



---

# Modelado *in vitro* de la displasia arritmogénica en cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas editadas genéticamente mediante CRISPR/Cas9

Tesis presentada para optar al título de  
Doctora en Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral

Lic. Guadalupe Amin

Directora: Dra. Lucia N. Moro

Co-directora: Dra. Catalina Atorrasagasti

Lugar de trabajo: INEU-FLENI-CONICET

Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT), CONICET-Universidad  
Austral

Buenos Aires, 2025

*Detrás de cada logro siempre hay personas que nos inspiran y acompañan en el camino. Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo y la confianza de quienes, con su conocimiento, paciencia y generosidad, hicieron de este recorrido una experiencia inolvidable. Más allá de los resultados que dejó este trabajo, me llevo la satisfacción de haber compartido estos años con personas que estuvieron a mi lado en todas, o tal vez solo algunas, etapas del proceso.*

*En primer lugar, quisiera agradecer a mi familia: Nahue, Mar, mis papás y mis hermanos. Gracias por su inspiración, aliento y amor. Gracias por el esfuerzo y tiempo que me regalaron, sobre todo estos últimos meses para poder terminar este proyecto. Gracias amor, porque en estos 6 años vivimos y atravesamos mil y un tormentas, tantos viajes y momentos inolvidables, un casamiento, un nacimiento, no tengo palabras para expresar lo completa que es mi vida a tu lado. Gracias papás por ser mi ejemplo a seguir, cada uno aportando su granito de arena a esta persona que soy hoy.*

*A mis amigas de la vida, las que no tienen ni idea de que trabajo, pero que con un cafecito y una charla saben que estoy bien encaminada. Gracias por sentarse y escucharme, alentarme y bancarme. Las quiero a cada una y agradezco eternamente que estén en mi vida, si tuviera que nombrarlas a todas y todo lo que han hecho por mí, debería redactar otra tesis entera.*

*Mi grupete de becarios 3, en especial Anto, Sole, Joaco, Fede y la intrusa de Deni. Este grupo de compañeros que se convirtieron en grandísimos amigos, con los cuales sé que, si nuestros caminos llegan a separarnos, haremos como sea para seguir en contacto, ya sea en Salta, San Martín o Japón. Los quiero y espero que siempre quede un poco de agua para un mate más.*

*A todo el grupo del LIAN, cardio y neuro, investigadores, técnicos y becarios, que con las charlas entre pasillos o un afterlab de vez en cuando siempre encontramos la manera de seguir adelante y solucionar cada problema que surgía.*

*Dentro de toda esta hermosa familia Fleni, tuve la suerte de tener la mejor directora del laboratorio. Siguiendo sus pasos y aprendiendo lo mejor, desde la tesina de licenciatura, hacia el fin del doctorado y ahora presentándonos para seguir con el postdoc, ¡qué largo camino y*

*que paciencia me tuviste! Gracias por formarme como científica, pero también por darme consejos como amiga y ahora como madre.*

*Gracias a Santiago, mi director en CONICET, por siempre estar dispuesto a ayudar y aconsejar cuando lo necesitaba, a Cata, mi co-directora, que por más que no nos alcanzó el tiempo para unir y explotar nuestros conocimientos, siempre estuvo para guiarnos y aportar en este proyecto, gracias a la Universidad Austral por permitirme realizar este doctorado y a FLENI, por abrirme sus puertas.*

# Resumen

La Displasia Arritmogénica (DA) es una enfermedad hereditaria caracterizada por el reemplazo progresivo del tejido cardíaco contráctil por tejido fibro-adiposo, lo que genera arritmias y puede llevar a la muerte del paciente. Es la segunda causa más común de muerte súbita en jóvenes menores de 35 años y representa el 20% de los casos de muerte súbita en esta población. Su incidencia se estima entre 1:2000 y 1:5000, y se debe principalmente a mutaciones en genes que codifican proteínas desmosomales: Placoglobina (PKG), Placofilina-2 (PKP2), Desmoplaquina (DSP), Desmogleína-2 (DSG-2) y Desmocolina-2 (DSC-2). Los desmosomas son complejos proteicos que desempeñan un papel crucial en la adhesión célula-célula y en la integridad estructural del tejido cardíaco. Las alteraciones en cualquiera de estas proteínas desmosomales comprometen la cohesión celular, lo que conduce a la desorganización sarcomérica, alteraciones en la mecanotransducción y un remodelado patológico del miocardio.

En esta tesis nos centraremos en dos componentes fundamentales de los desmosomas: PKG y PKP2. PKG desempeña un papel crucial en la adhesión célula-célula y en la transducción de señales. Estudios en modelos murinos han demostrado que la eliminación de PKG resulta en inviabilidad, atribuida a alteraciones críticas en el desarrollo cardíaco. En contraste, en humanos, estas mutaciones no suelen ser letales. Por otro lado, *PKP2* es el gen más frecuentemente mutado en pacientes con DA. PKP2 es vital para la estabilidad mecánica de las células cardíacas, ya que actúa como un puente que conecta las proteínas de adhesión transmembrana con la DSP y a su vez con la red de filamentos intermedios. Las mutaciones en PKP2 provocan una disfunción desmosomal que afecta la cohesión celular y altera la señalización intracelular, lo que conduce a una remodelación patológica del miocardio.

El objetivo general de esta tesis es modelar *in vitro* la DA mediante la generación de líneas de células madre pluripotentes inducidas (CMPI) portadoras de variantes asociadas a esta cardiopatía y su posterior diferenciación en cardiomiocitos. A través de estos modelos *in vitro*, buscamos recrear las características patológicas asociadas a la enfermedad, facilitando el

estudio de sus mecanismos moleculares y celulares subyacentes. Nuestra hipótesis es que la incorporación de mutaciones específicas en las CMPi, utilizando el sistema de edición genética CRISPR/Cas9, posibilitará la generación de modelos celulares que reproducen fielmente los rasgos de la DA. Este enfoque permitirá establecer una plataforma experimental para evaluar el impacto funcional de las mutaciones identificadas en pacientes y explorar potenciales estrategias terapéuticas.

Para ello, se generaron líneas de CMPi editadas con mutaciones específicas en *PKG* y *PKP2*. Se diseñaron ARNg dirigidos al exón 1 del gen de *PKG* para generar dos líneas de CMPi *knock-out* (PKG-KO-01, PKG-KO-02) y al exón 3 del gen de *PKP2* para generar una línea *knock-out* (PKP2-KO-01) y otra con una variante de significado incierto reportada en pacientes (PKP2-SF)]. El diseño experimental consistió en diferenciar estas CMPi editadas a cardiomiocitos para caracterizar el posible efecto de las variantes introducidas, analizando la adhesión celular, organización sarcomérica, ultraestructura cardíaca, predisposición a la acumulación lipídica y funcionalidad contráctil.

En el primer capítulo, se optimizó el protocolo para la obtención de líneas de CMPi clonales editadas en homocigosis mediante CRISPR/Cas9. Con esta estrategia consolidamos la línea PKG-KO-01. Si bien se evaluó la capacidad de diferenciación a cardiomiocitos de esta línea, luego se determinó que la misma tenía una aberración cromosómica detectando presencia de un isocromosoma del brazo corto del cromosoma 12. Por este motivo los resultados obtenidos de esta línea celular fueron desestimados, aunque este hallazgo consolidó la importancia de monitorear la estabilidad genómica en todas las líneas celulares editadas genéticamente en el laboratorio.

En el segundo capítulo, se generó una nueva línea de CMPi *knock-out* para PKG (PKG-KO-02) y también una *knock-out* para PKP2 (PKP2-KO-01). Los análisis mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia confirmaron que ambas líneas celulares editadas fueron capaces de diferenciarse a cardiomiocitos. Además, se incorporó un protocolo de maduración de cardiomiocitos para permitir la obtención de cardiomiocitos más similares a los adultos. El estudio de alineamiento del citoesqueleto de estos cardiomiocitos maduros mostró

alteraciones en las líneas editadas, con una disminución progresiva del orden estructural en cardiomiocitos PKG-KO-02 y PKP2-KO-01 en comparación con cardiomiocitos *wild-type*. Además, estudios de ultraestructura mediante microscopía electrónica de transmisión reveló sarcómeros más cortos y una menor cantidad de desmosomas en los cardiomiocitos *knock-out*, indicando un impacto claro en la integridad estructural de estas células. Los resultados mostraron que la falta de estas proteínas desmosomales provoca cambios estructurales significativos en los cardiomiocitos.

En el último capítulo, se utilizó este modelo para investigar la potencial patogenicidad de una mutación previamente reportada en pacientes, pero clasificada como de significado incierto. Para ello se generó por recombinación homóloga mediada por CRISPR/Cas9 la línea de CMPi PKP2-SF con la variante p.S140F. Esta línea fue exitosamente diferenciada a cardiomiocitos, los cuales fueron incubados en medio pro-adipogénico al igual que los cardiomiocitos PKP2-KO-01. Lo que se observó fue una mayor acumulación lipídica respecto a cardiomiocitos *wild-type*. Para evaluar la funcionalidad, también se cuantificó la contractilidad celular utilizando un software de procesamiento de video. Este ensayo mostró igual frecuencia de contracción entre los grupos, pero una disminución en la velocidad de contracción en cardiomiocitos PKP2-KO-01 maduros, en comparación con cardiomiocitos *Wild-Type*. Si bien esta disminución no fue tan evidente en cardiomiocitos PKP2-SF, se puede observar que hay una mayor cantidad de cardiomiocitos PKP2-SF con menor velocidad de contracción que el control. Tanto la acumulación lipídica como alteraciones en la contracción son fenotipos compatibles con alteraciones observadas en modelos de DA.

Este estudio valida el uso de modelos basados en CMPi y edición genética para el estudio de mutaciones en enfermedades cardíacas hereditarias, proporcionando una plataforma experimental robusta para la evaluación funcional de variantes de significado incierto. Además, estos modelos representan una herramienta fundamental para la identificación de nuevos mecanismos patogénicos y el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas, contribuyendo a mejorar la comprensión y el manejo clínico de la DA.

# Abstract

Arrhythmogenic Dysplasia (AD) is an inherited disease characterized by the progressive replacement of contractile cardiac tissue with fibro-adipose tissue, which leads to arrhythmias and may result in patient death. It is the second most common cause of sudden death in individuals under 35 years of age, accounting for 20% of sudden death cases in this population. Its incidence is estimated at 1:2000 to 1:5000 and is primarily caused by mutations in genes encoding essential desmosomal proteins: plakoglobin (PKG), plakophilin-2 (PKP2), desmoplakin (DSP), desmoglein-2 (DSG-2), and desmocollin-2 (DSC-2). Desmosomes are protein complexes that play a crucial role in cell–cell adhesion and the structural integrity of cardiac tissue. Alterations in any of these desmosomal proteins compromise cellular cohesion, leading to sarcomeric disorganization, impaired mechanotransduction, and pathological remodeling of the myocardium.

This thesis focuses on two fundamental desmosomal components: PKG and PKP2. PKG is critical for cell–cell adhesion and signal transduction. Studies in murine models have demonstrated that PKG ablation results in embryonic lethality, attributed to critical alterations in cardiac development. In contrast, loss-of-function mutations in PKG are not typically lethal in humans. PKP2, on the other hand, is the most frequently mutated gene in patients with AD. It is vital for the mechanical stability of cardiac cells, acting as a bridge connecting transmembrane adhesion proteins to DSP, and subsequently to the intermediate filament network. Mutations in PKP2 lead to desmosomal dysfunction, affecting cellular cohesion and altering intracellular signaling, which in turn causes pathological myocardial remodeling.

The overall objective of this thesis is to model AD *in vitro* by generating lines of induced pluripotent stem cells (iPSCs) harboring variants associated with this cardiomyopathy and subsequently differentiating them into cardiomyocytes. Through these *in vitro* models, we aim to recapitulate the pathological features of the disease, thereby facilitating the study of its underlying molecular and cellular mechanisms. Our hypothesis is that incorporating specific mutations into iPSCs using the CRISPR/Cas9 gene editing system will enable the creation of

cellular models that faithfully reproduce the characteristics of AD. This approach will establish an experimental platform to evaluate the functional impact of mutations identified in patients and to explore potential therapeutic strategies.

To this end, iPSC lines were generated with targeted mutations in PKG and PKP2. Guide RNAs (gRNAs) targeting exon 1 of the PKG gene were designed to create two knock-out iPSC lines (PKG-KO-01, PKG-KO-02), while gRNAs targeting exon 3 of the PKP2 gene were used to generate one knock-out line (PKP2-KO-01) and another carrying a variant of uncertain significance reported in patients (PKP2-SF). The experimental design involved differentiating these edited iPSCs into cardiomyocytes to characterize the potential effects of the introduced variants by analyzing cell adhesion, sarcomeric organization, cardiac ultrastructure, predisposition to lipid accumulation, and contractile functionality.

In the first chapter, the protocol for obtaining clonal iPSC lines edited in homozygosity via CRISPR/Cas9 was optimized, leading to the establishment of the PKG-KO-01 line. Although its differentiation potential into cardiomyocytes was evaluated, subsequent transcriptomic analysis (RNA-seq) revealed a chromosomal aberration—specifically, the presence of an isochromosome of the short arm of chromosome 12. Consequently, the results obtained from this cell line were disregarded, although this finding underscored the importance of monitoring genomic stability in all gene-edited cell lines.

In the second chapter, a new PKG knock-out iPSC line (PKG-KO-02) and a PKP2 knock-out line (PKP2-KO-01) were generated. Flow cytometry and immunofluorescence analyses confirmed that both edited cell lines were capable of differentiating into cardiomyocytes. Additionally, a cardiomyocyte maturation protocol was incorporated to obtain cells more representative of the adult phenotype. Analysis of the cytoskeletal alignment in these mature cardiomyocytes revealed alterations in the edited lines, with a progressive decrease in structural order observed in PKG-KO-02 and PKP2-KO-01 cardiomyocytes compared to wild-type cells. Moreover, transmission electron microscopy studies showed shorter sarcomeres and fewer desmosomes in the knock-out cardiomyocytes, indicating a clear impact on their



structural integrity. The results demonstrate that the absence of these desmosomal proteins leads to significant structural changes in cardiomyocytes.

In the final chapter, this model was used to investigate the potential pathogenicity of a mutation previously reported in patients but classified as of uncertain significance. For this purpose, the PKP2-SF iPSC line was generated via CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination, introducing the p.S140F variant. This line was successfully differentiated into cardiomyocytes, which were then incubated in a pro-adipogenic medium alongside PKP2-KO-01 cardiomyocytes. The PKP2-SF cardiomyocytes exhibited a greater accumulation of lipids compared to wild-type cells. To assess functionality, cellular contractility was quantified using video processing software. This assay revealed a similar contraction frequency across groups, but a decrease in contraction velocity in mature PKP2-KO-01 cardiomyocytes relative to wild-type. Although the reduction was less pronounced in PKP2-SF cardiomyocytes, a higher proportion of these cells exhibited reduced contraction velocity compared to the control. Both increased lipid accumulation and contractile alterations are phenotypes consistent with those observed in AD models.

This study validates the use of iPSC-based models and gene editing for investigating mutations in inherited cardiac diseases, providing a robust experimental platform for the functional evaluation of variants of uncertain significance. Furthermore, these models represent a crucial tool for identifying new pathogenic mechanisms and developing targeted therapeutic strategies, ultimately enhancing our understanding and clinical management of AD.

# Índice

<b>Resumen .....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>Índice de figuras.....</b>	<b>13</b>
<b>Índice de tablas .....</b>	<b>15</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>16</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>18</b>
1.1. Células Madre .....	18
1.1.1. Células Madre Pluripotentes .....	21
1.1.2. Diferenciación de las células madre pluripotentes .....	22
1.2. Desarrollo Cardíaco Humano .....	23
1.2.1. Estructura del corazón.....	25
1.2.2. Mesodermo cardíaco.....	25
1.2.3. Estructura del Tejido Muscular Cardíaco .....	27
1.2.4. Discos Intercalares .....	29
1.3. Diferenciación cardíaca de CMP <i>in vitro</i> .....	31
1.4. Modelado <i>in vitro</i> de enfermedades cardíacas.....	34
1.4.1. CRISPR/Cas9 como herramienta de edición génica.....	36
1.4.2. Edición Génica en CMPi.....	39
1.5. Displasia Arritmogénica.....	40
1.5.1. Manifestaciones Clínicas y Diagnóstico .....	41
1.5.2. Tratamiento y Manejo Clínico.....	41
1.5.3. Genética de la DA .....	42
1.6. Desmosoma cardíaco.....	44
1.6.1. Variantes génicas que causan DA .....	46
1.6.2. Mecanismos moleculares de la DA .....	47
1.7. Tejido adiposo en la cardiopatía.....	49
1.7.1. Reguladores clave.....	51
<b>2. Hipótesis .....</b>	<b>52</b>
<b>3. Objetivo general .....</b>	<b>53</b>
3.1. Objetivos Específicos .....	53
<b>4. Materiales y Métodos .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1. Cultivo Celular .....</b>	<b>54</b>
4.1.1. Línea celular .....	54
4.1.2. Mantenimiento de Células Pluripotentes .....	54
4.1.3. Criopreservación de las Células.....	55
<b>4.2. Generación de líneas de CMPi editadas genéticamente mediante CRISPR/Cas9 .....</b>	<b>56</b>
4.2.1. Diseño y clonado de ARN guías para el sistema CRISPR/Cas9 .....	56
4.2.2. Transfección de CMPi .....	60
4.2.3. Selección Clonal de CMPi Transfectadas .....	61
4.2.4. Secuenciación masiva de amplicones.....	61

4.2.5. Caracterización de las líneas generadas de CMPi editadas .....	62
<b>4.3. Diferenciación cardíaca de las CMPi en Monocapa .....</b>	<b>63</b>
4.3.1. Protocolo de diferenciación cardíaca .....	63
4.3.2. Protocolo de maduración de cardiomiocitos .....	64
4.3.3. Tratamiento de cardiomiocitos con medio pro-adipogénico .....	65
<b>4.4. Técnicas de Biología Molecular utilizadas .....</b>	<b>65</b>
4.4.1. Extracción de ADN Genómico .....	65
4.4.2. Detección de contaminación con Mycoplasma sp. ....	66
4.4.3. Extracción de ARN total .....	66
4.4.4. Tratamiento con ADNsa y Retrotranscripción .....	67
4.4.5. PCR a punto final .....	68
4.4.6. Digestión con Enzima de Restricción .....	69
4.4.7. PCR en tiempo real o cuantitativa .....	70
4.4.8. Análisis de proteínas por Western Blot .....	72
4.4.9. Citometría de Flujo .....	74
4.4.10. Microscopía de Fluorescencia .....	75
4.4.11. Tinción con Oil Red O .....	78
4.4.12. Tinción con Cristal Violeta .....	79
4.4.13. Microscopía de Transmisión Electrónica .....	79
4.4.14. Análisis de la Contracción del Cardiomiocito .....	80
<b>4.5. Secuenciación masiva de ARN total .....</b>	<b>81</b>
<b>4.6. Análisis Estadístico .....</b>	<b>82</b>
<b>5. Resultados .....</b>	<b>83</b>
<b>5.1. Capítulo 1: Generación de una línea celular <i>knock-out</i> para el gen de la Placoglobina. ....</b>	<b>83</b>
5.1.1. Puesta a punto para la generación de clones celulares editados genéticamente mediante CRISPR/Cas9 .....	83
5.1.2. Generación de la línea celular PKG-KO. ....	86
5.1.3. Validación de la pluripotencia en la línea celular PKG-KO-01 .....	88
5.1.4. Diferenciación a cardiomiocitos de la línea celular PKG-KO-01 .....	90
5.1.5. Secuenciación masiva del ARN de la diferenciación cardíaca de líneas <i>wild-type</i> y PKG-KO-01 .....	94
5.1.6. Cariotipo línea celular PKG-KO-01 .....	102
5.1.7. Conclusiones parciales del capítulo .....	103
<b>5.2. Capítulo 2: Relevancia de las proteínas desmosomales: Placoglobina y Placofilina-2 en cardiomiocitos .....</b>	<b>105</b>
5.2.1. Generación de las líneas PKG-KO-02 y PKP2-KO-01 .....	105
5.2.2. Validación de la pluripotencia de las líneas celulares PKG-KO-02 y PKP2-KO-01 .....	109
5.2.3. Diferenciación a cardiomiocitos de la líneas celulares PKP2-KO-01 y PKG-KO-02 .....	112
5.2.4. Conclusiones parciales del capítulo .....	124
<b>5.3. Capítulo 3: Modelado <i>in vitro</i> de la Displasia Arritmogénica .....</b>	<b>126</b>
5.3.1. Generación de línea celular con mutación puntual c.56C>T (p.Thr19Ile) en PKG mediante recombinación homóloga .....	127
5.3.2. Generación de línea celular con mutación puntual c.419C>T (p.Ser140Phe) en	

PKP2 mediante recombinación homóloga .....	129
5.3.3. Secuenciación masiva de amplicones.....	130
5.3.4. Generación de la línea PKP2-SF .....	133
5.3.5. Validación de la pluripotencia en la línea PKP2-SF .....	135
5.3.6. Diferenciación a cardiomiocitos de la línea PKP2-SF .....	138
5.3.7. Conclusiones parciales del capítulo .....	144
<b>6. Discusión .....</b>	<b>146</b>
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>157</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>159</b>

# Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema con tipos de células madre y su potencial de diferenciación..	20
<b>Figura 2.</b> Desarrollo cardíaco en el embrión de ratón como modelo de mamífero.....	26
<b>Figura 3.</b> Anatomía del sarcómero cardíaco.....	28
<b>Figura 4.</b> Esquema de la estructura y composición de los DI cardíacos. ....	31
<b>Figura 5.</b> Protocolo de diferenciación cardíaca <i>in vitro</i> en monocapa. ....	34
<b>Figura 6.</b> Rutas de reparación del ADN tras la ruptura doble cadena mediada por la Cas9. ....	37
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática del flujo de trabajo para la generación de líneas celulares genéticamente modificadas con CRISPR/Cas9.....	38
<b>Figura 8.</b> Esquema de los mecanismos involucrados en la DA.....	42
<b>Figura 9.</b> Estructura del desmosoma cardíaco. ....	45
<b>Figura 10.</b> ARNg y ssODNs en el exón 3 del gen de PKP2 .....	58
<b>Figura 11.</b> ARNg y ssODNs en el primer exón del gen de PKG.....	58
<b>Figura 12.</b> ssODNs en el primer exón del gen de PKG .....	58
<b>Figura 13.</b> Mapa del plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro .....	60
<b>Figura 14.</b> Diseño de secuencias para secuenciación de amplicones. ....	62
<b>Figura 15.</b> a) Secuencia original del gen de PKG. b) Secuencia del ssODN con mutación puntual donde se muestra el nuevo sitio de restricción para la enzima BamHI en azul. .	71
<b>Figura 16.</b> Imagen representativa de los valores obtenidos del parámetro de orden.....	77
<b>Figura 17.</b> Ejemplo de señal obtenida de la contracción de cardiomiocitos con el software ContractionWave. ....	81
<b>Figura 18.</b> Crecimiento de célula única. Imágenes representativas tomadas con microscopio óptico a distintos días post selección clonal.....	85
<b>Figura 19.</b> Producto de PCR de la secuencia de PKG lindante al sitio de edición deseada digerido con la enzima BamHI.....	85
<b>Figura 20.</b> Secuenciaciones por Sanger.....	86
<b>Figura 21.</b> Análisis de la expresión proteica de PKG. ....	87
<b>Figura 22.</b> Marcación de pluripotencia en las líneas <i>Wild-Type</i> y PKG-KO-01. ....	88
<b>Figura 23.</b> Análisis en estado pluripotente.....	89
<b>Figura 24.</b> Estructuras cardíacas en el día 14 de la diferenciación cardíaca .....	91
<b>Figura 25.</b> Identificación de población mesodérmica y cardiomiocitos por citometría de flujo.....	91
<b>Figura 26.</b> Expresión de cTnt en la línea PKG-KO-01 a día 21 de la diferenciación cardíaca.....	92
<b>Figura 27.</b> Análisis de expresión de genes en la diferenciación cardíaca. ....	93
<b>Figura 28.</b> Distribución de la abundancia de transcritos.....	95
<b>Figura 29.</b> Heatmap de distancia y PCA plot.....	96
<b>Figura 30.</b> Heatmap de genes con más variabilidad .....	98
<b>Figura 31.</b> Análisis de OG de los 3 clusters principales. ....	99
<b>Figura 32.</b> Volcano plots.....	101
<b>Figura 33.</b> Ubicación en los cromosomas de los genes diferencialmente expresados .	102
<b>Figura 34.</b> Análisis de bandas G cromosómicas de la línea PKG-KO-01.....	102
<b>Figura 35.</b> Secuenciaciones por Sanger.....	106

<b>Figura 36.</b> Análisis de bandas G cromosómicas. ....	<b>107</b>
<b>Figura 37.</b> Análisis de la expresión proteica de PKG y PKP2 .....	<b>108</b>
<b>Figura 38.</b> Análisis de la expresión proteica de PKG y PKP2. ....	<b>108</b>
<b>Figura 39.</b> Marcación de pluripotencia en las líneas <i>Wild-Type</i> , PKP2-KO-01 y PKG-KO-02. ....	<b>109</b>
<b>Figura 40.</b> Análisis de la expresión génica en estado pluripotente.....	<b>111</b>
<b>Figura 41.</b> Cuantificación de células positivas para cTnT. ....	<b>113</b>
<b>Figura 42.</b> Expresión de cTnT a día 21 de la diferenciación cardíaca.....	<b>114</b>
<b>Figura 43.</b> Expresión de genes a día 21 de diferenciación cardíaca. ....	<b>115</b>
<b>Figura 44.</b> Microscopía de campo claro de cardiomiocitos después del proceso de maduración.....	<b>116</b>
<b>Figura 45.</b> Cuantificación de la alineación del citoesqueleto de actina en cardiomiocitos maduros .....	<b>117</b>
<b>Figura 46.</b> Análisis de proteínas desmosomales en la línea PKG-KO-02. ....	<b>119</b>
<b>Figura 47.</b> Análisis de proteínas de N-Cadherina en la línea PKG-KO-02 .....	<b>120</b>
<b>Figura 48.</b> Expresión de genes en cardiomiocitos maduros.....	<b>121</b>
<b>Figura 49.</b> Caracterización ultraestructural de los cardiomiocitos <i>wild-type</i> , PKG-KO-02 y PKP2-KO-01.....	<b>123</b>
<b>Figura 50.</b> Fotografía de microscopía electrónica de cardiomiocito PKP2-KO-01 .....	<b>124</b>
<b>Figura 51.</b> Producto de PCR de la secuencia de PKG lindante al sitio de edición deseada digerido con la enzima BamHI.....	<b>128</b>
<b>Figura 52.</b> Análisis mediante un software online (ICE-Synthego) de la eficiencia de edición. ....	<b>128</b>
<b>Figura 53.</b> Secuenciaciones por Sanger.....	<b>128</b>
<b>Figura 54.</b> Gráfico representativo de los resultados de la secuenciación de amplicones de los pools celulares editados. ....	<b>132</b>
<b>Figura 55.</b> Secuenciaciones por Sanger.....	<b>133</b>
<b>Figura 56.</b> Análisis de bandas G cromosómicas del clon PKP2-SF. ....	<b>134</b>
<b>Figura 57.</b> Análisis de la expresión proteica de PKP2.....	<b>134</b>
<b>Figura 58.</b> Marcación de pluripotencia.....	<b>135</b>
<b>Figura 59.</b> Análisis de la expresión génica en estado pluripotente.....	<b>1136</b>
<b>Figura 60.</b> Análisis de cuerpos embrioides de las líneas <i>Wild-Type</i> , PKP2-SF y PKP2-KO-01 .....	<b>137</b>
<b>Figura 61.</b> Expresión de genes a día 21 de diferenciación no dirigida a cuerpos embrioides.....	<b>137</b>
<b>Figura 62.</b> Cuantificación de células positivas para cTnT. ....	<b>138</b>
<b>Figura 63.</b> Expresión de genes a día 21 de diferenciación cardíaca.....	<b>139</b>
<b>Figura 64.</b> Análisis de la dinámica de expresión génica de PKP2 en la diferenciación cardíaca.....	<b>140</b>
<b>Figura 65.</b> Tinción con Oil Red O posterior a exposición al medio pro-adipogénico. ....	<b>141</b>
<b>Figura 66.</b> Medición de capacidad adipogénica de cardiomiocitos maduros PKP2-KO-01 y PKP2-SF.....	<b>142</b>
<b>Figura 67.</b> Análisis de la contracción de cardiomiocitos utilizando el software CONTRACTIONWAVE.....	<b>143</b>

# Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Secuencia de ARNg y ssODNs para CRISPR/Cas9. ....	<b>59</b>
<b>Tabla 2.</b> Secuencias de los cebadores utilizados para la detección de contaminación por Micoplasma .....	<b>67</b>
<b>Tabla 3.</b> Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR a punto final en sentido 5´-3´. ....	<b>70</b>
<b>Tabla 4.</b> Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa en sentido 5´-3´ .....	<b>72</b>
<b>Tabla 5.</b> Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot.....	<b>74</b>
<b>Tabla 6.</b> Anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot. ....	<b>74</b>
<b>Tabla 7.</b> Anticuerpos primarios utilizados para citometría de flujo.....	<b>75</b>
<b>Tabla 8.</b> Anticuerpos primarios para inmunofluorescencia. ....	<b>78</b>
<b>Tabla 9.</b> Anticuerpos primarios para citometría de flujo e inmunofluorescencia.....	<b>78</b>
<b>Tabla 10.</b> Tabla de concentraciones de ADN total utilizado para transfectar las CMPi.	<b>130</b>
<b>Tabla 11.</b> Tabla de resultados de la secuenciación de amplicones.....	<b>132</b>

# Abreviaturas

AD: aurícula derecha

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADNc: ADN copia

ADNg: ADN genómico

AI: aurícula izquierda

AJs: adherens junctions, uniones adherentes

AO: aorta

ARN: Ácido ribonucleico

ARNg: ARN guía

ARNm: ARN mensajero

ARNseq: secuenciación masiva del ARN

AV: nodo auriculoventricular

CMEh: células madre embrionarias humanas

CMP: células madre pluripotentes

CMPI: células madre pluripotentes inducidas

CNCCs: Cardiac Neural Crest Cells, células de la cresta neural cardíaca

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DA: Displasia Arritmogénica

DI: discos intercalares

EBs: embryoid bodies

ECs: células endoteliales

EPC: epicardio

FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos

FHF: First Heart Field, primer campo cardíaco

FW: forward

GJs: gap junctions, uniones de hendidura

HDR: Homology-directed repair

hs: Horas

KO: Knockout

MCI: masa celular interna

MF: mesodermo faríngeo

min: minutos

mL: mililitro

mM: milimolar



ng: nanogramo  
NGS: next generation sequencing  
NHEJ: unión de extremos no homólogos  
nM: nanomolar  
nt: nucleótidos  
O.P.: Parámetro de orden  
OFT: Outflow Tract, tracto de salida  
OG: Ontología Génica  
PAM: protospacer adjacent motif  
PEO: Proepicardial Organ, órgano proepicárdico  
PV: polos venosos  
RV: reverse  
SA: nodo sinoauricular  
SHF: Second Heart Field, segundo campo cardíaco  
SL: solución de lavado  
SMA: atrofia muscular espinal  
SMCs: células musculares lisas vasculares  
SP: solución permeabilización  
ssODNs: single-stranded oligodeoxynucleotides, oligodesoxirribonucleótidos simple cadena  
TA: temperatura ambiente  
TCP: tubo cardíaco primitivo  
TEM: microscopía electrónica de transmisión  
TGF $\beta$ : factor de crecimiento transformante-beta  
TP: tronco pulmonar  
VCI: vena cava inferior  
VCS: vena cava superior  
VD: ventrículo derecho  
VI: ventrículo izquierdo  
Wnt: integradas de wingless  
*WT: wild-type*  
 $\mu$ g: Microgramo  
 $\mu$ L: Microlitro  
 $\mu$ m: Micrómetro  
 $\mu$ M: Micromolar

# 1. Introducción

En esta tesis doctoral se abordarán los aspectos celulares y moleculares de una enfermedad genética cardíaca mediante un modelo *in vitro*. Para ello, se utilizarán células madre pluripotentes humanas como punto de partida, las cuales serán diferenciadas a cardiomiocitos, permitiendo el estudio detallado de las alteraciones subyacentes en esta patología.

El enfoque de este trabajo se fundamenta en la aplicación de técnicas avanzadas de biología celular y molecular, integrando tecnologías emergentes en el campo de las células madre y la edición génica. En primer lugar, se proporcionará un marco teórico que incluye los conceptos clave necesarios para comprender los fundamentos de la enfermedad estudiada, el papel de las células madre en modelos de enfermedad, los mecanismos de diferenciación celular hacia cardiomiocitos y la metodología de ingeniería genética utilizada. Este apartado teórico servirá como base para contextualizar la hipótesis planteada y justificar los objetivos perseguidos.

## 1.1. Células Madre

Las células madre son células indiferenciadas que poseen dos características fundamentales: la capacidad de autorrenovación (pueden replicarse a sí mismas de manera indefinida) y la capacidad de diferenciación (pueden generar progenie destinada a convertirse en distintos tipos celulares). Estas propiedades son controladas por su entorno o nicho, donde un grupo de células se divide simétricamente para mantener la población indiferenciada, mientras que otro grupo da lugar a descendientes que se especificarán [1].

El proceso de diferenciación implica que las células madre experimentan cambios fenotípicos bajo la influencia de estímulos específicos y su especialización para cumplir una función determinada dentro del organismo. Una forma de clasificar las células madre será

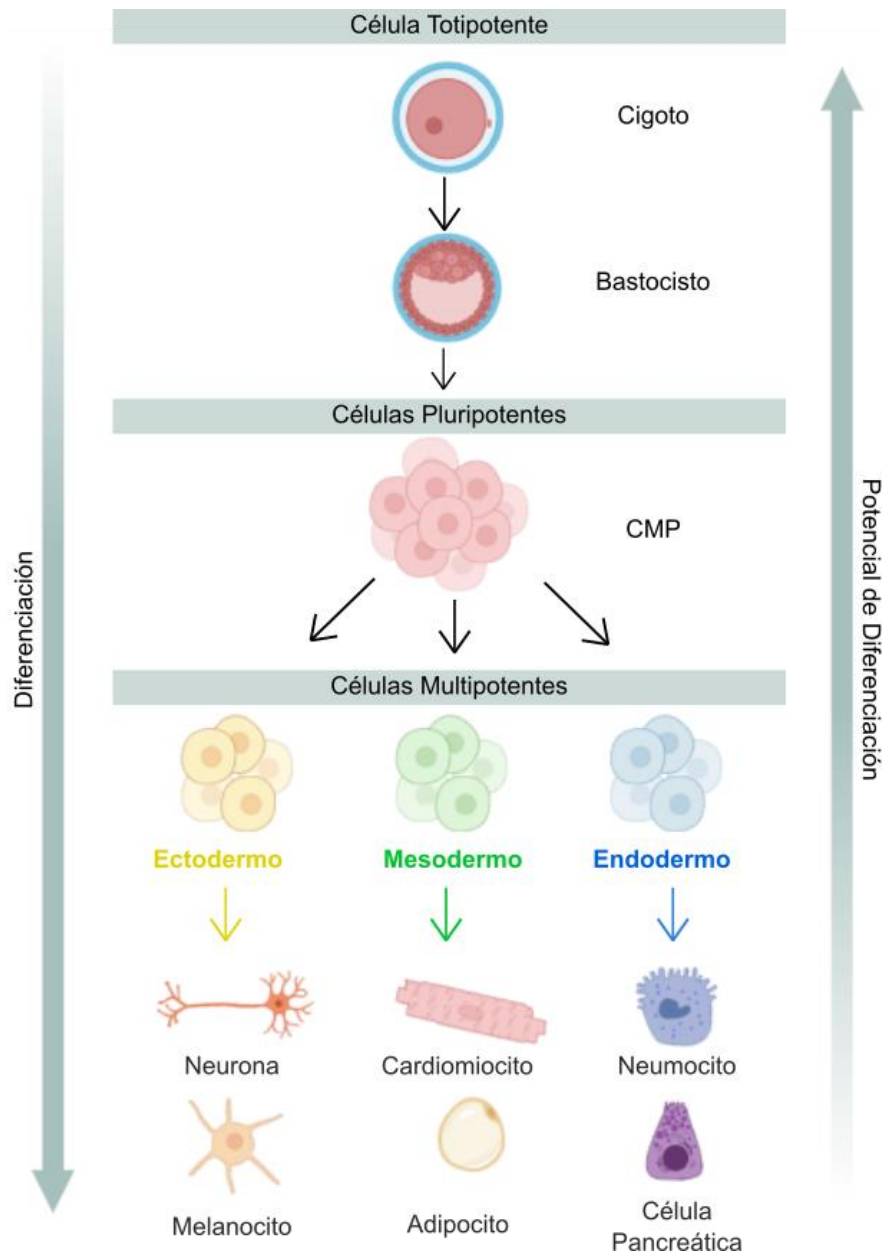
dada por el potencial que tienen para diferenciarse en diversas poblaciones de células, encontrando dentro de ellas a las células madre totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes (Figura 1) [2].

- Células totipotentes: Como el cigoto, son capaces de generar tanto tejidos embrionarios como extraembrionarios, lo que las convierte en las células con el mayor potencial de diferenciación.

- Células madre pluripotentes: Estas células pueden diferenciarse en los tres linajes embrionarios (ectodermo, mesodermo y endodermo), y, por lo tanto, pueden generar todos los tipos de células presentes en un organismo adulto. Sin embargo, no pueden formar tejidos extraembrionarios como la placenta.

- Células madre multipotentes: Tienen un potencial de diferenciación más limitado y sólo pueden generar tipos de células específicas dentro de un solo linaje embrionario. Se encuentran en varios órganos y tejidos del organismo adulto, donde participan en la regeneración y reparación de tejidos, manteniendo la integridad y función de los órganos a lo largo de la vida.

- Células unipotentes: Estas células tienen la capacidad de dar origen únicamente a un tipo de célula especializada, aunque mantienen la habilidad de dividirse y autorrenovarse.



**Figura 1. Esquema con tipos de células madre y su potencial de diferenciación.** Las células madre pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse a células de las tres capas germinales.

En los últimos años, el estudio de las células madre pluripotentes y sus procesos de diferenciación han proporcionado también avances significativos en el estudio del desarrollo embrionario humano. Esto se logró luego de que las células madre pluripotentes hayan podido ser aisladas y mantenidas *in vitro* donde pueden ser propagadas indefinidamente y diferenciadas a células de tejidos específicos. Por otro lado, la medicina regenerativa utilizando células madre se ha propuesto como una alternativa para la reparación de tejidos y

órganos dañados como consecuencia de enfermedades o injurias. Además de su potencial en terapias regenerativas, se han podido utilizar para el modelado *in vitro* de enfermedades.

La combinación de estas células con tecnologías emergentes como la edición genética ha hecho que las investigaciones basadas en células madre pluripotentes sean cada vez más prometedoras y ofrezcan un gran potencial en diversas áreas, desde la medicina regenerativa hasta la investigación de enfermedades. Es por eso que en esta tesis nos centraremos en el uso de células madre pluripotentes.

### 1.1.1. Células Madre Pluripotentes

Luego de la fecundación, se forma el cigoto, el cual comienza a dividirse para dar origen a un embrión multicelular. Tras alcanzar el estadio de 16 células, conocido como mórula, el embrión progresa hacia el estadio de blastocisto, que está compuesto por dos estructuras principales: la masa celular interna (MCI) y el trofoblasto, una capa externa de células que se desarrollará en los tejidos extraembrionarios, como la placenta. En este contexto, las células de la MCI poseen el potencial de convertirse en cualquier tipo celular del organismo, pero no en tejidos extraembrionarios, lo que las clasifica como células pluripotentes [3].

La pluripotencia de las células madre está regulada por dos mecanismos clave: el mantenimiento de su capacidad de autorrenovación y la inhibición de la diferenciación hacia cualquier otro tipo celular. Dentro de la MCI, se establece un circuito de regulación genética, donde factores de transcripción esenciales como OCT3/4, SOX2 y NANOG desempeñan un papel crucial en la promoción de la pluripotencia. Estos factores permiten que las células pluripotentes se mantengan en un estado indiferenciado [4].

En 1998 James Thomson y sus colaboradores lograron aislar, cultivar y propagar células derivadas de la MCI obteniendo así las primeras células madre pluripotentes embrionarias humanas (CMEh). Estas CMEh se convirtieron en una herramienta clave en la investigación del desarrollo embrionario y la medicina regenerativa [5]. Sin embargo, el origen de estas

células conlleva controversias éticas, al derivar de embriones humanos, que limitan su utilización.

La investigación en células madre y la búsqueda de alternativas a las CMEh llevó a un avance revolucionario en 2006, cuando Shinya Yamanaka y su equipo lograron reprogramar células somáticas adultas a un estado pluripotente mediante la expresión exógena de cuatro factores de transcripción: OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC [6]. Este proceso, denominado reprogramación celular, consiste en la desdiferenciación de células somáticas adultas, como fibroblastos, para generar CMP denominadas CMP inducidas (CMPi). Las CMPi presentan características fenotípicas similares a las CMEh, incluyendo su capacidad de autorrenovación y diferenciación, lo que las ha convertido en una valiosa herramienta para la investigación y el modelado de enfermedades *in vitro* [7].

Esta tecnología ha permitido obtener cultivos de CMPi portadoras de mutaciones genéticas que causan enfermedad para modelar la patología *in vitro*, lo que permite estudiar los mecanismos subyacentes de la misma, descubrir nuevos fármacos y desarrollar terapias regenerativas innovadoras. Así fue como se abrieron nuevas posibilidades en la medicina personalizada, ofreciendo un enfoque prometedor para el tratamiento de enfermedades genéticas y degenerativas.

### 1.1.2. Diferenciación de las células madre pluripotentes

Las CMP tienen la capacidad única de diferenciarse en los tres linajes embrionarios principales: ectodermo, mesodermo y endodermo (Figura 1). Cada uno de estos linajes da origen a diferentes tipos de tejidos y órganos en el cuerpo humano. Las CMP pueden ser utilizadas como modelo para estudiar los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo embrionario o como fuente de células diferenciadas de difícil obtención a partir de muestras biológicas, tales como los cardiomiocitos. Para ello es necesario diferenciar *in vitro* estas células al linaje celular de estudio. Para conseguir la diferenciación de las CMP se busca

recapitular lo que ocurre durante el desarrollo y recrear las señales que reciben las células y las conducen hacia linajes celulares específicos.

Los protocolos de diferenciación se basan en tres estrategias. El primero, cultivar las células en agregados celulares, conocidos como cuerpos embrioides o EBs (del inglés Embryoid Bodies); la segunda implica el co-cultivo de las células pluripotentes con células estromales murinas; la tercera consiste en la diferenciación de las células crecidas en adhesión sobre proteínas de la matriz extracelular [8].

El proceso de diferenciación de las CMP hacia estos linajes embrionarios está regulado por una red compleja de señales moleculares y factores de transcripción. Dependiendo de las señales específicas que reciban, las CMP activan diferentes rutas de señalización, lo que les permite adoptar identidades específicas y desarrollar los tipos celulares necesarios para cada tejido.

Las CMP, luego de diferenciarse en una primera instancia a sus precursores de la capa germinal correspondiente, pueden ser diferenciadas a células adultas. Existen diferentes protocolos para guiar la diferenciación de las CMP hacia diferentes linajes. Puntualmente, los estudios de la diferenciación de CMP a cardiomiocitos han aportado gran parte del conocimiento que se tiene hoy en día acerca del desarrollo cardíaco humano [9]

## 1.2. Desarrollo Cardíaco Humano

Para comprender los mecanismos involucrados de la diferenciación de las CMP a cardiomiocitos es importante primero describir y entender lo que sucede en el desarrollo del corazón humano. El desarrollo del corazón humano es un proceso sumamente complejo y orquestado de manera precisa, regulado por muchos genes y cascadas de señalización que controlan los cambios genéticos y morfológicos, que comienza en las primeras etapas del desarrollo embrionario y continúa hasta la formación de un órgano funcional capaz de bombear sangre por todo el cuerpo. El sistema circulatorio es el primer sistema en adquirir funcionalidad durante el desarrollo embrionario, lo que refleja su función vital en el suministro

de oxígeno y nutrientes a los diversos tejidos del organismo, tanto durante el desarrollo como a lo largo de la vida [10].

El proceso de cardiogénesis inicia poco después de la gastrulación, cuando las células del mesodermo se diferencian para formar el campo cardiogénico primario, donde surgirán las primeras estructuras cardíacas. El embrión humano de 21 días ya presenta dos tubos cardíacos en las hojas viscerales de la placa cardiogénica, uno a cada lado. Los cardiomiocitos que forman estos tubos comienzan a contraerse durante la tercera semana del desarrollo, luego de que se conectan los primeros vasos sanguíneos. Posteriormente los tubos se fusionan en una sola estructura central. El tubo cardíaco central sufrirá luego una serie de plegamientos y rotaciones hasta adquirir la forma del órgano adulto (Figura 2) [11, p. 3], [12]. Los primeros latidos del corazón se deben a la presencia de cardiomiocitos, los cuales están coordinados para contraerse en conjunto con el fin de bombear sangre y nutrientes alrededor del embrión en desarrollo. El papel crucial de los cardiomiocitos en garantizar el correcto funcionamiento del corazón que se mantiene a lo largo de toda la vida [13].

La importancia de estudiar el desarrollo cardíaco humano radica en la alta prevalencia de las enfermedades del corazón, siendo las cardiopatías congénitas los defectos hereditarios más comunes a nivel mundial [14]. Comprender en mayor profundidad los mecanismos subyacentes al desarrollo de estas patologías es fundamental, ya que permite no solo identificar factores de riesgo y posibles causas genéticas, sino también avanzar en la creación de estrategias preventivas y terapéuticas más efectivas. Ampliar este conocimiento es esencial para desarrollar nuevas tecnologías y enfoques de tratamiento que puedan reducir significativamente la carga de estas enfermedades y mejorar la calidad de vida de los pacientes.



### 1.2.1. Estructura del corazón

La formación del corazón en los mamíferos está regulada por la interacción entre las principales vías de señalización del desarrollo, un conjunto cada vez más específico de factores de transcripción cardíacos, así como otros reguladores transcripcionales. El corazón de cuatro cámaras está compuesto por las aurículas izquierda y derecha, los ventrículos izquierdo y derecho (los componentes miocárdicos), el epicardio (la capa epitelial externa del corazón) y el endocardio (la capa endotelial interna del corazón). Los principales tipos celulares del corazón incluyen los cardiomiocitos, las células de conducción cardíaca, los fibroblastos cardíacos, las células musculares lisas vasculares (predominantemente dentro del miocardio) y las células endoteliales (predominantemente dentro del miocardio y del endocardio). El linaje de cardiomiocitos está altamente especializado, consistiendo en varios subtipos definidos tanto por su ubicación como por su función [13].

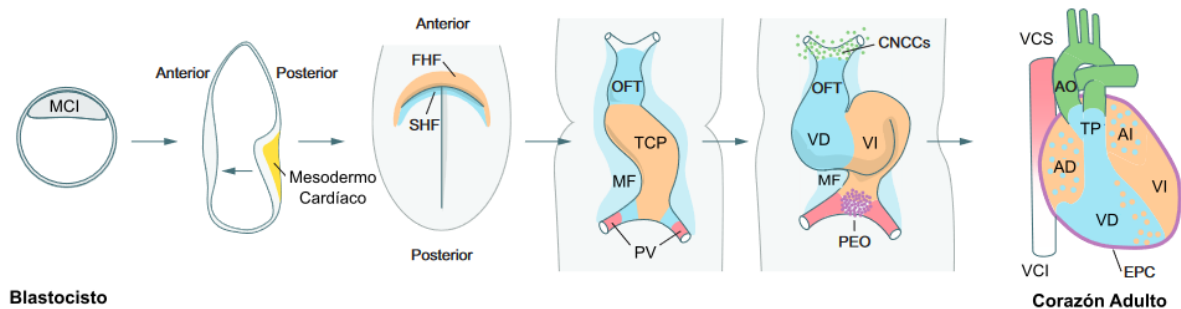
### 1.2.2. Mesodermo cardíaco

La mayoría de las líneas celulares cardíacas surgen del mesodermo, una de las tres capas germinales diferenciadas a partir de la masa celular interna tras la gastrulación [15], [16]. La inducción de la formación del mesodermo y su posterior especificación en mesodermo cardíaco y poblaciones distintas de células progenitoras cardíacas está controlada principalmente por tres familias de moléculas de señalización extracelular: las integradas de wingless (Wnt), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y los ligandos de la superfamilia del factor de crecimiento transformante-beta ( $TGF\beta$ ), que incluyen Wnt3a, la proteína morfogenética ósea 4 (BMP4), Nodal y activina A. Estos ligandos forman gradientes que, según el contexto espacio-temporal, activan o inhiben las señales en las células subyacentes, especificando el campo cardíaco mediante eventos transcripcionales que activan factores específicos del corazón en células mesodérmicas definidas [16].

El desarrollo cardíaco implica múltiples reservas de progenitores, principalmente derivadas de células mesodérmicas (*Mesp1*)<sup>+</sup>, incluyendo el primer campo cardíaco (FHF, por sus siglas en inglés *First Heart Field*) y el segundo campo cardíaco (SHF, *Second Heart Field*). El FHF inicia la formación del corazón, formando una estructura en forma de media luna que se convierte en el tubo cardíaco primitivo, el cual comienza a contraerse para bombear sangre y nutrientes. El SHF, ubicado posteriormente al FHF, migra hacia el tubo cardíaco para apoyar su crecimiento, contribuyendo al ventrículo derecho, partes de las aurículas y el tracto de salida (OFT, del inglés *Outflow Tract*) [17].

La señalización Wnt/ $\beta$ -catenina es crucial en las primeras etapas del desarrollo cardíaco, con su activación apoyando la formación de la línea primitiva y el mesodermo, mientras que su inhibición permite la especificación de los progenitores cardíacos. En etapas posteriores, la señalización activa de Wnt regula la expansión de los progenitores del SHF. Otras vías, incluyendo FGF, BMP, Hedgehog, Notch y Wnt no canónica, también modulan el desarrollo y diferenciación de los progenitores cardíacos [18], [19], [20].

Otros contribuyentes incluyen el órgano proepicárdico (PEO, del inglés *Proepicardial Organ*) y las células de la cresta neural cardíaca (CNCCs, del inglés *Cardiac Neural Crest Cells*). El PEO se desarrolla cerca del polo venoso del tubo cardíaco y contribuye al revestimiento externo del corazón, mientras que las CNCCs migran desde el tubo neural para contribuir a la inervación parasimpática, la formación de válvulas y el modelado y tabicación del OFT. En conjunto, estas fuentes de progenitores establecen los distintos compartimentos y la funcionalidad del corazón adulto [21], [22] (Figura 2).



**Figura 2. Desarrollo cardíaco en el embrión de ratón como modelo de mamífero.** El desarrollo cardíaco comienza en la gastrulación con la especificación de los progenitores cardíacos en el mesodermo lateral. El mesodermo cardíaco migra anteriormente y forma el campo cardiogénico. Los progenitores cardíacos migran hacia la línea media donde forman un tubo cardíaco lineal. En este momento, las células comienzan a contraerse. El tubo cardíaco sufre una torsión y rotación acompañada de proliferación de las células y adquiere asimetría en el eje derecha-izquierda. Mediante el correcto tabicamiento, el tubo cardíaco desarrolla las cuatro cámaras. MCI: masa celular interna, MF: mesodermo faríngeo, TCP: tubo cardíaco primitivo, PV: polos venosos, VD: ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo, AD: aurícula derecha, AI: aurícula izquierda, TP: tronco pulmonar, AO: aorta, VCS: vena cava superior, VCI: vena cava inferior, EPC: epicardio (Adaptado de [13]).

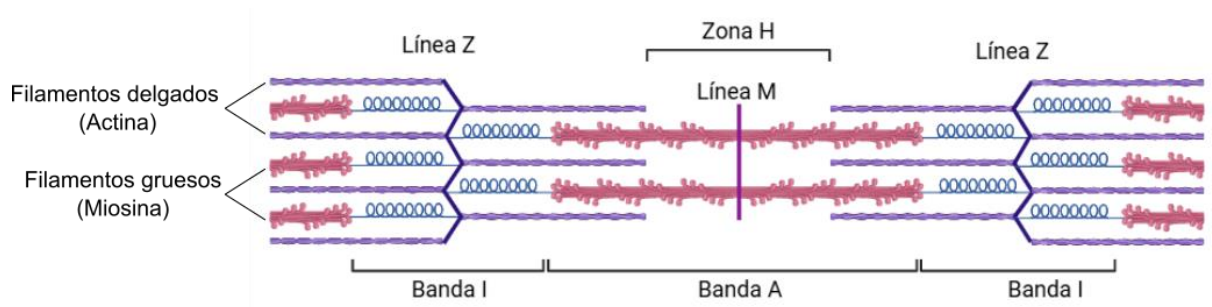
### 1.2.3. Estructura del Tejido Muscular Cardíaco

El músculo cardíaco está formado principalmente por cardiomiocitos. Estas células son rectangulares y ramificadas que típicamente contienen un solo núcleo ubicado en el centro, pero en algunas células es posible encontrar dos o más núcleos. Los cardiomiocitos poseen muchas mitocondrias para producir grandes cantidades de trifosfato de adenosina y mioglobina para almacenar oxígeno y satisfacer las demandas de la contracción muscular.

El sarcómero es la unidad básica de contracción en los cardiomiocitos. La organización de los filamentos gruesos y delgados se superponen dentro del sarcómero de la célula produciendo una apariencia estriada cuando se observa al microscopio. Esta característica visual consiste en bandas A gruesas y oscuras (que se corresponden con la superposición de los filamentos de actina y miosina) con una zona H relativamente clara en el centro y bandas I más claras (que corresponden sólo a los filamentos de actina) con una línea Z central oscura que conecta los filamentos de actina. La titina conecta la línea Z con la línea M y contribuye a las propiedades elásticas y a la producción de fuerza del sarcómero a través de su región extensible en la banda I. El acortamiento coordinado del sarcómero produce la contracción del cardiomiocito. A la membrana plasmática de las células musculares estriadas se le llama

sarcolema, la cual, en mamíferos, se invagina para formar los túbulos transversales, con un diámetro de unos 5 a 20 nm (Figura 3).

Los cardiomiocitos adyacentes están unidos en sus extremos por discos intercalares (DI). Dentro del disco intercalar, hay tres tipos diferentes de uniones celulares: uniones adherentes (“*Adherens Junctions*”, AJs), desmosomas y uniones de hendidura (“*Gap Junctions*”, GJs). El lado transversal de los discos intercalados corre perpendicular a las fibras musculares en las líneas Z y proporciona un componente estructural a través de las conexiones de AJs y desmosomas. El lado lateral de los discos contiene GJs que permiten la comunicación intercelular al facilitar el paso de iones de un cardiomiocito a una célula vecina sin tener que ser excretados primero en el espacio extracelular. La baja resistencia de las GJs permite que la despolarización se propague rápidamente a través del sincitio, lo que facilita la transmisión rápida de potenciales de acción para producir una contracción sincronizada de los cardiomiocitos al unísono [23].



**Figura 3. Anatomía del sarcómero cardíaco.** Diagrama de la organización básica del sarcómero.

#### 1.2.3.1. Tipos celulares en el tejido cardíaco:

- Los cardiomiocitos son las principales células contráctiles responsables de bombear sangre por todo el cuerpo. Se caracterizan por su apariencia estriada y están conectados de manera estrecha mediante discos intercalados, que permiten la contracción sincronizada
- Las células marcapasos y de conducción, ubicadas en estructuras como el nodo sinoauricular (SA) y el nodo auriculoventricular (AV), generan y propagan impulsos eléctricos que establecen y mantienen el ritmo cardíaco. Estas células aseguran que el corazón lata de manera coordinada y rítmica, permitiendo un flujo sanguíneo eficiente.

- Las células musculares lisas vasculares (SMCs) se encuentran en las paredes de las arterias y venas coronarias, donde controlan el diámetro de los vasos sanguíneos y regulan la presión y el flujo sanguíneo dentro del sistema circulatorio propio del corazón. A través de su contracción y relajación, contribuyen al tono vascular y ayudan a mantener un suministro sanguíneo estable a los tejidos cardíacos.

- Las células endoteliales (ECs) recubren la superficie interior de los vasos sanguíneos y las cámaras del corazón, formando una barrera entre la sangre y los tejidos cardíacos. Desempeñan un papel fundamental en el control del paso de materiales, en el mantenimiento de la fluidez sanguínea y en la regulación del tono vascular. Además, las células endoteliales liberan factores que facilitan la dilatación y contracción de los vasos, contribuyendo a la homeostasis cardiovascular y protegiendo al corazón de la inflamación y el daño.

#### 1.2.4. Discos Intercalares

En la presente tesis le daremos especial atención a la estructura y función de los discos intercalares. El DI cardíaco es una estructura altamente especializada y regulada que conecta a los cardiomiocitos adyacentes en el corazón. El DI desempeña un papel crucial en el funcionamiento del corazón, ya que facilita la comunicación y proporciona estabilidad mecánica entre los cardiomiocitos. Proporcionan la resistencia estructural necesaria para que los cardiomiocitos soporten el intenso estrés mecánico generado por cada latido del corazón y no se separen. Además, los DI desempeñan un papel fundamental al permitir la rápida propagación de señales eléctricas, asegurando que las células musculares del corazón se contraigan de manera sincronizada. Esta conectividad eléctrica es crucial para mantener el bombeo rítmico y eficiente de sangre (Figura 4) [24].

Cualquier alteración en la estructura o función de los DI puede provocar problemas cardíacos. Tal es el caso de mutaciones en las proteínas que forman los desmosomas que están asociadas a conexiones celulares debilitadas y pueden causar arritmias o insuficiencia cardíaca. Además, las uniones de hendidura deterioradas pueden provocar contracciones desincronizadas, aumentando el riesgo de arritmias [25].

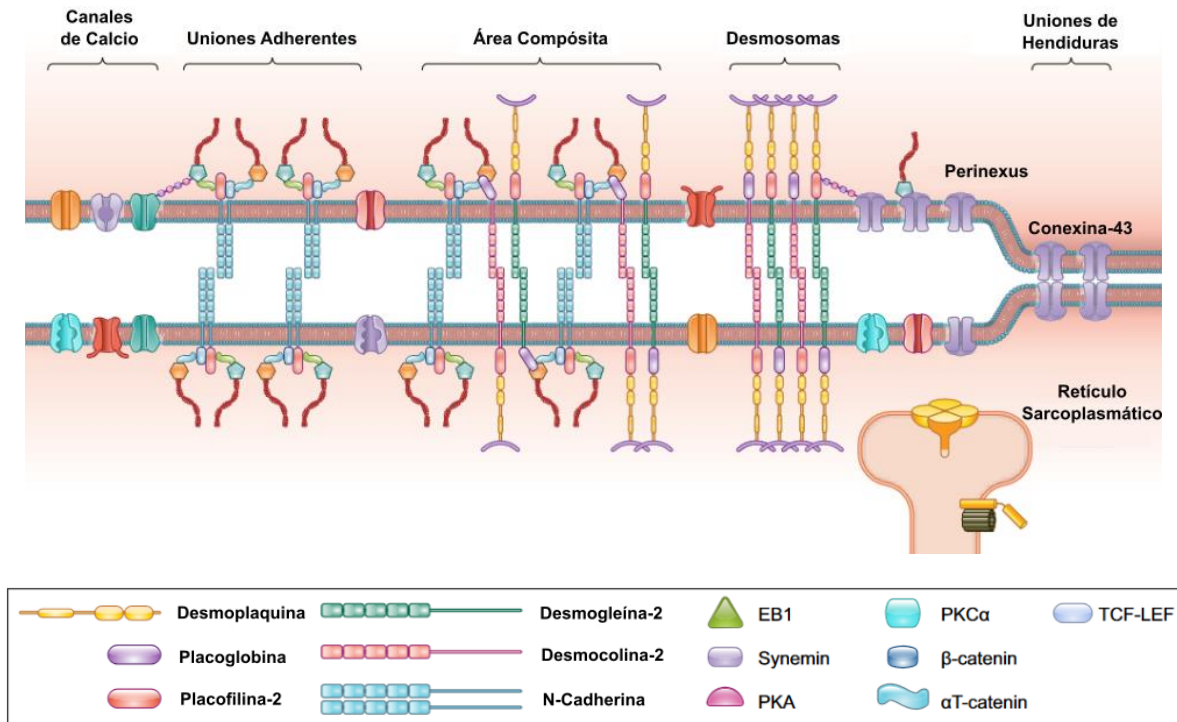
#### 1.2.4.1. Estructura y Componentes de los Discos Intercalares

✦ Desmosomas: El desmosoma es un anclaje celular robusto, denso y simétrico que proporciona soporte estructural a los cardiomiocitos y a otros tejidos sometidos a fuertes fuerzas mecánicas, como los epitelios. Aunque las uniones adherentes también transmiten fuerzas al citoesqueleto, los desmosomas son más resistentes gracias a su conexión con los filamentos intermedios de desmina (DES), que son mecánicamente resilientes. Esta estructura está compuesta por 5 proteínas desmosomales: Placoglobina (PKG o JUP), Placofilina 2 (PKP2), Desmoplaquina (DSP), Desmocolina 2 (DSC2) y Desmogleína 2 (DSG2). El estado de hiperadhesión de los desmosomas, cuando las proteínas DSC2 y DSG2 están unidas, depende de la presencia de iones de calcio. Además, las proteínas desmosomales pueden participar en vías de señalización, influyendo en la expresión de genes relacionados con la proliferación y diferenciación celular, la morfogénesis tisular y la cicatrización de heridas [26].

✦ Uniones adherentes (AJs): Las AJs son el anclaje principal de las miofibrillas y conecta los filamentos de actina de células adyacentes, lo que permite que las células mantengan su forma bajo estrés mecánico. La proteína transmembrana N-cadherina (CDH2 o N-Cadh) es el principal componente de las AJs. Esta se homodimeriza con otras N-Cadh de células adyacentes en el espacio extracelular, formando una especie de "cremallera" intercelular. Este mecanismo proporciona especificidad tisular durante el desarrollo, permitiendo que las células interactúen únicamente con otras que expresan la misma cadherina [24], [27].

✦ Uniones de hendidura (GJs): Las GJs son una aglomeración de múltiples canales individuales de unión de hendidura asociados con proteínas. Estas permiten el acoplamiento electrometabólico, facilitando la propagación de potenciales de acción y el paso de pequeños solutos entre células. En general, las GJs están compuestas por doce moléculas de conexina: seis moléculas forman un conexón en la membrana

y se conectan con un conexón de la membrana opuesta. En los cardiomiocitos ventriculares, la conexina 43 (Cx43) es la más prevalente [24].



**Figura 4. Esquema de la estructura y composición de los DI cardíacos.** El DI alberga complejos moleculares necesarios tanto para la adhesión intercelular como para la sincronización eléctrica eficiente del corazón. Las moléculas clásicamente identificadas como pertenecientes a un complejo en particular (por ejemplo, las uniones gap o los desmosomas) pueden interactuar y regular otros componentes, de manera que, en lugar de ser una suma de conglomerados moleculares separados e independientes, el disco intercalar constituye una única unidad funcional (un “conexoma”). [Adaptado de [28]].

### 1.3. Diferenciación cardíaca de CMP *in vitro*

Una vez comprendidas las vías de señalización y los procesos involucrados en el desarrollo del corazón describiremos cómo podemos obtener cardiomiocitos funcionales a partir de la diferenciación de CMPs.

Las CMPs, tanto embrionarias como inducidas, pueden ser dirigidas *in vitro* para convertirse en cardiomiocitos a través de un proceso que replica los eventos clave de la cardiogénesis *in vivo*, basados en el conocimiento adquirido sobre las señales biológicas necesarias para el desarrollo cardíaco.

El protocolo utilizado en nuestro laboratorio fue desarrollado por Lian y colaboradores en 2013 y se basa en el rol bifásico de la vía de Wnt (Figura 5) [29], [30]. En el mismo, el proceso de diferenciación es guiado mediante la exposición de las CMP a una combinación de factores de crecimiento y señales moleculares que imitan el desarrollo cardíaco embrionario mediante un proceso secuencial:

- **Inducción mesodérmica:** El primer paso es guiar a las CMP hacia el linaje mesodérmico, del cual derivan las células cardíacas. Durante las primeras 24 horas se activa la vía de señalización de Wnt en estas células. Esta activación está dada por ligandos canónicos, como WNT3 y WNT8, que inhiben a la quinasa GSK3b. En consecuencia, b-catenina no es degradada en el citoplasma y puede translocar al núcleo celular donde actúa como factor de transcripción junto al complejo TCF/LEF. Dentro del núcleo este complejo activa un gran número de genes, como TBXT, EOMES y MIXL1. En el protocolo de diferenciación *in vitro* se reemplaza los ligandos canónicos de Wnt por el inhibidor de GSK3b, CHIR99021.

- **Formación de progenitores cardíacos:** Una vez que las células han adoptado una identidad mesodérmica, se promueve la aparición de progenitores cardíacos a través de la inhibición de la señalización de Wnt. Esta inhibición se da en el tercer día de diferenciación, cuando las células son tratadas con el inhibidor de Wnt, IWP2. En esta fase, factores de transcripción como NKX2-5 y ISL1 son expresados y marcan la especificación hacia el linaje cardíaco.

- **Diferenciación a cardiomiocitos:** A medida que las células progenitoras cardíacas maduran, se diferencian en cardiomiocitos funcionales. Entre los días 7 y 10 aparecen zonas con actividad contráctil espontánea. A lo largo de este proceso, las células comienzan a



expresar marcadores específicos de cardiomiocitos como troponina T cardíaca (TNNT2 o cTnT) y alfa-actinina.

- **Purificación de los cardiomiocitos:** La diferenciación cardíaca *in vitro* genera múltiples derivados cardíacos, incluyendo fibroblastos, células endoteliales, músculo liso, endocardio y epicardio, así como también diferentes subtipos de células miocárdicas correspondientes a cardiomiocitos auriculares, ventriculares y del sistema de conducción. Con el propósito de purificar los cardiomiocitos del cultivo, se han desarrollado métodos para aislar los precursores cardíacos y eliminar los otros tipos celulares no deseados. La estrategia está basada en las características metabólicas de los cardiomiocitos, los cuales tienen la capacidad de utilizar diferentes fuentes de energía, como la glucosa, los ácidos grasos y el lactato. Aprovechando esta ventaja metabólica, se logra enriquecer el cultivo con más del 90% de cardiomiocitos en el día 21 del protocolo al cultivar las células en un medio sin glucosa y rico en lactato.

- **Maduración de los cardiomiocitos:** Los cardiomiocitos que se obtienen a día 21 de diferenciación serían equivalentes a los cardiomiocitos fetales en sus características estructurales y funcionales. Con el objetivo de alcanzar cardiomiocitos más maduros en el desarrollo (sin llegar aún a un cardiomiocito adulto), recientemente en el laboratorio se adaptó un protocolo de maduración publicado para maduración de cardiomiocitos en estructuras 3D para nuestro modelo, que utiliza la estrategia de diferenciación en 2D. Para lograrlo, se altera el metabolismo celular de los cardiomiocitos de día 21 utilizando medios de cultivo con altos niveles de ácidos grasos, la fuente principal de energía en el corazón adulto, induciendo un cambio en el metabolismo energético desde la glucólisis hacia la oxidación de ácidos grasos [31], [32].



**Figura 5. Protocolo de diferenciación cardíaca *in vitro* en monocapa.** Representación esquemática del proceso de diferenciación de CMP hacia el linaje mesodérmico y cardíaco. El tiempo se encuentra representado en días. Por debajo, se especificaron los medios de cultivo y por encima las poblaciones que se obtienen progresivamente.

Los cardiomiocitos derivados de CMP exhiben muchas de las características funcionales de los cardiomiocitos *in vivo*, incluyendo la capacidad de generar contracciones rítmicas espontáneas, la expresión de proteínas contráctiles como la miosina y la formación de estructuras organizadas como los sarcómeros, esenciales para la contracción muscular.

Estos cardiomiocitos *in vitro* también muestran respuestas electrofisiológicas a estímulos, lo que los convierte en modelos útiles para estudiar el comportamiento eléctrico del corazón, la investigación de arritmias y el cribado de fármacos. Sin embargo, a pesar de estos avances, los cardiomiocitos obtenidos *in vitro* suelen ser más inmaduros en comparación con los cardiomiocitos adultos, por lo que se están investigando nuevas estrategias para mejorar la maduración celular y así poder utilizarlos por ejemplo en su integración en tejidos cardíacos dañados.

## 1.4. Modelado *in vitro* de enfermedades cardíacas

En los últimos años, se han desarrollado nuevas aplicaciones con las CMPi de manera exitosa. Una de ellas es el modelado *in vitro* de enfermedades genéticas, diferenciando CMPi

obtenidas de pacientes que posean la mutación responsable de la patogénesis, para estudiar el rol que tiene la variante génica en el progreso de la enfermedad y poder desarrollar tratamientos eficientes y personalizados. Ejemplos de estos casos son el estudio de la atrofia muscular espinal (de las siglas en inglés SMA) y el estudio del síndrome del QT largo [33]. Otra aplicación de las CMPi, es el *screening* y evaluación de compuestos químicos de interés farmacológico en células de tejidos específicos y analizar sus efectos. Un ejemplo de esto es el uso de cardiomiocitos derivados de CMPi para el testeo de fármacos pre-clínicos para cardiopatías y el análisis de efectos no deseados como arritmias cardíacas [34].

En la presente tesis utilizaremos las CMP y su diferenciación a cardiomiocitos para estudiar una cardiopatía genética denominada Displasia Arritmogénica. Hasta la fecha se han realizado pocos trabajos en los que se pudo modelar esta enfermedad utilizando CMPi generadas a partir de pacientes con mutaciones en el gen de *PKP2* [35], [36], [37], habiendo encontrado algunas drogas que revierten los fenotipos alterados como el inhibidor de GSK-3 $\beta$ .

Además de diferenciar CMP derivadas de pacientes para modelar enfermedades genéticas *in vitro*, es posible generar mutaciones patológicas en líneas de CMP mediante edición génica. En el caso particular de la displasia arritmogénica, las mutaciones patológicas reportadas suman decenas y no es posible abordarlas a todas con células de pacientes para ensayar diferentes tratamientos *in vitro*. La posibilidad de generar las mutaciones patogénicas de manera dirigida tiene varias ventajas como son la no necesidad de contar con muestras de pacientes y la posibilidad de generar varias líneas de CMP con diferentes mutaciones para estudiar más ampliamente patologías específicas. De esta manera, la disponibilidad de variantes genotípicas nos permitirá una descripción mayor de los efectos fenotípicos y de las posibles intervenciones terapéuticas. Esta va a ser particularmente la estrategia elegida para estudiar dicha patología en la presente tesis. Para lograrlo es necesario aplicar herramientas de edición génica como CRISPR/Cas9 que se explicará a continuación.

### 1.4.1. CRISPR/Cas9 como herramienta de edición génica

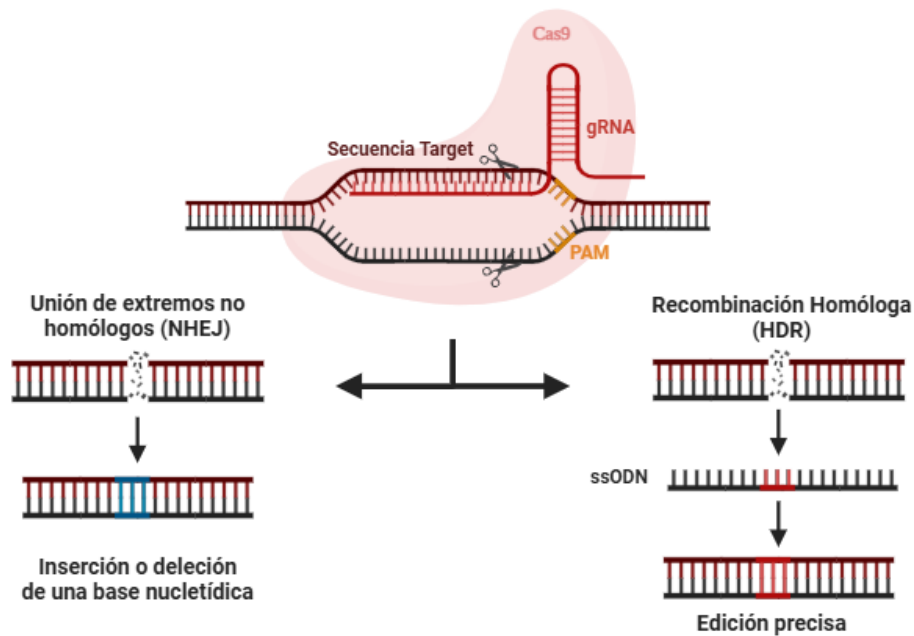
CRISPR/Cas9 es una de las herramientas más revolucionarias en el campo de la biología molecular, permitiendo una edición genética precisa, eficiente y versátil. El sistema CRISPR (acrónimo de "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats") y su enzima asociada Cas9, fue descubierto inicialmente como un mecanismo de defensa bacteriana contra virus, pero rápidamente fue adaptado para su uso en biotecnología y su potencial como herramienta de edición genética. Este sistema consta de dos componentes principales: la proteína Cas9, una nucleasa que corta el ADN, y una guía de ARN (ARNg) que dirige a Cas9 hacia la secuencia específica del genoma que se desea modificar [38].

#### 1.4.1.1. Mecanismo de acción

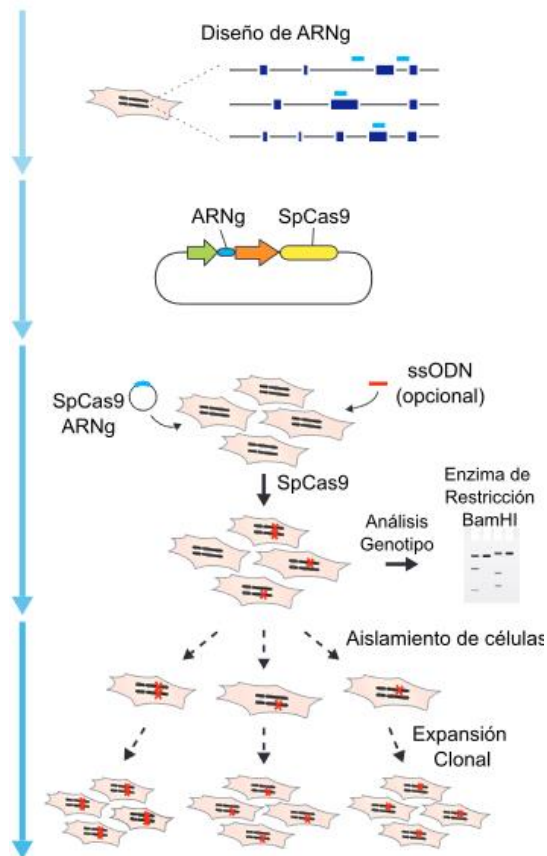
Su funcionamiento se basa en un ARNg, diseñado específicamente para complementar una secuencia blanco en el genoma, que se une a la enzima Cas9 dirigiendo y reconociendo la secuencia específica de ADN. Una vez allí, Cas9 actúa como unas "tijeras moleculares", cortando el ADN en el sitio objetivo, generando una ruptura de doble hebra. Este evento desencadena mecanismos de reparación del ADN intrínsecos de las células, que en algunos casos es exacto y en otros comete errores generando inserciones o deleciones (indels) como consecuencia.

Existen dos principales rutas de reparación del ADN tras el corte mediado por Cas9: la unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) y la recombinación homóloga (HDR, por sus siglas en inglés). El NHEJ es una reparación propensa a errores que suele introducir *indels*, lo que puede generar mutaciones de pérdida de función en el gen objetivo como consecuencia de la aparición de un codón de stop prematuro o un cambio en el marco de lectura. Por otro lado, la HDR permite la inserción, deleción o reemplazo precisa de secuencias de ADN, utilizando un molde de reparación homólogo a la zona a editar proporcionado externamente que contiene el cambio que se desea introducir (Figura 6). Esta capacidad de inducir tanto mutaciones puntuales como inserciones dirigidas convierte a

CRISPR/Cas9 es una herramienta extremadamente versátil para la investigación genética ya que se pueden incluir o corregir mutaciones patogénicas en genes específicos (Figura 7).



**Figura 6. Rutas de reparación del ADN tras la ruptura doble cadena mediada por la Cas9.** La reparación del daño genómico mediante NHEJ puede causar pequeños indels alterando el marco de lectura creando codones stop prematuros. Por otro lado, el daño puede ser reparado por HDR cuando existe otra molécula de ADN como molde para reparar el corte (Imagen creada con BioRender).



**Figura 7. Representación esquemática del flujo de trabajo para la generación de líneas celulares genéticamente modificadas con CRISPR/Cas9.** El plásmido utilizado para expresar Cas9 y el ARNg incluye un casete de resistencia a puomicina, lo que facilita la selección de células transfectadas y aumenta la probabilidad de aislar células con la edición deseada. Gracias a la autorrenovación de las CMPi, es posible generar clones genéticamente homogéneos, útiles para evaluar la función génica en diversos contextos. Esquema adaptado de [38].

#### 1.4.1.2. Ventajas y desafíos de CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 ofrece varias ventajas sobre otras técnicas de edición génica utilizadas anteriormente, como la capacidad de editar múltiples genes simultáneamente, la relativa simplicidad en el diseño de ARNg, sumado al bajo costo y la alta eficiencia en una amplia gama de organismos.

No obstante, CRISPR/Cas9 también presenta desafíos. Uno de los principales es el riesgo de "*off-target effects*", es decir, cortes accidentales en secuencias del genoma que son similares, pero no idénticas, a la secuencia objetivo. Estos efectos fuera de objetivo pueden resultar en mutaciones no deseadas, lo que es especialmente preocupante en aplicaciones clínicas. Además, la eficiencia de la reparación por HDR sigue siendo baja en muchos tipos celulares, lo que limita la capacidad de realizar ediciones precisas. A pesar de estos desafíos, se están desarrollando nuevas variantes de Cas9 y estrategias para mejorar la especificidad y reducir los efectos fuera de objetivo [39].

Otro desafío que presenta el sistema CRISPR/Cas9 aparece desde una perspectiva ética. La capacidad de modificar genomas humanos plantea preguntas sobre los límites de la intervención genética, especialmente cuando se trata de edición de la línea germinal, que podría afectar a futuras generaciones.

### 1.4.2. Edición Génica en CMPi

CRISPR-Cas9 se ha convertido en una herramienta ampliamente utilizada para la edición genética de CMPi con diversos propósitos. Entre sus aplicaciones se encuentran:

#### ❖ Estudios de Función Génica:

Al utilizar CRISPR/Cas9 para eliminar, modificar o insertar genes en CMPi, los científicos pueden investigar el papel de estos genes en el desarrollo y la función celular. Este enfoque es crucial para entender la biología subyacente al desarrollo y a muchas condiciones patológicas.

#### ❖ Modelado de Enfermedades:

Generar mutaciones patológicas para estudiar más ampliamente enfermedades específicas y poder modelarlas *in vitro*. Esto nos permite estudiar enfermedades genéticas sin la necesidad de obtener muestras de pacientes, ya que esta puede ser limitada o insuficiente.

Las iPSC derivadas de pacientes con mutaciones genéticas específicas pueden ser editadas para corregir o introducir mutaciones particulares, permitiendo la creación de modelos celulares de enfermedades humanas. Esto es especialmente útil para enfermedades genéticas raras o complejas, donde la disponibilidad de modelos animales es limitada.

#### ❖ Terapia Génica Personalizada:

La edición génica en CMPi ofrece la posibilidad de corregir mutaciones genéticas causantes de enfermedades en las células de un paciente. Estas células editadas podrían luego ser diferenciadas en tipos celulares específicos y reintroducidas en el paciente como una forma de terapia génica personalizada.

#### ❖ Desarrollo de Fármacos:

Las CMPi editadas genéticamente pueden utilizarse para crear modelos celulares que representen con precisión la enfermedad en cuestión. Estos modelos permiten la identificación y evaluación de fármacos en un entorno que refleja las condiciones humanas reales, mejorando la eficiencia y la precisión del desarrollo de nuevos tratamientos.

## 1.5. Displasia Arritmogénica

La patología que abordamos en la presente tesis y que planteamos estudiar utilizando CMPi y su diferenciación a cardiomiocitos es la cardiopatía displasia arritmogénica (DA).

La DA es una cardiopatía hereditaria que se caracteriza por la progresiva disfunción del músculo cardíaco debido al reemplazo del miocardio por tejido fibro-adiposo. Aunque inicialmente se describió como una enfermedad que afecta predominantemente el ventrículo derecho, estudios recientes han demostrado que la DA puede manifestarse de manera temprana con un patrón biventricular, o incluso con disfunción aislada del ventrículo izquierdo. Esta cardiomiopatía está asociada con arritmias ventriculares, que pueden generar muerte súbita en los pacientes, o con la distrofia progresiva del miocardio, llevando a insuficiencia cardíaca (Figura 8) [40].

La DA es la segunda causa más común de muerte súbita en jóvenes menores de 35 años, responsable de aproximadamente el 20% de los casos. Los paros cardíacos repentinos, frecuentemente asociados al ejercicio, ocurren más comúnmente durante la adultez temprana y en la fase subclínica de la enfermedad, cuando los síntomas no son evidentes en estudios de imagen como el ecocardiograma o la resonancia magnética cardíaca. A menudo, la muerte súbita es la primera manifestación clínica de la DA en una alta proporción de los pacientes, lo que subraya la importancia de una comprensión profunda de su patogénesis, factores de riesgo y manifestaciones clínicas [40], [41].



### 1.5.1. Manifestaciones Clínicas y Diagnóstico

La presentación clínica de la DA es variada y puede ir desde arritmias ventriculares aisladas hasta insuficiencia cardíaca severa. Los síntomas iniciales más comunes incluyen palpitaciones, síncope y, en algunos casos, dolor torácico. Sin embargo, la primera manifestación de la enfermedad puede ser la muerte súbita, lo que resalta la necesidad de un diagnóstico temprano y preciso [42], [43].

El diagnóstico de la DA se basa en una combinación de criterios electrocardiográficos, hallazgos en pruebas de imagen, antecedentes familiares y estudios genéticos. Las anomalías típicas en el electrocardiograma incluyen ondas epsilon, prolongación del QRS y ondas T invertidas en las derivaciones precordiales derechas (V1-V3). Aunque las anomalías estructurales en el ventrículo derecho suelen ser más prominentes, la afectación del ventrículo izquierdo también puede presentarse a medida que la enfermedad progresa [44].

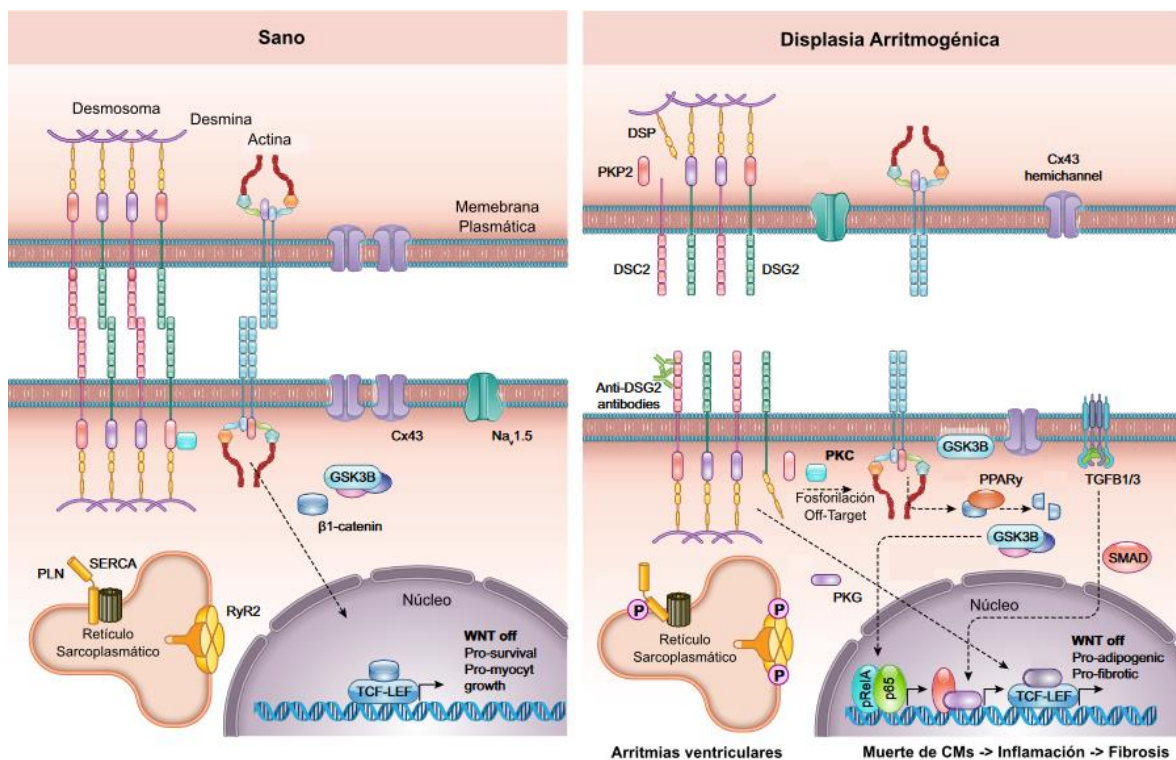
### 1.5.2. Tratamiento y Manejo Clínico

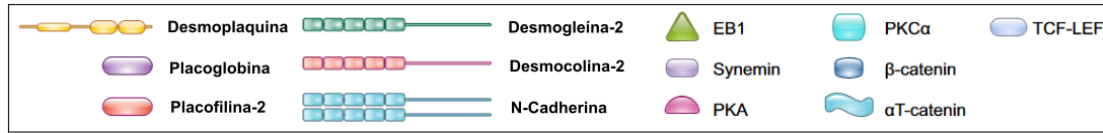
En términos de manejo, la DA representa un desafío clínico significativo. El objetivo más importante del tratamiento clínico en pacientes con DA es la prevención de la muerte cardíaca súbita. El grupo de Corrado y colaboradores elaboraron un documento de consenso para el tratamiento de la DA. El tratamiento suele incluir cambios en el estilo de vida, bloqueadores  $\beta$ , fármacos antiarrítmicos (AADs), ablación por catéter, el uso de antiarrítmicos, desfibriladores automáticos implantables y en casos graves, la consideración de un trasplante cardíaco. La naturaleza genética de la enfermedad también ha llevado a un creciente interés en la detección de portadores asintomáticos dentro de las familias afectadas, con el objetivo de prevenir eventos cardíacos potencialmente letales [45].

### 1.5.3. Genética de la DA

Dicha enfermedad tiene una incidencia estimada entre 1:1000 y 1:5000 individuos y se han reportado decenas de mutaciones para dicha cardiomiopatía. Aproximadamente un 50% de los casos presentan una o más mutaciones en los genes que codifican a las proteínas desmosomales, las cuales son cruciales para la integridad mecánica y funcional de las células miocárdicas. Estas mutaciones resultan en una disfunción de las uniones intercelulares, lo que favorece la apoptosis celular y la progresiva degeneración del tejido miocárdico, siendo reemplazado por tejido fibroso y adiposo [41].

Entre los genes más comúnmente alterados en esta patología se encuentran PKP2 (el gen más afectado), PKG, DSP, DSC-2 y DSG-2. Alternativamente, se han descrito variantes en genes que codifican proteínas no desmosomales, como el receptor de rianodina 2 (RYR2), factor de crecimiento transformante  $\beta 3$  (TGF $\beta 3$ ), proteína transmembrana 43 (TMEM43), desmina (DES), titina (TTN), fosfolamban (PNL), laminina A/C (LMNA) y el canal de sodio (SCN5A) (Figura 8) [46], [47].





**Figura 8. Esquema de los mecanismos involucrados en la DA.** En el cardiomiocito sano, tanto los desmosomas como las AJs forman conexiones intercelulares fuertes con las células vecinas. Asimismo, las GJs, formadas por Cx43, como el canal de sodio (Nav1.5) están posicionados adecuadamente.  $\beta$ -catenina cumple su función estructural y de activación transcripcional de los genes de la vía de señalización de WNT. La vía Hippo está inactiva, lo que permite la transcripción de genes que promueven la supervivencia y crecimiento del miocito. En la DA, la disrupción de los desmosomas y las AJs provoca un aumento del estrés mecánico. La expresión reducida de canales de sodio y Cx43, está implicada en la arritmogénesis. La translocación de la Placoglobina al núcleo inhibe la transcripción de genes dependientes de WNT. El aumento de la expresión del receptor activado por proliferadores de peroxisomas- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) se ha asociado con la inhibición de WNT, posiblemente a través de una relación directa que promueve la degradación de la catenina- $\beta$ 1. Además, el aumento en la producción de citocinas proinflamatorias y profibróticas, incluyendo el factor transformador de crecimiento- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) y TGF $\beta$ 3, podría contribuir a la patogénesis de la DA mediante vías canónicas y no canónicas (Adaptado de [28]).

### 1.5.3.1. Aspectos Genéticos y Variabilidad Fenotípica

Mientras que la mayoría de los fenotipos de la DA están asociados a una transmisión autosómica dominante, existen algunas formas que son autosómicas recesivas. Por ejemplo, la mutación homocigota en PKG (2157del2TG) causa la enfermedad de Naxos, que presenta intervención cardíaca y cutánea. Otra forma autosómica recesiva es el síndrome de Carvajal, causado por mutaciones en DSP, que también presenta un fenotipo cardio-cutáneo, caracterizado por pelo lanoso, queratodermia palmoplantar y cardiopatía [48].

Las variantes patogénicas en PKP2 están comúnmente asociadas con la forma clásica de la enfermedad, que afecta predominantemente el ventrículo derecho. Sin embargo, la afectación del ventrículo izquierdo puede aparecer en estadios tardíos. Otras mutaciones, como las que afectan a DSC2 y DSG2, pueden involucrar al ventrículo izquierdo incluso en

las primeras etapas de la enfermedad. Las mutaciones en DSP, por su parte, están más estrechamente relacionadas con la afectación predominante del ventrículo izquierdo.

La hipótesis principal de fisiopatología de la DA se centra en la desestabilización de la estructura desmosomal, debido a las variantes en las proteínas desmosomales y podría debilitar la resistencia al estiramiento del miocardio resultando en la muerte de los miocitos y su compensación por tejido fibroadiposo, debido al limitado potencial de regeneración que presenta el corazón.

Es importante destacar que los pacientes con múltiples mutaciones heterocigotas en diferentes genes asociados a la DA suelen presentar fenotipos mucho más severos en comparación con aquellos que poseen una sola mutación [49].

## 1.6. Desmosoma cardíaco

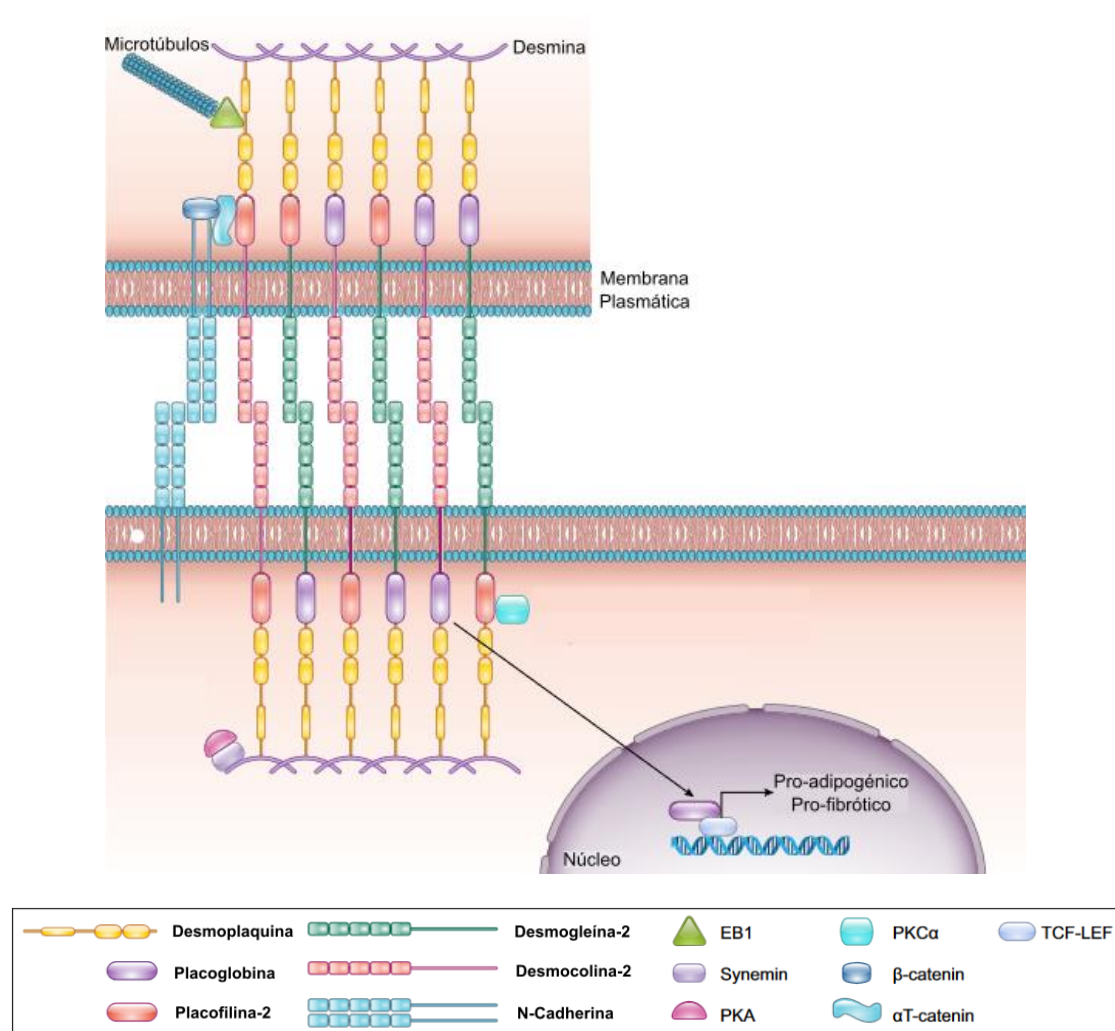
En la presente tesis es de suma importancia comprender en detalle la estructura de los desmosomas ya que estudiaremos una cardiopatía asociada a mutaciones en estas proteínas (Figura 9).

Los desmosomas cardíacos están formados por cuatro componentes principales:

- **Cadherinas:** Estas son proteínas transmembrana que incluyen DSG2 y DSC2. Las cadherinas desmosomales de una célula se unen a las cadherinas de la célula adyacente. Ambas proteínas tienen funciones que dependen del calcio. El dominio extracelular forma trans homo- y hetero-dímeros (DSG-DSG, DSC-DSC, DSG-DSC) que unen células adyacentes a través de interacciones físicas que abarcan los espacios entre células. Estas proteínas son críticas para la adhesión mecánica entre cardiomiocitos, permitiendo que el corazón mantenga su integridad estructural durante la contracción. Intracelularmente, estas proteínas se unen a las proteínas adaptadoras: PKG y PKP2 [50].
- **Proteínas Armadillo:** Estas proteínas forman parte del complejo de anclaje desmosomal. La PKG (también conocida como  $\gamma$ -catenina) y la PKP2 actúan como puentes que conectan las cadherinas desmosomales con la desmoplaquina.

- **Plaquinas:** Esta incluye a la DSP, la cual ancla el desmosoma a la red del citoesqueleto a través de uniones específicas a los filamentos intermedios. La región C-terminal de la DSP contiene tres dominios de repetición de plaquinas la cual se une al filamento intermedio: desmina [51].

- **Filamentos Intermedios:** En las células epiteliales, estos filamentos están compuestos principalmente por queratina, mientras que en los cardiomiocitos están formados por desmina. Los filamentos intermedios se anclan a los complejos de anclaje desmosomal, proporcionando estabilidad mecánica y distribución de fuerzas a través del tejido.



**Figura 9. Estructura del desmosoma cardíaco.** Las cadherinas cardíacas, DSC-2 y DSG-2, interactúan extracelularmente para conectar mecánicamente las células adyacentes. Intracelularmente, la placoglobina y la placofilina-2 actúan como proteínas adaptadoras que vinculan las cadherinas con la desmoplaquina. La desmoplaquina conecta el desmosoma con la red de filamentos intermedios de desmina dentro de la célula (Adaptada de [28]).

### 1.6.1. Variantes génicas que causan DA

Como se mencionó anteriormente, mutaciones principalmente en proteínas desmosomales son la causa principal de la DA. De las 5 proteínas desmosomales nos centraremos en 2 de ellas, PKP2 y PKG las cuales son el objeto de estudio de esta tesis.

#### ❖ Placofilina-2

El gen de PKP2 está localizado en el cromosoma 12p13 y se traduce en una proteína citoplasmática de 881 aminoácidos. Dentro de la familia de las placofilinas, PKP2 es la isoforma principal en el corazón humano, desempeñando su rol en la integridad estructural y la función de los tejidos cardíacos y juega un papel esencial en la formación y estabilidad de los desmosomas.

PKP2 es una proteína que interactúa tanto con las cadherinas desmosomales como con la proteína interna de los desmosomas, la DSP. Esta interacción asegura el anclaje de los filamentos intermedios del citoesqueleto a los desmosomas, lo cual es fundamental para la transmisión de fuerzas mecánicas entre células durante la contracción cardíaca.

PKP2 no solo actúa como un adaptador estructural, sino que también participa en la señalización celular. Estudios recientes han demostrado que PKP2 puede influir en la regulación del potencial de acción cardíaca al interactuar con los canales iónicos, como los canales de sodio dependientes de voltaje, contribuyendo así a la estabilidad eléctrica del corazón. Esta dualidad en función estructural y reguladora hace que PKP2 sea una proteína clave tanto en la mecánica celular como en la electrofisiología del miocardio [52].

Mutaciones en el gen que codifica la PKP2 son la causa más común de la DA. Las mutaciones de pérdida de función en PKP2 resultan en una disfunción desmosomal que compromete la cohesión celular, llevando a la ruptura de los contactos intercelulares y a la desregulación de la señalización celular. Los modelos celulares y animales de DA, incluyendo aquellos generados mediante la edición genética CRISPR/Cas9 en CMPi, han confirmado que la ausencia o disfunción de PKP2 conduce a la desorganización del citoesqueleto y a la disminución de la conductancia de los canales de sodio en cardiomiocitos, factores que contribuyen a la arritmogenicidad característica de esta enfermedad [36].

### ❖ Placoglobina

El gen de la placoglobina, también conocida como  $\gamma$ -catenina y *JUP*, está codificado en el cromosoma 17q21 y se traduce en una proteína citoplasmática de 745 aminoácidos. PKG forma parte de las proteínas de la familia armadillo. Está ubicada en los desmosomas uniendo las cadherinas con el citoesqueleto. Es la única proteína conocida que es un componente común entre las placas submembranosas. PKG forma uniones en estas placas con los filamentos intermedios y podría contribuir a interacciones proteicas entre la desmoplaquina y las caderinas desmosomales [53], [54].

Mutaciones en el gen que codifica la placoglobina son la causa menos frecuente de la DA. Una mutación que conduce a la inserción de serina en la posición 39 en el extremo N-terminal de la placoglobina causa la DA [55]. Mientras que una delección de dos pares de bases que provoca la truncación del extremo C-terminal de PKG resulta en la enfermedad de Naxos, que se manifiesta con queratodermia palmoplantar y cabello lanoso, además de la DA [56].

## 1.6.2. Mecanismos moleculares de la DA:

Una de las hipótesis más aceptadas para explicar el fenotipo de la DA radica en la desestabilización de los desmosomas [42]. Esta desestabilización no solo compromete la cohesión celular, sino que también impacta significativamente en diversas vías intracelulares,

incluyendo las vías Wnt/ $\beta$ -catenina y Hippo, cuya disfunción contribuye al reemplazo fibro-adiposo del tejido cardíaco [57].

Además, investigaciones recientes han señalado un aumento en la expresión de PPAR $\gamma$  en cardiomiocitos de pacientes con DA. Este gen es conocido como un regulador maestro de la adipogénesis, y su activación podría ser un mecanismo clave detrás del depósito de tejido adiposo observado en la DA [58].

- **Vía de Señalización Wnt/ $\beta$ -catenina en la DA:**

La vía de señalización Wnt canónica regula procesos de desarrollo durante la embriogénesis y está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos en adultos. Esta vía de señalización está asociada con la diferenciación celular, la polarización y la migración durante el desarrollo. La activación de la vía Wnt canónica inhibe la degradación de la  $\beta$ -catenina citoplásmica por el proteasoma. De esta manera, la  $\beta$ -catenina puede translocarse al núcleo e interactuar con el factor T-cell/Lymphoid-enhancer binding factor (Tcf/Lef) para activar la señalización Wnt canónica. Esta vía favorece la proliferación celular y regula la especificación del destino celular, incluyendo la diferenciación de cardiomiocitos [59], [60].

En la DA, se ha descrito una inhibición de la vía Wnt canónica en ratones deficientes en DSP y en células HL-1 con reducción de DSP, lo que conduce a un cambio morfológico de los cardiomiocitos hacia adipocitos con acumulación de lípidos [61]. Las mutaciones en genes que codifican para proteínas desmosomales pueden inducir una desestabilización global del desmosoma y provocar la liberación citoplásmica de proteínas que normalmente se retienen en la membrana plasmática. Utilizando ratones que sobreexpresan la PKG de unión, Lombardi y colaboradores confirmaron la capacidad de la PKG para translocarse al núcleo. La PKG compite con la  $\beta$ -catenina, que también puede encontrarse tanto en el citoplasma como en el núcleo. La relocalización nuclear de la PKG impide la interacción entre la  $\beta$ -catenina y Tcf/Lef, afectando así la vía Wnt canónica [62].



En los cardiomiocitos, la supresión de la señalización Wnt promueve principalmente la adipogénesis, lo que podría favorecer la acumulación de lípidos en el corazón de pacientes con DA y sustentar la hipótesis de la transdiferenciación de cardiomiocitos en adipocitos. En modelos celulares, se ha establecido una relación entre la vía Wnt y la expresión de PPAR $\gamma$  [63]. PPAR $\gamma$  es el regulador maestro de la diferenciación de adipocitos, la lipogénesis y la supervivencia de adipocitos [64]. Se sospecha que PPAR $\gamma$  favorece el cambio hacia la adipogénesis en la DA. En un estudio utilizando ratones con reducción de DSP, García-Gras et al. demostraron un vínculo entre la sobreexpresión de PPAR $\gamma$  y la supresión de la señalización Wnt. Este mecanismo patológico podría, por lo tanto, subyacer al reemplazo fibro-adiposo característico de la DA (García-Gras, 2006).

- Interacción con Vías de Señalización Hippo:

La vía Hippo es otra ruta de señalización que regula la proliferación, supervivencia y diferenciación celular [65]. La vía Hippo consiste en una cascada de quinasas, en la cual están involucradas las proteínas MST1/2 y LATS1/2. La primera fosforila a la segunda, la cual fosforila a YAP o a TAZ, los cuales son co-activadores transcripcionales. Al estar fosforilados, YAP y TAZ son expulsados del núcleo inhibiendo su actividad transcripcional. En la DA tanto la vía de Wnt como la vía Hippo se ha visto que interactúan, observando disminución de la actividad de la vía Wnt/B-catenina y activación de la vía Hippo (lo cual lleva a disminución de actividad transcripcional de YAP) [57].

## 1.7. Tejido adiposo en la cardiopatía

La principal característica patológica de la enfermedad es una pérdida progresiva del miocardio contráctil, que es reemplazado por tejido fibroso y adiposo. Este proceso de sustitución fibroadiposa se extiende de manera transmural con un gradiente epiendocárdico, causando adelgazamiento de la pared ventricular y dilatación aneurismática, especialmente

en el triángulo de la displasia (tracto de entrada, tracto de salida y ápex) del ventrículo derecho. La sustitución fibroadiposa provoca la disfunción biventricular progresiva. Esta sustitución constituye la esencia que determina el empeoramiento del fenotipo arritmogénico [66], [67].

Los adipocitos se originan de células madre mesenquimales (A-MSCs) y se diferencian a través de varios estadios, empezando por lipoblastos, transición a preadipocitos y finalmente convirtiéndose en adipocitos maduros. Este proceso está fuertemente controlado por numerosos factores de transcripción y vías de señalización [68].

Una de las hipótesis de la aparición de tejido adiposo en el corazón sugiere que los cardiomiocitos se transdiferencian directamente a adipocitos, basándose en evidencia histológica de células con características mixtas. Sin embargo, estos hallazgos aún se están estudiando, y no se han confirmado la presencia de dichas células de transición aún [69].

Otra hipótesis involucra a las células progenitoras cardíacas derivadas del segundo campo cardíaco, identificadas por la expresión de Isl-1. Estas células podrían adoptar un destino adipogénico cuando la señalización Wnt se suprime debido a mutaciones en los genes de los desmosomas. No obstante, su reducido número en el corazón adulto sugiere un papel menor en la extensa sustitución fibro-adiposa observada en DA [70]. Por otro lado, las células epicárdicas que pasan por una transición epitelial-mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés) también se han implicado como contribuyentes significativos. El silenciamiento de genes desmosomales, como PKP2, aumenta la proliferación, migración y el potencial adipogénico de las células derivadas del epicardio. Esta hipótesis se ve respaldada por el gradiente epicardio-endocardio observado en la sustitución fibro-adiposa [71].

Mientras tanto, las células madre mesenquimales cardíacas (C-MSCs), células no contráctiles presentes en el corazón, ahora se consideran una fuente principal de adipocitos. Estas células, especialmente en pacientes con DA, exhiben una propensión a la diferenciación adipogénica bajo la influencia de mutaciones en genes desmosomales y alteraciones en vías de señalización, como la supresión de Wnt [72]. De manera similar, los progenitores fibro-adiposos (FAPs), identificados por la expresión de PDGFR $\alpha$ , se reconocen como precursores

tanto de adipocitos como de fibroblastos, contribuyendo significativamente a la población de adipocitos en modelos de ACM [73].

### 1.7.1. Reguladores clave:

- PPAR $\gamma$ , el aumento de su expresión promueve el interruptor hacia adipogénesis. Está regulado por varias señales, entre las cuales la vía de señalización de Wnt es una de sus mayores mediadores negativos [64], [68], [74], [75].
- C/EBPs (del inglés CCAAT/enhancer-binding proteins), junto con PPAR $\gamma$  forman un bucle de retroalimentación positiva para mantener la adipogénesis [74], [75].

## 2. Hipótesis

A lo largo de la introducción, se describieron y presentaron diversas herramientas que han permitido avances significativos en el modelado de cardiomiopatías *in vitro*. La posibilidad de recrear enfermedades humanas en sistemas celulares ha sido clave para comprender los mecanismos subyacentes a diversas afecciones genéticas y desarrollar estrategias terapéuticas más precisas. Entre estas herramientas, la edición génica mediante CRISPR/Cas9 ha demostrado ser una técnica altamente eficiente para introducir mutaciones específicas en células madre pluripotentes inducidas, permitiendo la generación de modelos celulares que reproducen las alteraciones genéticas responsables de distintas enfermedades. La capacidad de estas células de diferenciarse a cardiomiocitos y desarrollar estructuras y funciones similares a las del tejido cardíaco las convierte en una herramienta valiosa para el estudio de cardiomiopatías. Este enfoque no solo permite analizar las consecuencias de mutaciones específicas en un entorno controlado, sino que también posibilita la identificación de mecanismos patológicos clave.

En base a todo lo propuesto, en este trabajo postulamos como hipótesis que *la introducción de mutaciones específicas en CMPi mediante el sistema de edición genética CRISPR/Cas9 permitirá la generación de modelos celulares representativos de la cardiopatía Displasia Arritmogénica a partir de su diferenciación a cardiomiocitos*. A través de estos modelos *in vitro*, buscamos recrear las características patológicas asociadas a la enfermedad, lo que facilitará el estudio de sus mecanismos moleculares y celulares. Además, este enfoque permitirá establecer una plataforma experimental para evaluar el impacto funcional de las mutaciones identificadas en pacientes, aun cuando fueran de significado incierto.

### 3. Objetivo general

Modelar *in vitro* la displasia arritmogénica (DA) mediante la generación de líneas de células madre pluripotentes inducidas con mutaciones reportadas para dicha cardiopatía y posterior diferenciación *in vitro* a cardiomiocitos.

#### 3.1. Objetivos Específicos

- \* Generar mutaciones puntuales reportadas para la DA mediante la técnica de CRISPR/Cas9 en células pluripotentes inducidas humanas (CMPi).
- \* Realizar diferenciación *in vitro* a cardiomiocitos de las CMPi normales y CMPi mutadas.
- \* Comparar las características fenotípicas de cardiomiocitos derivados de CMPi normales y CMPi mutados para la DA.
- \* Determinar la capacidad adipogénica de los cardiomiocitos derivados de CMPi normales y CMPi mutados para la DA y sus vías de señalización involucradas.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Cultivo Celular

#### 4.1.1. Línea celular

Para la realización de este trabajo utilizamos la línea de CMPi INEUi002, la cual fue obtenida a partir de la reprogramación de fibroblastos humanos, utilizando el vector lentiviral STEMCCA que porta las secuencias de los genes de los factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. La línea fue establecida en nuestro laboratorio por la Dra. Questa, demostrando su estado pluripotente y su habilidad para diferenciarse a las tres capas germinales [76], [77]. Esta línea será utilizada como control y se nombrará “*Wild-Type*” o “*WT*”.

#### 4.1.2. Mantenimiento de Células Pluripotentes

Las INEUi002 y todas las líneas de CMPi derivadas de las INEUi002 fueron mantenidas en estado indiferenciado en placas pretatadas durante 1 hora a 37°C con una matriz comercial rica en componentes de matriz extracelular, Geltrex (Gibco). El medio rutinario utilizado fue E8 Flex (Essential 8 Flex medium, Gibco), mTeSR (Stemcell Technologies) o StemFlex (Gibco) dependiendo del experimento en curso, sin antibióticos, el mismo se renovó diariamente a no ser que se detalle lo contrario. Las células se cultivaron en cámara húmeda con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Cuando las células alcanzaban el 70-80% de confluencia, aproximadamente cada 3-4 días, se disgregaron incubándolas con Versene durante 7 minutos a 37°C, luego se resuspendieron en E8Flex y fueron diluidas en una proporción entre 1:5 y 1:10 para su mantenimiento.

Para la utilización de las células en distintos experimentos, fue necesario levantarlas unicelulares. Para ello, se utilizó una dilución 1:10 de la enzima TrypLE 10X Select en PBS 1X/EDTA 1 mM (TrypLE 1X, Gibco) para disgregarlas. Las células se lavaron con PBS 1X,

luego se incubaron por 5 minutos a 37°C con TrypLE 1X; la reacción enzimática se frenó con PBS con el doble del volumen de TrypLE 1X utilizado, luego las células unicelulares se transfirieron a un tubo cónico y centrifugadas por 5 minutos a 300g. El pellet celular fue resuspendido en medio E8Flex, suplementadas con 10 uM Y-27632 (inhibidor de la vía de Rock, necesario para la sobrevivencia de las células pluripotentes en estado unicelular) y sembradas en estas condiciones durante las primeras 24 horas.

En todos los cultivos celulares utilizados en la presente tesis, las células se analizaron rutinariamente para hacer análisis de posible contaminación con *Mycoplasma* sp mediante PCR a punto final.

### 4.1.3. Criopreservación de las Células

#### 4.1.3.1. Criopreservación en criotubos

Para criopreservar las CMPi se disociaron de su sustrato como fue mencionado previamente y fueron resuspendidas en medio de cultivo. Las células se pasaron a un criotubo (Corning) con 1 mL de una mezcla con 70% de células en medio de cultivo de pluripotencia, 20% v/v SFB y 10% v/v DMSO, suplementado con inhibidor de Rock 10 uM. Los criotubos se mantuvieron por 24 horas a -80°C en un *frosty*, contenedor para congelamiento con isopropanol que permite el descenso de la temperatura a razón de 1°C/minuto, luego se transfirieron a N2 líquido por tiempo indefinido. Para descongelar las células, el criotubo se calentó rápidamente en baño termostático por menos de 2 minutos a 37°C. Las células se transfirieron a un tubo cónico conteniendo 3 mL de medio E8Flex y se centrifugaron a 300 g por 5 minutos. El *pellet* fue resuspendido en medio de cultivo pluripotente, suplementado con inhibidor de Rock 10 uM y sembrado en placas pretratadas con Geltrex por 24 horas.

#### 4.1.3.2. Criopreservación en placa (*multiwell* de 24)

Para algunos experimentos puntuales en los que se generaron muchos cultivos celulares clonales fue necesario congelar las células directamente en la placa de cultivo. Las células

fueron levantadas con Versene 7 minutos a 37°C. Luego de la incubación el Versene fue retirado y las células fueron resuspendidas dentro del mismo *well* en 250 µl de medio de cultivo suplementado con inhibidor de Rock 10 µM. Una vez resuspendidas todas las células de la *multiwell*, a cada *well* se le agregó por goteo 250 µl de medio de cultivo suplementado con 40% v/v de Suero Fetal Bovino, 20% v/v de DMSO e inhibidor de Rock 10 µM. Luego de una breve agitación circular de la placa *multiwell* para homogeneizar la suspensión celular, la *multiwell* fue sellada con parafilm, colocada dentro de un contenedor de telgopor y guardada a -80°C. Las células fueron criopreservadas mediante esta metodología durante un plazo no mayor a 14 días, siendo recomendable un plazo menor a 10 días para asegurar la viabilidad. Para su descongelamiento, la placa fue retirada del contenedor de telgopor y calentada en un baño termostatzado a 37°C hasta observarse líquido el medio de criopreservación. En este punto, la suspensión celular de los *wells* de interés fue trasvasada a tubos cónicos con 3 ml de PBS 1X y centrifugada 5 minutos a 300g. El sobrenadante fue descartado y el pellet de células fue resuspendido en medio de cultivo suplementado con inhibidor de Rock 10 µM y sembrado en *wells* previamente tratados con Geltrex o Vitronectina 1 hora.

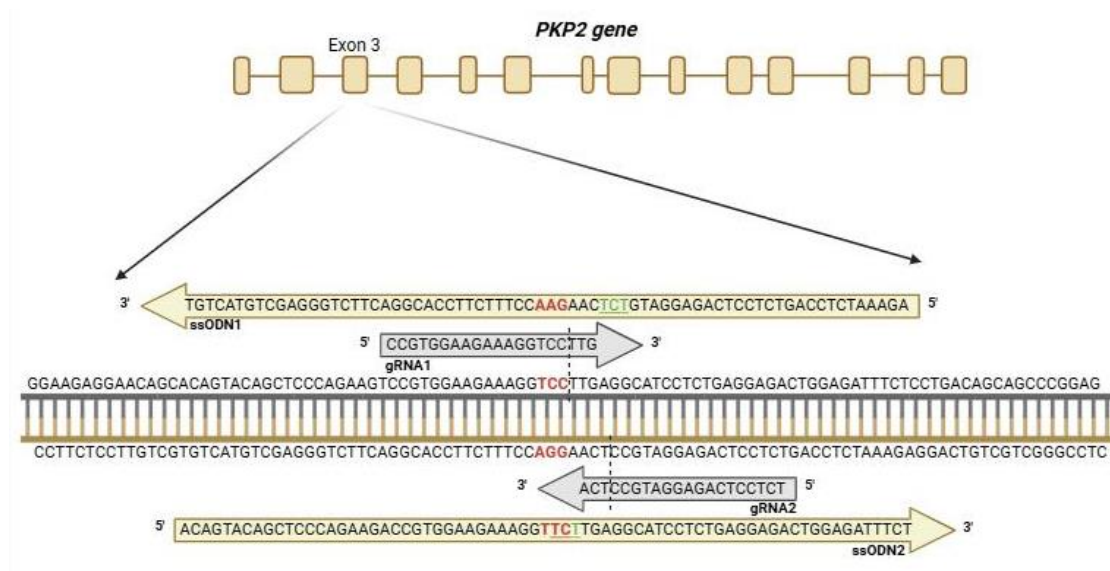
## 4.2. Generación de líneas de CMPi editadas genéticamente mediante CRISPR/Cas9

### 4.2.1. Diseño y clonado de ARN guías para el sistema CRISPR/Cas9

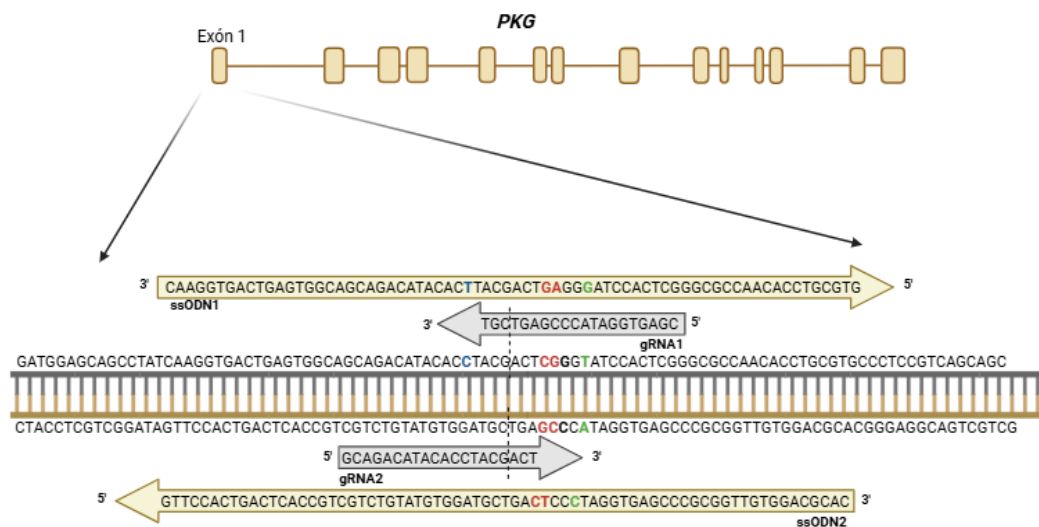
Se diseñaron dos ARNg dirigidos a cada proteína de interés utilizando el software Benchling con parámetros por defecto ([www.benchling.com](http://www.benchling.com)). A su vez, se diseñó el oligonucleótido de simple cadena (ssODN) de 70 nt correspondiente a cada ARNg homólogo a la zona de edición y con la incorporación de la mutación puntual deseada, una mutación



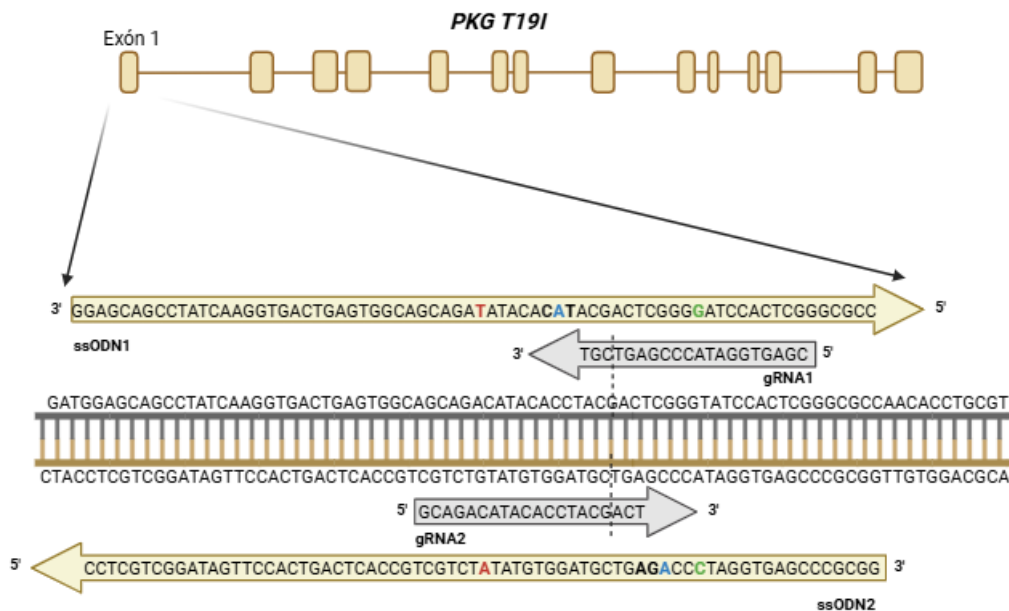
silenciosa para eliminar el sitio PAM (sitio de unión de la Cas9) para evitar que la Cas9 siga generando cortes en el sitio y una modificación de la secuencia para la incorporación de un sitio de corte de la enzima de restricción BamHI a partir de otra mutación silenciosa. Esto nos permitirá evaluar la correcta incorporación del ssODN mediante tratamiento con BamH1 de un amplicón de PCR lindante al sitio de edición.



**Figura 10. ARNg y ssODNs en el exón 3 del gen de PKP2.** Generación de ARNg y ssODNs para introducir la mutación puntual PKP2 c.419C>T en el gen de PKP2. En rojo: bases nucleotídicas en el sitio de edición que genera el cambio de aminoácido. En verde: secuencia PAM.



**Figura 11. ARNg y ssODNs en el primer exón del gen de PKG.** Generación de ARNg y ssODNs para introducir codón stop prematuro en el gen PKG. En rojo: bases nucleotídicas en el sitio de edición que genera el codón de stop prematuro. En azul: cambio de base para modificar sitio PAM en el ARNg-1. En negrita: secuencia PAM del ARNg-2. En verde: cambio de base para generar nuevo sitio de corte de la enzima de restricción BamHI.



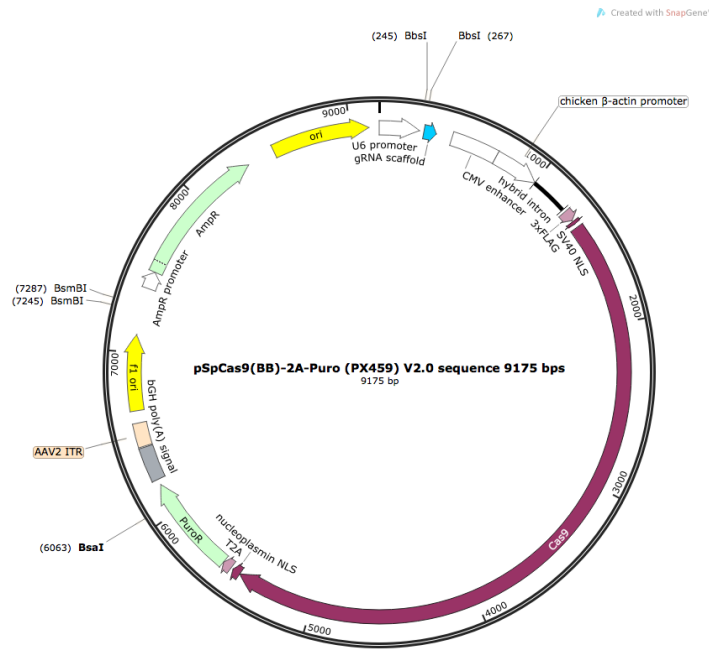
**Figura 12. ssODNs en el primer exón del gen de PKG.** Generación de ssODNs para la incorporación de la mutación puntual PKG c.56C>T. En rojo: bases nucleotídicas en el sitio de edición que genera la mutación deseada. En azul: cambio de base para modificar sitio PAM. En negrita: secuencia PAM. En verde: cambio de base para generar nuevo sitio de corte de la enzima de restricción BamHI.

Nombre del guía	Secuencia 5'-3'
ARNg-1-PKG-FW	CGAGTGGATACCCGAGTCGT
ARNg-1-PKG-RV	ACGACTCGGGTATCCACTCG
ARNg-2-PKG-FW	GCAGACATACACCTACGACT
ARNg-2-PKG-RV	AGTCGTAGGTGTATGTCTGC
ARNg-1-PKP2-FW	CCGTGGAAGAAAGGTCCTTG
ARNg-1-PKP2-RV	CAAGGACCTTTCTTCCACGG
ARNg-2-PKP2-FW	TCTCCTCAGAGGATGCCTCA

Nombre del guía	Secuencia 5'-3'
ARNg-1-PKP2-RV	TGAGGCATCCTCTGAGGAGA
ssODN1-PKG	CAAGGTGACTGAGTGGCAGCAGACATACACTTACGA CTGAGGGATCCACTCGGGCGCCAACACCTGCGTG
ssODN2-PKG	CACGCAGGTGTTGGCGCCCGAGTGGATCCCTCAGT CGTAGGTGTATGTCTGCTGCCACTCAGTCACCTTG
ssODN1-PKP2	AGAAATCTCCAGTCTTCTCAGAGGATGTCTCAAGAAC CTTTCTTCCACGGACTTCTGGGAGCTGTACTGT
ssODN2-PKP2	ACAGTACAGCTCCCAGAAGACCGTGGAAGAAAGGTT CTTGAGGCATCCTCTGAGGAGACTGGAGATTTCT

**Tabla 1. Secuencia de ARNg y ssODNs para CRISPR/Cas9.**

Para el clonado de los ARNg, los oligonucleótidos obtenidos comercialmente se resuspendieron en agua milliQ a una concentración final de 100 uM, se anillaron *in vitro* y fueron ligados dentro del plásmido pSpCas9(BB)-A2-Puro (PX459) v2.0 (Addgene #62988) digerido con la enzima de restricción BbsI. Además del ARNg clonado, el plásmido utilizado expresa la enzima Cas9 y resistencia a puromicina. Los plásmidos fueron luego transformados, amplificados por cultivo bacteriano y purificados mediante la técnica de mini-prep y maxi-prep. La presencia del ARNg clonado fue validada por PCR a tiempo final utilizando los cebadores U6 como FW y el oligo RV del ARNg como cebador RV. Una vez purificados se mandaron a secuenciar para corroborar la correcta incorporación del ARNg diseñado.



**Figura 13. Mapa del plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (SnapGene Viewer)**

#### 4.2.2. Transfección de CMPi

Los plásmidos conteniendo el sistema CRISPR/Cas9 con los ARNg clonados, fueron utilizados para transfectar CMPi y así generar las ediciones deseadas en estas células. Para esto, se plaquearon 100.000 células en un *multiwell*-12 pretratado con Geltrex y se las cultivo en medio mTesR suplementado con inhibidor de Rock 10 $\mu$ M. A las 24 horas fueron co-transfectadas la Lipofectamine Stem Transfection Reagent (Invitrogen), los plásmidos y los ssODN en una relación 1:1 ( $\mu$ g de ADN: $\mu$ l de lipofectamina) utilizando distintas concentraciones de  $\mu$ g de ADN total. Como control de la transfección se utilizó un plásmido GFP. A las 24 hs se evaluó la eficiencia de transfección observando la expresión de GFP de las células control en un microscopio de epifluorescencia EVOS.

A las 24 horas post-transfección, se reemplazó el medio por mTesR suplementado con inhibidor de Rock 10 $\mu$ M y antibiótico puromicina a una concentración de 500 ng/ml, para seleccionar aquellas células que incorporaron el plásmido con la resistencia al antibiótico. Luego de 48 horas de selección, se mantuvieron las células sobrevivientes en mTesR hasta

llegar a una confluencia suficiente para criopreservar y se tomaron muestras de ADN para la evaluación genética de las células transfectadas que sobrevivieron (*pools* celulares).

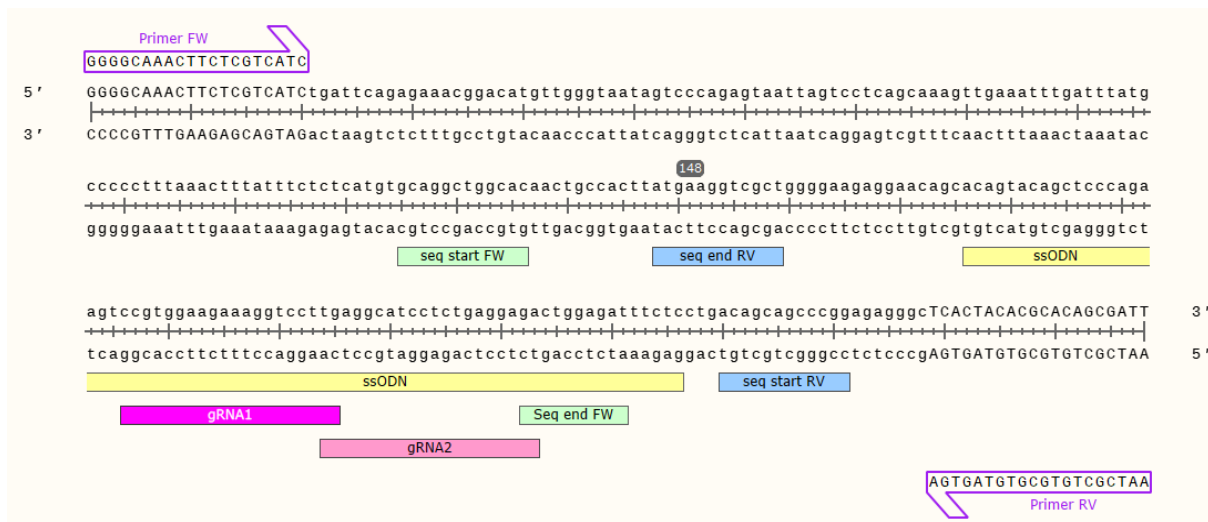
### 4.2.3. Selección Clonal de CMPi Transfectadas

La secuencia obtenida mediante secuenciación por Sanger del amplicón generado a partir de la PCR de punto final de los *pools* celulares, fue analizada utilizando el software Synthego para seleccionar aquellos que hayan incorporado las mutaciones puntuales deseadas con mayor eficiencia. Una vez seleccionado el *pool* celular a utilizar, éste fue expandido en el medio de cultivo de pluripotencia Stemflex. Al llegar a una confluencia del 70-80%, las células fueron disociadas unicelularmente con TrypLE 1X y transferidas a una placa p60 no adherente con 3mL de medio Stemflex. A partir de esta placa con células unicelulares en suspensión se utilizó una micropipeta p10 para transferir una célula única a una placa *multiwell*-96, previamente tratada con Geltrex, a razón de una célula por *well*, este proceso se realizó con un microscopio en condiciones de esterilidad dentro del flujo laminar. Las células fueron expandidas en el medio de pluripotencia Stemflex suplementado con inhibidor de Rock 10  $\mu$ M durante 7 a 10 días y luego se realizó un pasaje de aquellos clones que proliferaron utilizando Versene a una placa de mayor superficie. En estos primeros pasajes se generaron stocks de células criopreservadas en placa, se tomaron muestras de ADN genómico para la evaluación de cada uno de los clones y se secuenció por Sanger el producto de PCR del sitio de edición de interés en cada caso.

### 4.2.4. Secuenciación masiva de amplicones

Con el objetivo de determinar la eficiencia de edición de los diferentes ARNg de una manera más precisa en los *pools* celulares realizamos secuenciación masiva de amplicones. Esta estrategia fue utilizada en la generación de la línea de CMPi editada para el gen de PKP2. La secuenciación masiva de amplicones de los *pools* celulares se realizó en la empresa “CD Genomics” en Estados Unidos. Para ello, se tomaron muestras de ADN genómico de los

*pools* celulares de células transfectadas y se enviaron 10 µl de cada muestra genómica, en unas concentraciones entre 500-1000 ng/µl. Brevemente, se diseñaron secuencias de referencia de 10-12 bases que flanquean la región de interés (secuencias “start” y “end” en la figura 14), ésta, incluyendo la región donde se generaría la mutación puntual, generando un amplicón de aproximadamente 100 bases. Luego, se amplifica por PCR la región de referencia y se secuencia por NGS. Esta secuenciación de amplicones es luego analizada con el software CRIS.py. Cada amplicón leído es pareado con la secuencia de referencia y se mide y compara la distancia de pares de bases de diferencia. La devolución es una tabla que indica la cantidad de lecturas de cada indel y el porcentaje de inserción del ssODN.



**Figura 14. Diseño de secuencias para secuenciación de amplicones.**

#### 4.2.5. Caracterización de las líneas generadas de CMPi editadas

Una vez seleccionado el clon celular con la modificación genética deseada, este es analizado para verificar que no sufrió otras alteraciones no deseadas. Para ello se realizan los siguientes ensayos:

- **Análisis de marcadores de pluripotencia:** Se realizaron inmunofluorescencias y qPCRs de los marcadores comunes de pluripotencia OCT4 y SOX2 y se utilizó como control la línea celular INEU002.

- Cariotipo: El análisis cromosómico mediante bandeo G fue realizado por el Laboratorio de Genética Hematológica, Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET)/Academia Nacional de Medicina. Se analizaron 50 metafases con una resolución de 450 bandas.
- Análisis de los *off targets* del ARNg utilizado en cada caso: Se realizan PCR a punto final de los sitios predichos de *off targets* de cada ARNg y luego se secuencia mediante Sanger para verificar que el genoma siga íntegro.

Los off-targets de los ARNg en el sistema CRISPR/Cas9 son efectos no deseados en los que la nucleasa Cas9 corta secuencias de ADN que presentan similitudes parciales con la secuencia diana objetivo. Esto ocurre debido a un apareamiento imperfecto entre el ARNg y secuencias genómicas no específicas, lo que puede generar mutaciones inespecíficas, afectando la funcionalidad de genes no relacionados y comprometiendo la precisión del sistema. Para minimizar estos efectos, se optimizan los diseños de ARNg y se emplean herramientas bioinformáticas para predecir posibles sitios off-target.

## 4.3. Diferenciación cardíaca de las CMPi en Monocapa

### 4.3.1. Protocolo de diferenciación cardíaca

El protocolo utilizado en esta tesis fue desarrollado por el laboratorio de Palecek y colaboradores y algunas de las condiciones fueron puestas a punto en nuestro laboratorio [30]. Brevemente, se sembraron 700.000 CMPi en placas *multiwell*-12 pretratadas con Geltrex, en medio Stemflex por 3 días. Una vez alcanzado el 100% de confluencia, punto considerado como día 0, el medio fue reemplazado por RPMI 1640 suplementado con B27 sin insulina [B27 (-)], el cual será el medio basal para el resto del protocolo, y se agregó el inhibidor de la vía de GSK3, CHIR99021 (CHIR), en una concentración 12  $\mu$ M para estas

células, durante 24hs. Al día siguiente, se retiró el medio, se realizó un lavado con PBS 1X para remover la mayor cantidad de muerte celular, en este momento se pueden visualizar al microscopio espacios que se generan en la monocapa luego de la muerte esperada por el CHIR, y se reemplazó con medio basal fresco por 48 hs. En el tercer día, se retiró la mitad del medio del *well* y se agregó la misma cantidad de medio basal fresco, se suplementó el medio con 5  $\mu$ M del inhibidor de la vía de Wnt, IWP2 y se cultivaron por 48 hs. En el día 5, se retiró el medio, se lavó con PBS 1X para remover las células muertas y se agregó medio basal por 2-4 días (cambiando el medio día por medio). Hacia el día 7 del protocolo comienzan a formarse estructuras en forma de red, luego entre los días 8-9 aproximadamente se espera ver regiones con actividad contráctil espontánea, indicando la presencia de cardiomiocitos. En el día 9, el medio fue reemplazado por RPMI suplementado con B27 con insulina [B27(+)].

Con el objetivo de enriquecer el porcentaje de cardiomiocitos del cultivo y depurar de células no deseadas se cultivaron las células por 6 días más con medio de selección. Para ello, los cardiomiocitos en día 11 del protocolo se replaquearon a una p100 previamente tratada con Geltrex, utilizando TrypLE 10X, y se mantuvieron por 24 hs en DMEM 20% SFB suplementado con iRock 10mM. El medio de selección consiste en cambiar el medio basal por medio RPMI sin glucosa, 213  $\mu$ g/mL L-Ácido Ascórbico 2-Fosfato + 500  $\mu$ M L-Glutamina g/ml BSA para cultivo celular + 7 mM Lactato (Sigma). En el día 18, los cardiomiocitos se mantuvieron nuevamente con el medio basal RPMI + B27 (+) hasta el fin del protocolo a día 21 (Figura 5).

#### 4.3.2. Protocolo de maduración de cardiomiocitos

Los cardiomiocitos derivados del protocolo de diferenciación descrito se asemejan a cardiomiocitos fetales. Para lograr obtener cardiomiocitos más similares a los post-natales y así asemejar un poco más a un cardiomiocito adulto se llevó a cabo un protocolo de maduración en el que los cardiomiocitos de día 21 se mantuvieron en medio de maduración hasta el día 38. Este medio consistió en el medio DMEM con baja glucosa suplementado con hormona T3 en una concentración de 4 nM, dexametasona 100 ng/mL, un agonista de



moléculas pequeñas del PPAR $\alpha$  1  $\mu$ M y ácido palmítico 200  $\mu$ M en medio DMEM con bajo contenido de glucosa.

### 4.3.3. Tratamiento de cardiomiocitos con medio pro-adipogénico

Las células fueron sometidas a un medio de cultivo pro-adipogénico (Kit de Diferenciación de adipogénesis StemPro) diseñado para inducir en las células madre mesenquimales su participación en la ruta de la adipogénesis y la generación de adipocitos. Este modelo experimental permitió evaluar la respuesta de las células a un ambiente rico en lípidos, proporcionando información sobre su capacidad de adaptación metabólica y su propensión a la diferenciación adipogénica. A día 38 de la diferenciación cardíaca post-maduración, se cambió el medio de cultivo por el medio pro-adipogénico. Este medio se mantuvo por una semana, renovándose cada 2 o 3 días.

## 4.4. Técnicas de Biología Molecular utilizadas

### 4.4.1. Extracción de ADN Genómico

Para la extracción del ADN genómico, se partió aproximadamente de  $2 \times 10^5$  células disociadas. Estas fueron centrifugadas, se realizó un lavado con PBS y se centrifugaron nuevamente. Se resuspendió el *pellet* en 100  $\mu$ l de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatina, 0.5% NP-40, 0.5% Tween-20), se agregó 1  $\mu$ l de Proteinasa K (100 ng/ $\mu$ l) y se incubaron las muestras durante 1 hora a 60°C en agitación. Para inactivar la actividad de la enzima, las muestras se incubaron 15 min a 95°C. El ADN se precipitó en frío con 600  $\mu$ l de isopropanol 100% durante 30 min a -20°C. Las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min a 4°C, se lavó el *pellet* de ADN con etanol 70%. Las muestras fueron vortexeadas brevemente y centrifugadas de nuevo a 12.000 g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y los *pellets* fueron secados con las tapas abiertas entre 10-15 minutos. Los *pellets* fueron resuspendidos en 30  $\mu$ l de agua milliQ. Se incubaron las muestras

a 65°C durante 1 hora para favorecer la solubilización del ADN genómico. La concentración de ADN (ng de ADN/μl de solución) fue cuantificada en espectrofotómetro NanoDrop 1000 y guardadas a -20°C hasta su utilización.

#### 4.4.2. Detección de contaminación con *Mycoplasma* sp.

Rutinariamente, en el laboratorio controlamos los cultivos celulares para la detección de contaminación con bacterias del género *Mycoplasma* sp. Para ello, se extrae ADN genómico de las distintas líneas celulares a analizar y realizamos reacciones de PCR punto final con cebadores que amplifican una secuencia de ADN de 500 pb conservada en este género de bacterias. Para verificar la eficiencia de la reacción utilizamos un control positivo de muestra de ADN genómico de *Mycoplasma* sp., dado que ante la ausencia de contaminación no obtendremos producto de amplificación. Los productos de la reacción fueron corridos en un gel de agarosa 1,5% m/v y revelados en el transiluminador (Foto Analyst Investigator FX, Fotodyne).

	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')
Mycoplasma	ACACCATGGGAGYTGGTAAT	CTTCTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT

**Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados para la detección de contaminación por *Mycoplasma***

#### 4.4.3. Extracción de ARN total

Se purificó el ARN total utilizando el reactivo TRIzol Reagent (Ambion, cat no. 15596018) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se resuspendió el pellet celular en un volumen óptimo de Trizol según el número de células de las que se partió para luego ser conservado a -80°C hasta su procesamiento. Una vez descongelados a temperatura ambiente, se procedió a la extracción orgánica con 0,2 volúmenes de cloroformo (Merck), se mezcló vigorosamente con vortex por 15 segundos y se incubaron por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó el lisado a 13.000 g a 4°C por 15 minutos. Esto

generó una separación en 3 fases, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf, la cual contiene exclusivamente el ARN. Se adicionaron 0,6 volúmenes de isopropanol y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 16.000 g a 4°C por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con etanol 70%. Finalmente, se resuspendió el pellet en agua libre de nucleasas y se incubaron las muestras en un termobloque a 55°C por 10 min para favorecer la resuspensión y rehidratación. La concentración de ARN aislado (ng de ARN/ $\mu$ l de solución) se determinó utilizando un espectrofotómetro automático NanoDrop 1000 controlado por el software ND-1000. Se verificó también que la relación OD260/OD280 fuese de entre 1,7 y 2 para asegurar una elevada pureza del ARN total obtenido. Este ARN fue conservado a -80°C hasta el momento de uso.

#### 4.4.3.1. Control de integridad de ARN

Se evaluó la integridad del ARN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% (m/v). Se evaluaron las presencias de las bandas de las subunidades ribosomales 28S y 18S.

#### 4.4.4. Tratamiento con ADNasa y Retrotranscripción

Para realizar la síntesis de ADN copia (ADNc) a partir de ARN, en primer lugar, todas las muestras de ARN fueron tratadas con la enzima ADNasa I para eliminar posibles restos de ADN en la muestra. Se utilizaron de 0,5 a 1  $\mu$ g de ARN total que fueron incubados en una mezcla con la enzima ADNasa I, la solución buffer de la enzima y agua milliQ libre de ADNasas y ARNasas hasta un volumen final de 10  $\mu$ l, los tubos se incubaron a 37°C en termobloque por 30 min. Se cortó la reacción con 1  $\mu$ l de una solución de EDTA 50mM e incubación a 65°C por 10 min. En este paso el ARN es desnaturalizado y pierde sus estructuras tridimensionales. Por último, las muestras se incubaron por 5 min en hielo, previo a realizar la reacción de retrotranscripción.

El ADNc se realizó a partir de la retrotranscripción de los ARN mensajeros (ARNm). Para ello, se utilizaron 0,5-1 µg de ARN total (previamente tratado con ADNasa I), 200 ng/µl de oligonucleótidos al azar (Invitrogen 48190-011), dNTPs 10 mM y 200 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV. La reacción se llevó a cabo utilizando el siguiente programa en termocicladora:

Paso 1: 5 minutos a 25°C (annealing o hibridación)

Paso 2: 60 minutos a 37°C (elongación)

Paso 3: 15 minutos a 70°C (inactivación de la enzima).

Finalmente, las muestras de ADNc se diluyeron 1/10 en agua Milli-Q y fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización en PCR en tiempo real.

#### 4.4.4.1. Diseño de cebadores para analizar los ADNc

Los pares de oligonucleótidos específicos (cebadores) utilizados en este trabajo para analizar la expresión de los genes estudiados fueron diseñados en el portal BLAST de NCBI con la aplicación primer-BLAST. Para evitar la amplificación de posible ADN genómico contaminante en las muestras, los cebadores fueron diseñados de manera tal que cada miembro del par sentido y antisentido hibride en un exón diferente del gen en estudio, en los casos en los que esto fue posible. Los cebadores fueron sintetizados por el servicio de la empresa Invitrogen o Macrogen. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se indican en la Tabla 4.

#### 4.4.5. PCR a punto final

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µl. Se colocaron los siguientes componentes por tubo de PCR: 10µl de Green-Taq Master Mix 2X, 1,5 µl de oligonucleótido sentido (cebador *forward*) 5 uM, 1,5 µl de oligonucleótido antisentido (cebador *reverse*) 5 uM, 2 µl de ADNc y completando el volumen a 20 µl con agua libre de ADNasas.

La reacción se llevó a cabo con el siguiente programa en la termocicladora:

Paso 1: 5 minutos a 94°C (Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa)

Paso 2: 30 segundos a 94°C (Desnaturalización del ADN molde)

Paso 3: 30 segundos a 60°C (Apareamiento)

Paso 4: 40 segundos a 72°C (Extensión)

Paso 5: 5 minutos a 72°C (Extensión Final)

Se realizaron 35 ciclos de los pasos 2 a 4. El producto de la reacción fue evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa con concentraciones de entre 0,8-2% m/v dependiendo del tamaño del amplicón. El gel fue visualizado en lámpara UV.

Para secuenciar el producto de PCR se aumentó el volumen final de la reacción a 30 µl, adaptando sus volúmenes.

Nombre del gen	Cebador Forward	Cebador Reverse
<i>PKG</i> _genómico	GCAAGCCCAGGACATACACA	TTCAGACTGGAGGCACCCTA
<i>PKP2</i> _genómico	GGATACCATGGAAACTAGGGATGT	TGCTGTCAAAAACGGTGTCTG

**Tabla 3. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR a punto final en sentido 5´-3´.**

#### 4.4.6. Digestión con Enzima de Restricción

Debido a la incorporación del sitio de corte de la enzima de restricción BamHI en el ssODN utilizado, se pudo determinar el éxito de la incorporación del mismo realizando la digestión del producto de PCR de ADN genómico lindante al sitio de edición. Para ello, se precipitó el producto obtenido de la reacción de la siguiente manera: para 45 µl de producto de PCR se agregó 150µl de agua y 22,2 µl de acetato de sodio. Se mezcló bien por inversión y se agregaron 555 µl de etanol 100%. Las muestras se incubaron a -20°C por 2 a 3 horas o hasta el día siguiente. Luego, las muestras se centrifugaron a 13.000g durante 15 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 15-30 µl de agua (dependiendo del tamaño del pellet) y se midió la concentración de ADN en el espectrofotómetro automático NanoDrop 1000.

El producto de PCR purificado se digirió con la enzima BamHI. Para la digestión se utilizaron aproximadamente 500 ng de ADN, 2 µl de buffer K, 1 µl de enzima BamHI y agua

hasta 20 µl. Las muestras se incubaron durante 2 horas a 30°C en termobloque. Para verificar la digestión de la enzima se realizó un gel de agarosa 1,5% p/v durante aproximadamente 1 h a un voltaje constante de 100 V y se evaluó por transiluminiscencia.



**Figura 15. a) Secuencia original del gen de PKG. b) Secuencia del ssODN con mutación puntual donde se muestra el nuevo sitio de restricción para la enzima BamHI en azul.**

#### 4.4.7. PCR en tiempo real o cuantitativa

La expresión génica se cuantificó mediante PCR cuantitativa (qPCR) realizando una mezcla volumen final 10 µl. Se utilizaron 5 µl de la mezcla de reacción FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche), 0,5 µM de cebadores específicos y 2 µl de ADNc previamente diluido 1/10. Cada muestra fue corrida por duplicado. Se utilizó el termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) y el programa utilizado fue el siguiente:

Paso 1: Activación de la enzima UDG (uracil-DNA glycosylase) para degradación de posibles amplicones contaminantes (que contiene uracilo): 2 minutos a 50°C

Paso 2: Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 10 minutos a 95°C

Paso 3: Desnaturalización: 15 segundos a 94°C

Paso 4: Apareamiento y extensión: un minuto a 60°C

Se realizaron 40 ciclos de los pasos 3-4. 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.

Cada experimento se realizó al menos con tres réplicas biológicas. Los datos crudos fueron exportados y procesados usando el programa LinReg PCR (v2017.1)(Ruijter *et al.*, 2009). El mismo permite el cálculo de una cantidad inicial de ADNc teórico,  $N_0$ , a partir del cálculo de la eficiencia de amplificación para cada par de cebadores utilizado. En cada experimento se evaluó la expresión de dos genes normalizadores o housekeeping, GAPDH y RPL7. Se utilizó la media geométrica de su  $N_0$  para normalizar la expresión de los genes en estudio. Los  $N_0$  fueron promediados entre réplicas técnicas y luego normalizados por la media geométrica de los genes housekeepings. Finalmente, se relativizaron los valores al promedio de las réplicas biológicas en la condición control, o tiempo inicial en experimentos de progresión temporal.

Nombre del gen	Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>
<i>AFP</i>	TGCTGGATTGTCTGCAGGATG	ACGTTCCAGCGTGGTCAGTTT
<i>B-CATENINA</i>	GTGGGCTGCAGAAAATGGTTG	AGACAGATAGCACCTTCAGCA
<i>BRACHYURY</i>	TCCCAGGTGGCTTACAGATGA	GGTGTGCCAAAGTTGCCAAT
<i>CONEXINA 43</i>	GTGCCTGAACTTGCCTTTTC	CCCTCCAGCAGTTGAGTAGG
<i>CTNT</i>	ATGATGCATTTTGGGGGTTA	CAGCACCTTCCTCCTCTCAG
<i>CYCLIN-E1</i>	GCAGGATCCAGATGAAGAAATG	TATTGTCCCAAGGCTGGCTC
<i>DESMINA</i>	GAGACCATCGCGGCTAAGAA	TCAGGGAATCGTTAGTGCCC
<i>DSC2</i>	AACGGAGGTCAGGAGACCAT	TTTTTCACCAAGACGGGGCT
<i>DSG2</i>	TTCGGGAGGGAGAGGATCTG	TCCTCTTG CATCCAAAGCGT
<i>DSP</i>	GTGTCCTGGCACTACTGCAT	CTTCTGGGCATCGGTGAACT
<i>E-CADHERINA</i>	AAAGGCCCATTTCTCTAAAAACCT	TGCGTTCTCTATCCAGAGGCT
<i>GAPDH</i>	ACAGCCTCAAGATCATCAG	GAGTCCTTCCACGATACC
<i>ISLET1</i>	CACAAGCGTCTCGGGATTGTGT	AGTGGCAAGTCTTCCGACAA
<i>MESP1</i>	GCCACTTCACACCTCGGGCTC	CCAGGCCGCAGAGAGCATCCA
<i>MYH7</i>	TTGGCCCCTTTCTCATCTG	TGAGGTCAAAGGCCTGGTC
<i>N-CADHERINA</i>	AGGCTTCTGGTGAAATCGCA	TGCAGTTGCTAAACTTCACATTG

Nombre del gen	Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>
<i>NANOG</i>	AAAGGATCTTCACCTATGCC	GAAGGAAGAGGAGAGACAGT
<i>NESTINA</i>	GCGTTGGAACAGAGGTTGGA	CCAGGCTGAGGGACATCTTG
<i>NKX 2.5</i>	CCCACGCCCTTCTCAGTCAA	GTAGGCCTCTGGCTTGAAGG
<i>OCT4</i>	CTGGGTTGATCCTCGGACCT	CACAGAACTCATACGGCGGG
<i>PDRM16</i>	ATGCCGACTTTTGGGAAGGG	GGAGTGTCTTCGAAAGGGA
<i>PKG</i>	GCTCACCAAAGTCTCAACG	GATGCCACCCGACTTGAAGA
<i>PKP2</i>	CTTCTAAACACCGGGGGCAT	AGTGGTAGGCTTTGGCAGTC
<i>PPARG</i>	GGAAGACCACTCCCACTCCT	GGAGATGCAGGCTCCACTTT
<i>RPL7</i>	AATGGCGAGGATGGCAAG	TGACGAAGGCGAAGAAGC
<i>SOX17</i>	CCAAGGGCGAGTCCCGTAT	AGCGCCTTCCACGACTTG
<i>SOX2</i>	AGCATGGAGAAAACCCGGTACGC	CGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG T
<i>SPARC</i>	ACCAGCACCCCATGACG	AGGTCACAGGTCTCGAAAAAGC
<i>TBP</i>	AAGACCATTGCACTTCGTGCC	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC
<i>TBX6</i>	CAGCCTACCAGAACCACAG	GTGTGTCTCCGCTCCCATAG
<i>TCF21</i>	ACCTGACGTGGCCCTTTATG	TAGCGGGATCCTTCCTCCAT
<i>TUBB3</i>	TGGGCGACTCGGACTTGC	CCACTCTGACCAAAGATGAAATTG

**Tabla 4. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa en sentido 5'-3'**

## 4.4.8. Análisis de proteínas por Western Blot

### 4.4.8.1. Extracción de proteínas

Los extractos de proteínas totales fueron obtenidos de las células en sus distintos estadios utilizando el buffer de extracción RIPA (Sigma) suplementado con inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail set I, Calbiochem). Las muestras se incubaron 10 minutos en hielo y se guardaron a -80°C hasta su utilización. Una vez descongeladas, se centrifugaron 5 minutos a 10.000 rpm, se recuperaron los sobrenadantes y se transfirieron a un nuevo eppendorf.



#### 4.4.8.2. Cuantificación y preparación de muestras

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método del ácido bicinconínico (BCA, del inglés Bicinchoninic Acid Protein Assay) (Pierce) empleando albúmina sérica bovina (ASB) como patrón, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones de proteínas se leyeron utilizando un espectrofotómetro (iMark, Microplate Reader, Bio-Rad), con el programa Microplate Manager Software (Bio-Rad). Se leyó la absorbancia a 595 nm, se graficó la curva de calibración y se calculó la concentración de proteínas de la muestra a partir de la curva utilizando la siguiente fórmula:  $x = ab - y$ .

Las muestras se prepararon con 20 µg de proteínas a las cuales se les agregó la solución de siembra (generar carga negativa a la muestra) con B-mercaptoetanol (para reducir puentes SH-SH) y se llevó a un volumen de 20 µl con agua. Las muestras se calentaron entre 3-5 min a 100°C para completar el proceso de desnaturalización.

#### 4.4.8.3. Protocolo de Western Blot

Posteriormente a la cuantificación, las proteínas se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE en un gel de 10% de acrilamida durante 2:30 horas a 100 Volts. Las muestras se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (General Electric) durante 1 hora a 400 mA constantes. Finalizada la electrotransferencia se bloqueó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en solución PBS-Tween que contiene 5% m/v de leche. La membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos (Tabla 5), preparados en PBS-Tween más el agregado de 3% m/v de leche. Luego se realizaron 2 lavados rápidos y 2 lavados de 30 minutos en PBS-Tween. Seguidamente se incubaron las membranas durante 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes (acoplado a la enzima peroxidasa) (Tabla 6). Por último, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween. El revelado de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo comercial SuperSignal West Femto (Thermo Scientific), reacción que fue captada por un detector de quimioluminiscencia (ImageQuant LAS 4000 mini).

Las soluciones utilizadas en la electroforesis fueron: Solución de siembra: Tris 40 mM pH = 6,8, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,006%, SDS 1% y  $\beta$ -Mercaptoetanol 0,1%; Solución de Corrida: Tris 25 mM pH = 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%; Solución de Transferencia: Tris 25 mM pH = 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%, Metanol 20%, PBS-Tween: Tween-20 (Sigma-Aldrich) 0.1% V/V en PBS. Los geles utilizados fueron de poliacrilamida al 10% (gel de resolución): -Para gel 10%: 2 ml de acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8% (BIO-RAD), 1,5 ml de Tris HCl 1,5M pH = 8,8, 60  $\mu$ l SDS 10%; 60  $\mu$ l de persulfato de amonio 10%, 2,4 ml de H<sub>2</sub>O destilada y 6  $\mu$ l de tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich). -Gel de poliacrilamida concentrador: 0,4 ml de acrilamida 30%-bisacrilamida, 0,8%, 0,375 ml de Tris-Cl 1 M pH = 6,8, 30  $\mu$ l SDS 10%, 30  $\mu$ l APS 10%, 2,16 ml de H<sub>2</sub>O destilada y 4  $\mu$ l de TEMED.

Anticuerpo Primario	Especie	Marca	N.º Catálogo	Dilución
PKG	Rabbit	Abcam	ab184919	1/1000
PKP2	Mouse	Abcam	ab151402	1/1000
GAPDH	Mouse	Santa Cruz	sc-32233	1/5000

**Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot.**

Anticuerpo Secundario	Especie	Marca	N.º Catálogo	Dilución
anti- Mouse IgG	Goat	Life Technologies	G-21040	1/10000
anti- Rabbit IgG	Goat	Invitrogen	G21234	1/10000

**Tabla 6. Anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot.**

#### 4.4.9. Citometría de Flujo

##### 4.4.9.1. Proteínas de membrana

Las células fueron levantadas unicelularmente con TrypLE 1X. Luego de la centrifugación, las células se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS con 0.1% m/v de albúmina (PBS/ALB 0.1%). La muestra se dividió en 4 tubos con 50  $\mu$ l cada uno. Cada tubo se llevó a una dilución 1:100

del anticuerpo primarios conjugados correspondientes y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente (TA). A continuación, las células fueron lavadas dos veces y resuspendidas en 250 µL de PBS/Albúmina 0,1% para ser analizadas en un citómetro de flujo BD Accuri C6. Se utilizaron células sin marcar como controles para seleccionar la población correspondiente a las células en el citómetro y poder determinar las poblaciones positivas para cada marcador. Al menos 15.000 eventos fueron tomados con un Citómetro BD Accuri C6 a baja velocidad. Los datos fueron analizados con el software *FlowJo*.

#### 4.4.9.2. Proteínas nucleares y citoplasmáticas

Las células fueron levantadas unicelularmente con TrypLE 1X o 10X dependiendo el estadio de la célula. Luego de la centrifugación, las células fueron fijadas por 15 minutos con 200 µl de paraformaldehído 4% m/v (PFA 4%) a TA. Luego de 3 lavados con PBS 1X, las células se permeabilizaron y bloquearon con la solución de permeabilización (SP: PBS 1X, Tritón 0,1%, Suero de cabra o burro 3%) por 30 minutos a TA. Luego se incubaron los anticuerpos primarios diluidos 1:200 en BP por 30 minutos a TA o, alternativamente, durante 16 horas a 4°C. A continuación, se realizaron tres lavados con solución de lavado (SL: PBS 1X, Tritón 0.1%) y se incubaron los anticuerpos secundarios diluidos 1:400 en SP por 1 hora en oscuridad. Finalmente, se realizaron 3 lavados con SL y se resuspendieron los pellets celulares en 200-300 µl de PBS 1X. Al menos 15.000 eventos fueron tomados con un Citómetro BD Accuri C6 a baja velocidad. Los datos fueron analizados con el software *FlowJo*.

Anticuerpo Primario	Especie	Marca	N.º Catálogo	Dilución
CD326	Mouse	Molecular Probes	A15782	1/200
cTnT	Mouse	Invitrogen	MA1-16687	1/200
CD56	Mouse	Molecular Probes	A15704	1/200

**Tabla 7. Anticuerpos primarios utilizados para citometría de flujo.**

#### 4.4.10. Microscopía de Fluorescencia

#### 4.4.10.1. Células sembradas en placa *multiwell-24*

Se fijaron las células con PFA 4% por 10-20 minutos a TA y se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X. La permeabilización y bloqueo se realizaron agregando SP (SP, ver apartado 5.10) por 30-40 minutos a TA. Para la incubación del anticuerpo primario se realizaron las diluciones de los anticuerpos correspondientes (dilución 1:300 en SP) y se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con SL (SL, ver apartado 5.10) y se incubaron los anticuerpos secundarios (dilución 1:400 en SP) con 0,5 µg/ml de DAPI por una hora a TA en oscuridad. Luego se realizaron 3 lavados en SL y se mantuvieron las muestras a 4°C en PBS 1X hasta la obtención de imágenes. Se utilizó el microscopio digital invertido EVOS XL Core Imaging System (Thermo Fisher Scientific) con condiciones fijas de exposición y brillo (determinadas manualmente mediante un análisis preliminar de los preparados). Se guardaron las capturas en archivos formato tiff en 8 bits. Posteriormente, se procesaron las imágenes crudas con el software Fiji v2.1.0/1.53q. Se determinaron los valores mínimos y máximos de fluorescencia para cada canal por cada réplica biológica.

#### 4.4.10.2. Células sembradas en vidrio

Se utilizaron vidrios cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro y 0,13-0,17 mm de grosor (HDA COVER GLASS). Los vidrios fueron esterilizados bajo mechero con etanol 100% y fuego, luego fueron colocados en un tubo cónico de 50 ml estéril y almacenados hasta utilizar en cultivo celular. Los vidrios se retiraron del tubo y colocados de a uno dentro de una *multiwell-24*. Se los pretrató con Geltrex durante 1 hora en estufa a 37°C. Las células fueron cultivadas sobre los vidrios del mismo modo que dentro de las placas *multiwell*.

Para la inmunomarcación, el medio de cultivo fue retirado y se realizó un lavado con PBS 1X. La fijación, la permeabilización y el bloqueo se realizaron del mismo modo que para las placas *multiwell*. Para la marcación con el anticuerpo primario, el vidrio fue retirado del *well* con una pinza y colocado boca abajo sobre una gota de 15 µl de la dilución del anticuerpo

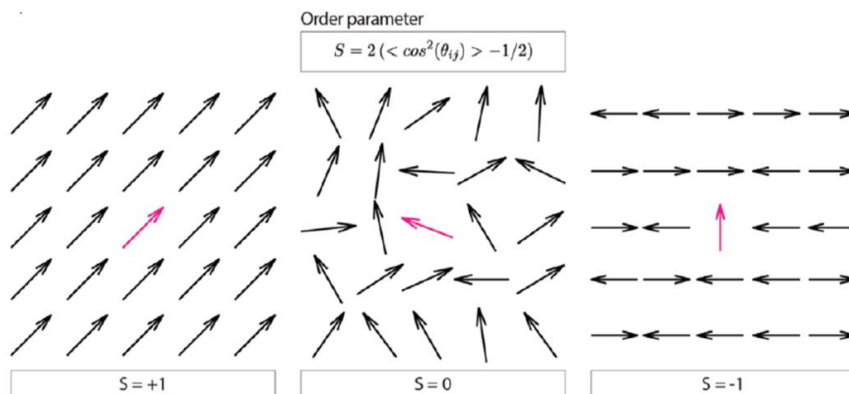
primario (dilución 1:300 en SP) y fueron incubados durante 16 horas a 4°C en cámara húmeda. Luego, el vidrio fue tomado con una pinza y colocado boca arriba en un *well*. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con SL. Posteriormente, para la marcación de las muestras con el anticuerpo secundario y los núcleos, el vidrio fue retirado del *well* con una pinza y colocado boca abajo sobre una gota de 15 µl de la dilución del anticuerpo secundario (dilución 1:400 en SP) con 0,5 µg/ml de DAPI. El anticuerpo secundario fue incubado 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Luego de la incubación, el vidrio fue colocado nuevamente dentro de un *well* con una pinza y se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con 1 ml de SL. La obtención de imágenes se realizó del mismo modo que para las placas *multiwell*.

#### 4.4.10.3. Tinción con faloidina

Para la tinción con faloidina (Invitrogen), las células se fijaron, bloquearon y permeabilizaron como se explicó anteriormente. La solución de uso se encuentra en una concentración de 165µM (1000X) y se conjugó junto con los anticuerpos secundarios. Luego se continuaron los lavados de la misma manera que con las marcaciones con anticuerpos y se obtuvieron las imágenes utilizando el microscopio digital invertido EVOS.

#### 4.4.10.4. Análisis de imágenes de microscopía

Se utilizó análisis bioinformático cuantitativo para medir el grado de alineación del citoesqueleto de F-actina, donde los valores más cercanos a 1 indicarían un patrón isotrópico (alineado) y mientras más cerca del 0, tendrían un patrón más anisotrópico (no alineado).



**Figura 16. Imagen representativa de los valores obtenidos del parámetro de orden.** (Imagen obtenida de Marcotti y colab. [78])

Anticuerpo Primario	Especie	Marca	N.º Catálogo	Dilución
CTNT	Mouse	Invitrogen	MA1-16687	1/200
DSP	Rabbit	Abcam	AB71690	1/100
N-CADH	Mouse	Cell Signaling	14215	1/100
NESTINA	Mouse	Millipore	MAB5326	1/50
NKX 2.5	Rabbit	Santa Cruz	SC-14033	1/50
OCT4	Mouse	Santa Cruz	sc-5279	1/200
PKG	Mouse	Invitrogen	13-8500	1/50
PKG	Rabbit	Abcam	ab184919	1/200
PKP2	Mouse	Abcam	ab151402	1/200
PKP2	Rabbit	Invitrogen	PA5-53144	1/50
SOX17	Mouse	Invitrogen	MA5-24885	1/50
SOX2	Rabbit	Cell Signaling	3579	1/50

**Tabla 8. Anticuerpos primarios para inmunofluorescencia.**

Anticuerpo Secundario	Especie	Fluoróforo	Marca	Nº Catálogo	Dilución
anti- Mouse	Donkey	488	Invitrogen	A21202	1/400
anti- Rabbit	Goat	488	Invitrogen	A11034	1/400
anti- Mouse	Goat	594	Invitrogen	A11032	1/400
anti- Rabbit	Donkey	594	Invitrogen	A21207	1/400

**Tabla 9. Anticuerpos primarios para citometría de flujo e inmunofluorescencia.**

#### 4.4.11. Tinción con Oil Red O

Para evaluar la acumulación de lípidos intracelulares, se realizó la tinción con Oil Red O siguiendo el siguiente protocolo: las células fueron lavadas con PBS frío y fijadas con formaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Posteriormente, se

realizaron dos lavados con PBS para eliminar residuos no específicos. Las células fueron incubadas con la solución de trabajo de Oil Red O (preparada en una proporción de 60% de colorante y 40% de agua) a temperatura ambiente durante 50-60 minutos. Luego de la tinción, se llevaron a cabo lavados con PBS para remover el exceso de colorante. Para la cuantificación de lípidos intracelulares, el colorante retenido en las células fue extraído mediante incubación con isopropanol al 100% y su absorbancia fue medida a 490 nm utilizando un espectrofotómetro. Se utilizó isopropanol como blanco para normalizar los valores obtenidos entre los diferentes grupos experimentales.

#### 4.4.12. Tinción con Cristal Violeta

Las células se incubaron con solución Cristal Violeta por 30 minutos en *rocker* a temperatura ambiente. Luego, se retiró el excedente y se llevaron a cabo 3 lavados con PBS. Una vez comprobada la tinción bajo el microscopio, se capturó una imagen del *well* completo por medio de un microscopio óptico de máxima resolución (Microscopio Wide Field Axio Observer). El porcentaje de área ocupada por células en el *well* se determinó mediante el procesamiento de imágenes con el software Fiji (ImageJ). Finalmente, se utilizó esta área para normalizar los valores de absorbancia obtenidos con el Oil Red O, permitiendo una comparación precisa entre las diferentes muestras y líneas celulares.

#### 4.4.13. Microscopía de Transmisión Electrónica

A día 38 del protocolo de diferenciación cardíaca los cardiomiocitos maduros fueron lavados con PBS y fijados en una mezcla Karnovsky conteniendo 2% (p/v) de glutaraldehído y 4% (p/v) de formaldehído en buffer cacodilato 0.1M a pH 7.3. Posteriormente, las células se despegaron de la base de las placas con un scraper y se centrifugaron a 1000 g; los *pellets* se mantuvieron en la solución fijadora por 2 horas y luego se post-fijaron con tetróxido de osmio al 1% en buffer cacodilato durante 1 hora. A continuación, se deshidrataron en una serie de acetonas de graduación creciente y se incluyeron empleando una resina epoxi: Spurr

(Electron Microscopy Sciences, USA). La polimerización de la resina se llevó a cabo en una estufa a 60°C durante 48 hs.

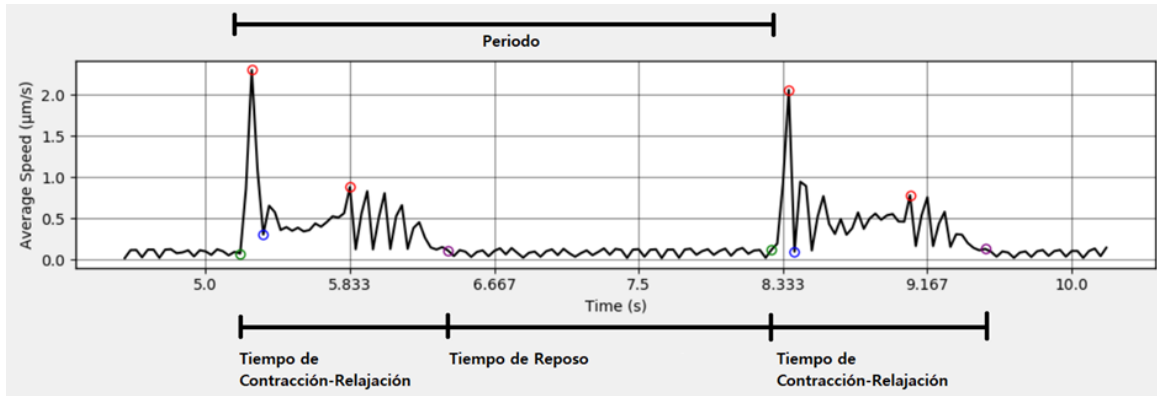
Una vez incluido el material, se realizaron las secciones ultrafinas de 90nm en un ultramicrotomo RMC Power Tome -XL empleando una cuchilla de diamante y se montaron en grillas de níquel de 200 mesh. Finalmente, las grillas se examinaron utilizando un microscopio electrónico Hitachi HT 7800 (Hitachi, Tokio, Japón) operado a 80 kv y fueron fotografiadas con una cámara NS 15 AMT (Advanced Microscopy Techniques Corp., Woburn MA, EE.UU.).

Con las imágenes obtenidas se realizaron mediciones de los largos de los sarcómeros y las distancias entre los desmosomas considerando la cantidad de estructuras encontradas en  $\mu\text{m}$  de uniones celulares medidas (se muestra un promedio de lo medido). Las distancias de los desmosomas se determinaron considerando la cantidad de estructuras encontradas respecto a  $\mu\text{m}$  de uniones celulares medidas (se muestra un promedio de lo medido).

#### 4.4.14. Análisis de la Contracción del Cardiomiocito

Para analizar las características de la contracción de los cardiomiocitos, se realizaron grabaciones de los mismos en distintos días del protocolo: día 21 (cardiomiocitos en estado embrionario antes de comenzar el protocolo de maduración) y día 38 (cardiomiocitos maduros). Los videos se capturaron con microscopio con su respectiva extensión de cámara (Nikon DS-L3) mientras se utilizaba el programa NIS-elements (Nikon) en el ordenador para controlar la configuración de la visualización, con una duración estándar de 20 segundos y un aumento de 200x. El análisis de la contracción se realizó con el software de código abierto "ContractionWave", que cuantifica la contracción celular mediante un algoritmo de densidad de flujo óptico. El software permite visualizar la señal de contracción, marcando puntos clave como el inicio de la contracción, el punto de máxima rapidez, el final de la contracción y la relajación [79].





**Figura 17. Ejemplo de señal obtenida de la contracción de cardiomiocitos con el software ContractionWave.** En la imagen se pueden observar los siguientes puntos importantes que utiliza el *software* para el análisis: verde: comienzo de la contracción; 1er punto rojo: punto máximo de velocidad de contracción; azul: final del tiempo de contracción; 2do punto rojo: máximo de relajación; violeta: finalización del tiempo de contracción-relajación.

## 4.5. Secuenciación masiva de ARN total

Se sembraron las células para realizar el protocolo de diferenciación cardíaca y se recolectaron muestras de ARN total a días 0, 7, y 21 de 3 protocolos independientes de la línea PKG-KO y control *wild-type*. El ARN total fue purificado como fue descrito previamente utilizando el reactivo TRIzol. La concentración obtenida de ARN se midió por espectrofotometría utilizando el equipo Qbit y se alicuotaron 5 µg de masa en un nuevo tubo. Se completó el volumen a 100 µl con agua y se precipitaron las muestras con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5,5 y 2 volúmenes de etanol 100%.

Las muestras fueron transportadas en este formato a las instalaciones de MacroGen (Corea del Sur), donde se construyó la biblioteca y se realizó la secuenciación. Brevemente, se utilizó el kit Truseq Stranded Total RNA con depleción de ARN ribosomal. Luego, se secuenciaron las bibliotecas con un nivel de profundidad de aproximadamente 35 millones de lecturas pareadas.

Los archivos de datos crudos (fastq) fueron luego recibidos mediante enlace electrónico, descargados y procesados. En primer lugar, se verificó la calidad de las lecturas y la presencia de secuencias adaptadoras mediante el software FastQC3. Luego, se alinearon las lecturas contra el genoma de referencia humano GRCh38 (Gencode versión 394) utilizando el software STAR y el archivo GTF primary assembly de la misma versión. Se utilizó el módulo GeneCounts del mismo programa para generar las tablas de cuantificación de lecturas crudas de genes. Los reportes generados por FastQC y STAR fueron compilados luego con el software MultiQC para evaluar gráfica y rápidamente los estadísticos de calidad y alineamiento.

Luego, se utilizaron las tablas de cuantificación génica para continuar con el análisis de expresión diferencial de genes utilizando el paquete DESeq2 del software libre R. Se filtraron aquellos genes que no superaron el límite de 10 lecturas. Luego, se realizaron los cálculos de expresión diferencial con parámetros estándar y aplicando la fórmula 'Genotipo Tiempo + Interacción'. El análisis de ontología génica fue realizado utilizando los paquetes clusterProfiler y enrichR. Brevemente, se utilizaron los genes diferencialmente expresados para cada condición analizada, ordenados en orden descendiente de log2FoldChange, filtrados por padj. Las tablas obtenidas fueron luego representadas gráficamente con el paquete ggplot2.

## 4.6. Análisis Estadístico

Los resultados experimentales son presentados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) para al menos tres réplicas biológicas. El análisis estadístico de la RT-qPCR fue realizado mediante análisis de ANOVA de un factor en bloques aleatorizados seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey o prueba de t de Student con corrección de Welch, utilizando el programa GraphPad PRISM versión X. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando los valores de p fueron menores a 0,05 entre los tratamientos indicados ( $p < 0.05$ ).

## 5. Resultados

### 5.1. Capítulo 1: Generación de una línea celular *knock-out* para el gen de la Placoglobina.

Como mencionamos previamente en la introducción, la DA es generada principalmente por mutaciones en los genes desmosomales, como por ejemplo la *PKG*. En primer lugar, nos propusimos estudiar el impacto de la falta de esta proteína desmosomal en la diferenciación de células madre pluripotentes humanas a cardiomiocitos. Para esto, buscamos realizar ensayos de pérdida de función realizando la generación de una línea *Knock-Out* (KO) de este gen mediante la técnica de edición génica CRISPR/Cas9. El objetivo general de este capítulo es desarrollar la técnica de edición génica CRISPR/Cas9 para ediciones puntuales por recombinación homóloga, generar una línea de CMPi PKG-KO para así realizar estudios de pérdida de función de esta proteína y evaluar las consecuencias fenotípicas en la diferenciación cardíaca y en los cardiomiocitos.

#### 5.1.1. Puesta a punto para la generación de clones celulares editados genéticamente mediante CRISPR/Cas9

El primer objetivo de este capítulo fue la puesta a punto del método para la generación de líneas clonales de CMPi editadas genéticamente utilizando CRISPR/Cas9. El plásmido utilizado codifica la endonucleasa Cas9 y expresa un ARNg dirigido a la secuencia específica presente en el gen a editar, así como también un casete para selección con el antibiótico eucariota puromicina. Los dos ARNg se diseñaron para estar dirigidos al primer exón del gen de la *PKG*. Además de este plásmido, se transfectó una secuencia molde (ssODN). Como se comentó en el capítulo de materiales y métodos, estos ssODNs son específicos para cada uno de los ARNg y homólogos a la zona de edición, aunque contienen una mutación puntual

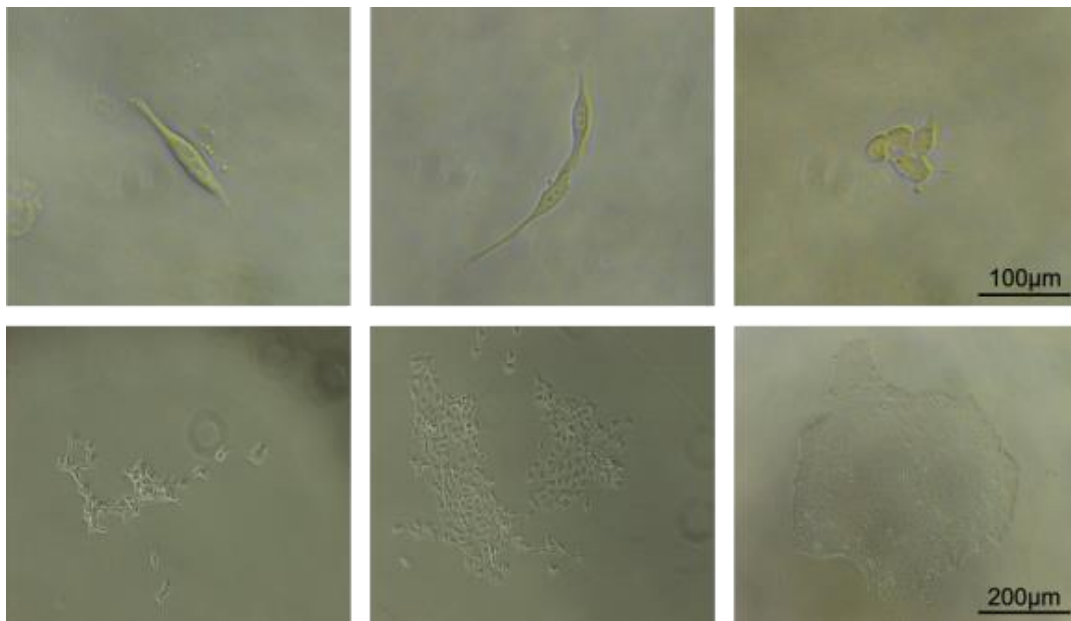
para generar un codón de stop prematuro y dos mutaciones silenciosas, una que modifica el PAM para evitar que la Cas9 vuelva a cortar en caso de una recombinación homóloga exitosa, y otra que genera un nuevo sitio de corte de la enzima de restricción BamHI.

Luego de la transfección, las células fueron seleccionadas con puromicina y se obtuvieron los *pools* celulares para cada una de las condiciones. Los *pools* celulares se sembraron en un *multiwell-6*, a una relación de 100 células por *well* con el objetivo de obtener líneas de CMPi clonales. Esta metodología permitió la formación de colonias celulares las cuales fueron luego picadas y transferidas a un nuevo *multiwell-24* de manera individual.

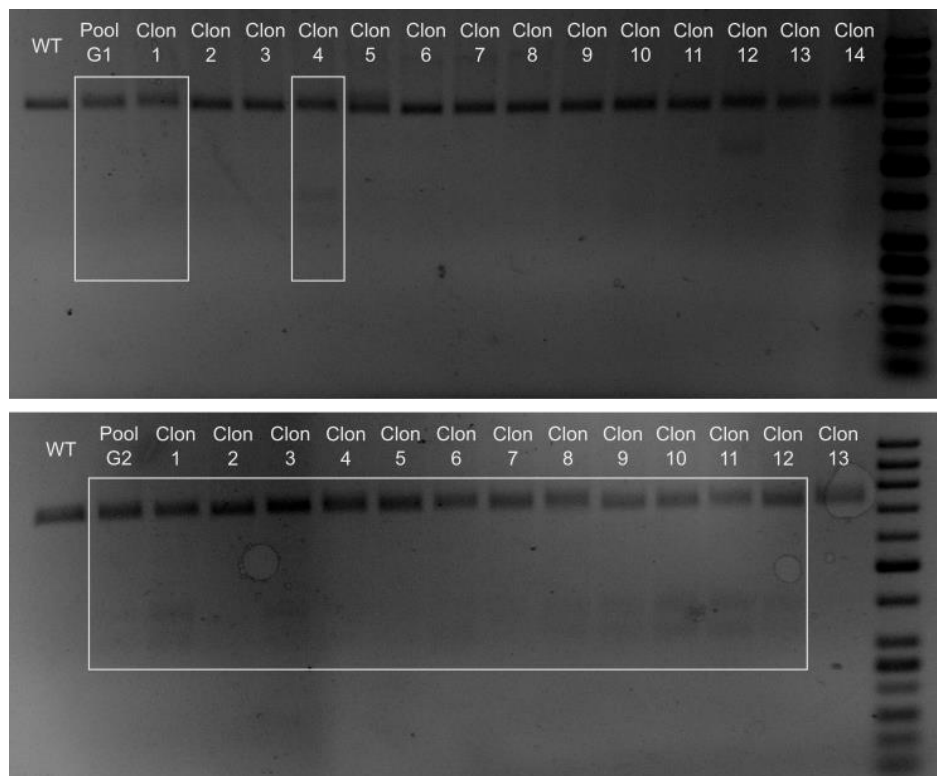
Realizamos el *screening* de los dos *pools* de células transfectadas con cada ARNg, analizando más de 10 clones por condición. Luego del corte con BamHI de los amplicones de PCR específicos, aquellos clones celulares que mostraron el patrón de corte esperado fueron seleccionados y enviados a secuenciar por Sanger.

El análisis mediante secuenciación por Sanger reveló un histograma con una mezcla de señales, indicando la presencia de células con diferentes secuencias genómicas dentro de los “clones” seleccionados, concluyendo entonces que los “clones” no estaban formados a partir de 1 única célula. Debido a esta heterogeneidad y al no lograr obtener un clon celular homocigota con la edición deseada, decidimos cambiar la estrategia de generación de clones.

Esta estrategia está explicada en detalle en el capítulo de 2.3 de materiales y métodos (Figura 18). Los amplicones obtenidos de los *pools* celulares, de los nuevos clones y de un control *wild-type* (WT) fueron sometidos a la digestión con la enzima de restricción BamHI. Dependiendo del ARNg + ssODN utilizado la eficiencia de edición de los guías fue diferente: 15.4% (n=2/14 clones) y 71.4% (n=10/13 clones) para el ARNg-1 y ARNg-2, respectivamente (Figura 19).



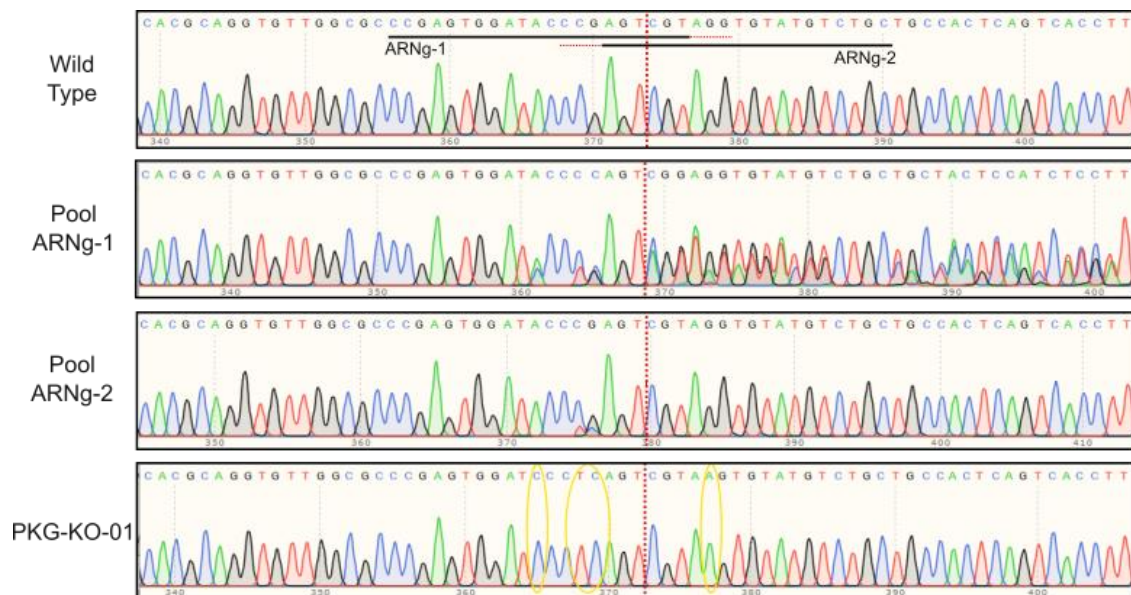
**Figura 18. Crecimiento de célula única.** Imágenes representativas tomadas con microscopio óptico a distintos días post selección clonal. Se observa cómo las células van proliferando y a los 10 días ya obtenemos una colonia suficientemente grande para pasar a otro *well*.



**Figura 19. Producto de PCR de la secuencia de *PKG* lindante al sitio de edición deseada digerido con la enzima BamHI.** En el gel de agarosa podemos observar con recuadros en blanco los *pools* y clones celulares que incorporaron el ssODN correctamente los cuales tienen el producto de PCR de *PKG* y 2 bandas más tenues de menor peso molecular correspondientes a la digestión de la enzima BamHI. Aquellos clones que no incorporaron el ssODN no pudieron ser digeridos por BamHI y en consecuencia sólo se observa la amplificación del gen *PKG*. **WT:** CMPi sin transfectar; **Pool G1:** *pool* de células transfectadas con el ARNg-1; **Pool G2:** *pool* de células transfectadas con el ARNg-2.

### 5.1.2. Generación de la línea celular PKG-KO.

Se secuenciaron por Sanger los *pools* celulares y 2 clones generados con cada uno de los ARNg para confirmar la correcta edición para generar la línea PKG-KO de los cuales se eligió uno para seguir trabajando con los objetivos del trabajo (PKG-KO-01) (Figura 20).



**Figura 20. Secuenciaciones por Sanger.** Histograma de las secuencias genómicas de las células *wild-type*, *pools* celulares de ambos ARNg y el clon correctamente editado PKG-KO-01. En amarillo: cambios de nucleótidos en el clon. Línea punteada roja: sitio de corte de la Cas9.

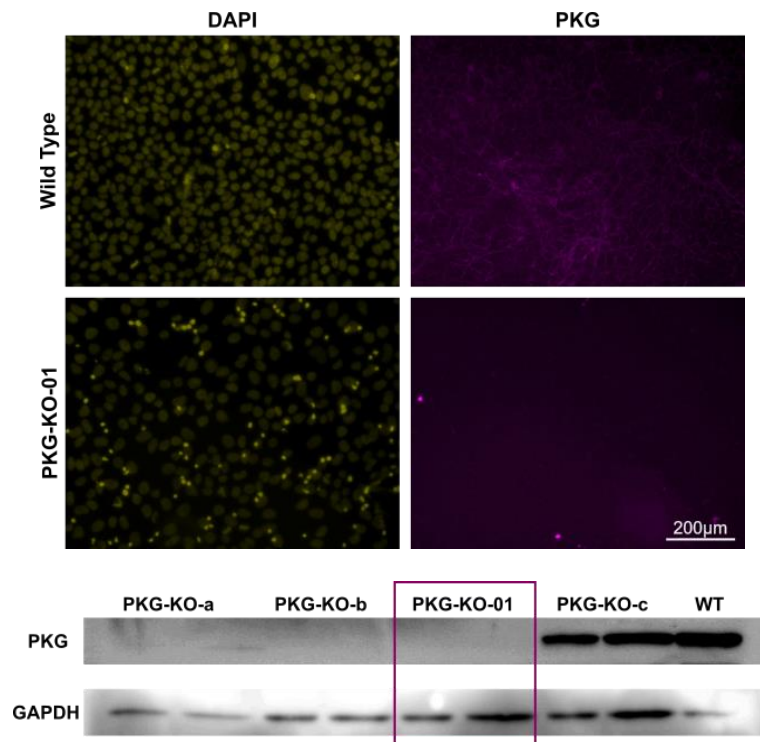
En el caso del *pool* celular se puede observar la presencia de diferentes secuencias a partir del sitio de corte de la Cas9 como consecuencia de los Indels generados al azar en las diferentes células, además de aquellas que se editaron correctamente. En la secuenciación

del clon PKG-KO-01 en cambio, se observan los cambios deseados de manera homocigota a partir de los cuales el codón codificante para una S en la posición 24 de PKG es modificado para generar un codón de stop (PKG, p.S24X). Como resultado, la traducción de la proteína se interrumpe antes de completar su secuencia funcional, lo que conduce a la pérdida de la función de la proteína. Las secuencias obtenidas tras la edición genética son las siguientes:

PKG *WT*: MEVMNLMEQPIKVTEWQQTYTYDSGIHSGANTCVPSVSSKGIMEEDEACG...

PKG-KO-01: MEVMNLMEQPIKVTEWQQTYTYD**X**

Posteriormente, la ausencia de la proteína PKG en las células fue confirmada mediante análisis de inmunofluorescencia y *Western blot* (Figura 21).

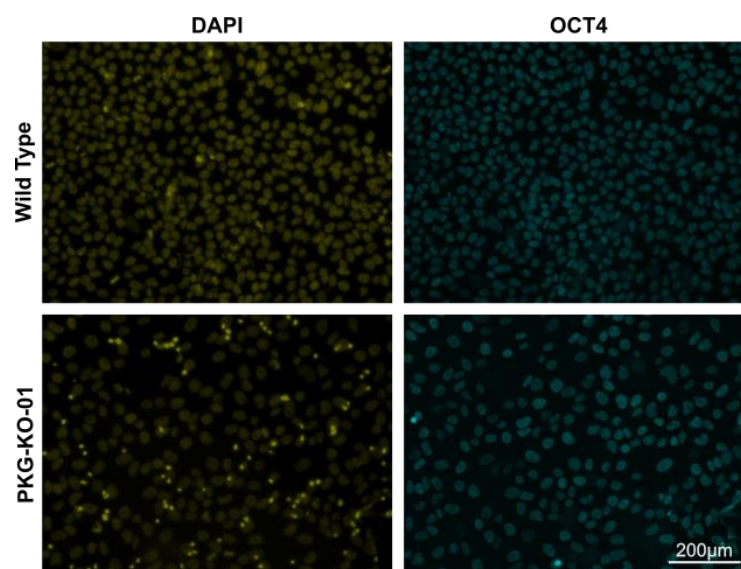


**Figura 21. Análisis de la expresión proteica de PKG.** Arriba: Detección por inmunofluorescencia de la proteína PKG (magenta) en células *wild-type* y el clon celular PKG-KO-01 usando un aumento de 400X. Se utilizó DAPI como marcación nuclear (amarillo). Barra de escala: 200µm. Abajo: Identificación de la ausencia de expresión proteica de PKG mediante Western Blot para la evaluación del *knock-out* de la proteína. PKG-KO-a, PKG-KO-b y PKG-KO-c corresponden a otros clones celulares evaluados, *WT* corresponde a una muestra de células *wild-type* como control positivo.

### 5.1.3. Validación de la pluripotencia en la línea celular PKG-KO-01

En la generación de líneas de CMPi editadas genéticamente, las células son expuestas a una serie de estímulos que pueden resultar estresantes y pierdan el estado pluripotente. Las células fueron mantenidas en cultivo en condiciones de pluripotencia y se evaluó la morfología mediante microscopía de campo claro. No se observaron cambios morfológicos celulares, ni aumento notorio en el nivel de muerte celular en la línea PKG-KO-01.

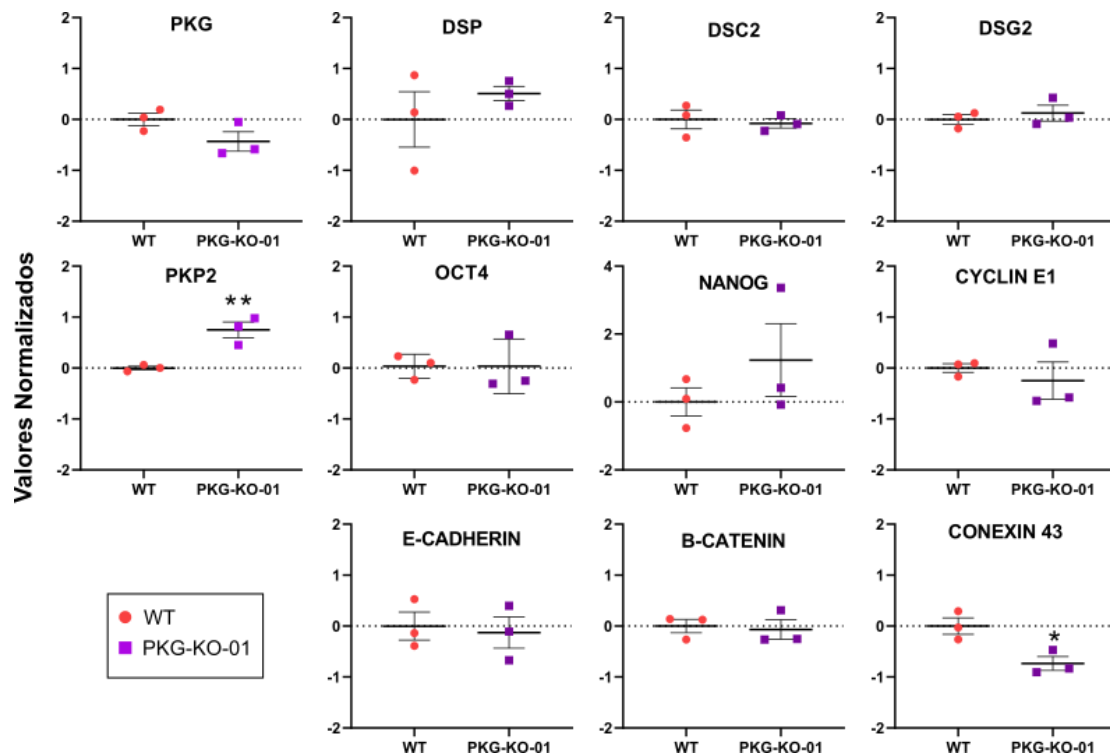
Se buscó constatar la pluripotencia de la línea celular PKG-KO-01 evaluando el factor de transcripción de pluripotencia OCT4 mediante inmunofluorescencia. El análisis mostró altos niveles de OCT4 del estado pluripotente en los núcleos, tanto en el *WT* como en la línea PKG-KO-01 (Figura 22).





**Figura 22. Marcación de pluripotencia en las líneas *Wild-Type* y *PKG-KO-01*.** Análisis de expresión por inmunofluorescencia del marcador de pluripotencia OCT4 (cyan) usando un aumento de 400X. Se utilizó DAPI como marcación nuclear (amarillo). Barra de escala: 200µm.

Analizamos los niveles de expresión por RT-qPCR de los marcadores moleculares de pluripotencia genes desmosomales, y otros relacionados con uniones celulares (*E-CADERINA*, *B-CATENINA* y *CONEXINA 43*) y de ciclo celular (*CICLINA E1*) para determinar si se vieron afectados por la falta de PKG (Figura 23). No se observaron diferencias estadísticas entre el clon PKG-KO-01 y el control *WT* en ningún gen salvo en la expresión del gen *PKP2*, en el cual se observó un aumento en el estado pluripotente y en *CX43*, donde se observó una disminución de la expresión del gen en el clon PKG-KO-01. A nivel transcripcional el gen de *PKG* no se vio afectado debido a la edición introducida. Todo esto indicaría que el estado pluripotente de las células no se vio afectado, aunque se observaron leves diferencias en la expresión de genes relacionados con las uniones celulares como son *PKP2* y *CX43*.



**Figura 23. Análisis en estado pluripotente.** Cuantificación de la expresión de los ARNm de genes desmosomales, marcadores de pluripotencia, genes de uniones celulares y ciclo celular por RTq-PCR de las líneas celulares *Wild-Type* y PKG-KO-01. La expresión de los genes fue normalizada con los genes *GAPDH* y *RPL7* como housekeepings. Se muestran los niveles de expresión normalizados. Se realizó una prueba estadística t de Student con corrección de Welch comparando la línea PKG-KO-01 contra la condición *WT*, para 3 réplicas biológicas independientes, (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ .

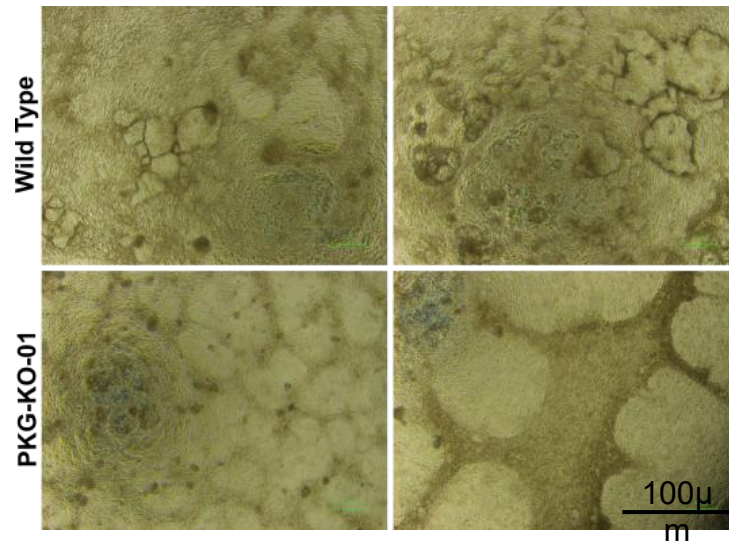
#### 5.1.4. Diferenciación a cardiomiocitos de la línea celular PKG-KO-01

Luego de validar la pluripotencia de la línea celular PKG-KO-01 se evaluó la capacidad de estas células de diferenciarse a cardiomiocitos. Para ello se sembraron y diferenciaron en paralelo células *wild-type* y PKG-KO-01 siguiendo el protocolo de diferenciación cardíaca desarrollado por el grupo de Palecek descrito anteriormente [30].

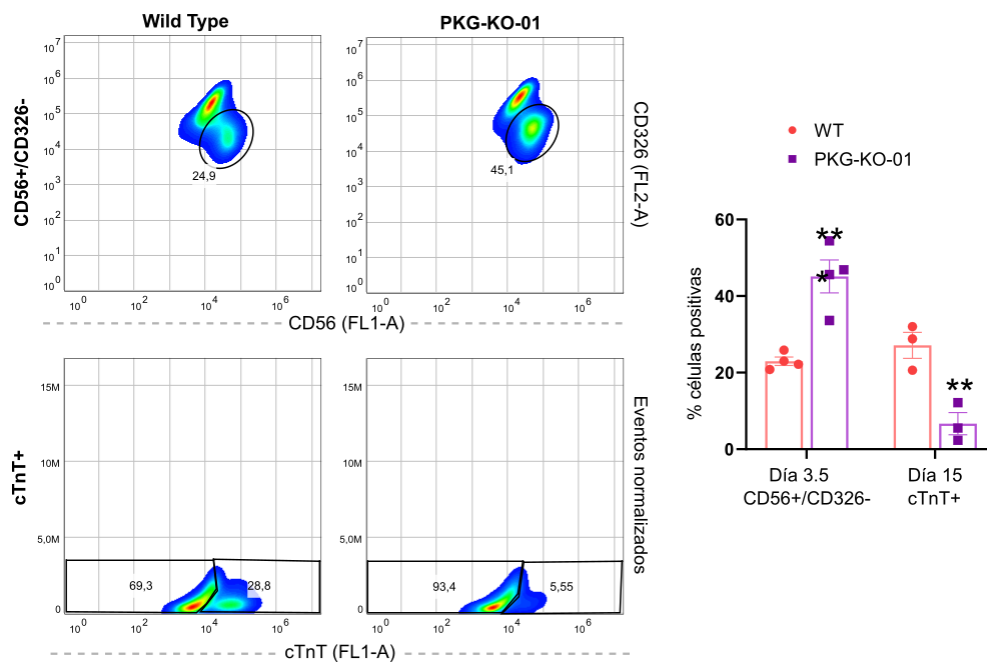
El trabajo realizado por Evseenko y col. identificaron en el día 3,5 de la diferenciación cardíaca la generación de la población de progenitores mesodérmicos tempranos en base a la expresión del marcador de membrana CD56 (mesodermo) y la ausencia del marcador de membrana CD326 (pluripotencia), por lo que el progenitor mesodérmico está definido por la subpoblación CD56+/CD326- [80]. Entre los días 7 y 12 comienza a observarse dentro del cultivo zonas con actividad contráctil espontánea, evidenciando la presencia de cardiomiocito (Figura 24). A su vez, la eficiencia del protocolo para la generación de cardiomiocitos varía entre un 30 y 90%, los cuales se caracterizan por la expresión de marcadores cardíacos como la troponina T cardíaca (cTnT) hacia día 14-15. El resto de las células obtenidas consiste en otros tipos celulares mesodérmicos tales como endotelio, endocardio, músculo liso y fibroblastos [81].

Con el fin de comparar la eficiencia de diferenciación del clon PKG-KO-01 vs. las CMPi *WT*, hacia el linaje cardíaco, se tomaron muestras de células a días 3.5 y 15 para evaluar los marcadores descritos anteriormente por citometría. Se utilizaron los marcadores CD326 y

CD56 para las muestras de día 3.5, y cTnT para las muestras de día 15. Se observó un aumento en el porcentaje de células CD56+/CD326- en el clon PKG-KO-01 ( $22.6 \pm 2.2\%$  vs.  $47.6 \pm 1.2\%$  para WT y PKG-KO-01, respectivamente), aunque una disminución significativa de las células cTnT+ en esta línea ( $28 \pm 1.5\%$  vs.  $11.6 \pm 7.3\%$  para WT y PKG-KO-01, respectivamente) (Figura 25).



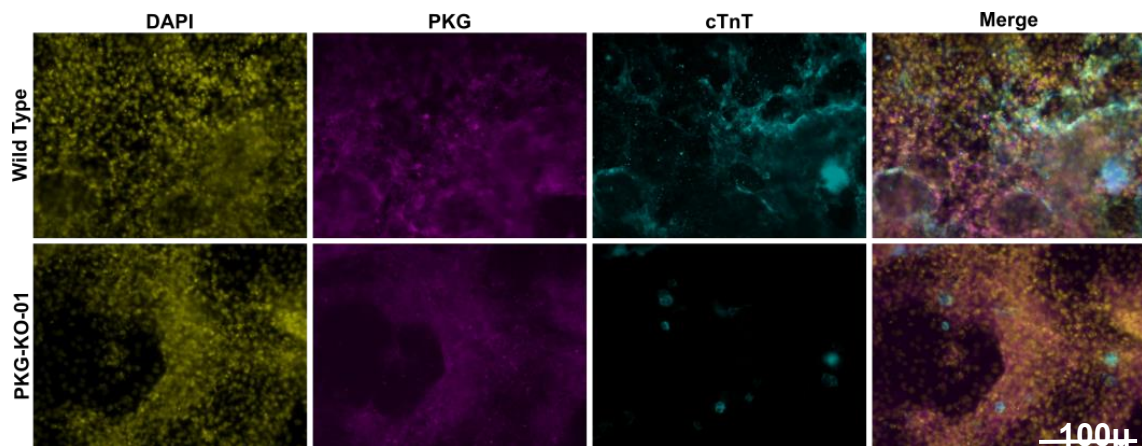
**Figura 24. Estructuras cardíacas en el día 14 de la diferenciación cardíaca.** Imágenes representativas tomadas con microscopio óptico de la línea celular *wild-type* y PKG-KO-01



**Figura 25. Identificación de población mesodérmica y cardiomiocitos por citometría de flujo.**

Expresión de los marcadores de membrana CD56 y CD326 en células del protocolo de diferenciación cardíaca en día 3,5 (arriba) y el marcador de cardiomiocitos cTnT en el día 15 (abajo) evaluado por citometría de flujo. Se realizó una prueba estadística *t* de Student con corrección de Welch comparando cada condición contra la condición *WT*, para 3 réplicas biológicas independientes (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

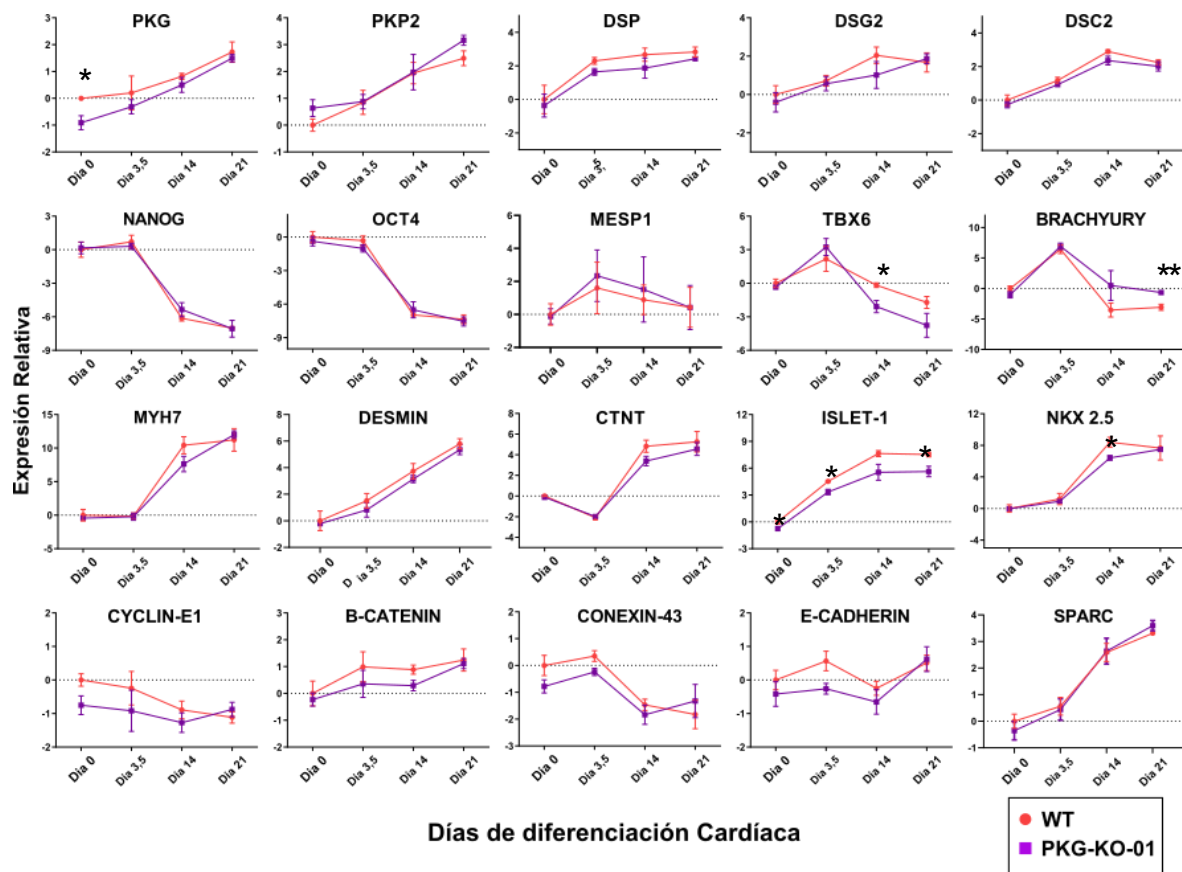
Con los resultados obtenidos por la citometría determinamos que con la línea PKG-KO-01 se obtendría mayor proporción de células mesodérmicas, pero se diferenciaba menos eficientemente a cardiomiocitos que la línea *WT*. Para continuar con esta caracterización, evaluamos la presencia de cardiomiocitos en el cultivo mediante inmunofluorescencia de la proteína cTnT en el día 21 de la diferenciación, cuando el cultivo ya pasó por un proceso de selección metabólica y sólo sobreviven los cardiomiocitos. El análisis reveló menor proporción de células cTnT+, confirmando que la línea PKG-KO-01 no se diferenciaba eficientemente a cardiomiocitos (Figura 26). Esta disminución en la proporción del marcador cTnT fue acompañada por la disminución de la actividad contráctil en el plato de cultivo (Figura 24).

**Figura 26. Expresión de cTnT en la línea PKG-KO-01 a día 21 de la diferenciación cardíaca.**

Inmunofluorescencia contra PKG (magenta) y cTnT (cyan) en células de las líneas *WT* y PKG-KO-01 en el día 21 de la diferenciación cardíaca. Se utilizó DAPI como marca nuclear (amarillo). Barra de escala: 100μm.

Al observar un efecto deletéreo sobre la diferenciación de la línea PKG-KO-01, decidimos realizar un análisis temporal de marcadores específicos para cada una de las etapas de la diferenciación y así poder determinar el momento de la diferenciación cardíaca que estaba siendo afectada.

Se analizó la expresión de marcadores de pluripotencia, mesodermo y cardiomiocitos mediante RT-qPCR en los días 0, 3.5, 14 y 21 (Figura 27). Para el estado de pluripotencia se evaluó *NANOG* y *OCT4*, para mesodermo temprano *TBX6* y *BRACHYURY*, para progenitor cardíaco *MESP1*, *ISLET1* y *NKX2.5*, para cardiomiocitos *DESMIN*, *CTNT* y *MYH7*. Junto con los marcadores específicos para cada una de las etapas de diferenciación evaluamos también la dinámica de expresión de todos los genes desmosomales (*PKG*, *PKP2*, *DSP*, *DSG2*, *DSC2*), de otras uniones celulares (*CONEXINA-43*, *E-CADHERINA*), de ciclo celular (*CICLINA-E1*) y de matriz extracelular (*SPARC*) para determinar si se veían afectados por la ausencia de PKG.



**Figura 27. Análisis de expresión de genes en la diferenciación cardíaca.** Cuantificación de la expresión de los ARNm de genes desmosomales, marcadores representantes de cada estadio celular, genes de uniones celulares y ciclo celular por RTq-PCR de las líneas celulares *Wild-Type* y PKG-KO-01. La expresión de los genes fue normalizada con los genes *GAPDH* y *RPL7* como *housekeepings*. Se muestran los niveles de expresión de cada gen relativos a la expresión de los mismos en el control *WT*. Se muestran el promedio y error estándar para 3 réplicas biológicas independientes. Se realizó un ANOVA de un factor seguido de un test Tukey. La estadística que se muestra es entre líneas celulares en el mismo día de diferenciación cardíaca, (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ .

A pesar de que habíamos observado que la diferenciación se veía afectada y la marca de *cTnT* disminuida, se obtuvieron diferencias a nivel de expresión génica sólo en algunos genes y en días específicos del protocolo entre las líneas PKG-KO-01 y *WT*. Al no ser concluyentes estos resultados, decidimos realizar un estudio más profundo para dilucidar qué procesos podrían estar alterados en la diferenciación cardíaca por la falta de PKG.

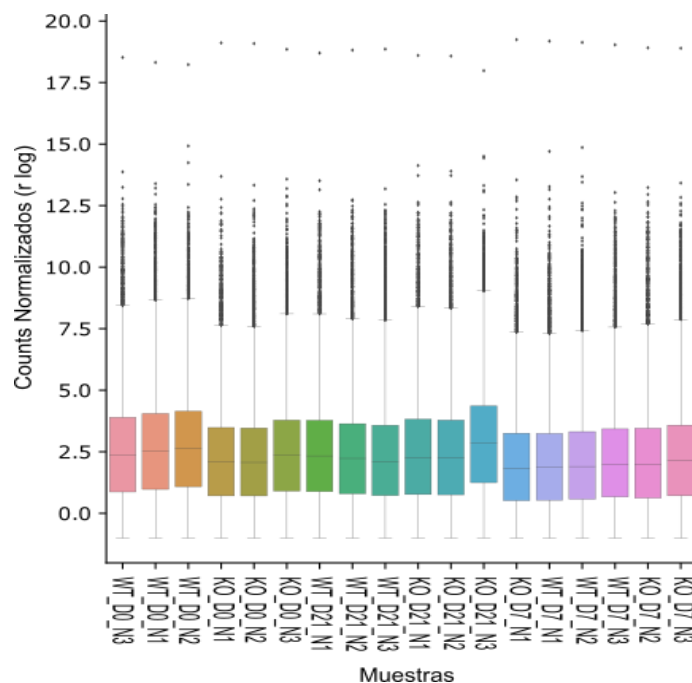
Para ello, las muestras de ARN obtenidas de 3 ensayos independientes fueron procesadas y preparadas para su posterior análisis mediante secuenciación masiva del ARN, el cual nos permitiría una caracterización detallada del transcriptoma. Este enfoque proporcionaría una visión integral de los cambios en la expresión génica a lo largo de la diferenciación, facilitando la identificación de rutas moleculares clave y posibles alteraciones inducidas por la edición genética.

### 5.1.5. Secuenciación masiva del ARN de la diferenciación cardíaca de líneas *wild-type* y PKG-KO-01

Mediante secuenciación masiva del ARN o ARNseq se analizó el transcriptoma de células *wild-type* y la línea celular PKG-KO-01 en distintos estadios de la diferenciación cardíaca (pluripotencia, progenitor cardíaco y cardiomiocitos; día 0, 7 y 21, respectivamente).

Los resultados de la secuenciación masiva fueron procesados y analizados íntegramente en nuestro laboratorio. Luego de la alineación de las lecturas del ARNseq con el genoma

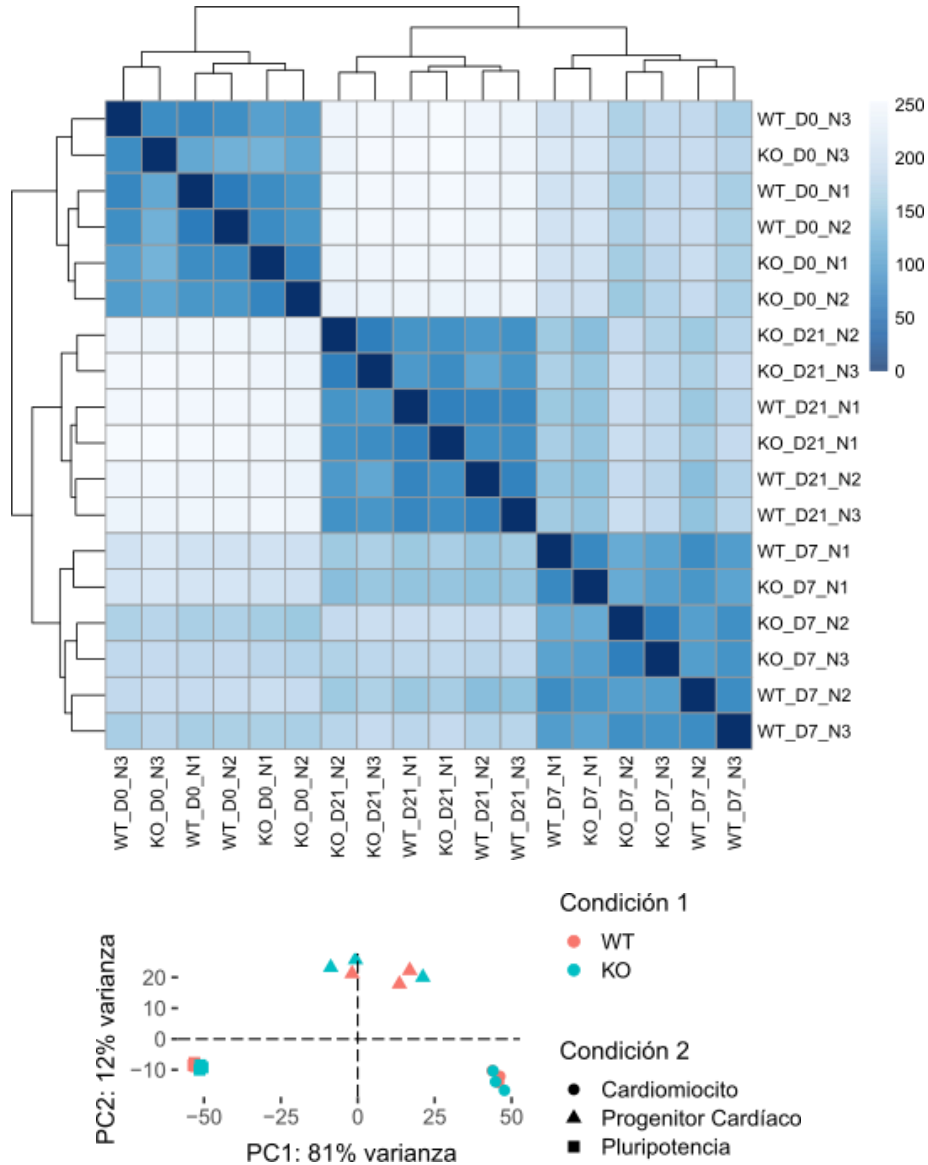
humano de referencia y una vez obtenidas las cuantificaciones por gen (*counts*), se evaluó la distribución de los genes con los datos normalizados y transformados utilizando el paquete estadístico DESeq2 de R Bioconductor (Figura 28). Los resultados obtenidos de cada una de las muestras (3 n por condición) tienen distribuciones similares indicando de que las muestras son comparables y que la normalización es eficiente y capaz de capturar correctamente la complejidad del set de datos.



**Figura 28. Distribución de la abundancia de transcritos.** El gráfico *boxplot* muestra los valores de expresión normalizada de los genes (rlog= transformación logarítmica regularizada). Línea *wild-type* (WT), línea PKG-KO-01 (KO), día 0 (D0), día 7 (D7) y día 21 (D21).

Con el propósito de realizar el control de la calidad de los datos obtenidos se procedió a realizar un análisis de agrupamiento no supervisado. Para ellos se implementó una matriz de distancia euclidiana, que expresa las similitudes de expresión génica entre muestras formando un mapa de calor o *Heatmap* mostrando la jerarquía de agrupamientos. Se observó que las réplicas biológicas de cada día analizado (N1, N2 y N3) se agrupaban juntas, lo cual demostraba la similitud que se presenta entre ellas (Figura 29 arriba). Con el mismo propósito,

se realizó un análisis de componentes principales (PCA) donde se puede apreciar que las tres réplicas biológicas de cada población celular se agrupan entre sí, tanto las *WT* como las PKG-KO-01, validando que las principales fuentes de variación del set de datos están definidas por las diferentes poblaciones celulares y corroborando que las réplicas biológicas son similares entre sí (Figura 29 abajo).

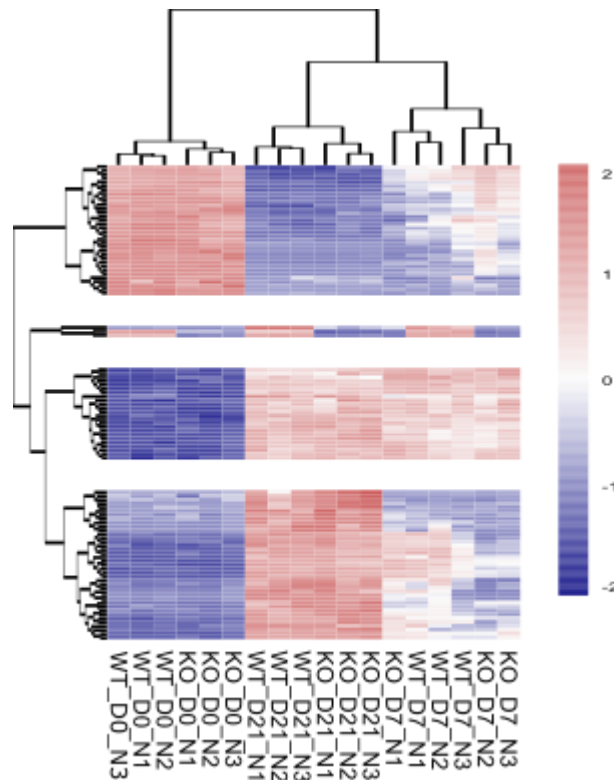




**Figura 29. *Heatmap* de distancia y PCA plot.** Arriba: El *heatmap* de las distancias euclidianas representa un agrupamiento jerárquico no supervisado que refleja a través de los dendrogramas las similitudes que existen entre las expresiones de los genes de las tres poblaciones y las réplicas biológicas [cuanto más cercano a cero (azul), más similitud entre las muestras]. Abajo: El gráfico de PCA muestra los dos componentes que explican la mayor variabilidad entre muestras.

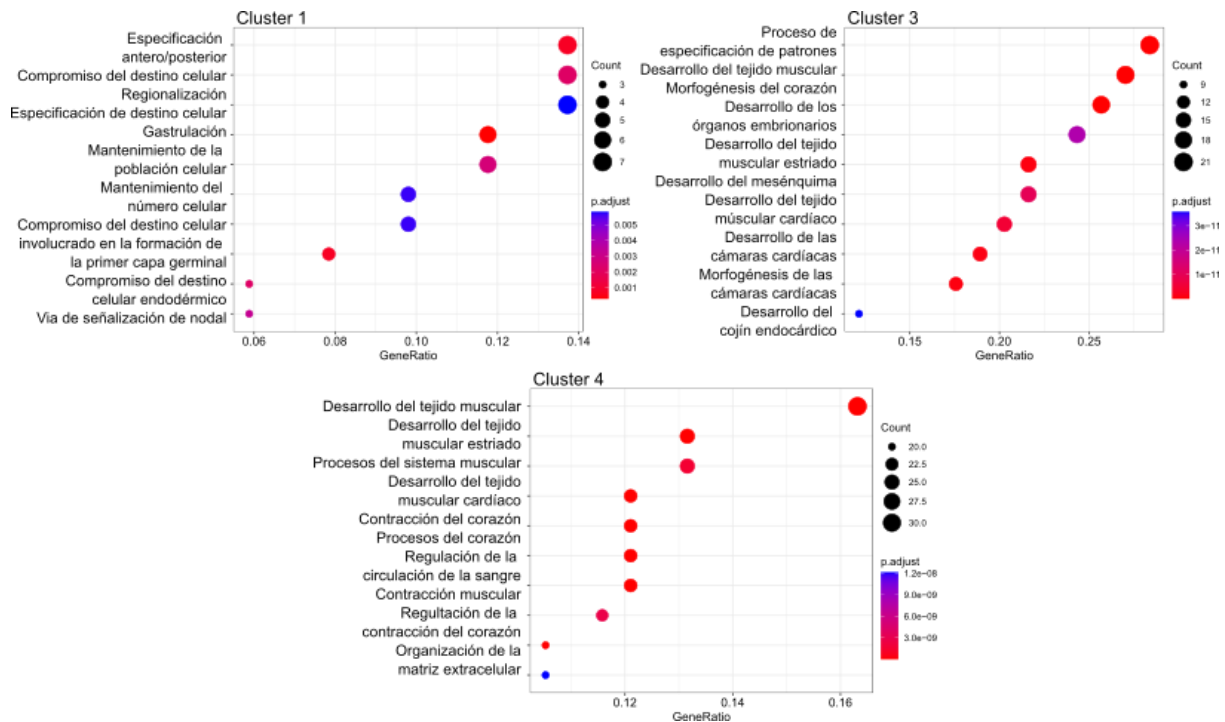
#### 5.1.5.1. Caracterización de la Diferenciación Cardíaca de la línea celular PKG-KO-01

Con el objetivo de seguir caracterizando y evaluando el efecto de la ausencia de PKG en la diferenciación cardíaca de la línea PKG-KO-01, en primera instancia realizamos un agrupamiento jerárquico no supervisado de los 400 genes con más varianza de *counts* entre las distintas poblaciones con el propósito de agrupar a los genes por patrones de expresión. Los resultados del agrupamiento se visualizan en el *Heatmap* de la Figura 30 donde en rojo se observan los genes altamente expresados y en azul genes sub-expresados. El análisis produjo un patrón de agrupamiento en 4 partes o *clusters* de comportamiento: el cluster 1 presenta genes elevados en la población de pluripotencia (día 0); el cluster 2 presenta una población pequeña de genes cuya expresión es elevada en la línea *WT* y baja en la línea PKG-KO-01 en cada uno de los días evaluados; el cluster 3 con expresión más elevada en las poblaciones de progenitores cardíacos y cardiomiocitos (días 7 y 21); y el cluster 4 genes con expresión elevada en la población cardiomiocitos (día 21).



**Figura 30. Heatmap de genes con más variabilidad.** Los genes más variables fueron agrupados en base a sus valores de expresión normalizados. El gráfico muestra los 400 genes identificados en el análisis, agrupados en 4 clusters.

A partir del listado de nombres de genes codificantes en cada cluster, realizamos el análisis de Ontología Génica (OG) para evaluar los procesos biológicos involucrados en cada grupo de genes incluidos en el cluster (Figura 31). El análisis mostró una representación en términos de ontología génica de procesos asociados al desarrollo y diferenciación cardíaca. El cluster 1, cuyos genes se expresan mayormente en la población pluripotente, mostró también procesos relacionados al compromiso y señalización celular. El cluster 3 mostró procesos de genes más expresados en mesodermo. Además de procesos asociados a desarrollo y morfogénesis, mostraron procesos relacionados con especificación celular. El cluster 4 representa a los genes más expresados en cardiomiocitos. Los procesos mostrados en estos clusters se encuentran casi exclusivamente relacionados con el desarrollo cardíaco y desarrollo muscular. Para el cluster 2 no fue posible realizar un análisis de OG ya que la cantidad de genes en este cluster eran insuficientes para este tipo de análisis.



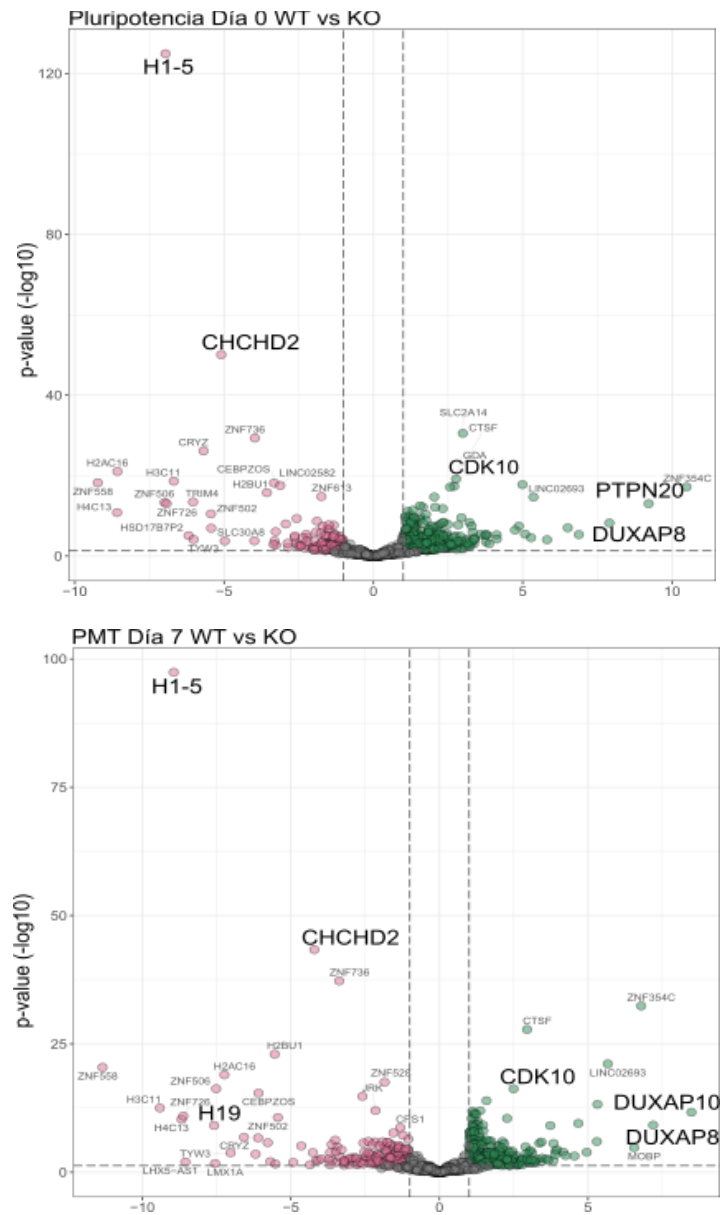
**Figura 31. Análisis de OG de los 3 clusters principales.** Se muestra el análisis de OG para 3 de los 4 clusters identificados en el *Heatmap* de la Figura 30. El *cluster 1* muestra los procesos biológicos relacionados con los genes más expresados en la población pluripotente. El *cluster 3* muestra los procesos biológicos relacionados con los genes más expresados en la población mesodérmica temprana. El *cluster 4* muestra los procesos biológicos relacionados con los genes más expresados en la población de cardiomiocitos.

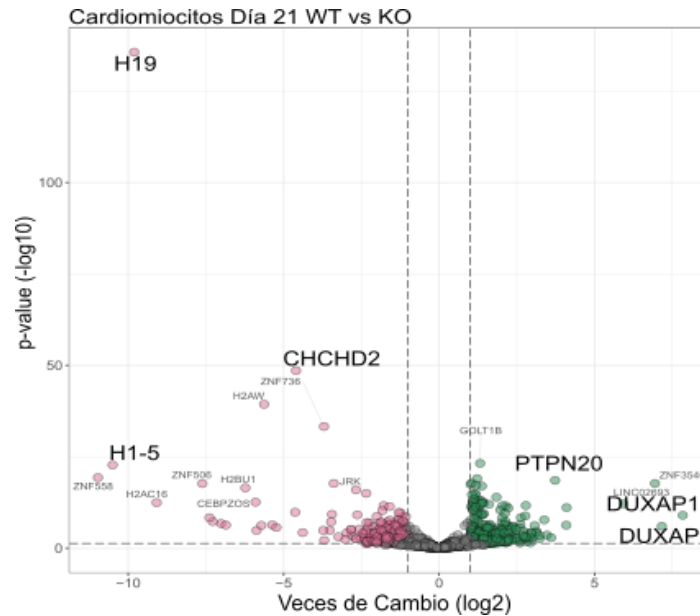
#### 5.1.5.2. Análisis de Expresión Diferencial

El análisis de expresión diferencial se realizó con el paquete de R DESeq2. El mismo reveló un total de 586 genes diferencialmente expresados, entre las 3 poblaciones celulares (D0, D7 y D21), tomando como puntos de corte un valor ajustado de p (o FDR) menor a 0,05 ( $p\text{-adj} < 0,05$ ) y al menos un valor mayor o igual a 2 veces de cambio ( $|FC| \geq 2$ ).

Se realizó el análisis de expresión diferencial de las tres poblaciones celulares entre el *wild-type* y PKG-KO-01. Se graficaron *Volcano plots* de las 3 poblaciones (Figura 32) mostrando la comparación de las veces de cambio ( $\log_2$ ) y el pvalor ( $-\log_{10}$ ) comparando entre las tres poblaciones celulares estudiadas. De esta manera se pueden visualizar la magnitud del cambio y la confianza estadística. Las líneas punteadas muestran los puntos de

corte de veces de cambio igual o mayor a 2 (1 en escala logarítmica de base 2) y un p-valor menor a 0,05 (1,3 en escala logarítmica  $-\log_{10}$ ). Los genes que están por debajo de esos puntos de corte, coloreados en gris, son genes que no se encuentran diferencialmente expresados.

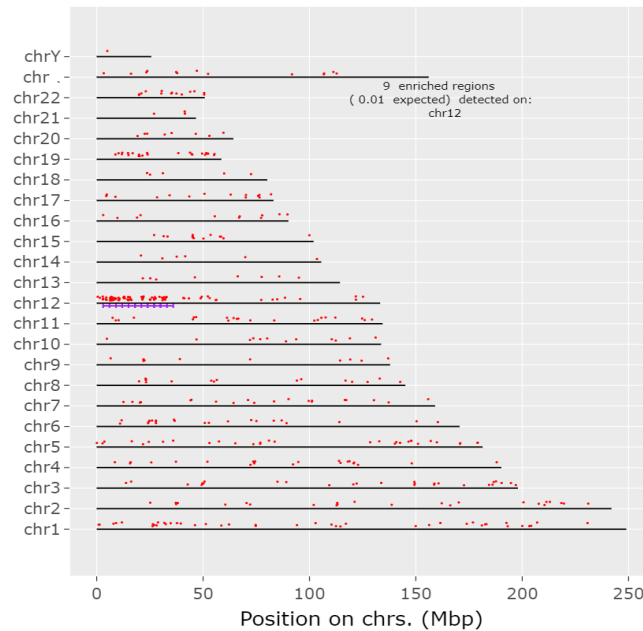




**Figura 32. Volcano plots.** Los gráficos muestran los nombres representativos de algunos de los genes diferencialmente expresados. En rosa: genes con expresión disminuida. En verde: genes con expresión aumentada.

Lo que observamos en este análisis fue mucha similitud en la dispersión de los datos y repetición de los genes diferencialmente expresados en los tres *Volcano plots*, independientemente del estadio celular evaluado. Esto nos podría estar indicando que la falta de la proteína PKG podría estar afectando las células en todos sus estadios celulares de manera similar, lo cual era llamativo.

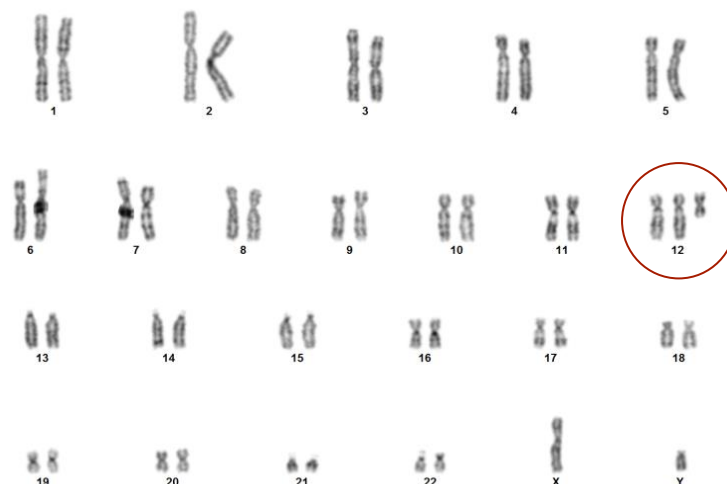
Lo siguiente que realizamos fue un gráfico para conocer la dispersión de los genes diferencialmente expresados a día 21 en los 23 cromosomas. Esto nos llevó a evaluar y entender más en profundidad la ubicación de los mismos y la relación que tenían con nuestros genes diferencialmente expresados. Como se ve en la Figura 33, lo que observamos fue una acumulación de genes diferencialmente expresados en el cromosoma 12, lo cual nos llamó la atención. Entre estos genes se encontraban aquellos que se repetían como diferencialmente expresados en los tres *Volcano plot*. En un análisis posterior determinamos que estos genes no sólo se encontraban diferencialmente expresados, sino que el 20% estaban up-regulados para la línea PKG-KO-01 respecto a la *wild-type*.



**Figura 33. Ubicación en los cromosomas de los genes diferencialmente expresados.** La figura muestra la dispersión de los genes en los cromosomas, pudiendo observar una acumulación de genes diferencialmente expresados en la primera porción del cromosoma 12.

### 5.1.6. Cariotipo línea celular PKG-KO-01

Una de las razones por la cual podríamos estar observando esta acumulación de genes en el brazo corto del cromosoma 12 era la presencia de una aberración cromosómica. Por lo cual decidimos realizar el cariotipo a nuestra línea celular PKG-KO-01. El resultado del cariotipo arrojó la presencia de un isocromosoma del brazo corto del cromosoma 12 (Figura 34).



**Figura 34. Análisis de bandas G cromosómicas de la línea PKG-KO-01.** Se analizaron 50 metafases con una resolución de 450 bandas para determinar el cariotipo de la línea celular PKG-KO-01, donde se puede observar el isocromosoma del brazo corto del cromosoma 12.

Luego de obtener el resultado del cariotipo y en un intento de sacar información de calidad de la secuenciación realizada, decidimos realizar un análisis de aquellos genes diferencialmente expresados eliminando o reduciendo a la mitad la expresión de los genes localizados en el cromosoma 12. Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre las líneas PKG-KO-01 y *WT*. Por todo esto, dado que es imposible determinar si el efecto fenotípico que vemos en nuestra línea celular PKG-KO-01 está dado por la aberración cromosómica o la falta de la proteína PKG es que decidimos descartar el clon PKG-KO-01 y realizar una nueva línea nuevo *knock-out* para PKG en las CMPi. Esto se describirá en el siguiente capítulo.

### 5.1.7. Conclusiones parciales del capítulo

En este primer capítulo, logramos establecer las condiciones óptimas de cultivo necesarias para desarrollar y optimizar la estrategia de edición génica mediante el sistema CRISPR/Cas9 mediado por recombinación homóloga. Implementamos con éxito la introducción de un codón *stop* prematuro a través de una mutación puntual dirigida en el primer exón del gen que codifica para la PKG, utilizando un ARNg y ssODN diseñado específicamente para la región de interés. Esta estrategia permitió generar una línea celular *knock-out* de PKG, para estudiar el papel de esta proteína en el proceso de diferenciación de las CMPi hacia cardiomiocitos.

Asimismo, generamos y procesamos muestras de ARN correspondientes a las distintas poblaciones celulares involucradas en la diferenciación cardíaca, lo que permitió realizar análisis transcriptómicos mediante secuenciación masiva de ARN. Este enfoque no sólo proporcionó una visión detallada de los cambios a nivel de expresión génica, sino que también amplió nuestra comprensión de las vías moleculares implicadas en el proceso de

diferenciación cardíaca. A pesar de no haber observado diferencias relevantes entre las líneas celulares analizadas, se adquirió experiencia en el análisis masivo de datos y fue mediante esta técnica que pudimos detectar la aberración cromosómica de la línea PKG-KO-01.

Finalmente, la aparición de la aneuploidía en la línea celular PKG-KO-01 destacó la importancia de monitorear la estabilidad genómica en las líneas celulares modificadas. Como resultado de este hallazgo, se implementó de manera rutinaria la realización de cariotipos en todas las líneas celulares utilizadas en el laboratorio y cada vez que se generan nuevas líneas celulares por edición génica, asegurando así la estabilidad y la reproducibilidad de los modelos experimentales empleados.



## 5.2. Capítulo 2: Relevancia de las proteínas desmosomales: Placoglobina y Placofilina-2 en cardiomiocitos.

Tras haber establecido un sistema eficiente para la inducción de mutaciones en CMPi, nos propusimos avanzar en la generación de nuevas líneas celulares editadas genéticamente. En esta etapa, desarrollamos una nueva línea celular *knock-out* para la proteína PKG y otra *knock-out* para la proteína PKP2, proteína desmosomal que presenta múltiples variantes asociadas al fenotipo característico de la Displasia Arritmogénica (DA). Este enfoque nos permitiría estudiar la importancia de estas proteínas desmosomales en el proceso de diferenciación de las CMPi hacia cardiomiocitos y en los cardiomiocitos propiamente dichos. Con ello, buscamos evaluar de manera más precisa su papel funcional en el contexto de la fisiopatología de la DA.

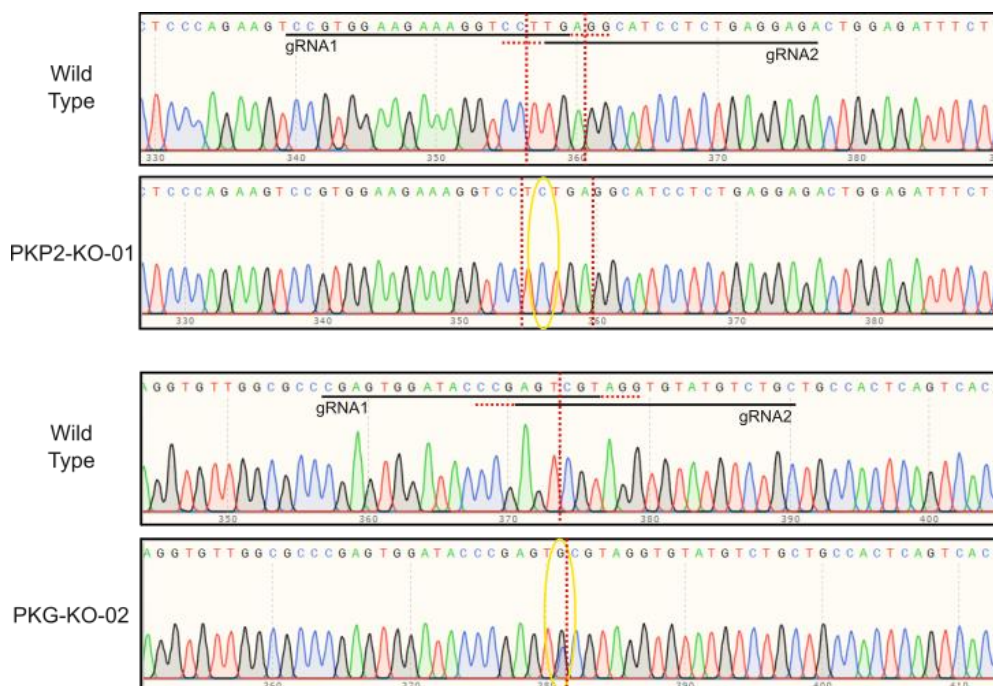
### 5.2.1. Generación de las líneas PKG-KO-02 y PKP2-KO-01

Como mencionamos en la introducción, otro mecanismo de reparación que utiliza el sistema CRISPR/Cas9, además de la recombinación homóloga, es mediante la unión de extremos no homólogos. Este sistema de reparación generalmente introduce *indels* en el sitio de corte, favoreciendo la generación de mutaciones al azar que en su mayoría tienen como consecuencia la pérdida de función del gen *target*. Al ser este sistema bastante frecuente, decidimos generar las nuevas líneas *knock-out* mediante la transfección solamente de ARNg dirigidos al exón 1 del gen *PKG* y al exón 3 del gen *PKP2*, sin utilizar ssODNs.

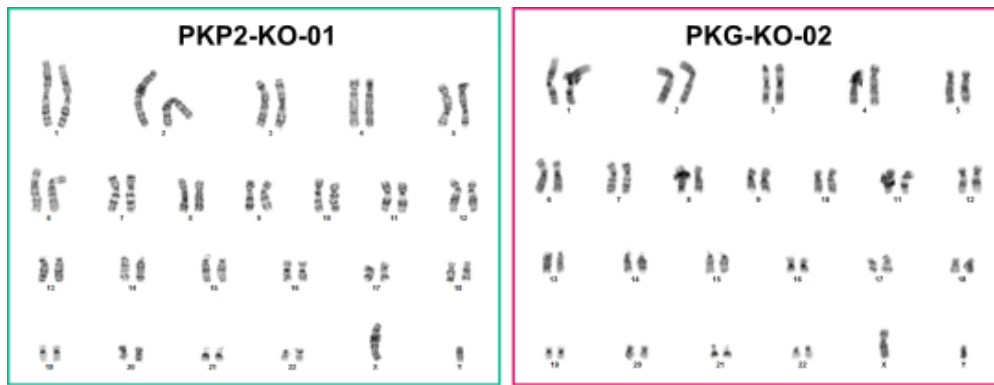
Luego de la transfección de las CMPi con el sistema CRISPR dirigido a *PKG* o *PKP2*, las células fueron seleccionadas con puromicina y luego aisladas unicelularmente para la generación de clones celulares. Una vez que se amplificaban y formaban colonias, cada colonia de células era transferida a un *multiwell*-12 para criopreservar un stock y dos *multiwell*-

24, uno para tomar muestra de ADN genómico y otro para realizar una inmunofluorescencia contra PKP2 o PKG y así determinar en cuál de los clones había sido efectiva la técnica. Tanto los *pools* de células sobrevivientes a la puromicina como los nuevos clones celulares generados, se amplificaron, criopreservaron y se secuenciaron por Sanger.

A partir del screening realizado pudimos confirmar que de los 9 clones evaluados para generar el KO de PKG, 3 clones (33,3%) presentaron modificaciones que generaban un codón stop prematuro y como consecuencia una línea PKG-KO. De los 12 clones evaluados para generar el KO de PKP2, 2 clones (16,6%) presentaban una inserción de una base generando un codón stop prematuro y como consecuencia una línea PKP2-KO (Figura 35). Se seleccionó un clon *knock-out* de cada proteína, a la cual se le realizó un análisis de cariotipo que dio normal (Figura 36) y de este punto en adelante estas líneas serán llamadas PKG-KO-02 y PKP2-KO-01.



**Figura 35. Secuenciaciones por Sanger.** Histograma de las secuencias genómicas de las células *wild-type*, el clon PKP2-KO-01 y el nuevo clon PKG-KO-02. En amarillo: inserciones de nucleótidos en el clon (Inserción de una C en homocigosis en PKP2-KO-01 e inserción de una G en un alelo y una C en otro alelo en PKG-KO-02). Línea punteada roja: sitio de corte de la Cas9.



**Figura 36. Análisis de bandas G cromosómicas.** Se observaron 50 metafases con una resolución de 450 bandas para determinar el cariotipo de la línea celular PKG-KO-02 y PKP2-KO-01. Ambas líneas presentan un número normal diploide.

En ambos casos, las inserciones introducidas provocaron un corrimiento en el marco de lectura, alterando la secuencia de aminoácidos y generando un codón de *stop* prematuro. Como resultado, la traducción de la proteína se interrumpe antes de completar su secuencia funcional, lo que conduce a la pérdida de la función de la proteína. Debido a la incorporación de diferentes nucleótidos en cada uno de los alelos del clon PKG-KO-02 (G en uno y C en otro), las variantes obtenidas fueron p.Asp23Alafs\*24 y p.Asp23Glyfs\*24 para cada uno de ellos, y la obtenida para PKP2 fue p.Leu141Serfs\*11.

Las secuencias de aminoácidos resultantes serían:

PKP2 WT: ..TATYEGRWGRGTAQYSSQKSVEERSLRHPLRRLEISPDSSPERAHYTHSD..

PKP2-KO-01: ..TATYEGRWGRGTAQYSSQKSVEERS**SEASSEETGDFSX**

PKG WT: MEVMNLMEQPIKVTEWQQTYTYDSGIHSGANTCVPSVSSKGIMEEDEACG...

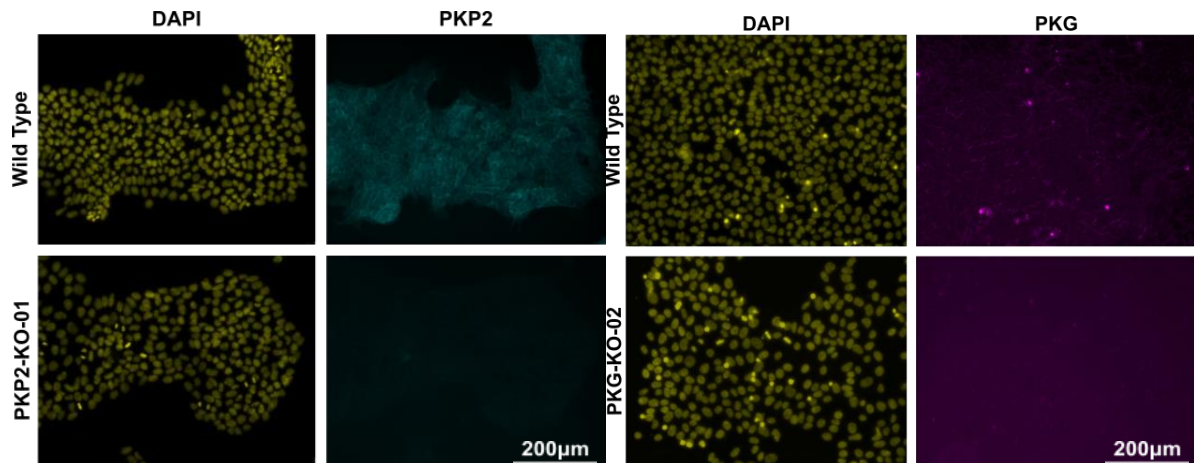
PKG-KO-02: MEVMNLMEQPIKVTEWQQTYTY**ALGYPLGRQHRLRALRQQQGHHGGGX**

(alelo 1)

PKG-KO-02: MEVMNLMEQPIKVTEWQQTYTY**GLGYPLGRQHRLRALRQQQGHHGGGX**

(alelo 2)

Posteriormente, la ausencia de las proteínas PKP2 y PKG en las células fueron confirmadas mediante análisis de inmunofluorescencia (Figura 37).



**Figura 37. Análisis de la expresión proteica de PKG y PKP2.** Izquierda: Detección por inmunofluorescencia de la proteína PKP2 (cyan) en CMPi *wild-type* y ausencia en el clon celular PKP2-KO-01. Derecha: Detección por inmunofluorescencia de la proteína PKG (magenta) en CMPi *wild-type* y ausencia de marca en el clon celular PKG-KO-02. Se utilizó DAPI como marcación nuclear (amarillo). Aumento de 200X, barra de escala: 200µm.

A continuación, se midió la expresión proteica de PKG y PKP2 en la línea CMPi *wild-type* y los clones KO mediante *Western Blot* para confirmar el resultado obtenido por inmunofluorescencia (Figura 38). El análisis confirmó la ausencia de la expresión de la proteína en las líneas celulares evaluadas, tanto en la línea PKG-KO-02 como en la línea PKP2-KO-01.



**Figura 38. Análisis de la expresión proteica de PKG y PKP2.** Identificación de la ausencia de expresión proteica de PKG y PKP2 mediante *Western Blot* para la evaluación del *knock-out* de cada una de las proteínas en CMPi.

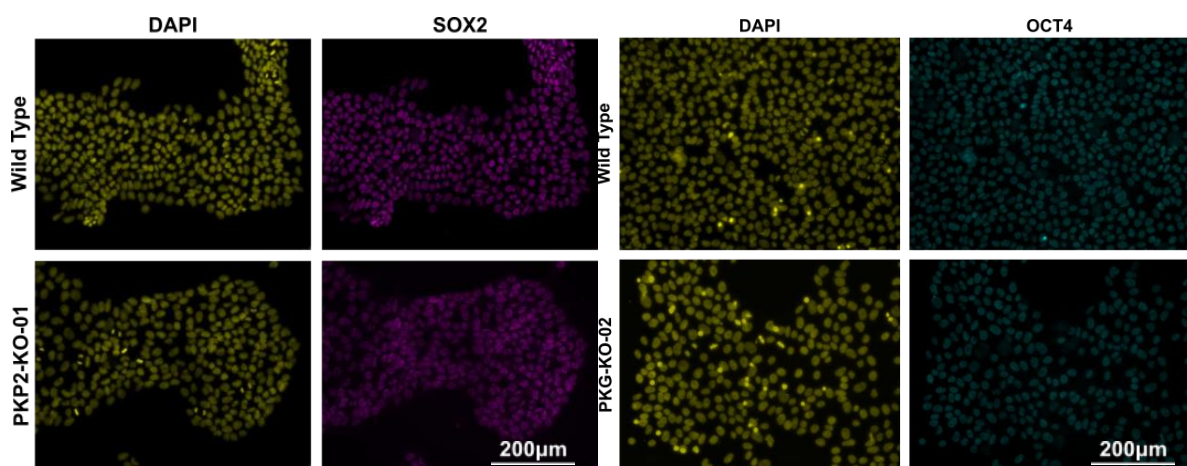
La ausencia de señal detectable confirmó una correcta eliminación de la proteína en ambas líneas celulares, lo que demuestra la eficiencia de la estrategia de edición génica utilizada.

Estos resultados fueron consistentes en las réplicas experimentales, asegurando la reproducibilidad de los datos obtenidos. Además, como control positivo, se utilizó la línea celular *WT* original, en la cual se observó una señal clara y específica de la proteína, confirmando la validez de las técnicas empleadas.

### 5.2.2. Validación de la pluripotencia de las líneas celulares PKG-KO-02 y PKP2-KO-01

Las células se cultivaron bajo condiciones que mantienen su estado de pluripotencia, y su morfología fue analizada mediante microscopía de campo claro. No se detectaron alteraciones morfológicas significativas ni un incremento evidente en la tasa de muerte celular.

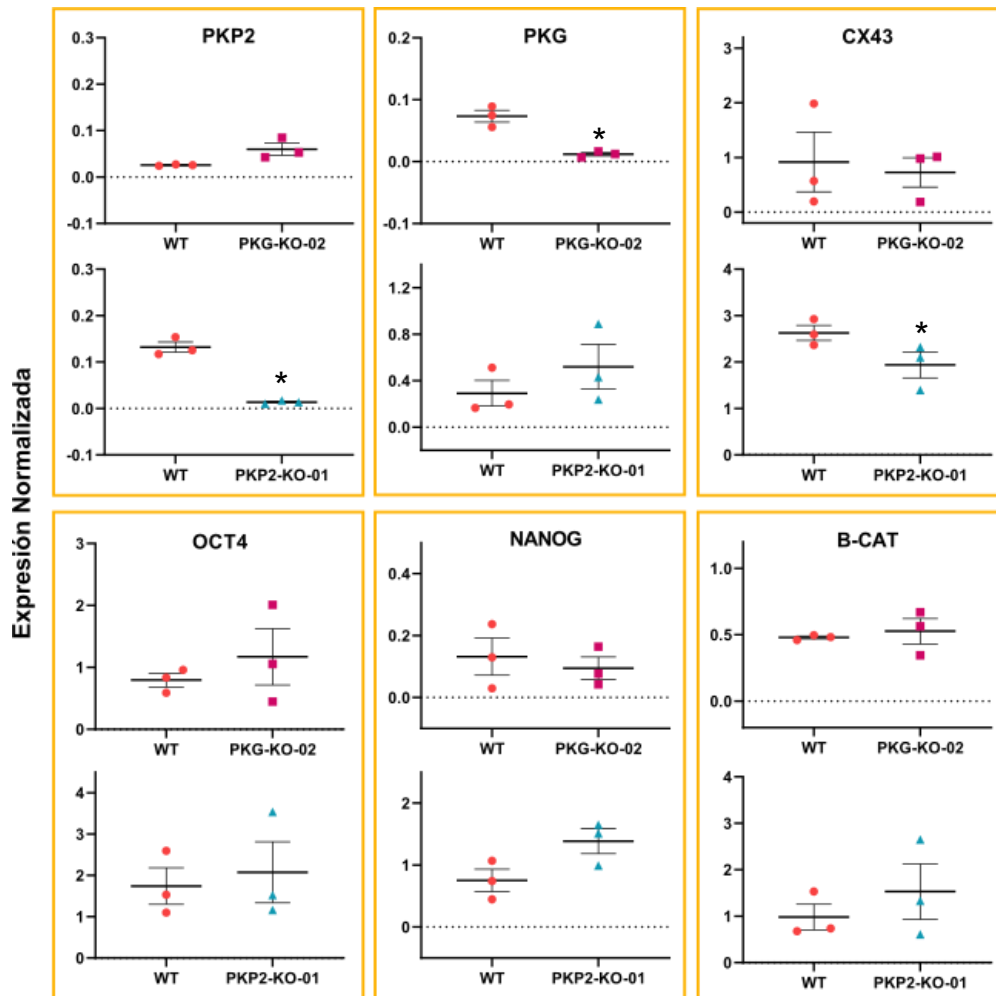
Para verificar el mantenimiento del estado pluripotente en las líneas celulares, se evaluó la expresión del factor de transcripción OCT4 en las PKG-KO-02 y SOX2 en las PKP2-KO-01 mediante inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos evidenciaron tanto en las células *WT* como en las líneas celulares PKG-KO-02 y PKP2-KO-01, una alta expresión de OCT4 y SOX2 en los núcleos, respectivamente, confirmando así la preservación del estado pluripotente en ambas líneas celulares (Figura 39).



**Figura 39. Marcación de pluripotencia en las líneas *Wild-Type*, PKP2-KO-01 y PKG-KO-02.**

Análisis de expresión por inmunofluorescencia del marcador de pluripotencia SOX2 (magenta) y OCT4 (cyan) usando un aumento de 200X. Se utilizó DAPI como marcación nuclear (amarillo). Barra de escala: 200µm.

Además, analizamos los niveles de expresión por RT-qPCR de dos marcadores moleculares de pluripotencia (*OCT4* y *NANOG*), genes desmosomales (*PKG* y *PKP2*) y otros relacionados con uniones celulares (*B-CATENINA* y *CONEXINA 43*) en el estado pluripotente (Figura 40). No se encontraron diferencias estadísticas entre el clon PKG-KO-02 y el control *WT* en los genes de pluripotencia, lo que indicaría que el estado pluripotente de las células se mantuvo sin alteraciones. Observamos una disminución significativa a nivel transcripcional de los genes *PKG* y *PKP2* en los clones PKG-KO-02 y PKP2-KO-01, respectivamente, como resultado de la edición introducida. Asimismo, en el clon PKP2-KO-01, se evidenció una disminución significativa de la expresión del gen CX43.



**Figura 40. Análisis de la expresión génica en estado pluripotente.** Cuantificación de la expresión de los ARNm de genes desmosomales, marcadores de pluripotencia y genes de uniones celulares por RTq-PCR de las líneas celulares *Wild-Type*, PKG-KO-02 y PKP2-KO-01. La expresión de los genes fue normalizada con los genes *GAPDH* y *RPL7* como *housekeepings*. Se muestran los niveles de expresión de cada gen normalizados. Se realizó una prueba estadística t de Student con corrección de Welch comparando cada línea celular contra la condición *WT*, para 3 réplicas biológicas independientes, (\*)  $p < 0.05$ .

Los resultados obtenidos demuestran que el estado pluripotente de las líneas celulares analizadas no se encuentra alterado tras la edición genética realizada. La expresión de los principales marcadores de pluripotencia se mantuvo estable en los clones modificados en comparación con el control *WT*, evidenciando que las condiciones de cultivo y el proceso de edición no comprometieron su pluripotencia. Estos hallazgos proporcionan una base sólida

para la continuación de los estudios, permitiendo avanzar en la caracterización de la capacidad de diferenciarse a cardiomiocitos.

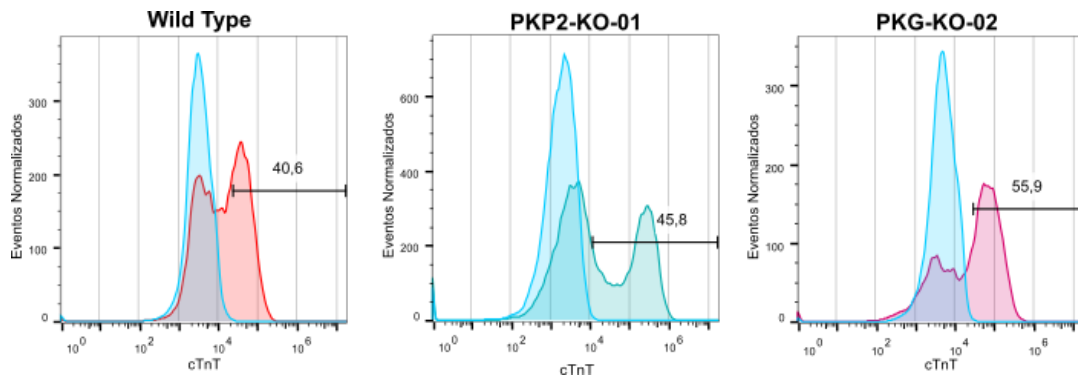
### 5.2.3. Diferenciación a cardiomiocitos de las líneas celulares PKP2-KO-01 y PKG-KO-02

Habiendo establecido las líneas PKP2-KO-01 y PKG-KO-02, consideramos el diseño experimental a utilizar para evaluar su diferenciación a cardiomiocitos. A diferencia del protocolo establecido en el capítulo 1, en este caso algunos análisis se realizaron a día 21 de diferenciación, y otros, luego del proceso de maduración a día 38 para obtener cardiomiocitos con un fenotipo más adulto. Al momento en el que el clon PKG-KO-01 fue estudiado y diferenciado no contábamos con el protocolo de maduración puesto a punto en el laboratorio. Además, considerando que los resultados obtenidos con el clon PKG-KO-01 no fueron concluyentes y fueron muy variables consideramos que la maduración de los cardiomiocitos sería una buena estrategia para obtener resultados más sólidos. Asimismo, la DA es una enfermedad cardíaca que se manifiesta en pacientes jóvenes/adultos por lo que su estudio sería más representativo en cardiomiocitos maduros.

#### 5.2.3.1. Evaluación de la capacidad de diferenciación a cardiomiocitos

En primer lugar, buscamos determinar si la ausencia de PKG y PKP2 en las líneas KO impedía la generación de cardiomiocitos. Para ello, se sembraron y diferenciaron en paralelo células *wild-type* y de ambos clones KO. La población de cardiomiocitos fue cuantificada mediante citometría de flujo de cTnT a día 14 de la diferenciación (Figura 41).

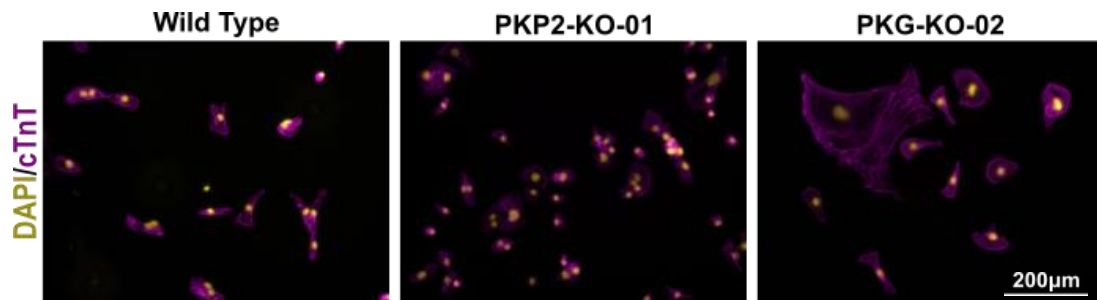




**Figura 41. Cuantificación de células positivas para cTnT.** Expresión del marcador de cardiomiocitos cTnT en el día 15 del protocolo de diferenciación cardíaca evaluado por citometría de flujo. En celeste, células tratadas sólo con el anticuerpo secundario como control negativo y en rojo, verde o rosa (*Wild-Type*, PKP2-KO-01 y PKG-KO-02, respectivamente) células tratadas con el anticuerpo primario anti cTnT y el anticuerpo secundario correspondiente.

Mediante citometría observamos una gran eficiencia de diferenciación en las 3 líneas celulares. Posteriormente, también se procedió a evaluar la presencia de cardiomiocitos en el cultivo mediante inmunofluorescencia de la proteína cTnT en el día 21 de la diferenciación cardíaca. En esta etapa, las células se encuentran cultivadas en placas p100, lo que hace necesario su replaqueo en *wells* de menor tamaño para optimizar la aplicación de la técnica de inmunofluorescencia y garantizar una adecuada distribución celular para su análisis. La optimización del proceso de replaqueo de cardiomiocitos fue un aspecto clave a lo largo del desarrollo del presente trabajo, debido a los múltiples desafíos técnicos que esta técnica conlleva. Entre las principales dificultades identificadas se encuentra la adherencia residual de las células a la placa tras la disociación con TrypLE 10X, lo que compromete la eficiencia del desprendimiento celular. Asimismo, se observó una elevada tasa de mortalidad celular posterior al replaqueo, posiblemente debido al estrés mecánico y químico inducido durante el procedimiento. El ensayo se realizó como se explicó en el subcapítulo 4.11.2 del capítulo Materiales y Métodos.

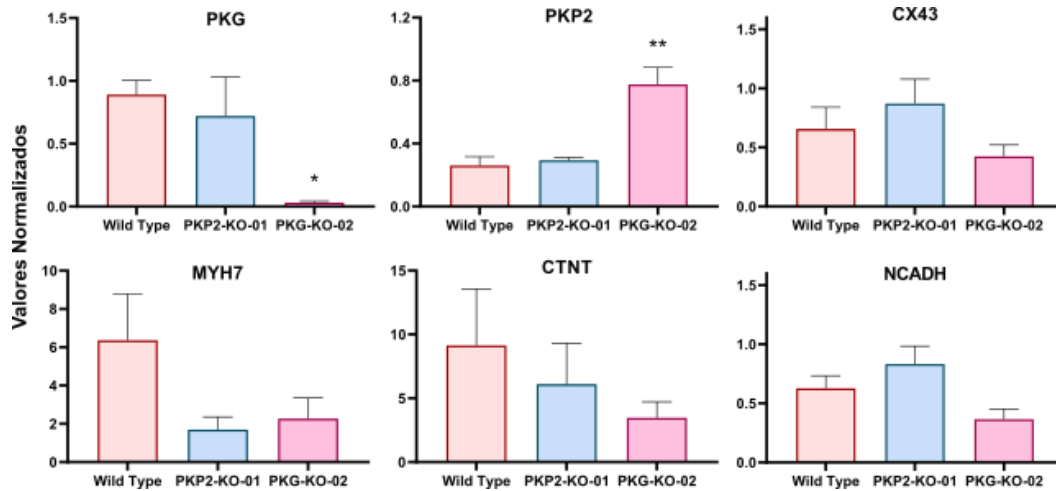
El análisis reveló la presencia de células cTnT positivas, confirmando que las líneas KO eran capaces de diferenciarse a cardiomiocitos (Figura 42).



**Figura 42. Expresión de cTnT a día 21 de la diferenciación cardíaca.** Inmunofluorescencia contra cTnT (magenta) en células de las líneas *WT*, PKG-KO-02 y PKP2-KO-01 en el día 21 de la diferenciación cardíaca. Se utilizó DAPI como marca nuclear (amarillo). Barra de escala: 200µm.

También se evaluó la expresión de genes de marcadores de cardiomiocitos, desmosomales y de unión celular a día 21 de diferenciación mediante RT-qPCRs en los que pudimos observar la correcta expresión de los mismos para los días del protocolo de diferenciación cardíaca analizado sin diferencias significativas entre los clones KO y el control *Wild-Type* (Figura 43).

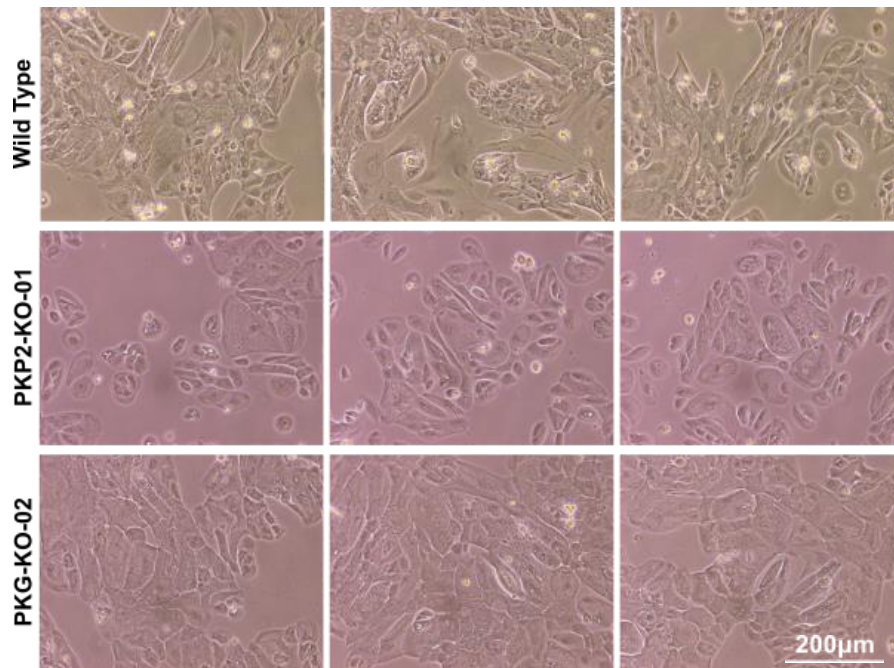
En la línea celular PKG-KO-02, se observó la ausencia de expresión transcripcional del gen *PKG* y un aumento significativo de la expresión transcripcional del gen *PKP2*. En cambio, en la línea celular PKP2-KO-01, se observó expresión de *PKP2* a día 21 del protocolo de diferenciación cardíaca, a pesar de haber observado previamente una disminución significativa de la expresión en estadio pluripotente.



**Figura 43. Expresión de genes a día 21 de diferenciación cardíaca.** Niveles de expresión de genes marcadores de cardiomiocitos (*cTnT* y *MYH7*) y proteínas de uniones celulares (*PKG*, *PKP2*, *CX43* y *N-CADH*). La expresión de los genes fue normalizada con los genes *GAPDH* y *RPL7* como *housekeeping*s. Se muestran los niveles de expresión de cada gen normalizados. Se realizó una prueba estadística t de Student con corrección de Welch comparando cada condición contra la condición *WT*, para 3 réplicas biológicas independientes, (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ .

#### 5.2.3.2. Análisis del alineamiento de los cardiomiocitos maduros mediante microscopía de campo claro

Al completar el protocolo de maduración celular luego de 38 días de cultivo, se llevaron a cabo observaciones del cultivo utilizando microscopio óptico. Teniendo en cuenta estudios previos en el laboratorio respecto al efecto del proceso de maduración de los cardiomiocitos, se espera que éstos se distribuyan de una manera más ordenada y alineada respecto a los cardiomiocitos obtenidos a día 21, tal como sucede en el tejido *in vivo*. En este caso, observamos que los cardiomiocitos maduros derivados de las líneas PKG-KO-02 y PKP2-KO-01 se mantenían más redondeados y menos alineados que el control *WT*, sin lograr organizarse de manera adecuada (Figura 44). Incluso determinamos una mayor desorganización espacial de los cardiomiocitos de la línea PKP2-KO-01, siendo estos más circulares que los de la línea PKG-KO-02.



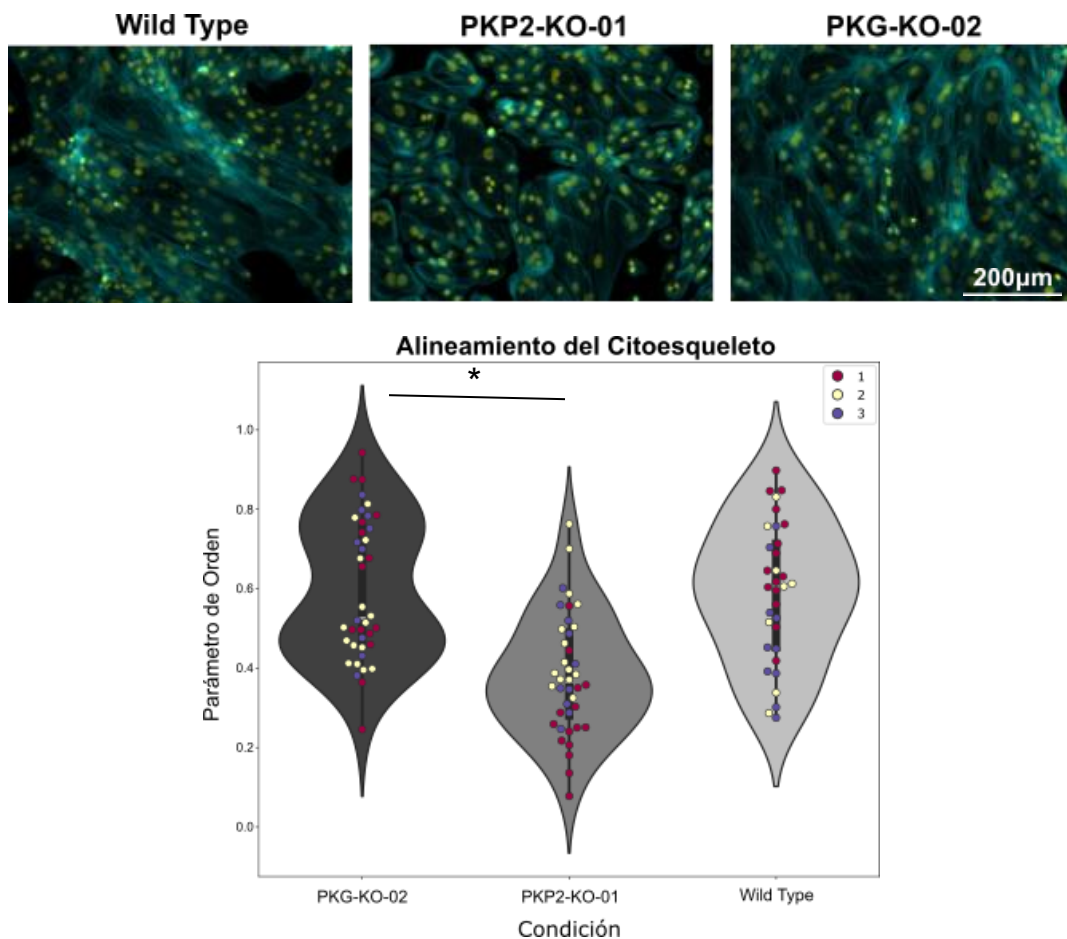
**Figura 44. Microscopía de campo claro de cardiomiocitos después del proceso de maduración.** Tres imágenes representativas de cada línea celular de la morfología que presentan los cardiomiocitos al día 38 de la diferenciación cardíaca, después de ser sometidos al proceso de maduración.

#### 5.2.3.3. Análisis cuantitativo del alineamiento de los cardiomiocitos maduros

Para sacar una mejor conclusión respecto a lo observado cualitativamente, se evaluó la organización del citoesqueleto tomando de referencia los filamentos de actina, en las distintas líneas celulares de manera cuantitativa y utilizando herramientas bioinformáticas. Para ello, se determinó el alineamiento de los filamentos de actina mediante la tinción con faloidina de cardiomiocitos maduros *WT*, *PKG-KO-02* y *PKP2-KO-01* (Figura 45 arriba). Las imágenes de fluorescencia obtenidas fueron procesadas utilizando la herramienta AFT (Alignment Fourier Transform), una biblioteca de Python que cuantifica la anisotropía estructural de las fibras de F-actina [78].

Los resultados mostraron que las células *WT* presentan un mayor grado de alineación de los filamentos de actina, caracterizado por la formación de conglomerados celulares

elongados, mientras que ambas líneas celulares *knock-out* exhibieron un patrón más anisotrópico, indicando una menor organización estructural. Para cuantificar estas diferencias, se calculó el Parámetro de Orden (O.P.), una medida de alineación de las fibras. Los valores obtenidos a partir de imágenes de 3 réplicas biológicas reflejaron una tendencia decreciente en la organización del citoesqueleto en las líneas editadas genéticamente: O.P. para WT=0,67; PKG-KO-02=0,55; y para PKP2-KO-01=0,37 (Figura 45 abajo), siendo esta diferencia entre los dos clones KO estadísticamente significativa  $p<0.05$ . A diferencia de los resultados obtenidos en las líneas *wild-type* y PKP2-KO-01 con valores de O.P. distribuidos uniformemente, la línea PKG-KO-02 mostró la presencia de 2 poblaciones una con mayor O.P. y una con menor O.P. según se puede observar en la Figura 45.

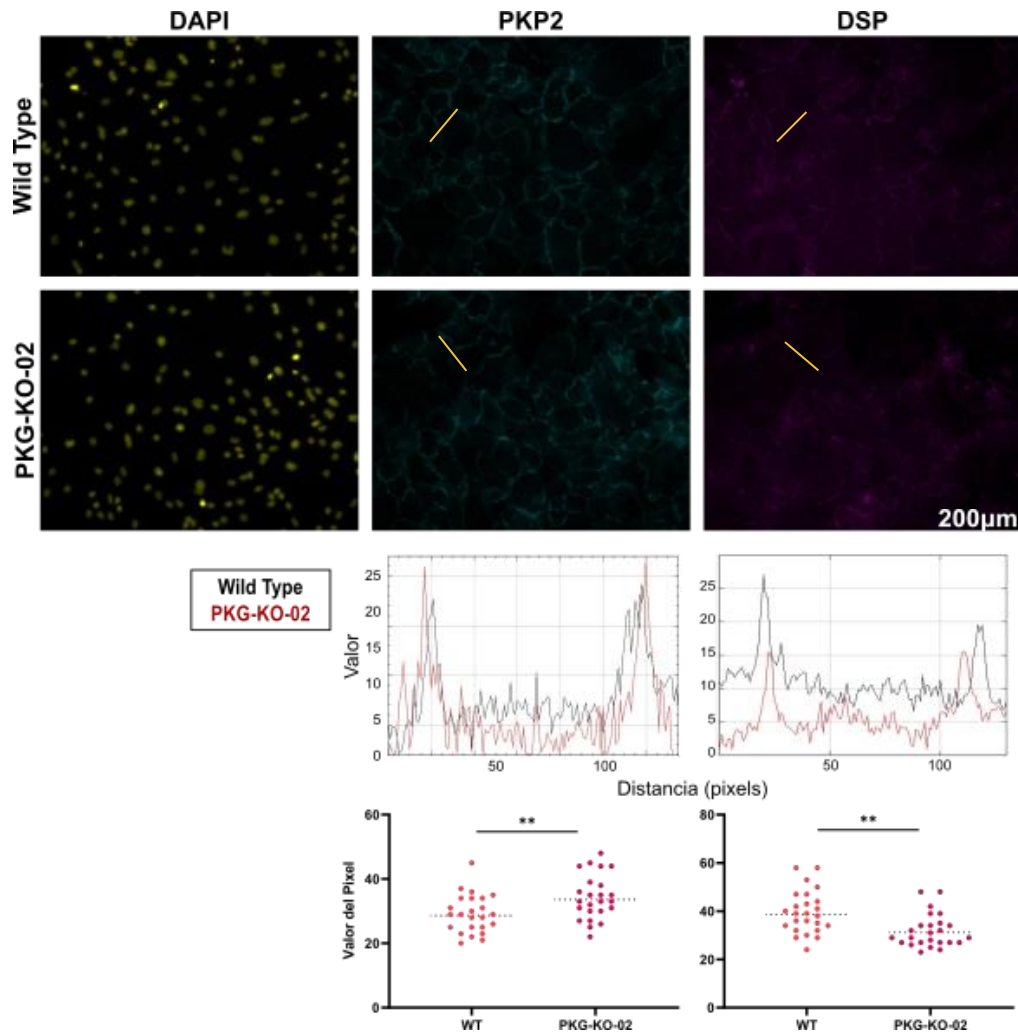


**Figura 45. Cuantificación de la alineación del citoesqueleto de actina en cardiomiocitos maduros.** Arriba: Imágenes de microscopía de fluorescencia de cardiomiocitos maduros teñidos con faloidina (cyan) derivados de las líneas *WT*, PKG-KO-02 y PKP2-KO-01, obtenidas mediante un microscopio EVOS. Abajo: Gráfico *Violin Plot* del Parámetro de Orden (O.P.) para cada réplica biológica. Cada punto representa una imagen tomada y cada color del punto representa una réplica biológica independiente (n=3).

#### 5.2.3.4. Análisis de otras proteínas desmosomales y de unión celular en los cardiomiocitos maduros

La correcta funcionalidad del desmosoma depende de la interacción coordinada de sus componentes proteicos, entre los que se encuentran la PKG y la PKP2. Con el objetivo de evaluar el impacto de la ausencia de estas proteínas en la organización del desmosoma, se realizaron inmunofluorescencias en la línea celular PKG-KO-02 para analizar la distribución y colocalización de PKP2 y DSP, dos componentes fundamentales del desmosoma en cardiomiocitos maduros.

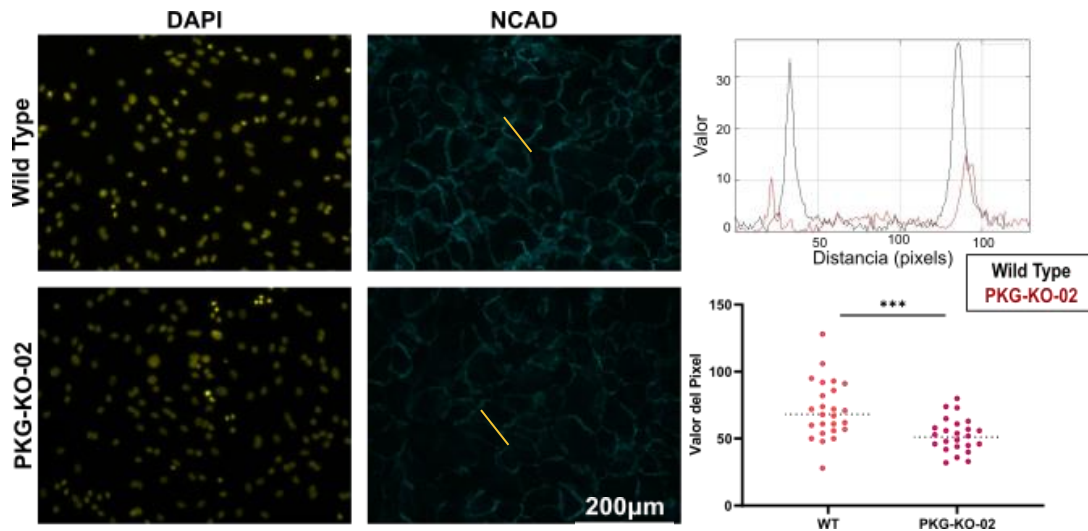
Podemos observar en las imágenes de inmunofluorescencias, cómo la línea PKG-KO-02 muestra un aumento en la expresión de la proteína PKP2 y una disminución en la expresión de DSP. Mediante el uso del programa ImageJ pudimos cuantificar los valores de intensidad del píxel y el histograma muestra cada valor de la línea marcada en la foto (Figura 46).



**Figura 46. Análisis de proteínas desmosomales en la línea PKG-KO-02.** Panel de arriba: Análisis de expresión por inmunofluorescencia de PKP2 (cyan) y DSP (magenta) usando un aumento de 200X. Se utilizó DAPI como marcación nuclear (amarillo). Barra de escala: 200µm. Panel de abajo: Histogramas mostrando los valores de intensidad de píxel de la línea amarilla marcada en la imagen. Dot plot de los valores máximos de píxel tomados al azar en 5 imágenes de una réplica biológica, obteniendo una diferencia significativa  $p < 0.005$ .

Además, se incluyó la evaluación de la N-cadherina, proteína de las uniones adherentes, con el fin de explorar posibles alteraciones en la organización de los complejos de adhesión celular del disco intercal. En este caso, también pudimos observar una disminución de la marcación de la proteína en la línea celular PKG-KO-02 (Figura 47).





**Figura 47. Análisis de proteínas de N-Cadherina en la línea PKG-KO-02.** Panel izquierdo: Análisis de expresión por inmunofluorescencia de NCAD (cyan) usando un aumento de 200X. Se utilizó DAPI como marcación nuclear (amarillo). Barra de escala: 200µm. Panel derecha: Histograma mostrando los valores de intensidad de píxel de la línea amarilla marcada en la imagen. Dot plot de los valores máximos de píxel tomados al azar en la imagen, obteniendo una diferencia significativa  $p < 0.001$ .

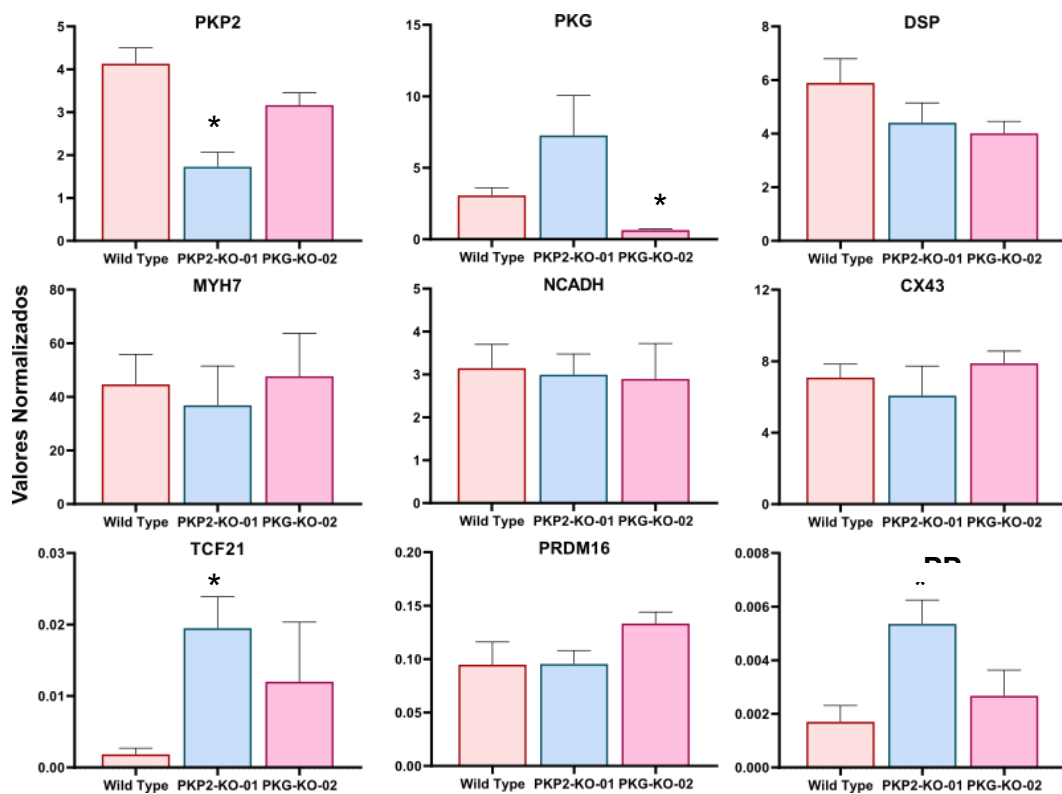
#### 5.2.3.5. Expresión génica de proteínas de uniones celulares y marcadores adipogénicos en cardiomiocitos maduros

Además de los ensayos de inmunofluorescencia, evaluamos la expresión de genes desmosomales (*PKP2*, *PKG* y *DSP*), un gen específico de cardiomiocito maduro (*MYH7*) y otros de unión celular (*CX43* y *N-CADH*) mediante RT-qPCRs en cardiomiocitos maduros PKP2-KO-01, PKG-KO-02 y control *wild-type*.

De acuerdo a la expresión de *MYH7* no habría diferencia entre los grupos experimentales respecto a su estadio de maduración estructural. Sí se observó una menor expresión de *PKP2* en cardiomiocitos PKP2-KO-01 y menor expresión de *PKG* en cardiomiocitos PKG-KO-02 respecto el control *Wild-Type* (Figura 48). Respecto a *CX43* y *N-CADH* no se observaron diferencias, a pesar de los resultados obtenidos en la inmunofluorescencia de *N-CADH* en cardiomiocitos PKG-KO-02.



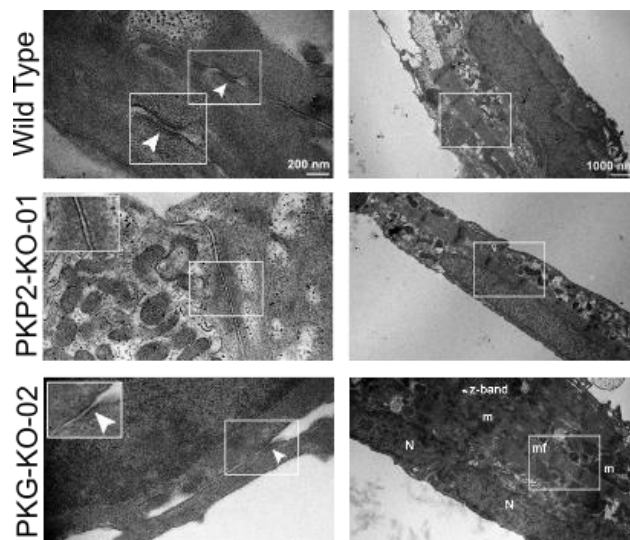
En este estadio también buscamos evaluar genes clave involucrados en la diferenciación de preadipocitos, como PPAR $\gamma$ , PRDM16, un regulador transcripcional de PPAR $\gamma$  que especifica el linaje de la grasa parda [82] y TCF21, un factor de transcripción expresado en preadipocitos y conocido por su capacidad para suprimir la miogénesis [83]. En la línea PKP2-KO-01 nos encontramos con que los genes PPAR y TCF21 se encuentran sobreexpresados. Estos hallazgos sugieren que estas células podrían estar menos estrictamente restringidas al fenotipo de cardiomiocito, presentando una predisposición temprana hacia la línea adipogénica.

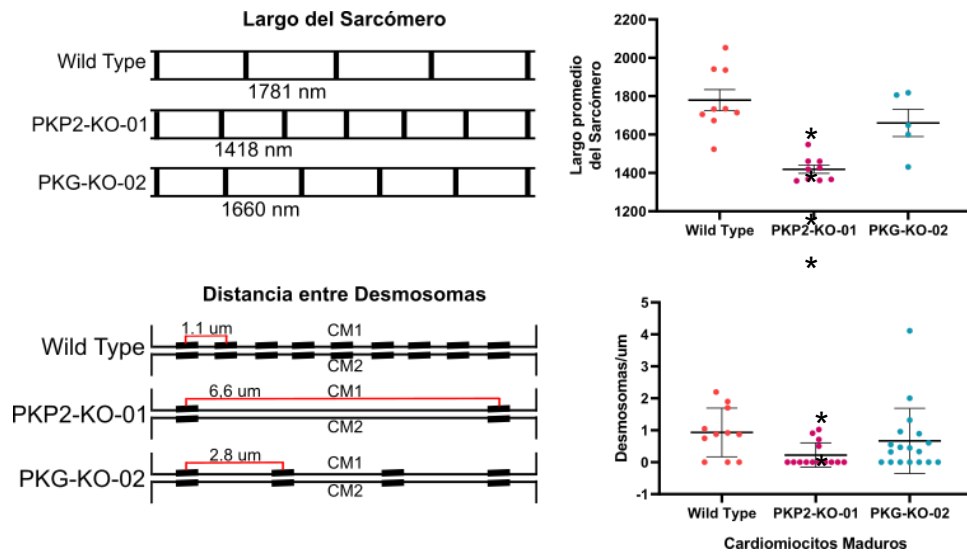


**Figura 48. Expresión de genes en cardiomiocitos maduros.** Niveles de expresión de genes marcadores de proteínas desmosomales y de uniones celulares (*PKG*, *PKP2*, *DSP*, *CX43* y *N-CADH*), marcador de cardiomiocito maduro (*MYH7*) y marcadores de adipogénesis (*TCF21*, *PRDM16* y *PPAR $\gamma$* ). La expresión de los genes fue normalizada con *RPL7* como *housekeeping*s. Se muestran los niveles de expresión de cada gen normalizados. Se realizó una prueba estadística t de Student con corrección de Welch comparando cada condición contra la condición *WT*, para 3 réplicas biológicas independientes, (\*)  $p < 0.05$ .

### 5.2.3.6. Análisis de las ultraestructuras de los cardiomiocitos maduros

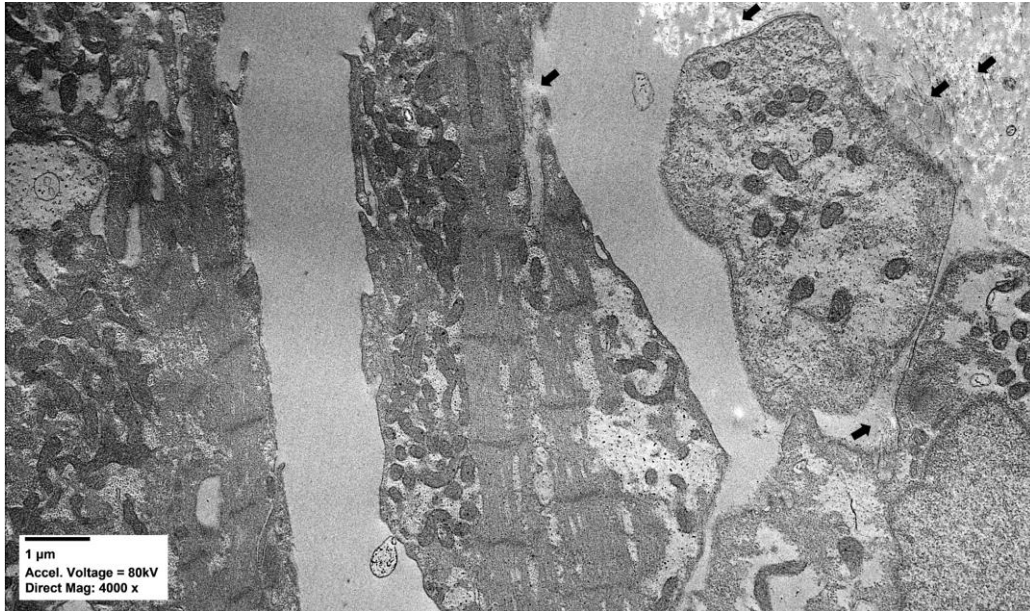
Por último, en este capítulo, realizamos microscopía electrónica de transmisión (TEM) de cardiomiocitos maduros derivados de las líneas *WT*, PKG-KO-02 y PKP2-KO-01 con el objetivo de evaluar en detalle las ultraestructuras de los cardiomiocitos maduros. Este análisis permitió cuantificar el largo de los sarcómeros en cada uno de los grupos experimentales y el número de desmosomas observados por imagen capturada donde se podía dilucidar la unión de dos cardiomiocitos (Figura 49). Los resultados revelaron diferencias significativas en los cardiomiocitos *knock-out* en comparación con los cardiomiocitos *WT*. En los cardiomiocitos *knock-out*, los sarcómeros presentaron una longitud menor y se observó una disminución en la cantidad de desmosomas por  $\mu\text{m}$  de unión celular, indicando un posible compromiso en la integridad de las uniones celulares. A su vez, los cardiomiocitos con mayores diferencias respecto a la condición *WT* fueron los de la línea PKP2-KO-01. Tal como se ve en el panel de los cardiomiocitos *WT* en la Figura 48 (arriba), las estructuras desmosomales se observan como un sombreado intenso en las uniones celulares y algo que nos llamó la atención fue encontrar estas estructuras más tenues en los cardiomiocitos PKG-KO-02 e incluso bien difuminadas en los cardiomiocitos PKP2-KO-01.





**Figura 49. Caracterización ultraestructural de los cardiomiocitos *wild-type*, PKG-KO-02 y PKP2-KO-01.** En el panel de arriba a la izquierda se pueden ver los desmosomas (recuadros blancos) y a la derecha los sarcómeros (recuadros blancos). Abajo se muestran los gráficos representativos de las mediciones hechas del largo del sarcómero y de las distancias entre los desmosomas con sus respectivos *dot plot* con los resultados obtenidos (cada punto es una foto diferente y el punto es el promedio de las mediciones realizadas de dicha foto, se muestra la cantidad de desmosomas que habría cada 1 μm de unión entre 2 cardiomiocitos). CM1: cardiomiocito 1; CM2: cardiomiocito 2. (\*\*),  $p < 0.01$ , (\*\*\*\*),  $p < 0.0001$

Particularmente, en cardiomiocitos PKP2-KO-01 se pudieron identificar fibras de matriz extracelular en abundancia, como se puede observar en la siguiente figura, señalado por flechas negras (Figura 50). Tanto en cardiomiocitos *WT* como PKG-KO-02 no se observó esta característica.



**Figura 50. Fotografía de microscopía electrónica de cardiomiocito PKP2-KO-01.** Imagen representativa de un cardiomiocito derivado de la línea celular PKP2-KO-01 donde se puede observar gran abundancia de matriz extracelular (flechas negras). Barra de escala: 1μm.

#### 5.2.4. Conclusiones parciales del capítulo

En este capítulo, se generaron dos líneas celulares *knock-out* para las proteínas PKG y PKP2 utilizando el sistema de edición génica CRISPR/Cas9. Diseñamos un ARNg dirigido específicamente a la secuencia de interés, con el objetivo de incorporar una inserción o deleción (indels) al azar que diera lugar a un codón de stop prematuro, inactivando así la expresión de la proteína. Se demostró mediante citometrías e inmunofluorescencias que ambas líneas celulares editadas fueron capaces de diferenciarse a cardiomiocitos, lo que permitió establecer como siguiente objetivo la evaluación funcional de la falta de estas proteínas en los cardiomiocitos, principalmente en cardiomiocitos maduros

Los resultados obtenidos mostraron que la ausencia de PKG y PKP2 generan cambios significativos en la organización estructural de los cardiomiocitos. A nivel macroscópico, se observaron alteraciones en la alineación del citoesqueleto, con una disminución progresiva del alineamiento en las líneas PKG-KO-02 y PKP2-KO-01 en comparación con las células *WT*. Además, los análisis mediante microscopía electrónica de transmisión revelaron que los

sarcómeros eran más cortos y que la cantidad de desmosomas por imagen era menor en los cardiomiocitos *knock-out*, indicando un impacto claro en la integridad estructural de los cardiomiocitos diferenciados. Evidenciamos también que el efecto de la ausencia de PKP2 comprometería más la estructura de los cardiomiocitos que la ausencia de PKG. Estos hallazgos destacan el papel crítico que desempeñan PKG y PKP2 en el mantenimiento de la arquitectura celular cardíaca, proporcionando evidencia clave sobre su contribución a la estabilidad y funcionalidad del tejido cardíaco.

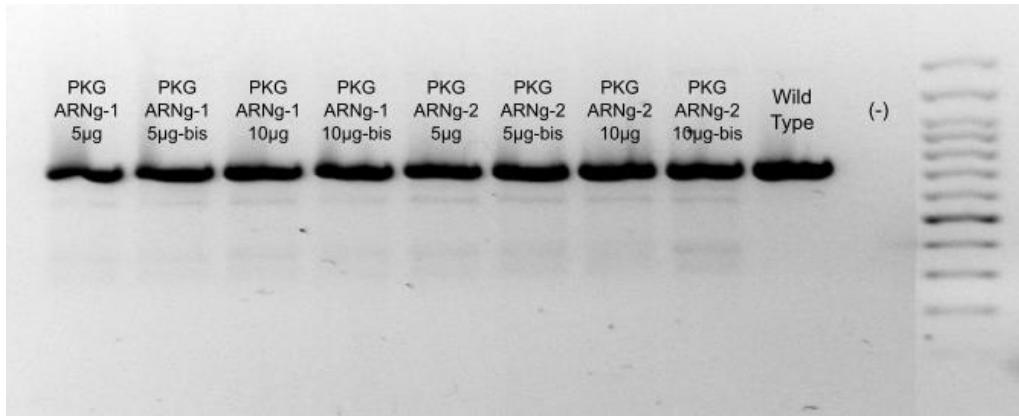
## 5.3. Capítulo 3: Modelado *in vitro* de la Displasia Arritmogénica

A partir de los resultados obtenidos, en este último capítulo nos propusimos editar la línea celular *wild-type* (INEUi002) mediante la introducción de una mutación puntual que generará un cambio de aminoácido previamente descrito en bibliografía, pero cuya patogenicidad aún no ha sido claramente establecida. Con este criterio, seleccionamos las mutaciones NM\_002230.4(PKG):c.56C>T (p.Thr19Ile o p.T19I) y NM\_001005242.3 (PKP2): c.419C>T (p.Ser140Phe o p.S140F) las cuales han sido reportadas en pacientes con DA, aunque su clasificación actual en la base de datos ClinVar sigue siendo de "Significado Incierto". El objetivo de elegir mutaciones de significado incierto consiste en evaluar si nuestro modelo de estudio permite identificar de manera experimental la patogenicidad de estas variantes.

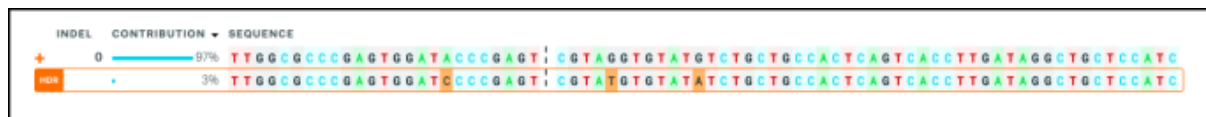
A pesar de haber observado cambios estructurales en los cardiomiocitos derivados de las líneas PKG-KO-02 y PKP2-KO-01 respecto al control *wild-type*, hasta el momento no habíamos hecho foco en el modelado de la enfermedad. Sin embargo, está reportado que los pacientes con mutaciones de pérdida de sentido en PKG y en PKP2 desarrollan DA [46], [84], [85]. Teniendo esto en cuenta, utilizaremos las líneas celulares PKG-KO-02 y PKP2-KO-01 como control positivo en los estudios de modelado de la DA y la línea celular INEUi002 se mantendrá como control negativo, permitiendo contrastar los efectos de la edición genética en el desarrollo del fenotipo patológico. Con estos controles determinaremos si la mutación de significado incierto a estudiar es posiblemente patogénica.

### 5.3.1. Generación de línea celular con mutación puntual c.56C>T (p.Thr19Ile) en *PKG* mediante recombinación homóloga

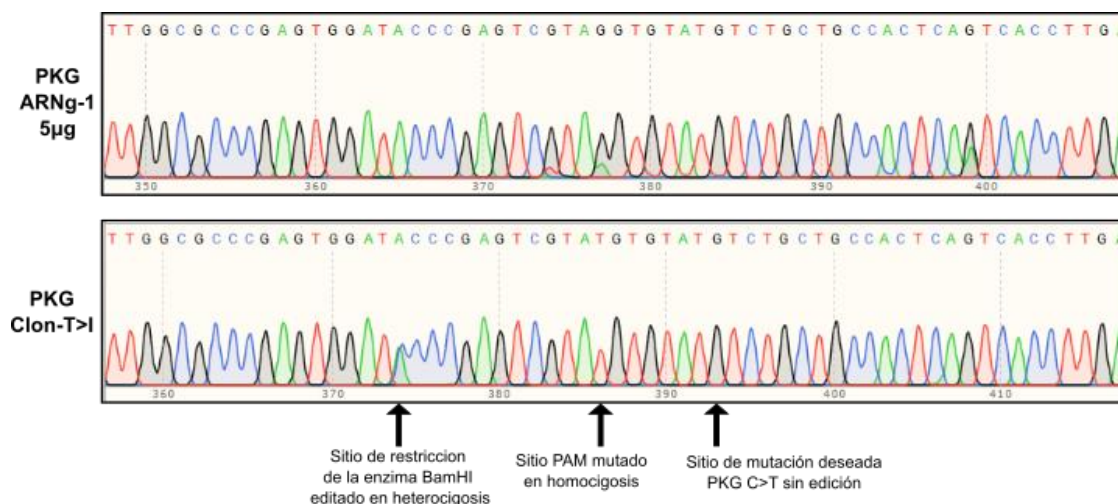
La mutación c.56C>T en el gen de la PKG (p.T19I) fue elegida para generar esta nueva línea celular y se ha encontrado en pacientes que presentan la enfermedad, pero al no poder atribuirle el fenotipo patogénico a esta mutación, es considerada de “Significado Incierto” en el ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/179756/>). Fue reportada por primera vez por Haan y colab. en 2009 [86], [87]. Para este ensayo utilizamos los dos ARNg previamente utilizados para la generación de la línea PKG-KO-01 dirigidos al exón 1 del gen de PKG que ya habían demostrado su capacidad de dirigir al sistema CRISPR al sitio de interés y se diseñaron dos ssODNs correspondientes a cada ARNg, con la variante antes mencionada, la incorporación de una mutación silenciosa para BamH1 y la edición del sitio PAM. Para este experimento, utilizamos dos concentraciones de ADN final en 200.000 células (2µg o 5µg) para cada uno de los ARNg y su respectivo ssODN. Los *pools* celulares se analizaron como se explicó anteriormente mediante PCR y corte posterior con BamH1 y secuenciación por Sanger del amplicón generado. El corte con BamH1 mostró el patrón de banda esperado en *pools* transfectados (Figura 51) y el análisis de la secuenciación mostró un porcentaje del 3% de HDR en el *pool* transfectado con 5µg total de ADN (Figura 52) según análisis bioinformático. A pesar de estos resultados, se aislaron 12 clones celulares de este *pool* celular y sólo obtuvimos 1 clon con el PAM completamente editado, el nuevo sitio de corte con la enzima de restricción editado en heterocigosis, aunque sin la edición deseada que generaría el cambio p.T19I (Figura 53). A este clon celular lo denominamos T>I.



**Figura 51. Producto de PCR de la secuencia de *PKG* lindante al sitio de edición deseada digerido con la enzima *Bam*HI.** Gel de agarosa donde observamos que los *pools* celulares incorporaron el ssODN correctamente, tienen el producto de PCR de *PKG* y 2 bandas más tenues de menor peso molecular correspondientes a la digestión de la enzima *Bam*HI. **WT**: CMPi sin transfectar, **(-)**: control negativo de la reacción.



**Figura 52. Análisis mediante un software online (ICE-Synthego) de la eficiencia de edición.** Los *pools* celulares fueron analizados con el software Synthego. Este utiliza los resultados por secuenciación Sanger de los *pools* y la secuencia *Wild-Type* como control, calculando el porcentaje de células que podrían haber incorporado el ssODN. El *pool* celular transfectado con 5µg de ADN total obtuvo una eficiencia del 3% de edición HDR. Imagen obtenida del software online Synthego ([www.ice.synthego.com](http://www.ice.synthego.com)).





**Figura 53. Secuenciaciones por Sanger.** Histograma de las secuencias genómicas del *pool* celular transfectado con 5µg y el clon T>I. Las flechas indican los cambios generados tras la edición génica. La secuenciación está realizada con cebador reverso.

Los análisis de secuenciación realizados sobre los *pools* celulares obtenidos tras la transfección de las células con los diferentes ARNg para generar la edición PKG c.56C>T (o G>A en la secuencia complementaria) revelaron un porcentaje de edición extremadamente bajo. Una alternativa podría ser aumentar la cantidad de plásmido y ssODN a transfectar, pero esto no era posible ya que 5 µg en 200.000 células era el límite superior de ADN para que no sea sumamente tóxico (evaluado previamente experimentalmente), lo que indicaba una eficiencia limitada del sistema CRISPR/Cas9 para generar esta edición al menos utilizando estos ARNg. Dado que estos factores dificultaban significativamente la obtención de clones homocigotas, se decidió no continuar con la búsqueda de un clon celular con esta edición específica y continuar con la edición puntual en el gen de PKP2

### 5.3.2. Generación de línea celular con mutación puntual c.419C>T (p.Ser140Phe) en PKP2 mediante recombinación homóloga

La mutación p.S140F está reportada en pacientes que presentan la DA, pero generalmente estos pacientes también portan otras mutaciones en genes desmosomales, es por ello que decidimos dilucidar si esta mutación, por si sola, generaría el efecto fenotípico patológico de la enfermedad (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/45077/>). Fue reportada por primera vez por Gerull en el 2004 [46], [88], [89]. Para este ensayo utilizamos los dos ARNg previamente utilizados para la generación de la línea PKP2-KO-01 dirigidos al exón 3 del gen de PKP2 y se diseñaron dos ssODNs, correspondientes a cada ARNg, con esta variante y la edición del sitio PAM. Debido a que habíamos comprobado en el experimento anterior que la incorporación de la mutación silenciosa para la enzima BamH1 no necesariamente se

correlacionaba siempre con la incorporación de la edición deseada en el gen, decidimos no incorporar ninguna mutación silenciosa para una enzima de restricción en este caso.

Se transfectaron las células con las siguientes cantidades de ADN:

ARNg	ssODN	#Células/MW	ADN total
1µg/µl	1µg/µl	5 <sup>5</sup> Células/MW6	500ng
1µg/µl	1µg/µl	10 <sup>5</sup> Células/MW6	1µg
1µg/µl	1µg/µl	10 <sup>5</sup> Células/MW12	2µg
2,5µg/µl	2,5µg/µl	10 <sup>5</sup> Células/MW12	5µg

**Tabla 10. Tabla de concentraciones de ADN total utilizado para transfectar las CMPi.** En este caso se aumentó el ADN total utilizado y también utilizamos un tamaño del *well* menor.

Los *pools* celulares se analizaron como se explicó anteriormente mediante secuenciación por Sanger, se aislaron aproximadamente 115 clones celulares considerando las distintas concentraciones utilizadas y no obtuvimos ningún clon con la edición deseada. Es por ello que se decidió hacer un análisis adicional para determinar la eficiencia de edición de los *pools* con un método más sensible y preciso como es la secuenciación masiva de los amplicones de PCR.

### 5.3.3. Secuenciación masiva de amplicones

Debido a que no logramos editar el gen de PKP2 en el experimento anterior, decidimos utilizar las mayores cantidades de ADN evaluadas anteriormente en la transfección de las CMPi y realizar un ensayo para determinar la eficiencia de edición en los *pools* celulares generados. Mediante el análisis de los *pools* determinaremos la eficiencia de cada uno de los ARNg lo que permitirá luego realizar clones celulares sólo del ARNg más efectivo. Para este experimento, utilizamos dos concentraciones de ADN final en 200.000 células (2 µg o 5 µg) para cada uno de los ARNg y su respectivo ssODN. Esto generó 4 grupos experimentales: ARNg1-2µg, ARNg1-5µg, ARNg2-2µg, ARNg2-5µg. Después de la transfección y el tratamiento con puromicina se aisló el ADN genómico de cada *pool* celular y se envió a la

empresa CD Genomics para realizar la secuenciación de amplicones de PCR que contienen el sitio de edición. Como control también se envió una ADN genómico de células *wild-type*. La empresa, luego de amplificar por PCR el sitio de interés, secuenció cada uno de los amplicones generados que en este caso fueron cerca de 100.000 amplicones. Los resultados obtenidos luego los analizamos con el *software* CRIS.py, un programa basado en Python diseñado para el análisis de datos de secuenciación de nueva generación (NGS) en experimentos de edición génica con CRISPR. Este software permite evaluar la frecuencia de inserciones y deleciones (*indels*), así como detectar modificaciones específicas introducidas mediante reparación homóloga (HDR) utilizando ssODNs. Debido a que este estudio fue realizado sobre el *pool* celular editado, con este análisis nosotros esperábamos encontrar amplicones con la secuencia *wild-type* (no habían sufrido edición), amplicones correctamente editados (con cambio de base deseada y edición del PAM), amplicones con cambio de base editada correctamente (sin estar el PAM editado) y amplicones editados incorrectamente (portadores de *indels*). A los fines prácticos a nosotros nos interesaban tanto los amplicones correctamente editados como los amplicones con cambio de base editada correctamente. En ambos casos se generaría la variante deseada en PKP2.

Las secuencias detectadas por el programa fueron las siguientes:

- *Wild-Type*: TGGAAGAAAGG **TCC**TTGAGGCATCCTCTG
- Mutación Puntual: TGGAAGAAAGG **TTC**TTGAGGCATCCTCTG
- Mutación Puntual + PAM: TGGAAGAAAGG **TTCTTGAGAC**ATCCTCTG
- Otros *indels*: TGGAAGAAAGGTCC **NNN**TTGAGGCATCCTCTG

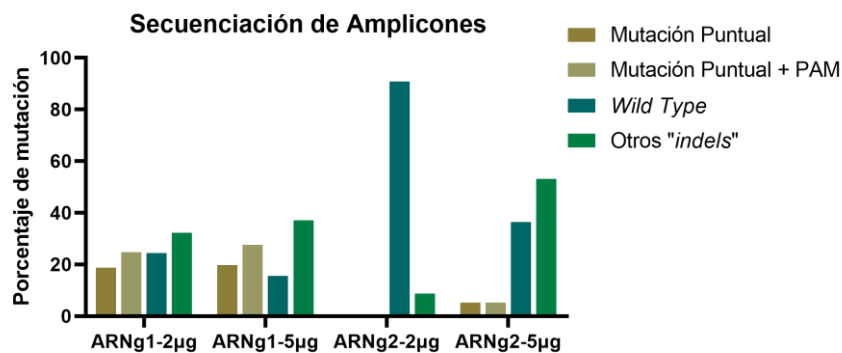
Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

Grupos	Total Lecturas	Mutación Puntual	Mutación Puntual + PAM	Wild Type	Indels
ARNg1-2ug	104438	19504 (18.7%)	25833 (24.7%)	25499 (24.4%)	33629 (32.2%)
ARNg1-5ug	106571	21012 (19.7%)	29448 (27.6%)	16636 (15.6%)	39537 (37.1%)
ARNg2-2ug	95237	220 (0.2%)	220 (0.2%)	86471 (90.8%)	8380 (8.8%)
ARNg2-5ug	99023	5219 (5.3%)	5219 (5.3%)	36015 (36.4%)	52482 (53%)

**Tabla 11. Tabla de resultados de la secuenciación de amplicones.** Mutación Puntual: Cantidad de lecturas en las cuales se observa la incorporación de la mutación puntual. Mutación Puntual + PAM: Cantidad de lecturas en las cuales se observa la incorporación de la mutación puntual y modificación deseada del PAM. *Wild-Type*: Cantidad de lecturas en las cuales se observa la secuencia *wild-type*. Otros “indels”: Cantidad de lecturas que incorporaron un indel en su secuencia.

Según estos resultados, el *pool* celular ARNg1-2µg tendría el 43,4% (18,7% + 24,7%) de las células correctamente editadas, el *pool* celular ARNg1-5µg tendría el 47,3% (19,7% + 27,6%) de células correctamente editadas, mientras que los *pools* ARNg2-2µg y ARNg2-5µg tendrían sólo el 0,4% y 10,6% de células correctamente editadas, respectivamente.

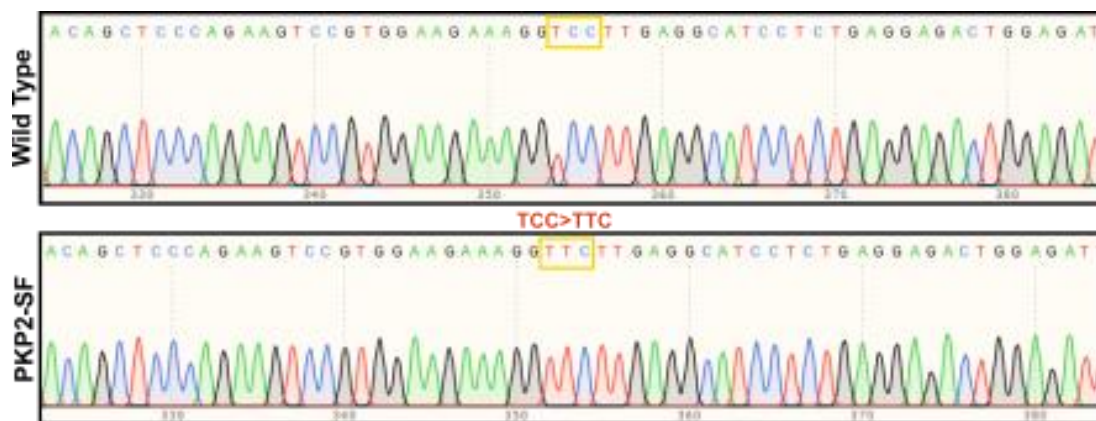
Para mejor visualización de los datos se realizó un gráfico de barras de los resultados obtenidos (Figura 54). Podemos concluir que el ARNg1 es más eficiente que el ARNg-2 para la generación de la edición deseada independientemente de la cantidad de ADN utilizada.



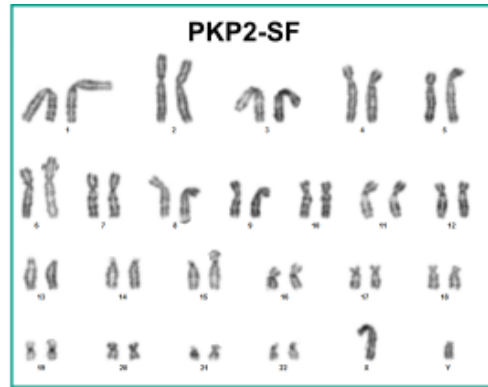
**Figura 54. Gráfico representativo de los resultados de la secuenciación de amplicones de los *pools* celulares editados.**

#### 5.3.4. Generación de la línea PKP2-SF

El estudio de secuenciación de amplicones de los *pools* nos permitió elegir el grupo experimental ARNg1-2µg para la generación de clones celulares ya que el 43% de los clones tendrían la edición deseada. Teniendo en cuenta este porcentaje tan eficiente, se realizó el aislamiento sólo de 12 clones celulares, se aisló el ADN genómico de cada uno de ellos y se analizó la secuencia de *PKP2* por Sanger (Figura 55). Los resultados mostraron que tres de ellos incorporaron correctamente el ssODN, logrando la introducción de la mutación puntual deseada, mientras que dos presentaron la inserción de una base nucleotídica y de los otros siete dos conservaron su secuencia *wild-type* y los otros tenían incorporaciones de bases en heterocigosis. Entre los tres clones editados, se seleccionó uno que no contenía la modificación en el sitio PAM, con el objetivo de reproducir lo más posible el genotipo de interés para el estudio. Una vez seleccionado el clon celular se realizó un análisis de cariotipo, el cual dio normal (Figura 56) y a esta nueva línea celular se la denominó PKP2-SF.

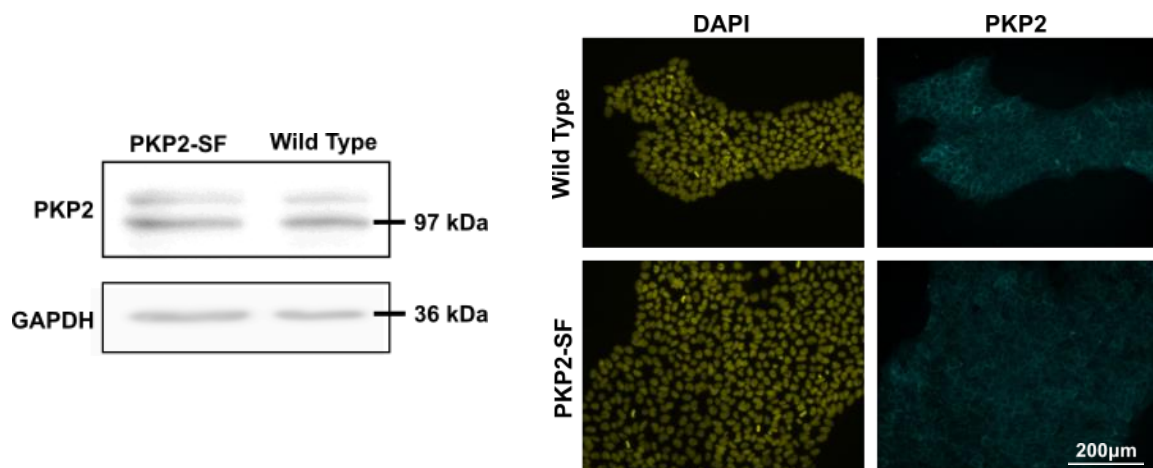


**Figura 55. Secuenciaciones por Sanger.** Histograma de las secuencias genómicas de las células *wild-type* y el clon PKP2-SF. En amarillo: sitio de edición y cambio de nucleótidos en el clon.



**Figura 56. Análisis de bandas G cromosómicas del clon PKP2-SF.** Se analizaron 50 metafases con una resolución de 450 bandas para determinar el cariotipo de la línea celular PKP2-SF presentando un número normal diploide.

Luego buscamos evaluar si la mutación introducida afectaba la traducción de la proteína, o era degradada por la propia célula. Para ello, analizamos la expresión de PKP2 mediante western blot (Figura 57, izquierda) e inmunofluorescencia (Figura 57, derecha) en células pluripotentes del clon PKP2-SF. En ambos ensayos, detectamos la presencia de la proteína y en la posición adecuada en la membrana celular.

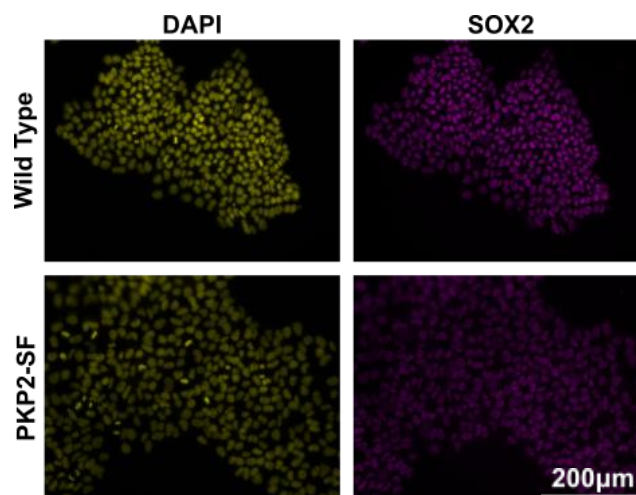


**Figura 57. Análisis de la expresión proteica de PKP2.** Izquierda: Medición de la expresión proteica mediante la técnica de *Western Blot* en el clon celular PKP2-SF. Derecha: Detección por inmunofluorescencia de la proteína PKP2 (cyan) en células *wild-type* y el clon celular PKP2-SF. Se utilizó DAPI como marcación nuclear (amarillo). Aumento de 200X, barra de escala: 200µm.

### 5.3.5. Validación de la pluripotencia en la línea PKP2-SF

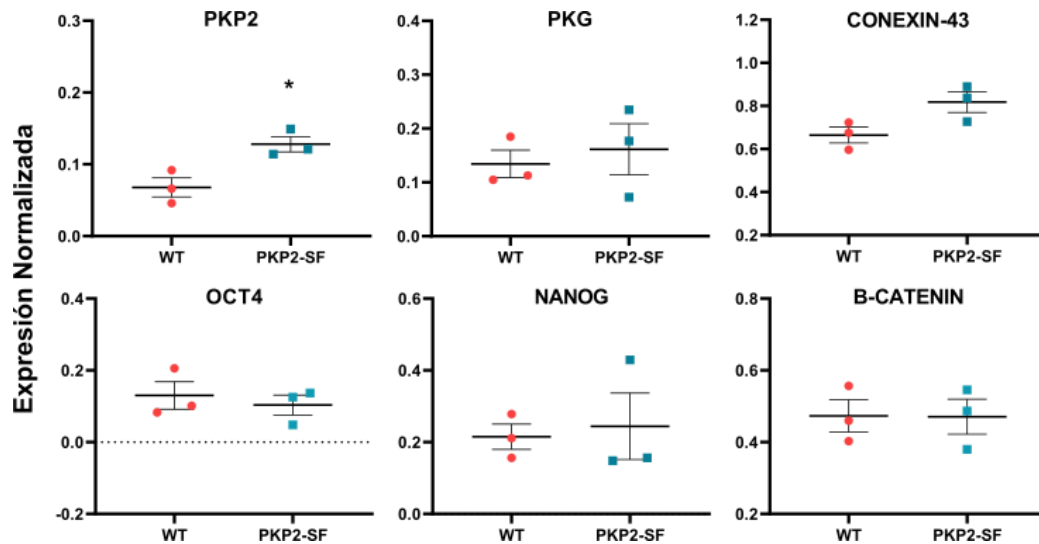
Las células se cultivaron bajo condiciones que mantienen su estado de pluripotencia, y su morfología fue analizada mediante microscopía de campo claro. No se detectaron alteraciones morfológicas significativas ni un incremento evidente en la tasa de muerte celular.

Para verificar el mantenimiento del estado pluripotente en la línea celular, se evaluó la expresión del factor de transcripción SOX2 mediante inmunofluorescencia (Figura 58). Los resultados obtenidos evidenciaron tanto en las células *WT* como en la línea celular PKP2-SF, una alta presencia de SOX2 en los núcleos, confirmando así la preservación del estado pluripotente en el clon celular.



**Figura 58. Marcación de pluripotencia.** Análisis de expresión por inmunofluorescencia del marcador de pluripotencia SOX2 (magenta) en las líneas celulares *Wild-Type* y PKP2-SF usando un aumento de 200X. Se utilizó DAPI como marcación nuclear (amarillo). Barra de escala: 200µm.

Analizamos los niveles de expresión por RT-qPCR de dos marcadores moleculares de pluripotencia (OCT4 y NANOG), genes desmosomales (PKG y PKP2) y otros relacionados con uniones celulares (B-CATENINA y CONEXINA 43). No se encontraron diferencias estadísticas entre el clon PKP2-SF y el control *WT* en los genes de pluripotencia, lo que indicaría que el estado pluripotente de las células se mantuvo sin alteraciones. Observamos un aumento significativo a nivel transcripcional del gen de PKP2 en el clon PKP2-SF (Figura 59).

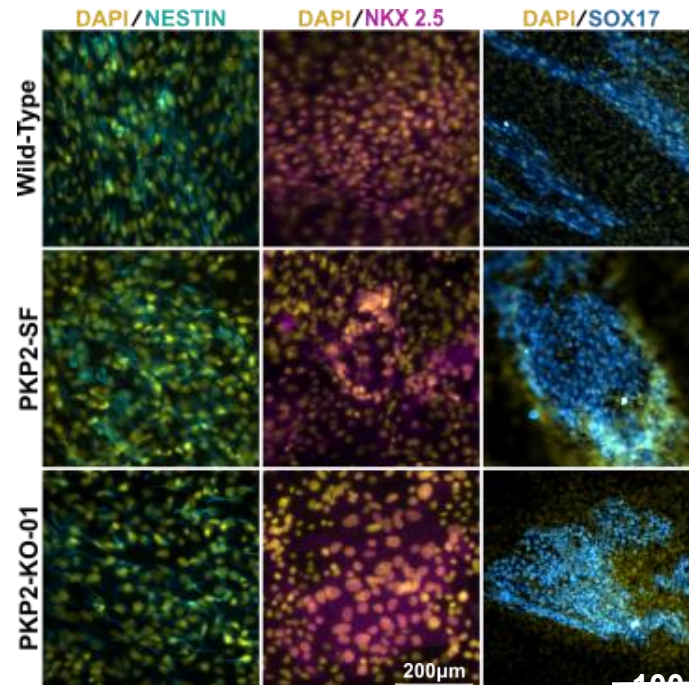


**Figura 59. Análisis de la expresión génica en estado pluripotente.** Cuantificación de la expresión de los ARNm de genes desmosomales, marcadores de pluripotencia y genes de uniones celulares por RTq-PCR de las líneas celulares *Wild-Type* y PKP2-SF. La expresión de los genes fue normalizada con los genes *GAPDH* y *RPL7* como housekeepings. Se muestran los niveles de expresión de cada gen normalizados. Se realizó una prueba estadística t de Student con corrección de Welch comparando cada condición contra la condición *WT*, para 3 réplicas biológicas independientes, (\*)  $p < 0.01$ .

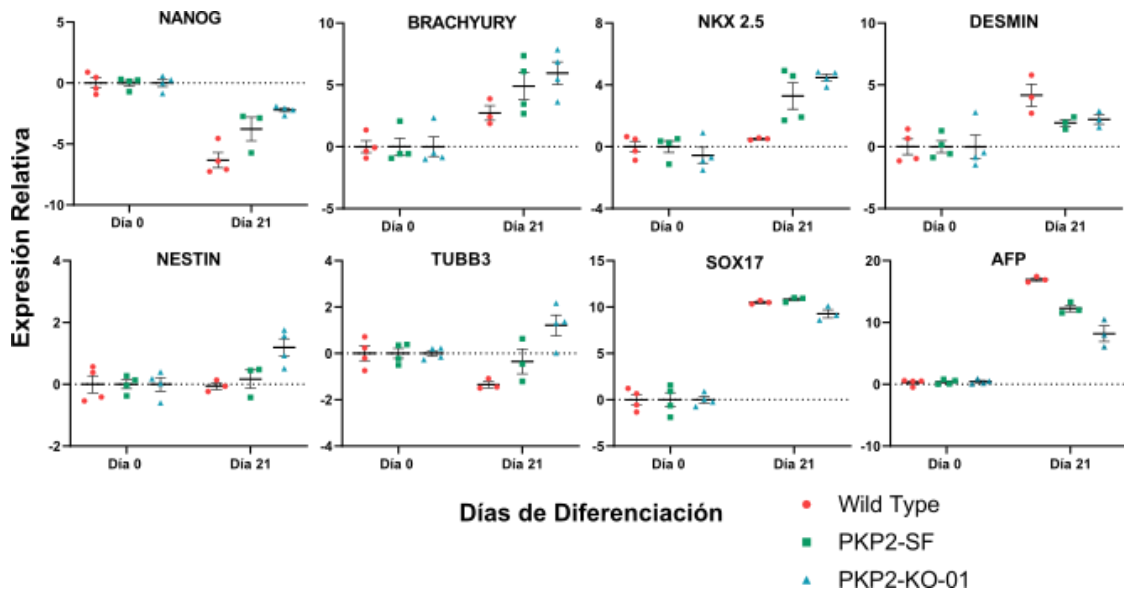
#### 5.3.5.1. Diferenciación no dirigida *in vitro*

Para confirmar la pluripotencia de las líneas celulares y su capacidad de diferenciarse en células derivadas de las tres capas germinales embrionarias, se llevó a cabo un protocolo de diferenciación *in vitro* no dirigido a “cuerpos embrioides”. Este enfoque permite evaluar si las células pueden generar derivados de ectodermo, mesodermo y endodermo de manera espontánea, sin la influencia de factores externos que guíen su destino celular de manera específica. La caracterización de esta diferenciación se realizó mediante inmunofluorescencias (Figura 60) y RT-qPCR (Figura 61), utilizando marcadores específicos: NES y TUBB3 para el ectodermo, BRACHYURY, NKX2.5 y DES para el mesodermo, y SOX17 y AFP para el endodermo. También se agregó el marcador de pluripotencia NANOG, para evaluar la correcta salida de la pluripotencia de las células. Mediante este ensayo observamos aumento de expresión de estos marcadores lo que confirma la capacidad de las células para diferenciarse, validando así su estado pluripotente.





**Figura 60. Análisis de cuerpos embrioides de las líneas *Wild-Type*, *PKP2-SF* y *PKP2-KO-01*.** Análisis de expresión por inmunofluorescencia de los marcadores NESTIN (cyan), NKX 2.5 (magenta) y SOX17 (cyan hot) usando un aumento de 400X y 200X. Se utilizó DAPI como marcación nuclear (amarillo). Barra de escala: 200µm/100µm.



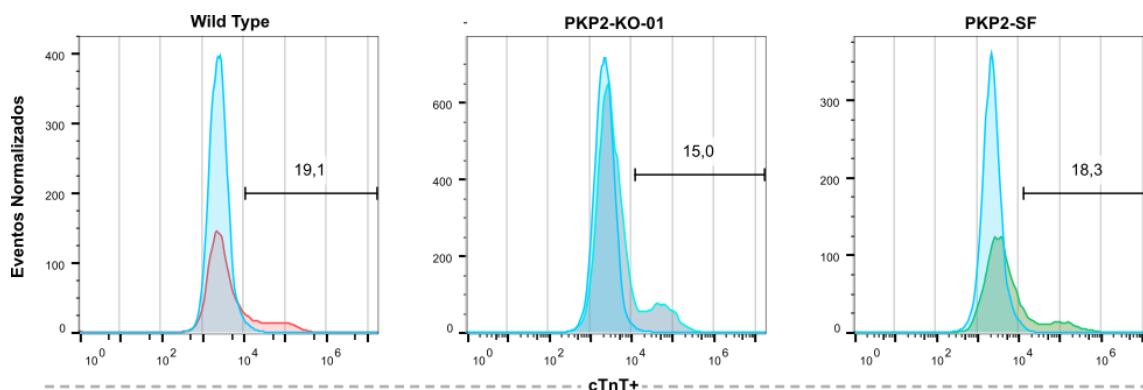
**Figura 61. Expresión de genes a día 21 de diferenciación no dirigida a cuerpos embrioides.**

Niveles de expresión de genes marcadores de pluripotencia (*NANOG*), transición epitelio-mesenquimal (*BRACHYURY*), de ectodermo (*NES* y *TUBB3*), de mesodermo (*BRACHYURY*, *NKX2.5* y *DES*) y de endodermo (*SOX17* y *AFP*). La expresión de los genes fue normalizada con los genes *GAPDH* y *RPL7* como *housekeeping*s y relativizada al día 0 del protocolo. Se muestran los niveles de expresión de cada gen normalizados. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de un factor seguido de un test Tukey., (\*\*),  $p < 0.01$ .

Estos resultados nos permitieron continuar con los objetivos de trabajo propuestos para este capítulo, sabiendo que el estado pluripotente de las células se encontró inalterado por la edición génica incorporada en las células.

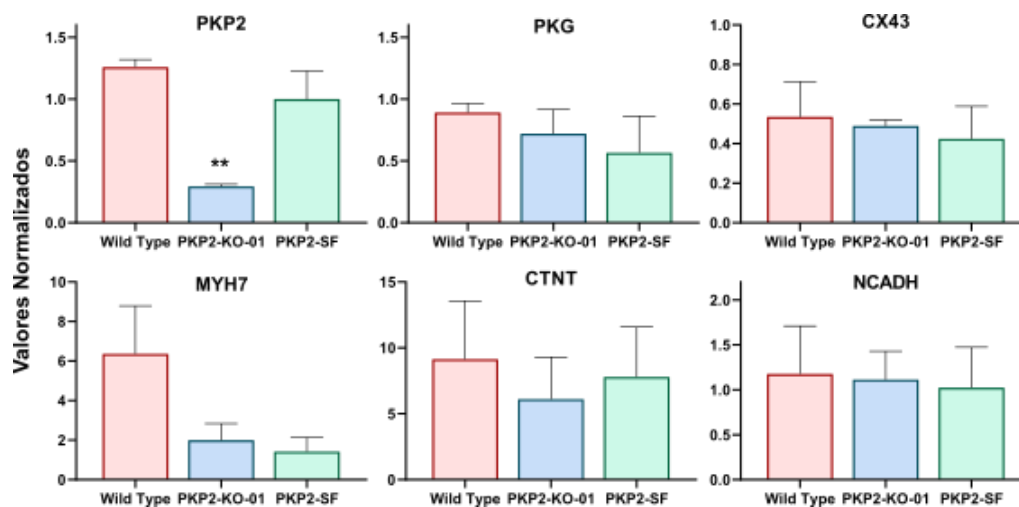
### 5.3.6. Diferenciación a cardiomiocitos de la línea PKP2-SF

A continuación, la línea PKP2-SF se sometió al protocolo de diferenciación cardíaca junto con el control *wild-type* y la línea PKP2-KO-01. En primer lugar, se determinó la eficiencia de diferenciación mediante citometría de flujo para el marcador cardíaco cTnT a día 15 de diferenciación (Figura 62). Si bien la eficiencia de diferenciación fue baja, esto ocurrió en los tres grupos experimentales y sin diferencias estadísticas entre ellos ( $14.4 \pm 4.3\%$  vs.  $11.25 \pm 3.3\%$  y  $13.2 \pm 4.4\%$  para WT, PKP2-KO-01 y PKP2-SF respectivamente).



**Figura 62. Cuantificación de células positivas para cTnT.** Expresión del marcador de cardiomiocitos cTnT en el día 15 del protocolo de diferenciación cardíaca evaluado por citometría de flujo. En celeste, células tratadas sólo con el anticuerpo secundario como control negativo y en rojo, azul o verde (*Wild-Type*, PKP2-KO-01 y PKP2-SF, respectivamente) células tratadas con el anticuerpo primario anti cTnT y el anticuerpo secundario correspondiente.

También se evaluó la expresión de ARNm mediante RT-qPCRs de genes asociados a cardiomiocitos, genes de proteínas desmosomales y genes de proteínas de otras uniones celulares en cardiomiocitos para determinar si éstos se veían afectados en la línea PKP2-SF debido a la mutación incorporada (Figura 63). Los resultados obtenidos no muestran diferencias en la expresión de estos genes respecto al control *wild-type*.



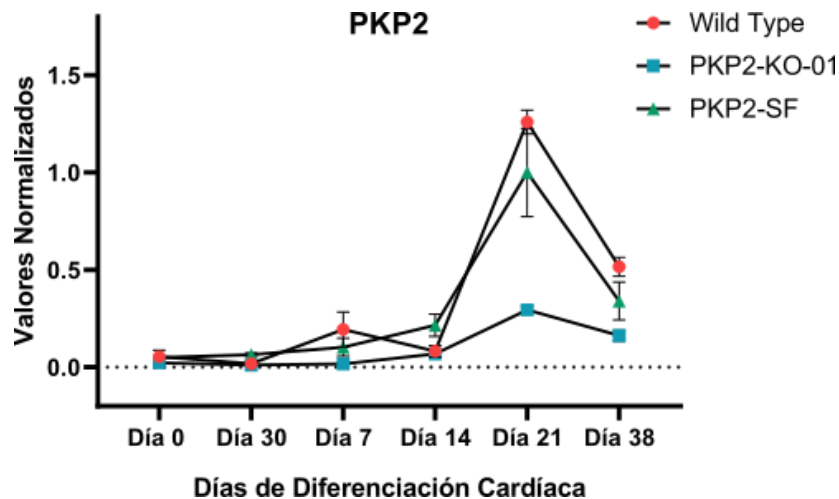
**Figura 63. Expresión de genes a día 21 de diferenciación cardíaca.** Niveles de expresión de genes marcadores de cardiomiocitos (*cTnT* y *MYH7*) y proteínas de uniones celulares (*PKG*, *PKP2*, *CX43* y *N-CADH*). La expresión de los genes fue normalizada con los genes *GAPDH* y *RPL7* como *housekeeping*s. Se muestran los niveles de expresión de cada gen normalizados. Se realizó una prueba estadística t de Student con corrección de Welch comparando cada condición contra la condición *WT*, para 3 réplicas biológicas independientes, (\*\*),  $p < 0.01$ .

#### 5.3.6.1. Expresión génica de PKP2 en la diferenciación cardíaca

Analizamos la dinámica de expresión transcripcional de *PKP2* a lo largo del proceso de diferenciación cardíaca y en cardiomiocitos maduros (día 38) (Figura 64). En el día 21,

observamos un aumento significativo en la expresión de *PKP2* tanto en la línea *Wild-Type* como en *PKP2-SF* ( $p < 0.0001$ ), mientras que en la línea *PKP2-KO-01*, si bien el incremento fue menor, siguió siendo significativo ( $p < 0.05$ ).

Posteriormente, en el día 38, correspondiente a cardiomiocitos en un estado maduro, se evidenció una disminución en la expresión transcripcional de *PKP2*. Esta reducción podría estar relacionada con la transición hacia un fenotipo más similar al de los cardiomiocitos adultos, los cuales han perdido su capacidad proliferativa y presentan un perfil transcripcional estable acorde a su estado de diferenciación avanzada.



**Figura 64. Análisis de la dinámica de expresión génica de *PKP2* en la diferenciación cardíaca.**

La expresión del gen fue normalizada con el gen *RPL7* como *housekeeping*. Se muestran los niveles de expresión normalizados. Se muestran el promedio y error estándar para 3 réplicas biológicas independientes para cada línea celular.

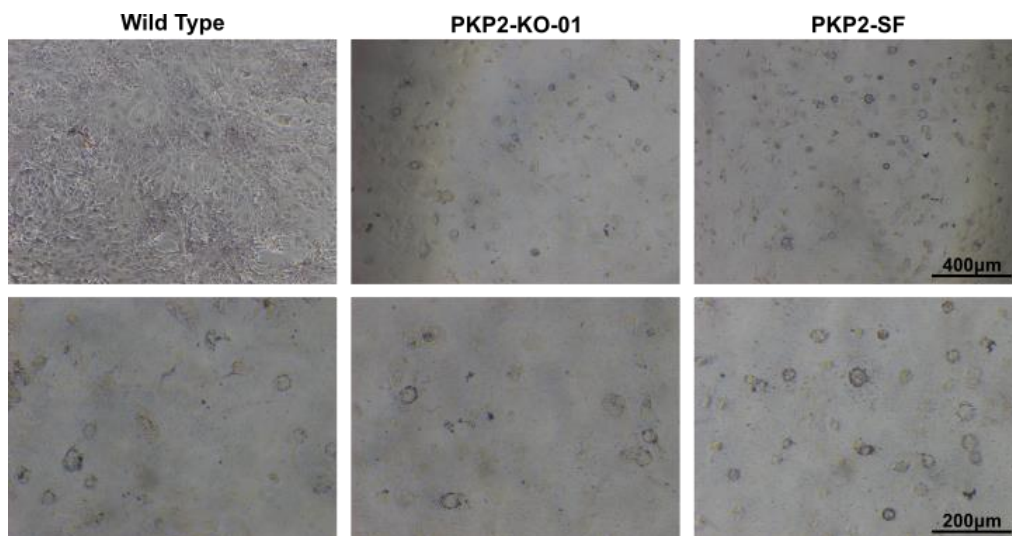
#### 5.3.6.2. Análisis de la capacidad adipogénica de las líneas celulares

La formación de tejido adiposo es una de las principales características histopatológicas de la DA y un indicador clave de su progresión en el tejido cardíaco. Es por ello que, para determinar si los cardiomiocitos *PKP2-KO* y/o *PKP2-SF* presentan una mayor predisposición a la adipogénesis, analizamos la capacidad adipogénica en cardiomiocitos maduros derivados de estas líneas celulares comparándolos con cardiomiocitos maduros *wild-type*. Para ello, los

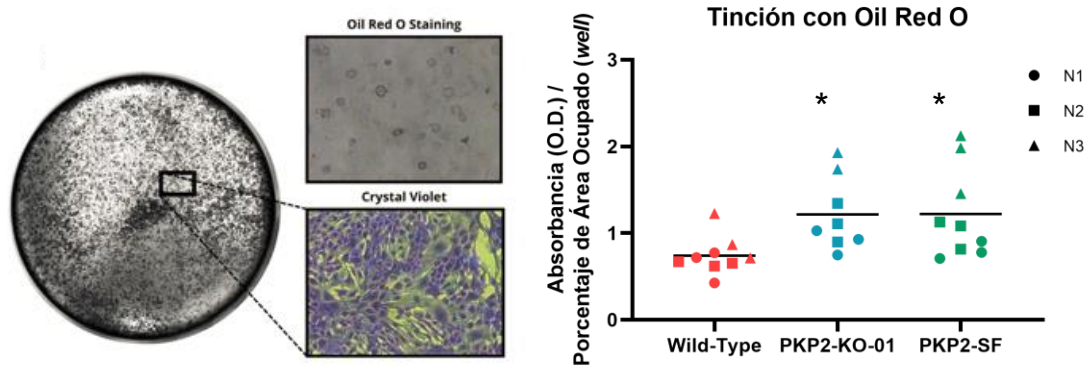
cardiomiocitos maduros fueron expuestos a medio pro-adipogénico por una semana y se evaluó la presencia de gotas lipídicas mediante tinción con *Oil Red O*, un marcador específico para la detección de lípidos neutros, permitiendo así una caracterización visual y cuantitativa del grado de adipogénesis en los cardiomiocitos derivados de las distintas líneas celulares (Figura 65).

El Oil Red O retenido en los cardiomiocitos fue luego liberado utilizando isopropanol y se midió la densidad óptica o absorbancia (optical density, OD) de esta solución. Para asegurar una comparación precisa, los valores obtenidos fueron normalizados en función de la densidad celular en el plato de cultivo de cada muestra evaluada utilizando tinción con cristal violeta y análisis de microscopía (Figura 66). Este procedimiento permitió determinar la acumulación de lípidos en las distintas líneas celulares, proporcionando una medida cuantitativa del grado de adipogénesis inducido en cada experimento.

Los resultados mostraron un aumento significativo en la acumulación de lípidos de los cardiomiocitos derivados de las líneas PKP2-KO-01 y PKP2-SF en comparación con los cardiomiocitos control *Wild-Type*.



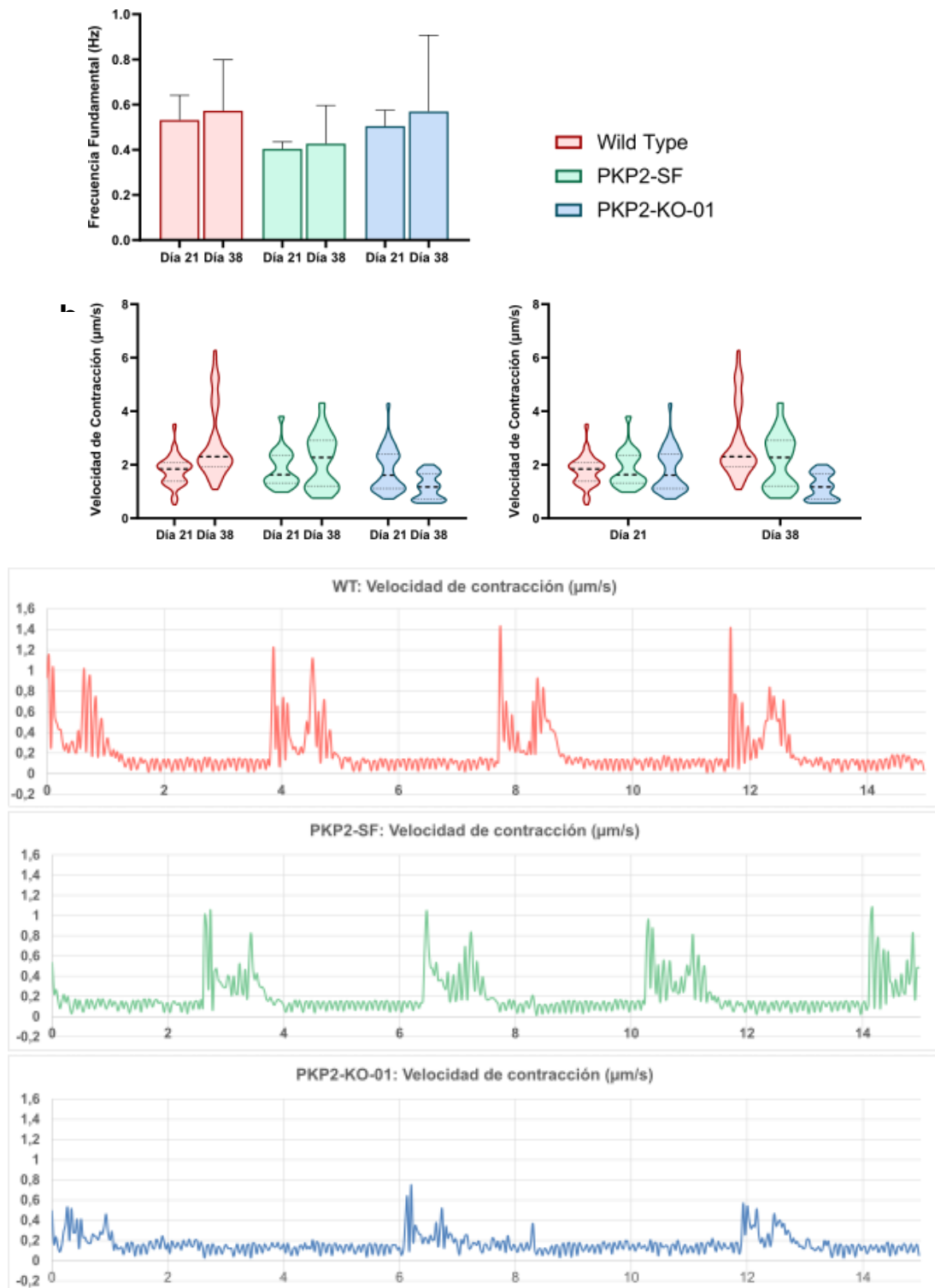
**Figura 65. Tinción con Oil Red O posterior a exposición al medio pro-adipogénico.** Imágenes representativas de las tres líneas celulares, *Wild-Type*, PKP2-KO-01 y PKP2-SF teñidas con Oil Red O después de ser sometidas al medio pro-adipogénico durante una semana. Arriba se utilizó un aumento de 100X y abajo de 200X.



**Figura 66. Medición de capacidad adipogénica de cardiomiocitos maduros PKP2-KO-01 y PKP2-SF (n=3).** Izquierda: En blanco y negro se observa un *well* representativo con cardiomiocitos teñidos con cristal violeta. Derecha: Cuantificación del contenido lipídico tras una semana de medio pro adipogénico comparando las tres líneas celulares: *Wild-Type*, PKP2-KO-01 y PKP2-SF. (\*)  $P < 0.05$

### 5.3.6.3. Análisis de la contracción de los cardiomiocitos

Además de evaluar la tendencia pro-adipogénica de los cardiomiocitos generados, quisimos determinar si la contractibilidad de los cardiomiocitos maduros se veía afectada en las líneas PKP2-KO-01 y PKP2-SF, tanto en cardiomiocitos inmaduros a día 21 como en cardiomiocitos maduros a día 38 de diferenciación. Para ello, se tomaron filmaciones de los diferentes grupos experimentales a los diferentes tiempos y se utilizó el *software* de código abierto CONTRACTIONWAVE desarrollado por Scalzo y col. en 2021 para su análisis (Figura 67). Este programa, escrito en Python, permite analizar de manera precisa la contractilidad celular mediante algoritmos de procesamiento de video, cuantificando parámetros como la frecuencia, amplitud y regularidad de los ciclos contráctiles. El *software* ha sido validado previamente para su uso en cardiomiocitos en diversas etapas del desarrollo y maduración, incluyendo aquellos derivados CMPI, cardiomiocitos neonatales y adultos.



**Figura 67. Análisis de la contracción de cardiomiocitos utilizando el software CONTRACTIONWAVE.** a) Cuantificación de la frecuencia fundamental de cardiomiocitos en días 21 y 38 del protocolo de maduración cardíaca (n=3 réplicas biológicas. Barra de error indica promedio  $\pm$  SD). b) Cuantificación de la velocidad de contracción de cardiomiocitos en días 21 y 38 del protocolo de maduración cardíaca mostrando los mismos resultados de dos maneras diferentes (n=3 réplicas biológicas. Línea punteada indica la mediana). c) Electrocardiograma de velocidad de contracción. Imágenes representativas de las velocidades de contracción de las tres líneas celulares: *wild-type*, PKP2-SF y PKP2-KO-01.

Lo que se observa luego de realizar este análisis es que la frecuencia de contracción de los cardiomiocitos no se altera ni por la maduración de los cardiomiocitos (día 21 vs. día 38) ni por las variantes en PKP2. En cambio, se ve una clara tendencia en los cardiomiocitos de la línea *wild-type* y PKP2-SF en aumentar la velocidad de contracción con la maduración, siendo mayor para los cardiomiocitos *wild-type*. Respecto a los cardiomiocitos PKP2-KO-01, la velocidad de contracción a día 21 es similar al control, aunque a día 38 ésta no aumenta tal como sucede en los otros 2 grupos experimentales, lo que se observa en cambio es una clara tendencia a ser menor.

### 5.3.7. Conclusiones parciales del capítulo

La implementación de la técnica de secuenciación masiva de amplicones permitió identificar el ARNg con mayor eficiencia de edición tras la transfección, lo que facilitó la generación del nuevo clon celular PKP2-SF. Este clon fue posteriormente caracterizado para validar su pluripotencia y capacidad de diferenciación, con el objetivo de ser utilizado en el modelado de la enfermedad.

El uso de la línea celular PKP2-KO-01 como control patogénico permitió adjudicar cierto grado de patogenicidad a la línea PKP2-SF, la cual, hasta el momento, se encuentra clasificada como una mutación de significado incierto. Esto refuerza la utilidad de nuestro



modelo celular para evaluar mutaciones cuya implicancia en la patogénesis de la enfermedad aún no ha sido completamente establecida.

Asimismo, tanto los cardiomiocitos PKP2-KO-01 como PKP2-SF presentaron mayor acumulación de lípidos que los cardiomiocitos *wild-type* tras el tratamiento con medio inductor de adipogénesis, junto con una tendencia a disminuir la velocidad de contracción en los cardiomiocitos maduros. Estos fenotipos son consistentes con alteraciones observadas en modelos de DA, lo que respalda la hipótesis de que esta mutación podría afectar la integridad estructural y funcional de los cardiomiocitos. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar su impacto a nivel molecular y su potencial contribución a la patogénesis de la enfermedad.

## 6. Discusión

La caracterización de los mecanismos celulares fundamentales de la Displasia Arritmogénica son esenciales para un mejor entendimiento de la enfermedad y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En la presente tesis abordamos esta caracterización utilizando como modelo de estudio cardiomiocitos diferenciados a partir de CMPi editadas genéticamente poniendo foco en la función de las proteínas desmosomales PKG y PKP2.

Como primer objetivo planteamos generar una línea de CMPi *knock-out* para PKG y así determinar la relevancia de esta proteína en nuestro modelo. Estudios previos en ratones *knock-out* para PKG han demostrado su papel esencial en la estabilidad estructural del tejido cardíaco. Los embriones homocigotas para la delección de PKG presentan una ausencia completa de desmosomas en el corazón, lo que resulta en defectos graves en la arquitectura de los discos intercalares. Como consecuencia, muchos de estos embriones mueren entre los días 12 y 16 del desarrollo debido a la ruptura de los ventrículos y el colapso de la integridad miocárdica, mientras que aquellos que logran sobrevivir hasta el nacimiento exhiben alteraciones en la piel, como ampollas epidérmicas [54]. En humanos, se han identificado mutaciones en el gen *PKG* asociadas con enfermedades tanto cardíacas como cutáneas. La mutación sin sentido p.S24X en PKG fue reportada como causante de un fenotipo exclusivamente cutáneo, sin afectar el desarrollo cardíaco en pacientes jóvenes [84]. Estudios posteriores realizados por Boente y colaboradores, evidenciaron que estos mismos pacientes desarrollaron complicaciones cardiológicas con el tiempo, sugiriendo que la ausencia de manifestaciones cardíacas en la infancia no excluye una evolución patológica en etapas posteriores de la vida [85]. Esta diferencia entre lo que sucede en ratones respecto a la patología en humanos hace evidente la necesidad de modelos de estudio con células humanas.

Con el objetivo de analizar la función de PKG e implicancia en cardiomiocitos humanos decidimos generar una línea de CMPi *knock-out* en homocigosis para este gen utilizando la

herramienta de edición génica CRISPR/Cas9. Si bien el uso de CMPi derivados de pacientes con variantes genéticas específicas son una excelente herramienta para el modelado de enfermedades [90], este enfoque presenta limitaciones para establecer una relación causal entre mutaciones específicas y fenotipos funcionales, ya que diferentes líneas de CMPi poseen distintos antecedentes genéticos, lo que puede influir en los resultados. En cambio, CRISPR/Cas9 ha permitido la generación de mutaciones específicas de enfermedades hereditarias, creando modelos experimentales altamente controlados para el estudio *in vitro* de diversas cardiopatías, prescindiendo de la necesidad de muestras de pacientes las cuales suelen ser limitadas y de difícil acceso [91]. Esto no solo facilita la investigación de enfermedades genéticas raras o con baja prevalencia, sino que también permite la creación de modelos experimentales altamente reproducibles, evitando la variabilidad asociada a la diversidad genética entre individuos.

Para generar la línea *knock-out* para el gen de PKG decidimos hacer la edición por recombinación homóloga mediada por CRISPR/Cas9. Si bien el *knock-out* se podría haber planteado realizarlo mediante CRISPR/NHEJ, se decidió hacer la edición por recombinación homóloga con el objetivo de poner a punto esta tecnología para luego utilizarla en la generación de otras variantes específicas reportadas en pacientes con DA. El primer desafío fue la optimización de métodos de transfección y selección clonal para garantizar la generación de clones celulares editados de manera eficiente. Una de las particularidades de las CMPi es que crecen en colonias y cuando se encuentran unicelulares no sobreviven [92], [93], [94]. A pesar de suplementar el medio con inhibidor de Rock para evitar la muerte cuando están unicelulares, el cultivo unicelular es muy ineficiente. Es por ello que inicialmente se planteó hacer líneas clonales a partir de la siembra de células en muy baja confluencia, pero esto generó poblaciones con una mezcla de genotipos, lo que dificultaba la identificación de clones con la edición deseada. Para superar esta limitación, se planteó la siembra de una célula única por *well*. A pesar de que la tasa de supervivencia de estas células fue baja (alrededor del 50%) nos aseguramos obtener líneas de CMPi clonales. Esta estrategia nos permitió obtener la línea PKG-KO-01.

En el primer capítulo de esta tesis se describen los ensayos de caracterización y diferenciación a cardiomiocitos de esta línea celular. Sin embargo, luego del ensayo de ARNseq detectamos que la línea celular utilizada contenía un isocromosoma extra. Esto representó un desafío en la interpretación de los datos, dado que no pudimos diferenciar si el fenotipo que estábamos obteniendo de los cardiomiocitos era consecuencia de la mutación sin sentido en *PKG* o del isocromosoma. El cultivo prolongado de CMPi se ha relacionado con la aparición de aberraciones cromosómicas y/o aneuploidías (número anormal de cromosomas), lo que puede comprometer su estabilidad genómica y utilidad terapéutica. Esta inestabilidad cromosómica surge del pasaje continuo, que ejerce presión selectiva sobre las células, permitiendo la supervivencia y proliferación de clones con anomalías cromosómicas. Esto disminuye la fiabilidad de las CMPi para aplicaciones clínicas e investigaciones, enfatizando la importancia de medidas de control de calidad rigurosas y duraciones de pasaje limitadas durante el cultivo para mantener la integridad genómica. Puntualmente, Mayshar y colaboradores estudiaron la integridad cromosómica de más de 100 líneas celulares de distintos trabajos y observaron una alta incidencia en duplicaciones totales y parciales del cromosoma 12 causado por las condiciones de cultivo, resultando en un enriquecimiento significativo de varios genes, concluyendo que esta aneuploidía podría limitar la capacidad de diferenciarse y un aumento en la tumorigénesis de las CMPi [95], [96]. Si bien la línea de CMPi de la cual partimos y editamos (INEUi002) se utiliza rutinariamente en el laboratorio y no presenta aberraciones cromosómicas de acuerdo a estudios previos, consideramos que el estrés generado en el cultivo clonal pudo haber generado esta anomalía particularmente en este clon. Fue debido a este resultado que actualmente se incorporó en el laboratorio la necesidad del análisis de cariotipo a cada línea de CMPi editada genéticamente como análisis obligatorio antes de continuar con los experimentos.

Habiendo concluido que no podríamos cumplir con los objetivos propuestos utilizando la línea PKG-KO-01 como modelo, decidimos generar una nueva línea *knock-out* para *PKG* y también para *PKP2*, pero ahora mediante CRISPR/NHEJ. Esta estrategia es más eficiente para la introducción de indels y lo corroboramos luego de identificar que el 33% de los clones

analizados eran *knock-out* para *PKG* y 16% para *PKP2*. En primer lugar, determinamos que ambas líneas editadas se diferenciaban eficientemente a cardiomiocitos, a diferencia de lo observado en el capítulo 1 donde la capacidad de diferenciación de la línea *PKG-KO-01* era muy variable. Al evaluar la expresión de genes de los cardiomiocitos día 21 observamos un aumento significativo de la expresión de *PKP2* en cardiomiocitos *PKG-KO-02*. Una posible explicación para este aumento es la respuesta a un mecanismo compensatorio para mantener la integridad estructural del desmosoma. *PKP2* podría sustituir parcialmente la ausencia de *PKG* en el ensamblaje del desmosoma y anclaje a los filamentos intermedios, pero con menor eficiencia [97]. Para el estudio más preciso del efecto de la ausencia de *PKG* y *PKP2* en cardiomiocitos decidimos extender el protocolo que veníamos haciendo (hasta día 21) para obtener cardiomiocitos con un fenotipo más avanzado en el desarrollo o maduros. Nos pareció importante la aplicación de este nuevo protocolo que recientemente se había puesto a punto en el laboratorio, ya que nos permitiría estudiar cardiomiocitos mejor organizados a nivel estructural y más similares a cardiomiocitos adultos que es cuando se manifiesta la DA en pacientes.

Uno de los primeros ensayos que realizamos en cardiomiocitos maduros fue evaluar el alineamiento de los cardiomiocitos y de los filamentos de actina comparando las líneas *knock-out* respecto a cardiomiocitos *wild-type* para determinar si su organización era isotrópica (distribución espacial uniforme) o anisotrópica (distribución espacial no uniforme). El patrón isotrópico de los cardiomiocitos permite una organización celular con una alineación direccional preferente, replicando la arquitectura natural del tejido cardíaco. En este contexto los DI y los sitios de unión célula-célula se distribuyen de manera homogénea, favoreciendo una conectividad estructural equilibrada. Esta organización es fundamental, ya que los cardiomiocitos requieren un acoplamiento mecánico eficiente para transmitir las fuerzas contráctiles de manera uniforme a lo largo del tejido. Además, el corazón opera como un sincitio funcional, en el cual las señales eléctricas y mecánicas deben propagarse de forma sincronizada para garantizar una contracción coordinada. Por ello, mantener un patrón isotrópico en cultivos *in vitro* de cardiomiocitos es crucial para reproducir con fidelidad el

comportamiento fisiológico del miocardio, asegurando tanto la estabilidad estructural como la funcionalidad contráctil del tejido cardíaco. Está reportado que mutaciones en las proteínas desmosomales comprometen la capacidad de los cardiomiocitos para establecer uniones celulares estables, debilitando la adhesión mecánica y afectando la cohesión del tejido, debido a una desorganización de la estructura desmosomal [24], [40], [55]. Además, dado que los desmosomas están estrechamente vinculados a la organización del citoesqueleto de actina, estas mutaciones pueden inducir una desorganización de los filamentos de actina, contribuyendo a la aparición de un patrón anisotrópico, caracterizado por una disposición celular desordenada y una pérdida de alineación estructural. La anisotropía en cultivos celulares imita las condiciones patológicas observadas en la DA, donde la alteración en la adhesión célula-célula provoca retrasos en la conducción eléctrica y fallos mecánicos. El análisis de microscopía de campo claro de los cultivos de cardiomiocitos y los ensayos con faloidina en nuestras líneas celulares *knock-out* para PKG y PKP2 evidenciaron una organización más anisotrópica en comparación con el *Wild-Type*, siendo más evidente en los cardiomiocitos PKP2-KO-01. Esto resalta cómo la pérdida de estas proteínas afecta la dinámica del citoesqueleto, posiblemente debido a la falla en el acoplamiento de las uniones célula-célula. Con este ensayo pudimos evidenciar *in vitro* un parámetro relevante del efecto de la ausencia de estas proteínas en los cardiomiocitos. Este parámetro no se hubiese podido determinar a día 21 de diferenciación ya que el alineamiento de los cardiomiocitos es un aspecto clave de los cardiomiocitos maduros, demostrando entonces que es de suma importancia el avance en el protocolo para sacar conclusiones más certeras.

Los resultados obtenidos del análisis de inmunofluorescencias de los cardiomiocitos maduros PKG-KO-02 mostraron un aumento de la marcación de PKP2, tal como ocurría a día 21 mediante expresión génica, y disminución de marcación de DSP y N-CADH. Si bien estos resultados son preliminares y es necesario aumentar las réplicas biológicas para confirmarlo, la ausencia de PKG estaría alterando la expresión proteica o el anclaje de otras proteínas de uniones celulares. Tal como fue descrito en la introducción, PKG es un componente central de los desmosomas, desempeñando un papel clave junto a PKP2, en la conexión entre las

cadherinas desmosomales (DSC2 y DSG2) y el citoesqueleto a través de la desmoplaquina (DSP). La pérdida de PKG interrumpe esta conexión crítica, provocando la desestabilización de los complejos desmosomales y comprometiendo la integridad de las uniones célula-célula [54]. Tal como fue observado, como consecuencia, podría suceder una reducción en la expresión y localización de otras proteínas desmosomales, como DSP. Estos efectos pueden afectar la adhesión celular y la organización del citoesqueleto, alterando la expresión de otras proteínas de las uniones celulares, como N-Cadherina [55], [98]. Este desequilibrio puede comprometer la integridad mecánica del tejido, aumentando su susceptibilidad al estrés mecánico y favoreciendo la aparición de patrones anisotrópicos o una débil adhesión célula-célula. Estos cambios imitan las etapas tempranas de la DA, donde los desbalances en las proteínas desmosomales desempeñan un papel clave en la progresión de la enfermedad [25].

Para determinar si la ausencia de PKP2 y/o PKG estaba alterando la formación de los desmosomas y la ultraestructura en general de los cardiomiocitos decidimos estudiar mediante microscopía TEM cardiomiocitos maduros derivados de las líneas editadas para compararlos con cardiomiocitos *wild-type*. En condiciones fisiológicas, los sarcómeros de cardiomiocitos maduros tienen una longitud  $\sim 1.8\text{-}2.2\ \mu\text{m}$  y estos cardiomiocitos están caracterizados con una mejor contractilidad y menos rigidez [99]. En contraste, los cardiomiocitos con un menor grado de maduración celular tienen sarcómeros más cortos, con una capacidad de contracción reducida. Los resultados obtenidos mediante este estudio mostraron una reducción del tamaño promedio de los sarcómeros en los cardiomiocitos *knock-out* (PKP2-KO-01 < PKG-KO-02 < WT) siendo más evidente esta diferencia en la línea PKP2-KO-01 (cabe destacar que el tamaño promedio de los sarcómeros de nuestros cardiomiocitos *wild-type* fue de  $1,78\ \mu\text{m}$  lo que denota una gran fidelidad del modelo respecto a lo reportado en bibliografía en condiciones fisiológicas). Los sarcómeros más cortos tienen una capacidad reducida para generar la fuerza óptima para la contracción, lo que contribuye a la disminución de la contractilidad observada en la DA. Este deterioro mecánico no solo afecta la función contráctil del miocardio, sino que también podría activar vías de remodelación patológica, favoreciendo la fibrosis y la acumulación de grasa en el tejido

cardíaco. Mutaciones en genes clave como PKP2 y PKG comprometerían la estabilidad del citoesqueleto, provocando una desalineación sarcomérica y reducción en la longitud de los sarcómeros. El impacto de estas mutaciones en la organización sarcomérica ha sido corroborado por Gokhan y colaboradores, donde demostraron que mutaciones en DSP afectan la estabilidad del citoesqueleto y la organización de los sarcómeros de manera similar a lo observado en pacientes con DA. Además, la pérdida de DSP causa una reducción en la longitud sarcomérica, promoviendo déficits contráctiles. Estos hallazgos refuerzan la relación entre la pérdida de adhesión desmosomal, la alteración del citoesqueleto y los defectos en la contractilidad cardíaca [100]. Este acortamiento sarcomérico se ha asociado con un estado de hipercontractilidad basal, donde los cardiomiocitos mutantes presentan una mayor rigidez en reposo. Como consecuencia, la relajación celular se ve comprometida, lo que genera una contracción anómala y una mayor predisposición a arritmias.

Además de haber observado un efecto en el largo de los sarcómeros, también comprobamos que las estructuras desmosomales que se podían identificar fácilmente en los cardiomiocitos *wild-type* se encontraban más difusas o “pálidas” en los cardiomiocitos *knock-out* (PKP2-KO-01>PKG-KO-02>WT), indicando tal vez una menor densidad de ciertos componentes celulares como proteínas en esas estructuras. También pudimos identificar menos cantidad de desmosomas en promedio en las uniones de dos cardiomiocitos (PKP2-KO-01<PKG-KO-02<WT). Se observó también la presencia de gran cantidad de matriz extracelular (posiblemente fibras de colágeno) en las fotos de los cardiomiocitos PKP2-KO-01. Estudios de microscopía TEM de biopsias de pacientes con DA muestran que la DA se caracteriza por anomalías ultraestructurales en los discos intercalares, entre los que se incluyen una disminución en el número de desmosomas y un aumento de desmosomas pálidos [101], además de un aumento del colágeno intersticial, tal como observamos en los cardiomiocitos diferenciados de las CMPi editadas genéticamente. Esta concomitancia entre lo observado en nuestro modelo y los estudios realizados con biopsias de corazón de pacientes con DA indica que estamos logrando recapitular características claves de la enfermedad *in vitro*.



Teniendo en cuenta todos los resultados donde comparamos cardiomiocitos PKP2-KO y PKG-KO podemos concluir que la ausencia de PKP2 afecta más evidentemente la estructura general de los cardiomiocitos que la ausencia de PKG, al menos respecto a los análisis realizados en esta tesis.

En el último capítulo de esta tesis, nos propusimos generar una línea celular editada con una mutación puntual previamente reportada en pacientes, pero cuya patogenicidad aún no ha sido claramente establecida. La variante PKP2 c.419C>T (p.S140F) es una mutación con cambio de sentido que provoca el cambio de un único aminoácido y ha sido reportada en múltiples estudios como una variante potencialmente asociada a la DA [46], [88], [89]. Sin embargo, aunque ha sido identificada de manera recurrente en pacientes y no ha sido detectada en más de 500 cromosomas control, aún no se puede establecer de manera definitiva su carácter patogénico. Esta incertidumbre se debe a la falta de ensayos funcionales validados que permitan evaluar con precisión el impacto de variantes de significado incierto en proteínas desmosomales y su posible rol en la progresión de la enfermedad [49]. Teniendo esto en cuenta el objetivo fue evaluar si nuestro modelo celular *in vitro* permite caracterizar experimentalmente el impacto funcional de esta variante (y de otras en el futuro) y determinar su posible contribución a la DA.

Para generar esta nueva línea editada de CMPi incorporamos el análisis de “secuenciación de amplicones” el cual nos permitió evidenciar de una manera muy precisa la diferencia de eficiencias entre los 2 ARNg/ssODNs utilizados. Este hallazgo no es algo novedoso ya que está sumamente estudiado que el diseño de los ARNg es un aspecto decisivo a la hora de ser exitoso en la edición génica, aunque sólo experimentalmente es posible determinar la eficiencia de aquellos ARNg sugeridos por programas diseñados para tal fin [102]. Tras confirmar la incorporación exitosa de esta variante en las CMPi y verificar que su pluripotencia permanecía intacta, procedimos a evaluar la expresión de la proteína PKP2 mediante inmunofluorescencia y *western blot*, sin evidenciar diferencias con el control *wild-type*. Para avanzar con los objetivos propuestos, llevamos a cabo la diferenciación eficiente de la línea celular PKP2-SF a cardiomiocitos y posteriormente a cardiomiocitos maduros.

Como se ha mencionado a lo largo de la tesis, la principal característica de la DA es el reemplazo del miocardio por tejido fibro-adiposo. El uso de cardiomiocitos derivados de CMPi con mutaciones en proteínas desmosomales representa una herramienta poderosa para el estudio *in vitro* de la patogénesis de la DA. Para evaluar si nuestro modelo de estudio refleja este fenotipo patológico característico de la enfermedad, expusimos los cardiomiocitos con las variantes en PKP2 (PKP2-KO-01 y PKP2-SF) a un medio de cultivo pro-adipogénico, previamente utilizado para el modelado de la DA, pero con células de pacientes [103]. Esta estrategia permitiría determinar si los cardiomiocitos derivados de las CMPi editadas presentan una mayor predisposición a la acumulación lipídica en comparación con cardiomiocitos *wild-type*. Previo a este experimento habíamos observado un aumento de expresión de *PPAR $\gamma$*  en cardiomiocitos maduros PKP2-KO-01 sin ningún tipo de tratamiento adipogénico particular. *PPAR $\gamma$*  es un factor de transcripción clave en la adipogénesis y juega un papel central en la diferenciación de pre-adipocitos en adipocitos maduros. En patologías como la DA, *PPAR $\gamma$*  está implicado en la transdiferenciación de cardiomiocitos en células adiposas. Si bien no hemos evaluado la expresión de este gen en cardiomiocitos PKP2-SF, realizamos este experimento con el medio pro-adipogénico para ambos grupos experimentales, considerando que tal vez veríamos un aumento en la acumulación de gotas lipídicas. Mediante la tinción con Oil-Red O pudimos corroborar este aumento significativo en la acumulación de lípidos en el citoplasma de estos cardiomiocitos, tanto PKP2-KO-01 como PKP2-SF, en comparación con cardiomiocitos *wild-type*. Con este resultado pudimos confirmar que tanto la ausencia de PKP2 como la variante p.S140F considerada de “significado incierto” provocan una mayor predisposición de los cardiomiocitos a desarrollar un fenotipo adipogénico.

Otro parámetro de gran interés para determinar el efecto de las variantes de PKP2 sobre la funcionalidad de los cardiomiocitos fue el análisis de contractilidad. Zhang y colaboradores habían observado una disminución en la fuerza de contracción en cardiomiocitos derivados de CMPi editadas en el gen de PKP2 para generar un *knock-out*, en comparación con el *wild-type* [104]. En nuestros resultados, respecto a la frecuencia de contracción, éstos muestran

que no se ve afectada ni por el estado de maduración (día 21 vs. día 38) ni por las variantes en PKP2. Sin embargo, en el análisis de la velocidad de contracción (que también está relacionada con la fuerza con la que el cardiomiocito se contrae) se observó un efecto tanto entre el estado de maduración como entre las variantes en PKP2. Si bien podemos hablar de tendencias, ya que no obtuvimos diferencias estadísticas, tanto los cardiomiocitos *wild-type* como PKP2-SF aumentaron la velocidad de contracción con la maduración comparando día 21 vs. día 38, aunque con mayor incremento en los cardiomiocitos *wild-type*. A pesar de que ambos grupos presentaron valores de mediana de velocidad de contracción similares a día 38, la línea PKP2-SF mostró un mayor porcentaje de cardiomiocitos con baja velocidad de contracción, lo que sugiere una posible alteración en la eficiencia contráctil de esta variante. Por otro lado, los cardiomiocitos PKP2-KO-01 presentaron una velocidad de contracción similar al control *wild-type* en el día 21, pero no mostraron el incremento observado en los otros dos grupos experimentales a día 38. En cambio, se evidenció una clara tendencia a la disminución de la velocidad de contracción. Este resultado es esperable luego de haber determinado por microscopía TEM que el largo de los sarcómeros era significativamente menor en estos cardiomiocitos respecto a los *wild-type*, lo cual se relaciona con mayor rigidez. Como se mencionó anteriormente el acortamiento de los sarcómeros podría deberse a que los cardiomiocitos tienen dificultades para relajarse completamente, manteniendo un estado de contracción parcial y por ello, la fuerza de contracción termina siendo menor. Todos estos resultados en conjunto, sugieren que la ausencia de PKP2 podría comprometer la capacidad funcional de los cardiomiocitos siendo más evidente en etapas avanzadas de maduración.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en la presente tesis consideramos que fue posible modelar *in vitro* algunos aspectos fundamentales de la DA mediante la incorporación de mutaciones patogénicas en CMPi y su posterior diferenciación a cardiomiocitos. Incluso, pudimos identificar manifestaciones patogénicas en una variante clasificada hasta el momento en las bases de datos como de significado incierto. Esto implica que no se ha determinado si esta mutación, por sí sola, es suficiente para desencadenar la DA. Si bien existen herramientas bioinformáticas y bases de datos que permiten predecir el

impacto de ciertas mutaciones, su confirmación experimental sigue siendo fundamental. La implementación de modelos celulares basados en CMPi y edición genética con CRISPR/Cas9 ofrece una plataforma prometedora para el estudio de estas variantes. Sin embargo, es crucial que los criterios de patogenicidad a evaluar sean rigurosamente definidos y validados para garantizar que los hallazgos sean comparables y clínicamente relevantes. Es necesario que estos parámetros sean reproducibles y que permitan caracterizar el fenotipo patológico característico de la DA, como la adhesión celular, la estabilidad del complejo desmosomal, la organización del citoesqueleto y la contractilidad. Estandarizar estos parámetros facilitaría la clasificación de variantes de significado incierto, favoreciendo así la precisión en el diagnóstico y manejo de pacientes con DA y otras cardiomiopatías hereditarias. Si bien en este caso abarcamos sólo una variante específica, en la presente tesis hemos estandarizado cada uno de los pasos experimentales para poder modelar cualquier otra variante.

## 7. Conclusiones

- \* Se optimizó un protocolo de edición génica mediada por CRISPR/Cas9 para variantes específicas y de aislamiento clonal, con el objetivo de generar líneas celulares editadas genéticamente en homocigosis de manera eficiente y reproducible.
- \* Se generaron cuatro líneas de CMPi correctamente editadas genéticamente que incorporaron mutaciones relacionadas con la Displasia Arritmogénica. Las mismas constituyeron una invaluable herramienta para el desarrollo del sistema experimental de la presente tesis y se proponen, a futuro, como una herramienta para el estudio de la DA.
- \* Se comprobó el estadio pluripotente y la capacidad de diferenciarse efectivamente a cardiomiocitos de las cuatro líneas celulares.
- \* La maduración de los cardiomiocitos fue fundamental para potenciar la manifestación del fenotipo patológico característico de la DA en las líneas celulares generadas, facilitando la identificación de efectos específicos atribuibles a las mutaciones introducidas.
- \* Las líneas *knock-out* para las proteínas PKG y PKP2 presentaron una clara alteración de la organización de los desmosomas y, por ende, la estructura de los discos intercalares se vió afectada, desregulando otras proteínas de uniones celulares.
- \* Los cardiomiocitos maduros de las líneas KO presentaron niveles elevados de algunos marcadores de adipogénesis, indicando una posible predisposición temprana hacia la línea adipogénica.
- \* La ausencia de PKP2 induce alteraciones más significativas en los desmosomas de los cardiomiocitos en comparación con las provocadas por la falta de PKG según pudimos corroborar al analizar la ultraestructura de los cardiomiocitos por microscopía TEM.

- \* Logramos identificar y cuantificar la acumulación lipídica en los cardiomiocitos derivados de las líneas CMPi editadas PKP2-KO-01 y PKP2-SF, un hallazgo relevante que refleja una de las características patológicas clave de la DA.
- \* Los cardiomiocitos maduros de la línea PKP2-KO-01 presentan una alteración evidente en la velocidad de contracción probablemente relacionado con una falla en la relajación de la contracción.
- \* Los cardiomiocitos derivados de la línea PKP2-SF mostraron manifestaciones patológicas relacionadas con la DA, por ende, podríamos atribuirle un efecto patológico a la variante de significado incierto PKP2 p.S140F.
- \* Con nuestro modelo de estudio sería posible identificar, si lo hubiera, el efecto de variantes génicas de manera muy temprana en el desarrollo, previo a manifestaciones clínicas, lo que podría ser una gran ventaja para el diagnóstico temprano.
- \* Con los resultados obtenidos podemos concluir que la hipótesis planteada en esta tesis “la introducción de mutaciones específicas en CMPi mediante el sistema de edición genética CRISPR/Cas9 permitirá la generación de modelos celulares representativos de la cardiopatía Displasia Arritmogénica a partir de su diferenciación a cardiomiocitos” fue corroborada.

## 8. Bibliografía

- [1] S. Poliwoda *et al.*, «Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice», *Orthopedic Reviews*, vol. 14, n.º 3, ago. 2022, doi: 10.52965/001c.37498.
- [2] A. De Los Angeles *et al.*, «Hallmarks of pluripotency», *Nature*, vol. 525, n.º 7570, pp. 469-478, sep. 2015, doi: 10.1038/nature15515.
- [3] W. Zakrzewski, M. Dobrzyński, M. Szymonowicz, y Z. Rybak, «Stem cells: past, present, and future», *Stem Cell Res Ther*, vol. 10, n.º 1, p. 68, dic. 2019, doi: 10.1186/s13287-019-1165-5.
- [4] L. A. Boyer *et al.*, «Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells», *Cell*, vol. 122, n.º 6, pp. 947-956, sep. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020.
- [5] J. A. Thomson *et al.*, «Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts», *Science*, vol. 282, n.º 5391, pp. 1145-1147, nov. 1998, doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
- [6] K. Takahashi y S. Yamanaka, «Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors», *Cell*, vol. 126, n.º 4, pp. 663-676, ago. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [7] K. Takahashi *et al.*, «Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors», *Cell*, vol. 131, n.º 5, pp. 861-872, nov. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [8] G. Keller, «Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine», *Genes Dev.*, vol. 19, n.º 10, pp. 1129-1155, may 2005, doi: 10.1101/gad.1303605.
- [9] C. Mummery *et al.*, «Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes: Role of Coculture With Visceral Endoderm-Like Cells», *Circulation*, vol. 107, n.º 21, pp. 2733-2740, jun. 2003, doi: 10.1161/01.CIR.0000068356.38592.68.

- [10] J. Hib, *Embriología Médica*. 2006.
- [11] M. A. Martínez, «DESARROLLO DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR», n.º 2.
- [12] S. F. Gilbert y M. J. F. Barresi, «DEVELOPMENTAL BIOLOGY, 11TH EDITION 2016», *American J of Med Genetics Pt A*, vol. 173, n.º 5, pp. 1430-1430, may 2017, doi: 10.1002/ajmg.a.38166.
- [13] D. Später, E. M. Hansson, L. Zangi, y K. R. Chien, «How to make a cardiomyocyte», *Development*, vol. 141, n.º 23, pp. 4418-4431, dic. 2014, doi: 10.1242/dev.091538.
- [14] W. Wu, J. He, y X. Shao, «Incidence and mortality trend of congenital heart disease at the global, regional, and national level, 1990–2017», *Medicine*, vol. 99, n.º 23, p. e20593, jun. 2020, doi: 10.1097/MD.00000000000020593.
- [15] R. Abu-Issa y M. L. Kirby, «Heart Field: From Mesoderm to Heart Tube», *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, n.º 1, pp. 45-68, nov. 2007, doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123331.
- [16] J. Rossant y P. P. L. Tam, «Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse», *Development*, vol. 136, n.º 5, pp. 701-713, mar. 2009, doi: 10.1242/dev.017178.
- [17] S. D. Vincent y M. E. Buckingham, «How to Make a Heart», en *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 90, Elsevier, 2010, pp. 1-41. doi: 10.1016/S0070-2153(10)90001-X.
- [18] M. Nosedá, T. Peterkin, F. C. Simões, R. Patient, y M. D. Schneider, «Cardiopoietic Factors: Extracellular Signals for Cardiac Lineage Commitment», *Circulation Research*, vol. 108, n.º 1, pp. 129-152, ene. 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223792.
- [19] E. D. Cohen, Y. Tian, y E. E. Morrisey, «Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal», *Development*, vol. 135, n.º 5, pp. 789-798, mar. 2008, doi: 10.1242/dev.016865.
- [20] A. Klaus, Y. Saga, M. Taketo M., E. Tzahor, y W. Birchmeier, «Distinct roles of Wnt/b-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis», *PNAS*, vol. 104, n.º 47, pp. 18531-18536, nov. 2007, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.070311310>.



- [21] J. Schlueter y T. Brand, «Epicardial Progenitor Cells in Cardiac Development and Regeneration», *J. of Cardiovasc. Trans. Res.*, vol. 5, n.º 5, pp. 641-653, oct. 2012, doi: 10.1007/s12265-012-9377-4.
- [22] M. R. Hutson y M. L. Kirby, «Seminars in Cell and Developmental Biology Model Systems for the Study of Heart Development and Disease Cardiac Neural Crest and Conotruncal Malformations», 2008.
- [23] J. W. Calvert y D. J. Lefer, «Overview of Cardiac Muscle Physiology», en *Muscle*, Elsevier, 2012, pp. 57-66. doi: 10.1016/B978-0-12-381510-1.00006-5.
- [24] M. Noorman *et al.*, «Cardiac cell–cell junctions in health and disease: Electrical versus mechanical coupling», *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 47, n.º 1, pp. 23-31, jul. 2009, doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.03.016.
- [25] D. Swope, L. Cheng, E. Gao, J. Li, y G. L. Radice, «Loss of Cadherin-Binding Proteins  $\beta$ -Catenin and Plakoglobin in the Heart Leads to Gap Junction Remodeling and Arrhythmogenesis», *Molecular and Cellular Biology*, vol. 32, n.º 6, pp. 1056-1067, mar. 2012, doi: 10.1128/MCB.06188-11.
- [26] R. M. Harmon y K. J. Green, «Structural and Functional Diversity of Desmosomes», *Cell Communication & Adhesion*, vol. 20, n.º 6, pp. 171-187, dic. 2013, doi: 10.3109/15419061.2013.855204.
- [27] Q. Wang, «Xin proteins and intercalated disc maturation, signaling and diseases», *Front Biosci*, vol. 17, n.º 7, p. 2566, 2012, doi: 10.2741/4072.
- [28] M. S. Nielsen, C. J. M. Van Opbergen, T. A. B. Van Veen, y M. Delmar, «The intercalated disc: a unique organelle for electromechanical synchrony in cardiomyocytes», *Physiological Reviews*, vol. 103, n.º 3, pp. 2271-2319, jul. 2023, doi: 10.1152/physrev.00021.2022.
- [29] E. Willems *et al.*, «Small-Molecule Inhibitors of the Wnt Pathway Potently Promote Cardiomyocytes From Human Embryonic Stem Cell–Derived Mesoderm», *Circulation Research*, vol. 109, n.º 4, pp. 360-364, ago. 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.249540.

- [30] X. Lian *et al.*, «Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 109, n.º 27, jul. 2012, doi: 10.1073/pnas.1200250109.
- [31] S. Funakoshi *et al.*, «Generation of mature compact ventricular cardiomyocytes from human pluripotent stem cells», *Nat Commun*, vol. 12, n.º 1, p. 3155, may 2021, doi: 10.1038/s41467-021-23329-z.
- [32] J. Smuccler, «Chemical maturation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes», nov. 2023.
- [33] P. Garg *et al.*, «Genome Editing of Induced Pluripotent Stem Cells to Decipher Cardiac Channelopathy Variant», *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 72, n.º 1, pp. 62-75, jul. 2018, doi: 10.1016/j.jacc.2018.04.041.
- [34] P. Liang *et al.*, «Drug Screening Using a Library of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Reveals Disease-Specific Patterns of Cardiotoxicity», *Circulation*, vol. 127, n.º 16, pp. 1677-1691, abr. 2013, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001883.
- [35] O. Caspi *et al.*, «Modeling of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy With Human Induced Pluripotent Stem Cells», *Circ Cardiovasc Genet*, vol. 6, n.º 6, pp. 557-568, dic. 2013, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000188.
- [36] C. Kim *et al.*, «Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs», *Nature*, vol. 494, n.º 7435, pp. 105-110, feb. 2013, doi: 10.1038/nature11799.
- [37] D. Ma *et al.*, «Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy», *European Heart Journal*, vol. 34, n.º 15, pp. 1122-1133, abr. 2013, doi: 10.1093/eurheartj/ehs226.
- [38] F. A. Ran, P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott, y F. Zhang, «Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system», *Nat Protoc*, vol. 8, n.º 11, pp. 2281-2308, nov. 2013, doi: 10.1038/nprot.2013.143.
- [39] Q. Ding, S. N. Regan, Y. Xia, L. A. Oostrom, C. A. Cowan, y K. Musunuru, «Enhanced

- Efficiency of Human Pluripotent Stem Cell Genome Editing through Replacing TALENs with CRISPRs», *Cell Stem Cell*, vol. 12, n.º 4, pp. 393-394, abr. 2013, doi: 10.1016/j.stem.2013.03.006.
- [40] J. E. Saffitz, A. Asimaki, y H. Huang, «Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: new insights into mechanisms of disease», *Cardiovascular Pathology*, vol. 19, n.º 3, pp. 166-170, may 2010, doi: 10.1016/j.carpath.2009.10.006.
- [41] G. Thiene, D. Corrado, y C. Basso, «Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia», *Orphanet J Rare Dis*, vol. 2, n.º 1, p. 45, dic. 2007, doi: 10.1186/1750-1172-2-45.
- [42] K. M. Austin *et al.*, «Molecular mechanisms of arrhythmogenic cardiomyopathy», *Nat Rev Cardiol*, vol. 16, n.º 9, pp. 519-537, sep. 2019, doi: 10.1038/s41569-019-0200-7.
- [43] D. Corrado, C. Basso, y D. P. Judge, «Arrhythmogenic Cardiomyopathy», sep. 2017.
- [44] M. Delmar y W. J. McKenna, «The Cardiac Desmosome and Arrhythmogenic Cardiomyopathies», *Circulation Research*, vol. 107, n.º 6, pp. 700-714, sep. 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223412.
- [45] D. Corrado *et al.*, «Treatment of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: An International Task Force Consensus Statement», *Circulation*, vol. 132, n.º 5, pp. 441-453, ago. 2015, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017944.
- [46] B. Gerull *et al.*, «Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy», *Nat Genet*, vol. 36, n.º 11, pp. 1162-1164, nov. 2004, doi: 10.1038/ng1461.
- [47] Z. Yang *et al.*, «Desmosomal Dysfunction due to Mutations in Desmoplakin Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy», *Circulation Research*, vol. 99, n.º 6, pp. 646-655, sep. 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000241482.19382.c6.
- [48] N. Protonotarios y A. Tsatsopoulou, «Naxos disease and Carvajal syndrome», *Cardiovascular Pathology*, vol. 13, n.º 4, pp. 185-194, jul. 2004, doi: 10.1016/j.carpath.2004.03.609.

- [49] X. Zhou *et al.*, «Comprehensive analysis of desmosomal gene mutations in Han Chinese patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy», *European Journal of Medical Genetics*, vol. 58, n.º 4, pp. 258-265, abr. 2015, doi: 10.1016/j.ejmg.2015.02.009.
- [50] O. J. Harrison *et al.*, «Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 113, n.º 26, pp. 7160-7165, jun. 2016, doi: 10.1073/pnas.1606272113.
- [51] E. Delva, D. K. Tucker, y A. P. Kowalczyk, «The Desmosome», *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 1, n.º 2, pp. a002543-a002543, ago. 2009, doi: 10.1101/cshperspect.a002543.
- [52] P. Y. Sato *et al.*, «Interactions Between Ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the Cardiac Intercalated Disc», *Circulation Research*, vol. 109, n.º 2, pp. 193-201, jul. 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247023.
- [53] J. E. Lewis, J. K. Wahl, K. M. Sass, P. J. Jensen, K. R. Johnson, y M. J. Wheelock, «Cross-Talk between Adherens Junctions and Desmosomes Depends on Plakoglobin», *The Journal of Cell Biology*, vol. 136, n.º 4, pp. 919-934, feb. 1997, doi: 10.1083/jcb.136.4.919.
- [54] P. Ruiz *et al.*, «Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart.», *The Journal of cell biology*, vol. 135, n.º 1, pp. 215-225, oct. 1996, doi: 10.1083/jcb.135.1.215.
- [55] A. Asimaki, P. Syrris, T. Wichter, P. Matthias, J. E. Saffitz, y W. J. McKenna, «A Novel Dominant Mutation in Plakoglobin Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy», *The American Journal of Human Genetics*, vol. 81, n.º 5, pp. 964-973, nov. 2007, doi: 10.1086/521633.
- [56] G. McKoy *et al.*, «Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease)», *The Lancet*, vol. 355, n.º 9221, pp. 2119-2124, jun. 2000, doi: 10.1016/S0140-6736(00)02379-5.
- [57] S. N. Chen, P. Gurha, R. Lombardi, A. Ruggiero, J. T. Willerson, y A. J. Marian, «The

- Hippo Pathway Is Activated and Is a Causal Mechanism for Adipogenesis in Arrhythmogenic Cardiomyopathy», *Circ Res*, vol. 114, n.º 3, pp. 454-468, ene. 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302810.
- [58] F. Djouadi, Y. Lecarpentier, J.-L. Hebert, P. Charron, J. Bastin, y C. Coirault, «A potential link between peroxisome proliferator-activated receptor signalling and the pathogenesis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy», *Cardiovascular Research*, vol. 84, n.º 1, pp. 83-90, oct. 2009, doi: 10.1093/cvr/cvp183.
- [59] E. Y. Rim, H. Clevers, y R. Nusse, «The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators», *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 91, n.º 1, pp. 571-598, jun. 2022, doi: 10.1146/annurev-biochem-040320-103615.
- [60] Z. Steinhart y S. Angers, «Wnt signaling in development and tissue homeostasis», *Development*, vol. 145, n.º 11, p. dev146589, jun. 2018, doi: 10.1242/dev.146589.
- [61] E. Garcia-Gras, «Suppression of canonical Wnt/ -catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy», *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, n.º 7, pp. 2012-2021, jul. 2006, doi: 10.1172/JCI27751.
- [62] R. Lombardi, M. Da Graca Cabreira-Hansen, A. Bell, R. R. Fromm, J. T. Willerson, y A. J. Marian, «Nuclear Plakoglobin Is Essential for Differentiation of Cardiac Progenitor Cells to Adipocytes in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy», *Circ Res*, vol. 109, n.º 12, pp. 1342-1353, dic. 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.255075.
- [63] E. I. Parrotta *et al.*, «Deciphering the Role of Wnt and Rho Signaling Pathway in iPSC-Derived ARVC Cardiomyocytes by In Silico Mathematical Modeling», *IJMS*, vol. 22, n.º 4, p. 2004, feb. 2021, doi: 10.3390/ijms22042004.
- [64] A. G. Cristancho y M. A. Lazar, «Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation», *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 12, n.º 11, pp. 722-734, nov. 2011, doi: 10.1038/nrm3198.
- [65] S. Ma, Z. Meng, R. Chen, y K.-L. Guan, «The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology», *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 88, n.º 1, pp. 577-604, jun. 2019, doi:

10.1146/annurev-biochem-013118-111829.

- [66] S. Mazurek y G. H. Kim, «Genetic and epigenetic regulation of arrhythmogenic cardiomyopathy», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1863, n.º 8, pp. 2064-2069, ago. 2017, doi: 10.1016/j.bbadis.2017.04.020.
- [67] E. Sommariva, I. Stadiotti, G. L. Perrucci, C. Tondo, y G. Pompilio, «Cell models of arrhythmogenic cardiomyopathy: advances and opportunities», *Disease Models & Mechanisms*, vol. 10, n.º 7, pp. 823-835, jul. 2017, doi: 10.1242/dmm.029363.
- [68] F. M. Gregoire, C. M. Smas, y H. S. Sul, «Understanding Adipocyte Differentiation», *Physiological Reviews*, vol. 78, n.º 3, pp. 783-809, ene. 1998, doi: 10.1152/physrev.1998.78.3.783.
- [69] G. d'Amati, C. R. T. Di Gioia, C. Giordano, y P. Gallo, «Myocyte Transdifferentiation», *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, vol. 124, n.º 2, pp. 287-290, feb. 2000, doi: 10.5858/2000-124-0287-MT.
- [70] R. Lombardi *et al.*, «Genetic Fate Mapping Identifies Second Heart Field Progenitor Cells As a Source of Adipocytes in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy», *Circulation Research*, vol. 104, n.º 9, pp. 1076-1084, may 2009, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.196899.
- [71] S. A. Matthes, S. Taffet, y M. Delmar, «Plakophilin-2 and the migration, differentiation and transformation of cells derived from the epicardium of neonatal rat hearts», *Cell Communication & Adhesion*, vol. 18, n.º 4, pp. 73-84, ago. 2011, doi: 10.3109/15419061.2011.621561.
- [72] E. Sommariva *et al.*, «Cardiac mesenchymal stromal cells are a source of adipocytes in arrhythmogenic cardiomyopathy», *Eur Heart J*, vol. 37, n.º 23, pp. 1835-1846, jun. 2016, doi: 10.1093/eurheartj/ehv579.
- [73] R. Lombardi *et al.*, «Cardiac Fibro-Adipocyte Progenitors Express Desmosome Proteins and Preferentially Differentiate to Adipocytes Upon Deletion of the Desmoplakin Gene», *Circulation Research*, vol. 119, n.º 1, pp. 41-54, jun. 2016, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.308136.

- [74] E. D. Rosen *et al.*, «C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\alpha$ : a unified pathway», nov. 2001.
- [75] Z. Wu, P. Puigserver, y B. Spiegelman, «Transcriptional activation of adipogenesis», *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 11, n.º 6, pp. 689-694, dic. 1999, doi: 10.1016/S0955-0674(99)00037-X.
- [76] G. Amin *et al.*, «Generation of two edited iPSCs lines by CRISPR/Cas9 with point mutations in PKP2 gene for arrhythmogenic cardiomyopathy in vitro modeling», *Stem Cell Research*, vol. 71, p. 103157, sep. 2023, doi: 10.1016/j.scr.2023.103157.
- [77] M. Questa *et al.*, «Generation of iPSC line iPSC-FH2.1 in hypoxic conditions from human foreskin fibroblasts», *Stem Cell Research*, vol. 16, n.º 2, pp. 300-303, mar. 2016, doi: 10.1016/j.scr.2015.12.026.
- [78] S. Marcotti *et al.*, «A Workflow for Rapid Unbiased Quantification of Fibrillar Feature Alignment in Biological Images», *Front. Comput. Sci.*, vol. 3, p. 745831, oct. 2021, doi: 10.3389/fcomp.2021.745831.
- [79] S. Scalzo *et al.*, «Dense optical flow software to quantify cellular contractility», *Cell Reports Methods*, vol. 1, n.º 4, p. 100044, ago. 2021, doi: 10.1016/j.crmeth.2021.100044.
- [80] D. Evseenko *et al.*, «Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 107, n.º 31, pp. 13742-13747, ago. 2010, doi: 10.1073/pnas.1002077107.
- [81] S. Tohyama *et al.*, «Distinct Metabolic Flow Enables Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes», *Cell Stem Cell*, vol. 12, n.º 1, pp. 127-137, ene. 2013, doi: 10.1016/j.stem.2012.09.013.
- [82] P. Seale *et al.*, «PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch», *Nature*, vol. 454, n.º 7207, pp. 961-967, ago. 2008, doi: 10.1038/nature07182.
- [83] J. A. Timmons *et al.*, «Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 104, n.º 11, pp. 4401-4406, mar. 2007, doi: 10.1073/pnas.0610615104.
- [84] R. M. Cabral *et al.*, «Homozygous Mutations in the 5' Region of the JUP Gene Result in

- Cutaneous Disease but Normal Heart Development in Children», *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 130, n.º 6, pp. 1543-1550, jun. 2010, doi: 10.1038/jid.2010.7.
- [85] M. del C. Boente, A. Nanda, P. A. Baselaga, D. P. Kelsell, J. A. McGrath, y A. P. South, «Cardiomyopathy diagnosed in the eldest child harbouring p.S24X mutation in JUP», *British Journal of Dermatology*, vol. 175, n.º 3, pp. 644-646, sep. 2016, doi: 10.1111/bjd.14617.
- [86] A. D. Den Haan *et al.*, «Comprehensive Desmosome Mutation Analysis in North Americans With Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy», *Circ Cardiovasc Genet*, vol. 2, n.º 5, pp. 428-435, oct. 2009, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.109.858217.
- [87] B. Y. Tan *et al.*, «Shared Desmosome Gene Findings in Early and Late Onset Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy», *J. of Cardiovasc. Trans. Res.*, vol. 3, n.º 6, pp. 663-673, dic. 2010, doi: 10.1007/s12265-010-9224-4.
- [88] P. Syrris *et al.*, «Clinical Expression of Plakophilin-2 Mutations in Familial Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy», *Circulation*, vol. 113, n.º 3, pp. 356-364, ene. 2006, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.561654.
- [89] D. Dalal *et al.*, «Clinical Features of Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Associated With Mutations in Plakophilin-2», *Circulation*, vol. 113, n.º 13, pp. 1641-1649, abr. 2006, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.568642.
- [90] N. Sun *et al.*, «Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Familial Dilated Cardiomyopathy», *Sci. Transl. Med.*, vol. 4, n.º 130, abr. 2012, doi: 10.1126/scitranslmed.3003552.
- [91] M. F. Hoes, N. Bomer, y P. Meer, «Concise Review: The Current State of Human In Vitro Cardiac Disease Modeling: A Focus on Gene Editing and Tissue Engineering», *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 8, n.º 1, pp. 66-74, ene. 2019, doi: 10.1002/sctm.18-0052.
- [92] G. Chen, Z. Hou, D. R. Gulbranson, y J. A. Thomson, «Actin-Myosin Contractility Is Responsible for the Reduced Viability of Dissociated Human Embryonic Stem Cells»,



- Cell Stem Cell*, vol. 7, n.º 2, pp. 240-248, ago. 2010, doi: 10.1016/j.stem.2010.06.017.
- [93] M. Ohgushi *et al.*, «Molecular Pathway and Cell State Responsible for Dissociation-Induced Apoptosis in Human Pluripotent Stem Cells», *Cell Stem Cell*, vol. 7, n.º 2, pp. 225-239, ago. 2010, doi: 10.1016/j.stem.2010.06.018.
- [94] K. Watanabe *et al.*, «A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells», *Nature Biotechnology*, vol. 25, n.º 6, pp. 681-686, jun. 2007, doi: 10.1038/nbt1310.
- [95] L. C. Laurent *et al.*, «Dynamic Changes in the Copy Number of Pluripotency and Cell Proliferation Genes in Human ESCs and iPSCs during Reprogramming and Time in Culture», *Cell Stem Cell*, vol. 8, n.º 1, pp. 106-118, ene. 2011, doi: 10.1016/j.stem.2010.12.003.
- [96] Y. Mayshar *et al.*, «Identification and Classification of Chromosomal Aberrations in Human Induced Pluripotent Stem Cells», *Cell Stem Cell*, vol. 7, n.º 4, pp. 521-531, oct. 2010, doi: 10.1016/j.stem.2010.07.017.
- [97] S. H. Vermij, H. Abriel, y T. A. B. Van Veen, «Refining the molecular organization of the cardiac intercalated disc», *Cardiovasc Res*, p. cvw259, ene. 2017, doi: 10.1093/cvr/cvw259.
- [98] E. Kyriakopoulou *et al.*, «Therapeutic efficacy of AAV-mediated restoration of PKP2 in arrhythmogenic cardiomyopathy», *Nat Cardiovasc Res*, vol. 2, n.º 12, pp. 1262-1276, dic. 2023, doi: 10.1038/s44161-023-00378-9.
- [99] B. Zhang, Y. Luo, X. Zhou, L. Gao, X. Yin, y H. Yang, «GelMA micropattern enhances cardiomyocyte organization, maturation, and contraction via contact guidance», *APL Bioengineering*, vol. 8, n.º 2, p. 026108, jun. 2024, doi: 10.1063/5.0182585.
- [100] I. Gokhan, A. J. Mora Pagan, y S. G. Campbell, «BPS2025 - R451G desmoplakin induces contractile deficits in engineered heart tissue», *Biophysical Journal*, vol. 124, n.º 3, p. 616a, feb. 2025, doi: 10.1016/j.bpj.2024.11.3180.
- [101] C. Basso, «Ultrastructural evidence of intercalated disc remodelling in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an electron microscopy investigation on

- endomyocardial biopsies», *European Heart Journal*, vol. 27, n.º 15, pp. 1847-1854, ago. 2006, doi: 10.1093/eurheartj/ehl095.
- [102]G. Liang, H. Zhang, D. Lou, y D. Yu, «Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing», *Sci Rep*, vol. 6, n.º 1, p. 21451, feb. 2016, doi: 10.1038/srep21451.
- [103]T. Dorn *et al.*, «Interplay of cell–cell contacts and RhoA/ MRTF -A signaling regulates cardiomyocyte identity», *The EMBO Journal*, vol. 37, n.º 12, p. e98133, jun. 2018, doi: 10.15252/embj.201798133.
- [104]K. Zhang *et al.*, «Plakophilin-2 truncating variants impair cardiac contractility by disrupting sarcomere stability and organization», *Sci. Adv.*, vol. 7, n.º 42, p. eabh3995, oct. 2021, doi: 10.1126/sciadv.abh3995.