



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Evaluación de los procesos involucrados en el arresto y re-ingreso al ciclo celular en cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes, con el fin de generar un protocolo de expansión de las mismas.

Tesis presentada para optar al título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el Área Química Biológica

Natalia Lucía Santín Velazque

Director de tesis: Dr. Santiago G. Miriuka

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Cánepa

Lugar de trabajo: Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI)

Buenos Aires, 2023

Evaluación de los procesos involucrados en el arresto y re-ingreso al ciclo celular en cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes, con el fin de generar un protocolo de expansión de las mismas.

En el corazón humano, poco después del nacimiento, los cardiomiocitos (CM) se someten a una última ronda de división seguida de un escape del ciclo celular. De aquí que, las células de este órgano tienen poca capacidad regenerativa después del daño miocárdico debido al bajo potencial de proliferación de los cardiomiocitos. Dado que existe la posibilidad de generar *in vitro* células madre pluripotentes inducidas (iPSC), a partir de células adultas, transfectando genes cruciales para el mantenimiento de la pluripotencia y que estas poseen la capacidad de diferenciarse a las tres capas germinales, se pueden producir *in vitro* células a medida, con posibilidades nulas de rechazo. Así, es posible generar cardiomiocitos derivados de iPSC (CM-iPSC), los cuales poseen actividad contráctil espontánea y pueden generar potenciales de acción como una célula cardíaca. Estos desarrollos en conjunto, conducen a un interés creciente en la producción de iPSC-CM humanos como una estrategia potencialmente prometedora para las terapias regenerativas. *In vitro*, los CM-iPSC salen del ciclo celular como lo hacen los cardiomiocitos *in vivo*. Esto puede ser un inconveniente al momento de pretender lograr una gran masa de células cardíacas como la que se necesitaría para hacer un implante en un tejido humano, ya que puede implicar la utilización de un número importante de iPSC como punto de partida.

Se plantea como hipótesis de esta tesis que es posible incrementar el número de células cardíacas que pueden ser obtenidas en cultivo a partir de iPSC si se manipula la salida del ciclo celular. Para poner a prueba esta hipótesis se propone el estudio de diferentes estrategias moduladoras del ciclo celular en CM-iPSC humanos. Para ello se puso a punto un protocolo de diferenciación cardíaca en monocapa y se desarrollaron líneas celulares reporteras que permitieron el estudio del ciclo celular. En función de la bibliografía estudiada y de los ensayos realizados previamente en el grupo de investigación, se seleccionaron tres metodologías para evaluar la influencia de estas sobre el ciclo celular de los CM-iPSC. Se estudió el efecto producido por el tratamiento con: FGFa, SB203580 (inhibidor de p38), miR520a y medio condicionado por células mesenquimales (MSC). Además se evaluó la posibilidad de criopreservar y mantener una línea de CM-iPSC durante múltiples pasajes.

Se observó aumento de la proliferación de CM-iPSC con el tratamiento con miR520a-mimic y se estudiaron los genes target regulados por el miR-520. Al evaluar el efecto del medio condicionado por MSC de cordón umbilical humano (WJ-MSC, Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells) se observó un aumento de la proliferación celular y por medio del estudio de la proteómica de este medio se plantea que este efecto podría estar relacionado las vías de Hippo, Hif-1 y Pi3K-Akt.

Por último, se estudió el efecto sobre el ciclo celular de los CM-iPSC luego de criopreservar y resembrar las células. A las 24 hs se observa un aumento de la proliferación celular, la cual se ve disminuida a la semana. Fue posible congelar en nitrógeno líquido los CM-iPSC, descongelarlos y mantenerlos en cultivo. Además se pudieron volver a sembrar los CM-iPSC múltiples veces, pero a partir del día 70 los pasajes son menos eficientes ya que se observa un aumento de la muerte celular. Con el fin de estudiar cuáles son las vías efectoras del aumento del ciclo celular en los cardiomiocitos resembrados, se evaluó la expresión del ARNm por medio de ARN-seq. Interesantemente, se observó genes relacionados con la vía de PI3K-Akt y la vía de Hippo, las cuales han sido reportadas previamente relacionadas con el ciclo celular.

Palabras clave: Células madre pluripotentes inducidas, Cardiomiocitos derivados de iPSC, Ciclo celular, proliferación.

Evaluation of the processes involved in the arrest and re-entry into the cell cycle in cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells, in order to generate a protocol for their expansion.

In the human heart, shortly after birth, cardiomyocytes (CMs) undergo a final round of division followed by an escape from the cell cycle. Therefore, the cells of this organ have little regenerative capacity after myocardial damage due to the low proliferation potential of cardiomyocytes. There is the possibility of generating induced pluripotent stem cells (iPSC) in vitro, from adult cells, transfecting crucial genes for the maintenance of pluripotency and these cells have the ability to differentiate into the three germ layers. Custom cells can be produced in vitro, with zero chance of rejection. Thus, it is possible to generate iPSC-derived cardiomyocytes (CM-iPSC), which have spontaneous contractile activity and can generate action potentials like a cardiac cell. Together, these developments lead to a growing interest in the production of human CM-iPSC as a potentially promising strategy for regenerative therapies, and in identifying factors playing relevant roles in the regulation of the hiPSC-CMs cell cycle. In vitro, CM-iPSCs exit the cell cycle as cardiomyocytes do in vivo. This can be a drawback when attempting to achieve a large mass of cardiac cells such as would be needed to make an implant in human tissue, since it may imply the use of a significant number of iPSCs as a starting point.

It is proposed as a hypothesis of this thesis that it is possible to increase the number of cardiac cells that can be obtained in culture from iPSCs if the exit of the cell cycle is manipulated. To test this hypothesis, we propose the study of different cell cycle modulating strategies in human CM-iPSC. To this end, a monolayer cardiac differentiation protocol was developed and reporter cell lines were generated that allowed the study of the cell cycle.

Based on the bibliography studied and the tests previously carried out in the research group, three methodologies were selected to evaluate their influence on the cell cycle of the CM-iPSC. We studied the effect produced by treatment with FGFa, p38 MAP kinase (SB203580), a mimic of microRNA miR520a and medium conditioned by mesenchymal stem cells (MSC). In addition, the possibility of cryopreserving and maintaining human CM-iPSC line during multiple passages was evaluated.

Increased proliferation of CM-iPSC was observed with treatment with miR520a-mimic and target genes regulated by miR-520 were studied. When evaluating the effect of the conditioned media by human umbilical cord MSC (WJ-MSC), an increase in cell proliferation was observed. Through

the study of the proteomics of this media it is suggested that this effect could be related to the pathways of Hippo, Hif-1 and Pi3K-Akt.

Finally, the effect on the cell cycle of CM-iPSCs after cryopreserving and re-seeding the cells are studied. At 24 hours an increase in cell proliferation is observed, which is diminished after a week. It is possible to freeze CM-iPSCs in liquid nitrogen, thaw them and maintain them in culture. In addition, the CM-iPSCs could be reseeded multiple times, but from day 70 the passages are less efficient since an increase in cell death is observed. In order to study which are the effector pathways of the increase in the cell cycle in reseeded cardiomyocytes, the expression of mRNA was evaluated by means of RNA-seq Interestingly, genes related to the PI3K-Akt pathway, the Hippo pathway , which have been previously reported related to the cell cycle.

Key words: Induced pluripotent stem cells, iPSC derived cardiomyocytes, cell cycle, proliferation

ÍNDICE

Abreviaturas	6
1. Introducción	8
1.1 Células madre.	8
1.2 Aplicaciones de iPSC en terapias regenerativas.	11
1.3 Diferenciación cardíaca	13
1.4 Proliferación en cardiomiocitos	19
1.4.1 Crecimiento cardíaco y proliferación celular	19
1.4.2 Proteínas involucradas en el ciclo celular cardíaco	21
1.4.3 Señales activadoras del ciclo celular de cardiomiocitos	24
1.6 MicroARN	26
1.7 Células madre mesenquimales	27
2. Hipótesis y Objetivos	29
3. Resultados	30
Capítulo 1: Herramientas de biología celular	30
3.1.1 Puesta a punto del protocolo del Kit de diferenciación cardíaca de Gibco.	31
3.1.2 Protocolo de diferenciación cardíaca a partir de cuerpos embrioides.	32
3.1.3 Diferenciación cardíaca partiendo de un cultivo en monocapa	35
3.1.4 Construcción de una línea FUCCI-iPSC	39
3.1.5 Conclusión	41
Capítulo 2: Ciclo celular durante la diferenciación cardíaca	42
3.2.1 Caracterización del ciclo celular cardíaco	42
3.2.2 Conclusiones	45
Capítulo 3: Estrategias para el aumento de la proliferación de CM-iPSC	46
3.3.1 Evaluación de los efectos producidos por la inhibición de p38 y el tratamiento con FGFa	46
3.3.2 Estudio del ciclo celular de CM-iPSC por el tratamiento con el mimic mir-520a	49
3.3.3 Estrategia con Células madre mesenquimales humanas	60
3.3.4 Estudio del efecto del resembrado de CM-iPSC humanos	69
3.3.5 Conclusión y comparación entre los distintos métodos	87
4. Discusión	89
5. Materiales y métodos	95
5.1 Líneas celulares	95
5.2 Co-cultivo de CMEh sobre MEFi	96
5.3 Cultivo de células embrionarias e iPSC libre de derivados animales	96
5.4 Cultivo de células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical humano	97
5.5 Criopreservación celular	98
5.6 Protocolo de diferenciación cardíaca utilizando “PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit” de Gibco	98
5.7 Protocolo de diferenciación cardíaca a partir de formación de cuerpos embrioides	98
5.8 Protocolo de diferenciación cardíaca en monocapa	99
5.9 Criopreservación de CM-iPSC	100
5.10 Protocolo de pasaje de CM-iPSC	100

5.11 Extracción de ADN genómico	101
5.12 Evaluación de contaminación por Mycoplasma	101
5.13 Extracción de ARN	101
5.14 Retrotranscripción	102
5.15 RT-qPCR	103
5.16 Ensayo de proliferación con el kit Click-iT EdU por citometría de flujo	104
5.17 Citometría de flujo	105
5.18 Inmunofluorescencia	106
5.19 Ensayo de proliferación con el kit Click-iT EdU por inmunofluorescencia	107
5.20 Generación líneas Fucci-iPSC	107
5.21 Análisis de imágenes	108
5.22 Análisis estadísticos	109
5.23 Transfección con pequeñas moléculas comerciales de ARN	109
5.24 Análisis Ago-IP	110
5.25 Incubación con factores e inhibidores	111
5.26 Proteómica-Exactas	111
5.27 Proteómica análisis	111
5.28 Preparación de muestras para secuenciar	112
5.29 Secuenciación	112
6. Bibliografía	113

Agradecimientos

A la UBA, a Conicet y a Fleni, por brindarme los saberes, el espacio, el dinero para poder hacer posible la ciencia argentina.

A Santiago y a Gustavo por darme la oportunidad de crecer e investigar en un gran laboratorio, por darme la libertad para hacerme preguntas y ponerlas a prueba.

A Dario y Leo por enseñarme a trabajar en cultivo, a Willy por pasarme el ministerio del citómetro, a Xime, Gaby y Fer por enseñarme a trabajar con los cardiomiocitos. A Celi, Sole, Caro, Guada, Alan, Anto, Clari, Sofi por las charlas y mates compartidos en la sala de becarios. A Vero, Lu, Ale, Ari por ayudarme a pensar los ensayos y las posibles preguntas.

A Agus por las mañanas compartidas de discusiones de ensayos, de resultados o de posibles líneas de investigación, hipótesis sin fundamentos, papers, entre otras anécdotas de la vida.

A mamá y papá por darme las herramientas en la vida para poder creer en mis sueños y dejarme perseguirlos. Por ser el soporte de los primeros escalones de mi formación.

A Juan, por sostenerme durante todos estos años de doctorado, por escucharme, por alentarme, por seguir creyendo en esta vida juntos. Por los mates, los masajes, los viajes, por el sacrificio extra estas últimas horas.

A Mile por aguantar a una mamá que ama la ciencia y que por eso pasaba horas de los 7 días de la semana en el laboratorio. Por acompañarme desde el principio en la aventura del doctorado, pero principalmente por soportar estas noches de escritura de tesis en las que no podía leerle su cuento de las noches.

A Lilo por no haber tenido una mamá disponible al 100% durante sus primeros días de vida.

A la Lu de 18 años que se animó a enviar una carta, hablando de las mariposas en la panza producto de la investigación y la curiosidad, para ingresar a su primer laboratorio. A esa Lu que soñó desde chica con esto, con hacer ciencia, con enamorarse del conocimiento y las preguntas de la vida.

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

AME: Atrofia muscular espinal

ARN: Ácido ribonucleico

FGF: Fibroblast Growth Factor

BMP4: Bone Marrow Factor 4

BSA: Seroalbúmina Bovina

CME: Células Madre Embrionarias

CMP: Células Madre Pluripotentes

CTNT: Cardio Troponina T

dNTPS: desoxi-ribonucleótidos-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EB: Cuerpos embrioides, del inglés *Embryoid Bodies*

eGFP: enhanced Green Fluorescence Protein

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

Fw: *Primer Forward*

GSK3: Glucógeno-Sintetasa Quinasa 3

iPSC: Células Madre Pluripotentes inducidas (del inglés: *induced Pluripotent Stem Cells*)

iROCK: Inhibidor de Rho quinasa

KSR: *KnockOut™ Serum Replacement*

LP: Lisado de plaquetas

mARN: Acido Ribonucleico mensajero

MEF: Fibroblastos Embrionarios de Ratón

MEFi: Fibroblastos Embrionarios de Ratón, irradiados

miRNA: micro ARN

MSC: Células Madre Mesenquimales (del inglés: *Mesenchymal Stem Cells*)

mw24: Placa de cultivo de 24 pocillos

ON: over night

ORA: *Over Representation Analysis*

PBS: Buffer Fosfato Salino

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PFA: Paraformaldehído

piARN: ARNs asociados a Piwi

RPMI: medio *Roswell Park Memorial Institute*

RNA-seq: Secuenciación de ARN

RT-qPCR: *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*

Rv: *Primer Reverse*

SFB: Suero Fetal Bovino

siARN: *small interfering RNA*

VE: Vesículas Extracelulares

WJ-MSC: Células Madre Mesenquimales de gelatina de Warthon

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Células madre.

Las células madre pluripotentes (CMP) comprenden dos tipos de células madre: las derivadas de la masa interna del blastocisto, denominadas células madre embrionarias (CME) y las células pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés *induced Pluripotent Stem Cells*). Las CME humanas fueron aisladas por primera vez en el año 1994 (Bongso y col., 1994) y luego establecidas como línea celular en 1998, por Thomson y colaboradores. El desarrollo de un embrión comienza con la fertilización de un óvulo, resultando en la formación de un cigoto. De aquí, por sucesivas divisiones celulares, el cigoto llega al estado de mórula (4–16 células), una vez que llega al útero se forma una cavidad central con un fluido que se denomina blastocele. En este estadio de desarrollo el embrión pasa a ser llamado blastocisto, con entre 40 y 150 células. Las células de la parte externa del blastocisto forman el trofoblasto y las células de la parte interna forman la masa celular interna o embrioblasto. Esta masa celular interna forma un embrión compuesto por el epiblasto contiguo al trofoblasto y el hipoblasto adyacente a la cavidad del blastocisto. El epiblasto da origen a las tres capas germinales, el ectodermo, el mesodermo y el endodermo. Dado que las CME se originan de la masa celular interna, estas células son pluripotentes por naturaleza.

Se han identificado distintos tipos de células madre: las células madre embrionarias tempranas que se generan a partir de la separación del cigoto luego de la formación del blastocisto y que son totipotentes por lo cual pueden originar cualquier tipo celular del cuerpo; las células madres embrionarias del blastocisto que se forman a partir de la masa celular interna son pluripotentes, es decir que dan lugar a las tres capas germinales. Luego están las células madre fetales, pluripotentes, responsables del desarrollo inicial de los tejidos. Las células madre del cordón umbilical, multipotentes, que se originan de la sangre del cordón umbilical y que tienen la información genética del bebé. Por otro lado, también se encontraron células madres adultas, multipotentes, en órganos desarrollados como médula ósea, sangre periférica, músculo, hueso o piel (Biswas y Hutchins, 2007 y Cable y col., 2020)

Estas células cultivadas in vitro presentan dos características fundamentales: capacidad ilimitada de replicación (autorenovación) y capacidad de diferenciación a las tres capas germinales

(ectodermo, mesodermo y endodermo), y por lo tanto, a todo tipo celular con un fenotipo adulto. Esta capacidad de autorenovación se puede observar en la formación de tumores llamados teratomas al inyectar las CME en ratones inmunodeficientes, compuestos de masas celulares que dan lugar a las tres capas germinales, endodermo, mesodermo y ectodermo. Las CME también tienen una alta actividad de telomerasa, lo cual les confiere la capacidad de ser mantenidas durante muchos pasajes en cultivo. Inicialmente, las CME eran mantenidas en cultivo por tiempos prolongados preservando sus características de pluripotencia mediante el co-cultivo con MEFi (del inglés, *Murine Embryonic Fibroblasts inactivated*) suplementado con b-FGF (Amit y col., 2000). Luego, gracias al avance en el campo de las células madre, fue posible cultivar las células sin perder su estado de indiferenciación en medios condicionados por MEFi y sobre coatings de matrigel o laminina (Xu y col., 2001). Posteriormente, se desarrollaron medios definidos químicamente que poseen los factores necesarios para el cultivo de las células en condiciones libres de MEFi (Chen y col., 2011). Sin embargo, los estudios en CME humanas con fines de aplicaciones clínicas fueron restringidos por cuestiones éticas por las fuentes celulares y el rechazo inmunológico para terapia celular. Aunque la mayoría de los debates sobre ética se concentran en la moralidad de destruir embriones humanos en beneficio de otras personas.

Con estos estudios, primeramente, se observaron factores de transcripción capaces de mantener la pluripotencia en CME de ratón, como Oct4 (Niwa y col., 2000; Shi y Jin, 2010), Sox2 (Avilion y col, 2003), y Nanog (Chambers y col., 2003). Con estos trabajos, más los datos sobre genes frecuentemente upregulados en tumores que contribuyen al mantenimiento del fenotipo de las CME, favoreciendo la proliferación de las células en cultivo, como c-myc (Cartwright y col., 2005), Klf4 (Li y col., 2005), y β -catenina (Kielman y col., 2002).

Años más tarde, el grupo de Shinya Yamanaka (Premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año 2012), describió el procedimiento por el cual se puede reprogramar una célula adulta, el cual consiste en introducir información genética de algunos factores de transcripción (Oct4, Sox2, c-myc y Klf-4). Estos son conocidos como los cuatro factores de Yamanaka, los cuales fueron probados primero en la generación de iPSC murinas y luego en humanas (Takahashi y Yamanaka, 2006 y Takahashi y col., 2007). Estas iPSC son capaces de diferenciarse posteriormente a otros linajes adultos, los cuales pueden no estar relacionados con el tejido del cual fue originalmente derivado. Luego de estos descubrimientos, rápidamente se avanzó en el tema debido a la trascendencia del mismo, ya que se podría producir in vitro células a medida, con posibilidades nulas de rechazo, lo cual podría resultar en un gran avance en la medicina regenerativa.

Desde que Yamanaka estableció la primera línea de iPSC en 2006, la comunidad científica ha trabajado en mejorar la seguridad y la eficiencia del proceso de reprogramación, incluyendo las transfecciones transitorias únicas (Si-Tayeb y col., 2010) y múltiples (Okita y col., 2008), vectores no integrantes (Yu y col., 2009), vectores extirpables (Lacoste y col., 2009), transducción directa de proteínas (Kim D. y col., 2009), virus Sendai basados en ARN (SeV) (Nishimura y col., 2010), suministro de factor de transcripción basado en ARNm (Warren y col., 2010), transfecciones de microARN (Maehr y col., 2009) y el uso de compuestos químicos (Desponts y Ding, 2010; Li y Ding, 2010).

A partir de la investigación en iPSC se desarrollaron distintas estrategias de diferenciación celular in vitro. Inicialmente, los protocolos de diferenciación se basaban en cultivar las CMEh como agregados celulares, conocidos como cuerpos embrioides o EB (del inglés *Embryoid Bodies*). Estos EB son crecidos en suspensión durante varios días en medios suplementados con suero fetal bovino. Estas condiciones de cultivo recrean la formación de un teratoma in vitro y se pueden identificar tipos celulares de los tres linajes dérmicos. Luego se han desarrollado protocolos de diferenciación específica a los distintos linajes (Figura 1.1):

- Ectodermo: Neuronas (Chambers y col., 2019), Astroцитos (Shaltouki y col., 2013), Oligodendrocitos (Douvaras y col., 2014), Células del epitelio renal (RPE), Epidermo, queratinocitos.
- Endodermo: Hepatocito (Si-Tayeb y col., 2010), Células del islote β -pancreático (Zhang y col., 2019), Células del epitelio intestinal, células alveolares pulmonares (Huang y col., 2014).
- Mesodermo: Células Hematopoyéticas, Células endoteliales, Cardiomiocitos (Burridge y col., 2014), Células del músculo liso (Patsch y col., 2015) y músculo esquelético (Maffioletti y col., 2015), Células renales, Adipocitos, Condrocitos y Osteocitos.

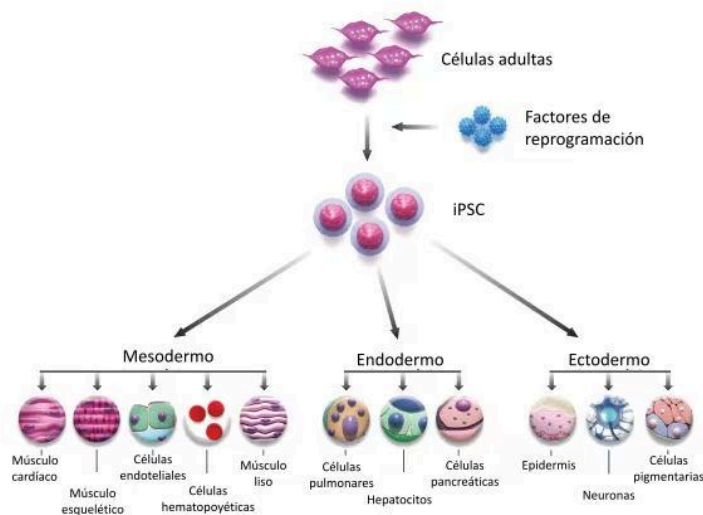


Figura 1.1. Proceso de reprogramación y capacidad pluripotente de las iPSC. Las iPSC se pueden obtener a partir de células adultas por medio de la inserción de factores de reprogramación. Luego, las iPSC pueden diferenciarse a distintos tipos celulares provenientes de las tres capas germinales.

1.2 Aplicaciones de iPSC en terapias regenerativas.

Las iPSC representan una herramienta con mucho potencial en diversas áreas, como el descubrimiento de fármacos, estudios patológicos, toxicología, la evaluación de los efectos secundarios de los fármacos y medicina regenerativa (Yamanaka 2009). En cuanto al desarrollo de las terapias regenerativas los primeros avances se realizaron con CME, pero debido a la controversia ética que esto causa, la mayoría de los estudios se llevan a cabo con iPSC. En 2010, *Geron Corporation* inició el primer ensayo clínico con células progenitoras de oligodendrocitos derivadas de CME para 10 pacientes que habían sufrido una lesión completa de la médula espinal a nivel torácico, en un ensayo multicéntrico de fase 1. El producto “GRNOPC1” de Geron contiene células progenitoras de oligodendrocitos derivadas de células CME humanas que han demostrado la capacidad de remielinización y de estimular el crecimiento nervioso (Alper, 2009). Por otro lado, *Advanced Cell Technology*, otra empresa de biotecnología, comenzó un ensayo clínico en el que se usó epitelio pigmentario de la retina derivado de CME para tratar la degeneración macular relacionada con la edad (Ohnuki y Takahashi, 2015). También, se describió el primer implante exitoso de progenitores cardíacos derivados de CME en seis pacientes que fueron sometidos a cirugía de revascularización coronaria, en ausencia de efectos adversos atribuibles a la inyección de las células (Menasché y col., 2018).

El primer obstáculo común es la formación de teratomas, que son tumores de células germinales que se pueden generar a partir de una pequeña cantidad de células indiferenciadas (Li y col., 2008). Por ello, es un gran desafío el desarrollo de diferenciaciones dirigidas específicamente a un tipo celular, en gran escala, con un alto grado de pureza y lograr que éstas células se interconecten al tejido preexistente. Un objetivo aún más a largo plazo sería utilizar en las terapias celulares iPSC de cada paciente para evitar así problemas de rechazo inmunológico al no existir diferencias en el sistema de mayor de histocompatibilidad entre las células donantes y el receptor.

También se han desarrollado modelos de enfermedades con el fin de entender los procesos biológicos y elaborar fármacos o terapias específicas para los distintos pacientes. Se generaron iPSC de pacientes con diversas enfermedades neurodegenerativas como esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Dimos y col., 2008), atrofia muscular espinal (AME) (Ebert y col., 2009) y enfermedad de Parkinson (Soldner y col., 2009) y una variedad de enfermedades genéticas con herencia mendeliana o compleja (Park y col., 2008).

Los cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas humanas (CM-hiPSC) proporcionan una plataforma relevante para humanos para la evaluación de la función cardíaca. De hecho, los ensayos alternativos que utilizan CM-hiPSC se emplean cada vez más para la toma de decisiones regulatorias. Actualmente se utilizan ensayos in vitro realizados en CM-hiPSC en estudios no clínicos de cardiotoxicidad inducida por fármacos en presentaciones reglamentarias a la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). La mayoría de los datos de CM-hiPSCs se obtuvieron en estudios exploratorios y se presentaron como evidencia de apoyo en concordancia con otros datos no clínicos (Yang y col., 2022).

En cuanto a las terapias regenerativas se presentó un trabajo que propone la implantación de parches alogénicos de CM-hiPSC en un paciente con miocardiopatía isquémica (ClinicalTrials.gov, #JRCT2053190081). Estos parches se produjeron en condiciones de grado clínico y mostraron fenotipos cardiogénicos y seguridad in vivo (ratones inmunodeficientes graves) sin mutaciones genéticas en genes relacionados con cáncer, y fueron implantados mediante toracotomía en el epicardio del ventrículo izquierdo del paciente bajo agentes inmunosupresores. La tomografía por emisión de positrones y la tomografía computarizada confirmaron la eficacia potencial y no detectaron tumorigénesis ni en el corazón ni en otros órganos. Los síntomas clínicos mejoraron 6 meses después de la cirugía, sin eventos adversos mayores, lo que sugiere que los parches fueron bien tolerados. Además, se recuperaron los cambios en el movimiento de la pared en el sitio trasplantado, lo que sugiere un pronóstico favorable y la potencial tolerancia al ejercicio.

Este estudio es el primer informe de un trasplante exitoso de CM-hiPSC para la miocardiopatía isquémica grave (Miyagawa y col., 2022). Luego, otro ensayo clínico de fase I/IIa de un solo centro, controlado con placebo y de escalada de dosis, demostró la seguridad y eficacia de la inyección epicárdica de CM-hiPSC en pacientes con isquemia cardíaca avanzada durante la cirugía de injerto de derivación de arteria coronaria (Zhang y col., 2022) . Esto nos lleva a pensar en la importancia del desarrollo de protocolos de generación de CM-hiPSC y del estudio de los mismos con el fin de mejorar y facilitar los ensayos preclínicos y las posibles terapias regenerativas.

1.3 Diferenciación cardíaca

En función del interés de la comunidad científica y de las empresas farmacéuticas en el acceso a CM humanos que permitan el avance de las tecnologías descritas previamente, se han desarrollado distintos protocolos de diferenciación cardíaca a partir de hiPSC. Las estrategias más reproducibles y eficientes involucran etapas específicas activación e inhibición de diferentes vías de señalización en condiciones de cultivo definidas, recapitulando los pasos clave en el desarrollo cardíaco en el embrión temprano.

Entre las diferencias de los protocolos se encuentra el cultivo en dos o tres dimensiones (Figura 1.2). Un hecho a destacar entre estos protocolos es la variabilidad de los resultados obtenidos con los mismos. En general, algunas líneas celulares de CME y, al azar, las líneas de iPSC generadas responden diferente a las señales de diferenciación. Si bien ha sido reportado con algunos protocolos una buena y amplia respuesta, muchas veces es necesario un ajuste de las concentraciones de los factores de crecimiento y los inhibidores para obtener los resultados esperados (Kattman y col., 2011; Yang y col., 2008). Un estudio del potencial de diferenciación de 17 líneas de CME humanas, reveló que algunas líneas exhiben una marcada preferencia a diferenciarse a linajes específicos, a menudo con diferencias mayores a 100 veces en la expresión génica específica de linaje (Osafune y col., 2008).

La primera diferenciación exitosa mediada por EB de CME humanas se realizó a partir de la línea de CME H9. Las colonias de iPSC se disgregaron utilizando collagenasa IV, generando pequeños grupos de 3 a 20 células que se cultivaron como EB en suspensión en placas de Petri de plástico no adherentes. Los EB se transfirieron a una placa tratada con gelatina al 0,1 %, observándose zonas latidoras al cuarto día (Kehat y col., 2001). Este protocolo se logró reproducir en otras líneas celulares pero presentando una baja pureza en la obtención de CM. Otro problema de este protocolo, especialmente con respecto a la reproducibilidad, podría estar relacionado con la

inclusión de componentes indefinidos como el suero y los tamaños heterogéneos de EBs. Por lo tanto, el desarrollo de los protocolos de diferenciación cardíaca se orientó a generar EBs de tamaños definidos y uniformes y al establecimiento de medios de diferenciación definidos. Para ello se debe tener en cuenta el desarrollo embrionario del corazón, de forma tal de recapitular este proceso en la diferenciación cardíaca a partir de iPSC humanas.

Dado que la diferenciación de las iPSC humanas recapitula desarrollo embrionario, resulta útil comprender cómo se establece el linaje cardíaco en el embrión para el desarrollo de estrategias de protocolos de diferenciación. El desarrollo cardíaco es un proceso muy complejo que está regulado por muchos genes y cascadas de señalización que controlan los cambios genéticos y morfológicos que permiten la formación del órgano completo y su correcto funcionamiento. Durante la gastrulación, las células del progenitor miocárdico, derivado del epiblasto, ingresan en la porción craneal de la línea primitiva como parte del mesodermo y comienzan su migración bilateral y cranealmente en una trayectoria semicircular. Esta segregación temporal y espacial sugiere que diferentes regiones de la línea primitiva, constituyen un ambiente de señalización que es responsable de la inducción de los distintos linajes (Abu-Issa y col., 2007). Luego de que los progenitores cardíacos se ubican en el mesodermo de la placa lateral se denomina mesodermo cardiogénico o mesodermo, con el potencial para formar células miocárdicas. El mesodermo cardíaco crece por proliferación celular. Múltiples señales del endodermo craneolateral inducen la especificación del miocardio, y éstas están equilibradas por factores inhibidores de otros tejidos. Muchos de los factores positivos se generan a partir del endodermo craneolateral, mientras que algunos factores inhibidores surgen de las estructuras de la línea media. Los candidatos que promueven la especificación del destino miocárdico incluyen miembros de la superfamilia del *Transforming Growth Factor* beta ($TGF\beta$), la familia de la proteína morfogenética ósea (BMP) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; Sugi y Lough, 1995). La señalización hedgehog (Shh) facilita la inducción del miocardio, mientras que la señalización Wnt canónica es inhibitoria. La vía de señalización canónica clásica de Wnt involucra a la proteína β -catenina, la cual posee una función en la adhesión celular a través de la interacción con proteínas transmembrana de la familia de las cadherinas, pero funciona aquí como un mediador de señalización. En ausencia de Wnt, la β -catenina citosólica interactúa con el complejo de destrucción compuesto por axina, APC y $GSK3\beta$, y por lo tanto es fosforilada y posteriormente degradada por el proteasoma. En presencia de un ligando Wnt, β -catenina se estabiliza, entra el núcleo y regula la transcripción del gen diana. A través de genes diana particulares como c-myc y cyclin D1, la vía canónica Wnt/ β -catenina también está relacionada

con la proliferación celular (Gessert y col., 2010). Por el contrario, la señalización Wnt no canónica es independiente de β -catenina e involucra diversos mediadores intracelulares. En la vía Wnt/JNK, las GTPasas de la familia rho están río arriba de la quinasa jun-N-terminal (JNK), mientras que en la vía Wnt/ Ca^{2+} , una liberación intracelular de los iones de calcio dan como resultado la activación de enzimas sensibles al calcio como la proteína PKC, la quinasa independiente de calcio/calmodulina (CaMK)II o la calcineurina (CaCN). Las vías Wnt no canónicas a menudo se han relacionado con la polaridad celular y migración celular causada por reordenamientos del citoesqueleto (Akoumianakis y col., 2022). WNT induce la expresión de marcadores mesoendodérmicos como T (brachyury) y Eomes. Después, genes implicados en el desarrollo del mesodermo y las transiciones epitelial-mesenquimal (EMT), como como Fgf4 y Fgf8, se expresan en la línea primitiva en desarrollo. T y EOMES entonces inducen la expresión de MESP1 (Costello y col., 2011; David y col., 2011), que ha sido descrito como el regulador maestro de la especificación de progenitores cardíacos.

A partir de estos conocimientos se buscó evaluar si las vías de señalización estudiadas podrían ser recapituladas en cultivos in vitro obteniendo células representativas de los diferentes tipos de linajes. Por ejemplo, algunos de los experimentos realizados demostraron que la señalización por Activina A conduce a una inducción eficiente del endodermo definitivo mientras que al inducir con BMP4, se promueve la aparición del linaje mesodérmico (Murry y Keller, 2008). Así, mediante un cultivo de CME de ratón en monocapa en alta confluencia se estudió el tratamiento secuencial con activina A y BMP4, obteniendo CM-CME con una pureza mayor a 30% y que luego de una centrifugación en gradiente de Percoll se llegó a una pureza mayor al 70% (Laflamme y col., 2007). En otro estudio realizado con CME de ratón se demostró que la activación de la vía Wnt/ β -catenina en la fase temprana durante la formación del cuerpo embrioide (EB) mejora la diferenciación de CME en cardiomiocitos mientras suprime la expresión génica de marcadores de células hematopoyéticas y vasculares. Por el contrario, la activación de la vía Wnt/ β -catenina en la fase tardía inhibe la diferenciación de cardiomiocitos y mejora la expresión de genes marcadores hematopoyéticos/vasculares a través de la supresión de la señalización de BMP (Naito y col., 2006). Señales mediadas a través de miembros de la familia Wnt/b-catenina y TGF- β , incluidos la activina y las BMP promueven la diferenciación de ESC de ratón a mesodermo. Sin embargo, una vez que se induce el mesodermo, la señalización de Wnt/b-catenina inhibe la diferenciación cardíaca y puede redirigir las células a destinos mesodérmicos alternos.

Por otro lado, con el fin de generar EBs homogéneos y así tener un protocolo más reproducible, se realiza una agregación forzada con placas de 96 pocillos en forma de V o U. Sin embargo, estos investigadores observaron que se requiere un tamaño variable de EB para una eficiente diferenciación cardíaca en función de distintas líneas humanas de CME, y este requerimiento también puede relacionarse con el número de pasaje de las líneas en el momento de la diferenciación (Burridge y col., 2007). Este grupo de investigación usa activina A y FGF2, logrando ~23% de EB latidores en cuatro líneas de CME. Luego, aumentaron la eficiencia al agregar BMP4 y FGF2 como inductores del mesodermo (Burridge y col., 2011). Así, estos protocolos suplementaban el medio de cultivo con BMP4, Activina A y FGF2 para estimular la formación del mesodermo cardíaco. Luego, una vez establecido el linaje cardíaco, se inhibe la vía de Wnt mediante el uso de pequeñas moléculas como IWR-1, IWP-1 o IWP-2. En otro trabajo, el grupo de investigación de Palecek publicó un protocolo de diferenciación cardíaca eficiente y reproducible, logrando una pureza mayor al 90% de CM-iPSC, solo con pequeñas moléculas moduladoras de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, en condiciones completamente definidas y libres de factores de crecimiento (Lian y col., 2012.A). Por lo tanto, demostraron que la señalización Wnt canónica puede actuar como un regulador maestro de especificación de cardiomiocitos a partir de células pluripotentes, con cambios temporales en la señalización Wnt que regulan las señales autocrinas y paracrinas que también están involucradas en el desarrollo cardíaco, incluidas las vías de la superfamilia TGF- β . La concentración adecuada de cada uno de estos factores es dependiente de la línea de célula madre pluripotente, lo cual requiere entonces que sean optimizadas para cada línea en particular. En resumen, este protocolo consistía en cultivar las iPSC a confluencia sobre Matrigel y durante las primeras 24 hs se trataba con CHIR99021, un inhibidor de GSK3B, en RPMI/B27 sin insulina y luego desde el día 3 al 5 inhibir la vía de Wnt mediante el uso del inhibidor IWP-4 o IWP2. La inhibición de la vía de GSK3B permite la activación de BMP-4 y la vía activina/NODAL. A partir del día 7 las células se mantienen en RPMI/B27, con cambio de medio cada 3 días (Lian y col., 2012.A).

Para la purificación de los CM-iPSC luego de los protocolos de diferenciación se han establecido distintos procedimientos que implican centrifugación en gradiente de densidad (Laflamme y col., 2007), modificación genética (Fijnvandraat y col., 2003), métodos no genéticos basados en que los CM poseen mayor contenido celular de mitocondrias (Hattori y col., 2012) o anticuerpos contra específicos marcadores de superficie celular (Dubois y col., 2011).

La purificación de CM-iPSC fue informada por primera vez por Klug y col. en 1996, quienes establecieron líneas de células madre murinas mediante la transfección genética permanente

del gen de la aminoglucósido fosfotransferasa bajo el promotor de la cadena pesada de β -miosina y obtuvieron resultados altamente positivos (>99%). Otro grupo, transfectó establemente el promotor de cadena ligera de miosina marcado con EGFP, knock-out de EGFP en el locus Nkx2.5 (Hidaka y col., 2003), transfección estable del promotor del canal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Fijnvandraat y col., 2003) y transfección estable del promotor del péptido natriurético auricular marcado con EGF (Gassanov y col., 2004).

La glucosa es la principal fuente de energía y precursores anabólicos, en diversas células de mamíferos. Se convierte por glucólisis en piruvato y/o lactato a través de glucosa-6-fosfato y 3-fosfoglicerato para la generación de dos moléculas de ATP sin la necesidad de oxígeno. El piruvato se utiliza en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) en las mitocondrias para la producción de 36 moléculas de ATP, mediante la fosforilación oxidativa. Los cardiomiocitos producen energía a partir de varios sustratos, incluidos la glucosa, los ácidos grasos y el lactato a través de la fosforilación oxidativa (Tohyama y col., 2013). Los cardiomiocitos poseen un cambio en la utilización del sustrato energético antes y después del nacimiento. En un estudio en ovejas se observó una disminución posnatal del consumo miocárdico de lactato y piruvato que no se compensa con un aumento en el consumo de glucosa, mientras que en el feto de la oveja la glucosa y el lactato suministran la mayor parte del sustrato para suministro de energía miocárdica, siendo el lactato la principal fuente de energía (Fisher y col., 1981), aprovechando el ambiente rico en lactato creado por la placenta (Burd y col., 1975).

Se ha demostrado que el cultivo de CM-hiPSC en medio MEM α sin glucosa suplementado con SFB y se ha demostrado que el lactato enriquece el cultivo a un 98% de α -actinina positiva (Tohyama S. y col., 2013). Como el suplemento B27, utilizado en el protocolo de diferenciación cardíaca de Lian y col. (2012.A), contiene una fuente de glucosa (D(+)-galactosa), el grupo de BurrIDGE desarrolló un medio de cultivo utilizando como base RPMI 1640 sin glucosa y suplementando con ácido L-ascórbico 2-fosfato (AA 2-P) y BSA. Con este medio encontraron que al deprivar el cultivo de glucosa entre los días 6 y 10 del protocolo de diferenciación se obtiene una purificación de CM-iPSC desde ~85% TNNT2+ hasta >95%. Demostraron igual eficiencia, reemplazando BSA por albúmina humana recombinante (rHA), logrando de esta forma un medio libre de componentes animales, que podría ser utilizado para el uso en clínica (BurrIDGE y col., 2014).

Estas mejoras en la reproducibilidad de los protocolos de diferenciación cardíaca, sumado a las técnicas de purificación cardíaca utilizando el metabolismo diferencial de los cardiomiocitos es

utilizado en esta tesis en la búsqueda de un protocolo adecuado para el cumplimiento de los objetivos.

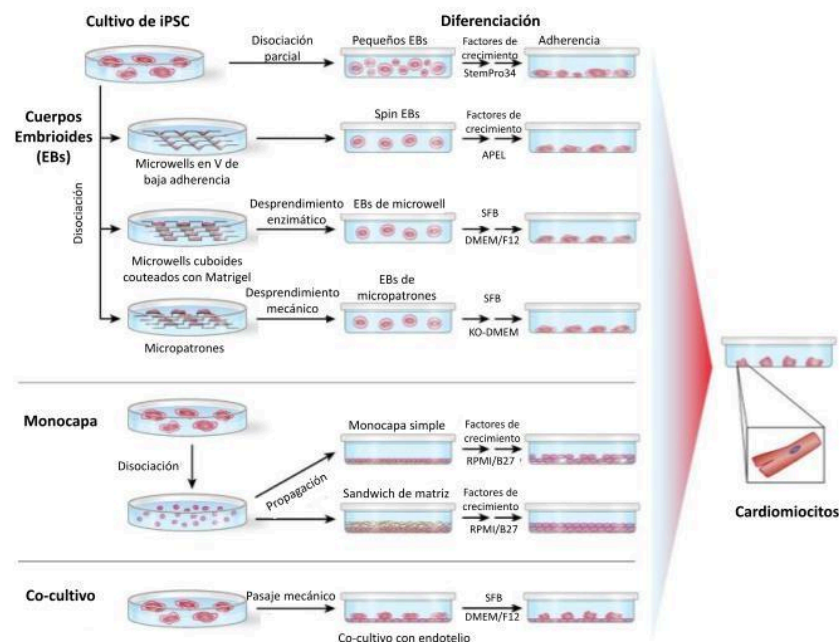


Figura 1.2. Diferenciación cardíaca a partir de iPSC. Resumen de los tres tipos principales de diferenciación cardíaca a partir de hiPSC: cuerpo embriode (EB), cultivo en monocapa y cocultivo inductivo. Adaptado de Mummery y col., 2012.

Las células que se obtienen al final de estos protocolos, no son completamente adultas, pero presentan características funcionales de una célula cardíaca, incluyendo la generación de potenciales de acción y actividad contráctil espontánea en el plato de cultivo.

La caracterización de los cardiomiocitos producidos por el protocolo desarrollado por Lian y col. (2012.B), demuestra que se trata de células cardíacas inmaduras ya que resultan positivas para marcadores cardíacos (TNNT2 y α -actinina) y para el marcador de CM inmaduros, alfa-actina de músculo liso (α SMA). Estos CM-iPSC inmaduros poseen baja capacidad de acoplarse funcionalmente con CM residentes, lo cual podría conducir a arritmias letales en una posible utilización en terapias regenerativas. Para conseguir la madurez funcional de los CM-iPSC se han desarrollado diversos métodos como el cultivo prolongado, la estimulación bioquímica o biofísica, y cultivo 3D. Experimentos donde el cultivo se mantiene por más de 3 semanas sugieren que los CM-iPSC poseen un mayor grado de madurez y que son cardiomiocitos eléctricamente estables (Fijnvandraat y col., 2003). Entre los tratamientos bioquímicos, se ha observado que el agregado de triyodotironina (T3) aumentó significativamente el tamaño

celular, la longitud del sarcómero y la capacidad contráctil de CM-iPSC (Yang y col., 2014). También, el tratamiento conjunto con T3 y glucocorticoides promueve significativamente la formación de túbulos T, que contribuye al aumento del acoplamiento excitación-contracción y a la sincronización del calcio intracelular, estas hormonas para mejorar la maduración de hiPSC-CM (Parikh y col., 2017). Otro método interesante surge de la observación de un aumento en la función mitocondrial luego de la estimulación de la maduración en CM-iPSC. Se sugiere que la transferencia mitocondrial intercelular proporciona desde CM adultos o bien desde células madre a CM-iPSC podría promover la generación de hiPSC-CM similares a los adultos (Yang y col., 2016).

Como consecuencia de los protocolos de maduración los CM-iPSC van perdiendo su capacidad de proliferación (Yang y col., 2023). Por lo tanto, resulta interesante desarrollar métodos para aumentar la proliferación de los CM-iPSC en una etapa temprana de los protocolos de diferenciación y luego mejorar su maduración, para sortear las limitaciones actuales en el campo de la investigación de la medicina regenerativa.

1.4 Proliferación en cardiomiocitos

1.4.1 Crecimiento cardíaco y proliferación celular

Los anfibios urodelos y los peces teleósteos conservan la capacidad de regeneración cardíaca durante toda la vida, pero no ocurre lo mismo con el corazón de los mamíferos adultos. Los corazones de ratones neonatales de 1 día de edad se pueden regenerar después de una resección quirúrgica parcial, pero esta capacidad se pierde a los 7 días de edad (Porrello y col., 2011). Estudios previos han demostrado que la binucleación de cardiomiocitos ocurre durante la vida neonatal temprana tanto en ratones como en ratas (Brodsky y col., 1980). Se cree que se produce la diferenciación terminal de los cardiomiocitos poco después del nacimiento en la mayoría de los mamíferos y se caracteriza por una transición de crecimiento hiperplásico a hipertrófico. A nivel morfológico, esta transición se caracteriza por un marcado aumento en la densidad de miofibrillas, la aparición de discos intercalares maduros, y la formación de cardiomiocitos binucleados. En ratones se observó que existen dos fases temporalmente distintas de síntesis de ADN en los cardiomiocitos. La primera fase de la síntesis de ADN ocurre en la vida fetal y está asociada exclusivamente con la proliferación de cardiomiocitos, mientras que la segunda fase se produce en la vida postnatal inmediata con un aumento del 40% en el número de cardiomiocitos y se asocia en gran medida con la binucleación (Soonpaa y col., 1996).

Esto último está en discusión, ya que en otros estudios no se pudieron detectar cambios en la cantidad de cardiomiocitos después del día posnatal 11, tanto por análisis con ¹⁵N-timidina y BrdU no se observó aumento de proliferación en ratones preadolescentes, pero si se detectó que la multinucleación comprende el 57% de la síntesis de ADN postnatal, dentro de la primera semana posnatal y este evento es seguido por dos oleadas de no replicativos en la segunda y tercera semana (Naqvi y col., 2014, Soonpaa y col., 2015, Alkass y col., 2015). Antiguamente, se consideraba que los cardiomiocitos poseían nula capacidad proliferativa en el corazón humano postnatal, y que este crece solamente por medio de aumento del tamaño celular o por división celular sin cariocinesis, pudiendo generarse cardiomiocitos multinucleados (von Harsdorf y col., 2004), sin embargo, diversos laboratorios demuestran que existe proliferación de cardiomiocitos luego del nacimiento. La datación por radiocarbono del tejido cardíaco postmortem ha demostrado que los cardiomiocitos adultos humanos tienen una tasa de recambio inferior al 1% anual y que el 40% del corazón adulto maduro está formado por cardiomiocitos generados posnatalmente (Bergmann y col., 2009). En un estudio donde se analizó la proliferación de CM de ventrículo izquierdo de corazones humanos sanos, se observó mayor porcentaje de CM en mitosis y citocinesis en bebés, disminuyendo a niveles bajos a los 20 años. Aunque la mitosis de los CM fue detectable durante toda la vida, la citocinesis no fue evidente después de los 20 años (Mollova y col., 2013). La regeneración se ha demostrado en ratones, pero sólo dentro de la primera semana posparto. (Porrello y col., 2011). Una de las diferencias más interesantes entre los cardiomiocitos derivados de ESC humanas y de ratón es su estado proliferativo. Los cardiomiocitos derivados de ESC de ratón, como los derivados de fetos de ratón o rata, exhiben poca proliferación in vitro (McDevitt y col., 2005). Este mismo grupo de investigación detectó que los cardiomiocitos derivados de ESC humanas posee un porcentaje relativamente alto de células capaces de proliferar in vitro, incluso después de varias semanas de diferenciación, involucrando a la vía del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa) y Akt, y utilizando receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) como uno de los activadores río arriba. En etapa temprana, entre el día 10 y 21, los CM presentan un 36% de proliferación, en etapa intermedia (entre día 21 y 35) un 9% y en etapa tardía (35 días) un 1% (Snir y col., 2003, Kikuchi y Poss, 2012).

En los CM-iPSCs, se ha observado que el ciclo celular es diferente al de los cardiomiocitos adultos. En particular, los cardiomiocitos derivados de iPSCs tienen un ciclo celular más corto y una mayor tasa de proliferación en comparación con los cardiomiocitos adultos. Además, se ha observado que los cardiomiocitos derivados de iPSCs tienen una mayor propensión a la

apoptosis (muerte celular programada) y una menor capacidad para regenerarse después de una lesión. En nuestro laboratorio hemos encontrado que el factor de crecimiento LIF actúa como un inhibidor de la apoptosis en la etapa tardía de la diferenciación a cardiomiocitos, pero que no tiene efecto en las etapas tempranas, ni sobre la proliferación de los cardiomiocitos (Blugüerman y col., 2017). El grupo de Yamanaka determinó que, aproximadamente, luego de 20 días de diferenciación, menos del 1% de los cardiomiocitos se replican (Yamanaka y col., 2008). Por lo tanto, la obtención de una gran cantidad de cardiomiocitos se ve limitada por su falta de crecimiento, el cual se limita a unas semanas después de comenzada la diferenciación. Investigaciones anteriores encontraron que si bien los cardiomiocitos embrionarios tienen una alta expresión de reguladores positivos del ciclo celular como las ciclinas, las quinasas dependientes de ciclina y los protooncogenes, los CM adultos tienen una muy baja expresión de estas proteínas (Pasumarthi y col., 2002).

En resumen, la proliferación de las células cardíacas adultas parece ser un fenómeno fisiológico reducido a ciertas situaciones. Las señales que inducen la proliferación de cardiomiocitos en los contextos descritos anteriormente son conocidas de manera incompleta.

1.4.2 Proteínas involucradas en el ciclo celular cardíaco

El ciclo celular está regulado por ciclinas, quinasas dependientes de ciclina (CDK) o inhibidores de quinasas dependientes de ciclina. Las ciclinas se clasifican como de fase G1/S, o fase G2/M. Cada ciclina requiere asociación con su CDK específica para regular la progresión del ciclo celular. Las ciclinas tipo D se asocian con CDK4 y CDK6, mientras que las ciclinas E se asocia con CDK2. El complejo ciclina D/CDK4 o CDK6, fosforilan la proteína del retinoblastoma (pRB), las proteínas de p107 y p130, que se unen y regulan los factores de transcripción E2F durante la fase G1 del ciclo celular. Tanto las ciclinas D, como la ciclina E permiten que la célula avance a través de la transición de fase G1/S, mientras que la ciclina A regula la transición de la fase G2 a M y puede asociarse con CDK2 o cdc2) y la ciclina B se une a cdc2 y controla la entrada en la mitosis ("GenBank", Clark y col., 2015, Figura 1.3). La ciclina D1 también puede inhibir la diferenciación a cardiomiocitos por medio de la fosforilación de GATA4, lo cual lleva a la degradación de este factor de transcripción (Nakajima y col., 2011). Para completar la mitosis se requiere una coordinación temporal entre la citocinesis y la segregación cromosómica, lo cual se logra mediante la activación del complejo promotor de anafase (APC), dando inicio a la segregación cromosómica e ingreso de surcos citocinéticos. La activación simultánea de CDK1, cocactivadora de ciclina B, lleva por degradación a la inactivación de CDK1, lo que resulta en la desfosforilación

de muchos sustratos de CDK1 promoviendo la citocinesis y salida mitótica. Finalmente, la abscisión está coordinada temporalmente con la finalización de la segregación cromosómica por una vía de señalización que involucra la quinasa mitótica Aurora B (Fededa y Gerlich, 2012).

La expresión y regulación de estas proteínas y sus numerosos circuitos de retroalimentación que permiten o impiden la división celular dependen del tipo de célula. Varios trabajos han descrito los genes reguladores del ciclo celular y sus niveles de expresión durante la ontología cardíaca. Los reguladores generales positivos del ciclo celular (como por ejemplo, ciclinas, las quinasas dependientes de ciclina [Cdk] y protooncogenes) tienen altos niveles de expresión en los corazones embrionarios donde los cardiomiocitos poseen un alto nivel proliferativo y están regulados negativamente en el corazón adulto. Por otro lado, los reguladores negativos del ciclo celular negativos, como los inhibidores de Cdk, aumentan con frecuencia en corazones adultos (Tabla 1).

En un trabajo se demostró que varios reguladores del ciclo celular se expresan diferencialmente en cardiomiocitos adultos, neonatales y fetales. Por medio de un microarray se detectó que Cdk2, Cdk3 y el complejo ciclina D1/Cdk4 poseen menor expresión en CM adultos, mientras que en CM neonatales se expresaron varios reguladores de transición G1/S, y hubo baja expresión de anilina y otras proteínas estructurales claves para la formación del cinetocoro, lo cual podría dar lugar a la binucleación (Walsh y col., 2010). En otro estudio más antiguo, se observó ARNm de las ciclinas D1, D2, D3 y E durante todas las etapas de desarrollo, mientras que las proteínas de las ciclinas D1, D3 y E se observaron sólo en corazones en la etapa de crecimiento joven (Kang y col., 1997). Durante el desarrollo cardíaco en ratas, p21 y p27 van aumentando su expresión a medida que aumenta significativamente el porcentaje de células en G0/G1 y G2/M (Poolman y col., 1998). El mRNA de la ciclina B se detectó en corazones adultos de rata, en contraste con la ciclina A que no fue detectada mientras que la proteína fue apenas detectada en corazones fetales (Yoshizumi y col., 1995).

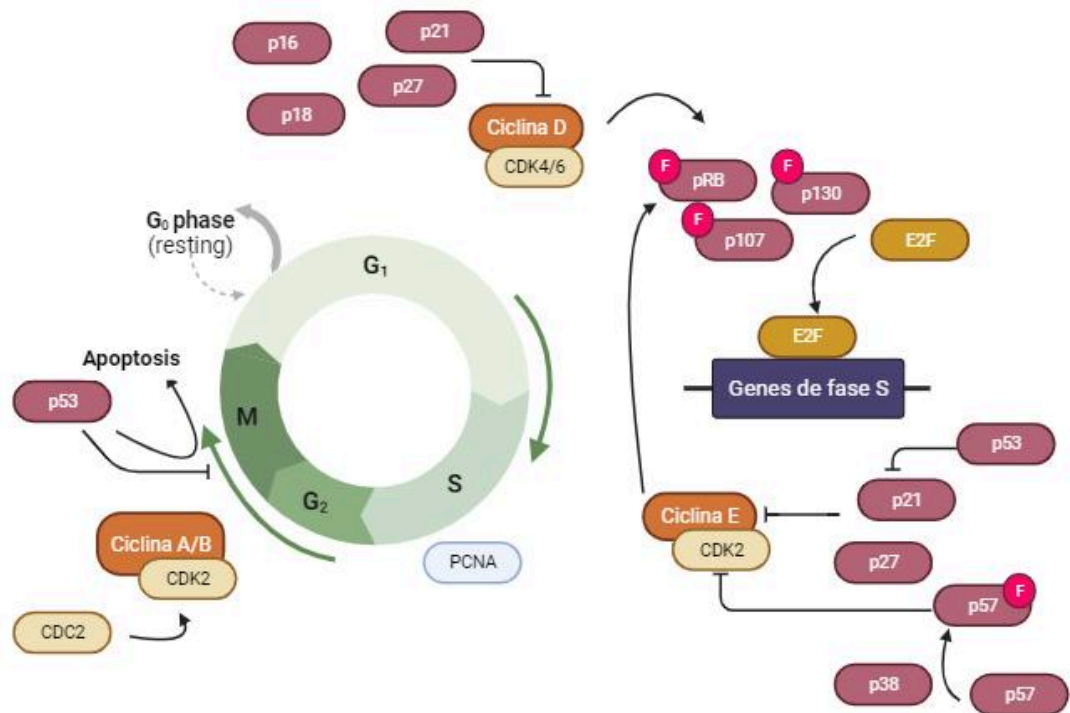


Figura 1.3. Proteínas reguladoras del ciclo celular. Se muestra la interacción entre diversas proteínas reguladoras del ciclo celular, involucradas en los puntos de control y pasajes de G₁ a S y de G₂ a M. Creado con BioRender.com

Gen	Actividad en el ciclo celular	Nivel de expresión		
		EMB	NEO	AD
Ciclina D1	Cofactor Cdk, regulador positivo de punto de control	++	+	-
Ciclina D2	Cofactor Cdk, regulador positivo de punto de control	++	+	-
Ciclina D3	Cofactor Cdk, regulador positivo de punto de control	++	+	-
CDK4	Fosforila RB, promueve el paso de un punto de control	++	+	-
p16	Inhibe Cdk4 y 6, bloquea el punto de control y el pasaje de G1/S	ND	-	ND
p18	Inhibe Cdk4 y 6, bloquea el punto de control y el pasaje de G1/S	++	++	-
p21	Inhibe Cdk2, 4 y 6, bloquea el punto de control y el pasaje de G1/S	++	++	-
p27	Inhibe Cdk2, 4 y 6, bloquea el punto de control y el pasaje de G1/S	+	+	+
p57	Inhibe Cdk2, 4 y 6, bloquea el punto de control y el pasaje de G1/S	++	+	-
Ciclina E	Cofactor Cdk, regulador positivo de S y del pasaje G1/S	+	+	+
Ciclina A	Cofactor Cdk, regulador positivo de S y del pasaje G2/M	++	+	-
CDK2	Promueve el pasaje G1/S cuando esta en complejo con CiclinaE	++	+	-
RB	Regula el pasaje G1/S inhibiendo la familia de E2F	+	+	+
p107	Regula el pasaje G1/S inhibiendo la familia de E2F	++	+	+/-
p130	Regula el pasaje G1/S inhibiendo la familia de E2F	+	++	ND
E2F1	Factor de transcripción de genes del ciclo celular	ND	+	-
p53	Supresor tumoral que promueve el arresto del ciclo celular o apoptosis	++	+	-
PCNA	Necesaria para la síntesis de DNA durante S	++	+	-
Ciclina B	Cofactor Cdk, regulador positivo del pasaje G2/M	++	+	-
cdc2	Promueve el pasaje G2/M cuando está en complejo con Ciclina B	++	+	-

Tabla 1. Proteínas involucradas en el ciclo celular. Nivel de expresión en estadio embrionario, neonato o adulto. El nivel relativo de expresión se refiere únicamente a valores dentro de un estudio individual; ND, no determinado o no detectado. Adaptado de Pasumarthi K y Field L, 2002.

1.4.3 Señales activadoras del ciclo celular de cardiomiocitos

Con este marco de referencia, algunos investigadores han estudiado las señales que favorecen la re-entrada del ciclo celular de cardiomiocitos adultos. La sobreexpresión directa de las ciclinas involucradas en el ciclo celular no resulta eficiente ya que por sus mecanismos de feedback estas proteínas son degradadas por proteasoma (Zebrowski y col., 2016). Aunque otro trabajo demostró que con adición exógena de los complejos Cdk1/CiclinaB1 y Cdk4/CiclinaD1, un 15% de los CM puede proliferar in vivo tanto en corazones humanos como en ratón (Mohamed col., 2018). Hasta el momento sólo han sido identificadas unas pocas señales, como, por ejemplo, la neuregulina-1 (NRG1). Esta molécula actúa por medio de receptores ErbB-2 y ErbB-4, estimulando la proliferación celular de los cardiomiocitos adultos (Wadugu y col., 2012). Este efecto de la NRG1 ha sido estudiado en varios modelos in vitro. En animales *knock-out* para NRG1, la ablación de esta señal induce una muerte fetal temprana, en parte por falta de

desarrollo miocárdico. En modelos de diferenciación de células madre pluripotentes se observó que la NRG1 induce la diferenciación cardíaca, aunque no es claro en estas publicaciones si éste es un efecto directo genuino, o si en realidad aumenta la proliferación de progenitores cardíacos (Zhu y col., 2010; Kim y col., 2007). Por otro lado, Engel y colaboradores demostraron que la inhibición de p38 MAP quinasa induce la proliferación de células miocárdicas fetales y adultas (Engel y col., 2005). Utilizando inhibidores de p38, estos autores lograron reprimir la inhibición a la proliferación en estas células, ya que los CM adultos presentaron cariocinesis. Estos efectos fueron observados en modelos in vivo de daño miocárdico en ratones, en donde la inhibición de p38 redujo el tamaño de un infarto de miocardio por proliferación de células miocárdicas adultas (Engel y col., 2006). FGF1 y FGF2 estimulan la proliferación de CM neonatales (Engel y col., 2005), mientras que el FGF2 también induce la síntesis de ADN en CM adultos (Speir y col., 1992). A su vez, la administración conjunta de inhibidores de p38 y FGFa resulta ser protectora en la isquemia cardíaca, disminuyendo la apoptosis de cardiomiocitos (Baines y col., 2004). Sin embargo, la sobreexpresión constitutiva de FGF1 sólo retrasó el infarto de miocardio sin diferencia en el tamaño máximo del infarto (Buehler y col., 2002). La aplicación local y pulsada resulta óptima para el tratamiento con SB203580, inhibidor de p38 ya que la inhibición continua de p38 in vitro resulta en la muerte celular de los CM adultos (Engel y col., 2006).

Existen otras dos potenciales señales a considerar al momento de inducir la proliferación de cardiomiocitos. Una de ellas es la periostina. Esta molécula de la matriz extracelular demostró inducir la re-entrada en el ciclo cardíaco en las células miocárdicas adultas (Kühn y col., 2007), aunque este hallazgo no fue confirmado en otro estudio (Lorts y col., 2009). También se ha demostrado que dos factores de crecimiento, IGF-1 y somatotrofina, inducen la proliferación de cardiomiocitos adultos (Brüel y col., 2007). El factor de crecimiento TWEAK, de la familia TNF, es un conocido regulador de la proliferación celular. En diferentes estudios ha sido demostrado que este factor puede inducir el ciclo celular en cardiomiocitos (Novoyatleva y col., 2010, Novoyatleva y col., 2013). Este efecto parece ser mediado por el receptor Fn14, asociado al receptor FGFR1, lo que explicara entonces los efectos de inducción de proliferación por parte de FGF1 (Novoyatleva y col., 2014).

Otras investigaciones se han concentrado en los factores de transcripción, los reguladores del ciclo celular, y los microARNs que regulan el ciclo celular de los cardiomiocitos. Por ejemplo, el factor de transcripción, MEIS1/2 ha sido recientemente asociado a la regulación de la salida del ciclo celular de los cardiomiocitos diferenciados. La inhibición de la expresión de MEIS1/2 induce

la reentrada en el ciclo de estos cardiomiocitos, ya que Meis1 es necesario para la activación de la transcripción de p15, p16 y p21 (Mahmoud y col., 2013, Mahmoud y col., 2014).

1.6 MicroARN

La mayoría de los ARNs producidos en las células eucariotas son no codificantes: solo el 2% de los ARNs transcriptos son traducidos a proteínas. El resto de los ARNs transcriptos tienen funciones estructurales, enzimáticas o de regulación. Los ARNs no codificantes han sido divididos, según su longitud, en los ARN de cadena larga (mayor a 200 bases, llamados long-non-coding-ARNs), y los de cadena corta (menor a 200 bases, llamados short-non-coding-RNAs). En los animales existen tres tipos de pequeños ARNs no codificantes: los siARNs (del inglés small interfering RNA), los piARNs y los microARNs. Los siARN regulan de manera post-transcripcional transcriptos y transposones, y participan de la defensa antiviral. Los microARNs (miRNAs) son ARNs simple cadena con un largo de 18–22 nucleótidos, que regulan la expresión de genes post-transcripcionalmente al unirse a la región 3' UTR (zona que no se traduce) de los ARN mensajeros target, inhibiendo la expresión de estos.

Fueron descritos por primera vez en el año 1993 en el trabajo de Lee y col. en el que demostraron que el microARN lin-4 participa en el desarrollo temprano de *C. elegans* (Lee, 1993). La última versión de miRBase, v22, contiene 38.589 loci de microARN de 271 especies, procesados para producir 48860 productos de microARN maduros (<http://www.mirbase.org>, Kozomara y col., 2019). Los microRNAs son importantes en la regulación de la mayoría de los procesos celulares, así como en el desarrollo embrionario, la diferenciación tisular, y el mantenimiento de la identidad celular durante la embriogénesis y la adultez (Cordes y col., 2009; Ivey y col., 2008). Se ha determinado que numerosos microARNs son desregulados en distintas etapas del progreso tumoral, siendo así eficientes biomarcadores que permiten establecer tanto el diagnóstico como pronóstico de la enfermedad (Joosse y col., 2014). Existen diversos microARNs que han sido asociados a la proliferación de cardiomiocitos. Estos incluyen al cluster mir302/367 (Tian y col., 2015), al mir-499 (Li y col., 2013), y a los mir-590 y mir-199 (Eulalio y col., 2012). Los miR-199a-3p y miR-590-3p estimulan la proliferación de CM luego de un infarto de miocardio, al expresarlos en el corazón de ratón por medio de vectores virales (Lesizza y col., 2017). Los miR-548c-3p, miR-509-3p y miR-23b-3p inducen significativamente la proliferación de CM adultos por medio de la inhibición de Meis1 (Pandey y col., 2016). Particularmente, se observó que el cluster del miR-302/367 regula la proliferación cardíaca en corazones pre y postnatales por medio de la unión al sitio 3' UTR de Mst1, Lats2, y Mob1, inhibiendo la vía de

Hippo (Tian y col., 2015). El mismo grupo de trabajo demostró que con el agregado del mir-302 exógeno con una gel de ácido hialurónico puede inducir la proliferación de CM por dos semana luego de agregarlo localmente en la zona de un infarto de miocardio (Wang y col., 2017). Estos microARNs se encuentran localizados en una zona específica del cromosoma 4, donde se concentran gran parte de la familia del mir-302 y el mir-367. Esta familia está muy ligada a la pluripotencia; de hecho, es posible reprogramar una célula adulta en iPSC solo sobreexpresando alguno de los mir-302 (Subramanyam y col., 2011). Por lo tanto, es interesante que también haya sido involucrado en la salida del ciclo celular en cardiomiocitos.

En un trabajo previo se han identificando 96 miRNAs capaces de aumentar la proliferación (síntesis de ADN y citocinesis) de CM-iPSC humanos. Tanto por análisis funcional como computacional se detectó que la mayoría de estos miRNA (67) tienen como target diferentes componentes de la vía Hippo/YAP (Yes-associated protein). De estos miRNAs, 53 están presentes en los CM-iPSC humanos, pero ninguno resulta individualmente esencial para su proliferación basal. Proponemos un modelo en el que múltiples miRNA endógenos se suprimen de forma redundante (Yu and Guan, 2013 y Diez-Cuñado y col., 2018). El miR-199a-3p promueve la proliferación de los CM por medio de la inhibición de la expresión de HOXP y el aumento de la acetilación de GATA4 (An y col., 2017). El miR-1825 induce la proliferación en CM adultos de rata (Pandey y col., 2017). MiR-29b-3p por sí solo inhibe la proliferación de CM, mientras que su inhibidor la promueve tanto in vivo como in vitro (Yang y col., 2020). Por otro lado, se encontraron clusters de miRNAs (miRNA-30a, miRNA-100, miRNA-27a, miRNA-30e, miRNA-294 y miRNA-590) dentro de vesículas extracelulares (EVs) derivadas de iPSC que pueden promover la actividad del ciclo celular de CM-iPSC al ser target de la vía PI3K/AKT (Louro y col., 2022).

En nuestro laboratorio hemos realizado un análisis de los miRNAs involucrados en la diferenciación cardíaca a partir de iPSC. Hemos identificado las familias y clusters de miRNAs involucrados en el establecimiento del linaje cardíaco, y determinamos el miRNAoma asociado a los cardiomiocitos, por comparación con los miRNAs expresados en otras células maduras (Garate y col., 2018).

1.7 Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales humanas (MSCs, por sus siglas en inglés) constituyen un tipo de células madre adultas que se hallan en diversos tejidos del organismo, como el tejido adiposo, óseo y conectivo (Ding y col., 2011). Se originan en el mesodermo durante las etapas iniciales del desarrollo embrionario. Aunque no alcanzan la pluripotencia de las CME o las iPSC,

las MSCs exhiben la capacidad de diferenciarse in vitro hacia células de los linajes adipogénico, condrogénico, osteogénico y neurogénico (Pittenger y col., 1999). Las MSCs poseen la facultad de auto-renovarse pero van modificando sus características a medida que se dividen (Bruder y col., 1997; Solchaga y col., 2005). Debido a la heterogeneidad de su origen, el comité de Células Madre Mesenquimales y de Tejido Mesenquimal de la Sociedad Internacional de Terapia Celular estableció criterios para denominar a una célula como MSC: las células deben mostrar adherencia al plástico, una morfología fibroblastoide y expresar los marcadores CD90, CD105 y CD73, mientras carecen de CD14, CD19, CD34 y CD45. Además, deben demostrar la capacidad de diferenciarse en adipocitos, condroblastos y osteoblastos (Dominici y col., 2006).

Las MSCs poseen cualidades atractivas para su uso en terapias regenerativas y de reparación de tejidos al tener capacidad de modular la respuesta inmunitaria del cuerpo y tener bajo riesgo de ser rechazadas por el sistema inmunológico del receptor. El potencial regenerativo de las MSC es explicado principalmente por su capacidad de secretar factores y citoquinas que estimulan la reparación innata del tejido y modulan la inflamación y la respuesta inmune (Caplan y Dennis, 2006). Entre los factores secretados capaces de contribuir en la reparación del tejido cardíaco, actuando sobre el ciclo celular de los cardiomiocitos o la muerte celular, se encuentran Angiogenina, Endotelina-1, FGF2, FGF7, LIF, factor de células madre (SCF), factor inhibitorio de migración de macrófagos (MIF), factor de crecimiento placentario (PGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), pleiotrofina (PTN), TGF- β y factor de necrosis tumoral α (TNF- α ; Gneccchi y col., 2008). Las MSC pueden actuar por medio de los EVs secretados, los cuales pueden contener lípidos, mRNA, miRNAs, y proteínas.

También se ha observado que las MSC poseen la capacidad de inhibir la muerte de CM expuestos a una isquemia a través de interacciones directas entre células y por medio de la donación de mitocondrias en un cocultivo (Cselenyák y col., 2010; Acquistapace y col., 2011). Sin embargo, este efecto protector no se vió al tratar un infarto agudo de miocardio en ratas con medio condicionado de MSC extraídas de médula ósea, aunque sí se observó disminución en el tamaño de la herida y aumento en el número de CM ventriculares de rata adulta cultivados in vitro (Gneccchi y col., 2005). Otro estudio plantea que las MSC estimulan la reparación cardíaca a través de efectos celulares autónomos que estimulan a las células precursoras del miocardio del para amplificarse y diferenciarse en cardiomiocitos, ya que este efecto lo ven solo al tratar con las células y no con el medio condicionado (Hatzistergos y col., 2010). Sin embargo, los EVs de MSC cardíacas tienen el potencial de activar la proliferación de cardiomiocitos luego de un infarto de miocardio, observándose una mejora en la función cardíaca luego de un mes del

tratamiento (Ju y col., 2018). También se describió que el secretoma de las MSC derivadas de médula ósea pueden inducir la activación de la proliferación de CM, in vitro (Nakanishi y col., 2008).

En nuestro laboratorio hemos estudiado el contenido de los EVs secretados por MSC derivadas de iPSC y MSC derivadas de cordón umbilical humano (WJ-MSC del inglés *Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells*), encontrando un alto contenido de proteínas de matriz extracelular, de adhesión celular y de locomoción. Particularmente, estos EVs poseen proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular y la replicación de ADN y se encuentran mayormente representadas en los EVs de WJ-MSC (La Greca y col., 2018). El secretoma de las MSC varía en función del tejido de origen (Park y col., 2009).

El secretoma de MSC incluye múltiples factores conocidos por promover la reparación cardiovascular y factores que modulan negativamente la apoptosis de los cardiomiocitos, la inflamación y remodelación patológica (Sze y col., 2007). Se encontró que este perfil de secreción de citoquinas era altamente conservado entre las MSC derivadas de médula ósea de donantes de diversa raza, edad y sexo (Park y col., 2009).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Hipótesis y Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral es generar un cardiomiocito estable, expandible, y congelable, derivado de células madre pluripotentes. Para ello, se plantearon objetivos específicos que permiten ordenar el avance del trabajo realizado:

1. Determinar el mejor protocolo de diferenciación cardíaca a partir de células madre.
2. Evaluar la resistencia y el efecto que genera el congelado/descongelado de los CM-iPSC.
3. Evaluar la salida del ciclo celular de los CM derivados de células madre, determinando el momento en el cual la mayor parte de las células dejan de proliferar y se alcanza el grado máximo de expansión luego de la diferenciación. Analizar los efectos de las potenciales señales moleculares que pueden interferir en la salida del ciclo celular de CM-iPSC, tanto previamente a la salida del ciclo celular de las células cardíacas como una vez que se arrestaron.
4. Estudiar la capacidad de los iPSC-CM de reingresar al ciclo celular por efecto de la inhibición de p38 y por la incubación con FGF1.
5. Estudiar la capacidad de los iPSC-CM de salir del arresto del ciclo celular por acción del mir520a.
6. Estudiar la habilidad de los iPSC-CM de re-entrar al ciclo celular luego de ser expuestos a medio condicionado por WJ-MSC, identificando las posibles causas estudiando la proteómica del medio condicionado por WJ-MSC.
7. El último objetivo planteado en esta tesis doctoral, fue evaluar los posibles mecanismos involucrados en el aumento de la proliferación de CM-iPSCs luego de ser resembrados al día 21 del protocolo de diferenciación cardíaca.

Hipótesis: La ejecución de un protocolo de diferenciación cardíaca optimizado a partir de células madre pluripotentes generará cardiomiocitos que podrán ser mantenidos en cultivo, pudiendo congelarlos y descongelarlos, como así también re sembrarlos. Se postula que la salida del ciclo celular de los CM derivados de células madre, y su posterior expansión controlada, pueden ser influenciadas por señales moleculares específicas. Se espera que la acción del mir520a, el medio

condicionado por células madre de tejido de cordón umbilical (WJ-MSC), la inhibición de p38, y la incubación con FGF1 afecten la capacidad de los CM-iPSC para salir y reentrar al ciclo celular.

RESULTADOS

3. Resultados

Capítulo 1: Herramientas de biología celular

El objetivo general de este capítulo consiste en la puesta a punto del sistema experimental con el que trabajaremos a lo largo de esta tesis. En línea con las investigaciones llevadas a cabo en nuestro y en otros laboratorios, evaluamos tres protocolos de diferenciación cardíaca distintos a partir de células madre humanas. El primer protocolo proviene de un kit desarrollado por la empresa Gibco, el segundo comienza con la generación de EBs y el tercero tiene su punto inicial a partir de la formación de una monocapa celular mega confluente.

También se desarrolló una línea celular que permite seguir el estadio del ciclo celular por medio de la detección de la fluorescencia nuclear.

3.1.1 Puesta a punto del protocolo del Kit de diferenciación cardíaca de Gibco.

Para la puesta a punto de este protocolo se utilizó la línea de iPSC desarrollada en el laboratorio. La misma fue mantenida sobre geltrex, una matriz comercial compuesta por una mezcla de proteínas que semejan la composición de la matriz extracelular, y con E8 flex. La pluripotencia de las mismas se validó por medio de inmunofluorescencia marcando a las proteínas OCT4 y NANOG (Figura 3.1). También se controló que mantuvieran una alta tasa de división y su aspecto morfológico característico.

El kit de diferenciación cardíaca desarrollado por Gibco consiste en tres medios definidos, dos para el proceso de diferenciación y uno para el mantenimiento de los CM-iPSC. Para el momento en el que se desarrolló este ensayo, el fabricante proponía testear diferentes confluencias, entre 30% y 90%, por lo cual se decidió comenzar con una confluencia del 30%, pero se evaluó hasta llegar a una mega confluencia (>100%). Se siguió el protocolo tal cual se indicaba en la página pero no se obtuvieron células latidoras (Figura 3.2.A). También se testearon tres confluencias con la línea embrionaria H9, sin obtener resultados positivos. Para la línea de iPSC, FN2.1, se

inició el protocolo de diferenciación con las siguientes confluencias: 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100% y en todos los casos no se obtuvo células con acción contráctil (Figura 3.2.B).

Es importante aclarar que al momento de escribir esta tesis el kit fue modificado por el fabricante, por lo cual resultaría conveniente volver a evaluar estos reactivos.

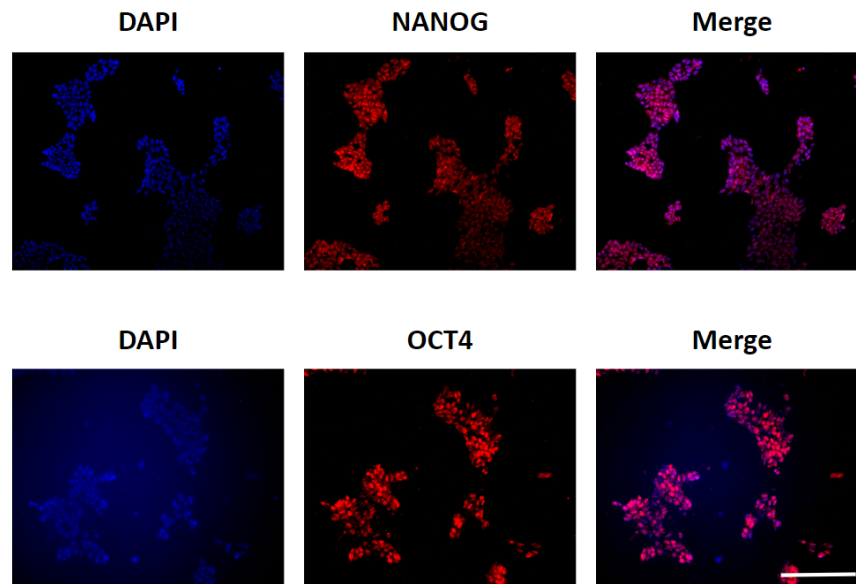


Figura 3.1. Validación de pluripotencia. A) Fotos representativas de inmunofluorescencia realizadas a la línea de iPSC desarrollada en el laboratorio. Barra de escala: 200 μ m.

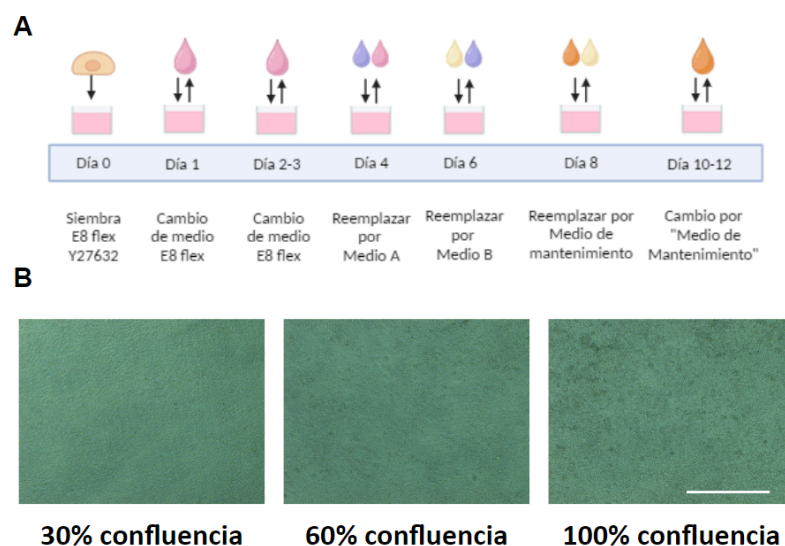


Figura 3.2. Diferenciación cardíaca con kit Gibco. A) Esquema del protocolo empleado para la diferenciación cardíaca a partir de iPSC. B) Imágenes representativas al día 8 del protocolo de diferenciación, para tres confluencias iniciales. Barra de escala: 200 μ m.

3.1.2 Protocolo de diferenciación cardíaca a partir de cuerpos embrioides.

Por otro lado, se evaluó el protocolo de diferenciación cardíaca a partir de cuerpos embrioides (EBs). Para ellos las células madre cultivadas sobre fibroblastos embrionarios murinos irradiados (MEFi) o sobre geltrex y se levantan enzimáticamente. Para conseguir homogeneidad de los EBs se siembran en placa no adherente, 30000 células por pocillo de placa de 96 con fondo en V y se realiza una agregación forzada por medio de centrifugación. Los EBs fueron crecidos y mantenidos en suspensión durante los primeros cuatro días y luego en adhesión, en un medio definido de diferenciación al cual se le agregan diversos morfógenos (BMP4, Activina A, bFGF, VEGF y el inhibidor WNT, IWR-1) que buscan recapitular las señales existentes en la diferenciación inicial a mesoendodermo, luego al progenitor mesodérmico, progenitor cardíaco y finalmente a cardiomiocito (Figura 3.3). Luego de aproximadamente 9-10 días de diferenciación, comienzan a aparecer zonas latidoras. Se utilizaron las líneas de CME humanas, H9 y H9ctnt. La línea H9ctnt está modificada con un cassette de expresión, que tiene bajo el promotor de un gen cardíaco específico (cardiotroponina T), el gen de resistencia a la Zeocina y el gen GFP, permitiéndonos así poder seleccionar con Zeocina a las células cardíacas (Figura 3.4.A y B). De esta manera obtuvimos un cultivo enriquecido en cardiomiocitos entre el 80-90% (Figura 3.4.C). Una vez que los EBs se pasan a placas adherentes, las células comienzan a colonizar la superficie de los pocillos, quedando los cardiomiocitos principalmente en los EBs. Sin embargo también pueden observarse zonas latidoras fuera de los EBs (Figura 3.5, día 18). A medida que la diferenciación progresa, los cuerpos suelen juntarse y formar agregados, que luego, en general terminan en suspensión luego de seleccionar con zeocina, ya que las células que van colonizando la superficie de la placa de cultivo no son CM (Figura 3.5). Este protocolo se venía desarrollando en el laboratorio con una alta eficiencia, sin embargo la disgregación de los cuerpos para el análisis de los mismos al finalizar el protocolo resulta ineficiente y complicaba los estudios, por eso se decidió evaluar otro protocolo.

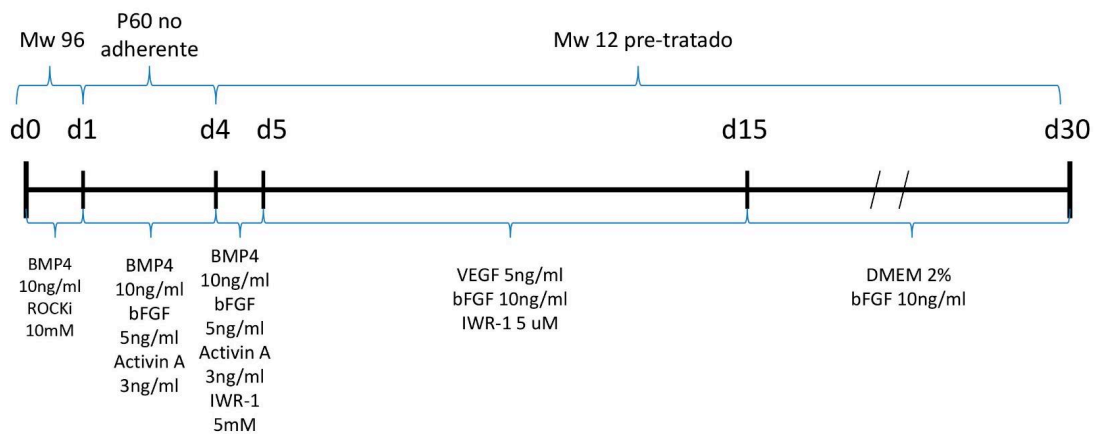


Figura 3.3. Diferenciación cardíaca con EBs. A) Esquema del protocolo empleado para la diferenciación cardíaca a partir de EBs.

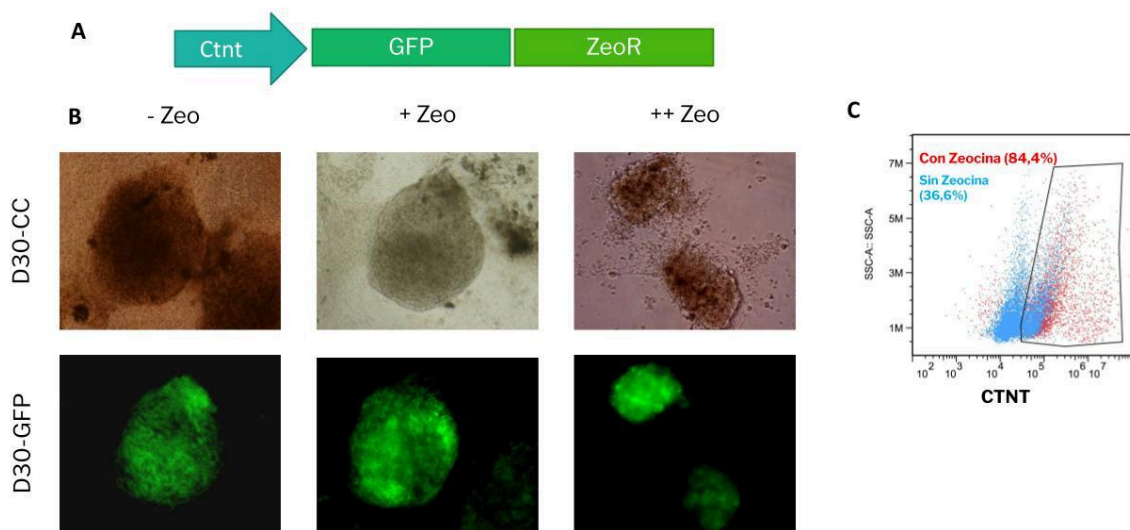


Figura 3.4. Selección cardíaca con la línea H9-CTNT. A) Esquema de la construcción de la línea H9-ctnt. B) Microscopías obtenidas a los 30 días de la diferenciación cardíaca para células H9ctnt sin selección con Zeocina, con un pulso de selección y con dos pulsos de selección. C) Eficiencia del protocolo de diferenciación a los 30 días, evaluado por citometría de flujo, con selección con Zeocina (rojo), y sin selección (celeste).

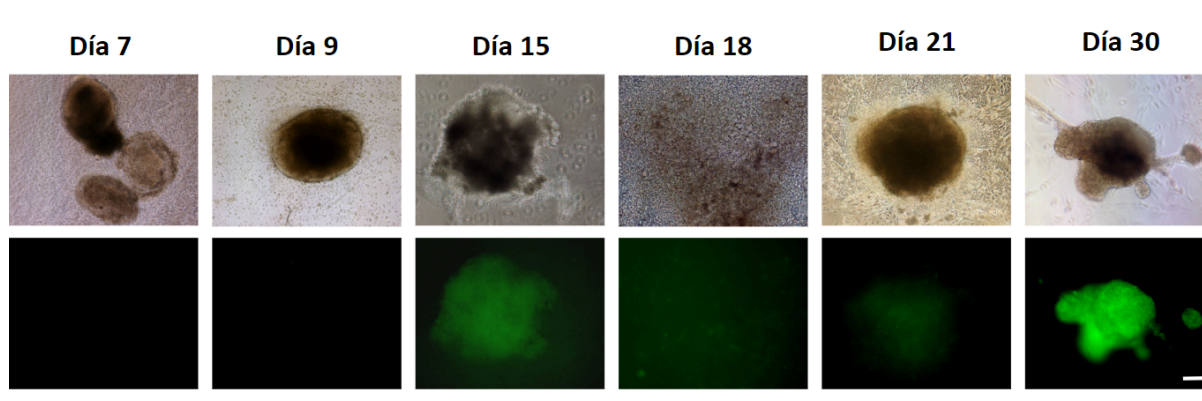


Figura 3.5. Diferenciación cardíaca a partir de CME con el protocolo de EBs en la fase de adherencia. Imágenes representativas de campo claro y de fluorescencia de GFP en diferenciación cardíaca a partir de EBs. Barra de escala: 200 μ m.

3.1.3 Diferenciación cardíaca partiendo de un cultivo en monocapa

El otro protocolo de diferenciación cardíaca a partir de células madre utilizado proviene de una adaptación del desarrollado por Lian y col. (2012.B). En éste las iPSC se cultivan en monocapa sobre una matriz definida de Geltrex y se emplean pequeñas moléculas que permiten la recapitulación del desarrollo cardíaco. Este protocolo tiene una duración de 21 días, incluyendo un paso de selección metabólica que permite aumentar la pureza de los CM-iPSC. En resumen, se plaquean 220.000 células por pocillo de placa de mw24, con 1 μ M de inhibidor de ROCK y 1ml de mTeSR o StemFlex. Luego de 4 días se llega a un 100% de confluencia. En el día 0 se cambia el medio por RPMI con B27 sin insulina y CHIR 99021 10 μ M. A las 24 hs se retira el CHIR 99021 y se observa alto grado de muerte celular, generando espacios en la monocapa (Figura 3.7). En el día 3 se retira la mitad del medio viejo y se agrega el mismo volumen de RPMI con B27 sin insulina más 5 μ M de IWP-2 (Inhibidor de la vía de Wnt) y se observa nuevamente una monocapa, pero con una estructura de redes (Figura 3.7). A las 24hs se retira el IWP-2, y al séptimo día se reemplaza el B27 por su versión con insulina; las redes se acentúan y pueden comenzar a verse zonas latidoras (Figura 3.6.A y Figura 3.7). Al finalizar el protocolo se puede observar un cultivo con alta proporción de CM-iPSC latidores y con marcación positiva para CTNT (Figura 3.6.B). Para enriquecer en CM-iPSC el cultivo se utiliza la diferencia metabólica existente entre los CM y las poblaciones celulares presentes en la diferenciación cardíaca. Para ello, se cultivan las células durante 6 días con medio de enriquecimiento con lactato, sin glucosa. Durante este periodo se observa un aumento de muerte celular y menor actividad contráctil (Figura 3.6.C). Esta actividad

se recupera luego de 48hs con medio de mantenimiento (Figura 3.7). Como se siguen manteniendo cúmulos celulares que dificultan la visualización de la morfología celular y de los núcleos celulares por medio de microscopía, se decidió levantar las células en el día 21 del protocolo de diferenciación y volver a sembrarlas. Generalmente abriendo 1 pocillo a 4 pocillos, sobre geltrex, disgregándolos con Tryple 10x de manera de dejarlos unicelulares y liberando las células de la matriz extracelular que se genera durante el proceso de diferenciación cardíaca. Al resembrar los cardiomiocitos el día 21 se obtiene una pureza aproximada del 100%, manteniendo la actividad contráctil de las células (Figura 3.9). Cuando el cultivo se mantiene más días se van observando cambios morfológicos, los cuales serán estudiados más adelante.

Por lo tanto, este protocolo no solo resulta más eficiente si no que también facilita la disgregación de las células para el posterior análisis y es más económico dado que no precisa del uso de factores de transcripción como BMP4 o Activina A, que son más costosos que los inhibidores.

Se realizó una caracterización del protocolo de diferenciación cardíaca por medio de la evaluación del ARNm por medio de RT-qPCR. Se analizaron tres factores de transcripción que se encuentran asociados a la población cardíaca y que podían llegar a ser de interés a la hora de evaluar el ciclo celular cardíaco (GATA4, MEIS1 y TBX20). Se observa un aumento de la expresión de estos tres factores de transcripción a medida que progresa la diferenciación cardíaca (Figura 3.8).

Un objetivo planteado en esta tesis es conseguir un CM-iPSC capaz de ser criopreservado y luego poder descongelarlo y mantenerlo en cultivo. Para evaluar esta resistencia y el efecto que genera el congelado/descongelado de los CM-iPSC, luego del día 21 del protocolo de diferenciación cardíaca las células son disgregadas con TrypLE 10x y criopreservadas en nitrógeno líquido con 90% SFB más 10% DMSO. Al descongelar las células se las mantiene las primeras 24hs con Y-27632 y en un medio con KSR, y a las 24hs se observa buena viabilidad y adherencia de las células a la placa de cultivo tratada con geltrex, manteniendo la actividad contráctil (Figura 3.9). Al igual que al resembrar los CM-iPSC se observa un aumento de la pureza del cultivo. Los CM-iPSCS mantienen la actividad contráctil y la viabilidad con el paso del tiempo, aunque va cambiando la morfología de los mismos (Figura 3.9).

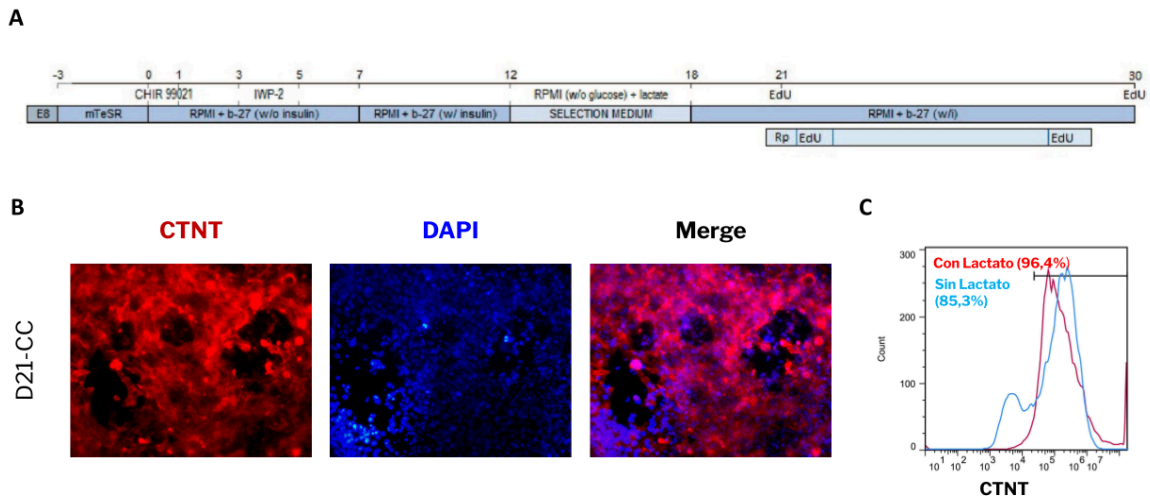


Figura 3.6. Diferenciación cardíaca a partir de iPSC con el protocolo de monocapa. A) Esquema del protocolo de monocapa, que incluye la selección metabólica y el tratamiento con EdU para el estudio del ciclo celular. B) Imágenes representativas de inmunofluorescencia del día 21 del protocolo de diferenciación cardíaca. En rojo se observa la marcación de CTNT y los núcleos se marcan con DAPI en azul. C) Gráfico de citometría con la cuantificación de las células CTNT positivas para un protocolo de 21 días sin selección metabólica (celeste, 85,3% CTNT) y para selección con medio enriquecido con lactato (rojo, 96,4% CTNT).

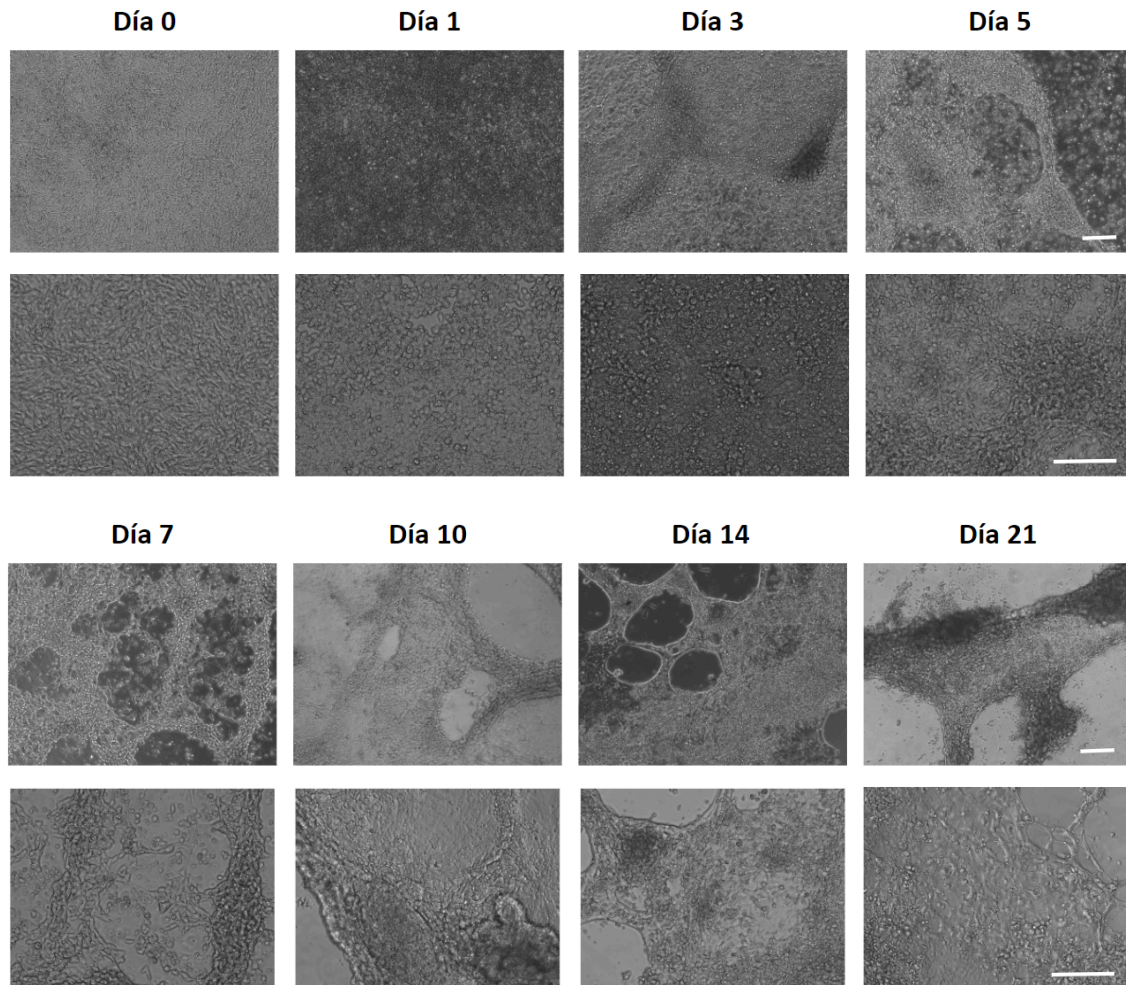


Figura 3.7. Diferenciación cardíaca a partir de iPSC con el protocolo de monocapa. Imágenes de microscopía en campo claro, representativas del protocolo de diferenciación cardíaca en monocapa. Barra de escala: 200 μm .

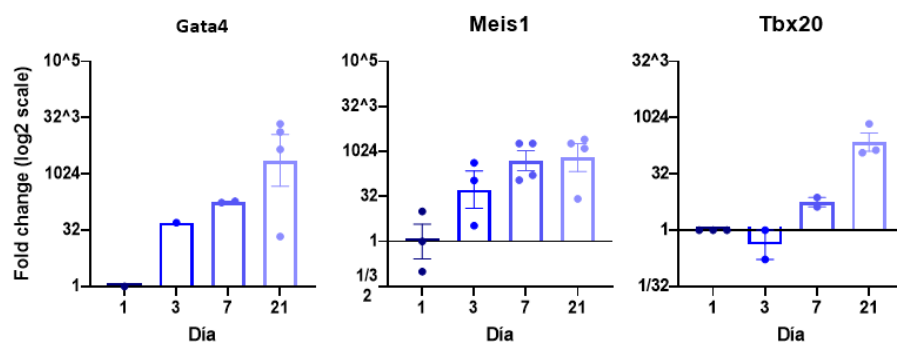


Figura 3.8. Cuantificación por RT-qPCR de los factores de transcripción, *gata4*, *meis1* y *tbx20*. Se realizó el análisis de la cantidad inicial de ARNm, normalizando a RPL7 y relativizando a día 1. Los resultados se presentan como la media \pm SEM.

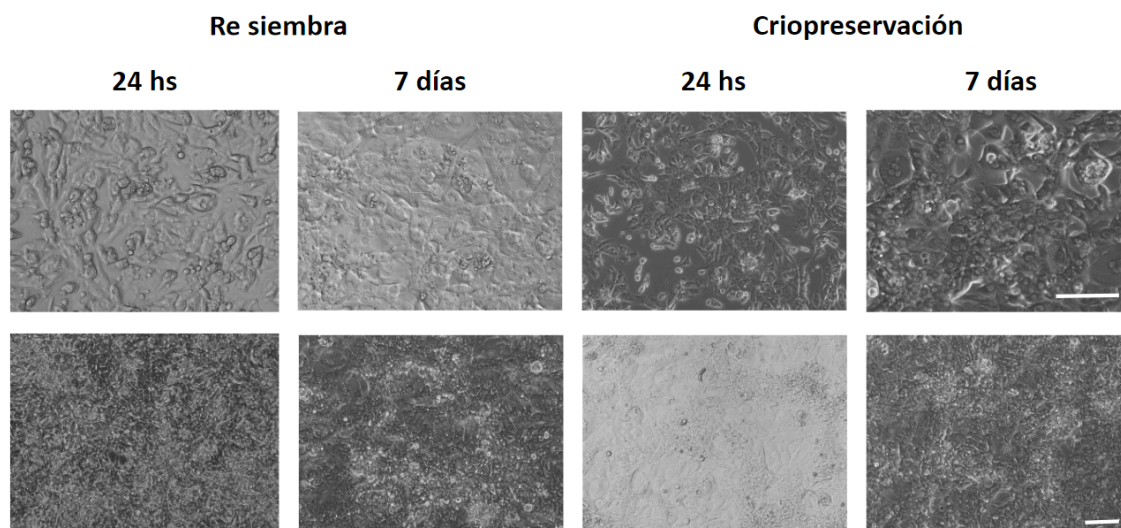


Figura 3.9. Estabilidad de CM-iPSC luego de ser resembrados o criopreservados. Imágenes de microscopía en campo claro representativas de CM-iPSC luego de 24hs o 7 días de haber sido resembrados o descongelados. Barra de escala: 200 μ m.

3.1.4 Construcción de una línea FUCCI-iPSC

Se generó una línea celular FUCCI (*Fluorescent Ubiquitination-Based Cell Cycle Indicator*) con el objetivo de poder evaluar el estado del ciclo celular en los distintos procesos. El sistema sensor FUCCI, consiste en un sistema basado en proteínas de fluorescencia que emplea proteínas fluorescentes de fusión, mCherry y mVenus unidas a dos reguladores distintos del ciclo celular (GEMININ y CDT1). Durante el ciclo celular, estas dos proteínas son ubiquitinadas por ubiquitin E3 ligasas específicas, que targetean las proteínas hacia degradación por proteasoma. La E3 ligasa posee una regulación temporal de su actividad lo cual resulta en un ciclo bifásico de los niveles de GEMININ y CDT1 durante el ciclo celular. En la fase G1 del ciclo celular, GEMININ se degrada; entonces solo CDT1 fusionado con mCherry está presente y el núcleo se ve rojo. En las fases S, G2, y M, CDT1 se degrada y solo GEMININ fusionada con GFP queda, dando como resultado células con núcleos verdes fluorescentes. Por otro lado, durante la transición G1/S, cuando los niveles de CDT1 decrecen y los de GEMININ aumentan, ambas proteínas están presentes, y al superponer imágenes en verde y rojo, los núcleos aparecen en fluorescencia amarilla (Figura 3.10).

Para generar la línea FUCCI estable de iPSC humanas, se utilizó la línea generada previamente en este laboratorio, FN2.1 (Questa y col., 2016). Los plásmidos utilizados fueron los construidos previamente por Waisman y col. (2017), ePB-CAG::Venus-Gem(1-110)-PURO,

ePB-CAG::mCherry-CDT1(30-120)-BSD. Estos dos plásmidos junto al plásmido de la transposasa (ePBac-Transposase) fueron transfectados con X-tremegene reagent (Sigma). Las células fueron seleccionadas con puomicina, blastidina y neomicina y se obtuvieron 9 líneas clonales. Estas líneas fueron caracterizadas en base a la fluorescencia y la capacidad de diferenciarse a cardiomiocitos. Se seleccionó el clon 9 para seguir con los experimentos ya que resultó más eficiente a la hora de realizar el protocolo de diferenciación (Figura 3.11.A), presentó una buena intensidad de fluorescencia a lo largo de la diferenciación (Figura 3.11.B) y también pudo cuantificarse la fluorescencia de mVenus por citometría (Figura 3.11.C).

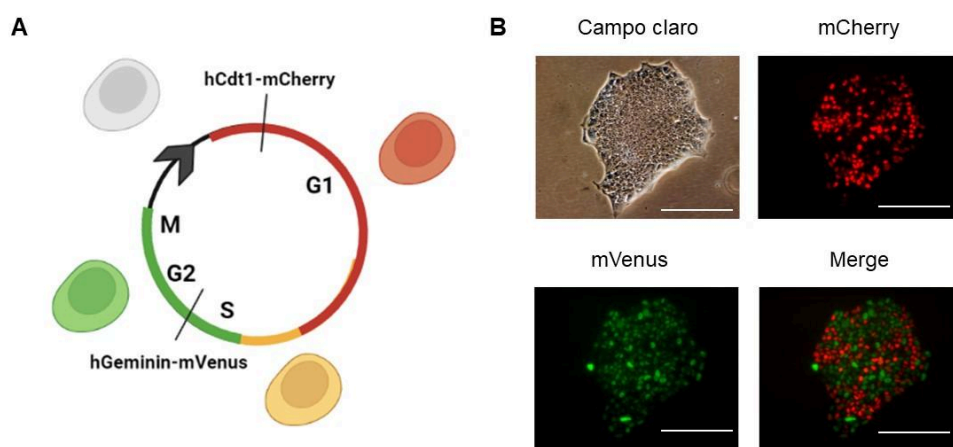


Figura 3.10. Sistema FUCCI. A) Esquema de la dinámica de fluorescencias del sistema FUCCI a lo largo del ciclo celular. Las células recién divididas que se encuentran en G1 temprano o G0 no poseen fluorescencia, luego al ingresar en la fase G1 presentan fluorescencia roja. Cuando las células entran en la transición de G1 a la fase S se observa fluorescencia amarilla, y durante las fases S, G2 y M las células presentan únicamente fluorescencia verde. B) Imágenes de microscopía de fluorescencia del clon de iPSC seleccionado para establecer el banco celular de trabajo. Se puede observar una colonia de iPSC en campo claro, en rojo la expresión CDT1 y en verde de GEMININ. Barra de escala: 200 μ m.

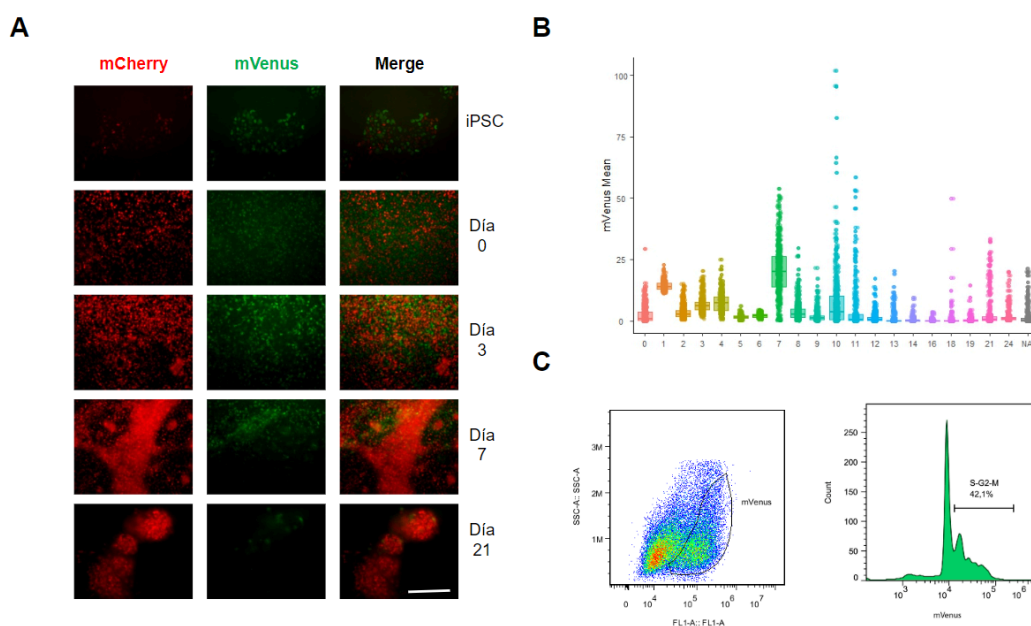


Figura 3.11. Caracterización del clon 9 de FUCCI-iPSC. A) Patrón de fluorescencia de las células Fucci durante el protocolo de diferenciación cardíaca. Barra de escala: 200 μ m. B) Patrón de intensidad de fluorescencia de mVenus de los núcleos de las distintas poblaciones celulares durante la diferenciación cardíaca. C) Imágenes representativas de la cuantificación de mVenus por citometría de flujo.

3.1.5 Conclusión parcial

En este primer capítulo, se describieron las herramientas de biología celular desarrolladas en el doctorado para el cumplimiento de los objetivos planteados. En primer lugar, se evaluaron tres protocolos de diferenciación cardíaca a partir de células madre humanas, tanto con CME como iPSC. También se plantearon dos protocolos de purificación de los CM-iPSC, el primero exclusivo para la línea CME H9-Ctnt, y el segundo para cualquier línea celular ya que tiene en cuenta las características metabólicas de los CM. De aquí se realizó una comparación de eficiencia de los protocolos por medio de la cuantificación por citometría de las células positivas para la marcación de CTNT, obteniendo mejor resultado y mayor reproducibilidad para el protocolo en monocapa (Figura 3.12). También se evaluó la capacidad de los CM-iPSC a ser levantados del plato de cultivo y luego volver a sembrarlos, o bien criopreservarlos.

Entonces, se pudo desarrollar un protocolo de diferenciación cardíaca a partir de iPSC con buena reproducibilidad y alta eficiencia. Este CM-iPSC resultó resistente a los procesos de resiembra y

criopreservación, observándose actividad contráctil, aún una semana después. Se continuará evaluando las características de estas células.

En segundo lugar, se desarrolló una línea celular de iPSC humana con un sistema reportero, FUCCI, que permite por medio del estudio de la fluorescencia de los núcleos determinar en qué estadio del ciclo celular se encuentran las células.

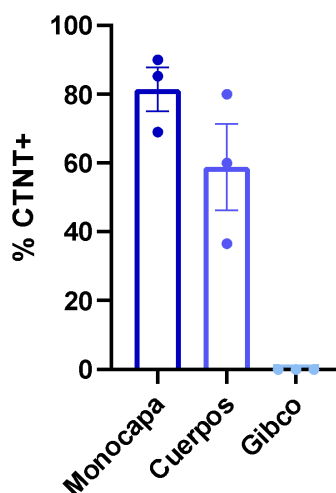


Figura 3.12. Comparación de protocolos de diferenciación cardíaca. Gráfico de citometría donde se comparan las eficiencias obtenidas para los diferentes protocolos de diferenciación evaluados, por medio de la cuantificación de células positivas para CTNT respecto del total de eventos celulares cuantificados. Los resultados se presentan como la media \pm SEM.

Capítulo 2: Ciclo celular durante la diferenciación cardíaca

3.2.1 Caracterización del ciclo celular cardíaco

Para continuar con el siguiente objetivo de evaluar el ciclo celular de iPSC-CM se utilizó el sistema reportero FUCCI (Figura 3.14) y la detección de la incorporación de EdU a los núcleos celulares (Figura 3.13) a distintos tiempos del protocolo de diferenciación. Inicialmente se evaluó la incorporación de EdU por citometría utilizando el *Click-iT EdU Flow Cytometry Assay Kit* (Thermo), con los fluoróforos Alexa 647. Este ensayo se realizó con una marcación conjunta con IP, ya que la incorporación conjunta de IP y EdU nos indica las células que se encuentran en la

fase S del ciclo celular, mientras que si solo incorporan IP se pueden encontrar en las fases G2 o M (Figura 3.14.B). Se observó una disminución del ciclo celular con el progreso de la diferenciación cardíaca. Los iPSC-CM fueron evaluados luego de la purificación a día 21 y día 30 del protocolo de diferenciación cardíaca. Tanto el análisis con FUCCI como con EdU reveló que a día 21 hay aproximadamente un 10% de iPSC-CM que se encuentran ciclando, mientras que a día 30 este porcentaje disminuye llegando a valores casi nulos. Esto nos permitió identificar dos puntos para encarar posteriormente dos estrategias distintas, evitar la salida del ciclo celular de los iPSC-CM a día 21, y buscar el re-ingreso al ciclo celular en el día 30.

Se evaluó la expresión de distintos genes relacionados con el ciclo celular, como ciclinas e inhibidores de ciclinas estudiando la expresión del ARNm por medio de RT-qPCR (Figura 3.15). Se eligió estudiar p21 y p15 por su posible relación con el factor MEIS1, el cual por bibliografía se encuentra relacionado con la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos. También se eligió estudiar el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p27, ya que al igual que p21 se expresa diferencialmente durante el desarrollo cardíaco. En general, se observa gran variabilidad en la expresión del ARNm en las muestras tomadas a lo largo del protocolo de diferenciación cardíaca. No se observa variación en la expresión de p27 y p21, pero si hay un aumento de p15 en el día 21 del protocolo. Tampoco se observaron diferencias en la expresión del ARNm de CDK10, ni de las ciclinas D1 y E1. Es oportuno destacar que los cambios en la actividad de las ciclinas y de los inhibidores de ciclinas pueden no verse reflejados en la expresión del ARNm y tener efectos a nivel de activación proteica por modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación.

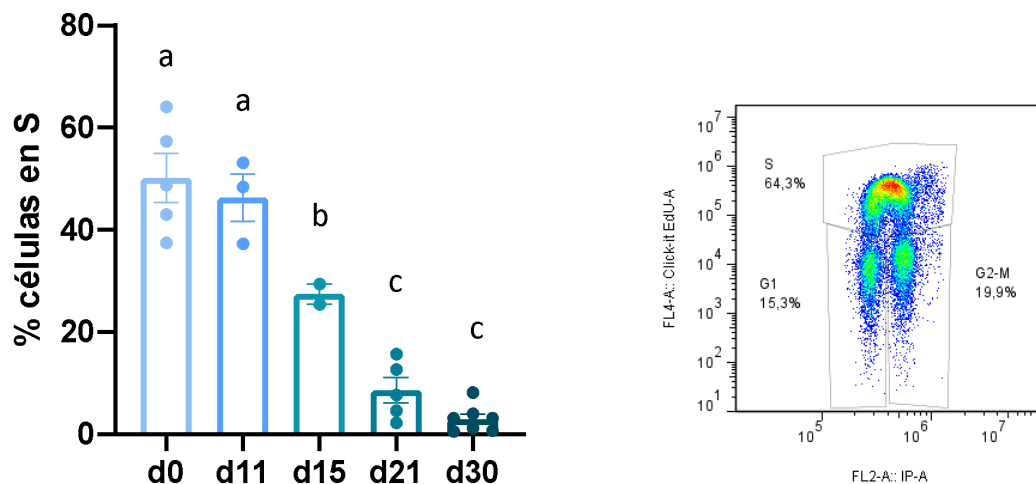


Figura 3.13. Proliferación celular durante el protocolo de diferenciación cardíaca a partir de iPSC. A. Porcentaje de células en fase S del ciclo celular. La cuantificación se realizó por citometría. En las poblaciones d21 y d30, se seleccionaron las células positivas para CTNT. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Con las distintas letras se indican las diferencias significativas (ANOVA + Tukey) B. Gráfico representativo de las poblaciones observadas en el análisis del ciclo celular con EdU e IP.

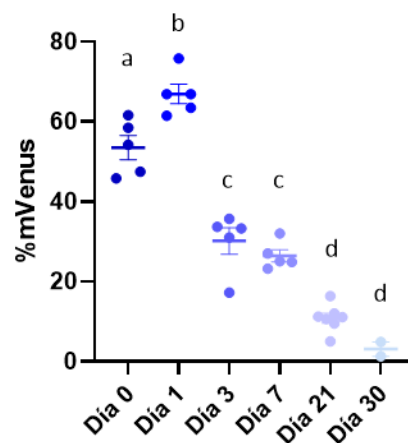


Figura 3.14. Proliferación celular durante el protocolo de diferenciación cardíaca a partir de iPSC. Porcentaje de núcleos positivos para fluorescencia de mVenus. Se cuantificaron aproximadamente 500 células por n por condición (n=5). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Con las distintas letras se indican las diferencias significativas (ANOVA + Tukey, $p < 0.05$).

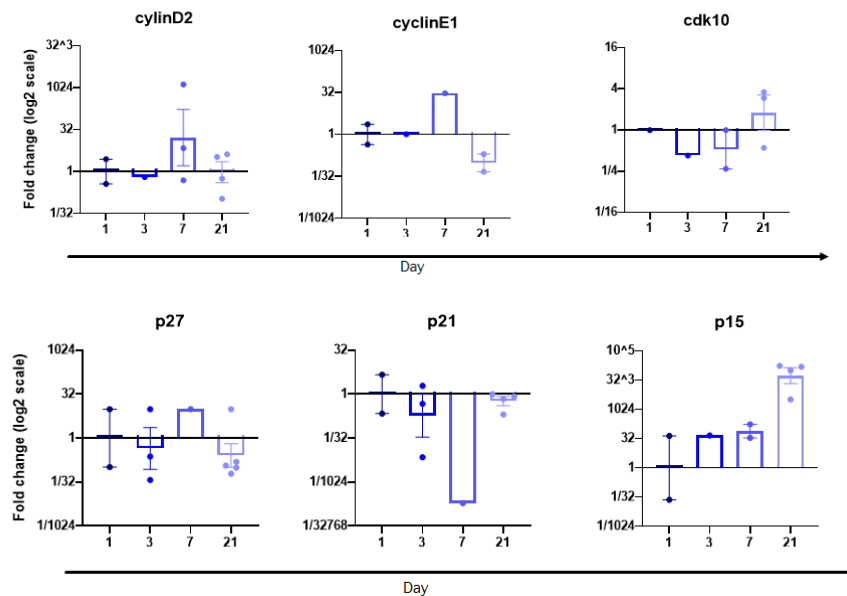


Figura 3.15. Genes involucrados en el ciclo celular. Cuantificación por RT-qPCR de las ciclinas D2 y E1, CDK10 y los CDKi, p21, p27 y p15. Se realizó el análisis de la cantidad inicial de ARNm, normalizando a RPL7 y relativizando a día 1. Los resultados se presentan como la media \pm SEM

3.2.2 Conclusiones parciales

Tanto por el análisis de incorporación de EdU como por la evaluación de la fluorescencia de los núcleos en la línea celular FUCCI, se pudo ver que a medida que avanza el protocolo de diferenciación, las células van saliendo del ciclo celular. Al no diferenciar los tipos celulares no se puede saber específicamente cómo es la dinámica de proliferación de cada uno, pero en el análisis general se puede ver que a las 24hs de haber agregado CHIR 99021 hay un pico de células en las fase S/G2/M, y luego va disminuyendo con el paso de los días manteniéndose en niveles cercanos a 30% en el día 3, cuando la mayoría de las células ya tiene un compromiso de mesodermo cardíaco y también en el día 7, cuando ya se observan zonas latidoras. Sin embargo la cantidad de células en S/G2/M se reduce al 10% al llegar al día 21, y a día 31 es casi nula. Por otro lado, si analizamos la dinámica de incorporación de EdU e IP en los núcleos, permitiéndonos cuantificar aquellas células que se encuentran en la fase S, vemos el mismo patrón de disminución en la proliferación a medida que avanza el protocolo de diferenciación cardíaca. En este último caso, para los días 21 y 30 para el análisis se seleccionaron las células que a su vez tenían marcación positiva para CTNT.

En cuanto al estudio de la expresión de algunos genes involucrados en el ciclo celular, primero quiero aclarar que podría haber sido útil estudiar no solo estos genes, sino también p18, p57,

p38, p53, p130, p107, RB, CDK4, CDK6, CDK2, CDK1, las ciclinas D2, A y B, ya que estas proteínas son las que se describieron en la introducción como las encargadas de regular el ciclo celular de los cardiomiocitos (Figura 1.3). Sin embargo, se seleccionaron algunos genes, pero los niveles de expresión resultaron muy variables, lo cual no permitió sacar conclusiones de ese análisis. Se esperaba ver un aumento de los inhibidores de ciclinas, como el observado para p15. Este resultado se ve apoyado por la detección del aumento de la expresión de MEIS (Figura 3.8), ya que este factor de transcripción activa la expresión de p15 y de esta forma actúan inhibiendo la proliferación de cardiomiocitos adultos (Mahmoud y col., 2013).

En función de estos resultados, se pueden plantear dos estrategias, por un lado, evitar la salida del ciclo celular de los iPSC-CM a día 21, o bien buscar el re-ingreso al ciclo celular en el día 30 del protocolo de diferenciación cardíaca.

Capítulo 3: Estrategias para el aumento de la proliferación de CM-iPSC

En este capítulo se evaluarán distintas estrategias elegidas en función de la bibliografía y la experiencia previa en el laboratorio. En primer lugar se investigará si la inhibición de p38 con el inhibidor SB203580 y/o el tratamiento con FGF1 permiten el reingreso al ciclo celular de los CM-iPSC humanos. Luego, por datos previos en el laboratorio donde se estudiaron los genes target del mir520a al realizar un ensayo de AgoIP en CM-iPSC y en iPSC, se decidió evaluar el efecto del agregado exógeno del mir520a en el re ingreso al ciclo celular de los CM-iPSC. Por medio del estudio de los datos obtenidos de la AgoIP para los CM-iPSC se estudiaron los genes targets que podrían justificar los resultados obtenidos. También se evaluó la capacidad de los CM-iPSC para mantener su proliferación luego ser tratados con el medio condicionado de las WJ-MSC y a través del estudio de la proteómica del medio se buscó identificar posibles candidatos que justificaran el efecto observado.

Por último, en función de estos ensayos y observando un aumento en la proliferación de los CM-iPSC luego de ser sembrados al día 21 del protocolo de diferenciación, se decidió estudiar en mayor profundidad los efectos del sembrado y el mantenimiento de estas células a lo largo del tiempo, como así también evaluar las posibles causas y consecuencias de esta técnica.

3.3.1 Evaluación de los efectos producidos por la inhibición de p38 y el tratamiento con FGFa

En la introducción de esta tesis se ha descrito que la administración conjunta de FGFa e inhibidores de p38 resulta ser protectora en la isquemia cardíaca, disminuyendo la apoptosis de cardiomiocitos (Baines y col., 2004) y aumentando la proliferación de células miocárdicas adultas (Engel y col., 2006). Por lo tanto, se postula que el tratamiento con SB203580, inhibidor de p38 y con FGFa los CM-iPSC que han dejado de ciclar pueden volver a reingresar en el ciclo celular. Para ello, se realizó un protocolo de diferenciación cardíaca en monocapa, el día 21 las células fueron re sembradas, ya que eso permite un mejor análisis de la fluorescencia nuclear y aumenta la pureza del cultivo. El día 22 se les cambió el medio y se mantuvieron hasta el día 28 con RPMI más B27 con insulina ya que luego de una semana de resembrar el cultivo se ve una significativa disminución de la proliferación de los CM-iPSC, cercana a valores nulos. Para este ensayo se utilizaron Fucci-iPSC y se analizó el porcentaje de núcleos mVenus positivos por medio de microfotografías y por citometría. Los CM-iPSC fueron tratados con SB203580 (5 μ M y 10 μ M) y con FGFa (50 ng/ml y 100 ng/ml), de forma individual o conjunta. Se tomaron microfotografías de fluorescencia luego de 24, 48 y 72 horas del tratamiento (Figura 3.16) y se cuantificó el porcentaje de núcleos positivos para mVenus, no observándose diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Figura 3.17).

Se repitió el mismo ensayo pero cuantificando las células positivas para mVenus por citometría. En este caso solo se observó diferencias significativas ($p < 0.05$) en la comparación del control ($6,77 \pm 0,39$) con el tratamiento con 100 ng/ml FGFa ($11,53 \pm 0,48$), a las 48 hs. Para el resto de los tratamientos, nuevamente no se observaron diferencias significativas.

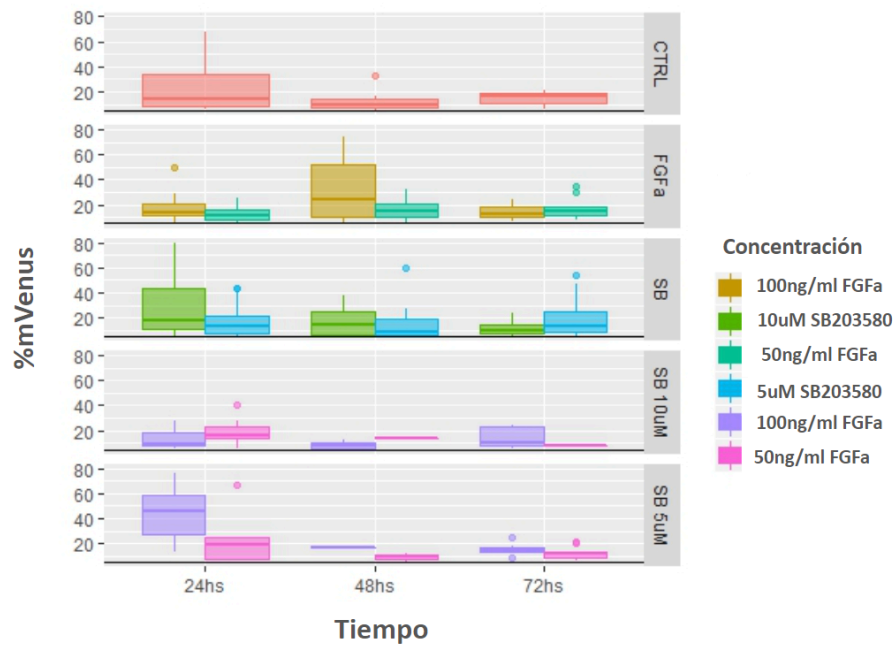


Figura 3.16. Efecto en el ciclo celular de CM-iPSC por el tratamiento con inhibidor de p38 y/o FGfA. Gráfico de boxplot donde los puntos indican datos aislados (N=3). Se cuantificó el porcentaje de núcleos positivos para mVenus de los CM-FUCCI-iPSC. Se evaluaron células control o tratadas con 5 μ M o 10 μ M de SB203580 (SB) o 50 ng/ml o 100 ng/ml de FGfA y se tomaron microfotografías a las 24, 48 y 72hs.

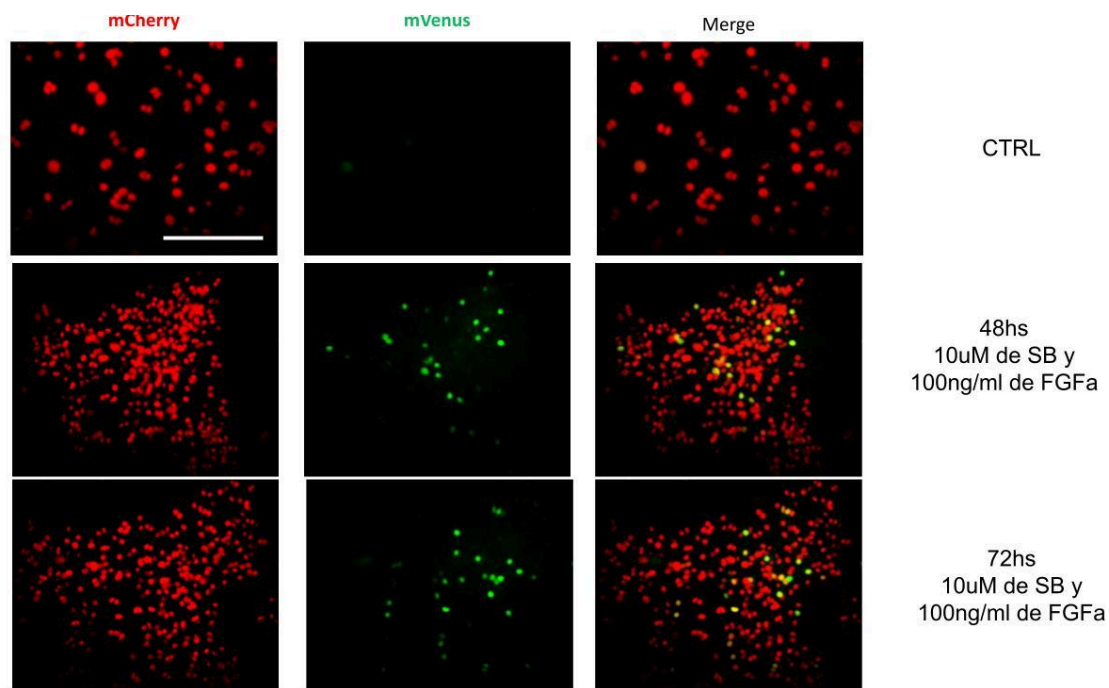


Figura 3.17. Tratamiento de CM-iPSC con SB203580 y FGfA. Imágenes representativas de CM-FUCCI-iPSC tratados conjuntamente con 10 μ M de SB203580 (SB) y 100 ng/ml de FGF1, luego de 48 hs y 72 hs. Barra de escala: 200 μ m.

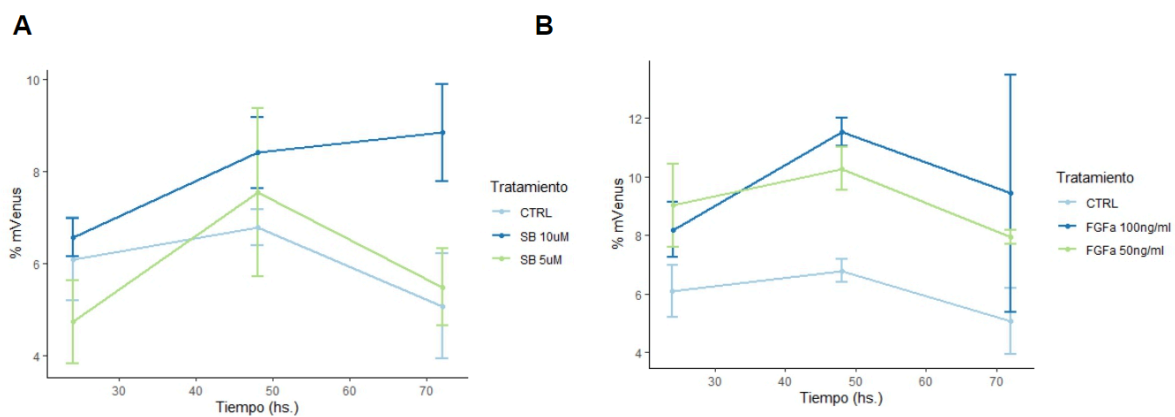


Figura 3.18. Tratamiento de CM-iPSC con SB203580 y FGfA. A) Cuantificación por citometría del porcentaje de células positivas para mVenus para CM-FUCCI-iPSCs control y tratados con 5 μ M o 10 μ M del inhibidor de p38, SB203580 (SB). Se evaluó a las 24, 48 y 72 hs después del tratamiento (N=3). B) Cuantificación por citometría del porcentaje de núcleos positivos para mVenus a las 24, 48 y 72hs luego de la incubación con 50 ng/ml o 100 ng/ml FGfA. Los resultados se representan como la media \pm SE (N=3).

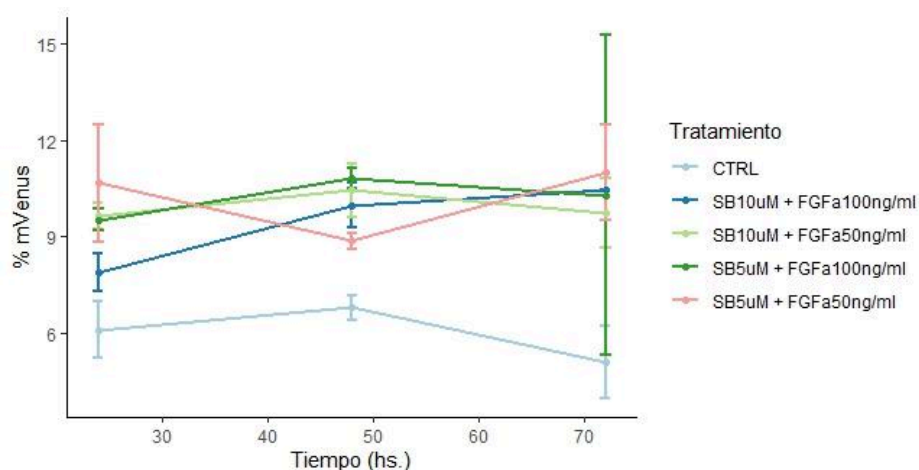


Figura 3.19. Tratamiento conjunto con SB y FGfA. Fucci-iPSC-CMs fueron tratados conjuntamente con 5 μ M o 10 μ M de SB203580 (SB) y 50 ng/ml o 100 ng/ml de FGfA. Se cuantificó por citometría el porcentaje de células positivas para mVenus a las 24, 48 y 72hs luego de la incubación. Los resultados se representan como la media \pm SE.

3.3.2 Estudio del ciclo celular de CM-iPSC por el tratamiento con el mimic mir-520a

Con el fin de determinar si el miR-520a podría tener un efecto promotor de la proliferación de los CM-iPSC, se realizó una transfección de estas células con un mimic del miR-520a (molécula de RNA pequeño que posee la misma secuencia que el microRNA en estudio). Para este ensayo se utilizaron Fucci-iPSC, se realizó el protocolo de diferenciación en monocapa, al día 21 los CM-iPSC son re sembrados, a las 24 hs se realiza el cambio de medio y se comienza con el tratamiento. De esta manera, se facilita el estudio del ciclo celular por medio de microscopía al poder visualizar los núcleos individualmente y también se observan CM-iPSC en S/G2/M antes de iniciar con el tratamiento. La transfección de los CM-iPSC se realizó con Lipofectamina RNAiMAX (*Thermo Fisher*). Como control de la transfección empleamos un pre-microRNA acoplado al fluorocromo Cy3 (Cy3M Dye-Labeled Pre-miR Negative Control, *Thermo Fisher*) y se obtuvo una eficiencia de transfección de aproximadamente 40% (Figura 3.20). Entonces, los CMs-Fucci-iPSC fueron replaqueados el día 21 del protocolo de diferenciación y a las 24 horas se transfectaron con 10nM de miR520a-mimic o 10 nM del mimic control negativo. Se tomaron microfotografías de fluorescencia luego de 24 y 48 horas de transfección (Figura 3.21). Se cuantificaron los cardiomiocitos en S/G2/M en 4 experimentos independientes (Figura 3.22). El

porcentaje de proliferación luego de 48hs fue $5,3 \pm 0,5$ y $16,5 \pm 6,5$, para mimic-ctrl y mimic-miR520a, respectivamente ($p < 0.05$). Por otro lado, se decidió evaluar si el aumento de núcleos en S/G2/M implicaba que las células eran capaces de continuar con la división celular o si llegaban a la cariocinesis pero sin citocinesis. Para ello se cuantificaron las células binucleadas en ambas condiciones y no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos (Mimic-control: $8,46 \pm 3,07$ (n=3); mimic-miR520a: $12,92 \pm 2,88$ (n=3); $p > 0.05$); Figura 3.23).

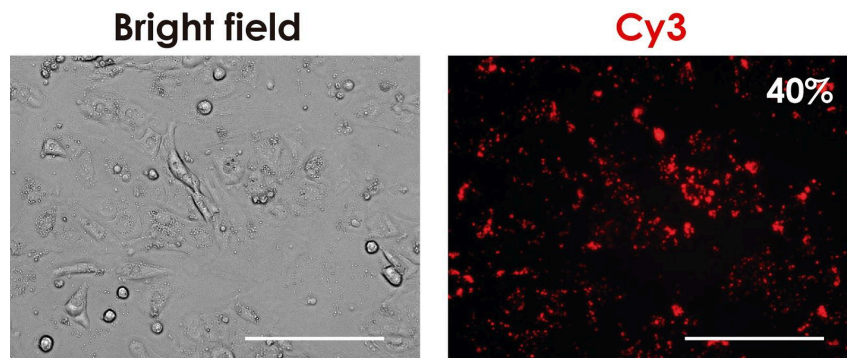


Figura 3.20. Control de transfección. Imágenes de microscopía de fluorescencia donde se muestra la eficiencia de transfección en hiPSC-CMs. El control de transfección se realizó con un pre-microRNA acoplado al fluorocromo Cy3. Barra de escala: 200 μ m.

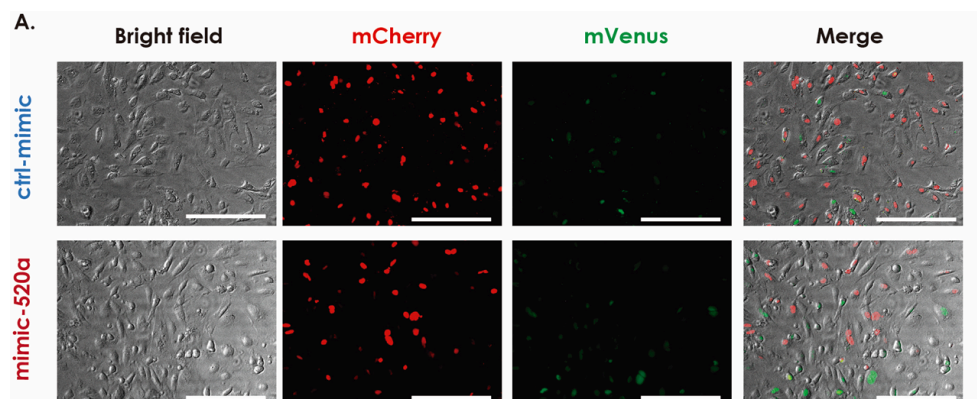


Figura 3.21. Transfección de CM-iPSC para evaluar el efecto del mir-520a. Imágenes de microscopía de fluorescencia luego de 48hs de realizada la transfección. Con mCherry (rojo) se marcan los núcleos en G1, mientras que con mVenus (verde) aquellos que están en S/G2/M. Los CM-iPSC fueron transfectadas con 10 nM mimic-miR-520a o 10 nM mimic negativo. La barra representa 200 μ m.

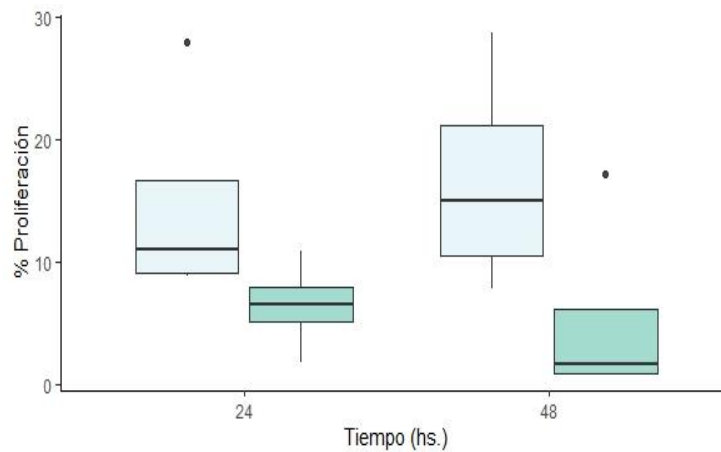


Figura 3.22. Cuantificación de CM-iPSC positivos para mVenus luego del tratamiento con mir-520a. Cuantificación de cardiomiocitos proliferativos para 4 experimentos independientes donde los CM-iPSC fueron transfectados con 10 nM el mimic de miR-520a (celeste claro) o 10 nM mimic negativo (verde).

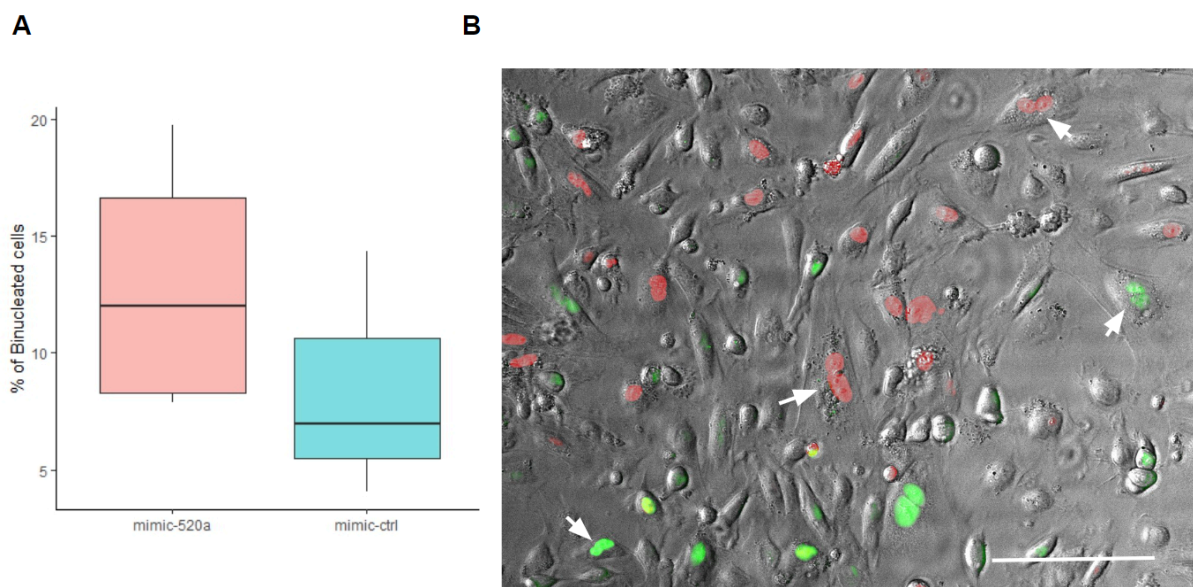


Figura 3.23. Estudio de la binucleación de CM-iPSC. A). Cuantificación de hiPSC-CM binucleados de 3 réplicas para la condición control y 4 para la transfección con el mimic-miR520a (ns). B) Imagen representativa de CM-hiPSCs transfectados con mimic-miR520a. Las flechas blancas indican células binucleadas, tanto en S/G2/M como en G1. La barra representa 200 μm.

Previamente en nuestro laboratorio se realizó un ensayo de AGO-IP en iPSC-CMs para estudiar los genes target regulados por el miR-520. Para ello, se sobre expresó el miR-520a mediante el

mimic específico y luego se co-inmunoprecipitó la proteína Argonauta junto con los mensajeros que están cargados en el complejo RISC (Figura 3.24.A). Al sobreexpresar el miR-520a (que no se expresa normalmente en cardiomiocitos), la idea es enriquecer la población de RNA mensajeros que estarían cargados en RISC con los mensajeros target de dicho microRNA. Posteriormente, se determinó la identidad de los mensajeros mediante la secuenciación masiva de RNA.

Para el análisis de los datos obtenidos de la secuenciación masiva se siguió el pipeline que se muestra en la Figura 3.24.B. El primer paso fue analizar las lecturas crudas (reads) mediante el programa FastQC para confirmar la calidad de los datos. Luego, se realizó el mapeo de las reads contra el genoma de referencia (hg19) utilizando el programa STAR. A continuación, por medio del programa *RIPSeeker* se realizó un "*peak calling*" que permite dar identidad a las secuencias y cuantificar las abundancias absolutas y relativas al control (IgG). Se identificaron los mensajeros que se unieron diferencialmente a Argonauta al sobreexpresar el miR-520a versus el mimic control negativo, mediante el uso del paquete DESeq2 de *Bioconductor*. Se seleccionaron los genes cuyo *log2FoldChange* es mayor a 1 y así obtenemos 2529 genes que se unen diferencialmente a Argonauta cuando se sobreexpresa el miR-520a, con respecto al control negativo.

A partir de ésta lista, analizamos los términos de *Gene Ontology* con el fin de identificar los procesos biológicos en los que participa el miR-520a y que pudieran tener relación con el efecto proliferativo visto en los hiPSC-CMs. Mediante el software on-line, *Panther* (Mi H. y col., 2016) se analizaron los genes según los procesos biológicos (Figura 3.25). Entre los targets identificados por Panther encontramos genes relacionados con la proliferación celular (GO:0008283), como TGF β 2, TBRS, CCNB2, CDK2, DUSP22, AREG, CCNJ, CCNE2. También se procedió a analizar la lista de genes enriquecidos mediante el programa on-line WebGestalt (WEB-based Gene Set Analysis Toolkit; Wang J y col., 2017). A partir de un análisis de *Overrepresentation Enrichment Analysis* (ORA) se pudieron observar 224 genes relacionados con proliferación celular en la categoría correspondiente a procesos biológicos (barras rojas, Figura 3.26). Por otro lado, se procedió al análisis a partir de la base de datos de KEGG-pathway, donde se identificaron 807 genes en 20 categorías (Figura 3.27), entre las que se encuentran genes relacionados con ciclo celular (Figura 3.28). Los genes que poseen mayor nivel de sobreexpresión relacionado con el ciclo celular son WEE2, TGF β 2, TFDP1, SMC1A, SMAD4, ORC4, MATR3, GATM, FZR1, CDC27, CCNB2, ATMN, ATM y ANAPC7.d

A su vez, se realizó un análisis complementario in silico por medio del software MiRWalk2.0 (Dweep H y col., 2015) con el fin de evaluar los genes blanco predichos para el miR-520a. Esta

herramienta, al momento de uso, combina 12 programas predictores de genes blancos de miRNAs (DIANA-microTy4.0, DIANA-microT-CDS, miRanda-rel2010, mirBridge, miRDB4.0, miRmap, doRiNA, PicTar2, PITA, RNA22v2, RNAhybrid2.1 y Targetscan .2). Al comparar los targets predichos bioinformáticamente y los obtenidos por la Ago-IP, observamos que hay 491 genes que se vieron enriquecidos en la Ago-IP y que cumplen con los parámetros de predicción de MiRWalk, es decir, tienen complementariedad con la secuencia semilla del miR-520a, cumplen con los parámetros de conservación y poseen un contexto y un sitio de unión adecuado para el microRNA (Figura 3.29.A).

Analizando los resultados de MiRWalk separando por la región génica en la que se encuentra la secuencia complementaria a la semilla del miR-520a-3p observamos que la mayoría corresponden a la zona 3'UTR, que se conoce como una zona de alta regulación génica (Figura 3.29.E), luego a la región codificante (Figura 3.29.D), a la zona 5'UTR (Figura 3.29.C) y en menor medida a la región promotora (Figura 3.29.B). Por último, se realizó un Gene Ontology para los 491 genes blanco identificados in silico y por la Ago-IP. De esta lista se pudieron mapear 454 genes y 417 de ellos pudieron clasificarse en categorías funcionales según procesos biológicos (Figura 3.30) y según los "Pathways de KEGG" (Figura 3.31). Finalmente, se encontraron genes involucrados en la transición de G2/M (13 en GO:0000086 y 14 en GO:0044839). Es importante aclarar que dada la naturaleza exploratoria del ensayo Ago-IP, es necesario confirmar en un futuro mediante otras técnicas los genes blanco identificados.

Sin embargo, en un ensayo realizado previamente en el laboratorio con LNA no se habían observado diferencias significativas en el ciclo celular de iPSC (Figura 3.32). En este experimento las células fueron tratadas con un inhibidor denominado *miRCURY LNA power family inhibitor*, el cual bloquea la acción de 9 microARNs de la familia C19MC, entre ellos el miR-520a, y se estudió el ciclo celular de las iPSC control o con el LNA por medio de la incorporación de BrdU y de 7-AAD.

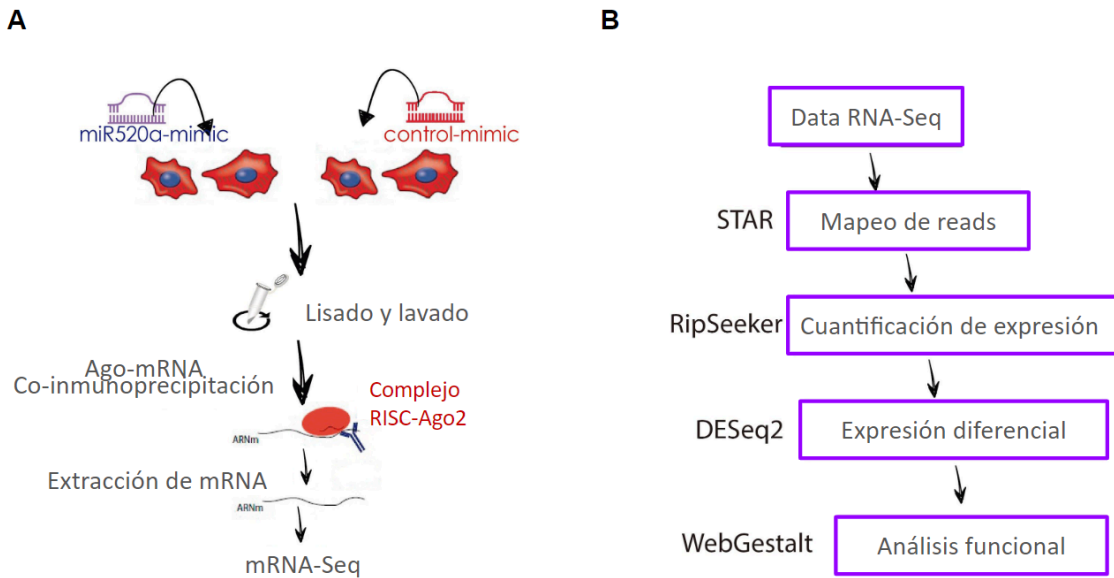


Figura 3.24. Ensayo de Ago-IP. A) Esquema del protocolo de AGO-IP realizado sobre hiPSC-CMs. B) Esquema del pipeline utilizado para el análisis de la secuenciación a partir de la AgoIP

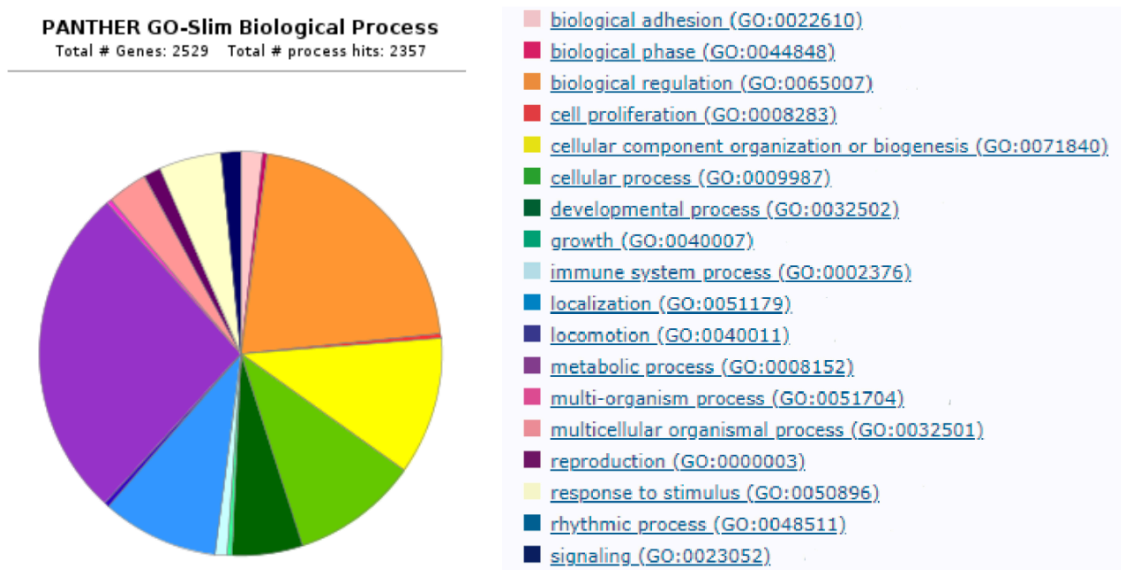


Figura 3.25. Procesos biológicos. Gráfico de torta donde se muestra la proporción de genes diferencialmente cargados en el complejo RISC de iPSC-CM transfectados con el mimic-miR520a, dentro de los Procesos Biológicos identificados según el programa Panther.

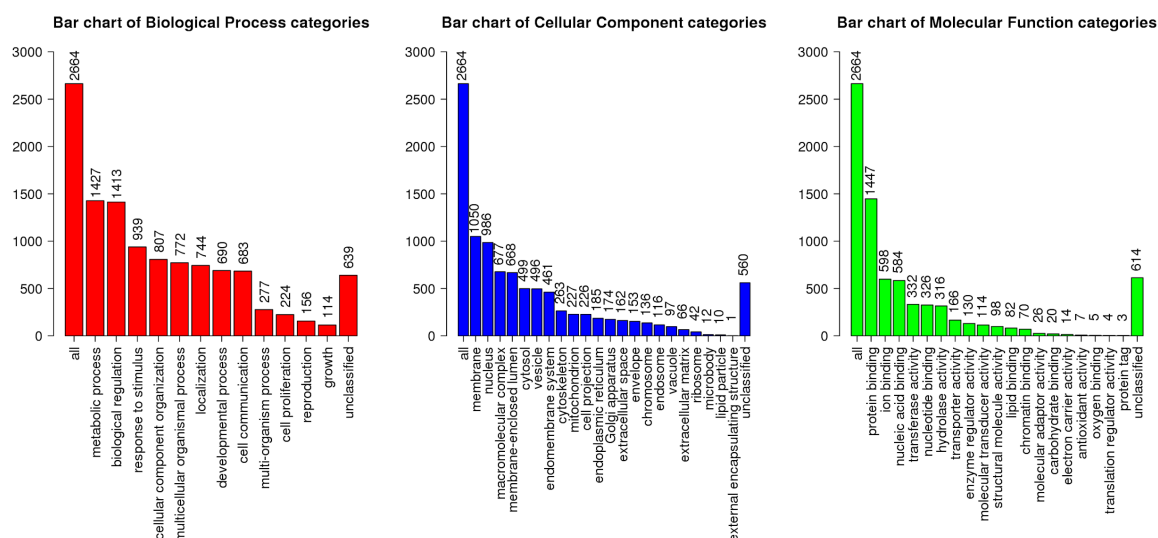


Figura 3.26. Análisis de enriquecimiento por sobre representación (ORA, del inglés Overrepresentation Enrichment Analysis). La altura de las barras representa el número de IDs que se encuentran representados en cada categoría. Las categorías de Proceso Biológico, Componente Celular y Función Molecular están representados por rojo, azul y verde, respectivamente.

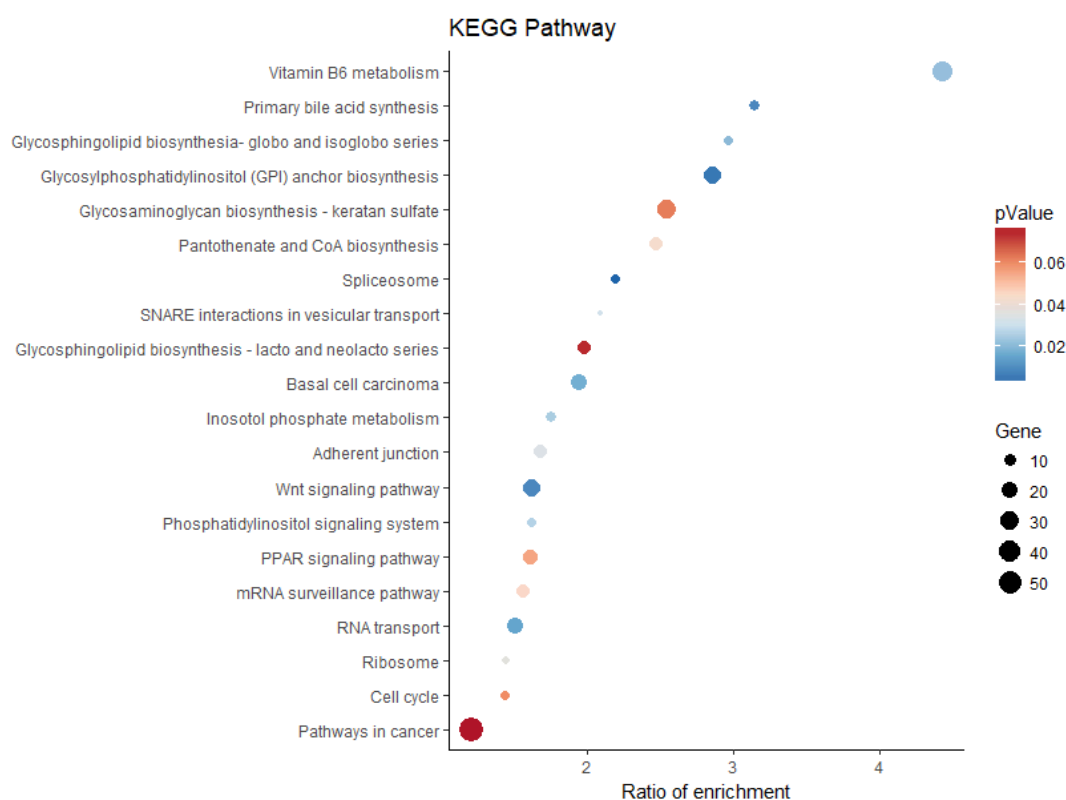


Figura 3.27. Análisis de KEGG. Términos de Gene Ontology (a partir de ORA) asociados a target del miR-520a, según los “Pathways de KEGG”. Las categorías se encuentran representadas en función de la proporción de enriquecimiento. El tamaño de los puntos indica la cantidad de genes en cada categoría y la escala de colores, el pValor.

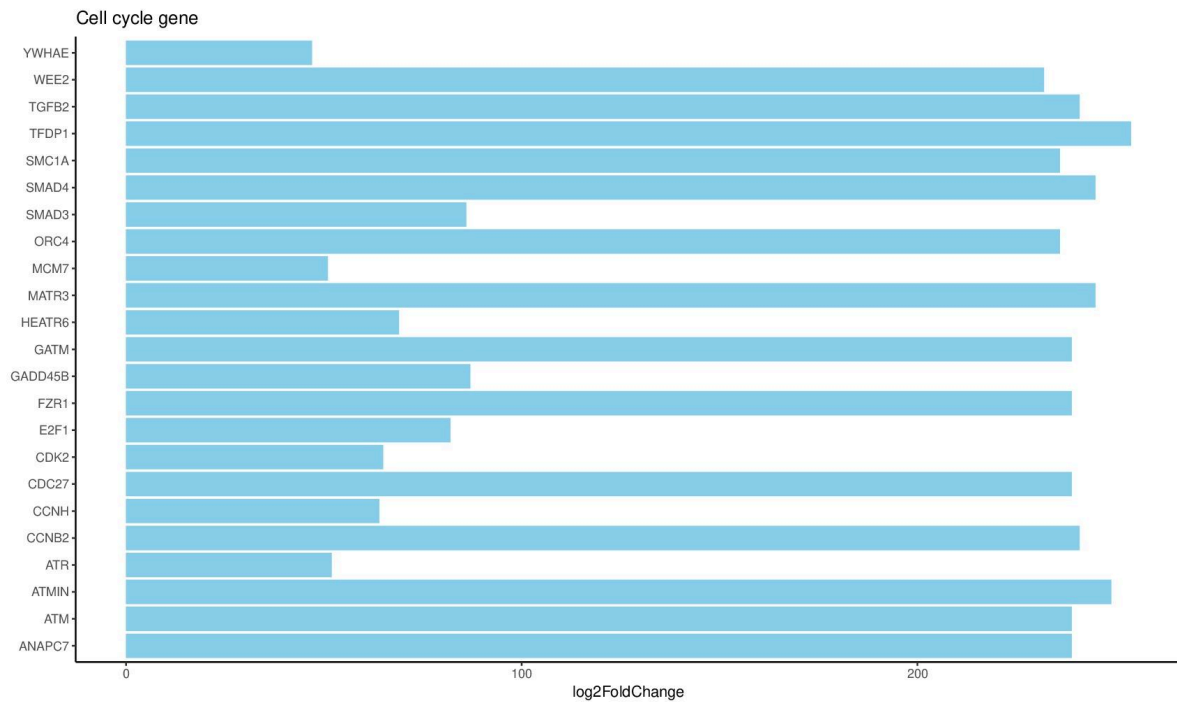


Figura 3.28. Expresión de los genes incluidos en la categoría de “Ciclo Celular” del KEGG-pathway. Las barras representan el log2-FoldChange de los mRNAs cargados diferencialmente en el complejo RISC entre la condición de hiPSC-CM transfectados con el mimic-miR-520a con respecto al transfectado con el mimic-control.

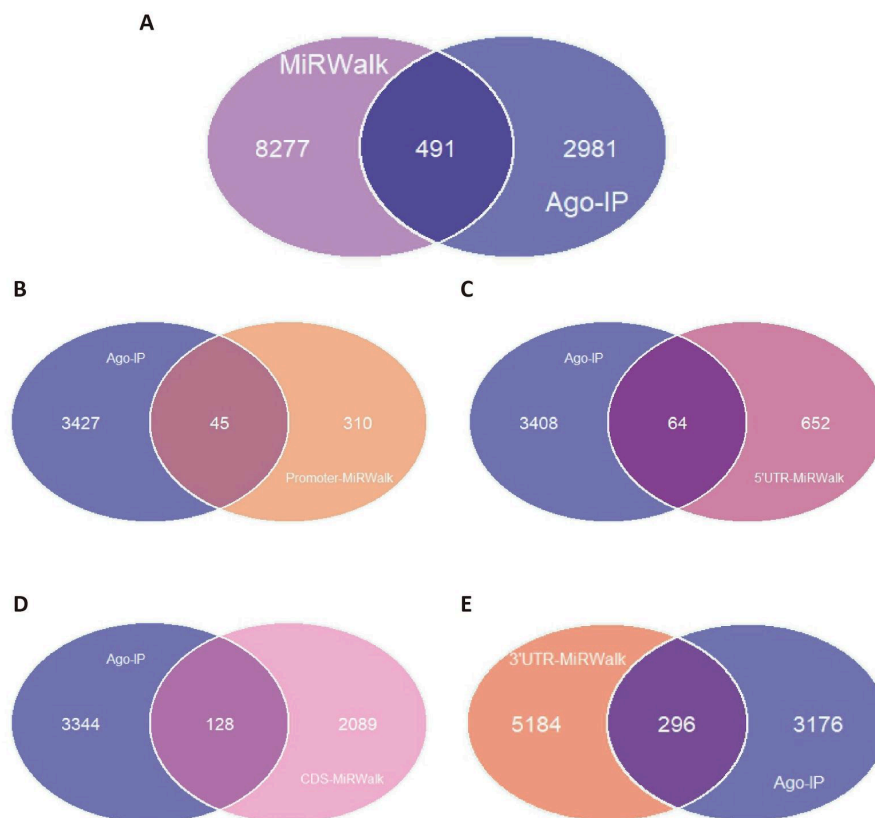


Figura 3.29. Análisis comparativo con MiRWalk. Comparación entre los targets predichos in silico por MiRWalk para el miR-520a-3p y los obtenidos a partir de la Ago-IP. En los diagramas de Venn se puede observar el número de genes blanco del miR-520a identificados mediante el Ago-IP (violeta) y los genes target predichos con MiRWalk. En (A) se compara el total de los genes target predichos por MiRWalk, en (B) los predichos para la región promotora, en (C) la zona 5'UTR, en (D) la región codificante y en (E) el 3'UTR.

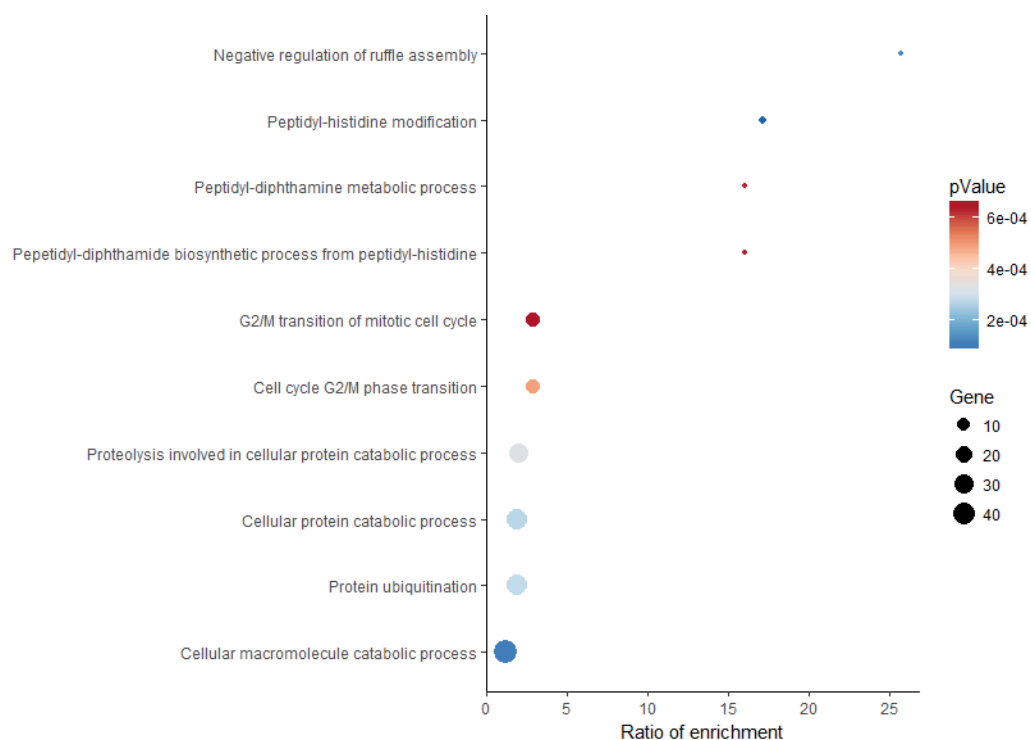


Figura 3.30. Procesos biológicos por Gene Ontology para la intersección del análisis in silico y el ensayo de Ago-IP. Procesos biológicos a los que pertenecen los genes target del miR-520a predichos in silico y por la Ago-IP. Las categorías se representan en función del enriquecimiento, la escala de colores indica el pValor y el tamaño de los puntos la cantidad de genes presentes en cada categoría.

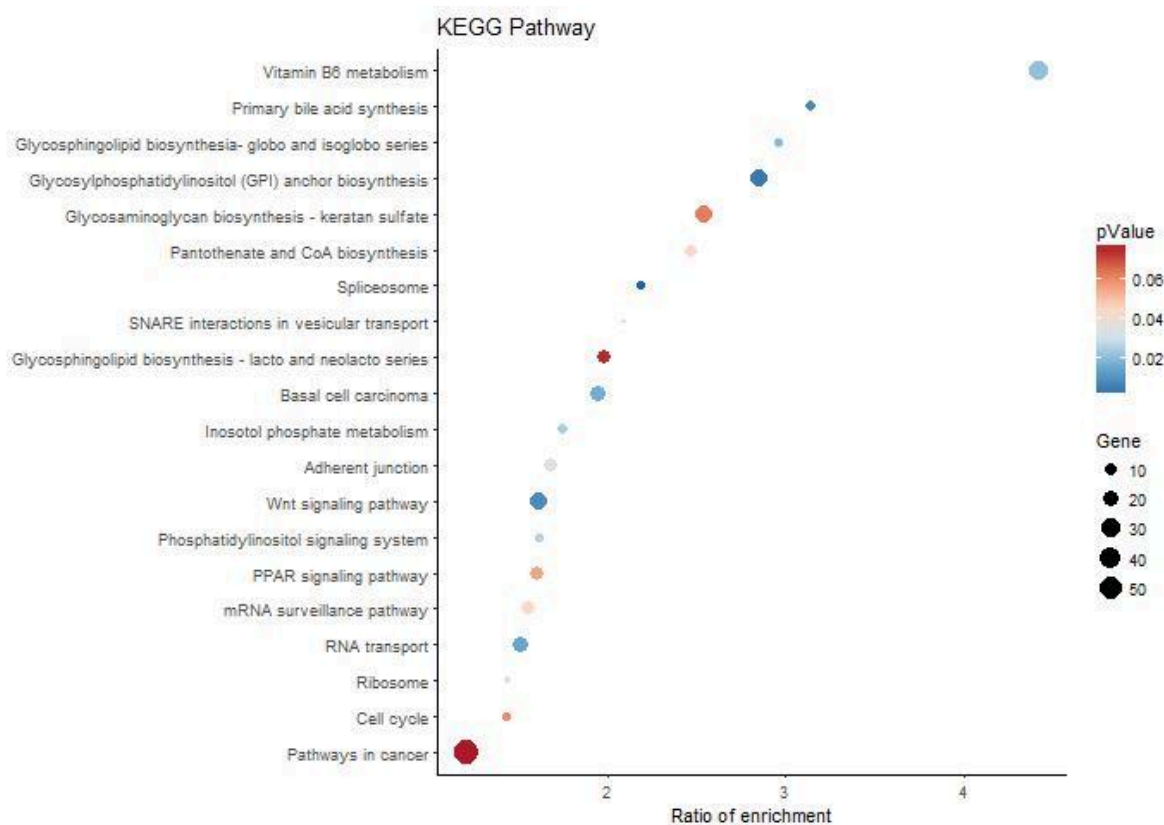


Figura 3.31. Análisis de KEGG para la intersección del análisis in silico y el ensayo de AgoIP Términos de Gene Ontology (a partir de ORA) asociados a target del miR-520a predichos in silico y por la AgoIP, según los “Pathways de KEGG”. Las categorías se encuentran representadas en función de la proporción de enriquecimiento. El tamaño de los puntos indica la cantidad de genes en cada categoría y la escala de colores, el pValor.

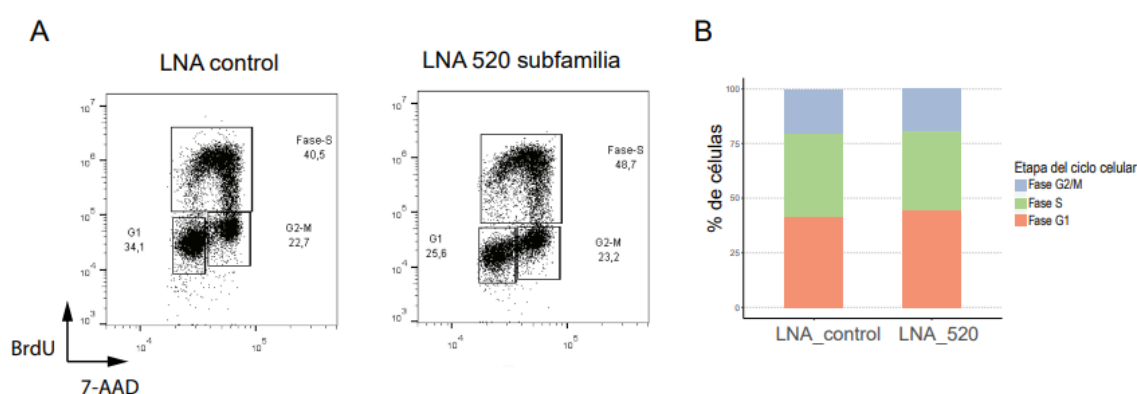


Figura 3.32. Análisis del ciclo celular al bloquear la subfamilia miR-520. A) Análisis de la incorporación de BrdU y el contenido de ADN luego de transfectar las células con el LNA 520 o el LNA control y determinamos mediante citometría de flujo las células positivas para BrdU con un anticuerpo anti-BrdU-FITC y el contenido de ADN mediante la tinción con 7-AAD a las 48 hs luego de

la transfección. Se muestra un dot plot representativo de una de las réplicas. B) Comparación de las distintas fases del ciclo celular para 5 réplicas biológicas. Resultados extraídos de la tesis doctoral de Ximena Garate.

3.3.3 Estrategia con Células madre mesenquimales humanas

Como se indicó en la introducción de esta tesis, las MSC poseen capacidad pro regenerativa. Algunos estudios previos indican que este efecto se puede dar por acción directa de las células y otros laboratorios plantean que esta capacidad puede estar mediada por sus EVs. En nuestro laboratorio se realizó la caracterización del contenido de los EVs de las MSC, derivadas tanto de cordón umbilical humano como de iPSC, y se encontraron proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular y la replicación de ADN. Por lo tanto, se decidió evaluar el efecto parácrino de las WJ-MSC sobre la capacidad proliferativa de los CM-iPSC. Para ello se cultivaron WJ-MSC de entre 9 y 12 pasajes y al llegar a una confluencia del 50% se cambió su medio de cultivo por RPMI y se mantuvo por 48 hs, de esta forma se preparó el medio condicionado por WJ-MSC. Este medio fue agregado a los CM-FUCCI-iPSC a las 24 hs de ser sembrados. Se tomaron fotografías de microscopía a las 24, 48 y 72 hs (Figura 3.33). Por medio del software de ImageJ se realizó la cuantificación de los núcleos en cada color. Se consideró que habían reentrado al ciclo celular aquellos núcleos con fluorescencia en el canal verde. Si bien al ser sembrados se observa un aumento de la proliferación de los CM-iPSC, ese efecto va disminuyendo con el paso del tiempo, llegando a un 5% de núcleos en S/G2/M a las 48 y 72 horas. Sin embargo, los CM-iPSCs que son cultivados con medio condicionado por WJ-MSC mantienen sus niveles de activación del ciclo celular cercano al 20% (Figura 3.34). El porcentaje de núcleos mVenus positivos de los CM-FUCCI-iPSC fue $5,3 \pm 2,9\%$ y $4,8 \pm 2,8\%$ para la condición control y $22,7 \pm 2,1\%$ y $23,5 \pm 4,2\%$ para el medio condicionado a las 48 y 72 hs respectivamente. A las 24hs del tratamiento se observa gran variabilidad en las cuantificaciones obtenidas. Por otro lado, se realizó un ensayo con EdU y se evaluó su incorporación ON luego de 72 hs de exposición al medio condicionado por WJ-MSC (Figura 3.35). Se utilizó el *Click-iT EdU Assay Kit-Alexa 488* (Thermo) y anticuerpo contra CTnT (ab 8295) y secundario Alexa 594 (anti-ratón). En las imágenes de la inmunofluorescencia se observa en color rojo tanto la marcación de CTnT como mCherry del sistema FUCCI, siendo la primera una marcación citoplasmática y la segunda nuclear. La cuantificación de los núcleos positivos para EdU se

realizó con el software de ImageJ, obteniéndose un porcentaje de núcleos positivos para EdU de $5,14 \pm 1,72$ % para la condición control y $26,51 \pm 8,10$ % para los CM-iPSC tratados con medio condicionado de WJ-MSC (Figura 3.36). Si bien hay dispersión en la cuantificación del tratamiento, la diferencia resultó ser significativa ($p < 0,05$). A partir de estas mismas fotografías se realizó la cuantificación de células binucleadas y no se observaron diferencias entre el control ($11,12 \pm 1,29$ %) y el tratamiento con medio condicionado ($11,90 \pm 2,06$ %; Figura 3.37). Esto me llevaría a pensar que la proliferación aumentada por la incubación con el medio condicionado por WJ-MSC no se traduce en un aumento de la binucleación de los cardiomiocitos.

A su vez, se desarrolló en el laboratorio una línea celular estable de iPSC con la construcción H2B-mCerulean. La proteína estructural H2B es una histona presente en los nucleosomas, por lo tanto nos permite marcar la cromatina. De esta forma podemos ver los distintos estados de la cromatina, facilitando la visualización de células en mitosis. A partir de la línea celular iPSC-H2B se realizó el protocolo de diferenciación en monocapa, los CMs fueron replaqueados a día 21 y se los incubó con medio condicionado de WJ-MSC, se tomaron fotografías de fluorescencia y se contabilizaron los núcleos en mitosis (Figura 3.38). En ambos casos los eventos de mitosis fueron cercanos al 2%.

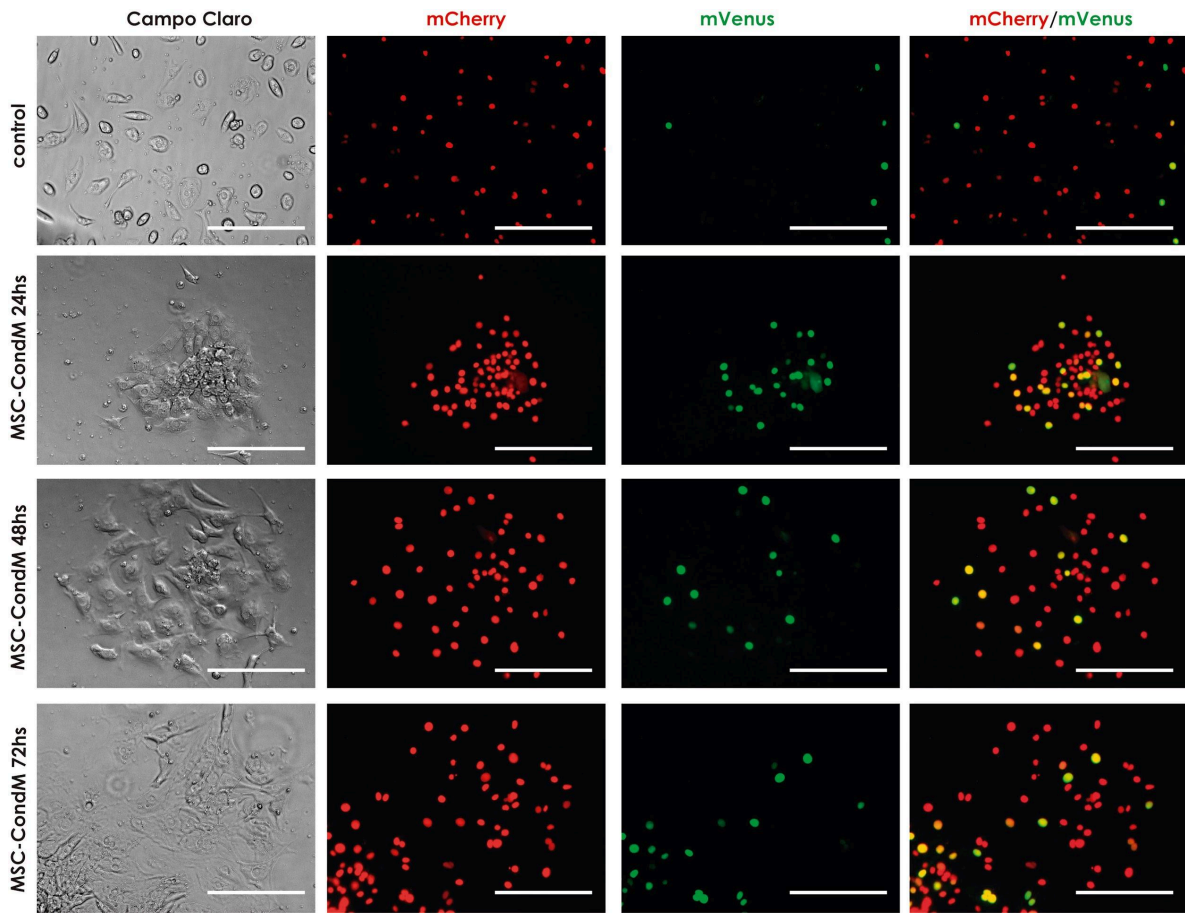


Figura 3.33. Análisis del ciclo celular al bloquear la subfamilia miR-520. A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de FUCCI-iPSC-CM. Las fotografías se tomaron a las 24, 48 y 72hs luego de haber expuesto los CM al medio condicionado por las WJ-MSC (MSC-CondM). Barra de escala: 200µm.

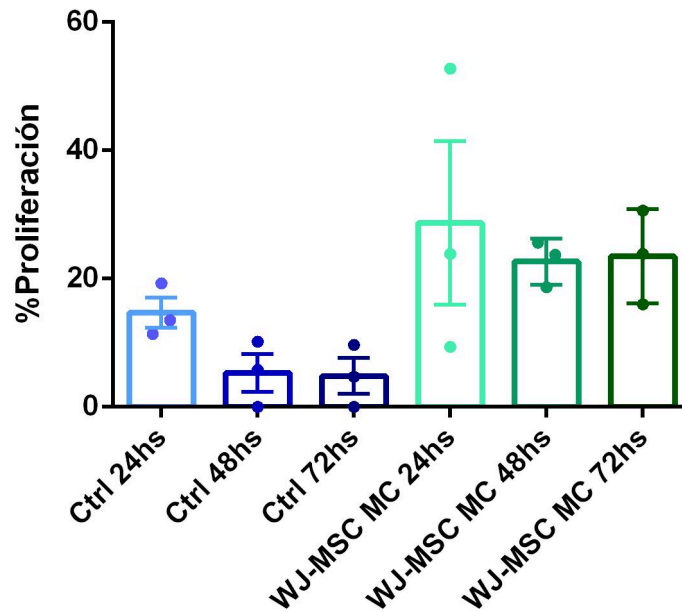


Figura 3.34. Tratamiento con medio condicionado por WJ-MSC sobre la proliferación de CM-iPSC. Porcentaje de núcleos positivos para fluorescencia de mVenus. Se cuantificaron aproximadamente 500 células por condición. (n=3). Los resultados se presentan como la media \pm SEM.

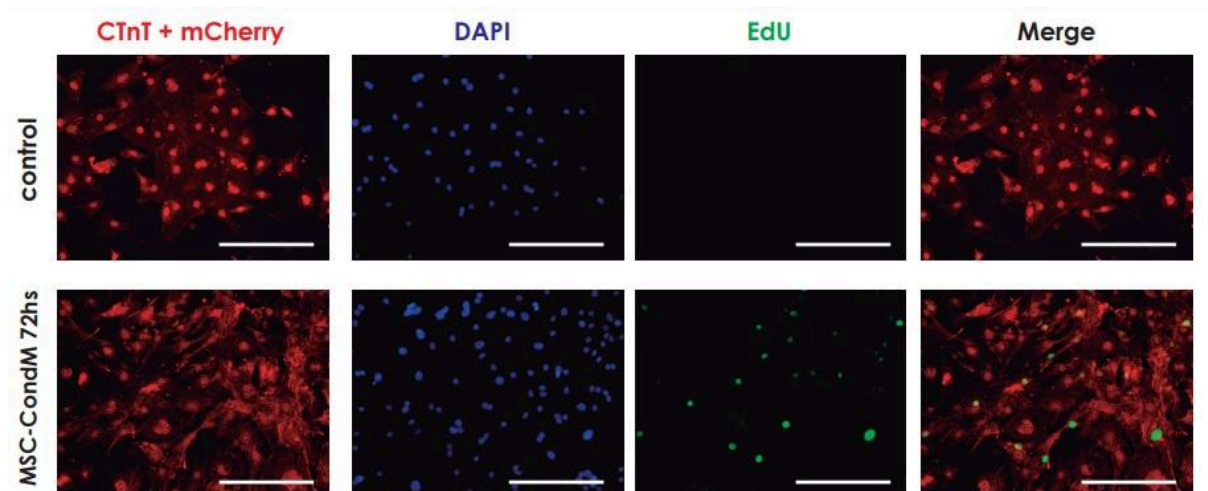


Figura 3.35. Efecto sobre la proliferación de CM-iPSC luego de 72hs del tratamiento con medio condicionado por WJ-MSC. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de Cardiac Troponin T (CTnT) y la incorporación de EdU para CMs-FUCCI-iPSC-CMs. Las células fueron incubadas con EdU overnight, y fijadas con metanol. Los núcleos fueron marcados con DAPI. Las fotografías se tomaron 72 hs luego de haber expuesto los CM al medio condicionado por las WJ-MSC (MSC-CondM) o a RPMI (control). Barra de escala: 200 μ m.

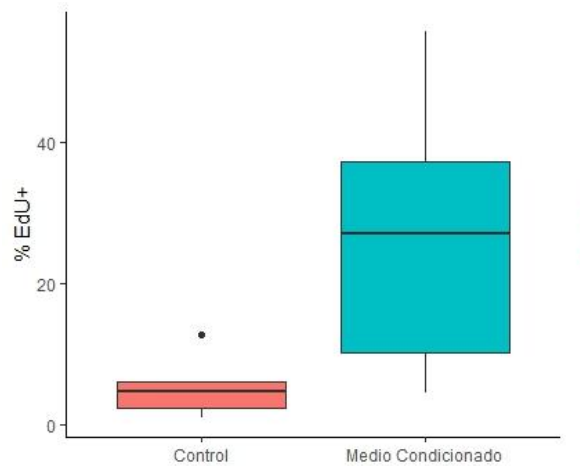


Figura 3.36. Análisis de la proliferación de CM-iPSC al cultivarlos con medio condicionado por WJ-MSC. Cuantificación de núcleos positivos para EdU (EdU+) para 6 experimentos independientes, luego de 72 hs de ser cultivados con Medio Condicionado o medio control.

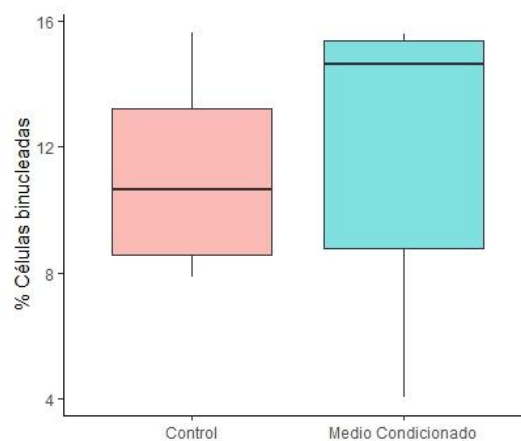


Figura 3.37. Estudio de la binucleación de los CM-iPSC por efecto del tratamiento con medio condicionado de WJ-MSC. Cuantificación de hiPSC-CM binucleados de 6 réplicas para la condición control y para CM-iPSC tratados por 72 hs con medio condicionado por WJ-MSC.

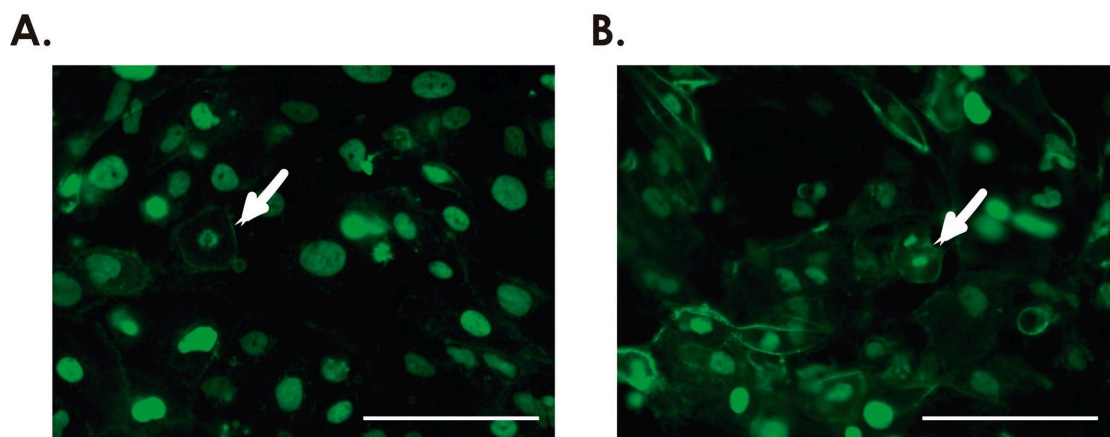


Figura 3.38. Procesos mitóticos en CM-iPSC. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de CM-H2B-iPSC. La marcación de las membranas se realizó con WGA (5 μ M). Las fotografías se tomaron 72 hs luego de haber expuesto los CM a RPMI (A) o al medio condicionado por las WJ-MSC (B). Barra de escala: 200 μ m.

Con el objetivo de identificar las moléculas que estarían modificando el ciclo celular de los CM-iPSC se evaluó la proteómica del medio condicionado por las WJ-MSC. El medio fue sometido a tres series de congelado y descongelado con el fin de facilitar la ruptura de las VEs, de forma tal de poder identificar el contenido de los EVs y aquellas proteínas que se encuentran sueltas en el medio. Las muestras provenientes de dos individuos distintos de los cuales se extrajeron las WJ-MSC, fueron enviadas al servicio de proteómica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, los resultados fueron analizados por el área bajo la curva. Se evaluó una distribución similar entre las réplicas técnicas y las distintas muestras (Figura 3.39). Los análisis posteriores se realizaron con dos muestras técnicas de dos individuos distintos. El contenido proteico de las muestras se realizó por medio del fluorímetro Qubit (*Thermo*). Para la muestra “mar10” se obtuvo una concentración de 160,7 μ g/ml y para la muestra “mar12” 79 μ g/ml. Se comparó la identidad de las distintas proteínas para las dos muestras, obteniéndose que 24 proteínas se encontraban presentes en ambas muestras (Figura 3.40). Posteriormente se realizó un análisis de ontología génica, encontrando que estas proteínas se encuentran principalmente asociadas a respuesta proinflamatorias o a matriz extracelular (Figura 3.41, Figura 3.42 y Figura 3.43) y que pueden ubicarse en los lúmenes del proceso de síntesis de vesículas extracelulares o bien en la membrana o matriz extracelular. Finalmente, como el objetivo es identificar aquellas proteínas que pueden ser responsables del aumento de iPSC-CM

en el ciclo celular se realizó el análisis de la totalidad de proteínas identificadas. Este análisis permitió identificar proteínas relacionadas con la vía de Hippo, con Hif-1 y Pi3K-Akt (Figura 3.44).

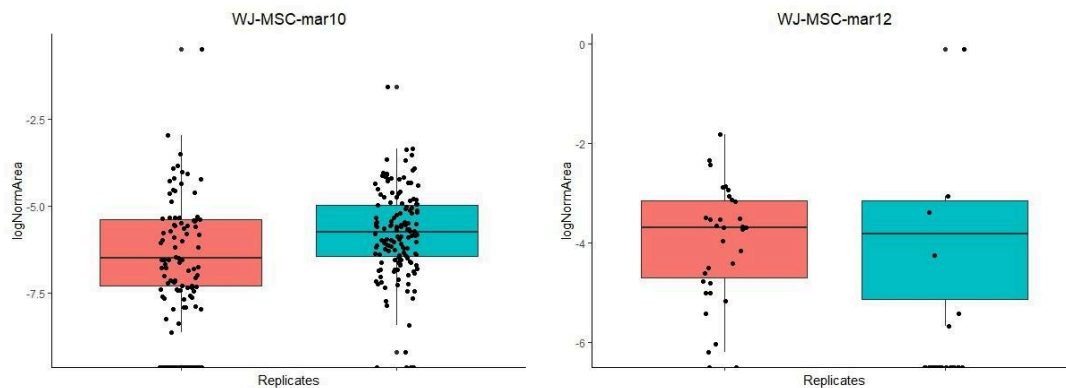


Figura 3.39. Análisis de homogeneidad de las muestras de proteómica. En cada gráfico se observan las distribuciones de las áreas para los dos individuos analizados con sus dos réplicas técnicas.

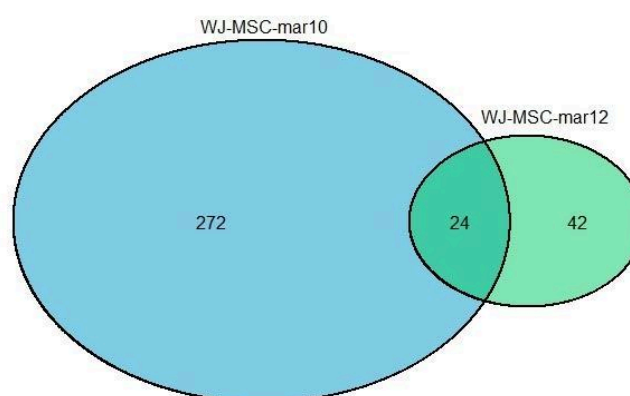


Figura 3.40. Comparación entre las proteínas identificadas en las distintas muestras. En el diagrama de Venn se puede observar el número de proteínas identificadas presentes en el medio condicionado de los dos individuos.

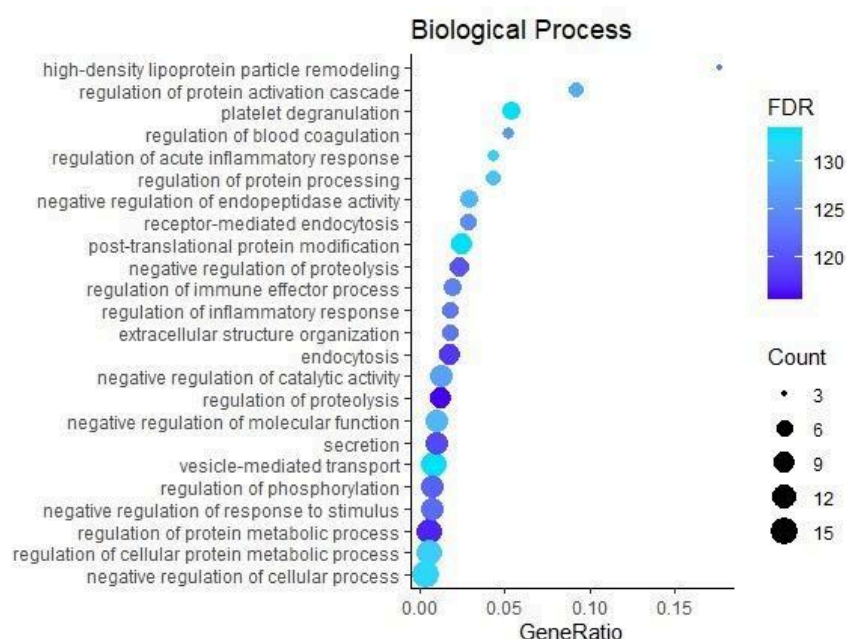


Figura 3.41. Categorías de los Procesos biológicos. Procesos biológicos a los que pertenecen las 24 proteínas identificadas en ambas muestras de medio condicionado por WJ-MSC. Las categorías se representan en función del enriquecimiento, la escala de colores indica el FDR y el tamaño de los puntos la cantidad de proteínas presentes en cada categoría.

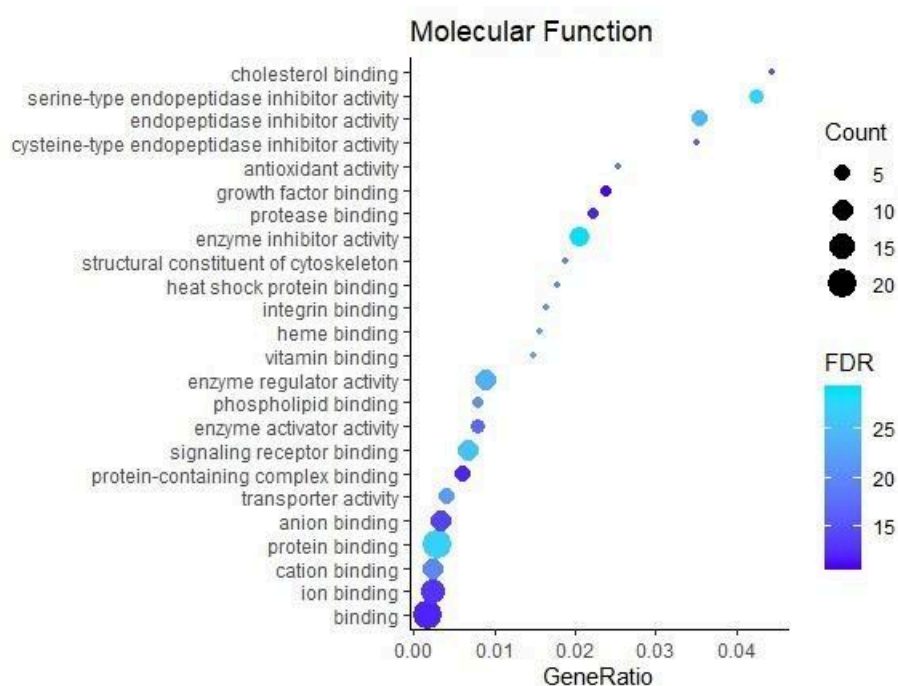


Figura 3.42. Categorías de Funciones Moleculares. Funciones moleculares a las que pertenecen las 24 proteínas identificadas en ambas muestras de medio condicionado de WJ-MSC. Las categorías se representan en función del enriquecimiento, la escala de colores indica el FDR y el tamaño de los puntos la cantidad de proteínas presentes en cada categoría.

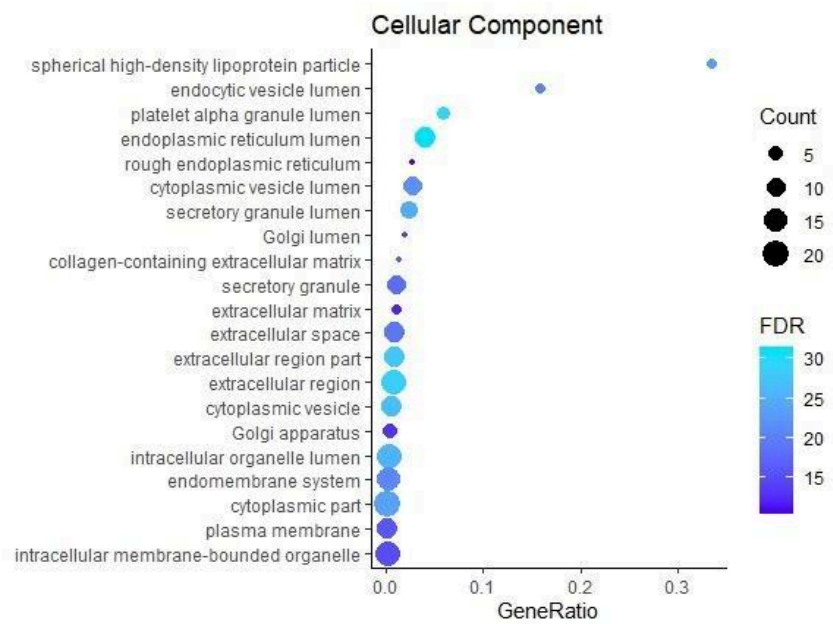


Figura 3.43. Categorías de compartimentos celulares. Se indican las partes de las células a las que se encuentran asociadas las 24 proteínas identificadas en ambas muestras. Las categorías se representan en función del enriquecimiento, la escala de colores indica el FDR y el tamaño de los puntos la cantidad de proteínas presentes en cada categoría.

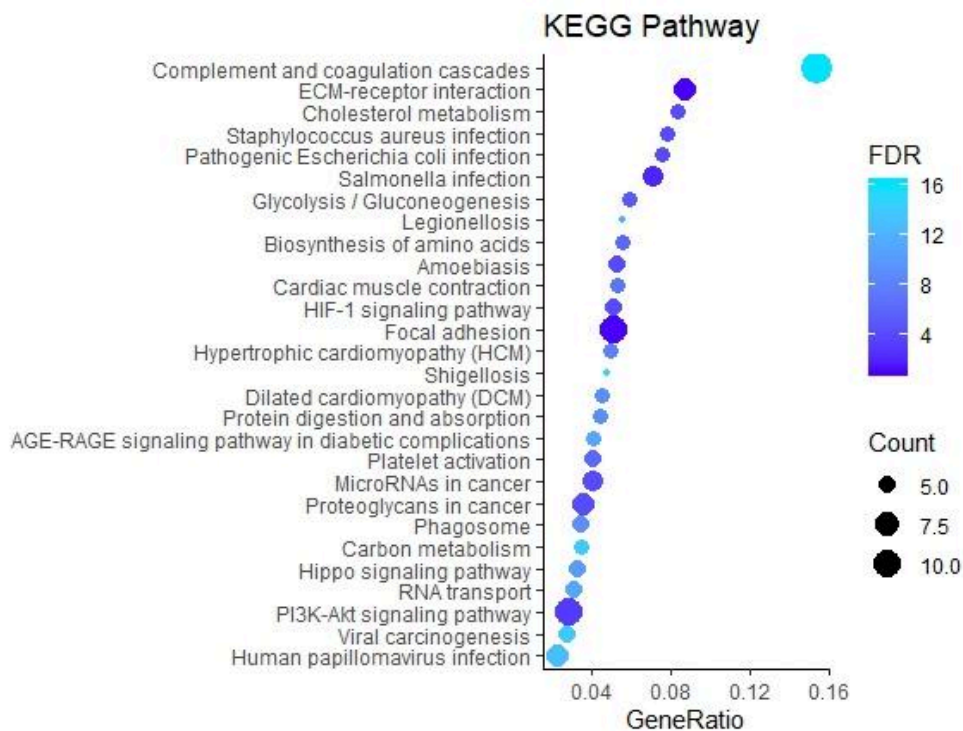


Figura 3.44. Vías de KEGG. Términos de Gene Ontology según el Pathway de KEGG a los que se encuentran asociados la totalidad de proteínas identificadas en ambas muestras. Las categorías se representan en función del enriquecimiento, la escala de colores indica el FDR y el tamaño de los puntos la cantidad de proteínas presentes en cada categoría.

3.3.4 Estudio del efecto del resembrado de CM-iPSC humanos

En los ensayos estudiados previamente los CM-iPSC fueron resembrados luego del día 21 del protocolo de diferenciación con el objetivo de facilitar los diferentes análisis y se observó un aumento de la proliferación celular. Entonces se decidió evaluar este tratamiento independientemente de los anteriores. Se llevó a cabo el protocolo de diferenciación cardíaca en monocapa y se evaluó el efecto del resembrado, sobre la proliferación celular de los CM-iPSC (Figura 3.45). Por medio de citometría de flujo se evaluó la incorporación de EdU y de IP en células marcadas positivamente con el anticuerpo contra CTNT (Figura 3.46). Por este análisis se determinó un aumento de la proliferación celular $15,23 \pm 2,85$ % a las 24hs de haber resembrado los CM-iPSC ($p < 0,05$). A su vez este tipo de análisis permitió detectar células multinucleadas, en aquellos ensayos con mayor porcentaje de proliferación. En los gráficos de puntos de citometría se observan varias réplicas de la forma de herradura y en el gráfico de densidad de IP hay una serie de picos, cada una de estas réplicas corresponde a células con un

nuevo evento de división nuclear. También se evaluó la incorporación de EdU por medio de imágenes de microscopía de fluorescencia (Figura 3.47.A), reflejando un aumento del $18,93 \% \pm 4,93 \%$ en la proliferación de los CM-iPSC resembrados con respecto a los CM-iPSC de día 21 (Figura 3.47.B). A su vez, se evaluó el porcentaje de CM-iPSC en G1 o S/G2/M utilizando la línea celular FUCCI-iPSC. Se tomaron imágenes de microscopía antes de levantar los CM-iPSC en el día 21 del protocolo de diferenciación ($7,52 \pm 1,20 \%$) y 24 hs luego del resembrado de los mismos ($23,99 \pm 1,41$) y se analizó la fluorescencia de los núcleos celulares (Figura 3.48). Se observó un aumento de un $16,47 \%$ en S/G2/M, de CM-iPSC resembrados con respecto a los evaluados en el día 21 del protocolo de diferenciación (Figura 3.49). También se cuantificaron las células positivas para marcación de CTNT e incorporación de EdU, resultando significativamente diferente la condición de cultivo 24hs luego de resembrar los CM-iPSC ($p < 0,05$; Día 21: $13,77 \pm 3,36$ vs 24hs post re resembrado: $43,11 \pm 6,53 \%$; Figura 3.50). Con el objetivo de evaluar si este aumento de la proliferación celular se sostiene en el tiempo se cuantificó la proliferación celular por medio de la marcación con EdU e IP, luego de 7 días de haber resembrado los CM-iPSC, observándose una marcada pérdida de la capacidad proliferativa ($10,45 \pm 3.02 \%$, Figura 3.50).

En el capítulo 1 de esta Tesis se realizó el estudio de la viabilidad celular y la capacidad de los CM-iPSC de mantener su identidad luego de ser criopreservados (Figura 3.9). El medio de cultivo utilizado para sembrar los CM-iPSC luego de ser descongelados es igual al medio de cultivo utilizado para resembrar las células, por lo tanto se decidió comparar estos dos tratamientos. Al evaluar el ciclo celular de los CM-iPSC descongelados por medio de EdU se pudo ver que aumenta su capacidad proliferativa luego de ser descongelados y esta característica se va perdiendo conforme avanzan los días. Sin embargo, se observa un $11,43\%$ más de CM-iPSC en fase S del ciclo celular 24 hs luego del proceso de resiembra, con respecto a las 24 hs luego de descongelar los CM-iPSC (No se observaron diferencias significativas entre estas condiciones, Figura 3.50).

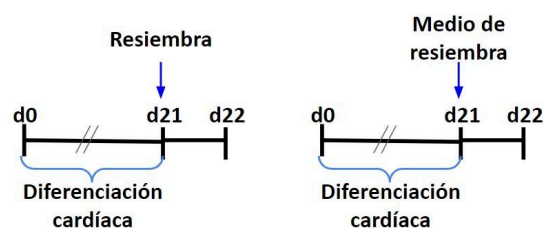


Figura 3.45. Efecto de re siembra de CM-iPSC. Esquema del protocolo utilizado para la evaluación del efecto del resiembra luego de 21 días del protocolo de diferenciación cardíaca.

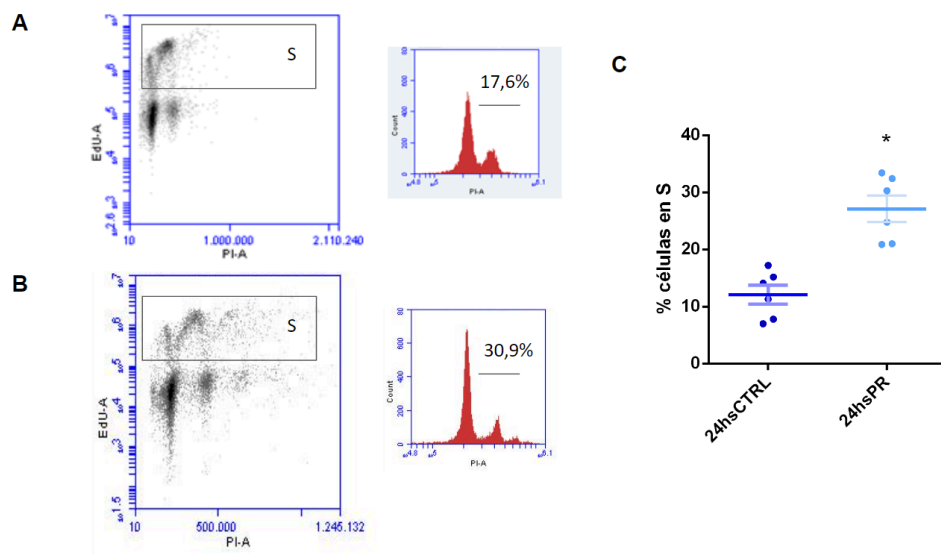


Figura 3.46. Evaluación de la proliferación de CM-iPSC resembrados A) Gráfico de herradura característico. En el eje de abscisas se representa la marcación con ioduro de propidio (IP) y en el eje de ordenadas la marcación para EdU. En rojo se representa el gráfico de densidad para IP. B) Cuantificación del porcentaje de células en la fases S del ciclo celular determinadas por citometría por medio de la marcación con IP y EdU luego de CM-iPSC luego de 21 días del protocolo de diferenciación cardíaca en monocapa en situación control o luego de ser resembrados. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Se observan diferencias significativas entre los dos tratamientos (*, $p < 0,01$).

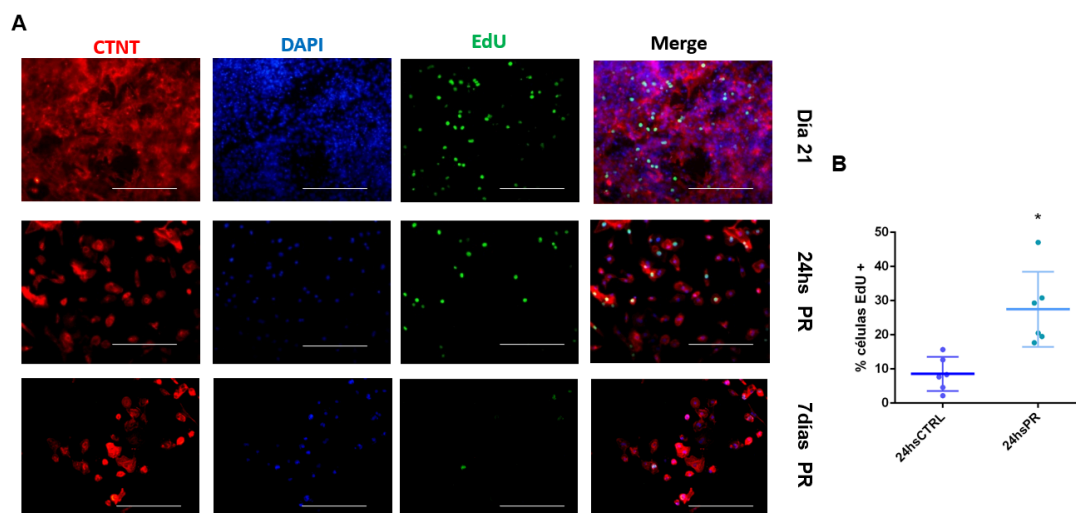


Figura 3.47. Incorporación de EdU en CM-iPSC sembradas. A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de CM-iPSC marcados con Troponina cardíaca T (CTNT) en rojo, DAPI para marcación nuclear en azul e incorporación de EdU nuclear (verde). Las células fueron incubadas con EdU overnight, y fijadas con metanol. Los núcleos fueron marcados con DAPI. Barra de escala: 200 μ m. B) Gráfico de cuantificación de núcleos positivos para EdU, calculados a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia para CM-iPSC(d21) luego de 24hs con medio de resiembra (24hs CTRL) y 24hs después de resiembra (24hs PR). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Se observan diferencias significativas entre los dos tratamientos (*, $p < 0,01$).

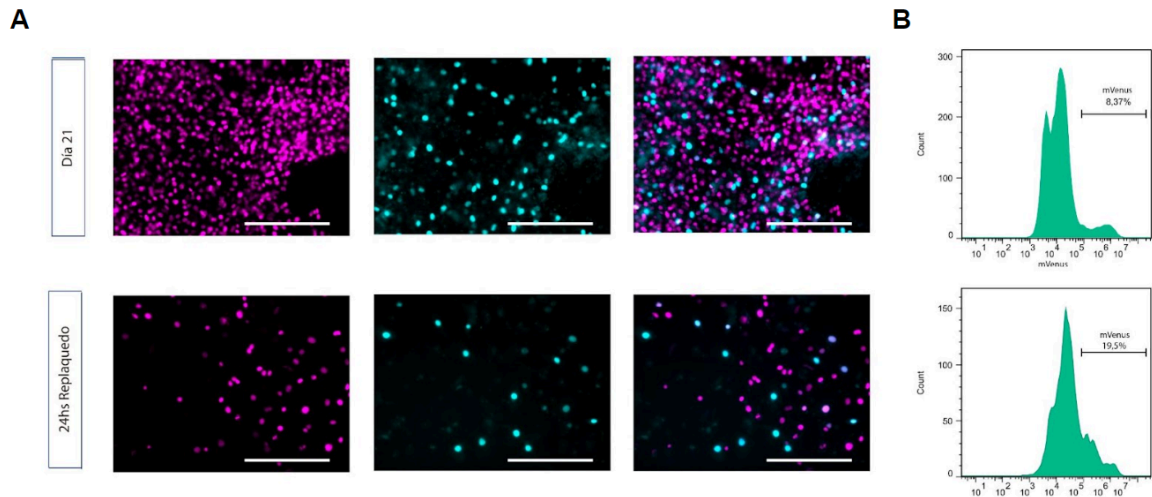


Figura 3.48. Proliferación celular de CM-iPSC FUCCI. A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de CM-iPSC FUCCI en el día 21 del protocolo de diferenciación y luego de 24 hs de resembrarlos. Los núcleos mVenus en color cyan (S/G2/M) y mCherry en color magenta (G1). B) Gráficos representativos de la cuantificación por citometría de las células con marcación mVenus o mCherry.

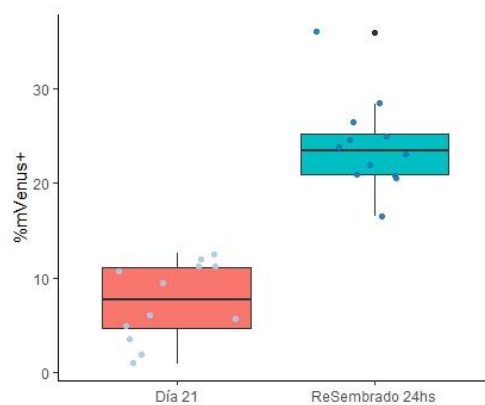


Figura 3.49. Proliferación de CM-iPSC FUCCI luego de ser resembrados. Gráfico de cuantificación de núcleos positivos para mVenus, calculados a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia para CM-iPSC (Día 21) y 24 hs después de resembrado. Se observan diferencias significativas entre los dos tratamientos ($p < 0,01$, $N=12$).

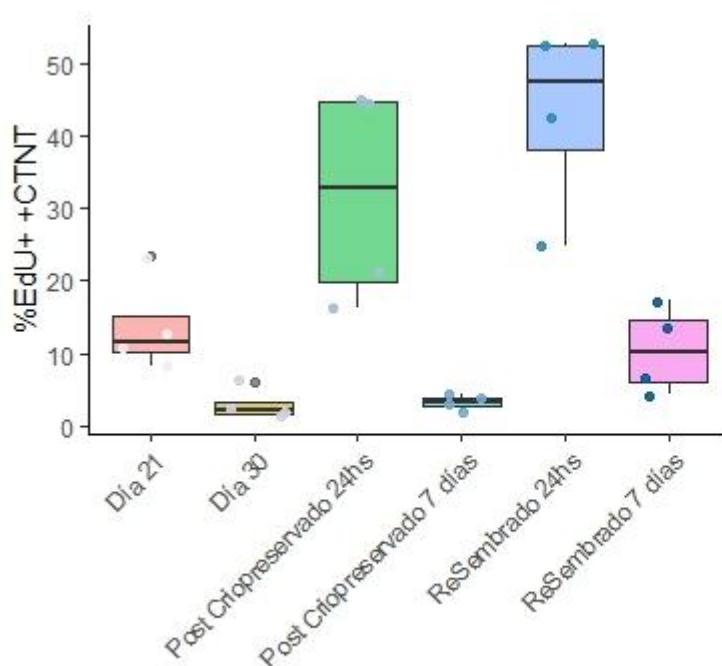


Figura 3.50. Proliferación de CM-iPSC luego de ser resembrados o criopreservados. Cuantificación por citometría de flujo de células positivas para CTNT y para la incorporación de EdU, para cuatro experimentos independientes. Las condiciones de “Resembrado 24hs” y “Post Criopreservado 24hs” resultan significativamente diferentes a los otros tratamientos ($p < 0,05$).

Luego, se estudió por medio del sistema reportero Fucci el efecto de múltiples pasajes sobre la capacidad proliferativa de los CM-iPSC (Figura 3.51), a su vez, se evaluó el efecto sobre el área celular (Figura 3.52). Los pasajes se realizaron cada 7 días, no pudiéndose observar el mismo aumento de proliferación celular a las 24hs de realizados. A partir del día 70, los pasajes son menos eficientes ya que se observa un aumento de la muerte celular, disminuyendo la eficiencia en la recuperación celular. A partir de estos resultados, no se recomienda realizar pasajes de CM-iPSC con la técnica descrita en esta tesis luego del día 70. Además, no se han podido realizar pasajes posteriores al día 120 de cultivo, ya que las células no logran adherirse al plato de cultivo. Se estudiaron los cambios morfológicos de los CM-iPSC en los distintos pasajes. Se observó un aumento en el área celular, aumento que no se pudo contrastar con una situación control sin pasaje, ya que en este caso las células se mantienen en una monocapa más compacta. Con los múltiples pasajes también se observó multinucleación celular, llegando a encontrar células con 2 o 4 núcleos. A su vez, la inmunofluorescencia realizada en el pasaje 4 (día 64) y en el pasaje 7 (día 120), reveló un aumento en la organización de CTNT (Figura 3.53).

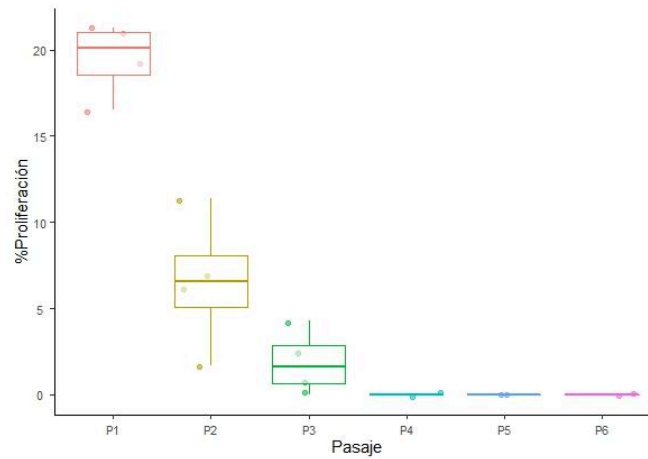


Figura 3.51. Proliferación de CM-iPSC FUCCI luego de varios pasajes. Porcentaje de células positivas para mVenus, cuantificado por medio de imágenes de microscopía, para distintos pasajes de CM-iPSC (n=3).

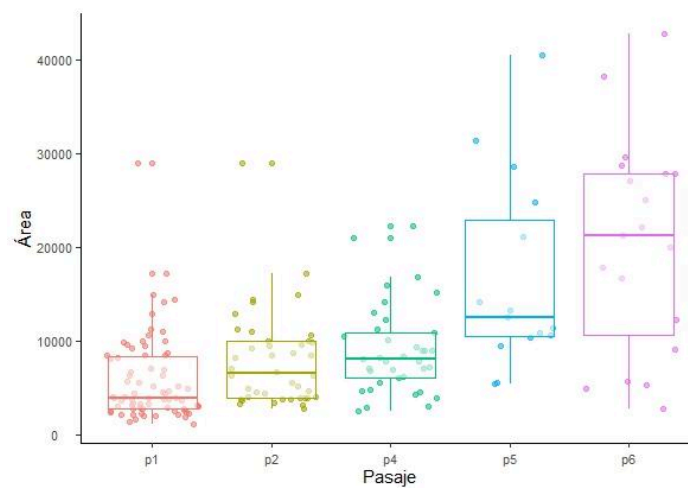


Figura 3.52. Área celular de CM-iPSC FUCCI luego de varios pasajes. Cuantificación del área celular luego de sucesivos pasajes de CM-iPSC (n=3).

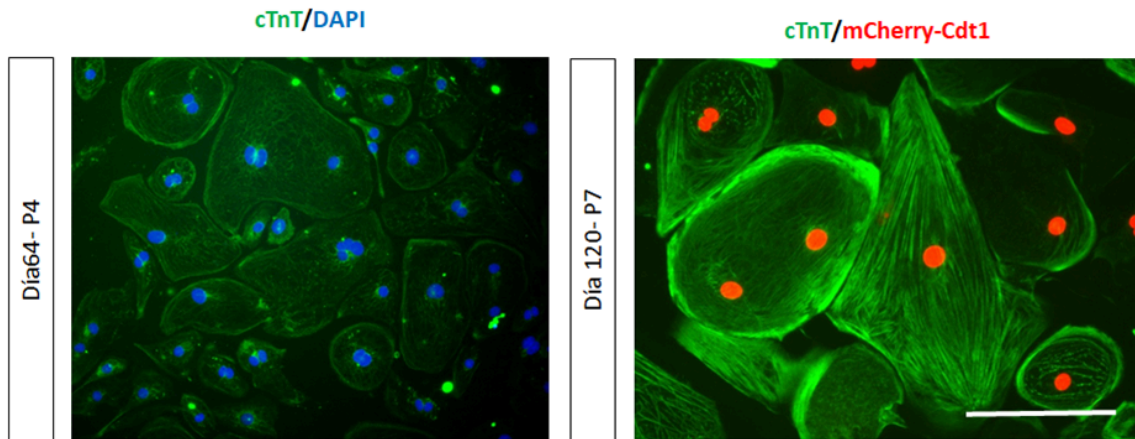


Figura 3.53. Características morfológicas de los CM-iPSC luego de varios pasajes. Inmunomarcación representativa de troponina cardíaca T (CTNT) en CM-FUCCI-iPSC luego del cuarto y séptimo pasaje. Los núcleos se marcaron con DAPI. Barra de escala: 200 μ m.

Con el fin de estudiar cuáles son las vías efectoras del aumento del ciclo celular en los cardiomiocitos replaqueados, se evaluó la expresión del ARNm, por RT-qPCR ($n=3$), de genes característicos de cardiomiocitos (ctnt y tnni3) y los factores de transcripción gata4, meis1 y tbx20 (Figura 3.54). También se cuantificó la expresión de genes del ciclo celular (ciclina D1, ciclina D2 y ciclina E1, p21, p15, p27; Figura 3.55). Estos resultados no presentaron diferencias significativas entre los CM-iPSC de día 21 y los replaqueados, por lo cual se procedió a la realización de una secuenciación masiva de ARN.

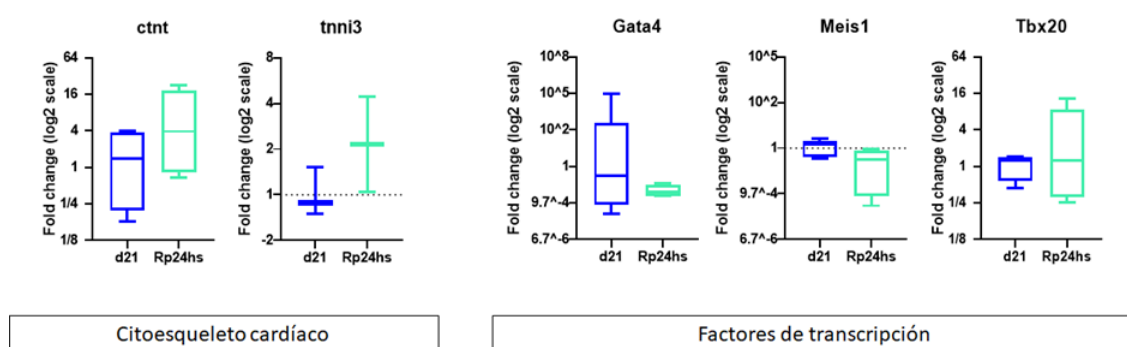


Figura 3.54. Cuantificación por RT-qPCR genes característicos de cardiomiocitos. Se realizó el análisis de la cantidad inicial de ARNm, normalizando a RPL7 y HPRT1, y relativizando a día 21.

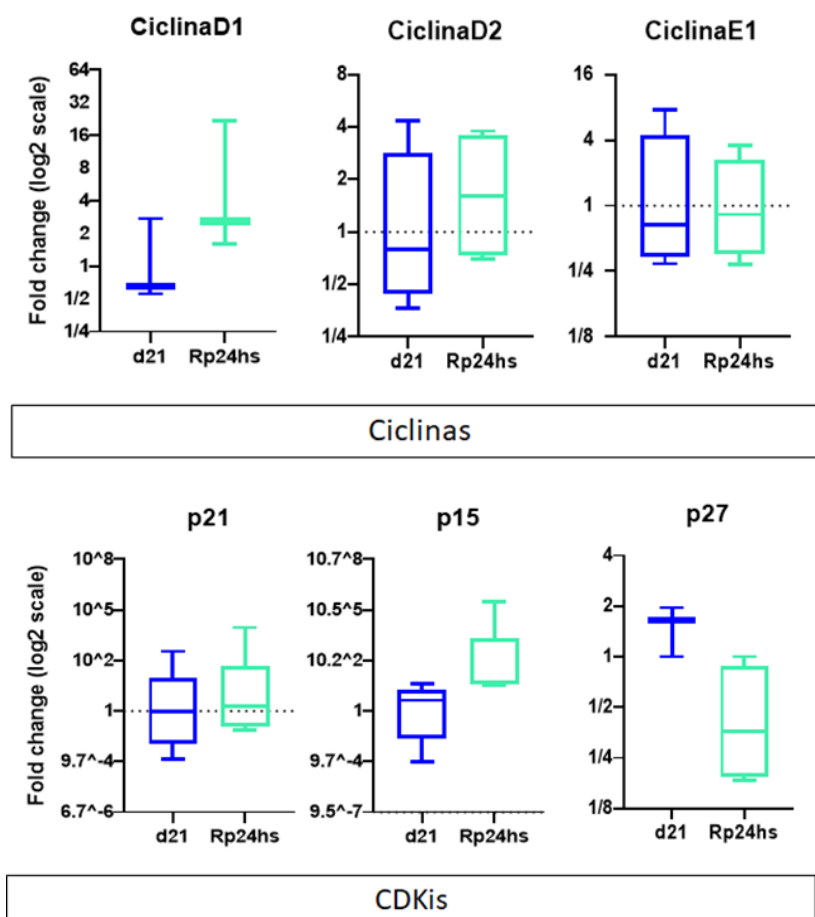


Figura 3.55. Cuantificación por RT-qPCR genes del ciclo celular. Se realizó el análisis de la cantidad inicial de ARNm, normalizando a RPL7 y HPRT1, y relativizando a día 21 (n=3).

Mediante secuenciación masiva de los ARNm se analizó el transcriptoma de CM-iPSC en el día 21 del protocolo de reprogramación (Control) y CM-iPSC luego de 24hs de resembrados (Replated). Para evaluar la eficiencia de los protocolos se cuantificó el porcentaje de células CTNT positivas por medio de citometría, para “Mn60” se obtuvo un 95,9%, mientras que para “Mn61” un 93,8%. Por otro lado, la cuantificación de núcleos mVenus para “Mn 60” resultó 11,4 % para el día 21 y 30,8% para el replaqueado, mientras que para “Mn61” fue de 15,6% y 29,3% para respectivos tratamientos. También se evaluó que la cuantificación por RT-qPCR de estas muestras se distribuya como en la cuantificación realizada previamente. Se enviaron muestras de ARN total, por triplicado de tres ensayos independientes al servicio de MacroGen para secuenciar en la plataforma “*Illumina NovaSeq6000*”, y se realizó una secuenciación de 100pb de extremos pareados, utilizando la librería Illumina TruSeq con depleción de ARN ribosomal utilizando “*Ribo-Zero Gold*”. Sin embargo 3 de las muestras enviadas no pasaron el control de

calidad, ya sea por calidad o por cantidad (Figura 3.56), y se decidió continuar el análisis de las muestras 3, 4 y 5, a modo de análisis exploratorio (Figura 3.57).

El análisis de la calidad de los datos crudos de secuenciación se realizó mediante el programa de uso libre FastQC v0.11.5 antes y después de eliminar los adaptadores (utilizando el programa Cutadapt), controlando posibles duplicaciones y artefactos generados por PCR en la preparación de las librerías (Andrews, 2010). Por medio del programa Bowtie2 se eliminan posibles contaminantes, como por ejemplo ARN ribosomal. Luego las secuencias (Reads) obtenidas, sin los adaptadores, son evaluadas en el largo, teniendo que ser homogéneas, son alineadas con el genoma de referencia (GRCh38) utilizando el programa STAR 2.7.3a y se cuantificó la abundancia mediante el programa HTSeq. Finalmente, se determinó la expresión diferencial entre los dos tratamientos mediante el paquete de R DESeq2. Se obtuvieron 60.688 observaciones en las tres muestras analizadas. Se realiza una filtración de los genes de conteo bajo con el fin de disminuir el ruido, luego se evalúan los veces de cambio, \log_2 , atribuibles a una variable determinada sobre la media de recuentos normalizados para todas las muestras en el DataSet (Figura 3.58.A). Se obtienen 827 genes diferencialmente expresados con un $\text{padj} < 0.1$ y 550 genes si se utiliza un $\text{padj} < 0.05$. Como control de calidad del mapeo se evalúan las estimaciones de dispersión (Figura 3.58.B). Este análisis permite ver las estimaciones finales reducidas de las estimaciones genéticas hacia las estimaciones ajustadas. Algunas estimaciones genéticas se marcan como valores atípicos y no se reducen hacia el valor ajustado.

Se evaluó la identidad de las muestras por grupos en función de la expresión de los genes por medio de una matriz de distancia, pudiendo observarse que las muestras d21 control se encuentran más cerca que la muestra correspondiente al tratamiento de resiembra, independientemente del experimento (Figura 3.59).

#	Sample Name	Conc. (ng/ul)	Final Volume (ul)	Total Amount (ug)	RIN	rRNA Ratio	Result*	
1	1-Mn56-C	25.29	19	0.481	9.5	2.5	Fail	Quantity
2	2-Mn56-R	24.904	20	0.498	5	1	Fail	RIN, Quantity
3	3-Mn60-C	194.182	19	3.689	8.9	2.2	Pass	
4	4-Mn60-R	111.489	19	2.118	9.7	2.4	Pass	
5	5-Mn61-C	164.16	23	3.776	8.9	2.3	Pass	
6	6-Mn61-R	0.929	18	0.017	0.1	0.1	Fail	RIN, rRNA ratio, Quantity

Figura 3.56. Análisis de calidad de las muestras enviadas. Tabla de los resultados de concentración, integridad del ARN (RIN, del inglés *RNA integrity number*) y de la pureza (rRNA ratio), obtenidos en el análisis de calidad de las muestras enviadas al servicio de secuenciación.

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC (%)	AT (%)
3-Mn60-C	16.286.517.216	161.252.616	50,73	49,27
4-Mn60-R	15.603.250.428	154.487.628	50,72	49,28
5-Mn61-C	16.584.616.322	164.204.122	51,99	48,01

Figura 3.57. Resultados de RNA-Seq obtenido para las tres muestras seleccionadas. Tabla de los datos crudos enviados por el servicio de secuenciación. “Total read bases”= número total de bases secuenciadas. Las muestras Mn60-C y Mn61-C corresponden a los CM-iPSC control y Mn60-R a los CM-iPSC res sembrados.

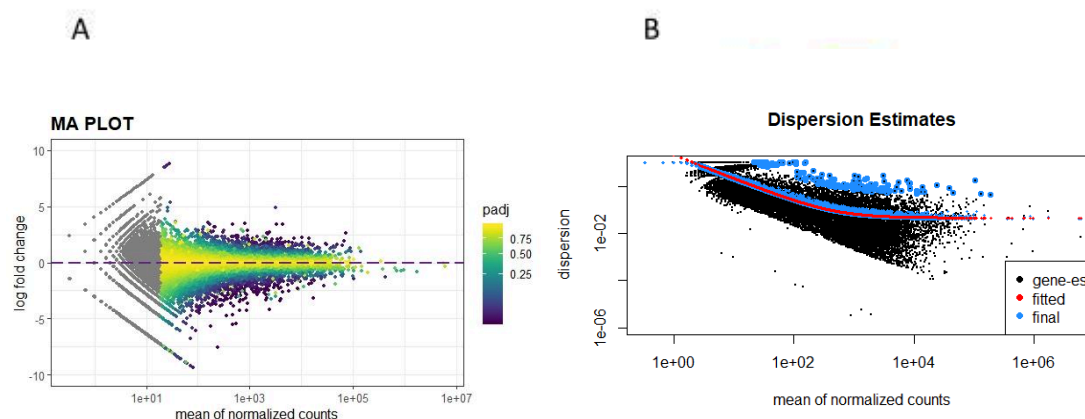


Figura 3.58. Evaluación de calidad por el análisis de DESeq2. A) Gráfico de plotMA que muestra las veces de cambio (\log_2) de una variable dada sobre la media de recuentos normalizados para todos los datos. Los puntos de color violeta indican p valor ajustado $< 0,1$. B) Gráfico de las estimaciones de dispersión.

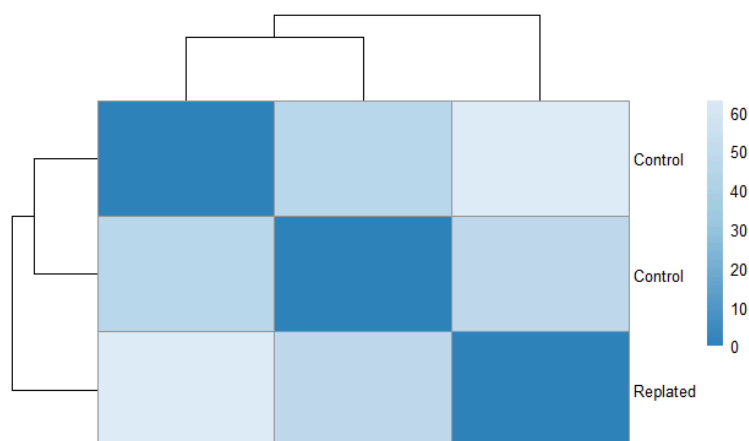


Figura 3.59. Heatmap de distancia. En el heatmap está representada la varianza que existe en la expresión de los mARNs entre los dos tratamientos y su réplica biológica. Una mayor intensidad de color se corresponde con menor variabilidad entre las muestras.

A partir del análisis de expresión diferencial entre los tratamientos, pudimos identificar los mRNAs que aumentan y los que disminuyen sus niveles de expresión. En el Volcano plot se muestran los nombres de los mARNs que presentaron la mayor diferencia en sus niveles de expresión (Figura 3.60).

Continuando con el objetivo de identificar mecanismos que pudieran estar relacionados con el aumento de proliferación observado experimentalmente, se evaluaron los genes diferencialmente expresados por *GeneOntology*, para Procesos Biológicos (Figura 3.61), Funciones moleculares (Figura 3.62) y Componentes celulares (Figura 3.63). Por otro lado se estudiaron los pathways de KEGG involucrados (Figura 3.64 y Figura 3.65). A partir de estos resultados, se seleccionaron los vías de señalización que podrían estar involucradas en la proliferación diferencial de los CM-iPSC, entonces se decidió profundizar en los genes involucrados en el vía de señalización “hsa04510: *Focal Adhesion*” (Figura 3.66), “hsa04151: *Pi3k-Akt*” (Figura 3.67), vía de señalización de “hsa04390: *Hippo*” (Figura 3.68) y los genes del “hsa04110: *Ciclo celular*” (Figura 3.69).

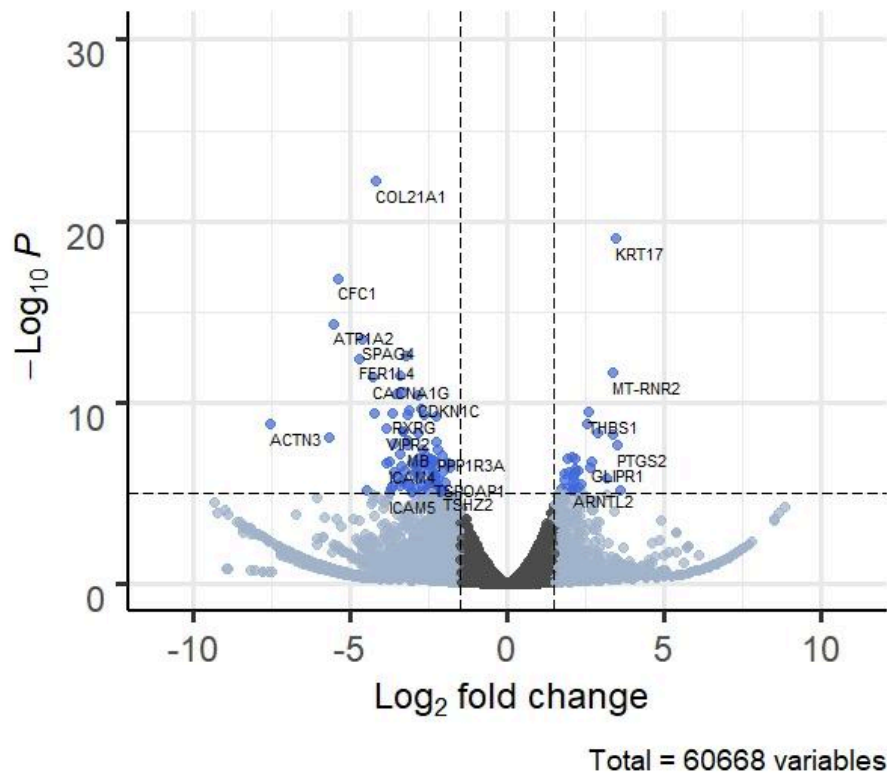


Figura 3.60. Análisis diferencial de la expresión de los mARNs. En el volcano plot se muestra el análisis diferencial de los niveles de expresión de los mARNs al comparar los CM-iPSC de día 21 respecto a los CM-iPSC luego de 24hs de resembrados. En azul están representados los mARNs que aumentan y disminuyen sus niveles de expresión, que presentaron un \log_2 de las veces de cambio mayor a 2 y un p-valor $<0,05$.

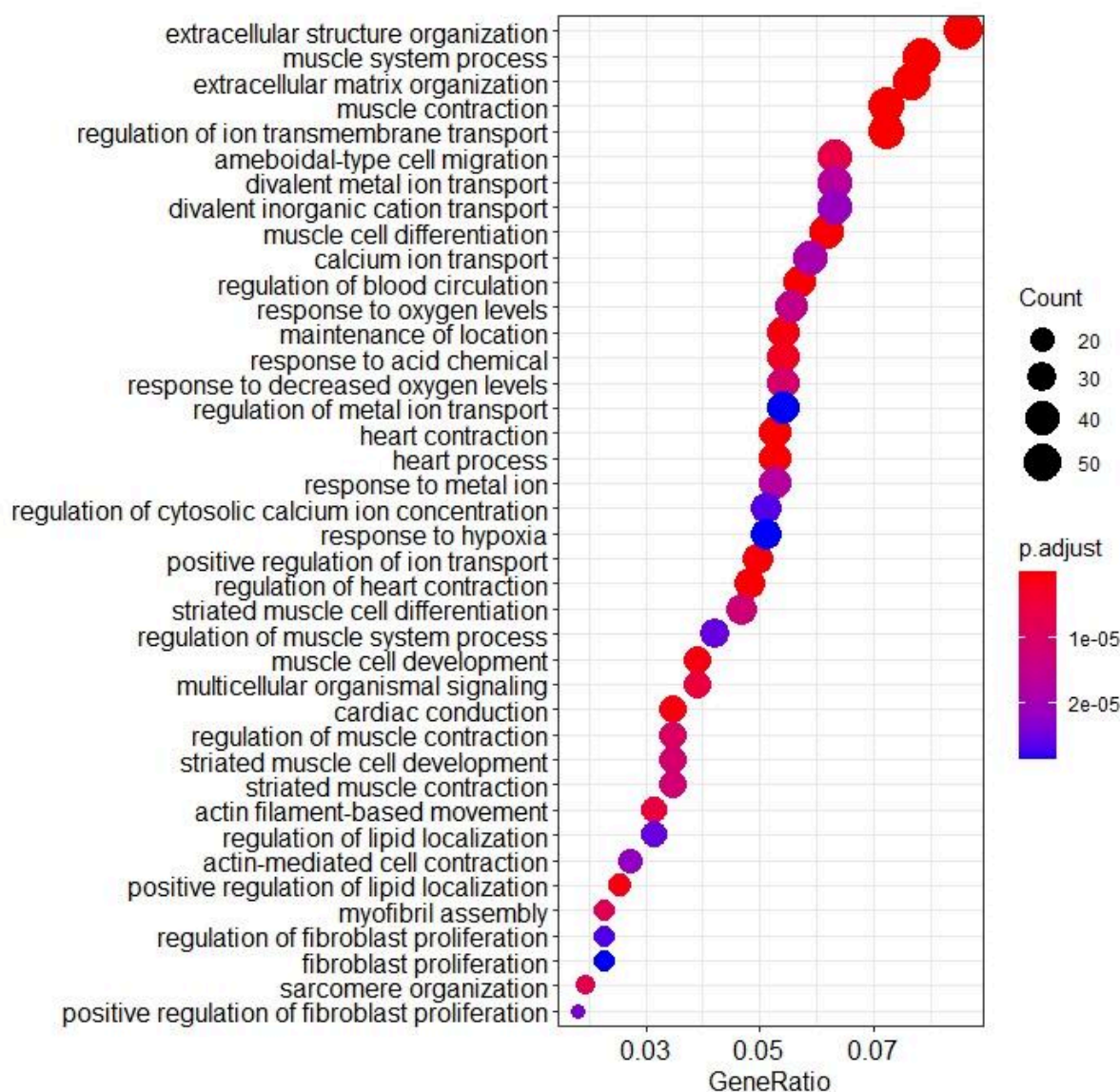


Figura 3.61. Procesos Biológicos. Análisis de Gene Ontology de los genes diferencialmente expresados entre los CM-iPSc de día 21 y los CM-iPSC re sembrados. En el gráfico están representados los primeros 40 términos de GO de Procesos Biológicos. El tamaño del dot corresponde al número de genes relacionados con cada término GO, el color a el p-valor y en el eje x el GeneRatio hace referencia a el número de genes observados sobre los esperados.

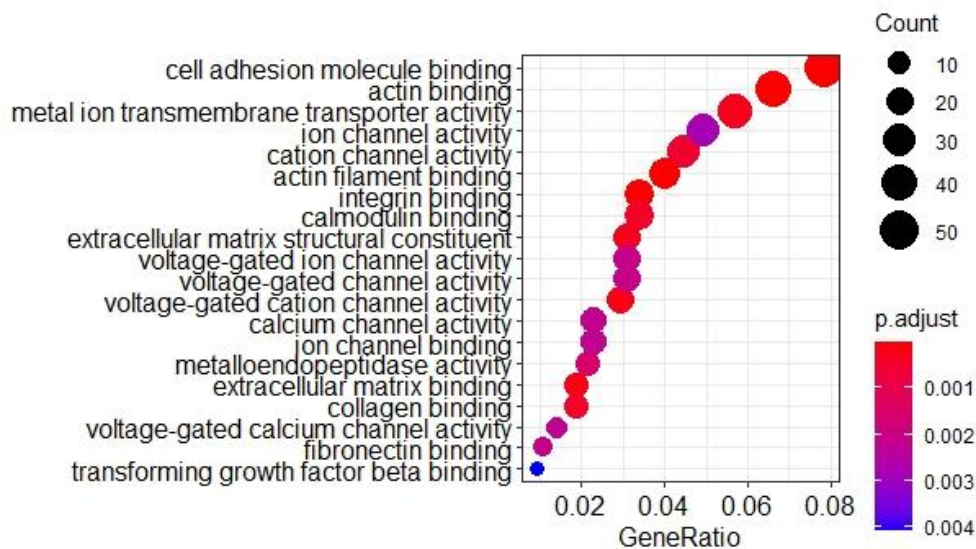


Figura 3.62. Funciones moleculares. Análisis de Gene Ontology de los genes diferencialmente expresados entre los CM-iPSc de día 21 y los CM-iPSC re sembrados. En el gráfico están representados los primeros 20 términos de GO de Funciones moleculares. El tamaño del punto corresponde al número de genes relacionados con cada término GO, el color a el p-valor y en el eje x el GeneRatio hace referencia a el número de genes observados sobre los esperados.

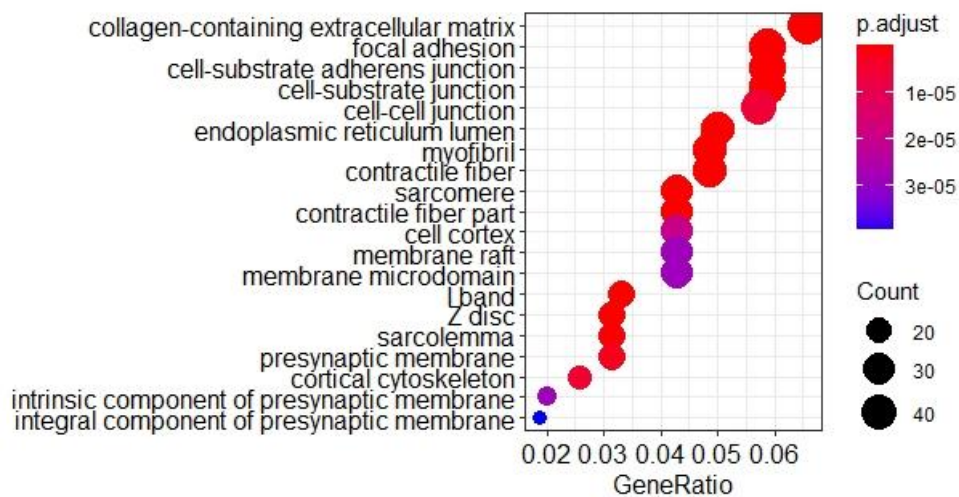


Figura 3.63. Componentes celulares. Análisis de Gene Ontology de los genes diferencialmente expresados entre los CM-iPSc de día 21 y los CM-iPSC re sembrados. En el gráfico están representados los primeros 20 términos de GO de Componentes celulares. El tamaño del punto corresponde al número de genes relacionados con cada término GO, el color a el p-valor y en el eje x el GeneRatio hace referencia a el número de genes observados sobre los esperados.

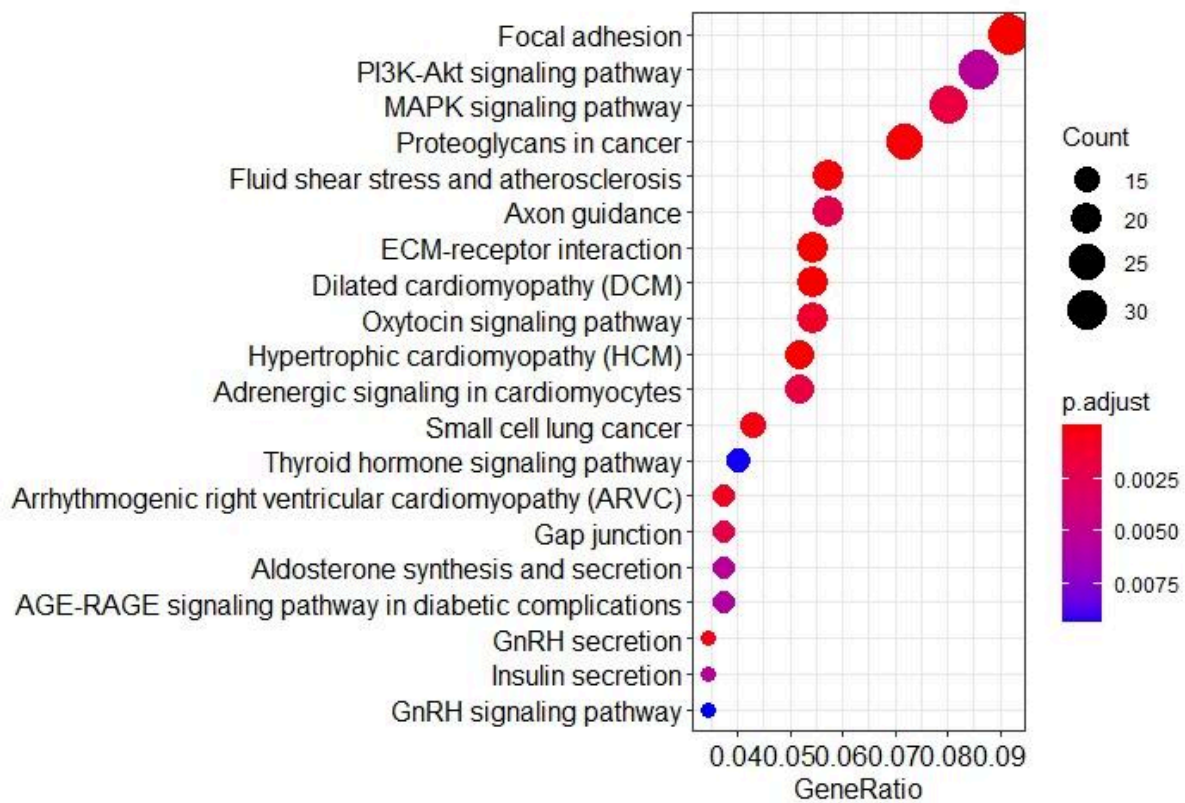


Figura 3.64. Vías de señalización de KEGG. Análisis de las vías de señalización de Kegg de los genes diferencialmente expresados entre los CM-iPSc de día 21 y los CM-iPSc re sembrados. En gráfico están representados los primeros 20 pathways. El tamaño del punto corresponde al número de genes presentes en cada pathway, el color a el p-valor ajustado y en el eje x el GeneRatio hace referencia a el número de genes observados sobre los esperados.

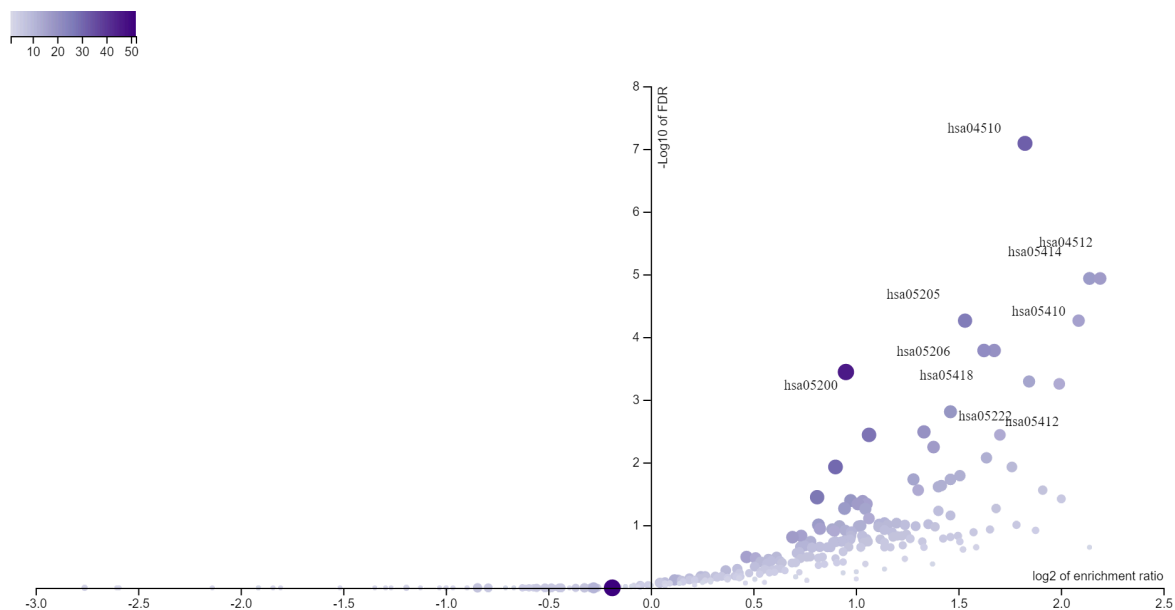


Figura 3.65. Expresión diferencial para las vías de señalización de KEGG. Gráfico Volcano plot donde se visualizan los Pathways de Kegg según las veces de cambio (\log_2) entre los CM-iPSc de día 21 y los CM-iPSc re sembrados. El color del punto corresponde al número de genes presentes en cada pathway.

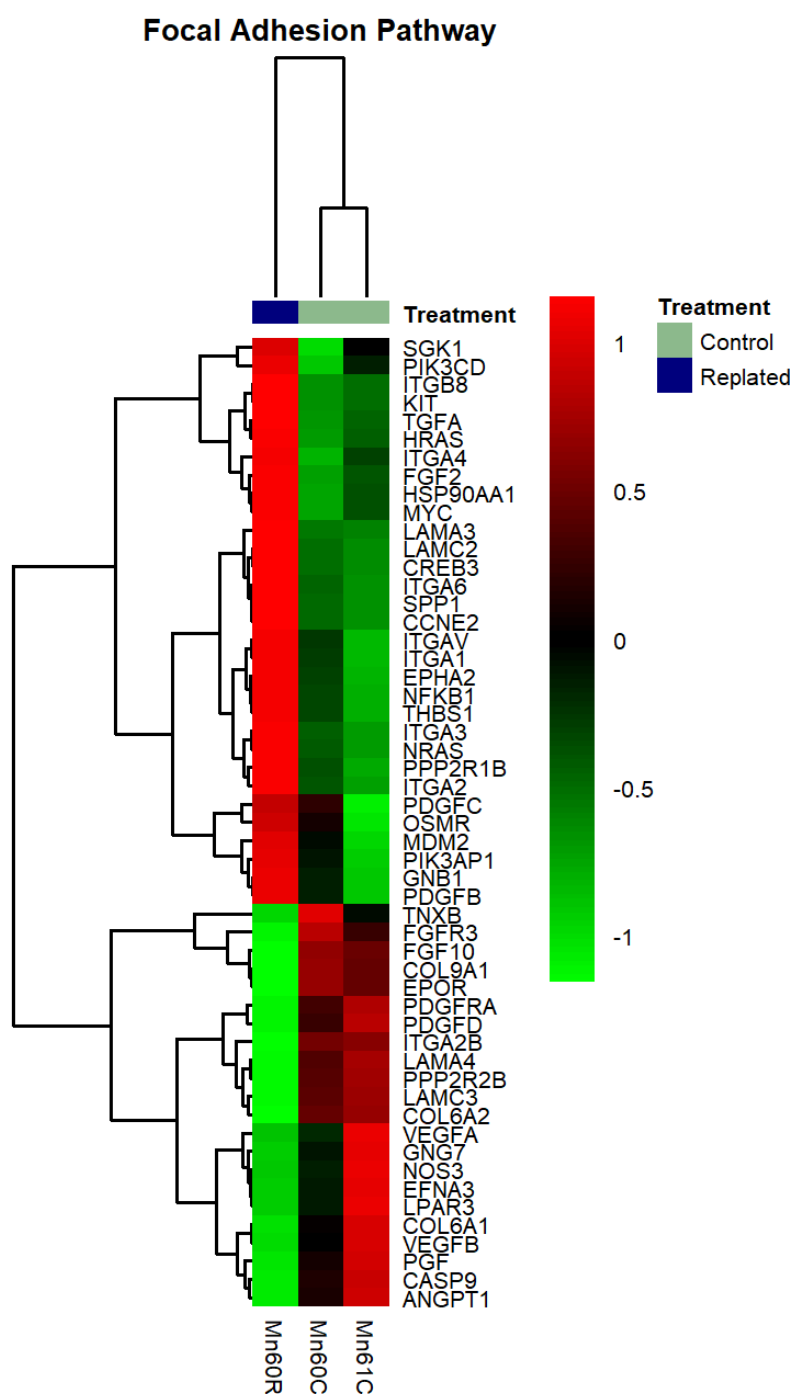


Figura 3.66. Adhesiones focales. Heatmap de niveles de expresión de los mRNAs en los CM-iPSC de día 21 y los CM-iPSC resembrados, para la vía de señalización de Kegg de “Adhesiones focales”. En rojo están representados los niveles de expresión altos y en verde los bajos. Los datos fueron estandarizados entre 1 y -1. Las muestras Mn60-C y Mn61-C corresponden a los CM-iPSC control y Mn60-R a los CM-iPSC resembrados.

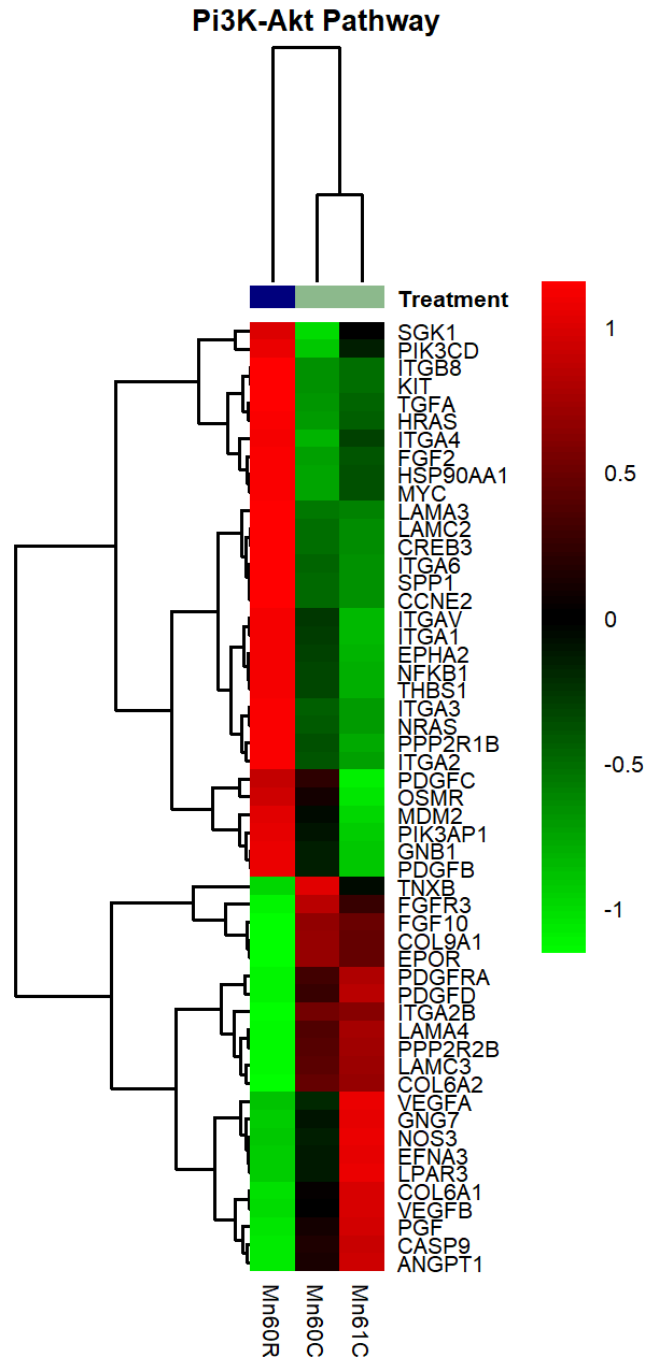


Figura 3.67. Vía de Pi3K-Akt. Heatmap de niveles de expresión de los mRNAs en los CM-iPSC de día 21 y los CM-iPSC resembrados, para la vía de señalización de Kegg de “Pi3K-Akt”. En rojo están representados los niveles de expresión altos y en verde los bajos. Los datos fueron estandarizados entre 1 y -1. Las muestras Mn60-C y Mn61-C corresponden a los CM-iPSC control y Mn60-R a los CM-iPSC resembrados.

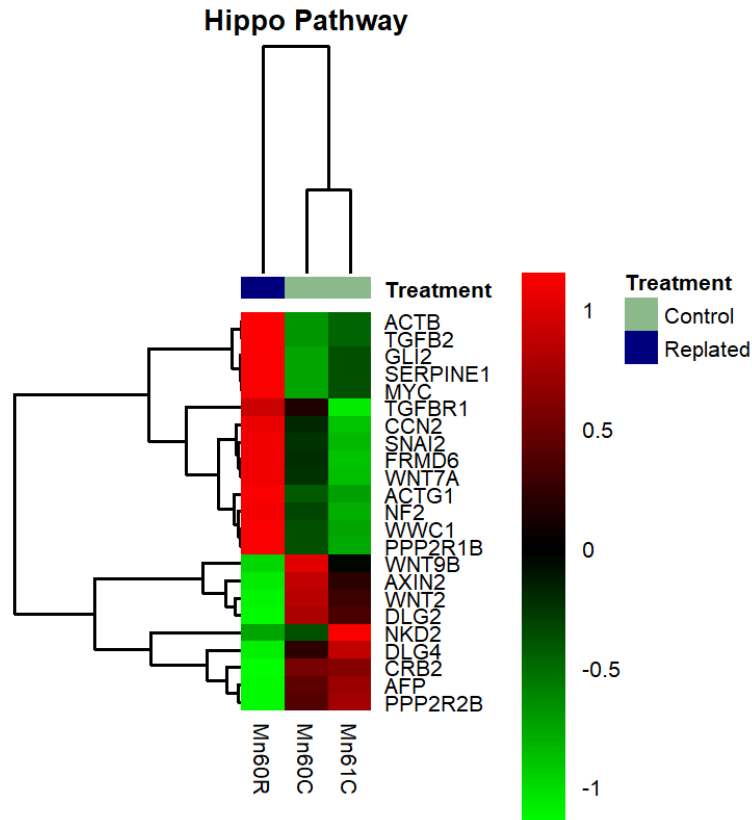


Figura 3.68. Vía de Hippo. Heatmap de niveles de expresión de los mRNAs en los CM-iPSC de día 21 y los CM-iPSC resembrados, para la vía de señalización de Kegg de “Hippo”. En rojo están representados los niveles de expresión altos y en verde los bajos. Los datos fueron estandarizados entre 1 y -1. Las muestras Mn60-C y Mn61-C corresponden a los CM-iPSC control y Mn60-R a los CM-iPSC resembrados.

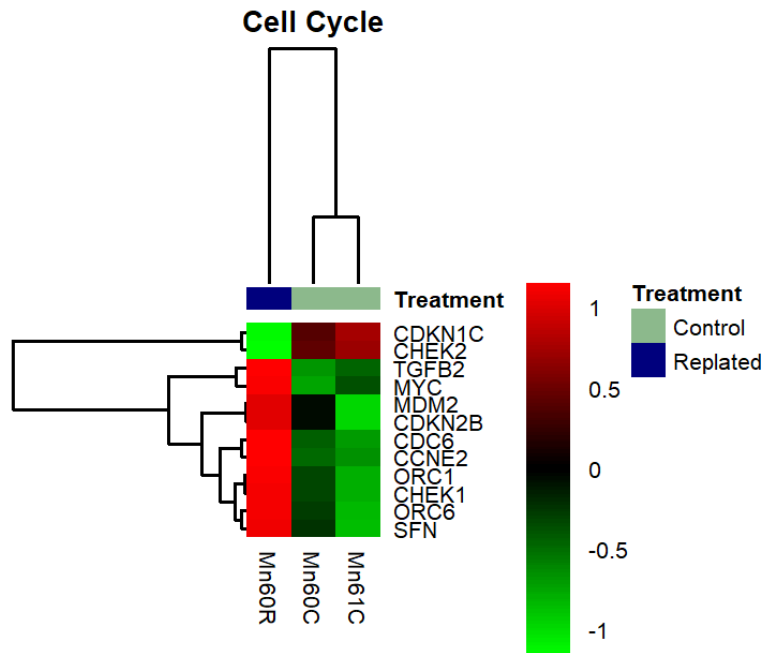


Figura 3.69. Ciclo celular. Heatmap de niveles de expresión de los mRNAs en los CM-iPSC de día 21 y los CM-iPSC resembrados, para la vía de señalización de Kegg de “Ciclo celular”. En rojo están representados los niveles de expresión altos y en verde los bajos. Los datos fueron estandarizados entre 1 y -1. Las muestras Mn60-C y Mn61-C corresponden a los CM-iPSC control y Mn60-R a los CM-iPSC resembrados.

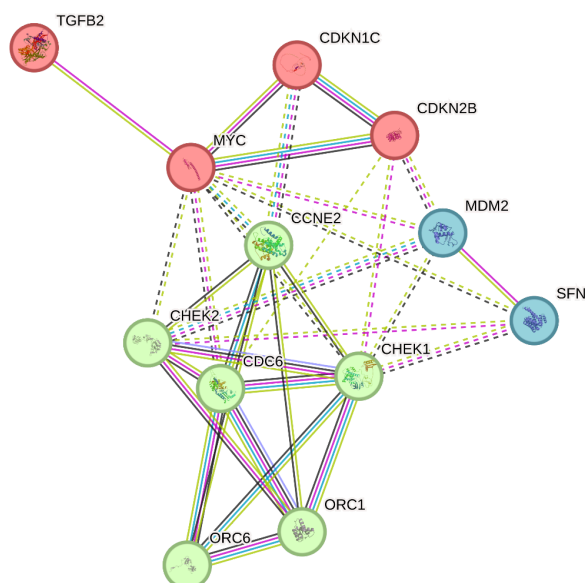


Figura 3.70. Análisis de relaciones entre los genes de “Ciclo celular”. Representación gráfica de las interacciones entre las proteínas relacionadas con el ciclo celular diferencialmente expresadas entre los dos tratamientos. Se utilizó el programa String-db (www.string-db.org; Szklarczyk y col., 2017). Los colores de los nodos representan los 4 clusters identificados por kmeans. Las conexiones predichas experimentalmente se encuentran en violeta, de bases de datos curadas en celeste, por genes de cercanía en verde, por coexpresión en negro y en verde claro por análisis de textos.

3.3.5 Conclusión y comparación entre los distintos métodos

En este último capítulo se llevaron a cabo tres estrategias que por bibliografía podrían haber modificado el ciclo celular y la capacidad proliferativa de los CM-iPSC: primero, el tratamiento conjunto con FGFa y el inhibidor de p38, SB203580, segundo, la incubación con el mimic del mir-520a, y tercero, el cultivo con medio condicionado por WJ-MSC. Más allá de los resultados obtenidos en esas tres estrategias, se identificó que al levantar los CM-iPSC del plato de cultivo y volver a sembrarlos se produce un aumento de la proliferación celular.

Particularmente, al incubar los CM-iPSC con SB203580 y FGFa, en las dos concentraciones utilizadas, no se observó un aumento significado de la población de CM-iPSC en S/G2/M. Sólo se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la comparación del control ($6,77 \pm 0,39$) con el tratamiento con 100 ng/ml FGFa ($11,53 \pm 0,48$), a las 48 hs. En este ensayo se había decidido evaluar el reingreso al ciclo celular, aplicando los distintos tratamientos cuando la mayoría de las células se encontraban sin ciclar, ya que la bibliografía hablaba de reingreso al ciclo celular, pero

también se podría evaluar el mantenimiento de la proliferación de los CM-iPSC tratándolos luego de ser re sembrados. Se propone a futuro evaluar los efectos de un tratamiento pulsado con SB203580 y/o FGFa y también evaluar los efectos sobre la apoptosis celular.

Por otro lado, se observó un aumento significativo de núcleos de CM-iPSC en S/G2/M que fueron sometidos al tratamiento con mimic-miR520a. A las 48 hs se observó un aumento del 11,2 % respecto del tratamiento con mimic-ctrl, en el mantenimiento de la proliferación de los CM-iPSC que incrementaron su división celular luego de ser resembrados. El estudio de la binucleación de los CM-iPSC permite inferir que las células completan la división celular ya que no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento y el control, para corroborar esto sería pertinente realizar el estudio de las proteínas involucradas en las citocinesis. El estudio de los genes targets reveló que el efecto puede estar mediado por la acción sobre TBRS, CCNB2, CDK2, DUSP22, AREG, CCNJ o CCNE2.

También se evaluó el efecto parácrino de las WJ-MSC sobre el ciclo celular de los CM-iPSC, observándose aumento en la proliferación o bien mantenimiento de la misma sin incrementar la binucleación celular. Con el objetivo de poder identificar las proteínas efectoras se estudió la proteómica del medio condicionado por WJ-MSC, y se identificaron proteínas relacionadas con la vía de Hippo, con Hif-1 y Pi3K-Akt.

En la última parte de este capítulo se trabajó sobre los efectos del resembrado de los CM-iPSC y la criopreservación de los mismos. Dado que los CM-iPSC aumentan su proliferación al levantarlos de la placa de cultivo y volver a sembrarlos se decidió estudiar los ARNm diferencialmente expresados en esta situación con respecto a aquellas células del protocolo de diferenciación cardíaca que no son sometidas al resembrado. De aquí surge que podrían estar involucradas en el aumento de la proliferación celular, proteínas involucradas en la adhesión celular, o en las vías de Pi3k-Akt o Hippo.

DISCUSIÓN

4. Discusión

La principal causa de muerte en el mundo es la cardiopatía isquémica, responsable del 16% del total de muertes mundiales, y la segunda el infarto. Entre 2000 y 2019, las muertes por cardiopatía isquémica han aumentado en más de 1,2 millones, el mayor aumento entre las principales causas de muerte en el mundo (OMS, s.f.). La principal limitación para progresar en la comprensión de las enfermedades cardiovasculares y en el desarrollo de terapias radica en la dificultad de aislar cardiomiocitos para su estudio. Sin embargo, una posibilidad para obtener células cardíacas humanas proviene de la diferenciación a partir de células madre. De hecho, este campo de estudio sigue en auge, principalmente luego de haber recibido el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año 2012, el investigador Shinya Yamanaka. Es por ello que resulta necesario el desarrollo de un protocolo de diferenciación cardíaca a partir de iPSC, generando un CM que pueda ser mantenido y amplificado en cultivo. Los CM-iPSC humanos han demostrado ser una herramienta útil en el modelado de enfermedades humanas, el descubrimiento de fármacos, la biología del desarrollo y la medicina regenerativa. Sin embargo, los cardiomiocitos de los mamíferos adultos poseen limitada capacidad proliferativa y esta fisiología se reproduce en los CM-iPSC humanos. Los cardiomiocitos de los mamíferos salen del ciclo celular poco después del nacimiento, donde se someten a una ronda final de síntesis de ADN, se binuclean y se diferencian terminalmente. Por otro lado, algunos organismos, como el pez cebra adulto y los ratones recién nacidos, tienen la capacidad de regenerar tejido cardíaco después de una lesión. La capacidad de regeneración cardíaca es un fenómeno fascinante que varía entre especies y etapas de desarrollo. Los resultados presentados abordan la complejidad de este proceso, centrándose en CM-iPSC. A partir de la revisión exhaustiva de la literatura y los experimentos realizados, se evidencia una serie de hallazgos significativos en relación con la proliferación celular, la expresión de genes clave y la viabilidad de los CM-iPSC. A continuación, se discuten los principales resultados y se plantean posibles interpretaciones y direcciones futuras para la investigación.

En función de estos intereses se han desarrollado algunos protocolos de diferenciación cardíaca a partir de células madre, como se han descrito en la introducción de esta tesis. Las estrategias

más reproducibles y eficientes involucran etapas específicas de activación e inhibición de diferentes vías de señalización en condiciones de cultivo definidas, recapitulando los pasos clave en el desarrollo cardíaco en el embrión temprano. De los protocolos estudiados en esta tesis, resultó más eficiente y con menor costo económico y de esfuerzo humano el derivado de Lian y col. (2012.B) con el agregado del paso de purificación por selección metabólica y luego por un paso extra de re sembrado. También comprobamos que se podía amplificar el cultivo por medio de la técnica de resiembra, pero solo hasta el día 120 con el protocolo planteado en la tesis. Los CM-iPSC, conforme avanzaban los días adquirirían una morfología más madura, manteniendo su actividad contráctil, está en estudio la evaluación de esa maduración respecto a una posible hipertrofia celular, ya que en algunos casos los CM-iPSC no sólo crecían en tamaño sino también en el número de núcleos, llegando a tener células con 6 núcleos. En el desarrollo del corazón de mamíferos, los CMs crecen en número y luego en tamaño, aumentando también el contenido de ADN por multinucleación. Aunque la hipertrofia cardíaca frecuentemente se asocia con la poliploidía, no está claro si se trata de una causa o consecuencia del crecimiento hipertrófico. Resulta interesante desarrollar métodos para aumentar la proliferación de los CM-iPSC en una etapa temprana de los protocolos de diferenciación y luego mejorar su maduración, para sortear las limitaciones actuales en el campo de la investigación de la medicina regenerativa. Por eso, la hipótesis de esta tesis radica en que es posible incrementar el número de células cardíacas que pueden ser obtenidas en cultivo a partir de iPSC si se manipula la salida del ciclo celular.

Para poner a prueba esta hipótesis se propone el estudio de diferentes estrategias moduladoras del ciclo celular en CM-iPSC humanas. Se estudió el efecto producido por el tratamiento con: FGFa, SB203580 (inhibidor de p38), miR520a y medio condicionado por células mesenquimales (MSC). Además se evaluó la posibilidad de criopreservar y mantener una línea de CM-iPSC durante múltiples pasajes.

La actividad de la proteína p38 MAP quinasa es uno de los mecanismos importantes usados por los cardiomiocitos de mamíferos para controlar la proliferación, ya que se ha demostrado que la regula la expresión de genes requeridos para la mitosis de los cardiomiocitos, su actividad se correlaciona indirectamente con el crecimiento cardíaco durante el desarrollo y su sobreexpresión bloquea la proliferación de cardiomiocitos fetales. A su vez, la inhibición de p38 promueve la citocinesis de cardiomiocitos adultos en cultivo. Ensayos in vitro sugieren que para evidenciar el efecto de la inhibición de p38, es necesario realizar una estimulación con FGFa. Por lo tanto, estudios previos han demostrado que p38 es un regulador negativo clave de la proliferación de cardiomiocitos postmitóticos. Al igual que en esta tesis, las concentraciones

utilizadas para ver estos efectos fueron de 10 uM de SB203580 y de 50 ng/ml de FGFa. Al evaluar estos efectos en modelos in vivo, los resultados obtenidos de incremento de la población de cardiomiocitos que reparan la injuria cardíaca, podrían deberse al aumento de la proliferación de las células madre residentes del corazón, o bien al reclutamiento de células periféricas (Engel y col., 2006). El receptor de FGF, FGFR-1, interactúa con el receptor de TNF, Fn14 reactivando la reentrada del ciclo celular de CM. Estos datos son los que llevaron a plantear como hipótesis de esta tesis, que era posible reingresar los CM-iPSC al ciclo celular por medio del tratamiento con FGFa y SB203580. Para ello los CM-iPSC fueron cultivados hasta valores casi nulos de proliferación y luego tratados con dos concentraciones distintas del inhibidor de SB203580 y/o FGFa. Sin embargo, solo se obtuvieron diferencias significativas en la proliferación de los CM-iPSC estudiado con la línea Fucci, al tratar las células con 100 ng/ml FGFa. Evaluando la bibliografía, se propone a futuro realizar pulsos de inhibición de p38 y evaluar la actividad de esta proteína.

La otra técnica que se evaluó se aprovecha de la característica de los microRNAs de poder regular múltiples genes blanco. Los miRNAs regulan la expresión génica post-transcripcionalmente, por apareamiento de bases y es probable que puedan unirse a múltiples genes de una misma vía reforzando su acción. Particularmente, la alteración de la expresión de los miRNAs está asociada a varias cardiopatías. También, se ha demostrado que algunos miRNAs inhiben la proliferación cardíaca (como el miR-199 y miR133) y otros la promueven (como el miR-590-3p y miR-199a-3p). En el trabajo de Díez-Cuñado (2018) se han identificado 96 miRNAs sintéticos que pueden promover la síntesis de ADN y la citocinesis de CM-iPSCs, de los cuales, 84 inducen la translocación nuclear de YAP, y 67 de ellos requieren de YAP para promover la proliferación de los CMs. De este trabajo surge la hipótesis de probar específicamente el miR-520a como un posible promotor de la proliferación de los CM-iPSC obtenidos en el laboratorio. El ensayo se realizó sobre CM-iPSC que ya se encontraba con un nivel inicial de proliferación debido a la acción del replaqueo, y sobre esto se obtuvo un aumento significativo de reingreso al ciclo celular con el tratamiento con el mimic del miR520a, a las 48 hs. Y al no observar diferencias significativas en la binucleación de los CM-iPSC entre el tratamiento y el control, se puede inferir que las células completan la división celular, aunque para corroborar esto se podría realizar el estudio de las proteínas involucradas en las citocinesis, o bien un seguimiento por timelapse de las mitosis. Para poder identificar posibles mecanismos de acción del miR-520a, se estudiaron los resultados de la secuenciación de la AgoIP realizada en CM-iPSC y se encontró que es un regulador directo de genes que codifican para proteínas del

ciclo celular, como CCNB2 y CDK2 que están involucradas en la transición de la fase G2 a la mitosis, o WEE2 que regula el ciclo celular al inhibir la actividad de las quinasas dependientes de ciclina CDK1 y CDK2, lo que contribuye a la progresión adecuada a través de la fase G2 del ciclo celular. También regula a TGF β 2 que participa la transición de las fases G1 a S actuando como un inhibidor del ciclo celular. La proteína efectora final de la vía de Hippo es YAP, un coactivador de la transcripción, que co-activa con TEAD (*TEA domain transcription factor proteins*) la expresión de reguladores del ciclo celular y otros genes como AREG (*amphiregulin*) que a su vez es regulada por mir-520a, aumentando la proliferación celular y disminuyendo la apoptosis. Para comprobar el efecto del mir-520a sobre estas vías se propone evaluar la actividad de las distintas proteínas que se marcaron como targets del mir-520a y que están íntimamente relacionadas con el ciclo celular. Hay que tener en cuenta, también que una limitación de los ensayos de AgoIP y sobreexpresión es que los miARN o siARN transfectados pueden distorsionar el perfil de miARN endógenos cargados en RISC.

El estudio de las MSCs ha generado un creciente interés en el campo de la regeneración tisular y la medicina regenerativa. A pesar de no poseer la pluripotencia de las CME o las iPSC, presentan propiedades únicas que las hacen atractivas para aplicaciones clínicas, por su capacidad para diferenciarse hacia adipocitos, condrocitos u osteocitos, junto con su facultad de auto-renovación (Pittenger y col., 1999; Dominici y col., 2006). Una de las propiedades más atractivas de las MSCs es su capacidad para modular la respuesta inmunitaria y su baja propensión al rechazo por el sistema inmunológico del receptor. Este fenómeno se atribuye a la capacidad de las MSCs para secretar factores y citoquinas que estimulan la reparación tisular y modulan la inflamación (Caplan y Dennis, 2006). Entre estos factores, se encuentran la Angiogenina, Endotelina-1, FGF2, FGF7, LIF, SCF, MIF, PGF, PDGF, PTN, TGF- β y TNF- α , que desempeñan un papel crucial en la reparación del tejido cardíaco (Gnecchi y col., 2008).

El papel de las EVs secretadas por las MSCs también se destaca, ya que estas vesículas pueden contener moléculas bioactivas, como lípidos, mRNA, miRNAs y proteínas, que desencadenan efectos paracrinós y pueden influir en el ciclo celular y la muerte celular de los cardiomiocitos (Ju y col., 2018). A pesar de la promisoría capacidad regenerativa de las MSCs, la respuesta es variable en diferentes contextos experimentales. Algunos estudios sugieren que las MSCs pueden estimular la reparación cardíaca a través de interacciones directas y la donación de mitocondrias (Cselenyák y col., 2010; Acquistapace y col., 2011). Sin embargo, la aplicación de medio condicionado de MSCs de médula ósea en un modelo de infarto agudo de miocardio en ratas no mostró un efecto protector significativo en términos de tamaño de la herida (Gnecchi y

col., 2005). En este trabajo se evaluó el efecto del secretoma de las WJ-MSCs en el ciclo celular de CM-iPSC. Los resultados sugieren que el medio condicionado por WJ-MSC mantiene la activación del ciclo celular de los CM-iPSC, mientras que los CM-iPSC cultivados sin el medio condicionado experimentan una disminución en la proliferación con el tiempo. Este efecto podría estar mediado por proteínas presentes en los EVs de WJ-MSC, ya que cuando se realizó el estudio proteómico en comparación con los EVs de iPSC-MSC, se encontraron enriquecidas en proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular y la replicación de ADN (La Greca y col., 2018). Los resultados obtenidos en esta tesis respaldan la idea de que las WJ-MSCs, a través de su secretoma, pueden estimular la proliferación de los cardiomiocitos. La identificación de proteínas relacionadas con la vía de Hippo, Hif-1 y Pi3K-Akt en el análisis proteómico del medio condicionado por WJ-MSC proporciona pistas sobre los posibles mecanismos moleculares involucrados en la modulación del ciclo celular de los cardiomiocitos. Otro estudio del secretoma de las CME-MSC detectó proteínas involucradas en las vías de biología cardiovascular, Jak-STAT, MAPK, Toll-like receptor, TGF y mTOR (Sze y col., 2007). En trabajos previos de análisis del secretoma también se han identificado los factores, VEGF, HGF, IGF-1, SDF1 α , TGF- β y TSG-6. Estos mediadores estimulan la angiogénesis, inhiben la apoptosis o modulan las vías inflamatorias (Sadat y col., 2007). Estas vías son conocidas por su participación en la regulación del crecimiento celular y la respuesta a la hipoxia. Hay un gran abanico de posibles efectores de la respuesta de los CM-iPSC, por lo cual, la propuesta de esta tesis es realizar un RNAseq que nos permita identificar efectivamente el accionar del medio condicionado de las WJ-MSC sobre los CM-iPSC, de manera tal de poder ir refinando la búsqueda sobre la explicación del mecanismo utilizado. En conclusión, este estudio proporciona evidencia de que las WJ-MSC pueden influir en el ciclo celular y la proliferación de los CM-iPSC por medio de su secretoma. La identificación de las moléculas involucradas abre nuevas perspectivas para comprender los mecanismos subyacentes y optimizar el uso de las MSCs y sus derivados en aplicaciones terapéuticas para la regeneración cardíaca. Sin embargo, se necesita más investigación para explorar completamente la complejidad de estas interacciones y garantizar la eficacia clínica de estas terapias. A futuro también se podría evaluar el precondicionamiento de las MSC ya que se ha observado que puede favorecer la secreción de factores en la dirección deseada (Ranganath y col., 2012). Por otro lado, las terapias con medio condicionado por MSC, en vez de las propias células podría permitirnos evitar algunos de los factores limitantes asociados con la terapia celular, como la incompatibilidad inmune, tumorigenicidad, costos y tiempo de espera para la expansión ex vivo.

Por último, se estudió el efecto sobre el ciclo celular de los CM-iPSC luego de criopreservar y resembrar las células. Fue posible congelar en nitrógeno líquido los CM-iPSC, descongelarlos y mantenerlos en cultivo. Se podría evaluar a futuro el efecto de múltiples eventos de criopreservación, lo cual no fue evaluado en esta tesis. Tanto al resembrar los CM-iPSC por haber sido criopreservados, o bien por haberlos levantado del plato de cultivo recientemente, se observa un aumento en la proliferación celular, ya sea evaluada por la línea reportera FUCCI o por la incorporación de EdU. Este efecto también fue observado por Tohyama y col. (2012) al disgregar EBs de un protocolo de diferenciación cardíaca luego de ser sometidos a un proceso de selección metabólica por lactato. Sin embargo este incremento en de Ki67 o incorporación de EdU los autores no lo adjudicaron al proceso de disgregación y siembra sino a la selección metabólica.

Cuando analizamos la proliferación celular durante el protocolo de diferenciación cardíaca, se observa una ventana crítica de proliferación en CM-iPSC, alcanzando su pico a los 21 días de diferenciación y disminuyendo significativamente a los 30 días. El resembrado a los 21 días induce una revitalización temporal, aumentando la proliferación celular. Sin embargo, esta capacidad disminuye progresivamente después de 7 días. La capacidad de proliferación parece estar ligada al estado temprano de diferenciación, sugiriendo una ventana temporal específica para la expansión eficiente de CM-iPSC. El resembrado ofrece una estrategia para estimular la proliferación, pero es eficaz sólo a corto plazo, ya que a partir del día 70 los pasajes son menos eficientes y se observa aumento de muerte celular, lo cual plantea preguntas sobre la estabilidad a largo plazo de la proliferación inducida. Se evaluaron algunos genes asociados con el ciclo celular, como ciclinas y reguladores celulares, sin encontrar diferencias significativas entre los CM-iPSC resembrados y los de 21 días, por lo que se propone el estudio exploratorio de posibles genes involucrados en este proceso. También se plantea la hipótesis de que la regulación puede estar dada por modificaciones post-transcripcionales, para lo cual sería pertinente evaluar la actividad proteica.

Con el fin de estudiar cuáles son las vías efectoras del aumento del ciclo celular en los cardiomiocitos resembrados, se evaluó la expresión del ARNm por medio de RNA-seq. El análisis de estos datos revela una serie de genes diferencialmente expresados entre CM-iPSC resembrados y aquellos de 21 días, destacando genes relacionados con la vía de PI3K-Akt y la vía de Hippo. Como parte de la vía de Hippo, la proteína YAP/TAZ coactivada con TEAD puede inducir la expresión de AuroraB, CCNB1, CDC20, CDC25b, CDC2, favoreciendo la proliferación de los

cardiomiocitos (Zhou y col., 2015), también puede ejercer su efecto por acción sobre β -catenina, la cual activa la ciclina D, favoreciendo el pasaje de G1 a S (Hashmi y Ahmad, 2019).

Por otro lado, la vía de PI3K-Akt promueve el ciclo celular y la apoptosis. Los estudios han demostrado que la expresión constitutiva de Akt puede prolongar la vida media de la ciclina D, lo que resulta en una regulación positiva del ciclo celular, mientras que la inhibición de PI3K acelera la degradación de la ciclina D1 (Parekh y col., 2010). La expresión de p27, un regulador negativo del ciclo celular también se ve disminuido por PI3K-AKT, facilitando la progresión de la fase G2/M (Hashmi y Ahmad, 2019).

La secuenciación masiva proporciona una visión integral de los cambios genéticos subyacentes, ofreciendo posibles objetivos moleculares para la regulación de la proliferación.

Entre los mRNAs relacionados al ciclo celular que se encontraron sobreexpresados con respecto al control del día 21 se encuentran $TGF\beta 2$, CDKN2B, CDC6, CCNE2, CHEK1. En el análisis de RT-qPCR se había evaluado la expresión de la ciclina E1, sin obtener diferencias significativas entre los tratamientos, pero con el RNA-seq se obtuvo mayor expresión de la ciclina E2 en los CM-iPSC replaqueados respecto del control. Por otro lado, también se encontró aumentada la expresión de CDKN2B y $TGF\beta$ en los CM-iPSC replaqueados, siendo la primera inductora de la expresión de la segunda, la cual actúa favoreciendo la proliferación celular.

La capacidad de regeneración de CM-iPSC es un fenómeno complejo y dinámico, con múltiples factores que influyen en la proliferación y estabilidad a largo plazo. Estos resultados no solo amplían nuestra comprensión de la biología de los cardiomiocitos, sino que también establecen bases sólidas para futuras investigaciones que podrían mejorar las aplicaciones terapéuticas y la ingeniería de tejidos cardiacos.

MATERIALES Y MÉTODOS

5. Materiales y métodos

5.1 Líneas celulares

Para la realización de este trabajo se utilizaron las líneas de células madres embrionarias (CMEh) adquiridas del instituto *WiCell* de la Universidad de Wisconsin, WA09 (H9; Thomson y col. 1998) y H9-hTnnT2-pGZ-D2 (Figura 5.1; Wrighton y col. 2014)). También se utilizó la línea de células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSC, del inglés *induced pluripotent stem cell*) que ha sido creada en el laboratorio a partir de fibroblastos humanos (FN2.1; Questa y col. 2016), y una línea de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, del inglés *murine embryonic fibroblast*). Las líneas de células madre fueron mantenidas en estado indiferenciado mediante dos tipos de cultivo: en placa sobre MEF irradiada o sobre Vitronectina o Geltrex, libre de derivados animales.

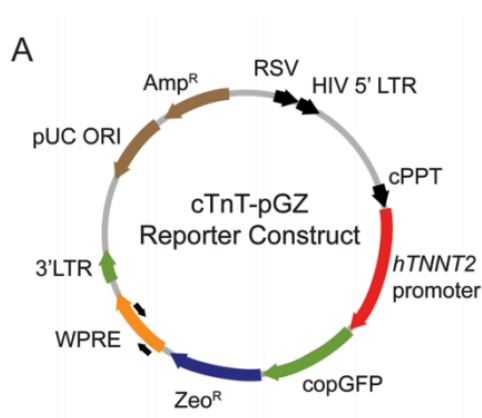


Figura 5.1: Construcción lentiviral que posee la línea celular H9-hTnnT2-pGZ-D2. El plásmido contiene el promotor específico del gen de troponina T cardíaca humana (TNNT2) dirigiendo la expresión de copGFP y de la resistencia a zeocina (cTnTpGZ).

5.2 Co-cultivo de CMEh sobre MEFi

Para el co-cultivo, las MEF deben ser irradiadas con el objetivo de inactivar la mitosis sin afectar su viabilidad. La irradiación se realiza con 40-80 Gy por la empresa CEBIRSA S.A. (Centro de Irradiación, Fitz Roy 2455, Ciudad de Buenos Aires, Argentina). Las MEF se cultivan en DMEM

(del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Gibco) con 10% v/v suero fetal bovino (SFB), renovándose el medio cada 3 días, en incubadora a 37°C y atmósfera al 5% CO₂.

Las CMEh se mantienen indiferenciadas sobre una capa de MEFi. En estas condiciones el medio de cultivo que se utiliza es HES y se renueva cada 24 hs. Este medio está compuesto por DMEM/F12 (Gibco), suplementado con 20% KSR (del inglés, *Knock Out Serum Replacement*; Gibco), 2 mM aminoácidos no esenciales, 2mM L-glutamina, 55mM β-Mercaptoetanol y 4 ng/ml bFGF (Invitrogen).

Los pasajes de las colonias de CMEh sobre MEFi se realizan con un tratamiento enzimático. Para ello, se lava la placa con PBS, se incuban durante 40 minutos con una solución 1 mg/ml de Colagenasa tipo IV (Gibco), se inactiva la enzima diluyéndola en medio HES, se centrifuga por 5 minutos a 200 g, se elimina el sobrenadante y se las vuelve a sembrar con medio HES fresco.

5.3 Cultivo de células embrionarias e iPSC libre de derivados animales

En el laboratorio las líneas celulares embrionarias o las iPSC se cultivan en placas de multiwell (*Corning o Cellstar-Greiner-Bio-One*) utilizando un sustrato de vitronectina (VTN-N, Gibco) o de Geltrex (Gibco). Como medio de cultivo generalmente se utiliza E8 Flex (Gibco), y cuando el ensayo lo requiere se utiliza StemFlex (Gibco) o mTeSR (StemCells). Estos son medios definidos comerciales especialmente desarrollados para el cultivo de células embrionarias o iPSC. Los pasajes de las células se realizan cada 3 o 4 días, ya que este es el tiempo máximo en que los sustratos son capaces de mantener los cultivos celulares indiferenciados. Las células se levantan de la placa de cultivo con Tryple Select 1X (Gibco) o con Versene (Gibco), en ambos casos se incuba por 5 minutos. Cuando se utiliza Tryple Select la incubación se realiza a 37°C y luego se diluye la enzima con PBS, se centrifuga durante 5 minutos a 200 g, se elimina el sobrenadante y se agrega medio nuevo. Por otro lado, luego de la incubación con Versene a temperatura ambiente, se descarta el reactivo y se resuspenden las células con medio fresco. El medio es suplementado con Y-27632 (inhibidor de Rock) 10 μM durante las primeras 24 horas (Tocris). La renovación de medio se realiza diariamente o luego de 48hs.

5.4 Cultivo de células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical humano

Para el cultivo de las células madres mesenquimales derivadas de cordón umbilical humano, WJ-MSC, se utilizó medio alfa-MEM (Gibco) suplementado con 10% de lisado de plaquetas y 2 mM L-glutamina, a 37°C y con 5% de CO₂. Generalmente se las cultiva en botellas de cultivo, T75

(JetBiofill). El lisado de plaquetas fue obtenido a partir de plaquetas ya no viables para transfusión donadas por el Servicio de Hemoterapia de la Fundación Fleni a nuestro laboratorio. Para prepararlo las bolsas de plaquetas sufrieron al menos dos congelamientos a -80°C durante 24 hs cada uno. Luego se juntaron aproximadamente 10 bolsas correspondientes a al menos 5 individuos diferentes en condiciones estériles y se incubaron durante 1 hora a 37°C junto con una solución de CaCl_2 10 mM para depletar al lisado de fibrinógeno. Con este paso se evitó la gelatinización del medio de cultivo y la acumulación excesiva de debris. Después de la incubación se formó un coágulo denso que es desarmado con una espátula, y se centrifugó durante 45 minutos a 3000 g a 18°C . El sobrenadante se retiró y se conservó a -20°C para su posterior uso.

Los pasajes celulares se realizaron con Tripsina (Gibco) incubando por 5 minutos a 37°C y se inactivó la enzima con igual volumen de DMEM (Gibco) suplementado con 10% SFB (Natocor). Luego, se centrifugaron durante 5 minutos a 300 g. El medio de cultivo fue renovado cada 48 horas.

Para la preparación del medio condicionado por WJ-MSC se dejó crecer el cultivo hasta un 60-70% de confluencia, se lavó la placa con PBS y luego se agregó RPMI-1640 (Gibco) durante 48 hs, ese medio se recolectó y se utilizó en el día. Este mismo medio es utilizado para el análisis proteómico. Con el objetivo de evaluar las proteínas que también están incluidas dentro de las vesículas extracelulares, se someten las muestras a un proceso de congelado a -20°C y descongelado, por tres veces.

5.5 Criopreservación celular

Para criopreservar las iPSC o líneas embrionarias, primero se las desprende de la matriz de cultivo como se indicó previamente. Las células son criopreservadas con 70% medio, 20% v/v SFB y 10% v/v DMSO. Este último reactivo se agrega gota a gota y agitando, minimizando el estrés que genera a las células. Luego, el criovial se coloca en un Mr Frosty a -80°C y al día siguiente el vial es guardado en nitrógeno líquido.

Para descongelar las células madre, se triplica el volumen del vial con medio, se centrifuga a 200 g por 5 minutos y el pellet se resuspende en medio fresco con 10 μM Y-27632. Por otro lado, el pellet de CM-iPSC se resuspende en Medio de Replaqueo (90% RPMI 1640, 10% KSR, B27 1x con insulina y 10 μM Y-27632).

5.6 Protocolo de diferenciación cardíaca utilizando “PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit” de Gibco

Para este método de diferenciación cardíaca se utilizó el protocolo indicado por el fabricante. En el mismo se indica que la eficiencia varía en función de la línea celular y que se debe poner a punto la concentración inicial ya que el rango de trabajo abarca desde una confluencia de 30% a 90% (actualizaciones recientes en el protocolo publicado por el fabricante indican una confluencia óptima de trabajo entre 35% y 60%). Brevemente se parte de iPSC o hESC en Medio E8 (Gibco) sobre geltrex de manera tal de llegar luego de tres días a la confluencia deseada. El día 1 se cambia el medio E8 por el “Medio A”, el día 3 por el “Medio B” y el día 5 por el “Medio de mantenimiento” en los volúmenes habituales de cultivo.

5.7 Protocolo de diferenciación cardíaca a partir de formación de cuerpos embrioides

Para el desarrollo de este protocolo se parte desde hESC o iPSC sobre MEFi. Las colonias de células madre se levantan de la matriz nutricia utilizando TrypLE Select 1x (Gibco) durante 5 minutos a 37°C. Para finalizar la reacción se realiza una dilución en PBS, obteniendo una suspensión unicelular que se somete a centrifugación a 200 g por 5 minutos. El sobrenadante se descarta y se resuspende en 1 ml de mTeSR (Stem Cells) con 10 μ M Y-27632 y BMP-4 10 ng/ml. Se toma una alícuota para evaluar viabilidad y cuantificar la concentración celular. En placa de 96 pocillos con fondo cónico, se siembran 25.000 células por pocillo, se centrifugan por 7 min a 1300 rpm y se incuban ON a 37°C y 5% de CO₂. A las 24 horas, se retiran de a uno los cuerpos con pipeta de 1000 μ l y se los paso a placa no adherente. En este momento el medio es cambiado por StemPro-34 suplementado con 10 ng/ml de BMP4, 5 ng/ml bFGF y 3 ng/ml Activina A. Al cuarto día los cuerpos se pasan a adherencia. Para ello, se tratan con gelatina 0,1% (Sigma) placas de cultivo adherentes y se cultivan las células con el medio anterior más 5 μ M de IWR-1. A partir del día 5, las células se mantienen con StemPro34 suplementado con 5ng/ml VEGF, 10 ng/ml bFGF y 5 μ M IWR-1. A partir del 8 día se pueden observar estructuras contráctiles y luego del día 15 se mantiene el cultivo en DMEM con 2% SFB.

5.8 Protocolo de diferenciación cardíaca en monocapa

Para la realización de este protocolo se utilizó una adaptación del publicado por Lian y col. (2012.B). Se parte de un cultivo sano de iPSC humanas cultivadas sobre Geltrex con E8flex. Para

comenzar con el protocolo, las células se levantan con TrypLE 1x (Gibco). Se plaquean 220.000 células por well de placa de mw24, con 10 μ M de inhibidor de ROCK (Y-27632) y 1ml de mTeSR. Luego de 3 días el cultivo llega a un 100% de confluencia y las células se encuentran muy compactadas. En el día 0 se cambia el medio por 1 ml de RPMI 1640 (Gibco) con 20 μ l B27 sin insulina (Invitrogen) y CHIR 9-12 μ M (Tocris). Para determinar la concentración de CHIR óptima para cada línea se realizó una curva de concentración evaluando la eficiencia en el protocolo de diferenciación cardíaca. A las 24 hs se retira el CHIR, pudiendo observar aumento de muerte celular. En el día 3 se descarta la mitad del medio y se agrega el mismo volumen de RPMI 1640 con B27 sin insulina (Gibco) más 5 μ M de IWP-2 (Inhibidor de la vía de Wnt). Luego de 24hs se retira el IWP-2, y al séptimo día se reemplaza el B27 por su versión con insulina. El medio se renueva cada 48 hs. Luego se puede realizar una selección para obtener mayor pureza de cardiomiocitos. Para ello se utiliza un medio enriquecido con lactato; aprovechando que los cardiomiocitos tienen la capacidad de metabolizar lactato, mientras que otras células que se pueden desarrollar mediante el proceso de diferenciación cardíaca sólo poseen la capacidad de metabolizar glucosa (Burridge y col., 2014). Para ello se cultivan las células durante 6 días con RPMI 1640 sin glucosa, 0,5 mg/ml BSA, 213 μ g/ml ácido ascórbico, 7mM lactato, renovando el medio cada 48 hs. De aquí en adelante las células pueden mantenerse con RPMI B27 con insulina o con DMEM con glucosa más 2% SFB y realizando el cambio de medio cada dos o tres días.

5.9 Criopreservación de CM-iPSC

Para la criopreservación de los CM-iPSC se procede a levantar las células de la placa de cultivo con TrypLE 10x por 5 minutos a 37°C. Se diluye con DMEM + 10% SFB. Por otro lado, las células cardíacas derivadas a partir del protocolo de formación de cuerpos embrioides se levantan de la placa de cultivo con TrypLE 10x, incubando por 15 minutos a 37°C, agitando cada 5 minutos y diluyendo la reacción con DMEM + 50% SFB. Se centrifugan las células por 5 minutos a 200 g y el pellet resultante se resuspende en SFB con 10%DMSO y 10 μ M de Y-27632. El criovial se coloca en un Mr.Frosty con isopropanol y se guarda a -80°C por 24 hs, luego se pasa a un tanque de nitrógeno líquido.

Para descongelar las células, se coloca el criovial en un baño térmico a 37°C, retirándolo cuando aún queda una porción congelada. Gota a gota se van diluyendo las células en RPMI 1640, luego se centrifuga a 200 g por 5 minutos y el pellet se resuspende en “Medio de pasaje de CM-iPSC”. Este medio se prepara con 90% RPMI 1640 con glucosa + 10% KSR + B27 con insulina 1x + 10 μ M

Y-27632. Las células son plaqueadas en superficies previamente tratadas con Geltrex 1x por 1 hs a 37°C.

5.10 Protocolo de pasaje de CM-iPSC

Los CM-iPSC se levantan de la placa de cultivo como se indicó en el ítem previo. Se realiza el tratamiento de los wells a utilizar con Geltrex 1x por una hora a 37°C. Los CM-iPSC se resuspenden y siembran con el “Medio de pasaje de CM-iPSC”. A las 24 hs se realiza el cambio de medio por RPMI 1640 con glucosa más B27 con insulina. Las células pueden mantenerse en cultivo en este último medio o bien en DMEM con glucosa más 2% SFB.

Cuando se realizan pasajes posteriores al día 28 del protocolo de diferenciación es necesario pasar a 7 minutos de incubación con TrypLE 10x ya que estas células producen gran cantidad de matriz extracelular, lo que da lugar a agregados celulares. Esto mismo dificulta la disgregación celular para contabilizarlas o pasarlas por citometría de flujo. Si se quiere lograr la unicelularización, probablemente se pierda eficiencia en la cantidad final de cardiomiocitos ya que se deben pasar las células por un filtro de 70 µm.

5.11 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico se utilizan aproximadamente 2×10^5 células en suspensión. Se lavan con PBS y se las resuspende en 100 µl de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.001% gelatina, 0.5% NP-40, 0.5% Tween-20). La muestra puede conservarse durante una semana en este buffer. Al momento de procesar la muestra, se agrega 1 µl de proteinasa K (10 g/ml, Thermo Fisher), se incuba a 65°C durante 1 hora, en agitación. Luego, se precipita con 600 µl de isopropanol 100% durante 30 min a -20°C. Se centrifuga a 12.000 g durante 15 min a 4°C, se descarta el sobrenadante y el pellet de ADN se lava con etanol 70%, se lo deja secar y se resuspende en 30 µl de agua milliQ, incubando a 65°C durante 1 h.

5.12 Evaluación de contaminación por *Mycoplasma*

Regularmente se realiza la evaluación de presencia de bacterias del género *Mycoplasma* sobre los cultivos celulares. Para ello, se toman células en suspensión, se extrae el ADN genómico y se realiza una PCR a tiempo final, y luego se corren las muestras amplificadas en un gel de agarosa 2%. Para la reacción de PCR a punto final se utilizan primers que amplifican una zona del genoma conservada en varias especies del género *Mycoplasma* que amplifican una secuencia de

500 pb. Los *primers* empleados son 5'-ACACCATGGGAGYTGGTAAT-3' (sentido) y 5'-CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT-3' (anti-sentido). Como control positivo se utiliza una muestra de ADN genómico conteniendo *Mycoplasma*. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl. Se colocaron los siguientes componentes por tubo de PCR: 2,5 µl de Buffer 10x de PCR (Tris-HC 200 mM[pH 8.4], KCl 500mM), 1 µl de MgCl₂ 50mM, 0,5 µl de una mezcla de los 4 deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Invitrogen), 2,5 µl de primer sentido 5µM, 2,5 µl de primer antisentido 5µM, 0,2 µl de la ADN polimerasa TaqPol 200U (Thermo Fisher Scientific) y 200 ng de ADN, y completando el volumen a 25 µl con agua libre de DNAsas. Para la reacción se utiliza el siguiente programa: 5 min a 94°C, 35 ciclos de 30 seg a 94°C + 30 seg a 55°C + 40 seg a 72°C, y finalmente 5 min a 72°C.

5.13 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN total, las células son resuspendidas en Trizol (Thermo) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Las células son lavadas con PBS y se colocan en el volumen óptimo de Trizol según indicación del fabricante, en función del número de células recolectadas. Si se tratase de cardiomiocitos es necesario mezclar varias veces con la pipeta con el objetivo de disgregar la matriz extracelular. Las muestras pueden ser procesadas inmediatamente o se las puede guardar a -80°C. Para procesar las muestras se agrega al Trizol, cloroformo y se agita por inversión durante 15 segundos, se incuba de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 12000 g por 15 minutos a 4°C. Aquí se forman 3 fases, quedando el ARN disuelto en la fase acuosa incolora. En este paso se agrega *GlycoBlue* (Invitrogen) como coprecipitante que facilita la visualización y por consiguiente la purificación del ARN. Se adiciona isopropanol para precipitar el ARN en la fase acuosa, incubando la muestra por minutos a temperatura ambiente y se centrifuga nuevamente a 12000 g por 10 minutos a 4°C. De aquí nos quedamos con el pellet, el cual se lava con alcohol 70%, se mezcla con vortex y luego se centrifuga a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Finalmente el pellet resultante se resuspende en agua libre de ARNasa y se incuba por 10 minutos a 60°C. El ARN puede conservarse a -80°C.

5.14 Retrotranscripción

Para pasar el ARN obtenido en el paso previo, a ADNc, se utiliza una enzima retrotranscriptasa. Antes de hacer la reacción de retrotranscripción en sí, es necesario hacerle a la muestra de ARN un tratamiento con una enzima DNase I RNase free (Invitrogen) que degrade el ADN que pueda haber quedado como contaminante y para que no interfiera en los análisis posteriores. Como

primer paso se trasvasa a otro tubo el volumen de ARN que contenga 1 µg, se agrega buffer 10x con MgCl₂ y se lleva a 8 µl con agua libre de nucleasas. Luego se coloca 1 µl del buffer de la enzima, 1 µl de enzima (1U/µl) y se incuba durante 30 minutos a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se agrega a la mezcla 1 ul de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, 50 mM) que previene la degradación del ARN cuando se incuba la muestra a 65°C durante 10 minutos. Esta última incubación es para inactivar la enzima DNAsa y evitar que degrade la muestra cuando se haga la retrotranscripción y para desarmar posibles estructuras secundarias que se hayan formado en el ARN y desnaturalizarlo. Luego, se preparan 200 ng de random primers (Invitrogen), 1 µl de dNTPs (10 µM, Invitrogen), 1 µg de RNA y agua miliq filtrada hasta completar un volumen final de 15 µl. Esta mezcla se incuba por 5 minutos a 65°C y se realiza un shock de temperatura incubando 1 minuto en hielo para romper las estructuras secundarias y terciarias del ARN. Luego se agregan 4 µl de buffer 5x (con DTT que viene junto con la enzima) y 1µl de la enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega). Si bien los *primers* son diseñados con un intrón de por medio, se puede agregar a modo de control una reacción sin enzima para evaluar si los resultados de la reacción de amplificación puede estar contaminada con ADN genómico. Para la reacción de retrotranscripción se utiliza el ciclo de 5 min a 25°C, 60 min a 37°C y 15 min a 70°C, en la termocicladora (*Applied Biosystems, Veriti 96 well Thermal Cycler*). El ADNc se almacena a -20°C.

5.15 Protocolo para RT-qPCR

Los pares de oligonucleótidos específicos (*primers*) utilizados en este trabajo para analizar la expresión de los genes estudiados se diseñan en el portal BLAST de NCBI con la aplicación *primer-BLAST*. Para evitar la amplificación espuria de posible ADN genómico contaminante en las muestras, cada miembro del par sentido y antisentido híbrida en un exón diferente del gen en estudio. Los *primers* fueron sintetizados en el servicio de la empresa Genbiotech o Macrogen. Las secuencias de los oligonucleótidos que se utilizó se indican en la Tabla 2. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 12 µl. Se colocaron los siguientes reactivos por tubo de PCR: 6 µl de SYBR-Green master mix (Roche); 0,72 µl de primer sentido (5 µM); 0,72 µl de primer antisentido (5 µM); 2,56 µl de agua miliQ filtrada y 2 µl de ADNc. Se utilizó el termociclador *Step One Plus (Applied Biosystems)*. Cada muestra a analizar fue determinada por duplicado. En todos los casos el programa utilizado fue el siguiente:

Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa:

1. 2 min a 50°C.

2. 10 minutos a 95°C.

Ciclos de apareamiento y extensión (x40):

3. 15 segundos a 95°C.

4. 1 minuto a 60°C.

Melting Curve:

5. 15 segundos a 95°C.

6. 1 minuto a 60°C

7. 15 segundos a 95°C (Con una rampa de 0,3°C entre el paso 6 y 7)

La lectura de la fluorescencia fue realizada al finalizar el paso 4 de cada ciclo. Para cada uno de los ADNc analizados se realizaron curvas de temperatura de apareamiento para verificar la presencia de un único producto de amplificación. Esto fue confirmado al sembrar los productos de la reacción en geles de agarosa (2%) teñidos con bromuro de etidio, evidenciando una única banda. El análisis de los resultados se realizó utilizando el programa de uso libre LinReg (Ruijter y col., 2009), a partir del cual se obtuvieron las eficiencias de la reacción de PCR para cada par de primers y luego se calcularon los niveles teóricos iniciales de ADNc (N0) para cada condición. Se evaluaron dos genes housekeeping, RPL7 y HPRT1, los cuales fueron utilizados para normalizar los niveles de expresión de los genes estudiados. Todos los experimentos fueron realizados con al menos tres réplicas biológicas.

Nombre del gen	Primer Sentido	Primer Antisentido
RPL7	AATGGCGAGGATGGCAAG	TGACGAAGGCGAAGAAGC
HPRT1	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
CTNT	ATGATGCATTTTGGGGGTTA	CAGCACCTTCCTCCTCTCAG
GATA4	ACACCCCAATCTCGTAGATATGTT	ACAGATAGTGACCCGTCCCA
TBX20	AACCCCAATCGAGGGTCAG	CCGATGGTGTCTCAGAGGCATT
MEIS1	TAGCTCACGTTGCTGGAGAC	GTCGTACCTTTGCGCCATC
P27	GGCTAACTCTGAGGACAC	TTCTTCTGTTCTGTTGGCC
P21	AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG	TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG
P15	CGTGGGAAAGAAGGGAAG	CCCCAGACGCGCAGC
CICLINA D2	TTGTTCCCGAGCGATAGATG	ACCAGAAGCGAAGAGTAACC
CICLINA E1	GCAGGATCCAGATGAAGAAATG	TATTGTCCCAAGGCTGGCTC
CDK10	GAAGAAGGTGCGGATGGACAAG	TCCTTCAGCTCCACGATGTTCCG
CICLINA D1	GATCAAGTGTGACCCGGACT	TCCTCCTCCTCTCCTCCTC

Tabla 2: Secuencias de los primers utilizados en la PCR cuantitativa en sentido 5'-3'

5.16 Ensayo de proliferación con el kit *Click-iT EdU* por citometría de flujo

El análisis del estado replicativo fue realizado mediante citometría de flujo utilizando el sistema *Click-iT® EdU Flow Cytometry Kit* (Thermo Fisher Scientific). Para ello, se realizaron pulsos con el análogo de nucleótido 5-Etínil-2'-deoxiuridina (EdU) a una concentración de 10 μ M durante 30 minutos en condiciones normales de cultivo. En el caso de los ensayos realizados con CM-iPSC la incubación con EdU se realizó ON, debido a la baja capacidad proliferativa de estas células.

Las células se disociaron con TrypLE, para lograr suspensiones unicelulares, luego se las fijó con *Click-iT fixative* por 15 minutos a temperatura ambiente protegiendo la luz. Se realizaron tres lavados con 1% BSA en PBS, luego se permeabilizó con 100 μ l de *Click-iT saponin based permeabilization* incubando por 15 minutos. Para la reacción de fluorescencia se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos con la mezcla de reacción puesta a punto en el laboratorio (86,75 μ l PBS, 4 μ l CuSO_4 , 1,25 μ l Alexa 647 o Alexa 488, 20 μ l Buffer). Luego se realizó un lavado con la solución *Click-iT saponin* y dos lavados más con 1% glucosa en PBS. Las

células se resuspendieron en una solución de 20 mg/ml de RNAsa A, se incubó por 30 minutos en oscuridad a 37°C y por último se agregó el yoduro de propidio.

Cuando se realizó la marcación con anticuerpos conjunto al ensayo de proliferación, se agregó luego de la mezcla con el fluoróforo, el anticuerpo primario incubándolo por una hora y media a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados con PBS/BSA y se incubó con el anticuerpo secundario por una hora.

5.17 Citometría de flujo

Para disgregar los cuerpos embrioides del protocolo de diferenciación cardíaca se incubaron ON con colagenasa tipo IV 1 mg/ml , se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y luego se incubaron por 10 minutos con TrypLE 1x. Posteriormente las células se resuspenden en medio suplementado con 50% de suero fetal bovino y DNAsa 300U/μl y se disgregaron mecánicamente utilizando un filtro de 100nm. Por otro lado, para la disgregación de las células madre en el estado de pluripotencia fue suficiente incubando durante 5 minutos con TrypLE 1x, mientras que para la disgregación de los CM-iPSC cultivados en monocapa se utilizó TrypLE 10x.

Para la detección de Cardiotroponina (CTNT), las células fueron fijadas en 300 μl de PFA 4 % e incubadas durante 20 minutos. Luego de 2 lavados con PBS/BSA se permeabilizó utilizando la solución 0,1% PBS-Tritón X-100. Se agregó anticuerpo primario anti-CTNT (Abcam, catálogo: ab8295) dilución 1/200 y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Para el control de isotipo se utilizó IgG normal de ratón como anticuerpo primario. Las células luego fueron lavadas e incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios: Alexa fluor 488 anti-ratón IgG (H+L) (Life Technologies). Las muestras fueron incubadas a TA durante una hora en oscuridad. Luego se realizaron dos lavados agregando 1ml de PBS en cada tubo, centrifugando a 300 x g, aspirando completamente el sobrenadante y resuspendiendo las células en 500 μl de PBS.

Las mediciones se realizaron en el citómetro BD Accuri c6 y los resultados fueron analizados con el software FlowJo X o *Bd Accuri software*.

Cuando se realizó marcación conjunta con IP, Alexa 488 y Alexa 647 se debió compensar los valores de fluorescencia teniendo en cuenta las superposiciones de los espectros de emisión de los fluoróforos utilizados y los filtros del equipo, para ello se siguieron los pasos indicados en el manual del equipo, pasando en forma independiente cada fluoróforo.

5.18 Inmunofluorescencia

Las tinciones de inmunofluorescencia se realizaron utilizando anticuerpos primarios específicos y anticuerpos secundarios conjugados con un fluoróforo. Preferentemente las células fueron plaqueadas sobre cubreobjetos de vidrio previamente lavados con jabón neutro, enjuagados con abundante agua miliQ y esterilizados directamente en fuego. Sin embargo para protocolos de diferenciación, las tinciones se realizaron sobre placas de cultivo ya que allí es donde se mantienen adheridas las células. En ambos casos las superficies fueron tratadas con Geltrex 1x durante 1 hora a 37°C. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente, permeabilizadas con 0,1% PBS-Tritón X-100 y bloqueadas con 3% suero normal de vaca en PBS. Se incubaron con anticuerpos primarios a 4°C ON en cámara húmeda y luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 0,1% PBS-BSA. Los anticuerpos secundarios son incubados durante 1 hora y media a TA, en los últimos 10 minutos se agrega DAPI (200 ng/ml). Las muestras se lavan tres veces durante 5 minutos con 0,1% PBS-BSA. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo se detallan en la tabla 3. Las fotografías de microscopía se toman se utilizando una cámara digital Nikon DXN1200F acoplada al microscopio invertido de fluorescencia con lámpara de mercurio (Nikon Eclipse TE2000-S) y controlada por el software *EclipseNet versión 1.20.0 Build 61* o con el microscopio de fluorescencia Evos FL (*Life Technologies*). Las imágenes son procesadas utilizando el software FIJI-ImageJ.

Anticuerpo primario	Especie-tipo	Marca	Catálogo
α -CTNT	Ratón-monoclonal	Abcam	ab8295
α -HA	Conejo-policlonal	Abcam	ab9110
Anticuerpo secundario	Especie-fluoróforo	Marca	Catálogo
α -IgG de ratón	Cabra-Alexa 488	Invitrogen	A-21429
α -IgG de conejo	Burro-Alexa 488	Invitrogen	A-31572
α -IgG de ratón	Cabra-Alexa 594	Invitrogen	A-11032

Tabla 3: Anticuerpos primarios y secundarios que se utilizaron para ensayos de citometría y microscopía en esta tesis.

5.19 Ensayo de proliferación con el kit *Click-iT EdU* por inmunofluorescencia

Para este ensayo se utilizó *Click-iT® EdU Imaging Kit* (Thermo Fisher Scientific). Al igual que en la detección por citometría, se realizaron pulsos con 10 μ M EdU durante 30 minutos en condiciones normales de cultivo, u ON para CM-iPSC.

Las células se fijaron con *Click-iT fixative* por 30 minutos a temperatura ambiente protegiendo la luz. Se realizaron tres lavados con 1% BSA en PBS, luego se permeabilizó con 100 μ l de *Click-iT saponin based permeabilization* incubando por 45 minutos. Para la reacción de fluorescencia se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos con la mezcla de reacción puesta a punto en el laboratorio (129 μ l PBS, 6 μ l CuSO_4 , 0,36 μ l Alexa 647 o Alexa 488, 15 μ l Buffer). Luego se realizaron dos lavados con la solución *Click-iT saponin*. Se incubó durante una hora con los anticuerpos primarios a TA en una dilución 1:200. Luego se lavó tres veces con la solución de BSA/PBS, se incubó con el anticuerpo secundario en una dilución 1:400, durante una hora y media a TA, en los últimos 10 minutos se agregó DAPI (200 ng/ml). Finalmente, se lavó tres veces con BSA/PBS, se dejó en PBS y se observó al microscopio óptico de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-S o Evos FL).

5.20 Generación líneas FUCCI-iPSC

Para producir las líneas estables de iPSC humanas, se utilizó la línea generada previamente en este laboratorio, FN2.1 (Questa y col. 2016). Los plásmidos utilizados fueron construidos previamente en la Universidad Rockefeller por el Dr. Mohammed Zeeshan Ozair y descritos en Waisman y col. (2017). Para la línea FUCCI se utilizaron los plásmidos, ePB-CAG::Venus-Gem(1-110)-PURO, ePB-CAG::mCherry-CDT1(30-120)-BSD y ePBac-Transposase. Estos plásmidos fueron transfectados con *X-tremegene reagent* (Roche) utilizando una relación 3:1 con respecto a los plásmidos. El día anterior a la transfección se sembraron 100000 células por well de mw12, sobre geltrex 1x, con E8flex y 10 μ M Y-27632. El día de la transfección se preparó 1 μ g de plásmidos más el X-tremegene reagent, se mezcló utilizando vortex. Esta mezcla se agregó a 100 μ l de Opti-MEM (Gibco), se mezcló con pipeta de 200 μ l y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente para dar lugar a la formación de las micelas. Luego se agregó gota a gota a la placa con las iPSC en 400 μ l de E8flex fresco. Se incubó por 48 hs y luego se realizó la selección con antibióticos (puromicina, blasticidina y/o neomicina, según corresponda). Se realizó un pulso de selección y se observó de todo el cultivo en las condiciones control (con

antibiótico sin ninguno de los plásmidos, y con antibióticos pero sin plásmido de transposasa). Se realizó una dilución en placa mw6, se seleccionó nuevamente con antibiótico y se procedió a picar colonias con aguja y pipeta, utilizando microscopio invertido dentro de la cabina de bioseguridad. Se obtuvieron 9 líneas clonales. Se tomaron dos de estos clones para caracterizar, en base a la fluorescencia y la capacidad de diferenciarse a cardiomiocitos; se seleccionó una de estas líneas para seguir con los experimentos, la que resultó más eficiente a la hora de realizar el protocolo de diferenciación.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para la construcción de la línea H2BCerulean-iPSC utilizando el plásmido ePB-CAG::Cerulean-H2B-Neo.

5.21 Análisis de imágenes

Para el análisis del ciclo celular por medio del sistema FUCCI se utilizó el programa Fiji-ImageJ. Se creó un macros que permitió agilizar el procesamiento de las imágenes (Figura 5.1). Este macros permitía importar las imágenes desde una carpeta, restar el background de cada imagen. Luego, se superpusieron las imágenes para contabilizar la totalidad de los núcleos, se creó una máscara binaria en base a umbrales de intensidad de ambas fluorescencias. Luego se aplicó el filtro *Watershed*, el cual permite separar dos objetos que se encuentran muy cerca en el espacio y que inicialmente fueron interpretados como uno solo y el filtro *Fill Holes* que completa píxeles en los espacios interpretados como uno solo. Luego se seleccionó en función del tipo celular la mínima y máxima área esperada para un núcleo. Se asignó una identidad a cada uno de los núcleos de la máscara binaria que están comprendidos en los parámetros anteriores. Luego se tomaron las imágenes de fluorescencia y para cada canal se cuantificó para todos los núcleos identificados, el área, el mínimo y máximo valor de fluorescencia y la media de fluorescencia. Estos datos se guardaron en una tabla .csv, que luego se analizó utilizando R versión 3.6.3 (R Core Team, 2020). El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete del conjunto *Tidyverse*, *dplyr* (Wickham, 2022) y los gráficos se generaron con el paquete *ggplot2* versión 3.3.2 (Wickham, 2016).

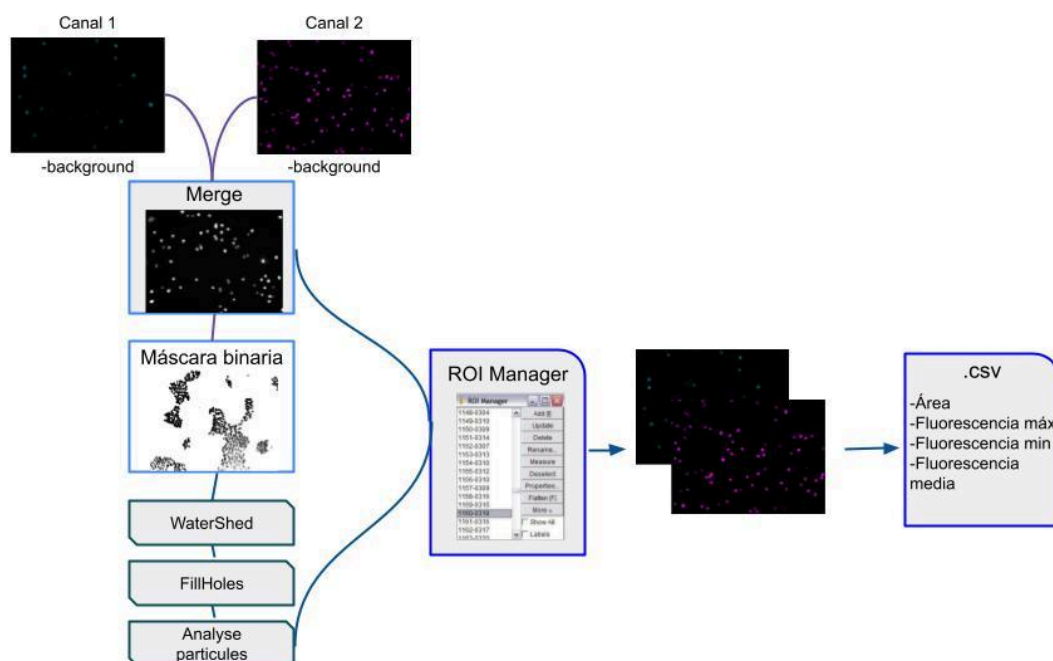


Figura 5.1. Análisis de imágenes. Esquema de pasos incluidos en el “macros” de ImageJ para el análisis de las imágenes de fluorescencia y sus cuantificaciones.

5.22 Análisis estadísticos

Los resultados experimentales se presentaron como la media \pm error estándar de la media (SEM) para al menos tres réplicas biológicas. Según el diseño experimental, la significancia estadística entre grupos fue determinada mediante el uso de t-test o ANOVA. Se analizó la normalidad en las distribuciones de las variables mediante el test de *Shapiro Wilks* modificado y se analizó además la homocedasticidad en el caso de ser necesario. La comparación entre las medias entre los grupos se realizó utilizando el test de Tukey. Consideramos las diferencias entre grupos como estadísticamente significativas cuando el P valor fue \leq a 0,05. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Graphpad Prism (v6.01) para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com o bien en R (realizando control sobre los residuos, ya sea con ANOVA de uno o dos factores dependiendo del ensayo).

5.23 Transfección con pequeñas moléculas comerciales de ARN

Para evaluar el efecto de los microARNs, las células CM-iPSC fueron transfectadas con pequeñas moléculas de ARN sintetizadas comercialmente, conocidas como mimics (Ambion-Life Technologies), mirVana miRNA mimic hsa-miR-520a (Código: MC10391) y Cy3-labeled Pre-miR Negative control (Código: AM17120).

Para esto, los CM-iPSC fueron resembrados según el protocolo descrito previamente y a las 24 hs se transfectaron con una mezcla de ARN con lipofectamina (*Lipofectamine RNAiMAX Reagent*, Thermo Fisher) según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se preparó una dilución de 10 nM del ARN mimic en Opti-MEM (ThermoFisher) y se agregó gota a gota a una solución de 2 μ l de lipofectamina en 100 μ l de Opti-MEM. Se incubó entre 15-20 min a temperatura ambiente. Luego, ésta mezcla fue agregada gota a gota al well con las células con un volumen final de 600 μ l de medio por pocillo de placa multiwell de 12. Como control de la transfección se transfectaron en paralelo células con una molécula de pre-microARN acoplada al fluorocromo Cy3 (Cy3TM Dye-Labeled Pre-miR Negative Control, Thermo Fisher) que es de fácil detección mediante microscopio de fluorescencia y permite estimar la eficiencia de transfección.

5.24 Análisis Ago-IP

Previamente en nuestro laboratorio la Dra. Ximena Garate, realizó un ensayo de coimmunoprecipitación de mRNAs con la proteína Argonauta (Ago-IP) en CM-iPSC tratados con el ARN mimic miR520a o con un mimic control (Figura 3.24). Este ensayo fue realizado mediante el kit miRNA Target IP kit de la empresa Active Motif y la secuenciación de ARN mensajeros, se realizó en una plataforma de secuenciación de Illumina, gracias a la colaboración con el Dr. Mercola, en el servicio de secuenciación de Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, Florida, USA. En esta tesis se procedió a realizar un análisis de los datos de RNA-seq obtenidos con el fin de evaluar la implicancia en la proliferación celular de los CM-iPSC. Se tomó la tabla de *counts* y se estudiaron, utilizando el paquete DEseq2 de Bioconductor (Love y col., 2014), los mensajeros que se unieron diferencialmente a Argonauta al sobreexpresar el miR-520a versus el mimic control negativo. Mediante el software on-line, Panther (Mi H. y col., 2013) se analizaron los genes según los procesos biológicos. También se procedió a analizar la lista de genes enriquecidos mediante el programa on-line *WebGestalt* (WEB-based Gene Set Analysis Toolkit; Wang J y col., 2017). Se realizó un análisis de *Overrepresentation Enrichment Analysis* (ORA). Por otro lado, se procedió al análisis a partir de la base de datos de KEGG-pathway, utilizando el paquete *Cluster Profiler* (Yu y col., 2012).

A su vez, se realizó un análisis complementario in silico por medio del software MiRWalk2.0 (Dweep H et al, 2015) con el fin de evaluar los genes blanco predichos para el miR-520a. Esta herramienta combina 12 programas predictores de genes blancos de miRNAs (DIANA-microTy4.0, DIANA-microT-CDS, miRanda-rel2010, mirBridge, miRDB4.0, miRmap, doRiNA, PicTar2, PITA, RNA22v2, RNAhybrid2.1 y TargetsScan6.2).

5.25 Incubación con factores e inhibidores

Para la estimulación de los CM-iPSC con el inhibidor de p38 y con FGF1, se realizó el tratamiento de las células a la semana de ser replaqueadas. Para este ensayo se utilizaron Fucci-hiPSC-CMs y se analizó el porcentaje de núcleos mVenus positivos por medio de microscopía de fluorescencia y por citometría luego de 24, 48 y 72 hs de tratamiento. Se realizó el protocolo de diferenciación cardíaca en monocapa con Fucci-iPSC, se realizó la selección metabólica y al día 21 del protocolo las células fueron re sembradas, al día siguiente se les cambió el medio por RPMI con B27 con insulina hasta el día 28. De esta forma se pueden observar los CM-iPSC con mayor pureza, se facilita la identificación de los núcleos por microscopía y la proliferación celular es prácticamente nula según ensayos previos. Los iPSC-CM fueron tratados con SB203580 (Life Technologies), inhibidor de p38 en concentraciones 5 μ M y 10 μ M diluido en DMSO, siguiendo con concentraciones utilizadas en otros trabajos científicos (Engel y col., 2005). A su vez se utilizó FGF1 (Life Technologies), también conocido como FGF ácido (FGFa), en concentraciones 50 ng/ml y 100 ng/ml, diluido en PBS.

5.26 Preparación de muestras para proteómica

Las muestras de medio condicionado por WJ-MSC se tomaron como se indicó previamente. La concentración proteica se calculó utilizando el fluorómetro Qubit (Thermo) y el kit de cuantificación proteica (Gibco) según las indicaciones del comerciante. Se enviaron de cada muestra aproximadamente 70 μ g de proteína en solución de cada una de las muestras, sin contar la proteínas presentes en el medio RPMI control. El análisis proteómico mediante LS-MS/MS fue realizado por el servicio brindado por CEQUIBIEM del departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires, IQUBICEN-CONICET.

5.27 Análisis de proteómica

A partir de los datos obtenidos de LC-MS/MS se realizó un análisis semi-cuantitativo de abundancia proteica libre de marcación usando los PSM calculados por Proteome Discoverer. Los análisis bioinformáticos se hicieron en R usando diversos paquetes. Se realizó un análisis de expresión diferencial usando el paquete DESeq de Bioconductor. Se realizó un análisis de *Overrepresentation Enrichment Analysis* (ORA). Por otro lado, se procedió al análisis a partir de la base de datos de KEGG-pathway, utilizando el paquete *Cluster Profiler* (Yu y col., 2012).

Además se hizo un *Gene Ontology Enrichment Analysis* usando los paquetes DOSE, evaluando las categorías de proteínas enriquecidas en Componentes Celulares (*Cellular Components*), Procesos Biológicos (*Biological Processes*) y Funciones Moleculares (*Molecular Functions*).

5.28 Preparación de muestras para secuenciar

Se realizaron tres ensayos independientes de diferenciación en monocapa a partir de iPSC-FUCCI, incluyendo la selección metabólica con el medio con lactato. En el día 21 del protocolo de diferenciación, la mitad de los pocillos se utilizaron para ser sembrados y el resto como control. A las 24hs, primero se toman imágenes de microscopía para cuantificar la fluorescencia FUCCI y luego se toma una muestra para citometría y otra para extraer ARN. Se cuantificó el porcentaje de células CTNT positivas para las muestras enviadas. El ARN se extrajo utilizando el protocolo de Trizol como se planteó previamente. El ARN obtenido fue cuantificado usando NanoDrop y Qubit. El ARN extraído se conservó en agua DEPC, libre de RNAsa a -80° C, hasta su secuenciación.

5.29 Secuenciación

El ARN total fue sometido a secuenciación masiva usando la tecnología “*Illumina NovaSeq6000*” en el servicio de MacroGen. Las librerías se prepararon sobre ARN poliadenilado (capturado con esferas de poliT) con TruSeq RNA Sample Preparation kit de acuerdo a las indicaciones del proveedor con depleción de ARN ribosomal utilizando “*Ribo-Zero Gold*” y la secuenciación fue llevada cabo con extremos pareados con fragmentos de 100 pares de bases.

El análisis de la calidad de los datos crudos de secuenciación se realizó mediante el programa de uso libre FastQC antes y después de eliminar los adaptadores (utilizando el programa Cutadapt). Por medio del programa Bowtie2 se eliminan posibles contaminantes, como por ejemplo ARN ribosomal. Luego las secuencias (Reads) obtenidas, sin los adaptadores, son evaluadas en el largo, teniendo que ser homogéneas, son alineadas con el genoma de referencia (GRCh38) utilizando el programa STAR y se cuantificó la abundancia mediante el programa HTSeq. Finalmente, se determinó la expresión diferencial entre los dos tratamientos mediante el paquete de R DESeq2.

BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

- Abu-Issa R, Kirby ML. Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:45-68. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123331. PMID: 17456019.
- Acquistapace A, Bru T, Lesault PF, Figeac F, Coudert AE, le Coz O, Christov C, Baudin X, Auber F, Yiou R, Dubois-Randé JL, Rodriguez AM. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. *Stem Cells.* 2011 May;29(5):812-24. doi: 10.1002/stem.632. PMID: 21433223; PMCID: PMC3346716.
- Akoumianakis I, Polkinghorne M, Antoniadis C. Non-canonical WNT signalling in cardiovascular disease: mechanisms and therapeutic implications. *Nat Rev Cardiol.* 2022 Dec;19(12):783-797. doi: 10.1038/s41569-022-00718-5. Epub 2022 Jun 13. PMID: 35697779; PMCID: PMC9191761.
- Alkass K, Panula J, Westman M, Wu TD, Guerquin-Kern JL, Bergmann O. No Evidence for Cardiomyocyte Number Expansion in Preadolescent Mice. *Cell.* 2015 Nov 5;163(4):1026-36. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.035. PMID: 26544945.
- Alper J. Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. *Nat Biotechnol.* 2009 Mar;27(3):213-4. doi: 10.1038/nbt0309-213a. PMID: 19270655.
- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol.* 2000 Nov 15;227(2):271-8. doi: 10.1006/dbio.2000.9912. PMID: 11071754.
- An M, Kwon K, Park J, Ryu DR, Shin JA, Lee Kang J, Choi JH, Park EM, Lee KE, Woo M, Kim M. Extracellular matrix-derived extracellular vesicles promote cardiomyocyte growth and electrical activity in engineered cardiac atria. *Biomaterials.* 2017 Nov;146:49-59. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.09.001. Epub 2017 Sep 4. PMID: 28898757.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early

- mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003 Jan 1;17(1):126-40. doi: 10.1101/gad.224503. PMID: 12514105; PMCID: PMC195970.
- Baines CP, Molkentin JD. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Jan;38(1):47-62. doi: 10.1016/j.yjmcc.2004.11.004. Epub 2004 Dec 9. PMID: 15623421.
- Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009 Apr 3;324(5923):98-102. doi: 10.1126/science.1164680. PMID: 19342590; PMCID: PMC2991140.
- Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res.* 2002 Aug 9;91(3):189-201. doi: 10.1161/01.res.0000027865.61704.32. PMID: 12169644.
- Bongso, Ariff, Chui-Yee Fong, Soon-Chye Ng, and Shan Ratnam. 1994. "Fertilization and Early Embryology: Isolation and Culture of Inner Cell Mass Cells from Human Blastocysts." *Human Reproduction* 9 (11): 2110–17.
- Brodsky WY, Arefyeva AM, Uryvaeva IV. Mitotic polyploidization of mouse heart myocytes during the first postnatal week. *Cell Tissue Res.* 1980;210(1):133-44. doi: 10.1007/BF00232149. PMID: 7407859.
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* 1997 Feb;64(2):278-94. doi: 10.1002/(sici)1097-4644(199702)64:2<278::aid-jcb11>3.0.co;2-f. PMID: 9027588.
- Brüel A, Christoffersen TE, Nyengaard JR. Growth hormone increases the proliferation of existing cardiac myocytes and the total number of cardiac myocytes in the rat heart. *Cardiovasc Res.* 2007 Dec 1;76(3):400-8. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.06.026. Epub 2007 Jul 4. PMID: 17673190.
- Buehler A, Martire A, Strohm C, Wolfram S, Fernandez B, Palmen M, Wehrens XH, Doevendans PA, Franz WM, Schaper W, Zimmermann R. Angiogenesis-independent cardioprotection in FGF-1 transgenic mice. *Cardiovasc Res.* 2002 Sep;55(4):768-77. doi: 10.1016/s0008-6363(02)00494-7. PMID: 12176126.

- Burd LI, Jones MD, Simmons MA, Makowski EL, Meshcia G, Battaglia FC. Placental production and fetal utilization of lactate and pyruvate. *Nature (Lond.)*. 1975. 254: 710.
- Burridge PW, Anderson D, Priddle H, Barbadillo Muñoz MD, Chamberlain S, Allegrucci C, Young LE, Denning C. Improved human embryonic stem cell embryoid body homogeneity and cardiomyocyte differentiation from a novel V-96 plate aggregation system highlights interline variability. *Stem Cells*. 2007 Apr;25(4):929-38. doi: 10.1634/stemcells.2006-0598. Epub 2006 Dec 21. PMID: 17185609.
- Burridge, Paul W., Elena Matsa, Praveen Shukla, Ziliang C. Lin, Jared M. Churko, Antje D. Ebert, Feng Lan, et al. 2014. "Chemically Defined Generation of Human Cardiomyocytes." *Nature Methods* 11 (8): 855–60.
- Cable, Jennifer, Elaine Fuchs, Irving Weissman, Heinrich Jasper, David Glass, Thomas A. Rando, Helen Blau, et al. 2020. "Adult Stem Cells and Regenerative Medicine-a Symposium Report." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1462 (1): 27–36.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006 Aug 1;98(5):1076-84. doi: 10.1002/jcb.20886. PMID: 16619257.
- Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*. 2005 Mar;132(5):885-96. doi: 10.1242/dev.01670. Epub 2005 Jan 26. PMID: 15673569.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003 May 30;113(5):643-55. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00392-1. PMID: 12787505.
- Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*. 2009 Mar;27(3):275-80. doi: 10.1038/nbt.1529. Epub 2009 Mar 1. Erratum in: *Nat Biotechnol*. 2009 May;27(5):485. PMID: 19252484; PMCID: PMC2756723.
- Chen, G., Gulbranson, D. R., Hou, Z., Bolin, J. M., Probasco, M. D., Smuga-otto, K., Howden, S. E., Nicole, R., Propson, N. E., Wagner, R., Lee, G. O., Teng, J. M. C., and Thomson, J. a. Chemically defined conditions for human iPS cell derivation and culture. *Nature Methods*, 8(5):424–429, 2011.
- Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan

- 4;44(D1):D67-72. doi: 10.1093/nar/gkv1276. Epub 2015 Nov 20. PMID: 26590407; PMCID: PMC4702903.
- Cordes KR, Srivastava D, Ivey KN. MicroRNAs in cardiac development. *Pediatr Cardiol.* 2010 Apr;31(3):349-56. doi: 10.1007/s00246-010-9639-3. Epub 2010 Feb 7. PMID: 20140609; PMCID: PMC2836460.
- Costello I, Pimeisl IM, Dräger S, Bikoff EK, Robertson EJ, Arnold SJ. The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of *Mesp1* to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation. *Nat Cell Biol.* 2011 Aug 7;13(9):1084-91. doi: 10.1038/ncb2304. PMID: 21822279; PMCID: PMC4531310.
- Cselenyák A, Pankotai E, Horváth EM, Kiss L, Lacza Z. Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol.* 2010 Apr 20;11:29. doi: 10.1186/1471-2121-11-29. PMID: 20406471; PMCID: PMC2869333.
- David R, Jarsch VB, Schwarz F, Nathan P, Gegg M, Lickert H, Franz WM. Induction of MesP1 by Brachyury(T) generates the common multipotent cardiovascular stem cell. *Cardiovasc Res.* 2011 Oct 1;92(1):115-22. doi: 10.1093/cvr/cvr158. Epub 2011 Jun 1. PMID: 21632880.
- Desponts C, Ding S. Using small molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells. *Methods Mol Biol.* 2010;636:207–218. doi: 10.1007/978-1-60761-691-7_13.
- Diez-Cuñado M, Wei K, Bushway PJ, Maurya MR, Perera R, Subramaniam S, Ruiz-Lozano P, Mercola M. miRNAs that Induce Human Cardiomyocyte Proliferation Converge on the Hippo Pathway. *Cell Rep.* 2018 May 15;23(7):2168-2174. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.049. PMID: 29768213; PMCID: PMC6261450.
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science.* 2008 Aug 29;321(5893):1218-21. doi: 10.1126/science.1158799. Epub 2008 Jul 31. PMID: 18669821.
- Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20(1):5-14. doi: 10.3727/096368910X. PMID: 21396235.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7. doi:

10.1080/14653240600855905. PMID: 16923606.

Douvaras P, Wang J, Zimmer M, Hanchuk S, O'Bara MA, Sadiq S, Sim FJ, Goldman J, Fossati V. Efficient generation of myelinating oligodendrocytes from primary progressive multiple sclerosis patients by induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014 Aug 12;3(2):250-9. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.06.012. Epub 2014 Jul 24. PMID: 25254339; PMCID: PMC4176529.

Dubois NC, Craft AM, Sharma P, Elliott DA, Stanley EG, Elefanty AG, Gramolini A, Keller G. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011 Oct 23;29(11):1011-8. doi: 10.1038/nbt.2005. PMID: 22020386; PMCID: PMC4949030.

Dweep, Harsh, and Norbert Gretz. 2015. "miRWalk2.0: A Comprehensive Atlas of microRNA-Target Interactions." *Nature Methods* 12 (8): 697–697.

Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 2009 Jan 15;457(7227):277-80. doi: 10.1038/nature07677. Epub 2008 Dec 21. PMID: 19098894; PMCID: PMC2659408.

Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, Jiang H, Wang Y, Keating MT. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev*. 2005 May 15;19(10):1175-87. doi: 10.1101/gad.1306705. Epub 2005 May 3. PMID: 15870258; PMCID: PMC1132004.

Engel FB, Hsieh PC, Lee RT, Keating MT. FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 17;103(42):15546-51. doi: 10.1073/pnas.0607382103. Epub 2006 Oct 10. PMID: 17032753; PMCID: PMC1622860.

Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, Giacca M. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature*. 2012 Dec 20;492(7429):376-81. doi: 10.1038/nature11739. Epub 2012 Dec 5. PMID: 23222520.

Fededa JP, Gerlich DW. Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nat Cell Biol*. 2012 May 2;14(5):440-7. doi: 10.1038/ncb2482. PMID: 22552143.

Fijnvandraat AC, van Ginneken AC, Schumacher CA, Boheler KR, Lekanne Deprez RH, Christoffels VM, Moorman AF. Cardiomyocytes purified from differentiated embryonic stem cells exhibit characteristics of early chamber myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Dec;35(12):1461-72. doi:

10.1016/j.yjmcc.2003.09.011. PMID: 14654372.

Garate X, La Greca A, Neiman G, Blüguermann C, Santín Velazque NL, Moro LN, Luzzani C, Scassa ME, Sevlever GE, Romorini L, Miriuka SG. Identification of the miRNAome of early mesoderm progenitor cells and cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2018 May 23;8(1):8072. doi: 10.1038/s41598-018-26156-3. PMID: 29795287; PMCID: PMC5966391.

Garate, Ximena. (2018). "Estudio de los microARNs involucrados en la diferenciación cardíaca a partir de células pluripotentes humanas". Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Gassanov N, Er F, Zagidullin N, Hoppe UC. Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype. *FASEB J*. 2004 Nov;18(14):1710-2. doi: 10.1096/fj.04-1619fje. Epub 2004 Sep 2. PMID: 15345687.

Gessert S, Kühl M. The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circ Res*. 2010 Jul 23;107(2):186-99. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.221531. PMID: 20651295.

Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4):367-8. doi: 10.1038/nm0405-367. PMID: 15812508.

Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008 Nov 21;103(11):1204-19. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.176826. PMID: 19028920; PMCID: PMC2667788.

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1920-3. doi: 10.1126/science.1152092. Epub 2007 Dec 6. PMID: 18063756.

Hashmi S, Ahmad HR. Molecular switch model for cardiomyocyte proliferation. *Cell Regen*. 2019 Jan 7;8(1):12-20. doi: 10.1016/j.cr.2018.11.002. PMID: 31205684; PMCID: PMC6557755.

Hattori F, Fukuda K. Strategies for replacing myocytes with induced pluripotent stem in clinical protocols. *Transplant Rev (Orlando)*. 2012 Jul;26(3):223-32. doi: 10.1016/j.trre.2011.09.003. Epub 2011 Dec 14. PMID: 22172453.

- Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, Mazhari R, Boyle AJ, Zambrano JP, Rodriguez JE, Dulce R, Pattany PM, Valdes D, Revilla C, Heldman AW, McNiece I, Hare JM. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010 Oct 1;107(7):913-22. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.222703. Epub 2010 Jul 29. PMID: 20671238; PMCID: PMC3408082.
- Hidaka K, Lee JK, Kim HS, Ihm CH, Iio A, Ogawa M, Nishikawa S, Kodama I, Morisaki T. Chamber-specific differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells. *FASEB J*. 2003 Apr;17(6):740-2. doi: 10.1096/fj.02-0104fje. Epub 2003 Feb 19. PMID: 12594186.
- Huang SX, Islam MN, O'Neill J, Hu Z, Yang YG, Chen YW, Mumau M, Green MD, Vunjak-Novakovic G, Bhattacharya J, Snoeck HW. Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2014 Jan;32(1):84-91. doi: 10.1038/nbt.2754. Epub 2013 Dec 1. PMID: 24291815; PMCID: PMC4101921.
- Ivey KN, Muth A, Arnold J, King FW, Yeh RF, Fish JE, Hsiao EC, Schwartz RJ, Conklin BR, Bernstein HS, Srivastava D. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008 Mar 6;2(3):219-29. doi: 10.1016/j.stem.2008.01.016. PMID: 18371447; PMCID: PMC2293325.
- Jing Wang, Suhas Vasaikar, Zhiao Shi, Michael Greer, Bing Zhang, WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit, *Nucleic Acids Research*, Volume 45, Issue W1, 3 July 2017, Pages W130–W137, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx356>
- Joose SA, Müller V, Steinbach B, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *Br J Cancer*. 2014 Aug 26;111(5):909-17. doi: 10.1038/bjc.2014.360. Epub 2014 Jul 1. PMID: 24983365; PMCID: PMC4150270.
- Ju C, Shen Y, Ma G, Liu Y, Cai J, Kim IM, Weintraub NL, Liu N, Tang Y. Transplantation of Cardiac Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promotes Repair in Ischemic Myocardium. *J Cardiovasc Transl Res*. 2018 Oct;11(5):420-428. doi: 10.1007/s12265-018-9822-0. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30232729; PMCID: PMC6212335.
- Kang MJ, Kim JS, Chae SW, Koh KN, Koh GY. Cyclins and cyclin dependent kinases during cardiac development. *Mol Cells*. 1997 Jun 30;7(3):360-6. PMID: 9264023.

- Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, Ellis J, Keller G. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell* 8, 228-240 (2011).
- Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 2001 Aug;108(3):407-14. doi: 10.1172/JCI12131. PMID: 11489934; PMCID: PMC209357.
- Kielman MF, Rindapää M, Gaspar C, van Poppel N, Breukel C, van Leeuwen S, Taketo MM, Roberts S, Smits R, Fodde R. Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat Genet.* 2002 Dec;32(4):594-605. doi: 10.1038/ng1045. Epub 2002 Nov 11. Erratum in: *Nat Genet.* 2003 Jan;33(1):107. PMID: 12426568.
- Kikuchi K, Poss KD. Cardiac regenerative capacity and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28:719-41. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155739. PMID: 23057748; PMCID: PMC3586268.
- Kim HS, Cho JW, Hidaka K, Morisaki T. Activation of MEK-ERK by heregulin-beta1 promotes the development of cardiomyocytes derived from ES cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Sep 28;361(3):732-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.045. Epub 2007 Jul 23. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Jan 25;365(4):889. PMID: 17678625.
- Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell.* 2009;4(6):472-476. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.005.
- Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest.* 1996 Jul 1;98(1):216-24. doi: 10.1172/JCI118769. PMID: 8690796; PMCID: PMC507419.
- Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D155-D162. doi: 10.1093/nar/gky1141. PMID: 30423142; PMCID: PMC6323917.
- Kühn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang YS, Lebeche D, Arab S, Keating MT. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med.* 2007 Aug;13(8):962-9. doi: 10.1038/nm1619. Epub 2007 Jul 15. PMID: 17632525.

- La Greca A, Solari C, Furmento V, Lombardi A, Biani MC, Aban C, Moro L, García M, Guberman AS, Sevlever GE, Miriuka SG, Luzzani C. Extracellular vesicles from pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells acquire a stromal modulatory proteomic pattern during differentiation. *Exp Mol Med*. 2018 Sep 10;50(9):1-12. doi: 10.1038/s12276-018-0142-x. PMID: 30201949; PMCID: PMC6131549.
- Lacoste A, Berenshteyn F, Brivanlou AH. An efficient and reversible transposable system for gene delivery and lineage-specific differentiation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009;5(3):332–342. doi: 10.1016/j.stem.2009.07.011.
- Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill EA, Ueno S, Yuan C, Gold J, Murry CE. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*. 2007 Sep;25(9):1015-24. doi: 10.1038/nbt1327. Epub 2007 Aug 26. PMID: 17721512.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y. PMID: 8252621.
- Lesizza P, Prosdocimo G, Martinelli V, Sinagra G, Zacchigna S, Giacca M. Single-Dose Intracardiac Injection of Pro-Regenerative MicroRNAs Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2017 Apr 14;120(8):1298-1304. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309589. Epub 2017 Jan 11. PMID: 28077443.
- Li X, Wang J, Jia Z, Cui Q, Zhang C, Wang W, Chen P, Ma K, Zhou C. MiR-499 regulates cell proliferation and apoptosis during late-stage cardiac differentiation via Sox6 and cyclin D1. *PLoS One*. 2013 Sep 11;8(9):e74504. doi: 10.1371/journal.pone.0074504. PMID: 24040263; PMCID: PMC3770584.
- Lian, Xiaojun, Jianhua Zhang, Samira M. Azarin, Kexian Zhu, Laurie B. Hazeltine, Xiaoping Bao, Cheston Hsiao, Timothy J. Kamp, and Sean P. Palecek. 2012. "Directed Cardiomyocyte Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells by Modulating Wnt/ β -Catenin Signaling under Fully Defined Conditions." *Nature Protocols* 8 (1): 162–75. A
- Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, Raval KK, Zhang J, Kamp TJ, Palecek SP. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 3;109(27):E1848-57.

- doi: 10.1073/pnas.1200250109. Epub 2012 May 29. PMID: 22645348; PMCID: PMC3390875. B
- Li JY, Christophersen NS, Hall V, Soulet D, Brundin P. Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair. *Trends Neurosci.* 2008 Mar;31(3):146-53. doi: 10.1016/j.tins.2007.12.001. Epub 2008 Feb 5. PMID: 18255164.
- Li W, Ding S. Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31(1):36–45. doi: 10.1016/j.tips.2009.10.002.
- Li Y, McClintick J., Zhong L., Edenberg H.J., Yoder M.C., Chan R.J. 2005. “Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4.” *Blood.* 105: 635-637.
- Lorts A, Schwanekamp JA, Elrod JW, Sargent MA, Molkentin JD. Genetic manipulation of periostin expression in the heart does not affect myocyte content, cell cycle activity, or cardiac repair. *Circ Res.* 2009 Jan 2;104(1):e1-7. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.188649. Epub 2008 Nov 26. PMID: 19038863; PMCID: PMC2644415.
- Louro AF, Paiva MA, Oliveira MR, Kasper KA, Alves PM, Gomes-Alves P, Serra M. Bioactivity and miRNome Profiling of Native Extracellular Vesicles in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Cardiomyocyte Differentiation. *Adv Sci (Weinh).* 2022 May;9(15):e2104296. doi: 10.1002/advs.202104296. Epub 2022 Mar 24. PMID: 35322574; PMCID: PMC9130911.
- Love MI, Huber W, Anders S (2014). “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.” *Genome Biology*, 15, 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, Leibel RL, Melton DA. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *PNAS.* 2009;106(37):15768–15773. doi: 10.1073/pnas.0906894106.
- Maffioletti SM, Gerli MF, Ragazzi M, Dastidar S, Benedetti S, Loperfido M, VandenDriessche T, Chuah MK, Tedesco FS. Efficient derivation and inducible differentiation of expandable skeletal myogenic cells from human ES and patient-specific iPS cells. *Nat Protoc.* 2015 Jul;10(7):941-58. doi: 10.1038/nprot.2015.057. Epub 2015 Jun 4. Erratum in: *Nat Protoc.* 2015 Sep;10(9):1457. PMID: 26042384.
- Mahmoud AI, Canseco D, Xiao F, Sadek HA. Cardiomyocyte cell cycle: Meis-ing something? *Cell Cycle.* 2014;13(7):1057-8. doi: 10.4161/cc.28379. Epub 2014 Feb 27. PMID: 24603411; PMCID: PMC4013154.

- Mahmoud AI, Kocabas F, Muralidhar SA, Kimura W, Koura AS, Thet S, Porrello ER, Sadek HA. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*. 2013 May 9;497(7448):249-253. doi: 10.1038/nature12054. Epub 2013 Apr 17. PMID: 23594737; PMCID: PMC4159712.
- McDevitt TC, Laflamme MA, Murry CE. Proliferation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells is mediated via the IGF/PI 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Dec;39(6):865-73. doi: 10.1016/j.yjmcc.2005.09.007. Epub 2005 Oct 19. PMID: 16242146; PMCID: PMC3505759.
- Menasché P, Vanneaux V, Hagège A, Bel A, Cholley B, Parouchev A, Cacciapuoti I, Al-Daccak R, Benhamouda N, Blons H, Agbulut O, Tosca L, Trouvin JH, Fabreguettes JR, Bellamy V, Charron D, Tartour E, Tachdjian G, Desnos M, Larghero J. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Jan 30;71(4):429-438. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.047. PMID: 29389360.
- Mi, Huaiyu, Anushya Muruganujan, and Paul D. Thomas. 2013. "PANTHER in 2013: Modeling the Evolution of Gene Function, and Other Gene Attributes, in the Context of Phylogenetic Trees." *Nucleic Acids Research* 41 (Database issue): D377–86.
- Mi, Muruganujan, and Thomas. 2013. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Miyagawa S, Kainuma S, Kawamura T, Suzuki K, Ito Y, Iseoka H, Ito E, Takeda M, Sasai M, Mochizuki-Oda N, Shimamoto T, Nitta Y, Dohi H, Watabe T, Sakata Y, Toda K, Sawa Y. Case report: Transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte patches for ischemic cardiomyopathy. *Front Cardiovasc Med*. 2022 Aug 16;9:950829. doi: 10.3389/fcvm.2022.950829. PMID: 36051285; PMCID: PMC9426776.
- Mohamed TMA, Ang YS, Radzinsky E, Zhou P, Huang Y, Effenbein A, Foley A, Magnitsky S, Srivastava D. Regulation of Cell Cycle to Stimulate Adult Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Regeneration. *Cell*. 2018 Mar 22;173(1):104-116.e12. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.014. Epub 2018 Mar 1. PMID: 29502971; PMCID: PMC5973786.
- Mollova M, Bersell K, Walsh S, Savla J, Das LT, Park SY, Silberstein LE, Dos Remedios CG, Graham D, Colan S, Kühn B. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 22;110(4):1446-51. doi: 10.1073/pnas.1214608110. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23302686; PMCID: PMC3557060.

- Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elefanty AG, Kamp TJ. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res*. 2012 Jul 20;111(3):344-58. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227512. PMID: 22821908; PMCID: PMC3578601.
- Murry, CE y Keller, G. "Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development". En: *Cell* 132.4 (2008), págs. 661-680. issn: 00928674.
- Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, Komuro I. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 26;103(52):19812-7. doi: 10.1073/pnas.0605768103. Epub 2006 Dec 14. PMID: 17170140; PMCID: PMC1750922.
- Nakajima K, Inagawa M, Uchida C, Okada K, Tane S, Kojima M, Kubota M, Noda M, Ogawa S, Shirato H, Sato M, Suzuki-Migishima R, Hino T, Satoh Y, Kitagawa M, Takeuchi T. Coordinated regulation of differentiation and proliferation of embryonic cardiomyocytes by a jumonji (Jarid2)-cyclin D1 pathway. *Development*. 2011 May;138(9):1771-82. doi: 10.1242/dev.059295. Epub 2011 Mar 29. PMID: 21447557.
- Nakanishi C, Yamagishi M, Yamahara K, Hagino I, Mori H, Sawa Y, Yagihara T, Kitamura S, Nagaya N. Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Sep 12;374(1):11-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.06.074. Epub 2008 Jun 27. PMID: 18586003.
- Naqvi N, Li M, Calvert JW, Tejada T, Lambert JP, Wu J, Kesteven SH, Holman SR, Matsuda T, Lovelock JD, Howard WW, Iismaa SE, Chan AY, Crawford BH, Wagner MB, Martin DI, Lefer DJ, Graham RM, Husain A. A proliferative burst during preadolescence establishes the final cardiomyocyte number. *Cell*. 2014 May 8;157(4):795-807. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.035. PMID: 24813607; PMCID: PMC4078902.
- Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, et al. Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem*. 2010;286(6):4760-4771. doi: 10.1074/jbc.M110.183780.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000 Apr;24(4):372-6. doi: 10.1038/74199. PMID: 10742100.

- Novoyatleva T, Diehl F, van Amerongen MJ, Patra C, Ferrazzi F, Bellazzi R, Engel FB. TWEAK is a positive regulator of cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Res*. 2010 Mar 1;85(4):681-90. doi: 10.1093/cvr/cvp360. Epub 2009 Nov 2. PMID: 19887380.
- Novoyatleva T, Sajjad A, Pogoryelov D, Patra C, Schermuly RT, Engel FB. FGF1-mediated cardiomyocyte cell cycle reentry depends on the interaction of FGFR-1 and Fn14. *FASEB J*. 2014 Jun;28(6):2492-503. doi: 10.1096/fj.13-243576. Epub 2014 Feb 26. PMID: 24571920.
- Novoyatleva T, Janssen W, Wietelmann A, Schermuly RT, Engel FB. TWEAK/Fn14 axis is a positive regulator of cardiac hypertrophy. *Cytokine*. 2013 Oct;64(1):43-5. doi: 10.1016/j.cyto.2013.05.009. Epub 2013 Jun 10. PMID: 23764551.
- Ohnuki M, Takahashi K. Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015 Oct 19;370(1680):20140367. doi: 10.1098/rstb.2014.0367. PMID: 26416678; PMCID: PMC4633996.
- Okita K, Nakagawa M, Hyunjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 2008;322(5903):949-953. doi: 10.1126/science.1164270.
- Organización Mundial de la Salud. (s.f.). The top 10 causes of death. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, Cowan CA, Chien KR, Melton DA. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol*. 2008 Mar;26(3):313-5. doi: 10.1038/nbt1383. Epub 2008 Feb 17. PMID: 18278034.
- Pandey R, Yang Y, Jackson L, Ahmed RP. MicroRNAs regulating meis1 expression and inducing cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Regen Med*. 2016;3:e1468. PMID: 28111633; PMCID: PMC5245919.
- Pandey R, Velasquez S, Durrani S, Jiang M, Neiman M, Crocker JS, Benoit JB, Rubinstein J, Paul A, Ahmed RP. MicroRNA-1825 induces proliferation of adult cardiomyocytes and promotes cardiac regeneration post ischemic injury. *Am J Transl Res*. 2017 Jun 15;9(6):3120-3137. PMID: 28670398; PMCID: PMC5489910.
- Parekh P, Motiwale L, Naik N, Rao KV. Downregulation of cyclin D1 is associated with decreased levels of p38 MAP kinases, Akt/PKB and Pak1 during chemopreventive effects of resveratrol in liver cancer cells. *Exp Toxicol Pathol*. 2011 Jan;63(1-2):167-73. doi: 10.1016/j.etp.2009.11.005. Epub

2010 Feb 4. PMID: 20133117.

Parikh SS, Blackwell DJ, Gomez-Hurtado N, Frisk M, Wang L, Kim K, Dahl CP, Fiane A, Tønnessen T, Kryshtal DO, Louch WE, Knollmann BC. Thyroid and Glucocorticoid Hormones Promote Functional T-Tubule Development in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ Res.* 2017 Dec 8;121(12):1323-1330. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311920. Epub 2017 Oct 2. PMID: 28974554; PMCID: PMC5722667.

Park CW, Kim KS, Bae S, Son HK, Myung PK, Hong HJ, Kim H. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *Int J Stem Cells.* 2009 May;2(1):59-68. doi: 10.15283/ijsc.2009.2.1.59. PMID: 24855521; PMCID: PMC4021795.

Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell.* 2008 Sep 5;134(5):877-86. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.041. Epub 2008 Aug 7. PMID: 18691744; PMCID: PMC2633781.

Pasumarthi KB, Field LJ. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res.* 2002 May 31;90(10):1044-54. doi: 10.1161/01.res.0000020201.44772.67. PMID: 12039793.

Patsch C, Challet-Meylan L, Thoma EC, Urich E, Heckel T, O'Sullivan JF, Grainger SJ, Kapp FG, Sun L, Christensen K, Xia Y, Florido MH, He W, Pan W, Prummer M, Warren CR, Jakob-Roetne R, Certa U, Jagasia R, Freskgård PO, Adatto I, Kling D, Huang P, Zon LI, Chaikof EL, Gerszten RE, Graf M, Iacone R, Cowan CA. Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol.* 2015 Aug;17(8):994-1003. doi: 10.1038/ncb3205. Epub 2015 Jul 27. PMID: 26214132; PMCID: PMC4566857.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7. doi: 10.1126/science.284.5411.143. PMID: 10102814.

Poolman RA, Gilchrist R, Brooks G. Cell cycle profiles and expressions of p21CIP1 AND P27KIP1 during myocyte development. *Int J Cardiol.* 1998 Dec 1;67(2):133-42. doi: 10.1016/s0167-5273(98)00320-9. PMID: 9891946.

Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science.* 2011 Feb 25;331(6020):1078-80. doi: 10.1126/science.1200708. PMID: 21350179; PMCID: PMC3099478.

Questa, María, Leonardo Romorini, Carolina Blüguermann, Claudia María Solari, Gabriel Neiman,

- Carlos Luzzani, María Élica Scassa, Gustavo Emilio Sevlever, Alejandra Sonia Guberman, and Santiago Gabriel Miriuka. 2016. "Generation of iPSC Line iPSC-FH2.1 in Hypoxic Conditions from Human Foreskin Fibroblasts." *Stem Cell Research* 16 (2): 300–303.
- Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell*. 2012 Mar 2;10(3):244-58. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.005. PMID: 22385653; PMCID: PMC3294273.
- Sadat S, Gehmert S, Song YH, Yen Y, Bai X, Gaiser S, Klein H, Alt E. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov 23;363(3):674-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.09.058. Epub 2007 Sep 24. PMID: 17904522.
- Shaltouki A, Peng J, Liu Q, Rao MS, Zeng X. Efficient generation of astrocytes from human pluripotent stem cells in defined conditions. *Stem Cells*. 2013 May;31(5):941-52. doi: 10.1002/stem.1334. PMID: 23341249.
- Shi G, Jin Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Res Ther*. 2010 Dec 14;1(5):39. doi: 10.1186/scrt39. PMID: 21156086; PMCID: PMC3025441
- Si-Tayeb K, Noto FK, Sepac A, Sedlic F, Bosnjak ZJ, Lough JW, Duncan SA. Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC Dev Biol*. 2010;10(1):81. doi: 10.1186/1471-213X-10-81.
- Snir M, Kehat I, Gepstein A, Coleman R, Itskovitz-Eldor J, Livne E, Gepstein L. Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Dec;285(6):H2355-63. doi: 10.1152/ajpheart.00020.2003. PMID: 14613910.
- Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2005 May;203(2):398-409. doi: 10.1002/jcp.20238. PMID: 15521064.
- Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009 Mar 6;136(5):964-77. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.013. PMID: 19269371; PMCID: PMC2787236.
- Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol*. 1996 Nov;271(5 Pt 2):H2183-9. doi:

- 10.1152/ajpheart.1996.271.5.H2183. PMID: 8945939.
- Soonpaa MH, Zebrowski DC, Platt C, Rosenzweig A, Engel FB, Field LJ. Cardiomyocyte Cell-Cycle Activity during Preadolescence. *Cell*. 2015 Nov 5;163(4):781-2. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.037. PMID: 26544927.
- Speir E, Tanner V, Gonzalez AM, Farris J, Baird A, Casscells W. Acidic and basic fibroblast growth factors in adult rat heart myocytes. Localization, regulation in culture, and effects on DNA synthesis. *Circ Res*. 1992 Aug;71(2):251-9. doi: 10.1161/01.res.71.2.251. PMID: 1378359.
- Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Derynck R, Blelloch R. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011 May;29(5):443-8. doi: 10.1038/nbt.1862. Epub 2011 Apr 13. PMID: 21490602; PMCID: PMC3685579.
- Sugi Y, Lough J. 1995. Activin-A and FGF-2 mimic the inductive effects of anterior endoderm on terminal cardiac myogenesis in vitro. *Dev. Biol*. 168:567–74
- Sze SK, de Kleijn DP, Lai RC, Khia Way Tan E, Zhao H, Yeo KS, Low TY, Lian Q, Lee CN, Mitchell W, El Oakley RM, Lim SK. Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Oct;6(10):1680-9. doi: 10.1074/mcp.M600393-MCP200. Epub 2007 Jun 11. PMID: 17565974.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering CV. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D607-D613. doi: 10.1093/nar/gky1131. PMID: 30476243; PMCID: PMC6323986.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell* 126 (4): 663–76.
- 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 Nov 30;131(5):861-72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019. PMID: 18035408.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16904174.

- Tian Y, Liu Y, Wang T, Zhou N, Kong J, Chen L, Snitow M, Morley M, Li D, Petrenko N, Zhou S, Lu M, Gao E, Koch WJ, Stewart KM, Morrissey EE. A microRNA-Hippo pathway that promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration in mice. *Sci Transl Med*. 2015 Mar 18;7(279):279ra38. doi: 10.1126/scitranslmed.3010841. PMID: 25787764; PMCID: PMC6295313.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, and J. M. Jones. 1998. "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts." *Science* 282 (5391): 1145–47.
- Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell*. 2013 Jan 3;12(1):127-37. doi: 10.1016/j.stem.2012.09.013. Epub 2012 Nov 15. PMID: 23168164.
- von Harsdorf R, Poole-Wilson PA, Dietz R. Regenerative capacity of the myocardium: implications for treatment of heart failure. *Lancet*. 2004 Apr 17;363(9417):1306-13. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16006-6. PMID: 15094278.
- Wadugu B, Kühn B. The role of neuregulin/ErbB2/ErbB4 signaling in the heart with special focus on effects on cardiomyocyte proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Jun 1;302(11):H2139-47. doi: 10.1152/ajpheart.00063.2012. Epub 2012 Mar 16. PMID: 22427524; PMCID: PMC3378290.
- Waisman A, Vazquez Echegaray C, Solari C, Cosentino MS, Martyn I, Deglincerti A, Ozair MZ, Ruzo A, Barañao L, Miriuka S, Brivanlou A, Guberman A. Inhibition of Cell Division and DNA Replication Impair Mouse-Naïve Pluripotency Exit. *J Mol Biol*. 2017 Sep 1;429(18):2802-2815. doi: 10.1016/j.jmb.2017.06.020. Epub 2017 Jul 3. PMID: 28684247.
- Walsh S, Pontén A, Fleischmann BK, Jovinge S. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo--an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc Res*. 2010 Jun 1;86(3):365-73. doi: 10.1093/cvr/cvq005. Epub 2010 Jan 13. PMID: 20071355.
- Wang LL, Liu Y, Chung JJ, Wang T, Gaffey AC, Lu M, Cavanaugh CA, Zhou S, Kanade R, Atluri P, Morrissey EE, Burdick JA. Local and sustained miRNA delivery from an injectable hydrogel promotes cardiomyocyte proliferation and functional regeneration after ischemic injury. *Nat Biomed Eng*. 2017;1:983-992. doi: 10.1038/s41551-017-0157-y. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29354322; PMCID:

PMC5773070.

Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010;7(5):618–630. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.012.

Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.

Wickham H, François R, Henry L, Müller K (2022). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. <https://dplyr.tidyverse.org>, <https://github.com/tidyverse/dplyr>.

Wrighton, Paul J., Joseph R. Klim, Brandon A. Hernandez, Chad H. Koonce, Timothy J. Kamp, and Laura L. Kiessling. 2014. "Signals from the Surface Modulate Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells through Glycosaminoglycans and Integrins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (51): 18126–31.

Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., and Carpenter, M. K. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(10):971–974, 2001.

Yakubov E, Rechavi G, Rozenblatt S, Givol D. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394(1):189–193. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.150.

Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*. 2008 May 21;453(7194):524-8.

Yang H, Borg TK, Ma Z, Xu M, Wetzell G, Saraf LV, Markwald R, Runyan RB, Gao BZ. Biochip-based study of unidirectional mitochondrial transfer from stem cells to myocytes via tunneling nanotubes. *Biofabrication*. 2016 Feb 4;8(1):015012. doi: 10.1088/1758-5090/8/1/015012. PMID: 26844857.

Yang H, Yang Y, Kiskin FN, Shen M, Zhang JZ. Recent advances in regulating the proliferation or maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res Ther*. 2023 Aug 30;14(1):228. doi: 10.1186/s13287-023-03470-w. PMID: 37649113; PMCID: PMC10469435.

- Yang Q, Wu F, Mi Y, Wang F, Cai K, Yang X, Zhang R, Liu L, Zhang Y, Wang Y, Wang X, Xu M, Gui Y, Li Q. Aberrant expression of miR-29b-3p influences heart development and cardiomyocyte proliferation by targeting NOTCH2. *Cell Prolif*. 2020 Mar;53(3):e12764. doi: 10.1111/cpr.12764. Epub 2020 Feb 20. PMID: 32077168; PMCID: PMC7106969.
- Yang X, Rodriguez M, Pabon L, Fischer KA, Reinecke H, Regnier M, Sniadecki NJ, Ruohola-Baker H, Murry CE. Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Jul;72:296-304. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.04.005. Epub 2014 Apr 13. PMID: 24735830; PMCID: PMC4041732.
- Yang X, Ribeiro AJS, Pang L, Strauss DG. Use of Human iPSC-CMs in Nonclinical Regulatory Studies for Cardiac Safety Assessment. *Toxicol Sci*. 2022 Nov 23;190(2):117-126. doi: 10.1093/toxsci/kfac095. PMID: 36099065.
- Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell*. 2009 Apr 3;137(1):13-7. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.034. PMID: 19345179.
- Yoshizumi M, Lee WS, Hsieh CM, Tsai JC, Li J, Perrella MA, Patterson C, Endege WO, Schlegel R, Lee ME. Disappearance of cyclin A correlates with permanent withdrawal of cardiomyocytes from the cell cycle in human and rat hearts. *J Clin Invest*. 1995 May;95(5):2275-80. doi: 10.1172/JCI117918. PMID: 7738192; PMCID: PMC295840.
- Yu FX, Guan KL. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev*. 2013 Feb 15;27(4):355-71. doi: 10.1101/gad.210773.112. PMID: 23431053; PMCID: PMC3589553.
- Yu G, Wang L, Han Y, He Q (2012). "clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters." *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, **16**(5), 284-287. doi: [10.1089/omi.2011.0118](https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118).
- Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 2009;324(5928):797–801. doi: 10.1126/science.1172482.
- Zebrowski DC, Becker R, Engel FB. Towards regenerating the mammalian heart: challenges in evaluating experimentally induced adult mammalian cardiomyocyte proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016 May 1;310(9):H1045-54. doi: 10.1152/ajpheart.00697.2015. Epub 2016 Feb 26. PMID: 26921436.
- Zhang D, Jiang W, Liu M, Sui X, Yin X, Chen S, Shi Y, Deng H. Highly efficient differentiation of human

- ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res.* 2009 Apr;19(4):429-38. doi: 10.1038/cr.2009.28. PMID: 19255591.
- Zhang H, Xue Y, Pan T, Zhu X, Chong H, Xu C, Fan F, Cao H, Zhang B, Pan J, Zhou Q, Yang G, Wang J, Wang DJ. Epicardial injection of allogeneic human-induced-pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in patients with advanced heart failure: protocol for a phase I/IIa dose-escalation clinical trial. *BMJ Open.* 2022 May 6;12(5):e056264. doi: 10.1136/bmjopen-2021-056264. PMID: 35523485; PMCID: PMC9083430.
- Zhao J, Jiang WJ, Sun C, Hou CZ, Yang XM, Gao JG. Induced pluripotent stem cells: origins, applications, and future perspectives. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2013 Dec;14(12):1059-69. doi: 10.1631/jzus.B1300215. PMID: 24302707; PMCID: PMC3863365.
- Zhou Q, Li L, Zhao B, Guan KL. The hippo pathway in heart development, regeneration, and diseases. *Circ Res.* 2015 Apr 10;116(8):1431-47. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303311. PMID: 25858067; PMCID: PMC4394208.
- Zhu WZ, Xie Y, Moyes KW, Gold JD, Askari B, Laflamme MA. Neuregulin/ErbB signaling regulates cardiac subtype specification in differentiating human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2010 Sep 17;107(6):776-86. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223917. Epub 2010 Jul 29. PMID: 20671236; PMCID: PMC2941561.