



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Salud Global

Hacia el corazón-en-Chip como modelo de enfermedad cardiaca humana

Towards the heart-on-Chip as a model of human heart disease

Autor/es

Carolina Gómez Moreno

Director/es

Jesús Ciriza Astraín
Laura Ordovás Vidal
Laura Paz Artigas

Facultad de Veterinaria

2023-2024

AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN

A mi madre, padre y hermana, por ser mis pilares fundamentales y apoyarme incondicionalmente.

A mis directores, los doctores Laura Ordovás, Jesús Ciriza y Laura Paz, por darme la oportunidad de participar en este proyecto y guiarme en cada paso.

En especial, a mis compañeros de laboratorio del grupo BSICoS, que me han acogido con los brazos abiertos y me han enseñado el amor por la investigación y la ciencia, brindándome siempre su apoyo.

Quiero agradecer al Servicio General de Apoyo a la Investigación (Universidad de Zaragoza) y a los servicios científico-técnicos del CIBA (IISA-IACS-Universidad de Zaragoza) por facilitarme el acceso a sus instalaciones y recursos, lo cual fue esencial para la realización de este trabajo. En particular a los servicios de Secuenciación y Genómica Funcional, Cultivo Celular, Proteómica, Microscopía óptica e Imagen y Citometría, por su apoyo técnico.

También deseo expresar mi agradecimiento a la ayuda del Programa de Becas y Ayudas para la realización de Trabajo de Fin de Máster del Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A) en colaboración con las Cátedras de Transformación Industrial y URBASER.

Además, cabe mencionar que este trabajo se ha realizado con financiación del proyecto PID2022-139859OB-I00 financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por FEDER/UE.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABREVIACIONES.....	3
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES, CÁNCER Y CARDIOTOXICIDAD.....	4
3.2. DOXORRUBICINA COMO AGENTE ANTINEOPLÁSICO	4
3.3. ESTRATEGIAS CARDIOPROTECTORAS PARA PREVENIR LA CARDIOTOXICIDAD INDUCIDA POR LA DOXORRUBICINA.	7
3.4. TERAPIA GÉNICA: EL FUTURO DE LA MEDICINA.....	8
3.5. LA NECESIDAD DE DESARROLLAR MODELOS CARDIACOS	10
3.6. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS HUMANAS	14
3.7. MODELOS DE INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	15
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
4.1. HIPÓTESIS	18
4.2. OBJETIVOS	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1. DESARROLLAR UNA TERAPIA CARDIOSELECTIVA RNAi ANTI-TOP2B.....	19
5.2. CARACTERIZACIÓN DE LA TERAPIA CARDIOSELECTIVA RNAi ANTI-TOP2B.	22
5.3. OBTENCIÓN DE hiPSC-CM Y CULTIVO DE hiPSC-CM Y hCF	25
5.4. CARACTERIZACIÓN POR CITOMETRÍA E INMUNOFLUORESCENCIA	26
5.5. ENSAYO DE ACTIVIDAD METABÓLICA.....	28
5.6. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR	28
5.7. DESARROLLO DEL MODELO DE CORAZÓN-EN-CHIP	29
5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1. DISEÑO Y CLONAJE DE LOS shRNAs EN V69	31
6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS shRNA-TOP2B	32
6.3. CARACTERIZACIÓN DE hiPSC-CM	36
6.4. CARACTERIZACIÓN DE hCF	37
6.5. ESTUDIO DE MEDIOS PARA EL CO-CULTIVO	39
6.6. DESARROLLO DEL CORAZÓN-EN-CHIP	42
7. CONCLUSIONES	44
8. REFERENCIAS.....	45
ANEXOS	i

1. RESUMEN

La **cardiotoxicidad inducida por quimioterapéuticos**, como la **doxorrubicina (DOXO)**, tiene consecuencias letales para las cuales no hay tratamiento preventivo, lo que limita su uso terapéutico. Además, actualmente no existe un buen modelo cardíaco para el estudio de las patologías y de la cardiotoxicidad de los fármacos. En este trabajo, se dan los primeros pasos hacia el desarrollo de una terapia con potencial protector frente dicha cardiotoxicidad mediante una **estrategia de silenciamiento génico**, así como un **modelo corazón-en-chip** para evaluar en el futuro la terapia generada.

Como la cardiotoxicidad inducida por DOXO se basa en su acción sobre la **topoisomerasa II β (TOP2B)**, se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron pequeños RNAs de horquilla corta (shRNA) dirigidas contra la *TOP2B*. El candidato **shRNA-TOP2B 3** fue el único que mostró indicios de inhibición de *TOP2B* a nivel de mRNA, con mayor evidencia a nivel de proteína. Paralelamente, se diferenciaron cardiomiocitos a partir de células madre pluripotentes inducidas (**hiPSC-CM**), así como se cultivaron fibroblastos cardíacos humanos (**hCF**), dos tipos celulares esenciales del tejido cardíaco. Mediante su cultivo en distintos medios, se determinó que el medio basal de hCF y la mezcla de medios con Innoprot son los más adecuados para su co-cultivo en el modelo de corazón-en-chip. Finalmente, se consiguió crear un **modelo corazón-en-chip** con hiPSC-CM y hCF en la cámara central, destacando la densidad de siembra y el tiempo de cultivo como factores críticos para la estabilidad y viabilidad celular.

En el futuro, se pretende tratar el modelo corazón-en-chip con shRNA-TOP2B 3 para determinar su efecto cardioprotector previo al tratamiento con DOXO. Aunque los resultados obtenidos son preliminares, muestran el inicio de un campo prometedor hacia la medicina personalizada y el desarrollo de terapias seguras oncológicas y cardioprotectoras.

ABSTRACT

Chemotherapy-induced cardiotoxicity, induced by agents as **doxorubicin** (DOXO), has fatal consequences for which there is no preventive treatment, limiting the use of potentially effective therapies. In addition, there are currently no good cardiac models to study the pathologies and cardiotoxicity of drugs. In this work, we take the first steps towards the development of a therapy with protective potential against such cardiotoxicity using a **gene silencing strategy**, as well as a **heart-on-chip model** to evaluate the generated therapy in the future.

Since DOXO-induced cardiotoxicity is based on its action on **topoisomerase II β** (TOP2B), short hairpin RNAs (shRNA) targeting TOP2B were designed, synthesized, and characterized. The candidate **shRNA-TOP2B 3** was the only one that showed mild inhibition of TOP2B at the mRNA level, with further evidence at the protein level. In parallel, cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells (**hiPSC-CM**) were differentiated and human cardiac fibroblasts (**hCF**) were obtained, two major cell types of cardiac tissue. By culturing them in different media, hCF basal medium and mixed media with Innoprot were determined to be the most suitable media for their co-culture in the heart-on-chip model. Finally, a **heart-on-chip model** with hiPSC-CM and hCF in the central chamber was established, highlighting seeding density and culture time as critical factors for cell stability and viability.

In the future, we intend to treat these heart-on-chip models with shRNA-TOP2B 3 to determine its cardioprotective effect prior to DOXO treatment. Although the results obtained are preliminary, they show the beginning of a promising field towards personalized medicine and the development of safe oncological and cardioprotective therapies.

2. ABREVIACIONES

CIQ	Cardiotoxicidad inducida por quimioterapéuticos
DOXO	Doxorrubicina
DBS	Roturas de doble hebra
TOP2	Topoisomerasa II
TOP2A	Topoisomerasa II isoforma α
TOP2B	Topoisomerasa II isoforma β
PGC-1α	Coactivador del receptor γ 1- α activado por el proliferador de peroxisomas
PGC-1β	Coactivador del receptor γ 1- β activado por el proliferador de peroxisomas
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos
RNAi	RNA de interferencia
miRNAs	microRNAs
shRNA	Pequeña horquilla de RNA
siRNAs	Pequeños RNA de interferencia
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
CM	Cardiomiocitos
hCF	Fibroblastos cardiacos humanos
EC	Células endoteliales
ECM	Matriz extracelular
hiPSC	Células madre pluripotentes inducidas humanas
hiPSC-CM	Cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas humanas
hiPSC-EC	Células endoteliales derivadas de células pluripotentes inducidas humanas
hiPSC-CF	Fibroblastos cardiacos derivados de células madre pluripotentes inducidas humanas
CMV	Citomegalovirus
tetO	Secuencias operadoras del operón de la tetraciclina
HSV-TK	Timidina quinasa del herpes virus
PBS	Tampón de fosfato salino
HEK293	Células embrionarias de riñón humano 293
SAB	Seroalbúmina bovina
PFA	Para-formaldehido
TNNT2	Troponina 2 cardiaca
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
α-SMA	α -actina de músculo liso

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES, CÁNCER Y CARDIOTOXICIDAD

Las **enfermedades cardiovasculares** son la principal causa de muerte en el mundo, ocasionando aproximadamente 17.9 millones de defunciones al año, cifra que asciende a 20.5 millones al considerar los **infartos de miocardio o isquemia cardíaca** ¹. Su importancia en la **Salud Pública** se ve reflejada en políticas internacionales, como el objetivo de desarrollo sostenible 3.4, cuya meta establece reducir un 33% las muertes prematuras por enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades no transmisibles. Además del envejecimiento, los factores de riesgo principales son conductuales, como dieta no saludable, sedentarismo o consumo de droga ².

De la misma manera, el **cáncer** es una de las principales causas de muerte, contando con casi 10 millones de defunciones mundiales en 2020. A nivel nacional, en España se registraron 115.590 defunciones causadas directamente por procesos oncológicos en 2022. Los cánceres más comunes son el de mama, pulmón, colorrectal, de próstata, de piel y gástrico, los cuales son también los más agresivos junto al hepático^{3,4}. Los agentes antineoplásicos más comúnmente utilizados son las **antraciclinas (doxorrubicina y epirubicina)**, antimetabolitos, inhibidores de la tirosinquinasa e inhibidores del receptor de factor de crecimiento epidérmico humano ². Estos tratamientos, además de otros más novedosos como la inmunoterapia, tienen un elevado potencial **cardiotóxico**, viéndose dificultado el diagnóstico precoz de dicha cardiotoxicidad a causa de la ausencia de manifestaciones clínicas previas a los episodios de **insuficiencia o isquemia cardíaca** ⁵.

Las enfermedades cardiovasculares y el cáncer lideran las causas de defunción, especialmente en los países desarrollados, y los agentes antineoplásicos más utilizados y efectivos, como la doxorrubicina, dan lugar a **cardiotoxicidad inducida por quimioterapéuticos (CIQ)**. Estos datos muestran que el estudio de las patologías cardíacas en pacientes oncológicos es de primordial importancia en nuestra sociedad, siendo evidente la necesidad de desarrollar **nuevas terapias** para tratar las **enfermedades cardiovasculares** y prevenir la **CIQ**.

3.2. DOXORRUBICINA COMO AGENTE ANTINEOPLÁSICO

La **doxorrubicina (DOXO)** es uno de los agentes quimioterapéuticos de amplio espectro más comúnmente utilizados, ya sea administrado individualmente o en combinación con otras sustancias antineoplásicas, radiación o cirugía. Es un antibiótico con propiedades antineoplásicas con gran efectividad para el tratamiento de numerosos cánceres sólidos y hematológicos adultos y pediátricos (cáncer de mama, enfermedad de Hodgkin, leucemia linfoblástica...) ^{6,7}.

Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que el tratamiento con DOXO da lugar a una **cardiotoxicidad irreversible, dosis dependiente y potencialmente letal**, que se manifiesta en supervivientes de cáncer años después de la exposición a dicha sustancia ^{6,8-10}. A modo representativo, un estudio de la disfunción cardíaca en pacientes supervivientes de leucemia linfoblástica concluyó que el tratamiento con DOXO generaba anomalías cardíacas de manera consistente, así como masa ventricular alterada y déficit contráctil. Estos signos aparecen en los pacientes tratados con las dosis más bajas, aunque la gravedad es dosis dependiente debido al efecto acumulativo del agente ⁶

3.2.1. Mecanismos de acción de la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina

El mecanismo de cardiotoxicidad de la DOXO no está claramente definido. Un mecanismo responsable podría ser el ambiente de **estrés oxidativo** generado por el procesamiento intracelular de la DOXO. Además, la DOXO induce mutaciones en el DNA mitocondrial, disminuye su contenido génico y altera la **función mitocondrial** al acumularse en estos orgánulos (implicados en la gestión de las especies reactivas de oxígeno) ^{8,11,12}. Las conclusiones de los estudios más recientes ponen en evidencia el papel de la **topoisomerasa II** (TOP2) en la cardiotoxicidad derivada por la DOXO (**Figura 1**).

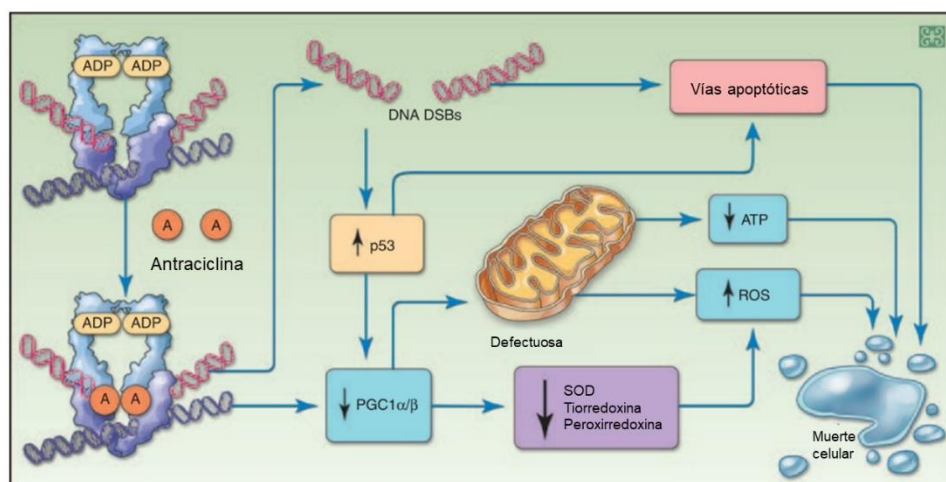


Figura 1. Esquema de los mecanismos moleculares conocidos de la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina, donde se resalta la generación de roturas de doble hebra (DSB), un aumento de p53 y una disminución de PGC 1 α/β . Figura adaptada ¹³.

La TOP2B está encargada del mantenimiento de la homeostasis del DNA, regulando su topología mediante la generación de roturas de doble hebra (DSB) transitorias. La DOXO forma el complejo ternario covalente **TOP2-DOXO-DNA**, procesado por el proteasoma, que degrada la TOP2. Las DSB del DNA remanente, si no son reparadas por otros mecanismos, conducen a la muerte celular por **apoptosis** ¹⁴. Además, la DOXO induce un **cambio transcriptómico** dependiente de la isoforma β de la topoisomerasa II (**TOP2B**) donde se inhibe la expresión del

coactivador del receptor γ 1- α activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 α) y del coactivador del receptor γ 1- β activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 β), provocando **disfunción y disminución de la biogénesis mitocondrial** ⁸. También se ha demostrado un **incremento** significativo en la **fosforilación de p53** tras el tratamiento con DOXO, el cual parece ser dependiente de la TOP2B como se explica a continuación ⁸.

Vejpongsa y colaboradores determinaron tres razones por las cuales el mecanismo de acción de la DOXO sobre la TOP2B es la causa principal de la cardiotoxicidad ^{13,14}. En primer lugar, el efecto tóxico no se ve mitigado por mediadores de las especies reactivas de oxígeno como la vitamina C y la N-acetilcisteína, cuestionando la implicación de estos. Además, mediante el tratamiento con inhibidores del proteasoma no se observa daño genómico, por lo que este mecanismo es esencial para la cardiotoxicidad. En tercer lugar, la delección de *Top2b* en fibroblastos murinos embrionarios hace que el daño genómico inducido por DOXO sea significativamente menor, demostrando de manera concluyente el papel protagonista de la TOP2B en el mecanismo de cardiotoxicidad de la DOXO.

3.2.2. La topoisomerasa 2 β como diana terapéutica

La TOP2 tiene dos isoformas: **topoisomerasa II α** (TOP2A) y **topoisomerasa II β** (TOP2B). Estos son parálogos, ya que el gen *TOP2B*, situado en el cromosoma 3, procede de una duplicación de *TOP2A*, situado en el cromosoma 17 ¹⁵. Debido a su origen, las proteínas tienen una **identidad de secuencia muy elevada**. Su estructura consta de un dominio ATPasa en el N-terminal, un dominio central de rotura y unión con un 78% de identidad de secuencia proteica y un dominio C-terminal más divergente ¹⁶. La TOP2 es esencial para la mitosis, entre otros procesos del DNA, donde resuelve la tensión en las hebras del DNA generada en la replicación.

Estudios de la expresión de la Top2 en tejidos murinos han concluido que las dos isoformas se expresan y regulan de manera diferencial. La **Top2a** se expresa únicamente en los **tejidos con alta actividad proliferativa**, como el timo, la médula ósea y el bazo, aunque también se expresa en situaciones patológicas como tumores ¹⁷. Esta participa en diferentes eventos principales del ciclo celular, como la replicación genómica, la condensación y descondensación cromosómica y la segregación de cromátidas hermanas ¹⁸. En cambio, la **Top2b** tiene niveles de expresión altos en una gran variedad de tejidos, incluidos los no proliferativos, como el útero, los ovarios, los nódulos linfáticos, las glándulas adrenales, los ojos, la vejiga y el **corazón** ¹⁷. Aunque no se conoce su función exacta, puede estar implicada en el metabolismo del DNA, como la transcripción. Por ejemplo, se ha descrito que la delección de *Top2b* da lugar a defectos en la

formación de uniones neuromusculares provocando impedimentos respiratorios y la muerte prematura de los modelos murinos ¹⁹.

Los denominados **venenos de la TOP2**, como la DOXO, actúan de manera **inespecífica** sobre la TOP2, impidiendo la resolución de los complejos TOP2-DNA. De esta manera, la acción de la DOXO sobre la **TOP2A** (expresada únicamente en células con alta capacidad proliferativa) causa la **muerte de las células tumorales**. Sin embargo, además del ambiente de estrés oxidativo que genera la DOXO ¹¹, su actuación sobre la **TOP2B** (única isoforma expresada en el corazón) produce un aumento de la muerte celular ⁸, dando lugar finalmente a la **cardiotoxicidad**.

El estudio de Zhang y colaboradores situó a la **TOP2B como diana terapéutica para la prevención de la cardiotoxicidad inducida por DOXO** ⁸. Describieron un modelo murino en el que la delección completa, inducible y específica de *Top2b* en los cardiomiocitos tenía efecto protector, ya que no se observaban daños en la doble hebra de DNA tras el tratamiento con DOXO. En los ratones *Top2b*^{+/+}, tras el tratamiento con DOXO, se observó un incremento de 200 veces la expresión del gen *Trp53inp1*, regulado por p53, por lo que la activación de p53 podría depender de Top2b. De igual manera, se observaron aumentos significativos de los transcritos *Apaf1*, *Bax* y *Fas*, muy importantes en la vía apoptótica. En cambio, en los individuos *Top2b*^{-/-} los niveles de especies reactivas de oxígeno disminuyeron un 70% respecto los individuos sin la delección. Además, en los ratones *Top2b*^{+/+} la DOXO disminuyó la transcripción de genes involucrados en la biogénesis y función mitocondrial y alteró la transcripción de genes responsables de la fosforilación oxidativa.

3.3. ESTRATEGIAS CARDIOPROTECTORAS PARA PREVENIR LA CARDIOTOXICIDAD INDUCIDA POR LA DOXORRUBICINA.

El único tratamiento cardioprotector para la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) es la **dexrazoxana**. Su administración es profiláctica y se ha utilizado principalmente en niños con leucemia linfoblástica debido a las complicaciones cardíacas demostradas en la edad adulta de los supervivientes ²⁰. Estudios recientes apuntan a que la **dexrazoxana es un inhibidor de la actividad catalítica de la TOP2**, al estabilizar su conformación cerrada en su forma libre (impidiendo su unión al DNA) y en el complejo covalente terciario TOP2-DOXO-DNA (fomentando la degradación proteosómica de la TOP2B e induciendo negativamente la expresión de TOP2B)¹⁴.

Entre las estrategias cardioprotectoras emergentes destaca el fomento de la biogénesis mitocondrial en los cardiomiocitos, es decir, aumentar la masa y función mitocondrial, mediante el incremento de la expresión de PGC-1 α y PGC-1 β . Esto se debe a que ambos coactivan factores

de transcripción que inducen genes nucleares codificantes de proteínas mitocondriales involucradas en la oxidación de ácidos grasos, el ciclo del ácido tricarboxílico y la cadena respiratoria mitocondrial. Además, PGC-1 α incrementa directamente la expresión de genes mitocondriales ²¹.

Respecto a la implicación de la TOP2 en la cardiotoxicidad inducida por DOXO, se proponen cuatro métodos para minimizarla:

1) La creación de **moléculas específicas para la TOP2A**. Por ejemplo, el pyridostatin es un ligando que estabiliza el complejo de 4 hebras de DNA y la estructura secundaria del bucle R de DNA al interaccionar específicamente con la TOP2A, induciendo DSB en las regiones del genoma ricas en guanina ²².

2) **Inhibidores de la actividad de TOP2B**. Los inhibidores catalíticos no han tenido éxito farmacológico, aunque algunos compuestos son capaces de inhibir su actividad sin fomentar la formación de los complejos TOP2-DNA, como es el caso de dexrazoxana ¹⁴.

3) **Estudio de los efectos de la combinación de terapias con la DOXO**. Los efectos de la DOXO dependen a su vez de otros agentes que modifican la biología nativa de la enzima TOP2 mediante las modificaciones postraduccionales, por ejemplo, la sumoilación de TOP2 incrementa la reparación de DSB tras la degradación proteosómica de la TOP2 ²³.

4) **Desarrollo de mecanismos de entrega dirigida de quimioterápicos a las células tumorales**. La nanotecnología para la entrega dirigida de agentes a las células neoplásicas es un campo de investigación muy activo ²⁴.

Aunque las cuatro estrategias para mejorar la eficacia terapéutica de la DOXO son campos abiertos de investigación, actualmente ninguna tiene propuestas prometedoras frente a la prevención de la CIQ. Una nueva línea de estudio surge de la idea de inhibir la expresión de la *TOP2B* de manera específica en los cardiomiocitos mediante estrategias de terapia génica.

3.4. TERAPIA GÉNICA: EL FUTURO DE LA MEDICINA

La FDA define la **terapia génica** como una técnica que modifica los genes de un individuo para el tratamiento o cura de una enfermedad. Esta sigue tres estrategias principales: reemplazar el gen mutado por una copia sana, inactivar el gen causante de la enfermedad o introducir un nuevo gen ²⁵. Al tratar la enfermedad desde su origen, la terapia génica es una estrategia próxima a la **medicina personalizada**.

Una de las líneas de terapia génica se basa en el uso de **RNA de interferencia (RNAi)**. El RNAi induce el silenciamiento génico postraducciona l mediante su hibridación por

complementariedad con el RNA mensajero diana, lo que resulta bien en la degradación del mRNA o en el bloqueo de la traducción a proteína ²⁶. La terapia RNAi permite el tratamiento transitorio en células somáticas específicas en individuos adultos, lo que se cree más seguro, y ofrece otras posibilidades terapéuticas a la modificación permanente. Este silenciamiento se da de manera natural a través de pequeños RNA de interferencia (siRNAs) o microRNAs (miRNAs), y se ha conseguido replicar con miRNAs miméticos, RNAs de horquilla corta (shRNA) o siRNA sintéticos ²⁷. Específicamente los **shRNAs** son precursores de siRNAs, estos se administran en forma de DNA que se transcribe a RNA mediados por el promotor de la RNA polimerasa III o II, de manera que entran en la ruta del RNAi como una molécula análoga a un **pre-miRNA** ²⁸. La exportina-5 media su exportación al citoplasma, donde la estructura de horquilla es reconocida por Dicer, una ribonucleasa que procesa el pre-miRNA y genera un fragmento RNA de 21-13 nucleótidos con extremos 3' protuberantes ²⁹. Una de las hebras del dúplex de RNA es incorporado por las enzimas Ago1-4 dentro de complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), que localiza las dianas de mRNA y media su degradación ³⁰ (**Figura 2**).

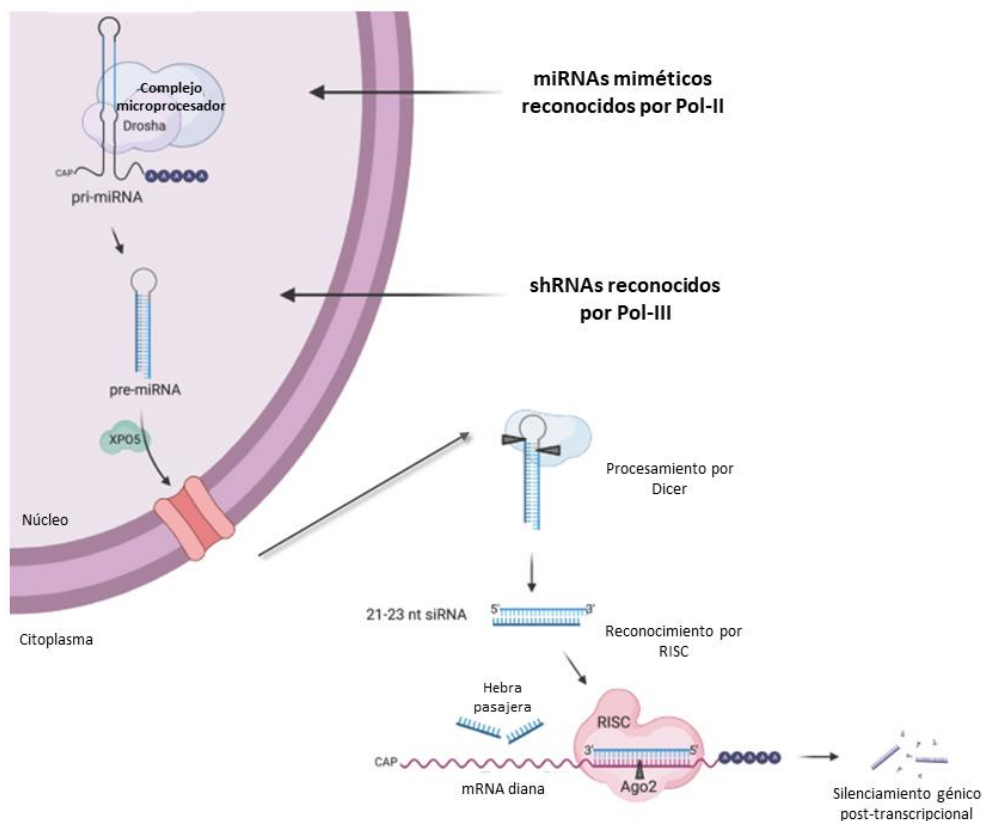


Figura 2. Representación esquemática del mecanismo de silenciamiento por shRNA. Tras la transcripción a RNA, el shRNA es exportado al citoplasma por la exportina 5. La estructura de horquilla es reconocida por Dicer, que la procesa dando lugar al siRNA. Una de las hebras del dúplex de RNA es utilizada por el complejo RISC para el cribado de mRNAs. Figura adaptada ¹³.

Desde el descubrimiento del RNAi, se ha estudiado su aplicación como terapia génica para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, actualmente una terapia de shRNA se encuentra en fase I de ensayos clínicos en humanos. Esta terapia inhibe la traducción del gen codificante de la apolipoproteína a en los hepatocitos, con el objetivo de prevenir la arterosclerosis ³¹. En otros campos de la medicina, existen terapias ya aprobadas con RNAi. En 2023 se aprobó por la FDA y la Agencia Europea del medicamento **la primera terapia basada en RNAi**, el patisiran, para el tratamiento de la amiloidosis hereditaria transtirretina, una enfermedad cardiovascular ³².

Hasta donde conocemos, **no se han aplicado terapias de RNAi para inhibir la expresión de TOP2B en los cardiomiocitos humanos y estudiar el posible efecto cardioprotector**. Sin embargo, sí que se han utilizado estrategias de RNAi para el silenciamiento de TOP2B con otros objetivos de estudio. Por ejemplo, para el análisis de la correlación entre la replicación del virus del papiloma humano y las DSB de DNA originadas por la acción de TOP2B. Disminuyendo la expresión de TOP2B mediante un shRNA, consiguieron una disminución del 50% de las roturas ³³.

Con todo lo expuesto, es evidente la necesidad de desarrollar nuevas terapias para la prevención de la CIQ que permitan la maximización del beneficio terapéutico de los antineoplásicos. Para ello, es conveniente conocer que se estima que aproximadamente el 45% de los fracasos farmacéuticos y el 30% de las restricciones en la aplicación de sustancias médicas se debe a efectos cardiovasculares no deseados, siendo la causa más común de los fracasos en los ensayos clínicos ³⁴. Por otro lado, el 70% de la toxicidad detectada en los ensayos clínicos podría haberse detectado en las fases preclínicas en caso de haber dispuesto de modelos cardiacos predictivos relevantes ³⁵. Estos datos ponen de manifiesto la **carencia de modelos complejos que reflejen las propiedades anatómicas y fisiológicas del corazón humano**.

3.5. LA NECESIDAD DE DESARROLLAR MODELOS CARDIACOS

Dada la incidencia de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, además de la importancia de la cardiotoxicidad inducida por fármacos, es imprescindible desarrollar **modelos predictivos de la funcionalidad cardiaca humana** que permitan desarrollar nuevas soluciones terapéuticas, así como testar su seguridad. Actualmente existen diferentes niveles de experimentación con diversos grados de fidelidad al corazón, de integración con otros sistemas (como el endocrino) y de brecha traslacional con el humano (**Figura 3**). Sin embargo, **el corazón es un órgano difícil de modelizar por su gran complejidad**, lo que ha impedido el desarrollo de modelos que reflejen de manera fiel las características cardiacas. Estos modelos son esenciales para obtener resultados traslacionales en el estudio de su función, caracterización, así como su

aplicación farmacéutica en ensayos preclínicos que permitan obtener una predicción precisa y adecuada de los efectos secundarios y la toxicidad.

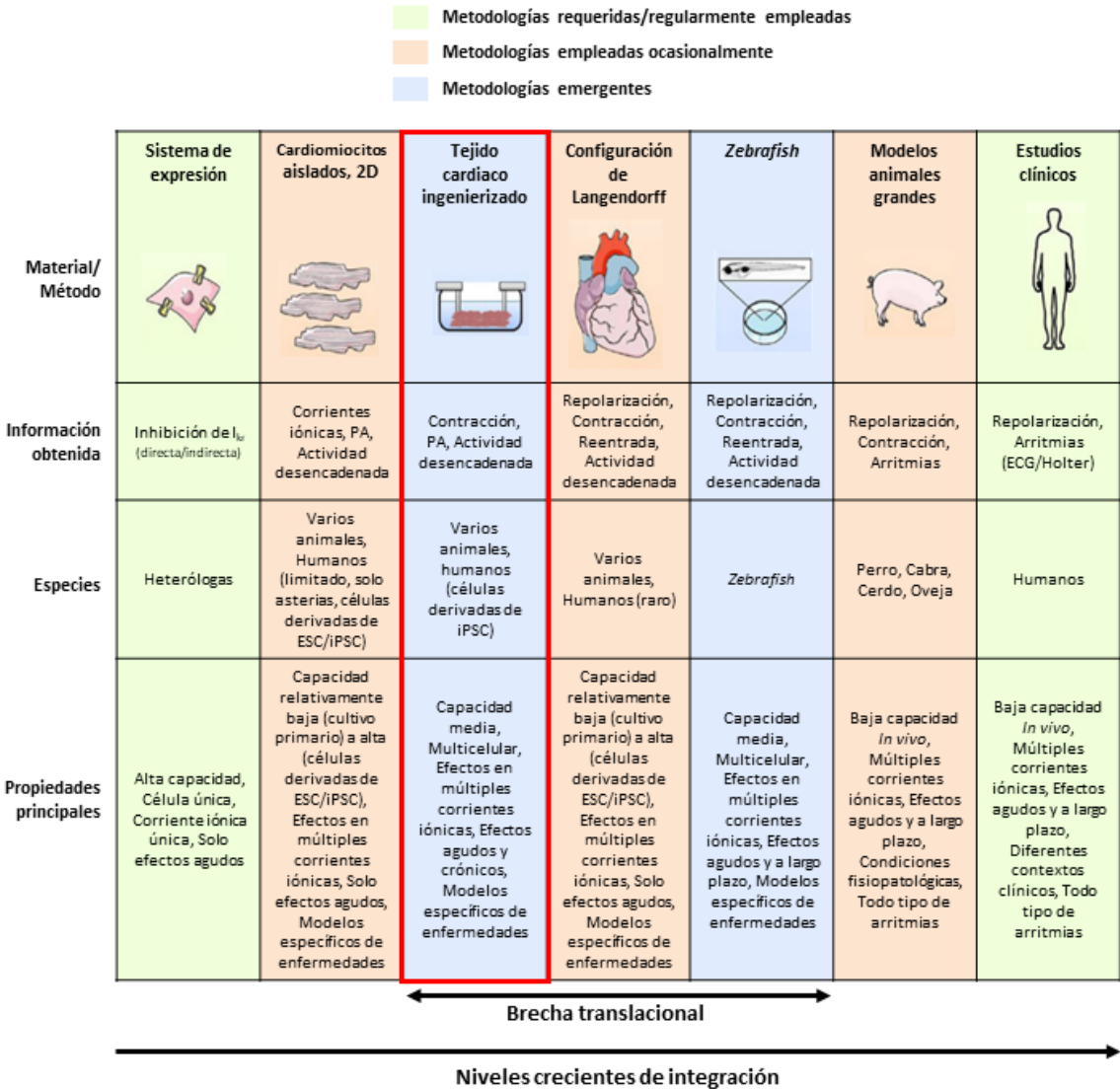


Figura 3. Panorama actual de las tecnologías utilizadas para evaluar las propiedades y características de las sustancias farmacológicas respecto a la toxicidad cardíaca. Figura adaptada del original ³⁶.

3.5.1. Complejidad celular del corazón

El corazón humano adulto es un **órgano multicelular** compuesto principalmente por cardiomiocitos (CM), fibroblastos cardíacos (CF) y células endoteliales (EC), aunque también incluye otros tipos minoritarios como células perivasculares, neuronas del sistema nervioso simpático y macrófagos residentes. Esta **red celular** se comunica mediante interacciones complejas y estrechas, siendo esencial en la función cardíaca y en los procesos de remodelado tras un episodio de estrés o isquemia ³⁷.

Los **cardiomiocitos** ocupan un 70-80% del volumen total del órgano, mientras que constituyen un 30-40% de las células totales ³⁸. Los CM maduros carecen de actividad proliferativa, por lo que se llega al número máximo de CM pocos meses tras el nacimiento y posteriormente tan solo crecen en tamaño ³⁹. Los CM adultos son binucleados, tienen una morfología poligonal, alargada y ramificada, presentan una disposición organizada de los sarcómeros, tienen un alto volumen de mitocondrias y un metabolismo y uso de energía basado en los ácidos grasos.

Los **fibroblastos** representan el 20% de la red celular cardíaca. Su función principal es proveer fuerza mecánica y de tensión a los CM ⁴⁰. Además, sintetizan diversas proteínas de la matriz extracelular (ECM) cardíaca, como el colágeno fibrilar de tipo I y II (componentes mayoritarios de la ECM), colagenasas, fibronectina o vitronectina. Mediante el co-cultivo de CF sobre una monocapa de CM se ha comprobado que también establecen interacciones paracrinas, mejorando el fenotipo de estos últimos ⁴¹. Además, los fibroblastos juegan un papel protagonista en la remodelación del tejido tras un episodio de estrés cardíaco, transitando a un fenotipo de miofibroblastos activos que se caracteriza por la acumulación y secreción de proteínas de la ECM ⁴².

Las **células endoteliales** conforman los vasos sanguíneos, elemento fundamental para el transporte de oxígeno y nutrientes para los CM, pero también otros procesos como el inicio de la respuesta inflamatoria, la regulación del tono vasomotor, el control de la permeabilidad vascular o el transporte de factores protectores que promuevan la organización y supervivencia de los CM. Además, se ha demostrado que la disfunción endotelial en el corazón tiene un papel protagonista en el desarrollo de arterioesclerosis y los consecuentes procesos isquémicos ⁴³⁻⁴⁵.

La **matriz extracelular** y el resto de tipos celulares son imprescindibles para la estimulación química, eléctrica y mecánica de los CM. Además, la interacción es fundamental para formar las estructuras mínimas necesarias para la contracción. Todas estas características se han demostrado mediante el aislamiento de los CM, condición en la que rápidamente pierden su función contráctil y sufren grandes cambios morfológicos, estructurales y funcionales ^{46,47}.

3.5.2. Modelos animales: necesarios pero insuficientes

El estudio de los procesos fisiológicos y patológicos *in vivo* es imprescindible. Uno de los argumentos de mayor peso a favor de la experimentación animal es que los **órganos interactúan** de manera constante y esto no se ha conseguido modelar *in vitro*. Por lo que, para estudiar la toxicidad o el impacto de sustancias en el cuerpo humano, los únicos organismos completos son los animales (**Figura 3**). Se ha demostrado que los estudios en animales predicen la toxicidad en

humanos con una ratio de concordancia del 71%, siendo un 63% en especies no roedoras y un 43% en especies roedoras ³⁵. Por tanto, a pesar del alto grado de homología genética, las **diferencias interespecíficas a nivel funcional** entre humanos y roedores son significativas. Sin embargo, las especies roedoras son las más utilizadas por su fácil manejo, cortos tiempos de reproducción y bajo coste. El último informe europeo sobre el uso de animales de experimentación muestra que el 61% eran ratones y el 12% ratas, mientras que el uso el resto de los mamíferos de experimentación suman tan solo un 8.3% ⁴⁸.

A pesar de las ventajas de los modelos animales, estos también cuentan con numerosos inconvenientes, entre los que destacan tres:

- 1) La **barrera entre las especies** es evidente, pequeñas diferencias genéticas se ven reflejada en grandes cambios fenotípicos y funcionales que imposibilitan la traslación de los resultados.
- 2) Muchos modelos animales son **inducidos**, es decir, se les realiza una serie de modificaciones génicas o quirúrgicas para que padezcan unos síntomas similares a los humanos. Los modelos quirúrgicos son de baja reproducibilidad y utilizan tratamientos anestésicos. Los modelos genéticos son complejos de realizar y, además, la gran mayoría de enfermedades son multifactoriales, poniendo en duda los modelos que solo comprenden la genética ⁴⁹.
- 3) Para obtener unos resultados reproducibles, los modelos son **genéticamente homogéneos**, por lo que no consiguen recapitular la variabilidad genética humana. Además, los modelos se encuentran en **condiciones estandarizadas y estériles**, lo que difiere mucho de los factores ambientales a los que se expone un individuo a lo largo de su vida ⁵⁰.

Para modelizar la cardiotoxicidad inducida por DOXO con animales de experimentación, generalmente se les administran 5-45 mg/kg de DOXO intraperitoneal o por la vena caudal a ratones, ratas, conejos, perros y *zebrafish*. La **cardiotoxicidad aguda** se recrea con una única inyección de dosis alta ⁵¹, mientras que la **cardiotoxicidad crónica** se modeliza con múltiples administraciones de DOXO hasta llegar a la dosis acumulativa deseada ⁵².

3.5.3. Cultivos celulares bidimensionales como modelos

Las principales ventajas de los modelos bidimensionales recaen en su **simplicidad, bajo coste de mantenimiento y gran control de las condiciones ambientales**. Sin embargo, se trata de células aisladas cuyas **características están totalmente alejadas de las naturales** al perderse las interacciones intercelulares y con el entorno, las cuales son la principal fuente de señalización para su correcto funcionamiento ⁵³. Además, al aislarlas se altera el fenotipo y se condiciona la fisiología celular, por ejemplo, la EC pierden su característica polaridad ⁵⁴. Otro factor determinante es la accesibilidad al medio (fuente de nutrientes, moléculas de señalización y

oxígeno), ya que de manera natural las células se organizan en tejidos en los que se generan gradientes de nutrientes y oxígeno en función de la cercanía a los capilares sanguíneos, hecho que no ocurre en una monocapa celular ⁵⁵.

La cardiotoxicidad derivada del tratamiento con antraciclinas también se ha estudiado en cultivos celulares. El aislamiento de CM adultos humanos es complejo y su disponibilidad es muy limitada, por lo que generalmente se utilizan CM adultos de rata ⁵⁶. En estos se descubrió que la administración de DOXO causa una regulación negativa de la maquinaria de degradación proteica y acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas y autofagosomas de manera dosis-dependiente. Estos resultados indican que la autofagia se inicia para compensar el estrés citotóxico, pero a dosis mayores y más prolongadas en el tiempo resultan en procesos apoptóticos y necróticos ⁵⁷. Aunque también se ha estudiado el efecto de DOXO en líneas celulares establecidas como la línea de cardiomioblastos H9C2, actualmente los estudios se centran en los cardiomiocitos derivados de células madre humanas pluripotenciales inducidas (hiPSC-CM) como se comentará más adelante ⁵⁸.

3.5.4. Tendencia actual: modelos tridimensionales y células pluripotentes inducidas humanas

Como se ha descrito, los modelos animales conllevan un alto coste de manejo y mantenimiento y su uso tiene fuertes repercusiones éticas, pero reflejan de manera más fiel la complejidad de los organismos. Estas características contrastan con los cultivos bidimensionales, muy simples y de bajo coste, pero cuyos resultados son difíciles de extrapolar (**Figura 3**).

La concienciación sobre el bienestar de los animales de experimentación se formalizó en 1959, cuando Russel y Burch definieron los principios de las 3Rs para el uso de animales en la investigación: reemplazamiento, reducción y refinamiento ⁵⁹. De los tres objetivos el principal es el reemplazamiento ya que, en el caso de encontrar un sustituto total de los animales, no sería necesario utilizarlos. Por ello, actualmente el desarrollo de modelos de reemplazo se centra en la creación de **cultivos celulares tridimensionales basados en líneas derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas** (hiPSC), ya que son los modelos que podrían recrear con mayor fidelidad los órganos humanos, evitando el salto interespecie.

3.6. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS HUMANAS

Las hiPSC fueron desarrolladas por primera vez en 2006 mediante la inducción de la expresión de factores transcripcionales propios de células pluripotentes en células somáticas adultas ⁶⁰. Su aplicación para la investigación es muy interesante, porque se podrían obtener células pluripotentes a partir del **propio paciente y diferenciarlas a los tipos celulares de interés**. Un ejemplo ilustrativo es el reportado por Orondzynski y colaboradores, donde crearon un

modelo cardiaco basado en la ingeniería de tejidos con hiPSC-CM derivados de una familia con cardiomiopatía hipertrófica que recapitulaba de manera óptima las características de dicha enfermedad, como la hipertrofia, la respuesta alterada al calcio, la hipercontractilidad y la desorganización de los sarcómeros ⁶¹. Posteriormente probaron la eficacia de diferentes fármacos mediante el estudio de la mejora del fenotipo eléctrico, concluyendo qué tratamiento era el más efectivo. Con este caso se puede observar que las células derivadas de hiPSC y los modelos de ingeniería de tejidos son un gran avance hacia la **medicina de precisión**, donde se maximizan los beneficios de las terapias basándose en las características específicas de los individuos. Incluso se podrían **generar diferentes líneas celulares con un fondo isogénico** a partir de las células pluripotentes inducidas del propio paciente.

En los últimos 15 años se han desarrollado diferentes metodologías para la producción, cultivo y diferenciación de las hiPSC, aunque aún **no se han establecido protocolos sencillos y con una alta reproducibilidad** para la generación de los tipos celulares que conforman el corazón humano. La mayor desventaja del uso de hiPSC para el modelado del tejido cardiaco es el **fenotipo inmaduro** de los tipos celulares derivados. En el caso de los CM se refleja en la mononucleación, la morfología celular, la disposición desorganizada de los sarcómeros, el bajo volumen en mitocondrias y un metabolismo y uso de energía similar a los patrones fetales ⁶². Mediante la tecnología de los **órgano-en-chip** se ha conseguido **mejorar el perfil** inmaduro, gracias al preciso control de los factores ambientales y la incorporación de distintos tipos celulares como se explica posteriormente.

Los fibroblastos cardiacos son una población heterogénea ya que provienen de diferentes orígenes, aunque la fuente mayoritaria es el epicardio. Actualmente se han establecido protocolos para la diferenciación de **fibroblastos cardiacos a partir de progenitores del segundo campo cardiaco o epicárdicos** ^{63,64}.

Las **células endoteliales** también se pueden derivar de las iPSC mediante la adición de pequeñas moléculas o la edición génica para la sobreexpresión de factores de transcripción endoteliales esenciales, como ETV2 y GATA2. Además, al diferenciarlas a partir de un progenitor intermediario cardiaco tienen un perfil de expresión relacionado con genes cardiacos, lo que se asemeja al perfil natural de las células endoteliales cardiacas ⁶⁵.

3.7. MODELOS DE INGENIERÍA DE TEJIDOS

En las dos últimas décadas, motivado por la directiva de las 3Rs, el interés por los modelos celulares tridimensionales ha crecido exponencialmente, ya que reflejan la **organización y microarquitectura** de un órgano vivo. En estos se pueden estudiar las

interacciones intercelulares, así como las **interacciones con la matriz extracelular**, esenciales para desarrollar la función fisiológica del tejido, incluyendo la proliferación, diferenciación, supervivencia y secreción ^{66,67}.

3.7.1. Corazón-en-chip

Los órgano-en-chip consisten en **sistemas de microfluídica** que pretenden modelizar la estructura, microambiente y función de los órganos humanos, con las ventajas de la miniaturización, la integración de diferentes poblaciones celulares y, sobre todo, del control preciso de las condiciones. Al utilizar células de origen humano y tener una disposición tridimensional, las células presentan perfiles de expresión y metabolización más similares a los naturales. Por tanto, estos dispositivos podrían ser la solución para predecir la toxicidad en los modelos de cribado, representando un avance hacia la medicina personalizada.

Los modelos de microfluídica del corazón, denominados **corazón-en-chip**, proporcionan el estímulo necesario para la **organización espacial anisotrópica, el alineamiento celular, la contracción mecánica y la respuesta electroquímica** ^{68,69}. Estos sistemas aportan de manera continua nutrientes y oxígeno y elimina los desechos metabólicos, simulando una red metabólica artificial, lo que permite un **control preciso de las condiciones** de cultivo, así como una mejor **monitorización funcional** de las células ⁷⁰.

En los últimos años, han surgido diferentes plataformas microfluídicas que permiten simular y estudiar diferentes aspectos de la patofisiología cardíaca, generando un amplio abanico de modelos de corazón-en-chip. Por ejemplo, mediante la integración de electrodos en la plataforma microfluídica, se proporcionan estímulos eléctricos alternos para la simular la **electrofisiología** del miocardio ⁷¹. También se puede imitar los **ciclos de contracción** mediante el estiramiento de las cámaras, lo que mejora el alineamiento sarcomérico y la expresión de proteínas estructurales ⁷². La **organización y alineamiento de la matriz extracelular** también determinan la función de los CM, por ejemplo, la integración de micropatrones o sustratos de proteínas mejoran la función y diferenciación miogénica celular ⁷³. Una de las principales ventajas de los corazón-en-chip y la integración de células derivadas de hiPSC en estos es que mediante todas las estrategias descritas aplicadas a los hiPSC-CM **mejoran su fenotipo maduro**.

Un campo en auge dentro del corazón-en-chip es la creación de una **barrera endotelial** que simule un vaso sanguíneo. Tener un modelo cardíaco vascularizado es imprescindible para el estudio de la mayoría de los procesos fisiológicos y patológicos, ya que esta barrera determina la circulación de factores, células inmunes, fármacos u otros componentes relevantes hacia el tejido diana ⁶⁵. Además, el co-cultivo de las EC cardíacas con pericitos y células del músculo liso

ha demostrado que fomenta la función de barrera y da lugar a un mejor modelo de las respuestas inflamatorias ⁷⁴. Recientemente, Liu Y y colaboradores publicaron un modelo microfluídico cardíaco con **CM y CF** en una misma cámara y una barrera endotelial compuesto por **EC vasculares derivadas de iPSC** en otra cámara conectada. Las EC se alinearon de manera paralela a la dirección del flujo, como ocurre *in vivo*. El flujo continuo de medio incrementó la formación de conexiones intercelulares dando lugar a una menor permeabilidad. Además, mejoró el perfil de expresión de los CM y la función cardíaca ⁷⁵.

La cardiotoxicidad inducida por la DOXO ya ha sido evaluada en modelos de corazón-en-chip. En 2021 se publicó un modelo con hiPSC-CM y tejido derivado de un cáncer de mama en diferentes cámaras, y aptasensores electroquímicos para la detección de biomarcadores en diferentes cámaras ⁷⁶. De esta manera, tras la administración de DOXO se monitorizó la secreción de biomarcadores de la fibrosis cardíaca, lo que resulta muy interesante para el diagnóstico precoz de la cardiotoxicidad. Este mismo año se ha publicado un corazón-en-chip con hiPSC-CM y hiPSC-EC embebidos en canales diferentes donde se ha evaluado su poder predictivo de la cardiotoxicidad inducida por inhibidores de la tirosina quinasa ⁷⁷.

Aunque los avances en el campo del corazón-en-chip son evidentes, aún queda mucho que avanzar. Uno de puntos débiles de los últimos modelos desarrollados es la integración de los diferentes tipos celulares que conforman el tejido cardíaco en cámaras separadas, aunque conectadas ⁷⁵⁻⁷⁷. Para recrear un modelo fiel del corazón, interesa que las células estén en el mismo compartimento y puedan establecer las interacciones intercelulares necesarias para el correcto funcionamiento del órgano. Por ejemplo, para simular la vascularización, sería primordial que las células endoteliales estén en contacto con los cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos. Además, interesa saber que proporciones y densidad celulares son las más adecuadas para la modelización del corazón.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. HIPÓTESIS

Aunque se ha demostrado que la delección inducible y específica en el tejido cardíaco de *Top2b* es cardioprotectora frente a la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina, no se ha estudiado su aplicación para la clínica humana. Dado este vacío en el conocimiento, se hipotetiza que una **terapia génica** basada en **shRNA** para el **silenciamiento de TOP2B** tendrá efecto **cardioprotector** y se podrá implementar como **tratamiento profiláctico** en la clínica.

Para poder realizar dicho estudio con valor traslacional, es necesario disponer de un modelo preclínico humano predictivo. Por eso se hipotetiza que la creación de un **dispositivo de corazón-en-chip** conformado por los principales tipos celulares cardíacos, en concreto fibroblastos cardíacos y cardiomiocitos, sobre el que se pueda mimetizar la CIQ, puede constituir ese modelo que permita dar un paso más hacia la futura medicina personalizada y la seguridad farmacológica de los quimioterápicos.

4.2. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo es el desarrollo de una **estrategia de RNAi para inhibir la TOP2B** como base para futuras terapias preventivas de la CIQ, así como desarrollar los primeros pasos para construir un **modelo biomimético corazón-en-chip humano** para evaluar la terapia creada.

Los **objetivos específicos** del trabajo son los siguientes:

1. Diseñar, desarrollar y caracterizar una terapia cardiosselectiva RNAi anti-TOP2B.
2. Obtener y/o caracterizar cardiomiocitos derivados de células madre pluripotenciales inducidas humanas (hiPSC-CM) y fibroblastos cardíacos humanos (hCF) para generar modelos corazón-en-chip.
3. Definir el medio de cultivo óptimo para el co-cultivo de células endoteliales, hiPSC-CM y hCF.
4. Iniciar el desarrollo de un modelo fisiológico corazón-en-chip.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. DESARROLLAR UNA TERAPIA CARDIOSELECTIVA RNAi ANTI-TOP2B.

5.1.1. Diseño de shRNA

El diseño de las secuencias de los shRNAs se realizó mediante el software Invivogen. Se obtuvieron 3 shRNA candidatos en base a su región de interacción con los parálogos TOP2 y la ausencia de interacciones fuera de la diana. La región se definió haciendo un alineamiento de las secuencias codificantes de TOP2A (NM_001067) Y TOP2B (NM_001330700) con *Basic Local Alignment Search* (BLAST) y comprobando que las secuencias diana se localizaban en zonas de poca homología con TOP2A. La especificidad de los shRNAs se evaluó mediante análisis de homología de secuencia con el genoma humano con BLAST⁷⁸. Se descartaron aquellos candidatos con homología superior o igual al 75% de nucleótidos con el shRNA. Para terminar, se diseñó una secuencia aleatoria, denominada *scramble* sin homología con el genoma humano, determinado por BLAST.

El diseño de los shRNAs está basado en bibliografía, así como la secuencia del bucle^{79,80}. A las secuencias de DNA se les añadió en su extremo 5' el sitio de restricción de la enzima MluI y en el extremo 3' la secuencia del bucle, seguido de la secuencia complementaria a la secuencia elegida y el sitio de restricción de MluI (**Figura 4A**). Estas secuencias de DNA se sintetizaron como dos oligonucleótidos complementarios (Thermo Fisher Scientific).

5.1.2. Procesamiento del vector V69 para el clonaje de los shRNAs

Para el clonaje de las horquillas se utilizó el vector V69 disponible en el grupo BSICoS (**Figura 4B**). El sitio de clonaje MluI se encuentra corriente abajo del gen reportero tdTomato (tdT), cuya expresión está controlada por un promotor inducible por doxiciclina (el promotor mínimo del citomegalovirus (CMV)) y las secuencias operadoras del operón de la tetraciclina (tetO)). De esta manera, la expresión del gen reportero y de los shRNAs en un RNA policistronico solo se producirá en presencia del inductor doxiciclina. Corriente abajo al sitio de clonaje de los shRNAs se encuentra la señal de poliadelinación del gen de la timidina quinasa del herpes virus (HSV-TK) para asegurar el fin de la transcripción y el correcto procesamiento de los transcritos. Además, el V69 contiene un gen de resistencia a la ampicilina.

El clonaje se realizó mediante la **digestión** de 2 µg del vector V69 con la enzima de restricción MluI (Thermo Fisher, IV GN0026) a 37 °C durante 8 horas, y la posterior inactivación de la enzima a 80 °C durante 20 minutos. Para evitar la recircularización del vector en la ligación, se defosforiló con la fosfatasa alcalina termosensible FastAP (Thermo Fisher, EF0651), siguiendo el protocolo de la casa comercial.

Con el producto de la defosforilación se realizó una **electroforesis en gel de agarosa** al 1% en 0.5X TBE (50 mM de Tris, 45 mM de ácido bórico y 0.5 mM de EDTA) (Thermo Fisher, 15581044) y el DNA se tiñó con *Gel GreenSafe Premium* 1:100 (NZYtech, MB13201). Como marcador de peso molecular de DNA se utilizó *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, 10787-018). Finalmente, el gel se visualizó en el documentador de geles iBright CL1000 (Invitrogen) y se recortó la banda del peso molecular correspondiente al vector. A continuación, se purificó el DNA contenido en la banda del gel con el kit NZYGelPure (NZYtech, MB01102), siguiendo las instrucciones del fabricante, y el producto final se eluyó en 50 µl de H₂O. El producto final fue cuantificado en el nanoespectrofotómetro (Implen) y conservado a 4 °C.

5.1.3. Procesamiento de los oligonucleótidos shRNA para su clonaje

Los oligonucleótidos de DNA fueron fosforilados con la T4 polinucleotido kinasa (Life Technologies, EK0031) siguiendo el protocolo y reactivos establecidos por la casa comercial. Posteriormente, los oligonucleótidos complementarios se hibridaron mediante la incubación de las parejas complementarias a 98 °C durante 5 minutos y su renaturalización a temperatura ambiente. Los DNA bicatenarios con las secuencias de los shRNA generados presentaban una concentración de 1.25 µM de cada oligonucleótido y fueron conservados a 4°C.

5.1.4. Ligación

Se preparó un mix de ligación con un ratio molecular vector:inserto de 1:3, 50 ng del vector digerido y *T4 DNA ligase Master Mix* (Invitrogen, IVGN2104). Además, se incluyó un control negativo de ligación donde se introdujo vector pero no inserto. La ligación se realizó mediante la incubación de las muestras 30 minutos a temperatura ambiente y el producto final se conservó a 4°C.

5.1.5. Transformación de cepas competentes *E.coli* DH5α

Las bacterias competentes NZY5α *Escherichia coli* (NZYtech, MB00401), conservadas a -80 °C, fueron descongeladas en hielo y 25 µl se incubaron con 2 µl del producto de ligación durante 30 minutos en hielo. Pasado el tiempo, se realizó un choque térmico a 37 °C durante 60 segundos, seguido de 5 minutos de incubación en hielo. Se añadieron 200 µl de medio SOC (Thermo Fisher, 15544034) y se incubaron las bacterias a 37 °C y 250 rpm durante 1 hora. Finalmente, los cultivos bacterianos se sembraron en placas de Agar-LB (NZYtech, MB11801) con 100 µg/ml de ampicilina (Sigma Aldrich, A9518-5G) y se incubaron a 37 °C hasta el siguiente día.

5.1.6. Cribado de colonias recombinantes

El primer paso del cribado consistió en una **PCR de colonias**. Las colonias se replicaron primero en una placa de Agar-LB fresco con 100 µg/ml de ampicilina y después en H₂O estéril. Se replicaron dos colonias por tubo con agua. La PCR se llevó a cabo con 0.035 U/µl de NZTaq II DNA polimerasa (NZYtech, MB36403), 2 mM de MgCl (NZYtech, MB36403), 200 mM de dNTPs (NZYtech, MB36403), 3% de dimetilsulfóxido (DMSO) (PanReac AppliChem, A3672.0100) y 250 mM de los cebadores especificados en la **Tabla A1** para la amplificación de la horquilla y de un control interno del vector V69.

El ciclo de la PCR consistió en un ciclo inicial de desnaturalización de 3 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de hibridación a 60 °C, 15 segundos de extensión a 72 °C y un ciclo final de hibridación de 5 minutos a 72 °C. Para visualizar el producto de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% tal como se explica en el apartado 5.1.2.

Las colonias que mostraron la amplificación de interés fueron cultivadas en 5 ml de medio líquido LB (MP Biomedicals, 3002022) con 100 µg/ml de ampicilina (Sigma Aldrich, A9518-5G) a 37 °C y 250 rpm hasta el día siguiente. Después, se purificó el DNA plasmídico utilizando el kit comercial NZYSpeed Miniprep (NZYtech, MB21002), siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo en 50 µl de buffer TE (10mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) (Thermo Fisher, AM9858). La concentración de plásmido se cuantificó en el nanoespectrofotómetro (Implen) y fueron conservados a 4°C.

La identificación de vectores recombinantes, dentro de los positivos de la PCR de colonias, se realizó por digestión enzimática de 500 ng de vector con las enzimas de restricción SpeI (Thermo Fisher, ER1251) y HindIII (Thermo Fisher, ER0501) durante 2 horas a 37 °C, seguido de una inactivación enzimática a 80 °C durante 20 minutos. Los fragmentos de la digestión se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% como se explica en el apartado 5.1.2., obteniendo un patrón de bandas diferencial en función de la presencia o ausencia de los shRNA en el vector V69.

5.1.7. Secuenciación de los vectores recombinantes

La secuencia de los vectores recombinantes se verificó por el método de Sanger (STAB VIDA) utilizando cebadores adecuados (**Tabla A1**) y 1 M de betaina (Thermo Fisher, J77507.UCR). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software Contig Analysis (Invitrogen).

5.2. CARACTERIZACIÓN DE LA TERAPIA CARDIOSELECTIVA RNAi ANTI-TOP2B.

5.2.1. Transfección de células HEK293 con los vectores recombinantes

La caracterización de los shRNAs se realizó en células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293, ATCC, CRL-1573). Esta línea se cultivó a 37 °C con 5% de CO₂ en medio MEM (Biowest, L0440-500) con 10% de suero fetal bovino (SFB, Thermo Fisher, 10270098) y 1% penicilina y estreptomicina (100 µg/ml) (Thermo Fisher, 15140122).

Las HEK293 se sembraron en placas de 6 pocillos (Teknovas, 15516) a una densidad celular de 80.000 células/cm² y se transfectaron 24 horas después de la siembra con 1 µg de vectores de expresión de shRNAs (shRNA-TOP2B 1, shRNA-TOP2B 2, shRNA-TOP2B 3 y shRNA-scramble) y 6 µl de Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher, 11668027), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada vector se transfectó en duplicado y, además, se incluyó una condición sin transfectar. En uno de los dos replicados por condición se añadió una concentración final de 2 µg/ml de doxiciclina (Biogen Científica, sc-204734) para la expresión inducible del RNA policistrónico compuesto por la tdT y el shRNA. Los cultivos celulares se incubaron con la mezcla de transfección durante 72 horas a 37 °C y 5% de CO₂.

La eficiencia de transfección se evaluó a las 72 horas observando la expresión del gen reportero tdT mediante microcopia de fluorescencia con el microscopio Nikon TS2. Para la posterior caracterización de los shRNA, se lavaron las células con tampón de fosfato salino (PBS, Labotaq, 85873), y se suspendieron con EDTA 0,5 mM (Thermo Fisher, T4174-100ML), cuya acción se neutralizó con DMEM (VWR, 392-0412). Se centrifugaron los cultivos a 300 g durante 5 minutos y, tras quitar el sobrenadante, se lavó el pellet con PBS y se separaron tres alícuotas diferentes para la extracción de proteínas, la extracción de RNA y la resiembra en placas multipocillo para inmunofluorescencia.

5.2.2. Ensayos de expresión proteica mediante Western Blot

La **extracción de proteínas** a partir del pellet lavado y seco se realizó mediante la adición de 200 µl del tampón de lisis RIPA (Thermo Fisher, 89900) suplementado con 10 µl/ml de anti-proteasas (Thermo Fisher, 87795) y 10 µl/ml de anti-fosfatasas (Thermo Fisher, 78420). Tras 1 hora de incubación en hielo, se centrifugó la suspensión celular y se recuperó el sobrenadante como extracto final. La **cuantificación de las proteínas totales** de cada extracto se realizó mediante el ensayo de BCA (Thermo Fisher, 26635).

A 20 ng de proteína total de cada muestra se añadió tampón de muestra 6x (375 mM Tris-HCl pH=6.8, 10% SDS, 0.03% azul de bromofenol, 45% glicerol, 10% β-mercaptoetanol y H₂O destilada) (VWR, J61337.AC) y se desnaturalizaron por incubación a 95 °C durante 10 minutos,

seguido de 2 minutos de incubación en hielo. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida (29:1) (Merk Life Science, A3699-5X100ml) al 8% en tampón Tris pH=8.8, 10% SDS, 10% APS, 1% TEMED y H₂O destilada, con un gel concentrador al 4% de poliacrilamida en tampón Tris pH=6.8, 10% SDS, 10% APS, 1% TEMED y H₂O destilada. Como marcador de peso molecular se utilizó el Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher, 26616). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V durante 2 horas.

Para la tinción de **Coomassie**, los geles se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en una solución de 0.5% *Coomassie Brilliant Blue G-250* (PanReac AppliChem, 42655) con 50% de metanol (VWR, 20903.368) y 10% de ácido acético glacial (VWR, 20104.312) en H₂O destilada. Posteriormente se realizaron dos lavados rápidos y dos lavados de 20 minutos en agitación en el agitador *3D Sunflower Mini-Shaker* (bioSan) con la solución de lavado compuesta por 40% de metanol y 10% de ácido acético glacial en H₂O destilada. Para obtener un resultado más nítido, se incubó el gel en H₂O destilada a temperatura ambiente hasta el día siguiente. La señal se registró en el escáner de infrarrojos Odyssey CLx 118 (LI-COR).

Para los Western blots, las proteínas de los geles se **transfirieron a una membrana de nitrocelulosa** (Amershan Protan, 10600003) a 10 V y 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente la membrana se bloqueó mediante su incubación durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación, en PBS (Labotaq, 85873) con 5% de seroalbúmina bovina (SAB, Merck Life Science, A9647-100G) o 5% de leche desnatada en polvo (PanReac AppliChem, A0830).

La **incubación con los anticuerpos primarios (Tabla A2)**, diluidos en un 2% de SAB se realizó durante toda la noche a 4 °C y agitación. Tras tres lavados de 10 minutos con PBS con un 0.1% de Tween (VWR, 8.22184.0500), se incubó la membrana con el **anticuerpo secundario (Tabla A3)** durante 2 horas a temperatura ambiente, oscuridad y agitación. Tras tres lavados de 10 minutos con PBS con un 0.1% de Tween, las membranas fueron escaneadas en el escáner de infrarrojos Odyssey CLx 118 (LI-COR).

5.2.3. Ensayos de expresión proteica mediante inmunofluorescencia

Para la inmunofluorescencia, el pellet celular fue resuspendido en DMEM (VWR, 392-0412) y se sembró a una densidad celular 1:10 respecto a la placa original de 6 pocillos. Se utilizó una placa multipocillo de 18 pocillos de 0.32 cm² de superficie recubiertos de cristal (Cellvis, C18-1.5H), previamente recubierta con poli-D-lisina (Gibco, A38904-01) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras un día de incubación a 37 °C y 5% CO₂, se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS (Labotaq, 85873) y se fijaron las células mediante su incubación en para-formaldehído (PFA, Biogen Científica, sc-281692) al 4% durante 20 minutos a 4 °C.

Posteriormente se realizó un lavado con PBS y se conservó la placa sellada con los pocillos llenos de PBS a 4 °C hasta su posterior uso.

Para realizar el marcaje por inmunofluorescencia, las células se permeabilizaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en Tritón X-100 (LANAU, 142314.1611) al 0.1% en PBS (Labotaq, 85873), seguido de tres lavados con PBS de 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se bloquearon con Protein Block (Agilent, X0909) durante 25 minutos a temperatura ambiente, seguido de otros tres lavados con PBS. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-TOP2B (**Tabla A2**) diluido en PBS durante toda la noche a 4 °C. Tras este periodo, se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron las muestras con el correspondiente anticuerpo secundario (**Tabla A3**) diluido 1:500 en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Además, tras otros tres lavados con PBS, se tiñeron los núcleos mediante la incubación de las muestras con DAPI (Abcam, ab228549) a 15 µM en PBS. Finalmente, se realizaron otros 3 lavados con PBS y se conservó la placa con los pocillos llenos de PBS a 4 °C hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia Mica (Leica Microsystems).

5.2.4. Ensayos de expresión génica

Extracción de RNA. Al pellet lavado con PBS (Labotaq, 85873) se le añadieron 300 µl de tampón de lisis del kit PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, 12183018A) con 1% de β-mercaptoetanol (Thermo Fisher, 31350010) y se siguió el protocolo establecido por la casa comercial. El RNA final se eluyó en 30 µl de agua libre de RNasas del mismo kit y la concentración de RNA se midió en el NanoPhotometer N60 (Implen).

Finalizada la extracción, se realizó una etapa adicional para la eliminación del DNA residual utilizando la DNase RNAase-free (Thermo Fisher, EN0521), siguiendo las instrucciones del fabricante para el tratamiento de 1 µg de RNA de cada una de las muestras. Para ello se incubaron las mezclas de reacción a 37 °C durante 1 hora y se inactivó la reacción mediante la adición de EDTA del mismo kit e incubando las muestras a 65 °C durante 10 minutos.

Retrotranscripción de RNA a cDNA. De cada muestra se retrotranscribieron 100 ng de RNA. Para ello, se utilizó el kit PrimeScript RT Master Mix (Takara, #RR036A) siguiendo el protocolo del fabricante. Además de las muestras de interés, se realizaron dos controles donde se incluyeron el RNA de dos muestras seleccionadas al azar sin el máster mix del kit comercial. El cDNA obtenido se diluyó 1:10 en buffer TE (10mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) (Thermo Fisher, AM9858), siendo la concentración final de los cDNA de 1 ng/µl.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR estándar se realizó con el kit NZYTa_q II 2x *Green Master Mix* (NZYtech, MB35802) siguiendo las instrucciones del fabricante con 250 nM de cebadores específicos (**Tabla A1**) y 6 ng de muestra (cDNA, gDNA y el control de la retrotranscripción) en un termociclador M100 (BioRad). El ciclo de la PCR consistió en una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C, y 35 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 94 °C y 60 segundos de hibridación a 60 °C. Las muestras amplificadas fueron conservadas a 10 °C y visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% tal como se explica en el apartado 5.1.2.

La PCR cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo con el kit NZY Supreme qPCR *Green Master Mix* (2x) (NZYtech, MB41901) junto con los cebadores para la amplificación de los genes de interés *TOP2B*, *TOP2A* y los genes normalizadores *GAPDH* y *POLR2A* (**Tabla A1**) a 500 nM y 1 ng de cDNA. El ciclo de la qPCR consistió en un ciclo inicial de desnaturalización de 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 95 °C y 45 segundos de hibridación a 60 °C y una fase de la curva de desnaturalización de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C. La qPCR se llevó a cabo en el equipo de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific).

5.3. OBTENCIÓN DE hiPSC-CM Y CULTIVO DE hiPSC-CM Y hCF

Los **cardiomiocitos se diferenciaron** a partir de hiPSC siguiendo los protocolos basados en bibliografía^{63,81} y optimizados por el grupo de investigación BSICoS. La línea de hiPSCs σ 0028 (Sigma-Aldrich, IPSC0028) se sembró a una densidad de 84.000 células/cm² en placas de 12 pocillos (Teknovas, 15513) con un recubrimiento de Matrigel (CULTEK, 45354277) y medio de cultivo E8 (Stem Cells Technologies, 05990) con 5 μ M de inhibidor de ROCK (Stem Cells Technologies, 72304). Al día siguiente, el medio de cultivo se cambió a medio E8. Tras un día comenzó la diferenciación con el cambio de medio a RPMI (VWR, BWSTL0500-500) suplementado con B27 sin insulina (Thermo Fisher, A1895601) y 9 μ M de CHIR (MERK Life Sciences, SML1046), durante exactamente 24 horas. Posteriormente el medio se cambió a RPMI con B27 sin insulina para las siguientes 48 horas. Tras 72 horas desde la adición de CHIR, se retiró la mitad del medio de cultivo y se incorporó el mismo volumen de RPMI con 5 μ M de IWP2 (Biotechne R&D Systems, 3533/10), donde se incubó durante 48 horas. En el día 5 desde el inicio de la diferenciación, se volvieron a cultivar las células en el medio RPMI con B27 sin insulina durante las siguientes 48 horas. En el día 7, se cambió al medio RPMI suplementado con B27 (con insulina, Gibco, 17504001), denominado medio de mantenimiento de hiPSC-CM, que se mantuvo por 3 días, dentro de los cuales se renovó una vez. En el día 10, comienza la etapa de purificación para la que se cambió el medio a RPMI sin glucosa (Life Technologies, 11879020) con B27, que se renovó a los 2 días.

A día 13 finaliza la diferenciación y comienza el **protocolo de expansión** de los **hiPSC-CM**⁸². Se realizó un lavado con RPMI y se levantaron las células incubándolas 15 minutos a 37 °C con TripleE 10X (Thermo Fisher, A1217701) sin diluir. Tras la neutralización de la reacción añadiendo el doble de volumen de RPMI, las células se centrifugaron a 270 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de medio de pase, compuesto por medio de mantenimiento de hiPSC-CM con 10% de sustituto de suero KnockOut (10828010, Thermo Fisher) y 0.1% de inhibidor de ROCK. Se sembraron las células a una densidad de $1.88 \cdot 10^6$ células/cm² en frascos de 75 cm² con recubrimiento de Matrigel. En el día 1 de expansión se cambió el medio de pase por medio de cultivo de expansión, compuesto por RPMI con B27 y 2 µM de CHIR, que se renovó cada 2-3 días. Para utilizar los hiPSC-CM resultantes en experimentos, deben estar como mínimo 48-72 horas antes del comienzo del ensayo con medio de mantenimiento de hiPSC-CM, para promover su salida del fenotipo inmaduro proliferativo.

Los hCFs fueron cedidos generosamente por la profesora Arantxa González Miqueo de la Universidad de Navarra. Estos se cultivaron de manera rutinaria en medio de cultivo completo MilliporeSigma Chemicon FibroGRO-LS (Merck Life Science, SCMF002) incubados a 37 °C y 5% de CO₂ y renovando el medio cada 48 horas. Para subcultivarlas, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C con tripsina-EDTA 10X (Merck Life Science, T4174). Tras neutralizar su acción con el triple de volumen de DMEM (VWR, 392-0412), se centrifugaron a 135 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* celular en 1 ml de DMEM y se sembró la densidad deseada en medio FibroGRO-LS.

5.4. CARACTERIZACIÓN POR CITOMETRÍA E INMUNOFLUORESCENCIA

La identificación del linaje de cardiomiocitos por citometría de flujo se llevó a cabo con una tinción de la troponina 2 cardiaca (TNNT2). Para ello se siguió el protocolo optimizado por el grupo BSiCoS para la tinción de proteínas intracelulares. Se levantaron los hiPSC-CM como se explica en la expansión del apartado 5.3 y, tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se fijaron las células mediante su incubación a 4 °C durante 15 minutos en 100 µl de PBS y 100 µl de PFA (Biogen Científica, sc-281692) al 4%. Después se añadió 1 ml de PBS (Labotaq, 85873) y las células se centrifugaron a 270 g durante 5 minutos. Tras descartar el sobrenadante, se añadió 1 ml de PBS y se repitió la centrifugación. Se retiró de nuevo el sobrenadante y las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en el tampón de bloqueo y permeabilización [PBB, consistente en PBS con 10% de suero de burro (Merck Life Science, S30-100ML) y 0.1% de saponina (Merck Life Science, CAS 8047-15-2)] a una concentración de

5·10⁶ células/ml. A continuación, las células se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos con 1 µg/ml del anticuerpo anti-TNNT2 conjugado con BV421 (**Tabla A2**) en PBB. Se incluyó un control de células sin teñir con anti-TNNT2. Posteriormente se añadieron 200 µl/pocillo de la solución de lavado compuesta por PBS con 0.1% de saponina y se centrifugaron en las condiciones especificadas. Se eliminó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 300 µl de PBS y se conservaron a 4 °C o hielo hasta la lectura de la fluorescencia.

Para la citometría de los fibroblastos cardiacos humanos (hCF) se realizó el marcaje de CD90 y CD140α siguiendo el protocolo de tinción extracelular. El cultivo celular se levantó en las condiciones descritas para el pase de hCF en el apartado 5.3. Tras descartar el sobrenadante, se añadieron 500 µl de la solución de citometría compuesta por PBS con 5% de suero de burro (Merck Life Science, S30-100ML) y 2.5 mM de EDTA (Thermo Fisher, 15581044). Tras centrifugar las células a 135 g durante 5 minutos, se repitió el paso anterior dos veces más, con la diferencia de que en la última repetición se añadió el volumen de PBS con 5% de suero de burro para conseguir una suspensión celular de 4.000 células/µl. Se sembraron 50 µl/pocillo de dicha suspensión en placas con el fondo en V (Fisher Scientific, 10052063), teniendo un total de 2·10⁵ células/pocillo, donde se añadieron los anticuerpos primarios conjugados (**Tabla A2**) y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. También se incluyeron controles de los cultivos a los no se les añadió el anticuerpo. Posteriormente, se realizó un lavado con 200 µl/pocillo de solución de citometría, se centrifugó y se quitó el sobrenadante mediante la inversión de la placa. Finalmente, se añadieron 300 µl/pocillo de solución de citometría y se conservaron a 4 °C o hielo hasta la lectura de la fluorescencia.

En ambas tinciones para citometría, inmediatamente antes de la lectura, se filtraron las suspensiones celulares con una malla de nylon de 60 µm (Thermo Fisher, 11973466). Se utilizó el citómetro Galios (Beckman Coulter), en el que se registraron 20.000 eventos o 100 segundos. Los datos obtenidos fueron analizados con el software FlowJo (BD Biosciences).

Para el análisis funcional de los hCF, estos se cultivaron a una densidad de 6·10⁴ células/cm² en una placa de 18 pocillos de 0.32 cm² de superficie recubiertos de cristal (Cellvis, C18-1.5H), en medio de cultivo completo FibroGRO-LS con 10 µg/ml o ausencia del factor de crecimiento transformante β (TGF-β) (Gibco, PHG9214) durante 72 horas. Después, las células se fijaron y marcaron por inmunofluorescencia siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.2.3. con los anticuerpos específicos frente a anti-vimentina y anti-α-actina de musculo liso (anti-αSMA) (**Tabla A2**) y sus correspondientes anticuerpos secundarios (**Tabla A3**). En este caso, la inmunofluorescencia fue observada con el microscopio de fluorescencia THUNDER (Leica Microsystems).

5.5. ENSAYO DE ACTIVIDAD METABÓLICA

Los hCF y los hiPSC-CM se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos (Costar, 3596) a una densidad celular de $8.7 \cdot 10^5$ células/cm² y 10^5 células/cm², respectivamente. Los hCF se cultivaron en medio FibroGRO-LS durante 24 horas antes de comenzar el ensayo, mientras que los hiPSC-CM se cultivaron como si se tratase de un pase de expansión previo a un experimento como se explica en el apartado 5.3. A continuación, se realizó la primera medida de actividad metabólica y se procedió a cambiar el medio basal de cada tipo celular por los diferentes medios de cultivo a testar, manteniendo las células en los nuevos medios durante 7 días y refrescando el medio cada 2/3 días. Se realizaron medidas de actividad metabólica con los nuevos medios los días 1, 3 y 7 tras el cambio de medio inicial. Para cada medio y medida se utilizaron 5/6 replicados técnicos.

Los medios a testar consistieron en: medio de cultivo completo FibroGRO-LS, medio de mantenimiento de hiPSC-CM, medio de cultivo ECM™-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 (Lonza, CC-3162), medio de cultivo *Endothelial cell medium* (Innoprot, P60104), mix [FibroGRO-LS: medio de mantenimiento hiPSC-CM:Lonza] en un ratio 1:1:1 y mix [FibroGRO-LS: medio de mantenimiento hiPSC-CM: Innoprot] en un ratio 1:1:1.

Para estudiar la actividad metabólica se realizó un ensayo basado en la reducción de las células del compuesto resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazina-10-io-3-ona) a resorufina, con propiedades fluorescentes. Para ello se añadió a los 100 µl de medio de cada pocillo el reactivo sal sódica de resazurina (Life Technologies, B21187.03) con una concentración final de 44 mM. Además, se incluyeron en cada ensayo controles de cada medio de cultivo sin células con y sin resazurina, para eliminar de los resultados la fluorescencia basal derivada de los medios utilizados y de la resazurina sin reducir. Tras la incubación de 2 horas a 37 °C y 5% de CO₂ se procedió a leer la fluorescencia de los pocillos ($\lambda_{\text{excitación}} = 560$ nm, $\lambda_{\text{emisión}} = 590$ nm y sensibilidad 40) en el lector de placas BioTek Synergy (Agilent).

5.6. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Para el ensayo de proliferación celular se utilizó el cristal violeta compuesto capaz de penetrar en todas las células previamente fijadas, de tal manera que la absorbancia del colorante retenido es proporcional al número total de células. En pocillos de placas de 96 pocillos (Costar, 3596) con los cultivos celulares del día 7 del ensayo de actividad metabólica previamente fijados siguiendo el protocolo descrito en 5.2.3, se retiró el PBS (Labotaq, 85873), se añadieron 50 µl/pocillo de solución cristal violeta (Sigma Aldrich, C0775) al 0.1% en H₂O destilada y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró la solución y se realizaron

3 lavados consecutivos por inmersión en H₂O, cambiando el agua entre los lavados. Se dejó secar el cultivo celular durante la noche a temperatura ambiente. Tras tomar fotografías de los cultivos teñidos con el microscopio óptico Nikon TS2, se lisaron las células añadiendo 200 µl/pocillo de ácido acético 10% (Sigma-Aldrich, AG283) y se midió la absorbancia a 570 nm en el lector de placas BioTek Synergy (Agilent).

5.7. DESARROLLO DEL MODELO DE CORAZÓN-EN-CHIP

Para el desarrollo del modelo de corazón-en-chip se utilizó el dispositivo microfluídico BEGradient, desarrollado por el grupo de investigación TME Lab (Unizar) en colaboración con la empresa BEOnChip. El dispositivo, fabricado en polímero de olefinas cíclicas, consta de una cámara central de 200 µm de ancho y dos canales laterales de 700 µm de ancho y 250 µm de profundidad, presentando los tres elementos una salida a ambos lados para poder introducir soluciones manualmente con una micropipeta. Mediante adhesivo biocompatible, 3 dispositivos se pegan a una placa Petri, para facilitar el manejo y el cultivo en condiciones de esterilidad. Los dispositivos fueron tratados para incrementar sus propiedades hidrofílicas mediante su exposición a plasma de oxígeno (50% oxígeno, 60% potencia) durante 1 minuto. Para garantizar la esterilidad de los mismos, se incubaron posteriormente 30 minutos bajo luz ultravioleta.

Para el cultivo tridimensional en hidrogel de los hiPSC-CM y hCF dentro de los dispositivos BEGradient, ambos tipos celulares se levantaron y resuspendieron en proporción 70:30 (hiPSC-CM:hCF) en medio de cultivo 1/1 (v/v) de medio de mantenimiento hiPSC-CM y medio de cultivo de DMEM mínimo [low glucose DMEM (Gibco, 11880-028) con 2.5 mM Glutamax (Life Technologies, A28139434) y 0.5 ng/ml factor de crecimiento de fibroblastos 2 (Miltenyi Biotec, 130-093-838)]. Esta solución celular se mezcló con una solución de colágeno consistente en colágeno de tipo I de cola de rata (Corning, 354236), NaOH 1N (Sigma-Aldrich, 1310-73-2) y PBS 10X, de forma que la mezcla final contenía $40 \cdot 10^6$ o $60 \cdot 10^6$ células/ml, 2mg/ml de colágeno, 1:40 (v/v) de NaOH 1N con respecto al volumen de colágeno y PBS al 1X. La mezcla final del hidrogel se inyectó en la cámara central del dispositivo, comprobando una distribución homogénea y que no desbordara hacia los canales laterales. Además, para asegurar una distribución celular uniforme dentro de la matriz, una vez inyectados, los dispositivos se incubaron boca abajo durante 5 minutos a temperatura ambiente, 5 minutos boca abajo a 37 °C, 5 minutos boca arriba a 37 °C y 10 minutos boca abajo a 37 °C. Tras la polimerización de los geles de colágeno dentro de los dispositivos, se incorporaron 5 ml/placa Petri de medio de cultivo 1/1 (v/v) de medio de mantenimiento hiPSC-CM y medio de cultivo de DMEM mínimo. Los canales laterales se llenaron mediante la aspiración por las salidas con una micropipeta, de esta misma

manera se renovó el medio de cultivo diariamente. Los microdispositivos se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂.

A días 1, 3 y 6 desde la siembra de los dispositivos, se realizó un ensayo de viabilidad celular basado en la tinción con calceína [metabolizada únicamente por células vivas, generando un compuesto de fluorescencia verde ($\lambda_{\text{excitación}}= 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}}= 515 \text{ nm}$)] y yoduro de propidio [presenta fluorescencia roja ($\lambda_{\text{excitación}}= 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}}= 615 \text{ nm}$) al hibridar con el DNA de células con la membrana permeable, marcando así las células con viabilidad comprometida]. Para este ensayo se retiró el medio de la placa de Petri, se despegaron los dispositivos de la placa y se abrieron, separando las dos piezas que los componen, para dejar expuesto el hidrogel. Posteriormente se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y oscuridad con una solución de 2 $\mu\text{g/ml}$ calceína (Invitrogen, 10696883) y 6 $\mu\text{g/ml}$ yoduro de propidio (Invitrogen, BMS500PI) en PBS (Labotaq, 85873). Pasado el periodo de incubación, se tomaron imágenes con el microscopio de fluorescencia Mica (Leica Microsystems).

5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism. La distribución normal se determinó por el test de Shapiro-Wilk con un $P=0.05$. El umbral de significancia estadística se estableció en $P=0.05$ para el test ANOVA de un factor y el test de Sidak para las comparaciones por parejas. Los resultados se muestran como media \pm desviación típica.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. DISEÑO Y CLONAJE DE LOS shRNAs EN V69

Utilizando herramientas bioinformáticas y la secuencia de *TOP2B*, se obtuvieron secuencias de 4 shRNA-*TOP2B* candidatos. Mediante alineamiento de las secuencias *TOP2B* y *TOP2A*, se comprobó que de una de las cuatro era complementaria a una región de *TOP2B* con completa homología con *TOP2A*, por lo que se descartó. Las otras tres candidatas restantes eran complementarias a fragmentos de *TOP2B* con una homología inferior al 75% con *TOP2A* y sin aparentes efectos fuera de diana predichos (**Figura 4A**). Por lo tanto, estos shRNA son potencialmente específicos para el silenciamiento de la *TOP2B* y se eligieron para el estudio. Además, se diseñó un shRNA con secuencia aleatoria (*scramble*, shRNAscr) sin homología con el genoma humano como control de no inhibición.

En primer lugar, los shRNA se clonaron en un vector de expresión inducible por doxiciclina (V69) corriente abajo a un gen reportero fluorescente tdTomato (tdT) (**Figura 4B**).

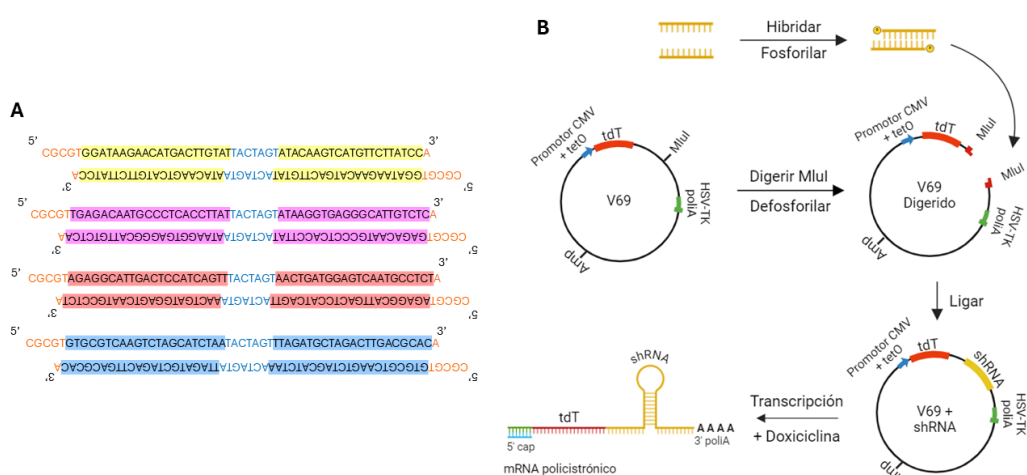


Figura 4. A) Secuencias de los shRNAs seleccionados para su clonaje en el vector V69: shRNA-*TOP2B* 1 (amarillo), shRNA-*TOP2B* 2 (rosa), shRNA-*TOP2B* 3 (rojo), shRNAscr (azul). Con los nucleótidos en naranja se muestran las secuencias correspondientes a los extremos cohesivos de la enzima de restricción *MluI* y en azul el bucle de la horquilla. **B)** Esquema de la estrategia de clonaje. A la izquierda se muestra el esquema del vector V69 utilizado, abajo derecha el esquema de los vectores recombinantes generados y abajo a la izquierda el mRNA policistrónico final expresado bajo inducción con doxiciclina. Creado con BioRender.

Tras la ligación, se transformaron bacterias competentes, obteniéndose colonias resistentes a ampicilina en las cuatro ligaciones (shRNA-*TOP2B* 1-3 y shRNAscr). El cribado por PCR de colonias mostró la amplificación del control interno de PCR de 200 pb en la totalidad de las colonias, y en su mayoría, también se observó la amplificación del fragmento de 330 pb que indica la presencia de la horquilla (**Figura 5A**). Sin embargo, debido a la conformación secundaria estable de los shRNAs, se obtuvieron además artefactos de amplificación probablemente correspondientes a amplicones incompletos.

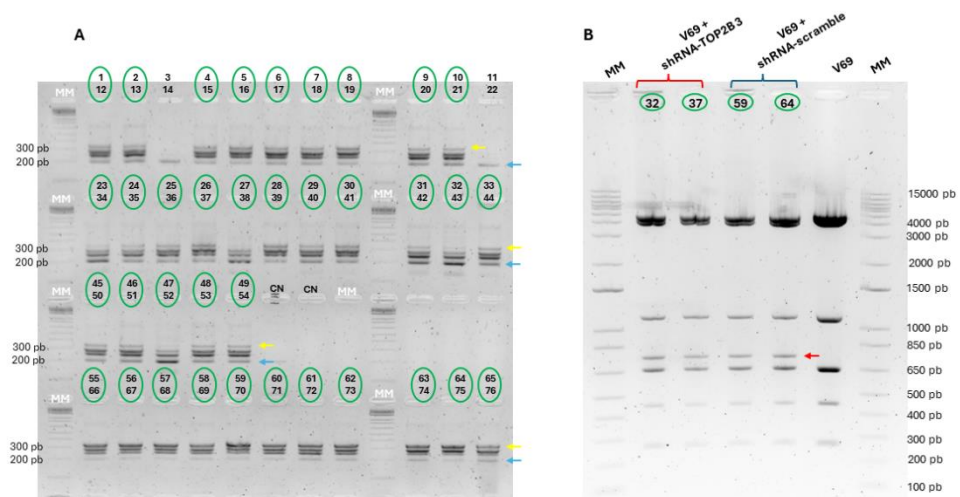


Figura 5. Geles de electroforesis representativos del cribado de colonias resistentes a ampicilina obtenidos tras la ligación del vector V69 con las horquillas shRNA-TOP2B 1, shRNA-TOP2B 2, shRNA-TOP2B 3 y shRNAscr. **A)** PCR de colonias. MM (Marcador de peso molecular 100 pb), CN (Control negativo), flecha azul (banda específica del control interno de amplificación), flecha roja (banda específica de la horquilla), círculo verde (colonias con el vector recombinante). **B)** Digestión enzimática con SpeI y HindIII. MM (marcador de peso molecular 1Kb), flecha roja (banda de 741 pb distintiva entre vector recombinante y original V69).

Los plásmidos de las colonias positivas fueron posteriormente confirmados por digestión enzimática (**Figura 5B**). El patrón de restricción de los vectores recombinantes, que consta de 5 bandas de peso molecular inferiores a 1500 pb (1106 pb, **741 pb**, 655 pb, 438 pb y 250 pb), se observó en todas las colonias analizadas, en comparación con el del vector V69 (1106 pb, 655 pb, 438 pb y 250 pb), carente de la banda de 741 pb. Finalmente, se verificaron los vectores recombinantes por secuenciación de Sanger. De esta forma se consiguieron clonar las cuatro horquillas en el vector de destino, mostrando la alta eficiencia de la estrategia de clonaje.

6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS shRNA-TOP2B

Las células HEK293 se utilizaron para evaluar la actividad RNAi de los shRNA. En primer lugar, se confirmó la expresión de *TOP2A* y *TOP2B* en esta línea celular (**Figura 6**).

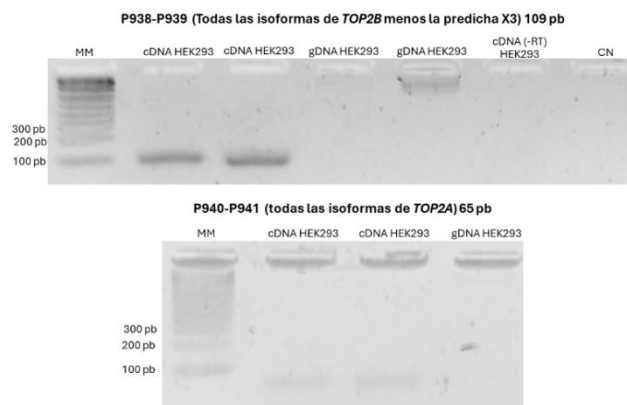


Figura 6. PCR con muestras de DNA complementario (cDNA) y genómico (gDNA) de HEK293. Además, también se incluye un control de cDNA sin retrotranscribir (cDNA(-RT)), un control sin DNA molde (CN) y el marcador de peso molecular (MM).

A continuación, las HEK293 se transfectaron de manera transitoria con los vectores recombinantes confirmados. Como las horquillas se clonaron tras el gen reportero tdT y la expresión de ambos está dirigida por el mismo promotor inducible, la efectividad de la transformación se puede estudiar mediante la expresión de la tdT (**Figura 7**). Tras 72 horas desde la transfección, se observó que la confluencia de los cultivos era cercana al 100% y todos mostraban expresión de tdT, aunque a eficacias bajas, siendo la transfección con el vector recombinante con shRNAscr la más eficaz. De estos cultivos se obtuvo RNA y proteína para cuantificar los niveles de TOP2A y TOP2B a ambos niveles.

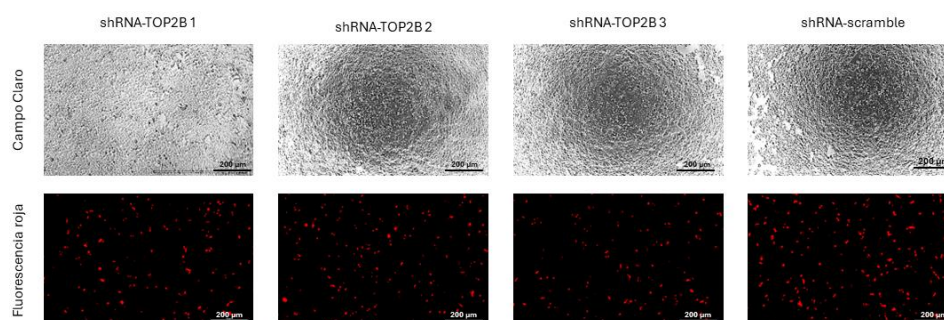


Figura 7. Imágenes de los cultivos de HEK293 inducidos con 2 µg/ml de doxícilina tomadas 72 horas tras su transfección con los vectores de expresión de shRNAs. En la fila superior se muestran las imágenes de campo claro y en la fila inferior las imágenes de fluorescencia roja originada de la tdT. Se tomaron las imágenes en las mismas áreas de los pocillos para que fueran comparables. Barra de escala de 200 µm.

Para cuantificar los niveles de expresión de TOP2 y la eficacia de los shRNAs-TOP2B, se testaron los anticuerpos anti-TOP2A y anti-TOP2B (**Tabla A2**) para la detección de estas proteínas mediante Western blot. Para ello se extrajeron las proteínas totales de las HEK293 transfectadas, se cargaron en un gel de poliacrilamida y se realizó una tinción de proteínas con azul de Coomassie, donde se comprobó que la calidad de los extractos era adecuada al observarse el patrón de bandas definidas de todos los pesos moleculares (**Figura 8A**). Tras la transferencia a las membranas de nitrocelulosa e incubación con los anticuerpos primarios anti-TOP2B y anti-TOP2A en distintas condiciones, no se consiguieron detectar bandas específicas del peso molecular esperado (180 kDa) correspondientes a TOP2A y TOP2B (**Figura 8B**). Estos resultados pueden deberse en parte a la ineficaz transferencia de proteínas de alto peso molecular, ya que mediante la tinción Coomassie en el gel ya transferido se observan las bandas cuyo peso molecular es superior a ~40 kDa (**Figura 8C**), o a la falta de interacción de los anticuerpos con sus antígenos.

Sin embargo, la eficacia de la transferencia de las proteínas de bajo peso molecular se demostró mediante la detección de la proteína P16 (**Figura 8D**). P16 es un marcador de senescencia celular y envejecimiento, aunque también se le atribuyen otras funciones⁸³. El uso de este anticuerpo, además de para confirmar la correcta realización del experimento, resulta

de especial interés en este proyecto para evaluar la posible senescencia celular asociada al daño genómico resultante de inhibir *TOP2B*.

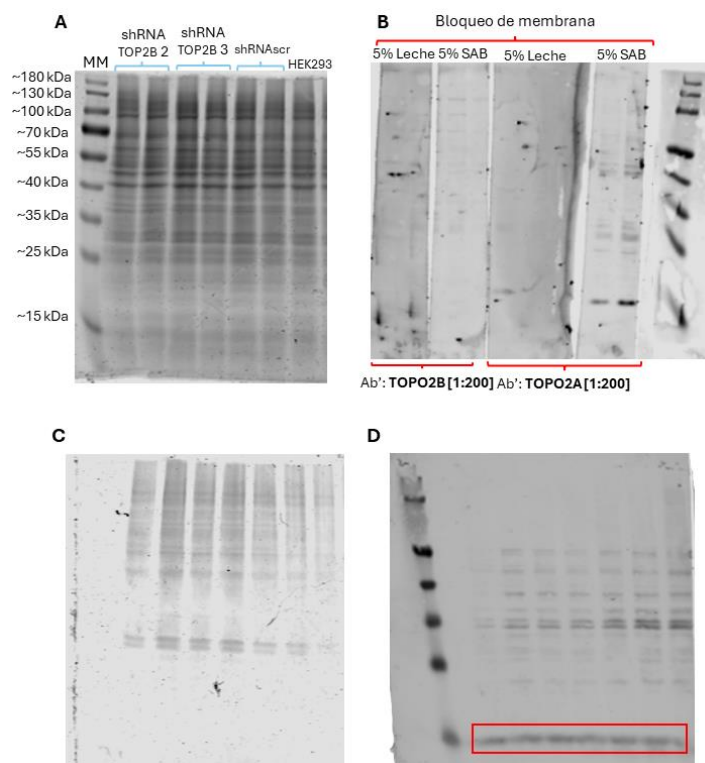


Figura 8. Optimización de la técnica de Western blot para la detección de TOP2A y TOP2B con extractos de proteína purificada a partir de HEK293. **A)** Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida al 8%. Los carriles corresponden al marcador de peso molecular (MM), las transfecciones con los vectores recombinantes V69-shRNA-TOP2B 2, 3 y *scramble* y a las HEK293 sin transfectar, mismas muestras que en el resto de la figura. **B)** Western Blot con anti-TOP2B (dilución 1:200) y anti-TOP2A (dilución 1:200) con bloqueo con 5% de leche desnatada en polvo o 5% de seroalbúmina bovina. **C)** Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida al 8% tras la transferencia de las proteínas. **D)** Western Blot con anti-P16, donde se remarca en rojo la banda específica de 16 kDa.

Por otro lado, los análisis de expresión a nivel de RNA (**Figura 9**) mostraron que los shRNA-TOP2B 1 y 2 aumentan la expresión de la *TOP2A* 1.43 y 1.80 veces respectivamente, mientras que la expresión de *TOP2B* se mantiene en el caso del candidato 1 e incrementa 1.25 veces en el candidato 2. El shRNA-TOP2B 3 es el único que mostró un cierto nivel de inhibición de la expresión, de 0.92 veces para *TOP2A* y 0.87 veces para *TOP2B*, con respecto a la secuencia aleatoria. Por tanto, los resultados preliminares mostraron una inhibición de *TOP2B* ineficiente.

Como los shRNAs tienen una complementariedad del 100% con la secuencia diana, se espera la degradación del mRNA de *TOP2B*. Por tanto, los resultados obtenidos indican o una ausencia de interacción del shRNA con *TOP2B* basada en un procesamiento incorrecto del shRNA por la maquinaria de la célula a partir del mRNA policistrónico, o una transfección insuficiente de los vectores recombinantes que limita la visualización del posible efecto de los shRNAs (**Figura 7**). Futuros estudios irán dirigidos a aclarar esta situación, pero, como los niveles de RNA no son necesariamente representativos de la cantidad de proteína que codifican, se decidió continuar

con la caracterización de la expresión de TOP2B a nivel de proteína mediante inmunofluorescencia, donde también se puede estudiar la eficiencia de la transfección (**Figura 7**).

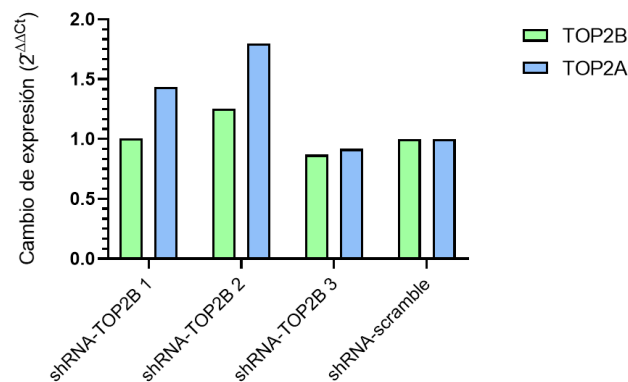


Figura 9. Análisis de la expresión relativa de TOP2B y TOP2A con respecto al shRNA-scramble.

Así, en primer lugar, se evaluó la eficacia de la inducción mediante el estudio de la fluorescencia del reportero tdT en HEK293 transfectadas, ya que solo en el caso de las células inducidas con doxiciclina se observa señal fluorescente (**Figura 10A**). Además, se seleccionó el candidato shRNA-TOP2B 3, al ser el único que mostraba algo de capacidad inhibitoria a nivel de mRNA, para la inmunofluorescencia con el anticuerpo primario anti-TOP2B. Se observó una disminución de la señal fluorescente roja en el caso de las células transfectadas con el vector recombinante con shRNA-TOPB 3 respecto a las transfectadas con el vector recombinante con la horquilla shRNA-scramble (**Figura 10B**).

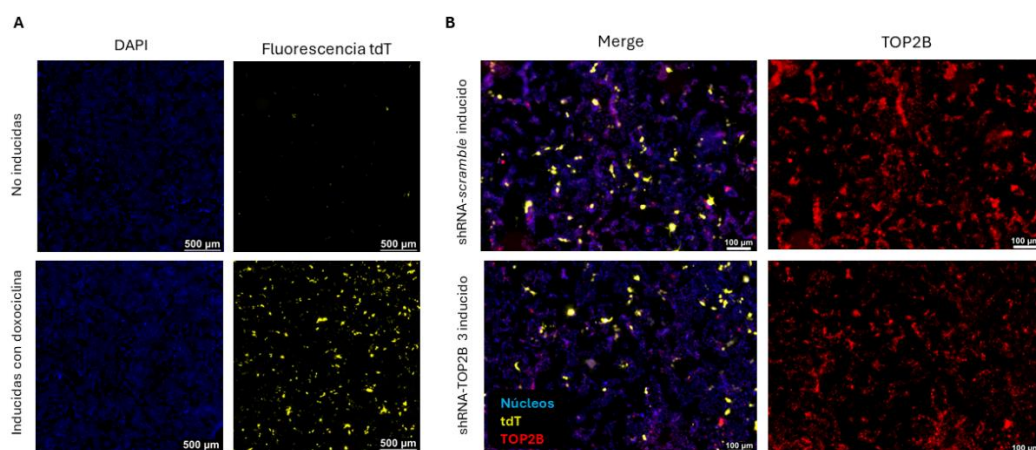


Figura 10. Inmunofluorescencia de las HEK293 transfectadas con el vector recombinante V69-shRNA-TOP2B 3. **A)** Evaluación de la expresión de tdT-shRNAs mediante fluorescencia tdT sin inducción y con inducción con doxiciclina 2 μg/ml durante 72 horas. **B)** Expresión de tdT (señal amarilla) y TOP2B (señal roja) en células transfectadas con vectores de expresión de shRNA (scr o TOP2B 3) con (fila inferior) o sin (fila superior) inducción con doxiciclina 2 μg/ml durante 72 horas. Contraste nuclear (DAPI), barra de escala 500 μm.

Por lo tanto, aunque hasta ahora son resultados preliminares basados en un único experimento de transfección, parece que el candidato shRNA-TOP2B 3 es el único que muestra cierta inhibición de la expresión de *TOP2B* a nivel de mRNA, que se ve reflejado así mismo, en una disminución de la expresión de la proteína más aparente que el cambio observado a nivel de RNA. La discrepancia entre los niveles de RNA y proteína para la TOP2B podría deberse a multitud de mecanismos regulatorios post-transcripcionales y post-traduccionales. Estudios futuros más amplios determinarán el grado de inhibición conseguido por este shRNA.

6.3. CARACTERIZACIÓN DE hiPSC-CM

Para la caracterización de la población de cardiomiocitos diferenciados a partir de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC-CM), se realizó citometría de flujo para la troponina II humana (TNNT2) el último día del protocolo de diferenciación (día 13) y el último día de la primera expansión (día 20) (**Figura 11**). La TNNT2 es un marcador específico del linaje celular de los cardiomiocitos y, además, es esencial para la contracción cardíaca.

De la población seleccionada para el estudio, un 70.2% fue positiva para TNNT2 en el día 13, el 29.8% de las células restantes pueden ser subpoblaciones celulares menos diferenciadas u otros linajes celulares. El porcentaje de células TNNT2 positiva tras la primera expansión aumentó significativamente al 98.2% (**Figura 11**).

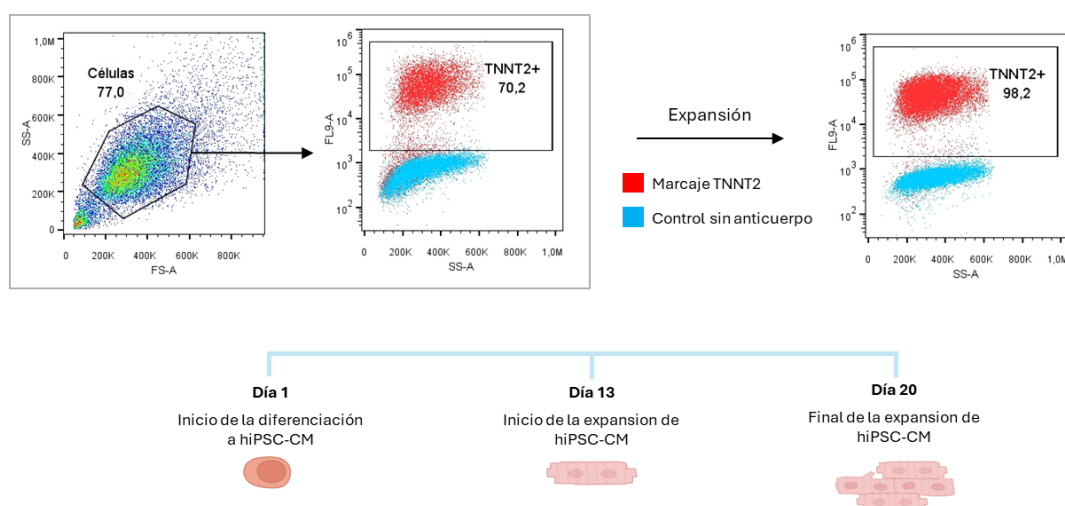


Figura 11. Inmunofenotipado de la progenie de cardiomiocitos derivados de iPSC marcados con anti-TNNT2 humana por citometría de flujo. En la gráfica de la izquierda se muestra la población seleccionada para el análisis según su tamaño y complejidad. La segunda gráfica muestra el marcaje de la TNNT2 de la población en día 13 de diferenciación de iPSC a iPSC-CM y la de la derecha en día 20, correspondiente al último día de la primera expansión. Abajo se muestra una línea del tiempo con los hitos principales en el protocolo de obtención de los hiPSC-CM. SS-A (área del láser lateral), FS-A (área del láser frontal) y FL9-A (área del canal de fluorescencia 9).

Los resultados obtenidos, sugieren que el protocolo de expansión favorece la selección o proliferación de los hiPSC-CM, lo que concuerda con la biobibliografía consultada, gracias a la adaptación de las condiciones de cultivo que favorecen el fenotipo de CM, como el recubrimiento con matrices celulares artificiales, la estandarización de la densidad celular, y el uso de medio de cultivo sin suero ⁸². De esta manera, el alto porcentaje de células TNNT2 positivas es un resultado óptimo para confirmar que las células obtenidas pertenecen a un linaje homogéneo con el que construir el modelo de corazón-en-chip.

6.4. CARACTERIZACIÓN DE hCF

Para la caracterización de los fibroblastos cardíacos humanos (hCF) se realizó citometría para CD90 y CD140 α . CD90 es una glicoproteína de membrana que se utiliza frecuentemente como marcador general de fibroblastos al expresarse en los fibroblastos, células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, neuronas y células endoteliales activadas en humanos ⁸⁴. CD140 α , conocido generalmente como receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas, es un marcador específico de los fibroblastos cardíacos al ser únicamente expresado por estos ⁸⁵.

Primero se seleccionó la población a analizar por su tamaño y complejidad celular, donde se observó heterogeneidad en la granularidad interna de las células. El 97.2% de las células fueron positivas para CD90, diferenciándose claramente dos poblaciones y confirmando que aproximadamente la totalidad de la población celular son fibroblastos. Sin embargo, solo el 0.27% expresaron CD140 α (**Figura 12**). Según bibliografía consultada, aunque solo los CF expresan CD140 α , no todas las poblaciones de estos lo presentan. La gran heterogeneidad de los fibroblastos dificulta su caracterización, ya que pueden provenir de múltiples progenitores ⁸⁶. Además, los cultivos celulares primarios pierden frecuentemente su fenotipo celular al carecer de los estímulos intercelulares y topográficos propios del tejido original.

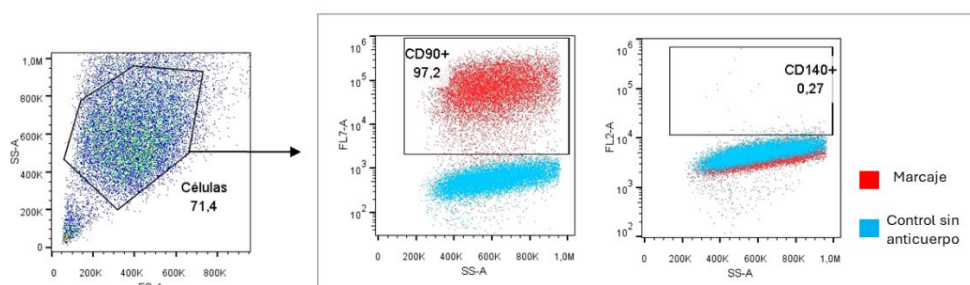


Figura 12. Citometría de hCF para el marcaje de CD90 (gráfica central) y CD140 α (Gráfica derecha). En la gráfica de la izquierda se muestra la población seleccionada para el análisis según su tamaño y complejidad. SS-A (área del láser lateral), FS-A (área del láser frontal), FL7-A (área del canal de fluorescencia 7) y FL2-A (área del canal de fluorescencia 2)

La expresión de marcadores de hCF analizada por citometría se complementó con un análisis funcional de su capacidad de activación a miofibroblastos en respuesta al **factor de crecimiento transformante β** (TGF- β), inductor de este cambio ⁸⁷. Los miofibroblastos tienen un tamaño significativamente mayor y expresan **α -actina de músculo liso (α SMA)**, marcador de activación a miofibroblastos, aunque también es expresado por las células del músculo liso ⁸⁸. En la inmunofluorescencia se marcó con **vimentina**, una proteína de los filamentos intermedios, que se considera un marcador genérico de fibroblastos y otros tipos celulares, como por ejemplo, del linaje endotelial ⁸⁹.

En el caso de los hCF cultivados en condiciones basales, se observó una morfología generalizada estrecha y alargada, con el citoplasma marcado completamente con vimentina, salvo alguna célula esporádica que presentaba el fenotipo característico de los miofibroblastos (**Figura 13A**). En cambio, en los hCF tratados con TGF- β aumentó significativamente el número de células α SMA⁺ y con una marcada hipertrofia celular (**Figura 13B**). Sin embargo, la activación no fue homogénea a diferencia del marcaje con vimentina, por lo que queda por determinar si incubaciones más prolongadas con TGF- β pueden conducir a una activación total como cabría esperar.

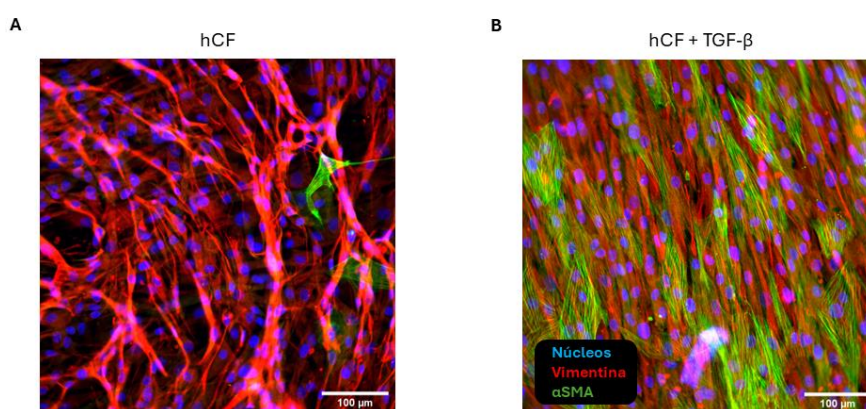


Figura 13. Inmunofluorescencia de fibroblastos cardiacos primarios cultivados en condiciones basales (**A**) y en presencia de TGF- β (**B**). Marcaje nuclear (azul), con vimentina (rojo) y α SMA (verde). Barra de escala de 100 μ m.

Con estos resultados, se confirma el linaje celular de fibroblasto inactivo de la población de hCF primarios con la que se está trabajando. Esto resulta de especial interés para el estudio de patología cardiacas con procesos inflamatorios y participación de estrés mecánico. Por ejemplo, uno de los hitos principales en la **isquemia cardiaca** es el reclutamiento de fibroblastos en el tejido dañado, los cuales se activan a miofibroblastos por la presencia de señales inflamatorias, fibróticas y mecánicas. Los miofibroblastos producen más matriz extracelular, derivando fibrosis caracterizada por un aumento en la rigidez del tejido, lo que altera finalmente

la capacidad contráctil cardíaca ⁹⁰. Por tanto, un modelo de corazón-en-chip con hCF con capacidad de activación a mioblastos sería ideal para modelizar el infarto de miocardio, una patología de gran interés social en nuestra sociedad.

6.5. ESTUDIO DE MEDIOS PARA EL CO-CULTIVO

Con el objetivo de seleccionar el mejor medio para el co-cultivo de cardiomiocitos inducidos (hiPSC-CM), fibroblastos cardíacos (hCF) y células endoteliales (EC) en el modelo de microfluídica corazón-en-chip, se estudió la actividad metabólica y proliferación celular de los hiPSC-CM y hCF en el medio basal de los hiPSC-CM, hCF y dos medios de EC, así como las dos mezclas de los tres medios basales de cada tipo celular. El ensayo con resazurina mide la actividad metabólica de las células, que se puede alterar dependiendo de factores ambientales y la actividad proliferativa. En cambio, con la tinción con cristal violeta se obtienen datos de la cantidad total de células en un determinado momento. Como los tipos celulares del ensayo son adherentes, la población teñida con cristal violeta corresponde con las células vivas, informando sobre la proliferación celular.

En el caso de los hCF, la actividad metabólica disminuyó en el primer día de incubación con los medios de estudio, y posteriormente aumentó significativamente hasta el final del ensayo (**Figura 14A**), a excepción del medio de mantenimiento de hiPSC-CM, que carece de suero, por lo que no hay factores suficientes para promover una actividad metabólica elevada. Al comparar la actividad metabólica de los hCF en los distintos medios a día 7 (**Figura 14B**), se observó que las actividades metabólicas mayores se registraban con los medios de cultivos de las EC, seguidas de las correspondientes a las mezclas de medios. Tanto en el caso de los medios de las EC como de las mezclas de medios, el uso del medio de EC de Lonza se tradujo en una actividad metabólica significativamente mayor que su contraparte de Innoprot. Respecto a la proliferación celular (**Figura 14C**), se observó la misma tendencia a nivel global que con la actividad metabólica, sin embargo, en este ensayo no hay diferencias significativas entre los medios de EC y sus mezclas. Es decir, en los medios de las EC la actividad metabólica se ve incrementada mientras que la cantidad de las células se mantiene respecto a las mezclas de medios, por tanto, el aumento de la actividad no se debe a un aumento de la proliferación, sino que las células están más activas.

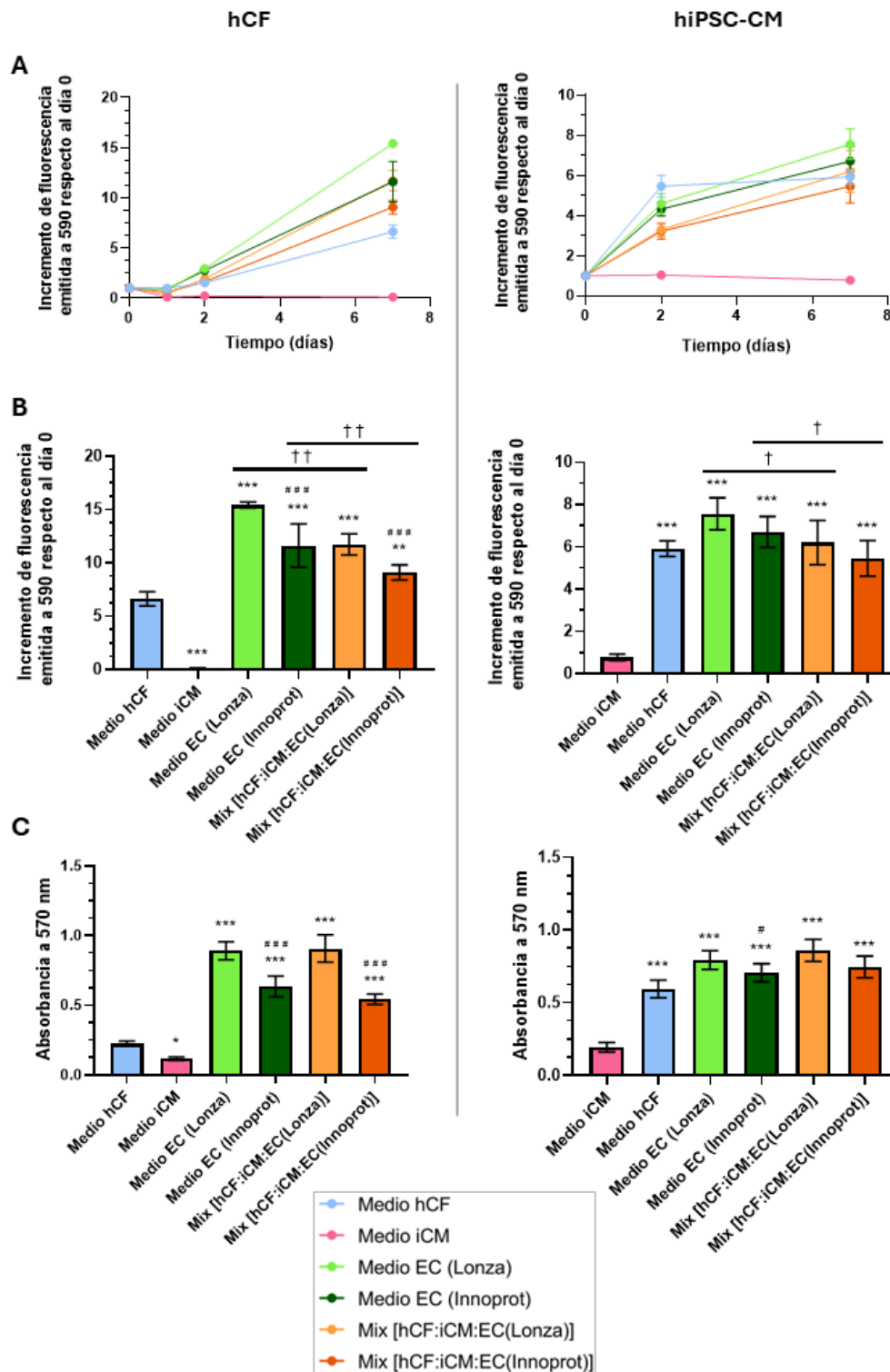


Figura 14. A) Representación de la actividad metabólica durante el ensayo mediante el incremento de fluorescencia emitida a 590 respecto al día 0 en los diferentes medios de cultivo. **B)** Representación gráfica de la actividad metabólica en el día 7 mediante el incremento de fluorescencia emitida a 590 respecto al control del día cero. **C)** Representación de la proliferación celular mediante la absorbancia a 570 nm en el día 7 desde el cambio de medios de cultivo. Las gráficas de la izquierda corresponden a los hCF y los de la derecha a los hiPSC-CM. Las barras representan la media con la desviación estándar. Todos los conjuntos de datos muestran una distribución Gaussiana. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ y ***: $P < 0.001$ comparado con el medio basal de cada tipo celular. #: $P < 0.05$ y # #: $P < 0.001$ comparado con el medio EC Lonza con Innoprot. †: $P < 0.05$, ††: $P < 0.01$ comparando los medios EC basales con el mix con el respectivo medio EC.

La actividad metabólica de los hiPSC-CM a lo largo del ensayo (**Figura 14A**) fue menor en su medio basal respecto al resto de medios estudiados y las tendencias globales variaron respecto a las observadas en los hCF. La actividad sufrió un rápido incremento hasta el día 2, a partir del cual el incremento fue más gradual. De hecho, en el caso del medio basal de los hiPSC-CM y hCF, la actividad a partir del día 2 se mantuvo prácticamente constante. Analizando las actividades metabólicas a día 7 (**Figura 14B**), la tendencia global fue la misma que la de los hCF, siendo la actividad mayor en los medios de EC, seguido de las mezclas y del medio basal de hCF. En este caso no hubo diferencias significativas entre los efectos de los dos medios de EC y entre las dos mezclas, aunque sí que hay entre los medios de EC y sus mixes correspondientes, con un nivel de significancia bajo. En cuanto a la proliferación, las hiPSC-CM presentaron mayor número de células totales en la mezcla con el medio EC Lonza, aunque los valores obtenidos en los medios de EC basales y sus mezclas respectivas fueron prácticamente iguales (**Figura 14C**).

Para ambos tipos celulares cabe mencionar que ninguno de los medios testados muestra citotoxicidad. En este ensayo es importante conocer que una mayor actividad metabólica y proliferación no significan mejores condiciones para el cultivo del tipo celular. Por ejemplo, la actividad metabólica es esencial y se ve incrementada con la proliferación, tal y como se observa en los hCF. Sin embargo, la exposición a estrés también conlleva un aumento de la actividad metabólica⁹¹. Un incremento de viabilidad en hiPSC-CM inducido por los medios se traduce en un aumento de la proliferación y esto es indeseable puesto que los CM maduros carecen de capacidad proliferativa. Los medios basales de hiPSC-CM no tienen suero, consiguiendo una proliferación basal baja, sin embargo, en cultivo con el resto de medios ricos en micronutrientes y factores de crecimiento, aumenta significativamente. Esto demuestra que la población de hiPSC-CM no tiene un fenotipo maduro y mantiene cierta plasticidad modulada por la variación de componentes en el medio de cultivo. Estas diferencias entre medios y densidades celulares se pudieron observar con microscopía (**Figura A1**), donde la densidad era mínima en el medio de las hiPSC-CM, seguida por el medio de los hCF y con una muy alta densidad en el resto de los medios. Por otro lado, el aumento de proliferación observado en los distintos medios podría deberse a la estimulación del crecimiento de tipos celulares presentes entre la progenie de hiPSC-CM con ventaja proliferativa sobre los CM. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo una caracterización fenotípica de los cultivos obtenidos en presencia de los distintos medios para determinar su efecto.

En resumen, y a falta de llevar a cabo la caracterización fenotípica mencionada, parece que el medio basal de hCF o la mezcla de medios con el medio de EC Innoprot son los mejores candidatos para el co-cultivo de estos dos tipos celulares cardiacos ya que en estos medios se

exhiben la actividad metabólica y viabilidad más parecidas a las obtenidas con los medios propios de los distintos tipos celulares.

6.6. DESARROLLO DEL CORAZÓN-EN-CHIP

Para modelar el tejido cardíaco lo ideal sería generar un modelo que incluya un cultivo tridimensional de hiPSC-CM y hCF en la cámara central, con una barrera compuesta por EC en los laterales. Con este objetivo se han incluido los medios de cultivos de los tres tipos celulares en el ensayo de medios anterior. De manera paralela a dicho ensayo, y como primer paso hacia la generación del corazón-en-chip, se embebieron hCF e hiPSC-CM en un hidrogel tridimensional de colágeno confinado en la cámara central del dispositivo de microfluídica BEGradient, utilizando como medio de cultivo una mezcla [1:1] de los medios basales de los dos tipos celulares utilizados. Esta decisión se tomó en base a que el 70% de las células sembradas son hiPSC-CM, las cuales se ven altamente alteradas por los factores tróficos de los distintos medios diferentes al suyo basal, por lo que se optó por una mezcla donde la cantidad de suero no sea tan superior a la basal del medio de hiPSC-CM, pero tenga la suficiente para garantizar la supervivencia de los hCF.

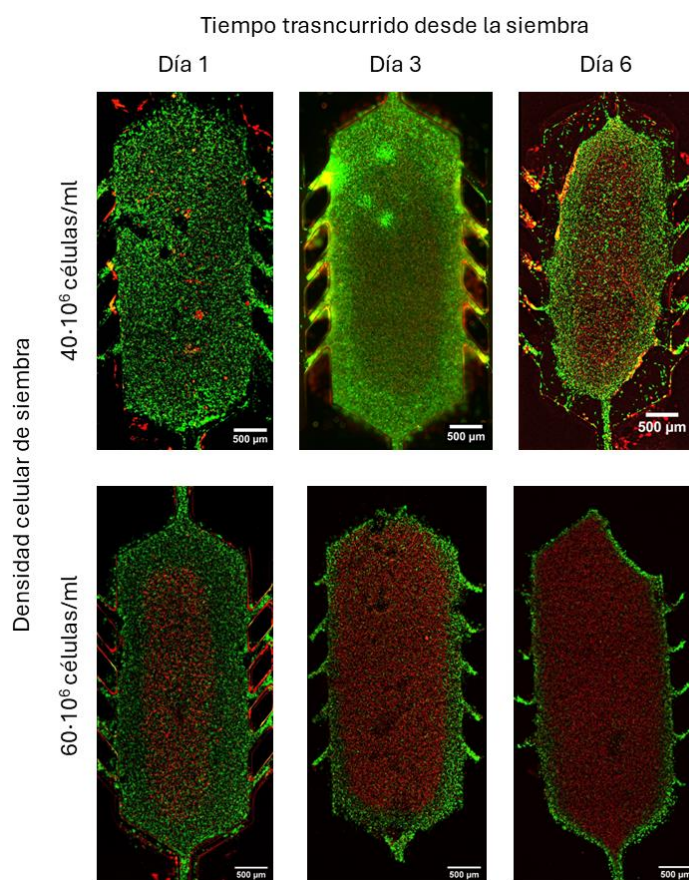


Figura 15. Evolución del cultivo celular tridimensional de hiPSC-CM:hCF [70:30] en el dispositivo BEGradient mediante imágenes de microscopía fluorescente. Las células vivas se tiñeron con calceína (verde) y las células muertas con yoduro de propidio (rojo). Barra de escala de 500 μm .

Se estudió la evolución de la viabilidad celular dentro del dispositivo BEGradient mediante tinción fluorescente con calceína y yoduro de propidio a diferentes tiempos desde la siembra, partiendo de dos densidades celulares iniciales distintas (**Figura 15**). En el caso de la densidad de siembra menor, se observó que en el primer día la mayoría de las células estaban vivas, comenzando a distinguirse en el día 3 una población necrótica central, que se definía claramente a día 6. Sin embargo, al aumentar la densidad inicial se observó el primer día un centro necrótico de tamaño similar al día 6 anterior. La población de células muertas se fue expandiendo a lo largo del tiempo, hasta cubrir la totalidad del cultivo a día 3, a excepción de los bordes.

Este ensayo muestra que, al incrementar el tiempo de cultivo o la densidad celular de siembra, se forma un centro necrótico que se expande con el paso del tiempo, debido probablemente a la limitación de difusión del medio de cultivo y al consumo de nutrientes y oxígeno por las células de la periferia. En vista de estos resultados, para modelizar el tejido cardíaco para la cardiotoxicidad inducida por quimioterápicos, se plantea trabajar a tiempos cortos o reducir la densidad celular de siembra para permitir una mayor difusión de los nutrientes desde los canales laterales y mantener durante más tiempo las características originales del cultivo. Por otro lado, el uso de densidades de siembra elevadas que resulte en la generación de una región central sin nutrientes y oxígeno es interesante para la modelización del tejido cardíaco en situaciones patológicas como la isquemia, donde se utiliza ampliamente la limitación de dichos recursos para recrear los episodios de estrés cardíaco ⁹².

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se han diseñado, clonado y caracterizado tres candidatos de shRNA-TOP2B para estudiar el silenciamiento transitorio de *TOP2B*. Además, se han caracterizado hiPSC-CM y hCF, se ha determinado el mejor medio de co-cultivo de hiPSC-CM, hCF y EC y se ha iniciado el desarrollo del modelo de corazón-en-chip. Las conclusiones de los resultados obtenidos se enumeran a continuación:

- Se han diseñado y clonado exitosamente **shRNA anti-TOP2B** en un vector de expresión inducible funcional.
- En resultados preliminares, se observa que el candidato **shRNA-TOP2B 3** muestra un grado de **inhibición muy limitado de la expresión TOP2B** a nivel de mRNA, que es más acusado a nivel de proteína. Se requiere una mayor caracterización y optimización del diseño de los shRNA-TOP2B para conseguir una mayor eficiencia del silenciamiento y especificidad de inhibición de *TOP2B* sin alterar la expresión de *TOP2A*.
- La diferenciación de hiPSC a CM resulta en una **población homogénea de cardiomiocitos TNNT2⁺**. Aunque, mediante su cultivo en presencia de suero, se ha demostrado que tiene alta capacidad proliferativa, característica de un **fenotipo inmaduro**.
- Se ha confirmado el **fenotipo y funcionalidad del cultivo primario de hCF**.
- El **medio de cultivo** influye significativamente en la actividad metabólica y proliferación celular de los **hCF y hiPSC-CM**, pero se han identificado dos medios que las mantienen en comparación con sus respectivos medios basales.
- Se han iniciado los primeros pasos para la puesta a punto de un **modelo de corazón-en-chip** en el dispositivo de microfluídica BEGradient con hCF y hiPSC-CM embebidos en colágeno para su uso como modelo de CIQ.

8. REFERENCIAS

1. World Heart Federation. About the World Heart Federation. <https://world-heart-federation.org/about-whf/> (2024).
2. World Health Organization: WHO. Enfermedades cardiovasculares. https://www.who.int/es/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1 (2019).
3. Ferlay J, E. M. L. F. L. M. C. M. M. L. P. M. Z. A. S. I. B. F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. <https://gco.iarc.who.int/today> (2024).
4. World Health Organization. Cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (2022).
5. Madonna, R. Early Diagnosis and Prediction of Anticancer Drug-induced Cardiotoxicity: From Cardiac Imaging to “Omics” Technologies. *Revista Espanola de Cardiologia* vol. 70 576–582 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2016.12.032> (2017).
6. Lipshultz, S. E. *et al.* Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **23**, 2629–2636 (2005).
7. Kalyanaraman, B. Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: Have we been barking up the wrong tree? *Redox Biology* vol. 29 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101394> (2020).
8. Zhang, S. *et al.* Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* **18**, 1639–1642 (2012).
9. Veronese, P. *et al.* Effects of anthracycline, cyclophosphamide and taxane chemotherapy on QTc measurements in patients with breast cancer. *PLoS One* **13**, (2018).
10. Sumners, J. E., Johnson, W. W. & Ainger, L. E. *Childhood Leukemic Heart Disease A Study of 116 Hearts of Children Dying of Leukemia*. <http://ahajournals.org>.
11. Bates, D. A. & Winterbourn, C. C. Deoxyribose breakdown by the adriamycin semiquinone and H_2O_2 : evidence for hydroxyl radical participation. *FEBS Lett* **145**, 137–142 (1982).
12. Lebrecht, D., Kokkari, A., Ketelsen, U.-P., Setzer, B. & Walker, U. A. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J Pathol* **207**, 436–444 (2005).
13. Vejpongsa, P. & Yeh, E. T. H. Topoisomerase 2 β : A promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* **95**, 45–52 (2014).
14. Yi, L. L. *et al.* Topoisomerase II β -mediated DNA double-strand breaks: Implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res* **67**, 8839–8846 (2007).
15. Tan, K. B. *et al.* Topoisomerase II alpha and topoisomerase II beta genes: characterization and mapping to human chromosomes 17 and 3, respectively. *Cancer Res* **52**, 231–4 (1992).

16. Austin, C. A., Sng, J.-H., Patel, S. & Fisher, L. M. Novel HeLa topoisomerase II is the II β isoform: complete coding sequence and homology with other type II topoisomerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1172**, 283–291 (1993).
17. Capranico, G., Tinelli, S., Austin, C. A., Fisher, M. L. & Zunino, F. *Different Patterns of Gene Expression of Topoisomerase II Isoforms in Differentiated Tissues during Murine Development*. *Biochimica et Biophysica Acta* vol. 1132 (1992).
18. Wang, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 3 430–440 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm831> (2002).
19. Xia Yang, Wei Li, Elizabeth D. Prescott, Steven J. Burden & James C. Wang. DNA Topoisomerase IIB and Neural Development. *Science* (1979) **287**, 131–134 (2000).
20. Harake, D., Franco, V. I., Henkel, J. M., Miller, T. L. & Lipshultz, S. E. Cardiotoxicity in childhood cancer survivors: Strategies for prevention and management. *Future Cardiology* vol. 8 647–670 Preprint at <https://doi.org/10.2217/fca.12.44> (2012).
21. Di, W. *et al.* PGC-1: The Energetic Regulator in Cardiac Metabolism. *Curr Issues Mol Biol* 29–46 (2018) doi:10.21775/cimb.028.029.
22. Bossaert, M. *et al.* Transcription-associated topoisomerase 2 α (TOP2A) activity is a major effector of cytotoxicity induced by G-quadruplex ligands. *Elife* **10**, (2021).
23. Sun, Y. *et al.* A conserved SUMO pathway repairs topoisomerase DNA-protein cross-links by engaging ubiquitin-mediated proteasomal degradation. *Sci Adv* **6**, (2020).
24. Sun, L. *et al.* Smart nanoparticles for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther* **8**, 418 (2023).
25. Research CFBEA & U.S. Food And Drug Administration. What is Gene Therapy? <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy#:~:text=Gene%20therapy%20is%20a%20technique,that%20is%20not%20functioning%20properly> (2018).
26. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
27. Alsing, S. *et al.* VEGFA-targeting miR-agshRNAs combine efficacy with specificity and safety for retinal gene therapy. *Mol Ther Nucleic Acids* **28**, 58–76 (2022).
28. Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J. & Conklin, D. S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16**, 948–958 (2002).
29. Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F. & Hannon, G. J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231–235 (2004).
30. Jonas, S. & Izaurralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* **16**, 421–433 (2015).

31. Nissen SE, Wolski K, Balog C, jfdk & fkd. Single ascending dose study of a short interfering RNA targeting lipoprotein(a) production in individuals with elevated plasma lipoprotein(a) levels. *JAMA* (2022) doi:10.1001/jama. 2022.5050.
32. Adams, D. *et al.* Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *New England Journal of Medicine* **379**, 11–21 (2018).
33. Kaminski, P., Hong, S., Kono, T., Hoover, P. & Laimins, L. Topoisomerase 2 β induces dna breaks to regulate human papillomavirus replication. *mBio* **12**, 1–11 (2021).
34. Lavery, H. G. *et al.* How can we improve our understanding of cardiovascular safety liabilities to develop safer medicines? *British Journal of Pharmacology* vol. 163 675–693 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01255.x> (2011).
35. Olson, H. *et al.* Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **32**, 56–67 (2000).
36. Eder, A., Vollert, I., Hansen, A. & Eschenhagen, T. Human engineered heart tissue as a model system for drug testing. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 96 214–224 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.010> (2016).
37. Wang, B. X., Kit-Anan, W. & Terracciano, C. M. N. Many cells make life work—multicellularity in stem cell-based cardiac disease modelling. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms19113361> (2018).
38. Zhou, P. & Pu, W. T. Recounting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* **118**, 368–370 (2016).
39. Dorn, G. W. & Force, T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 527–537 (2005).
40. Pinto, A. R. *et al.* Revisiting cardiac cellular composition. *Circ Res* **118**, 400–409 (2016).
41. Christopher Kane, M. P. & *Cesare M. Terracciano, M. P. Human Cardiac Fibroblasts Engage the Sarcoplasmic Reticulum in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Excitation–Contraction Coupling. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 72 1060–1061 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.06.027> (2018).
42. Fan, D., Takawale, A., Lee, J. & Kassiri, Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, 15 (2012).
43. Tulloch, N. L. *et al.* Growth of engineered human myocardium with mechanical loading and vascular coculture. *Circ Res* **109**, 47–59 (2011).
44. Endemann, D. H. & Schiffrin, E. L. Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology* vol. 15 1983–1992 Preprint at <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000132474.50966.DA> (2004).
45. Hsieh, P. C. H., Davis, M. E., Lisowski, L. K. & Lee, R. T. Endothelial-cardiomyocyte interactions in cardiac development and repair. *Annual Review of Physiology* vol. 68 51–66 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.124629> (2006).
46. Wang, W. E. *et al.* Dedifferentiation, proliferation, and redifferentiation of adult mammalian cardiomyocytes after ischemic injury. *Circulation* **136**, 834–848 (2017).

47. Zhang, Y. *et al.* Dedifferentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes. *PLoS One* **5**, 1–13 (2010).
48. European Commission. *REPORT FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL 2019 Report on the Statistics on the Use of Animals for Scientific Purposes in the Member States of the European Union in 2015-2017*. (2019).
49. Schuleri, K. H. *et al.* Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J* **30**, 2722–2732 (2009).
50. Balcombe, J. P., Barnard, N. D. & Sandusky, C. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci* **43**, 42–51 (2004).
51. Lu, X., Lu, L., Gao, L., Wang, Y. & Wang, W. Calycosin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via autophagy regulation in zebrafish models. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **137**, (2021).
52. Christiansen, S., Perez-Bouza, A., Schälte, G., Hilgers, R. D. & Autschbach, R. Selective Left Ventricular Adriamycin-Induced Cardiomyopathy in the Pig. *Journal of Heart and Lung Transplantation* **27**, 86–92 (2008).
53. Birgersdotter, A., Sandberg, R. & Ernberg, I. Gene expression perturbation in vitro - A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in Cancer Biology* vol. 15 405–412 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.06.009> (2005).
54. Kilian, K. A., Bugarija, B., Lahn, B. T. & Mrksich, M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4872–4877 (2010).
55. Breslin, S. & O'Driscoll, L. Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today* vol. 18 240–249 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003> (2013).
56. Graham, E. L. *et al.* Isolation, culture, and functional characterization of adult mouse cardiomyocytes. *Journal of Visualized Experiments* (2013) doi:10.3791/50289.
57. Dimitrakis, P., Romay-Ogando, M.-I., Timolati, F., Suter, T. M. & Zuppinger, C. Effects of doxorubicin cancer therapy on autophagy and the ubiquitin-proteasome system in long-term cultured adult rat cardiomyocytes. *Cell Tissue Res* **350**, 361–372 (2012).
58. Atwal, M. *et al.* Intercalating TOP2 Poisons Attenuate Topoisomerase Action at Higher Concentrations. *Mol Pharmacol* **96**, 475–484 (2019).
59. Russell & Burch. *The Principles of Human Experimental Technique*. (1959).
60. Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
61. Prondzynski, M. *et al.* Disease modeling of a mutation in α -actinin 2 guides clinical therapy in hypertrophic cardiomyopathy. *EMBO Mol Med* **11**, (2019).
62. Yang, X., Pabon, L. & Murry, C. E. Engineering Adolescence. *Circ Res* **114**, 511–523 (2014).

63. Zhang, H. *et al.* Generation of Quiescent Cardiac Fibroblasts From Human Induced Pluripotent Stem Cells for In Vitro Modeling of Cardiac Fibrosis. *Circ Res* **125**, 552–566 (2019).
64. Zhang, J. *et al.* Functional cardiac fibroblasts derived from human pluripotent stem cells via second heart field progenitors. *Nat Commun* **10**, 2238 (2019).
65. Cochrane, A. *et al.* Advanced in vitro models of vascular biology: Human induced pluripotent stem cells and organ-on-chip technology. *Adv Drug Deliv Rev* **140**, 68–77 (2019).
66. Bissell, M. J., Radisky, D. C., Rizki, A., Weaver, V. M. & Petersen, O. W. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* **70**, 537–546 (2002).
67. O'Brien, L. E., Zegers, M. M. P. & Mostov, K. E. Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 531–537 (2002).
68. Wang, P.-Y., Yu, J., Lin, J.-H. & Tsai, W.-B. Modulation of alignment, elongation and contraction of cardiomyocytes through a combination of nanotopography and rigidity of substrates. *Acta Biomater* **7**, 3285–3293 (2011).
69. Herron, T. J. *et al.* Extracellular Matrix–Mediated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiac Monolayer Structure and Electrophysiological Function. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **9**, (2016).
70. Ryu, N.-E., Lee, S.-H. & Park, H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells* **8**, 1620 (2019).
71. Ronaldson-Bouchard, K. *et al.* Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature* **556**, 239–243 (2018).
72. LaBarge, W. *et al.* Correction: Maturation of three-dimensional, hiPSC-derived cardiomyocyte spheroids utilizing cyclic, uniaxial stretch and electrical stimulation. *PLoS One* **14**, e0223424 (2019).
73. Agarwal, A., Goss, J. A., Cho, A., McCain, M. L. & Parker, K. K. Microfluidic heart on a chip for higher throughput pharmacological studies. *Lab Chip* **13**, 3599 (2013).
74. Halaidych, O. V. *et al.* Inflammatory Responses and Barrier Function of Endothelial Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* **10**, 1642–1656 (2018).
75. Liu, Y. *et al.* Development of a human heart-on-a-chip model using induced pluripotent stem cells, fibroblasts and endothelial cells. doi:10.1101/2023.12.06.569751.
76. Lee, J. *et al.* A Heart-Breast Cancer-on-a-Chip Platform for Disease Modeling and Monitoring of Cardiotoxicity Induced by Cancer Chemotherapy. *Small* **17**, (2021).
77. Mozneb, M. *et al.* Multi-lineage heart-chip models drug cardiotoxicity and enhances maturation of human stem cell-derived cardiovascular cells. *Lab Chip* **24**, 869–881 (2024).

78. Boratyn, G. M., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Busby, B. & Madden, T. L. Magic-BLAST, an accurate RNA-seq aligner for long and short reads. *BMC Bioinformatics* **20**, 405 (2019).
79. Frank, S. B., Schulz, V. V. & Miranti, C. K. A streamlined method for the design and cloning of shRNAs into an optimized Dox-inducible lentiviral vector. *BMC Biotechnol* **17**, (2017).
80. Moore, C. B., Guthrie, E. H., Huang, M. T. H. & Taxman, D. J. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol* **629**, 141–158 (2010).
81. Bao, X. *et al.* Directed differentiation and long-term maintenance of epicardial cells derived from human pluripotent stem cells under fully defined conditions. *Nat Protoc* **12**, 1890–1900 (2017).
82. Maas, R. G. C. *et al.* Massive expansion and cryopreservation of functional human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *STAR Protoc* **2**, 100334 (2021).
83. Safwan-Zaiter, H., Wagner, N. & Wagner, K.-D. P16INK4A—More Than a Senescence Marker. *Life* **12**, 1332 (2022).
84. Krenning, G., Zeisberg, E. M. & Kalluri, R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol* **225**, 631–637 (2010).
85. Ivey, M. J., Kuwabara, J. T., Riggsbee, K. L. & Tallquist, M. D. Platelet-derived growth factor receptor- α is essential for cardiac fibroblast survival. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **317**, H330–H344 (2019).
86. Pinto, A. R. *et al.* Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* **118**, 400–409 (2016).
87. Li, J. *et al.* β -Arrestins regulate human cardiac fibroblast transformation and collagen synthesis in adverse ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* **76**, 73–83 (2014).
88. Shinde, A. V., Humeres, C. & Frangogiannis, N. G. The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1863**, 298–309 (2017).
89. Lane, E. B., Hogan, B. L. M., Kurkinen, M. & Garrels, J. I. Co-expression of vimentin and cytokeratins in parietal endoderm cells of early mouse embryo. *Nature* **303**, 701–704 (1983).
90. Mazo, M., Pelacho, B. & Prósper, F. Stem Cell Therapy for Chronic Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Transl Res* **3**, 79–88 (2010).
91. Farah, H., Young, S. P., Mauro, C. & Jones, S. W. Metabolic dysfunction and inflammatory disease: the role of stromal fibroblasts. *FEBS J* **288**, 5555–5568 (2021).
92. Pavlacky, J. & Polak, J. Technical Feasibility and Physiological Relevance of Hypoxic Cell Culture Models. *Front Endocrinol (Lausanne)* **11**, (2020).

ANEXOS

Tabla A1. Cebadores utilizados.

Gen	Código cebadores	Sentido	Secuencia	Uso
shRNA-TOP2B 1	P944	F	GTACAAGTAAACGCGTGGATAAG	PCR de colonia
shRNA-TOP2B 2	P947	F	AGACAATGCCCTCACCTTATTAC	PCR de colonia
shRNA-TOP2B 3	P950	F	AGGCATTGACTCCATCAGTTTAC	PCR de colonia
shRNA-scramble	P953	F	TGCGTCAAGTCTAGCATCTAATAC	PCR de colonia
shRNA-GFP	P956	F	AAGCTGACCCTGAAGTTCATTAC	PCR de colonia
TK-pA	P988	R	AAACTCGAGCTATGGCAGGGC	PCR de colonia y secuenciación de Sanger
CAG	P167	F	CTCTAGAGCCTCTGCTAACC	PCR de colonia
CMVp	P138	R	GGTAGGCGTGACGGTGG	PCR de colonia
TOP2A	P940	F	TGAAGAATTGGAGGCTGTTG	qPCR
	P941	R	CTTTCCCAGGAAGTCCGA	qPCR
TOP2B	P938	F	TCCTTGCTCAGATGATGAATCC	qPCR
	P939	R	TTAGGTCTTTCGGCTGCTG	qPCR
GADPH	P1	F	GACCACAGTCCATGCCATC	qPCR
	P2	R	CATCCACAGTCTTCTGGGTG	qPCR
PolR2A	P740	F	CTCCCTCATCATACCTGGTCA	qPCR
	P493	R	CATTCTCCACCACCACCTTG	qPCR

Tabla A2. Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Proveedor	Referencia	Dilución	Uso
Anti-TOP2B	Santa Cruz	sc-25330	1:200; 1:100	Western Blot
			1:250; 1:100	Inmunofluorescencia
BV421_anti-Troponina II humana	BD Biosciencias	565618	1:200	Citometría
AF700-antiCD90	Thermo Fisher	56-0909-42	1:20	Citometría
PE-antiCD140α	Thermo Fisher	12-1401-81	1:40	Citometría
Anti-vimentina	Thermo Fisher	PA1-16759	1:1000	Inmunofluorescencia
Anti-αSMA	Agilent	M085129-2	1:200	Inmunofluorescencia

Tabla A3. Anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpo	Proveedor	Referencia	Dilución	Uso
488 Cabra anti-ratón	Abcam	Ab173003	1:1000	Western Blot
AF790 Burro anti-ratón	Thermo Fisher	A11371	1:10000	Western Blot
633 Cabra anti-conejo	Thermo Fisher	A-21070	1:5000	Western Blot
488 Cabra anti-ratón	Thermo Fisher	A11001	1:1000	Inmunofluorescencia
633 Cabra anti-pollo	Thermo Fisher	A-21103	1:500	Inmunofluorescencia
700 Cabra anti-ratón	Thermo Fisher	A-21036	1:500	Inmunofluorescencia

Figura A1. Cultivos celulares teñidos con cristal violeta a día 7 tras el cambio de medio a los medios de estudio indicados a la izquierda de la figura.

