado, hace falta un estudio más intensivo para caracterizar el efecto de la progerina en los hiPSC-CM.

- [1]. REFERENCIASSCAFFIDI, P and MISTELI, T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*. (80-.). 312, 1059–1063 (2006).
- [2]. ORDOVÁS, L, BOON, R, PISTONI, M, CHEN, Y, WOLFS, E, GUO, W, SAMBATHKUMAR, R,

BOBIS-WOZOWICZ, S, HELSEN, N, VANHOVE, J, BERCKMANS, P, CAI, Q, VANUYTSEL, K, EGGERMONT, K, VANSLEMBROUCK, V, SCHMIDT, BZ., RAITANO, S, VAN DEN BOSCH, L, NAHMIAS, Y, CATHOMEN, T, STRUYS, T and VERFAILLIE, C M., 2015. Efficient recombinase-mediated cassette exchange in hPSCs to study the hepatocyte lineage reveals AAVS1 locus-mediated transgene inhibition. *Stem Cell Reports*. 2015. Vol. 5, n

- [3]. DE VOS, W. H., VAN NESTE, L., DIERIKS, B., JOSS, G. H. and VAN OOSTVELDT, P., 2010. High content image cytometry in the context of subnuclear organization. *Cytometry Part A*. 2010. Vol. 77, no. 1, pp. 64–75. DOI 10.1002/cyto.a.20807o. 5, pp. 918–931. DOI 10.1016/j.stemcr.2015.09.004

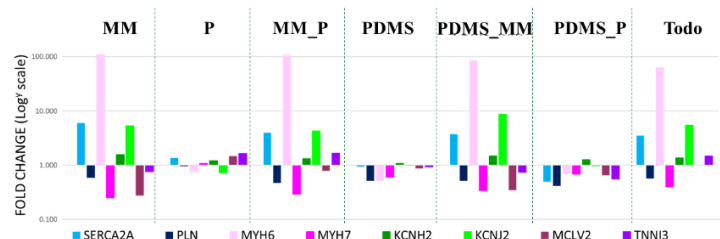


Figura 1. Análisis de expresión génica. 3 replicados técnicos. 2 replicados biológicos

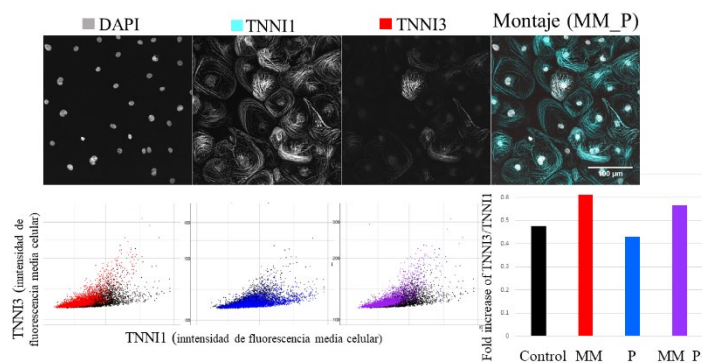


Figura 2. Análisis de imagen de alto contenido. 5 replicados técnicos, 2 replicados biológicos