



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**ROL DE RCAN1 EN LA MITOFAGIA MEDIADA POR LA VÍA
PINK1/PARKIN EN CÉLULAS MADRE PLURIPOTENCIALES
INDUCIDAS CON TRISOMÍA DE SÍNDROME DE DOWN**

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímico

ANDRÉS GUILLERMO GÓMEZ CONTRERAS

**DIRECTORA DE TESIS:
Valentina María Parra Ortiz**

Santiago, Chile 2018

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

ROL DE RCAN1 EN LA MITOFAGIA MEDIADA POR LA VÍA PINK1/PARKIN EN
CÉLULAS MADRE PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS CON TRISOMÍA DE SÍNDROME
DE DOWN

ANDRÉS GUILLERMO GÓMEZ CONTRERAS

PROFESOR(A) GUÍA: Valentina María Parra Ortiz

Santiago, Chile 2018

Esta memoria de pregrado se llevó a cabo en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Metabolismo, dirigido por la Dra. Valentina Parra, el cual pertenece al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y al Centro FONDAP de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), de las Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Proyecto FONDECYT de Iniciación 2015 11150282 (VP)
- Proyecto de Inserción en la Academia 2015 79150007 (VP)
- Proyectos FONDECYT Regulares 2016 1161156 (SL, VP) y 2018 1181097 (PC, VP)
- Anillo en Investigación y Tecnología ACT172066 (AC, VP)
- Proyecto FONDAP ACCDiS 15130011 (SL, VP)

La presente memoria ha dado origen a las siguientes actividades de difusión:

A) Presentaciones a congresos internacionales:

1. Hernández-Fuentes C, **Gómez-Contreras A**, Gómez W, Leiva-Navarrete S, Parra V. RCAN1 and mitochondrial dynamics in induced pluripotent stem cells (iPSCs) of patients with Down Syndrome. **Emerging Concepts in Mitochondria Biology Conference**, Weizmann Institute of Science. Rehovot, Israel, 2018. *Poster*.

B) Presentaciones a congresos nacionales:

1. Gomez W, **Gómez-Contreras AG**, Garcia F, Maracaja-Coutinho V, Nassif M, Parra V. Molecular interplay between Down syndrome and Alzheimer's disease: a bioinformatics approach. **XXXII Annual Meeting of the Chilean Society for Cell Biology**, Puerto Varas, Chile, 2018. *Poster*.

2. García F, Gomez W, **Gómez-Contreras AG**, Espinoza S, Bergmann C, Murgas P, Ponce D, Behrens MI, Parra V, Nassif M. Rubicon family of proteins in the interplay between Down syndrome and Alzheimer's disease. **XXXII Annual Meeting of the Chilean Society for Cell Biology**, Puerto Varas, Chile, 2018. *Poster*.

3. Hernández-Fuentes CP, **Gómez-Contreras AG**, Leiva-Navarrete S, Parra V. The relation of RCAN1 overexpression and mitochondrial dynamics in induced pluripotent stem cells (iPSCs) of Down Syndrome. **XL Annual Meeting of the Biochemistry and Molecular Society of Chile**, Puerto Varas, Chile, 2017. *Oral Communication*

4. Hernández-Fuentes CP, Bravo-Sagua R, Norambuena-Soto I, **Gómez-Contreras AG**, Mellado R, Lavandero S, Castro PF, Parra V. Inhibition of DRP1-dependent mitochondrial fission prevents hypoxia-induced metabolic shift and cellular proliferation of pulmonary arterial smooth muscle

cells (PASMIC). **XL Annual Meeting of the Biochemistry and Molecular Society of Chile,**
Puerto Varas, Chile, 2017. *Poster.*

1 DEDICATORIA

Después de tanto tiempo, finalmente estoy escribiendo estos párrafos...

Primero que todo, agradecer a la Dra. Valentina Parra, por aceptarme en su laboratorio y apoyarme durante este proceso. Muchas gracias por toda la experiencia y depositar su confianza en mí. Pese a que el último tiempo estuvo dedicada a la pequeña Violeta, siempre estuvo involucrada y le estaré eternamente agradecido por esta oportunidad.

Al laboratorio LDyM, por ser los mejores compañeros que podría haber tenido. Que pese a ser poquitos, nos podemos volver igual loquitos (ji ji ji jiii). A todo el laboratorio LTSM, gracias por hacer esta experiencia mucho más llevable. Por esos pequeños detalles que uno sabe que va a extrañar después como son las medias mañanas, el sello de aprobación, las tardes de cumbia y los viernes de pescado. Muchas gracias al maestro Fidel y la señora Gindra por tener siempre la disposición de ayudar con una sonrisa, aunque otras tres personas estuviesen pidiendo su ayuda también. Muchos cariños a la Caro, la Maca, la Carla, la Wileidy, la Kari, la Poli, el Tomás y el Ignacio. Gracias por toda su ayuda, por hacer los días más alegres y siempre tener algo con que romper la rutina como leer el horóscopo, apañar a los partidos, pasando por cómo van las teleseries, o una charla sobre Rick and Morty.

Y si, no me he olvidado... El mayor de los abrazos de laboratorio va para Apu. Muchas gracias por tu ayuda, por tooooooda la paciencia que tuviste, por los coscorriones que me gané, por ayudarme en los desastres y por ser el más adorable de todos. Esta tesis no habría ocurrido si no estuvieses ahí. ¡No te mueras nunca!

A los amigos que me dio la universidad. Por todas esas tardes de relax en Microclima. Por esos carretes que armaban en el Autobús. A todos aquellos que hicieron de la Quimifonda el magno

evento de la facultad. A todos los compañeros que apañaban en las tardes de estudio. Un saludo gigante para la Andrea por apañar hasta en las últimas con los ramos. A la Vale, la Fanny y la Coni, las quiero con todo a estas diosas y su amistad significa mucho para mí. A la Ale que, pese a ser de otra facultad se volvió un pilar gigante porque sufríamos casi lo mismo, y nada, ni siquiera los canguros con los que está ahora, me harán olvidarla.

Un saludo muy especial a todo el grupo SalSalud UChile. Por mucho tiempo los vi bailar, y cuando finalmente di el paso, encontré un grupo de gente que me ayudó mucho a crecer como persona. Muchas gracias a la Bele, al tío Eu, al AndyLais, a la Javi, a la Jenny, al Sergio, a la Fefa, a la Andrea, a la Mery... Mucha gente bella en ese grupo que quiero con todo mi corazón salsero.

A los amigos de la vida, esos que uno dice que son su segunda familia. A Juanca y Shirvani, por ser los mejores amigos y apoyos durante el colegio. A Amatto y el Jo, por ir contagiándome con su espíritu aventurero y rebelde. A la Fran, que pese a estar lejos en este momento, siempre te recuerdo amiga del alma. Al Ian, te conocí como un compañero más de mi hermano y terminaste siendo un hermano más de la familia. A Rodolfo y Carlangas... es literalmente una vida entera que nos conocemos los tres, y pese a que hemos tomado caminos distintos, siempre atesoro esos recuerdos de infancia con ustedes.

Y finalmente, los mayores agradecimientos son para mi familia. Los que siempre creyeron en mí en este largo camino. A mi madre, mi Mayita. A mi abuela, mi Mama Nena. A mi pequeño gran hermano, el Álvaro. A mi tía Katy. Al Nino. A todos los quiero con el alma. Ustedes me vieron desde pequeño, desde que empecé a caminar, desde el primer día en el jardín hasta el último día de colegio... Me han seguido durante todo este camino. Muchas gracias por estar siempre ahí, por ayudarme a ponerme de pie cuando fue necesario, por mostrar siempre ese amor de familia. Esta tesis es tanto mía como de ustedes.

2 TABLA DE CONTENIDO

1	DEDICATORIA	vi
2	TABLA DE CONTENIDO.....	viii
3	ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y TABLAS	x
4	ABREVIATURAS.....	xi
5	RESUMEN	xiii
6	ABSTRACT.....	xv
7	INTRODUCCIÓN	1
7.1	Síndrome de Down	2
7.2	Cromosoma 21 y RCAN1	4
7.3	RCAN1 en diferentes patologías.....	5
7.4	RCAN1 en Síndrome de Down.....	7
7.5	Mitocondrias y Dinámica Mitocondrial	8
7.6	Mitofagia: vía PINK1/Parkin.....	12
7.7	Morfología mitocondrial en patologías.....	14
7.8	Morfología mitocondrial en cardiopatías	15
7.9	Células madre pluripotenciales inducidas.....	16
8	HIPÓTESIS.....	20
8.1	Objetivo General.....	20
8.2	Objetivos Específicos.....	20
9	METODOLOGÍA	21
10	RESULTADOS.....	26
10.1	El aumento de RCAN1 disminuye el $\Delta\psi_m$ y aumenta la producción de ROS en las mitocondrias de las iPSC	26
10.2	El aumento de RCAN1 disminuye la activación de vía mitofágica regulada por PINK1/Parkin en las iPSC	29
10.3	El aumento de RCAN1 por adenovirus en las iPSC 2s produce una disminución en la expresión de PINK1	33
11	DISCUSIÓN	35
11.1	SD y vía PINK1/Parkin.....	35
11.2	Integridad mitocondrial y vía PINK1/Parkin	35

11.3	Rol de RCAN1 y modelo final.....	38
11.4	Proyecciones	41
11.5	Conclusiones finales	41
12	BIBLIOGRAFÍA	43
13	ANEXO: DIFERENCIACIÓN EN CARDIOMIOCITOS	47
13.1	Estandarización del proceso de diferenciación de iPSC a cardiomiocitos	47
13.2	Resultados	48

3 ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y TABLAS

Figura 1: Cariotipo de pacientes con Síndrome de Down (SD).....	3
Figura 2: Estructura y función de RCAN1.....	6
Figura 3: Cadena transportadora de electrones	9
Figura 4: Dinámica mitocondrial regula la morfología de la red mitocondrial	11
Figura 5: La mitofagia es el proceso de degradación de las mitocondrias en la célula	13
Figura 6: Caracterización de iPSC 2s y iPSC 3s.....	18
Figura 7: RCAN1 regula la morfología mitocondrial en las iPSC.....	19
Figura 8: RCAN1 altera el $\Delta\psi_m$ en las iPSC 3s	26
Figura 9: Generación de ROS en las mitocondrias iPSC 3s es dependiente de RCAN1	28
Figura 10: Masa mitocondrial no varía en las iPSC 2s y iPSC 3s	28
Figura 11: Localización de la proteína Parkin es distinta entre iPSC 2s y iPSC 3s.....	30
Figura 12: Expresión de PINK1 esta disminuída en iPSC 3s	32
Figura 13: El aumento de RCAN1 en las iPSC 2s disminuye los niveles basales de PINK1	34
Figura 14: Modelo de trabajo propuesto para relación de RCAN1 con la mitofagia.....	39
Tabla 1: Lista de anticuerpos	25

4 ABREVIATURAS

ATP	: adenosin trifosfato
CaN	: calcineurina
CCCP	: carbonilcianida 3-clorofenilhidrazona
CO₂	: dióxido de carbono
DH-123	: dihidrorodamina-123
dKD	: doble knock down (silenciamiento con siRCAN1.1 + siRCAN1.4)
DRP1	: proteína relacionada a la familia de las dinaminas tipo 1
DSCR	: región candidata del Síndrome de Down
FADH₂	: forma oxidada del dinucleótido de flavina-adenina
iPSC	: células madre pluripotenciales inducidas
MDA	: medio de diferenciación A
MDB	: medio de diferenciación B
MMC	: medio de mantención de cardiomiocitos
MME	: medio de mantención enriquecido
MOI	: multiplicidad de infección
MTG	: mitoTracker Green
mtHsp70	: proteína “ <i>heat shock</i> ” 70 de la mitocondria
NADH	: nicotinamida adenina dinucleótido
NFAT	: factor nuclear de células T activadas
PGC-1α	: “ <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator</i> ”
PINK1	: proteína quinasa inducida por PTEN 1
RCAN1	: regulador de calcineurina 1
ROS	: especies reactivas de oxígeno
SD	: Síndrome de Down
siRNA	: RNA pequeño de interferencia

TMRM : tetrametilrodamina metil ester perclorato

$\Delta\psi_m$: potencial de membrana mitocondrial

5 RESUMEN

El síndrome de Down (SD) es un trastorno genético que causa deficiencia intelectual y entre otros trastornos asociados, mayor incidencia a desarrollar cardiopatías. Una de las proteínas involucradas en este trastorno es RCAN1. Esta proteína pertenece a la familia de las calcipresinas, muy conservada entre especies, que regulan la morfología de las mitocondrias (los principales productores de ATP en la célula) por inhibición de la fisión mitocondrial. La fisión es un proceso celular que genera mitocondrias más pequeñas, separándolas de la red mitocondrial previo a su degradación. El proceso de degradación de mitocondrias se llama mitofagia y solo se activa en mitocondrias que presentan un bajo potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Una de las vías mitofágicas en las células es la vía regulada por PINK1/Parkin. Esta vía sólo se activa en mitocondrias que presenta altos niveles de PINK1 por una disminución del $\Delta\psi_m$.

En este trabajo se analizó si el aumento de RCAN1, observado en el SD, inhibe la activación de la mitofagia regulada por la vía PINK1/Parkin. Se utilizó un modelo de células madre pluripotenciales inducidas (iPSC) de pacientes sanos (iPSC 2s) y pacientes con SD (iPSC 3s). Se evaluó si existían diferencias en la mitofagia regulada por PINK1/Parkin entre las iPSC 2s y las iPSC 3s. Luego se silenció RCAN1 para determinar si la disminución de sus niveles afecta la actividad mitofágica en las iPSC 3s. Finalmente, se utilizó un adenovirus para ver si el aumento en los niveles de RCAN1 altera los niveles de mitofagia basales en las iPSC 2s. Se evaluaron los efectos de las isoformas RCAN1.1 y RCAN1.4 sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y la activación de la vía PINK1/Parkin. Se analizaron las muestras utilizando las técnicas de citometría de flujo,

inmunofluorescencia y Western-Blot. Además, se estandarizó un proceso de diferenciación de ambas líneas celulares de iPSC hacia cardiomiocitos.

Las iPSC 3s mostraron un mayor $\Delta\psi_m$, mayor generación de ROS y menor activación de la vía PINK1/Parkin que las iPSC 2s, dando signos de acumulación de mitocondrias deficientes. La disminución de los niveles de RCAN1.1 disminuyó el $\Delta\psi_m$, la generación de ROS, y aumentó la activación de la vía PINK1/Parkin en las iPSC 3s. La disminución de los niveles de RCAN1.4 no tuvo efectos en ninguno de estos parámetros en las iPSC. El aumento en los niveles de RCAN1.1 disminuyó la acumulación de PINK1 en las iPSC 2s. La diferenciación de ambas líneas hacia cardiomiocitos arrojó diferencias en las iPSC 3s, que mostraron latidos tardíos respecto a las iPSC 2s. Concluimos que la activación de la mitofagia regulada por la vía PINK1/Parkin es regulada por RCAN1.1 en las iPSC, y un aumento en sus niveles disminuye la activación de la vía como se observa en las muestras de pacientes con SD.

6 ABSTRACT

The role of RCAN1 in PINK1/Parkin mediated mitophagy pathway on induced pluripotent stem cells with Down Syndrome trisomy

Down syndrome is a genetic disorder that causes intellectual deficiency and among other associated disorders, greater incidence to develop cardiac diseases. One of the proteins associated in this disorder is RCAN1. This protein belongs to the calcipressin family, very conserved among species, that regulates mitochondrial morphology (the principal ATP producers in the cell) by inhibition of mitochondrial fission. Fission is a cellular process that generates smaller mitochondria, isolating them from the mitochondrial network before their degradation. The mitochondrial degradation process is called mitophagy and is only activated in mitochondria with low mitochondrial membrane potential and higher generation of reactive oxygen species. One of the pathways that regulates cellular mitophagy is the PINK1/Parkin pathway. This pathway is only activated in mitochondria with higher levels of PINK1 due to a decrease in their $\Delta\psi_m$.

In this work we analyzed if an increase in RCAN1, observed during Down Syndrome, inhibits the activation of PINK1/Parkin mitophagy. We used a model of induced pluripotent stem cells from healthy patients (iPSC 2s) and Down Syndrome patients (iPSC 3s). We evaluated if there were differences in PINK1/Parkin mitophagy between iPSC 2s and iPSC 3s. Then we silenced RCAN1 to determine if a decrease on its levels affects mitophagic activity on iPSC 3s. Finally, we used an adenovirus to see if an increase in RCAN1 levels altered basal mitophagy levels on iPSC 2s. We evaluated the effects of isoforms RCAN1.1 and RCAN1.4 over the mitochondrial membrane potential, generation of reactive oxygen species and the activation of the PINK1/Parkin pathway. We analyzed the samples using the techniques of flow cytometry, immunofluorescence

and Western-Blot. Besides that, we standardized a differentiation process of both induced pluripotent stem cell lines to cardiomyocytes.

iPSC 3s showed a greater mitochondrial membrane potential, greater generation of reactive oxygen species and lower activation of PINK1/Parkin pathway than iPSC 2s, giving signs of deficient mitochondrial accumulation. A decrease in RCAN1.1 levels diminished mitochondrial membrane potential, generation of reactive oxygen species and increased activation of PINK1/Parkin pathway on iPSC 3s. A decrease in RCAN1.4 levels had no effects over any of these parameters on iPSC. An increase in RCAN1.1 levels diminished PINK1 accumulation on iPSC 2s. The differentiation of both cell lines to cardiomyocytes showed differences in iPSC 3s, which showed late beats regarding iPSC 2s. We conclude that RCAN1.1 levels regulate the activation of the PINK1/Parkin pathway mitophagy in the induced pluripotent stem cells, and an increase of his levels reduces the activation of the pathway as it is observed in Down Syndrome samples.

7 INTRODUCCIÓN

Gracias a los avances realizados los últimos años en la estandarización del modelo celular de células madre pluripotenciales inducidas (iPSC), hoy en día es posible utilizar este modelo como herramienta de trabajo. Este modelo es útil para investigar distintas enfermedades complejas que antes no era posible abordar por la falta de un modelo de trabajo óptimo. El uso de estas células permitió superar la poca reproducibilidad de los resultados al trabajar con líneas celulares o la falta de un modelo animal apropiado para modelar la enfermedad ^[1,2,3].

Uno de los trastornos actuales donde se puede aplicar la investigación con las iPSC es el Síndrome de Down. Esta enfermedad es un trastorno genético que afecta el organismo de forma generalizada, y efectos severos en el sistema nervioso y cardiaco de las personas que lo presentan ^[2,4,5]. La mayoría de los estudios se han enfocado en comprender los factores genéticos involucrados en el desarrollo del trastorno en el sistema nervioso de los pacientes. Esto ha permitido identificar distintos genes sobreexpresados en este trastorno ^[6]. Pese a los avances, los estudios se han enfocado principalmente en los efectos sobre el sistema nervioso de estos pacientes y se han dejado de lado otros tejidos muy comprometidos como el corazón, muy importante ya que la mayoría de los pacientes presentan algún grado de cardiopatías ^[2,7]. Entender el mecanismo molecular que produce estas cardiopatías puede servir para generar futuros tratamientos que mejoren la calidad de vida de estas personas.

Distintos estudios han relacionado el desarrollo de cardiopatías con una deficiencia en el metabolismo cardiaco al observar cambios en la morfología de la red mitocondrial de los cardiomiocitos ^[8]. Con este enfoque, se postuló que uno de los genes sobreexpresados en el Síndrome de Down, RCAN1 ^[9], inhibe uno de los procesos de recambio mitocondrial, la mitofagia por la vía PINK1/Parkin, en las iPSC provenientes de pacientes con Síndrome de Down, causando

la acumulación de mitocondrias deficientes. Para comprobar la hipótesis, se regularon los niveles de RCAN1 en las iPSC al silenciar el gen con siRNA y su sobreexpresión por transfección con adenovirus, se analizó la morfología de las mitocondrias y la activación de la proteína Parkin por inmunofluorescencia, se analizaron parámetros asociados al metabolismo mitocondrial por citometría de flujo, y se vio la activación de distintas proteínas involucradas en la degradación de las mitocondrias por Western-Blot. Finalmente, se estandarizó un proceso de diferenciación con ambas líneas celulares desde iPSC hacia cardiomiocitos, con la finalidad de usar estas células diferenciadas en análisis futuros que permitan entender mejor los mecanismos que generan cardiopatías en estos pacientes.

7.1 Síndrome de Down

El Síndrome de Down (SD) es un trastorno genético causante de la forma más común de deficiencia intelectual afectando a 1 de cada 750 niños al nacer ^[2,4]. Este síndrome es causado por una copia extra del cromosoma 21 (también se le llama trisomía del par 21) (Fig. 1A) la mayoría de las veces producto de un error durante la segregación maternal en meiosis I ^[2,4]. La trisomía genera la sobreexpresión de ciertos genes que generan el fenotipo específico de la enfermedad. Aunque aún no se ha podido determinar la causa de este error en la migración, si se ha relacionado la edad de la madre como un factor de riesgo. Un embarazo a una edad más avanzada aumenta las probabilidades de tener un hijo con SD ^[5,7].

Los individuos con SD presentan ciertas características físicas distinguibles del resto de la población como hipotonía (debilidad muscular) y dismorfología facial ^[9]. Además, presentan degeneración neuronal progresiva que deriva en problemas cognitivos tales como deficiencia en el aprendizaje, la memoria, el lenguaje y funciones motoras desde la infancia. Muestran una

neurodegeneración similar a la enfermedad de Alzheimer ^[7] y mayor incidencia a desarrollar ciertas patologías cardíacas, además de leucemia, diabetes, trastornos al sistema inmune y el endocrino ^[4,9,10], por nombrar algunas. A principios del siglo pasado, la expectativa de vida de estos pacientes no superaba los 10 años. Hoy en día se espera que la mayoría supere los 50 años,

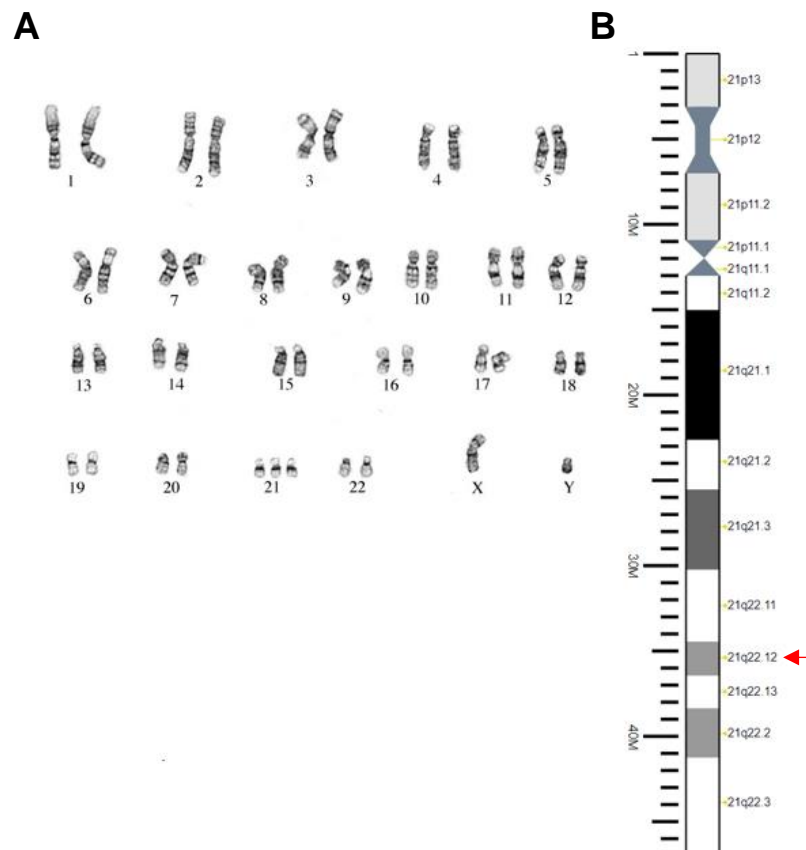


Figura 1: Cariotipo de pacientes con Síndrome de Down (SD)

(A) Cariotipo de un varón que presenta una trisomía en el cromosoma 21, típico en un paciente con SD (Imagen modificada de <http://worms.zoology.wisc.edu/zooweb/Phelps/ZWK99024k.jpeg>). (B) Mapa genético de cromosoma 21. Se ven las distintas coordenadas para encontrar genes en el cromosoma. Flecha en rojo en las coordenadas 21q22.12 del cromosoma marca la región DSCR que codifica para el gen *DSCR1* o *RCAN1*, sobreexpresado en pacientes con SD (imagen de https://en.wikipedia.org/wiki/Chromosome_21#/media/File:Human_chromosome_21_ideogram_vertical.svg).

dependiendo de los problemas congénitos desarrollados ^[5]. Actualmente, más del 50% de estos pacientes nace con algún grado de cardiopatía ^[2] y son la principal causa de muerte de este síndrome durante los primeros dos años de vida ^[7].

7.2 Cromosoma 21 y RCAN1

Existe evidencia de casos con SD desde la edad antigua, pero hace menos de 60 años se estableció la relación entre su desarrollo y la trisomía del par 21 ^[9]. Desde entonces, entender el rol de los genes involucrados en el desarrollo del trastorno pasó a ser uno de los enfoques principales en el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos. En las últimas décadas, la caracterización del cromosoma 21 ha detectado distintas regiones involucradas en el desarrollo del SD (Fig. 1B). La activación de solo una región no es suficiente para generar el fenotipo característico ^[2].

Una de estas regiones sobreexpresadas es la “*Down Syndrome Candidate Region*” (DSCR) ubicada en las coordenadas 21q22.12 del cromosoma 21 (Fig. 1B). Esta región codifica para el gen *DSCR1* o “*Regulator of Calcineurin 1*” (*RCAN1*) ^[4,9,10,11], de un largo total de 2178 bps y compuesto por siete exones y seis intrones ^[12]. El gen codifica para RCAN1, una proteína de la familia de las calcipresinas que son muy conservadas entre especies e involucradas en procesos como la adaptación al estrés oxidativo, respiración, mantenimiento y morfología mitocondrial ^[10,11,12].

La estructura de la proteína RCAN1 consiste en cuatro exones: los exones 5, 6 y 7 constituyen los exones constantes, mientras el cuarto exón varía entre los exones 1–4 y da lugar a las distintas isoformas de la proteína. RCAN1.1 (exón 1) y RCAN1.4 (exón 4) son las isoformas abundantes en el organismo (Fig. 2A) ^[12,13]. RCAN1.1 presenta su mayor expresión en muestras

de corazón, cerebro y músculo liso adultos, mientras que RCAN1.4 se expresa más en muestras de corazón, placenta, músculo liso, riñón y páncreas adultos ^[13]. Ambas isoformas también están presentes en muestras fetales, donde la expresión de RCAN1.1 es superior a la expresión de RCAN1.4 ^[13]. La isoforma con el exón 2 (RCAN1.2) solo ha sido detectada en muestras de cerebro e hígado fetales, mientras la isoforma con el exón 3 (RCAN1.3) aún no es detectada ^[12,13].

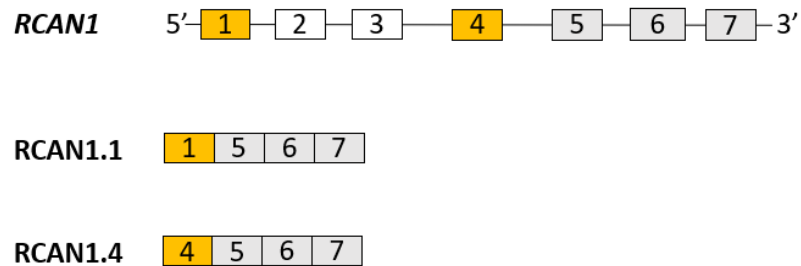
Las calcipresinas tienen un rol asociado a la actividad de calcineurina (CaN). La CaN es una serina treonina fosfatasa dependiente de calcio involucrada en la regulación de distintas vías de señalización en varios tejidos como el cardíaco, el sistema inmune y sistema nervioso ^[12,14,15]. Su estructura consiste en un heterodímero, con una subunidad catalítica que contiene el sitio activo y una subunidad reguladora que une a calcio, ambas conectadas a través de una secuencia enlazadora (o *linker* en inglés). Mediante la activación del factor de transcripción NFAT y su traslocación al núcleo, la CaN promueve la expresión de RCAN1. De esta forma RCAN1 interactúa con CaN uniéndose al *linker* a través de su secuencia carboxilo-terminal (codificada por el exón 7), bloqueando el sitio activo e inhibiendo su actividad (Fig. 2B) ^[12,14,15].

7.3 RCAN1 en diferentes patologías

Debido a que la CaN regula distintas vías de señalización en varios tejidos, se asume que RCAN1 también actúa como un regulador de las mismas vías. Un análisis bibliográfico no solo refleja la importancia de RCAN1 en la regulación de distintos procesos celulares, sino que sus niveles basales varían en distintas patologías, produciendo efectos específicos en distintos tejidos ^[12,15].

En enfermedades neurodegenerativas, como en Alzheimer o el mismo SD, se ve un incremento de los niveles de RCAN1 en los cerebros de estos pacientes [9,12,13,14,15]. En contraste, RCAN1 es menor en los cerebros de pacientes con la enfermedad de Huntington [15]. Además de su rol en enfermedades neurodegenerativas, se observa un rol protector de RCAN1 frente a la herida cerebral por isquemia y reperfusión [16]. Esto demuestra que, en un mismo tejido, distintas patologías que regulan de forma distinta los niveles basales de RCAN1, pueden producir el mismo

A



B

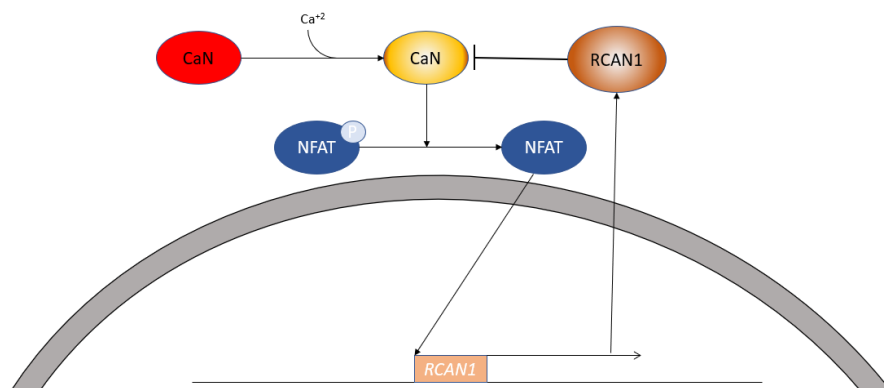


Figura 2: Estructura y función de RCAN1

(A) Estructura del gen *RCAN1* y la proteína RCAN1. El gen consiste en seis intrones y siete exones. La proteína RCAN1 está constituida por cuatro de esos exones: tres constantes (en gris) y uno variable. Las isoformas más comunes tienen los exones 1 y 4 (en naranja), RCAN1.1 y RCAN1.4, respectivamente. (B) Autorregulación de CaN por expresión de RCAN1.

efecto adverso. De la misma forma, en otras circunstancias un aumento fisiológico de la proteína puede ser beneficioso para el organismo.

En muestras de páncreas, RCAN1 está sobreexpresado en pacientes que presentan diabetes mellitus tipo 2, con los niveles de expresión hasta un 153% más elevados respecto a pacientes no diabéticos. Esto se asocia a una disminución en la secreción de insulina inducida por glucosa ^[17]. Como dato interesante, los pacientes con SD tienen mayor incidencia de padecer diabetes tipo 2, demostrando la importancia y transversalidad de este gen en el trastorno.

Otros tejidos con variación de RCAN1 durante una patología son el músculo y el sistema circulatorio. Se sabe que RCAN1 está relacionada con la respuesta a hipertrofia en el músculo esquelético y cardíaco ^[12], inhibiendo la actividad CaN y previniendo el avance de la hipertrofia. Esto convierte a RCAN1 en un posible blanco terapéutico para mejorar la respuesta de otros procesos, como la respuesta de isquemia y reperfusión ^[20] donde se observa un rol protector de RCAN1. En el sistema circulatorio, se han detectado aumentos de RCAN1 en las placas arterioscleróticas, lo que podría indicar que RCAN1 actúa como un factor que favorece la arteriosclerosis ^[15]. En resumen, son múltiples los tejidos donde una desregulación de RCAN1 puede favorecer el desarrollo de enfermedades.

7.4 RCAN1 en Síndrome de Down

Debido a la trisomía del par 21, los pacientes con SD presentan niveles elevados de RCAN1 en distintos tejidos ^[10,12,13]. Los mayores cambios se ven en el corazón y cerebro, dos órganos muy comprometidos en estos pacientes donde la expresión de RCAN1 puede alcanzar el doble de sus niveles basales ^[9,13]. Además de los mencionados problemas neurológicos, los

pacientes con SD nacen con distintos grados de malformaciones cardíacas ^[7], lo que explica por qué la mayoría de ellos muere producto de una cardiopatía ^[7,18].

Distintos estudios en modelos animales con sobreexpresión de RCAN1 presentan distintos trastornos metabólicos, cardíacos y cognitivos semejantes al fenotipo del SD ^[2,4,12]. Específicamente, dos estudios realizados en un modelo de mosca homólogo al SD demostraron que, en los cerebros de éstas, la actividad CaN estaba disminuida, lo que se asocia a un déficit en su aprendizaje ^[10]. Por otro lado, la sobreexpresión del homólogo de RCAN1, *nebula*, genera problemas en el metabolismo neuronal como una menor producción de ATP, un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y un menor contenido de DNA mitocondrial ^[11]. Los resultados de ambos estudios fueron corroborados en muestras de cerebro de fetos humanos, indicando una conexión entre la sobreexpresión de RCAN1 y su rol en el desarrollo del fenotipo del SD ^[10,11].

En las células eucariontes, la producción de ATP y ROS están ligados a la actividad de las mitocondrias, organelos que actúan como los motores de la célula ^[19,21]. La masa de estos organelos en las células varía entre distintos tipos celulares, siendo superior en tejidos como el cerebro y el corazón ^[8,21], dos órganos muy afectados durante el SD. Esto, sumado a la regulación de ciertos procesos mitocondriales por CaN, hace de las mitocondrias un blanco de estudio para evaluar los efectos de RCAN1 a nivel celular.

7.5 Mitocondrias y Dinámica Mitocondrial

Las mitocondrias son organelos de doble membrana y los principales reguladores del metabolismo celular, además de participar en otros procesos como el desarrollo embrionario, apoptosis y autofagia, y ser las principales productoras de ROS celulares ^[19,22,23]. Se distribuyen

a través de la célula en redes mitocondriales interconectadas de tamaño variable dependientes del metabolismo de cada tipo celular. La red mitocondrial es mayor en células con alta demanda energética, como es el caso de las neuronas, el músculo esquelético o el corazón, pudiendo alcanzar un 30% del volumen celular total en este último en un adulto sano ^[19].

La producción principal de ATP en las mitocondrias es a través de la fosforilación oxidativa. Esta funciona a través de cuatro complejos en la membrana mitocondrial interna que componen la cadena transportadora de electrones ^[24]. La cadena permite a las mitocondrias utilizar compuestos del ciclo de Krebs y el oxígeno (O₂) obtenido por la respiración para generar una corriente de electrones. Esta corriente produce un gradiente de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, generando el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) ^[24]. Para mantener el $\Delta\psi_m$ constante, los protones reingresan a la matriz a

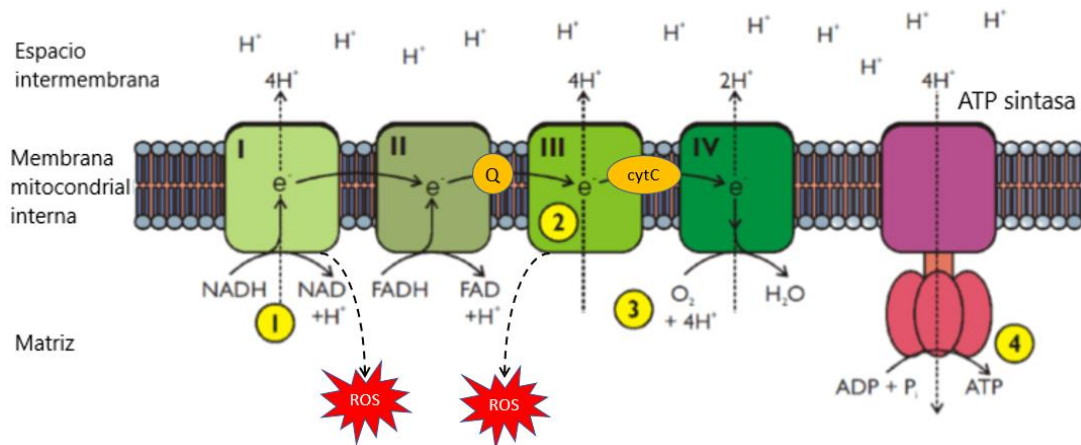


Figura 3: Cadena transportadora de electrones

(1) Los complejos I y II utilizan NADH y FADH₂ del ciclo de Krebs para iniciar transporte de electrones; gradiente de protones hacia espacio intermembrana y generación de ROS. (2) Ubiquinona (Q) transporta electrones desde el complejo II al III, donde son captados por citocromo C (cytC); gradiente de protones hacia espacio intermembrana y generación de ROS. (3) El cytC transporta electrones hacia complejo IV, donde se combinan con O₂ para generar H₂O; gradiente de protones hacia espacio intermembrana. (4) Gradiente de protones hacia la matriz genera movimiento en la ATP sintasa para producir ATP (imagen modificada desde <http://astarbiology.com/aqa/electron-transport-chain/>).

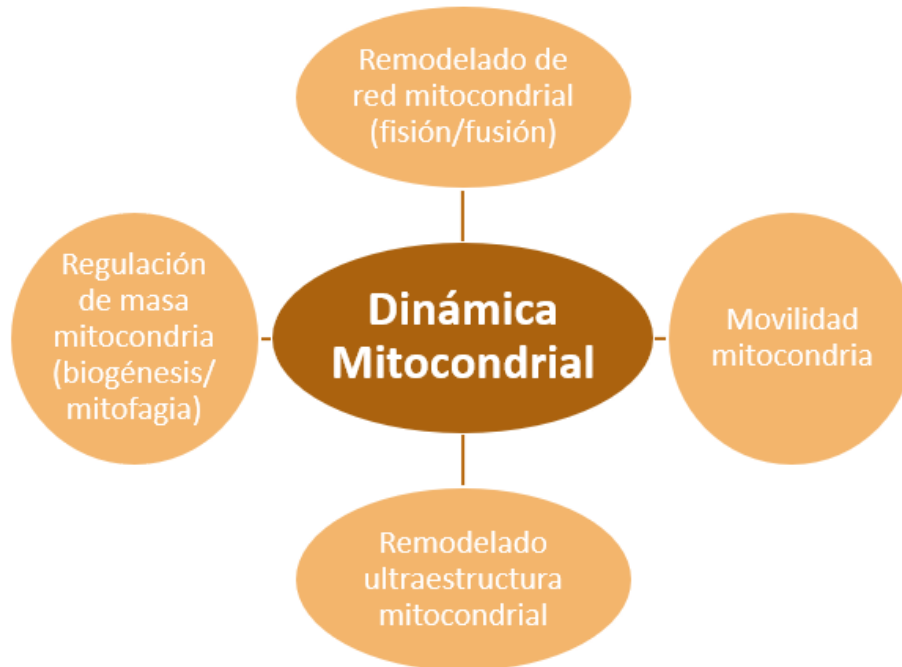
través de la ATP sintasa, un complejo que consiste en un canal iónico y una turbina que utiliza el traspaso de protones para generar ATP (Fig. 3) ^[24]. La cadena transportadora además repone los metabolitos para que reingresen al ciclo de Krebs y genera ROS. Estos tradicionalmente se usan como marcador de daño mitocondrial ya que su acumulación se asocia a un metabolismo deficiente, daño en el ADN mitocondrial y proteínas mitocondriales. Además, se usan como sensor para gatillar autofagia o recambio mitocondrial ^[19,23].

El metabolismo mitocondrial está ligado a la regulación morfológica de la red a través de la “dinámica mitocondrial”. Este término engloba al menos cuatro procesos: a) remodelado de la red mitocondrial mediante los procesos de fusión y fisión, b) movilidad mitocondrial dependiendo de la demanda energética celular, c) remodelado de la ultraestructura mitocondrial y condensación de la matriz (usado como reflejo del metabolismo), y d) regulación del volumen mitocondrial ^[8,22]. Los principales procesos que regulan el remodelado de la red son la fusión y fisión mitocondrial ^[19]. La fusión permite unir mitocondrias pequeñas para aumentar su tamaño y el de la red, promoviendo además la interacción con el retículo endoplasmático ^[22]. La fisión genera mitocondrias más pequeñas, ideal para aumentar la producción de ROS y separarlas de la red mitocondrial para su degradación o previo a la división celular ^[22]. En el proceso de fisión, una de las proteínas involucradas es DRP1, una GTPasa citoplasmática cuya activación promueve la fisión mitocondrial, aunque el mecanismo por el que ocurre esto aún no está identificado ^[22]. La activación de esta GTPasa depende de la fosforilación y desfosforilación de ciertos aminoácidos que regulan su actividad. Dentro de sus reguladores se encuentra la CaN, que actúa al desfosforilar el residuo de Ser⁶³⁸ ^[25] de DRP1, activándola y promoviendo la fisión (Fig. 4B) ^[22].

Estudios han demostrado que la inhibición de DRP1 disminuye los niveles de fisión y afecta procesos mitocondriales asociados a ésta ^[19,22,23,25]. Con estos datos, se realizó un estudio

en el laboratorio, recientemente publicado, donde se determinó que la sobreexpresión de RCAN1 afecta la morfología mitocondrial, disminuyendo la fisión al inhibir la activación de DRP1 por CaN, produciendo mitocondrias más pequeñas y con un metabolismo deficiente ^[26]. En esta tesis

A



B

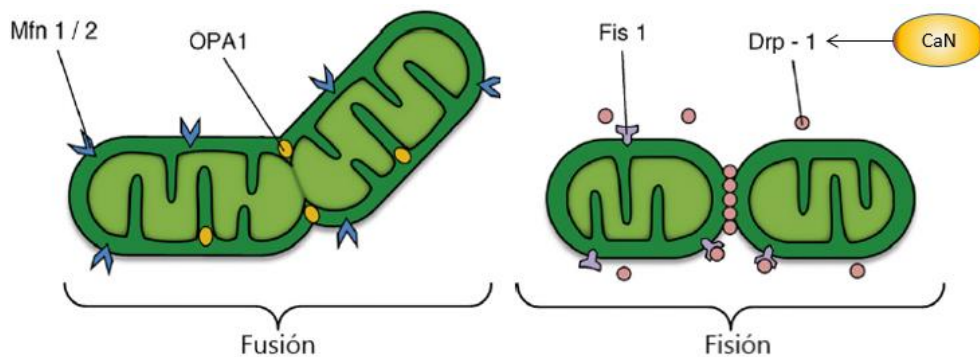


Figura 4: Dinámica mitocondrial regula la morfología de la red mitocondrial

(A) La dinámica es regulada por cuatro procesos: remodelado de la red, movilidad mitocondrial, remodelado de la ultraestructura, y regulación por biogénesis y mitofagia. (B) Remodelado de las mitocondrias por los procesos de fusión y fisión. En la fisión, DRP1 es activada por CaN (Imagen modificada de “Kuzimic, J., et al (2011). *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 64(10), 916-923”).

en particular, se buscó ver los efectos de la inhibición de la fisión, producto de la sobreexpresión de RCAN1, en uno de los procesos asociados a esta e involucrado en la dinámica mitocondrial: la mitofagia.

7.6 Mitofagia: vía PINK1/Parkin

La autofagia es una respuesta celular a condiciones nutricionales desfavorables donde se eliminan organelos y proteínas envejecidas y/o dañadas para reutilizar sus aminoácidos y ácidos grasos en procesos celulares esenciales. Además, la autofagia también actúa como mecanismo de control de calidad celular ^[22,23]. En las mitocondrias este proceso se denomina “mitofagia” ^[8]. Se gatilla por cambios en el $\Delta\Psi_m$ y/o generación descontrolada de ROS, eliminando los organelos cuando el daño es muy extenso y no puede ser reparado ^[23]. Durante esta respuesta, las mitocondrias defectuosas primero son aisladas de la red mitocondrial mediante inhibición de la fusión y/o activación de la fisión ^[8,22,23] (Fig. 5A).

Existen distintas vías de señalización mitofágicas dentro de la célula, algunas más estudiadas que otras. Una de ellas es la vía regulada por PINK1/Parkin, originalmente descubierta en estudios de la enfermedad de Parkinson en neuronas ^[21]. En un inicio, se pensó que esta vía era exclusiva de las neuronas, así como las proteínas involucradas en ella. Hoy en día se sabe que esta vía es muy conservada en las células y que se ve afectada en el desarrollo de diversas patologías ^[8,19,22,27], haciéndola un buen modelo para estudiar mitofagia en distintos tipos celulares.

Las proteínas principales de la vía mitofágica son PINK1 (PTEN-induced kinase 1) y Parkin. PINK1 es una serina-treonina quinasa de la membrana mitocondrial externa que protege las células al prevenir el estrés inducido por despolarización de la membrana y apoptosis, reduce

estrés oxidativo local y la fisión. Parkin es una proteína E3 ubiquitín ligasa que protege las células por ubiquitinación de proteínas dañadas y mitocondrias disfuncionales para su degradación [19,22,23]. Normalmente, PINK1 transloca a la membrana mitocondrial interna producto del $\Delta\psi_m$ y es degradada rápidamente por proteasas, lo que mantiene sus niveles bajos. En mitocondrias disfuncionales con bajo $\Delta\psi_m$, PINK1 se acumula en la membrana mitocondrial externa, reclutando a Parkin desde el citosol y activándola por fosforilación, promoviendo la mitofagia mediante la ubiquitinación de proteínas [19,22,23]. Por lo tanto, esta vía solo se activa en mitocondrias que presentan altos niveles de PINK1 (Fig. 5B).

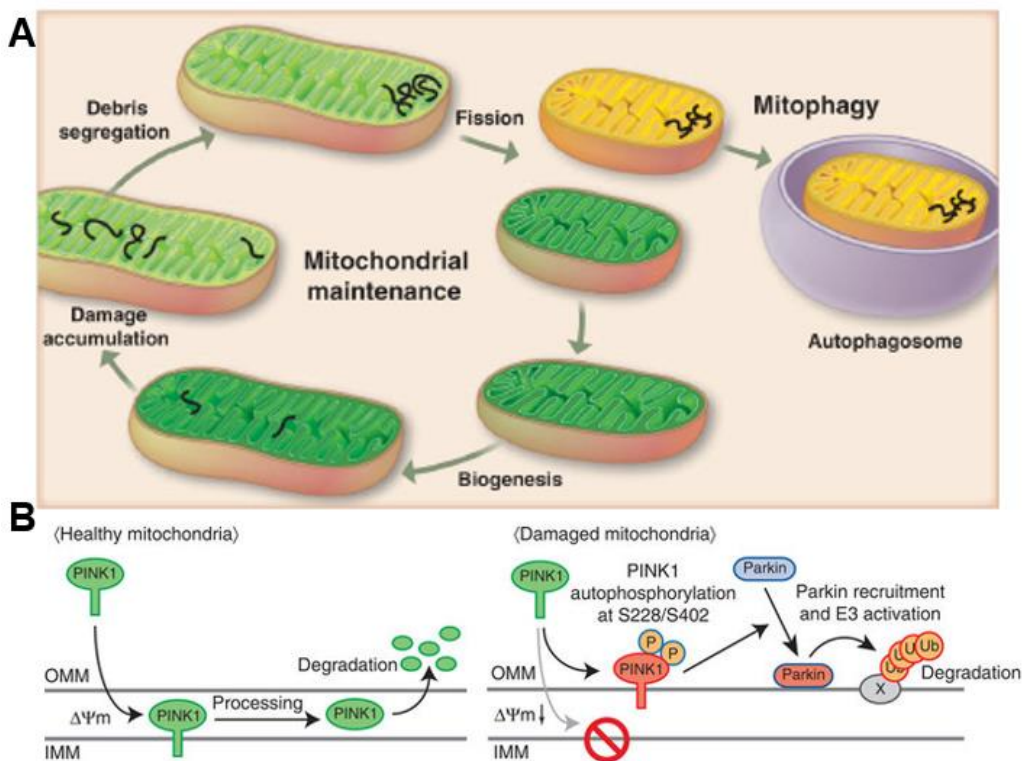


Figura 5: La mitofagia es el proceso de degradación de las mitocondrias en la célula

(A) Daño en las mitocondrias por cambios en $\Delta\psi_m$ o generación excesiva de ROS produce separación de las mitocondrias dañadas de la red previo a ser degradadas (imagen de “Youle, R. J., & Van Der Blik, A. M. (2012). *Science*, 337(6098), 1062-1065”). (B). Vía mitofágica PINK1/Parkin. PINK1 se acumula en la membrana mitocondrial externa ante un bajo $\Delta\psi_m$, reclutando Parkin y activando la vía (imagen de “Pickrell, A. M., & Youle, R. J. (2015). *Neuron*, 85(2), 257-273”).

7.7 Morfología mitocondrial en patologías

Existen distintos estudios que han relacionado cambios en el metabolismo celular con el desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes mellitus y enfermedades neurodegenerativas [19,22]. Una desregulación en la dinámica mitocondrial puede derivar en varios problemas metabólicos que afectan a las células con alta demanda energética, sobre todo a los órganos con un metabolismo alto [21,22].

En la enfermedad de Parkinson, donde se observó la acumulación de mitocondrias defectuosas en las neuronas que posteriormente derivan en muerte celular [19,22]. Estudios posteriores en modelos animales con neuronas deficientes de PINK1/Parkin presentaron mitocondrias con una fisión excesiva, aumento del estrés oxidativo y menor generación de ATP, que derivó en neurodegeneración progresiva y parkinsonismo leve [22,23,27].

Se ha demostrado que existe una relación entre la dinámica mitocondrial y las proteínas DRP1 y CaN. La inhibición de ambas proteínas disminuye la fisión, mitofagia, y aumentan la producción de ROS [19,22,23,25]. Esto, sumado a los efectos causados por inhibición de la vía PINK1/Parkin, ayudó a determinar que la vía era extrapolable a otros modelos celulares y que la mitofagia fluctúa en ciertas patologías. En las neuronas de pacientes con SD, donde se observa neurodegeneración similar al Alzheimer, los estudios mencionados [10,11] indican signos de bajos niveles de mitofagia.

En diabetes, las mitocondrias presentan menor producción de ATP, no presentan hiperpolarización de la membrana mitocondrial en respuesta a altos niveles de glucosa, lo que se traduce en una menor captación de glucosa en las células β [17]. Tomando en cuenta todos los datos, existe una relación entre la función de RCAN1 en las mitocondrias, sus efectos en tejidos durante el desarrollo de distintas patologías, y sus efectos en la dinámica mitocondrial,

principalmente en los procesos de fusión y la mitofagia. Debido a su sobreexpresión en pacientes con la trisomía del par 21, se postula que en el SD la sobreexpresión de RCAN1 genera cambios en la regulación de la red mitocondrial por una desregulación de la mitofagia regulada por la vía PINK1/Parkin.

7.8 Morfología mitocondrial en cardiopatías

Uno de los tejidos con mayor demanda energética es el corazón, donde las mitocondrias ocupan un 30% de su volumen total y pueden generar hasta 6 kg de ATP al día ^[19]. En el organismo, la mayoría de las células presenta un metabolismo glucolítico (oxidación de la glucosa) como principal fuente de generación de ATP ^[8,19]. Para ajustarse a la demanda energética que requiere el corazón, las células cardíacas, específicamente los cardiomiocitos, cambian la morfología de la red durante el desarrollo embrionario a una red de mayor tamaño para pasar a un metabolismo β -oxidativo (oxidación de ácidos grasos) ^[8,19]. Esta red fusionada tiene mayor producción energética, generando así un 70% del ATP cardíaco total en el corazón de un adulto por esta vía ^[8].

En los últimos años se ha descubierto que, durante el avance de una cardiopatía, el metabolismo del corazón disminuye su preferencia por la β -oxidación y revierte su metabolismo a uno glucolítico lo que deriva en una menor generación de ATP ^[8]. Ya que los individuos con SD tienen mayor frecuencia a presentar cardiopatías desde su nacimiento, es probable que una de sus causas sea una desregulación en la dinámica mitocondrial durante el desarrollo embrionario que prevenga el cambio morfológico de las mitocondrias necesario para ajustarse al nuevo metabolismo en los cardiomiocitos.

7.9 Células madre pluripotenciales inducidas

Los estudios en SD los últimos años han permitido distinguir muchos aspectos de su desarrollo y avance, pero aún existen muchos problemas para generar un modelo de estudio integrativo para comprender en su totalidad esta condición. Dada la complejidad de la enfermedad, el uso de modelos animales es muy limitado ya que no presentan los genes ortólogos al cromosoma 21 humano en un mismo cromosoma ^[2]. El modelo de ratón más cercano al SD presenta los genes ortólogos repartidos en tres cromosomas distintos, lo que dificulta la generación de un buen modelo de estudio ^[2].

Aquí toman importancia las investigaciones realizadas en células madre pluripotenciales inducidas (iPSC). Estas constituyen una nueva herramienta de investigación para modelar enfermedades genéticas complejas y además permiten su uso clínico en la regeneración de tejidos dañados ^[3]. Sin los problemas éticos de obtención que las células madres embrionarias, aunque ambas son similares en morfología, proliferación y expresión de genes ^[3], son un modelo de trabajo estandarizado, renovable y reproducible.

Las iPSC son producidas a partir de células somáticas tratadas para inducir su desdiferenciación mediante la activación de distintos genes ^[3]. A partir de este punto, las células alcanzan un estado pluripotencial donde expresan distintos marcadores de pluripotencialidad como OCT3/4, SOX2 o NANOG. Estas células son capaces de ser diferenciadas a distintos tipos celulares con los estímulos apropiados para eso. Esto da lugar a una nueva herramienta de trabajo en investigación y con un potencial uso en la clínica, al permitir regenerar tejidos para trasplantes autólogos ^[3]. Hasta el momento se tienen protocolos para diferenciar las iPSC en cardiomiocitos ^[28], neuronas ^[29] o hepatocitos ^[30], por nombrar algunos tejidos importantes.

Pese a ser tratadas para inducir la desdiferenciación, las iPSC tienen la ventaja de mantener su genotipo original. Esto genera un nuevo modelo de estudio *in vitro* para enfermedades genéticas complejas ^[2,3]. Al generar iPSC a partir de células de pacientes con SD, se obtienen iPSC que presentan la trisomía del par 21. Esto, sumado a su capacidad de volver a diferenciarse en distintos tipos celulares, nos da la oportunidad de analizar cómo la sobreexpresión de algún gen influye no solo en el fenotipo de las iPSC, sino también en los tipos celulares que se diferencian a partir de éstas y todo el fenotipo producto de la trisomía.

Como datos previos de laboratorio, se analizaron clones de iPSC obtenidos de pacientes normales (ahora las llamaremos iPSC 2s) y pacientes con la trisomía del par 21 (ahora las llamaremos iPSC 3s). Ambos clones presentaron los genes de pluripotencialidad OCT3/4 y SOX2. Se determinó que ambos clones presentan la isoforma de RCAN1.1, no así la isoforma RCAN1.4 que se expresa en muy bajos niveles en estas células, por no decir que no se expresa. Además, el silenciamiento de ambas isoformas de RCAN1 no afectó la pluripotencialidad de las iPSC (Fig. 6). Al revisar el trabajo recién publicado por el laboratorio ^[26], se ven diferencias en la morfología mitocondrial entre ambas células: las iPSC 3s presentan menor cantidad de mitocondrias y un volumen mitocondrial mayor que las iPSC 2s (Fig. 7A), mostrando una red mitocondrial más conectada. Además, al silenciar las isoformas de RCAN1 en las iPSC 3s, se ve que al silenciamiento de RCAN1.1 solo y en conjunto con RCAN1.4 (doble knockdown, dKD) aumentan la cantidad de las mitocondrias (Fig. 7B) y se reducen el volumen mitocondrial (Fig. 7C). Estos efectos no se observan al silenciar solamente con RCAN1.4.

En resumen, RCAN1 está aumentada en los pacientes con SD, que tiene un efecto regulador en la morfología mitocondrial disminuyendo la fisión y los procesos asociados a esta. Su sobreexpresión altera la morfología en distintos tipos celulares, incluyendo las iPSC,

generando mitocondrias más grandes y una red más fusionada. Dados estos datos, se buscó analizar el rol de RCAN1 sobre uno de los procesos asociados a la fisión mitocondrial, la mitofagia dependiente de la vía PINK1/Parkin en las iPSC. Además de esto, se estandarizó un proceso de diferenciación de 20 días para las iPSC 2s y las iPSC 3s hacia cardiomiocitos para futuros estudios donde se puedan aplicar los análisis de la morfología mitocondrial de las iPSC en procesos de diferenciación.

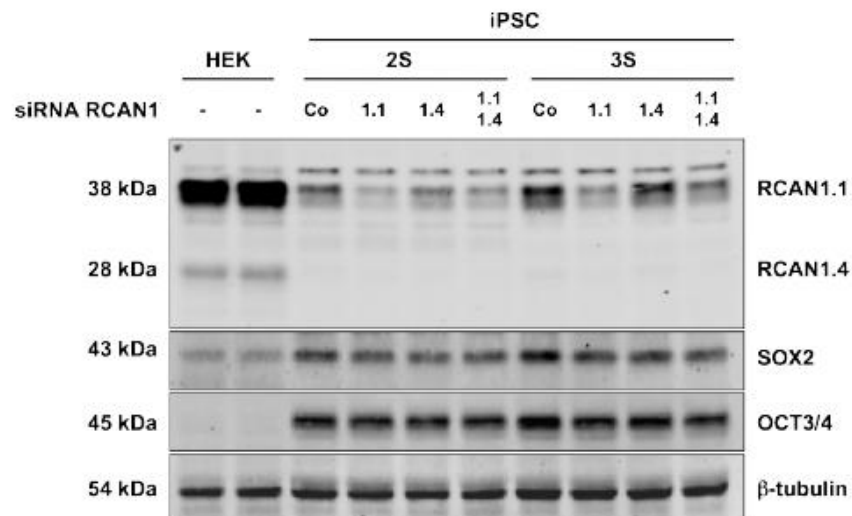


Figura 6: Caracterización de iPSC 2s y iPSC 3s

Western Blot donde se observa el silenciamiento de RCAN1 en las iPSC 2s y iPSC 3s utilizadas en laboratorio. RCAN1.1 se expresa en ambas iPSC y su silenciamiento disminuye sus niveles. Expresión de RCAN1.4 es casi nula en ambas iPSC. Marcadores de pluripotencialidad SOX2 y OCT3/4 se expresan en ambas iPSC, y el silenciamiento de RCAN1 no tiene efectos en los marcadores. Células HEK (línea celular de riñón humano embrionario) se utilizan como control negativo para marcadores de pluripotencialidad (figura adaptada de Parra et al (2018). *Circulation research*, CIRCRESAHA-117).

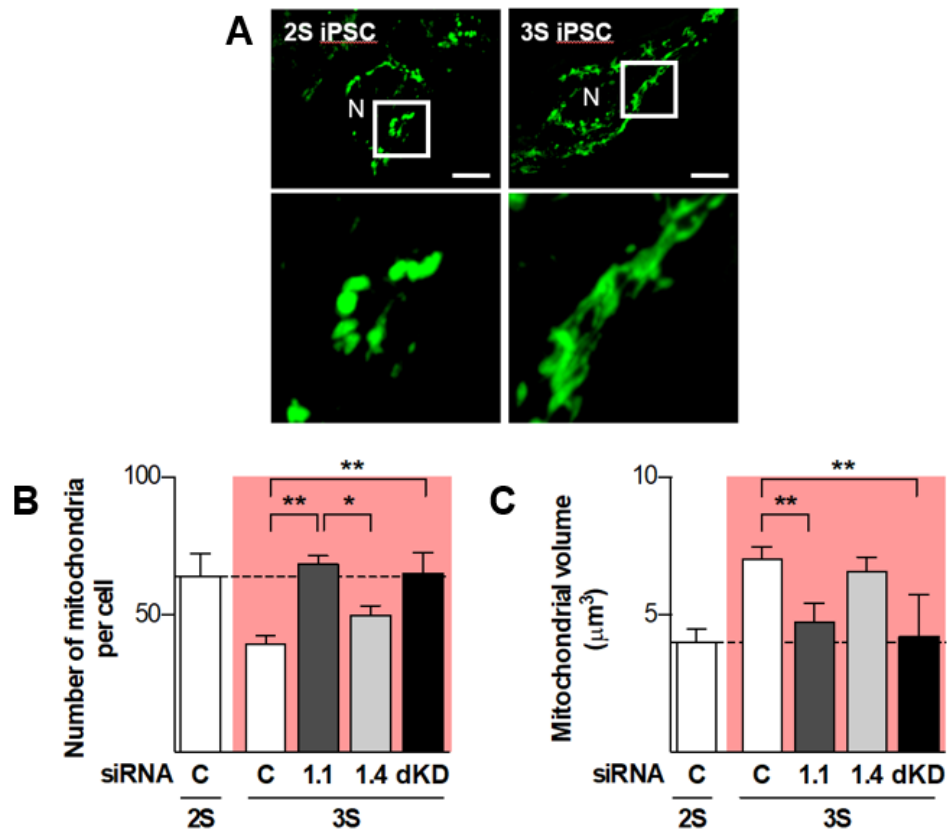


Figura 7: RCAN1 regula la morfología mitocondrial en las iPSC

(A) Las iPSC 2s presentan red mitocondrial más fisionada y con mitocondrias más pequeñas que las iPSC 3s. Células fueron teñidas con MitoTracker Green e imágenes tomadas por microscopía confocal. Análisis de los Z-stack tomador por esta técnica permite determinar el (B) número de mitocondrias por célula y (C) el volumen mitocondrial en las muestras iPSC 2s control y iPSC 3s silenciadas con siRCAN1.1, siRCAN1.4 y ambos (dKD) (figura adaptada de Parra et al (2018). *Circulation research*, CIRCRESAHA-117).

8 HIPÓTESIS

“La sobreexpresión de RCAN1, observada en la trisomía del SD, inhibe la mitofagia en células madres pluripotenciales inducidas (iPSC) trisómicas”.

8.1 Objetivo General

Determinar el rol de la sobreexpresión de RCAN1 sobre la mitofagia regulada por la vía PINK1/Parkin en iPSC trisómicas.

8.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar el proceso de mitofagia mediada por la vía PINK1/Parkin en las iPSC 2s y las iPSC 3s.
2. Determinar el efecto de la disminución de los niveles de RCAN1 en iPSC 3s sobre la actividad mitofágica.
3. Determinar el efecto de la sobreexpresión de RCAN1 en un modelo de iPSC 2s y si altera los niveles de mitofagia basales.

9 METODOLOGÍA

Se describirá a continuación la metodología utilizada durante el proyecto de tesis:

Reactivos: Los siguientes reactivos de obtuvieron de las correspondientes empresas: HEPES (485) fue obtenido de Amresco; inhibidor de proteínas quinasas asociadas a Rho (ROCK) Y-27632 (ORB227384) se obtuvo en Biorbyt; suero de albúmina bovina (BSA) (BM-0150) fue obtenido de BioslabChile; matriz de membrana Matrigel (354230) se obtuvo de CORNING; paraformaldehído 16% (PFA) (15710) se obtuvo de Electron Microscopy Sciences; kit de diferenciación de cardiomiocitos PSC (incluye Medio de Diferenciación A (MDA), Medio de Diferenciación B (MDB) y Medio de Mantenimiento de Cardiomiocitos (MMC)) (A2921201), medio esencial E8 (A1517001), medio reducido de suero Opti-MEM (31965070), medio RPMI 1640 (11879020) y Versene® (15040-066) se obtuvieron de GIBCO; dihidrorodamina 123 (DH-123) (D23806), lipofectamina™ RNA-iMAX (13778030), mitoTracker™ Green FM (MTG) (M7514), ProLong Gold™ + DAPI (P36935) y tetrametilrodamina metil ester perclorato (TMRM) (T668) se obtuvieron de Invitrogen; Normocin™ (ant-nr-2) se obtuvo de InvivoGen; ácido ascórbico (100127), albumina bovina fracción V (BAF V) (12659), azida de sodio (NaN₃) (106688), metanol (9070-03) y Triton X100 (108603) se obtuvieron de Merck; ácido láctico (L1250), carbonilcianida 3-clorofenilhidrazona (CCCP) (C2759) y oligomicina (O4876) se obtuvieron de Sigma-Aldrich; kit completo mTeSR™1 (#85850) fue obtenido de StemCell™; suero fetal bovino HyClone™ (SH30910.03) se obtuvo de Thermo Fischer Scientific. Los anticuerpos utilizados se especifican en la Tabla 1.

Los RNA pequeños de interferencia (siRNA) se compraron a Dharmacon™ ON-TARGETplus; Lafayette, CO, USA. Las secuencias de los siRNA son las siguientes: siRCAN1.1, sentido (5'-GCUUCAUUGACUGCGAGAAU-3'), antisentido (5'-UCUCGCAGUCAAGAAGCUU-3');

siRCAN1.4, sentido (5'-AGUGAUAUCUUCAGCGAAAUU-3'), antisentido (5'-UUUCGCUGAAGAUUAUCACUUU-3'). Se utilizaron adenovirus para β -galactosidasa (*Ad- β -gal*) y RCAN1.1 (*Ad-RCAN*) descritos en el paper ^[26].

Modelo celular: Para esta tesis se utilizó un modelo celular de iPSC de pacientes sanos (iPSC 2s) y pacientes que presentan la trisomía del par 21 (iPSC 3s) obtenidas a través del “MHLBI Progenitor Cell Biology Consortium” (<https://progenitorcells.org/>) y su obtención se describe en el paper ^[26]. Las iPSC se mantuvieron en medio E8 comercial + Normocin 1 mg/mL en una atmósfera humificada de CO₂ al 5% a 37°C, reponiendo medio cada dos días. Las células crecieron en placas recubiertas con Matrigel hasta alcanzar un 75-80% de confluencia ^[26].

Tratamiento adenoviral: Se utilizaron los adenovirus *Ad-RCAN* y *Ad- β -Gal*, como control positivo, de acuerdo con la metodología descrita en el paper ^[26]. Las placas a una confluencia de 60% se pre-incubaron 1 hora con Y-27632 10 μ M ^[31]. Se contabilizaron las células en uno de los pocillos para calcular una multiplicidad de infección de 1000 partículas virales por célula (MOI 1000). Se prepararon soluciones para la transducción en medio Optimem® utilizando los adenovirus, Y-27632 10 μ M y lipofectamina RNAiMax. Se transdujo por 1 hora y se completó volumen con medio E8 comercial e Y-27632 10 μ M. Pasadas 24 horas, se cambió el medio a E8 comercial + Normocin 1 mg/mL y se dejaron incubando por 24 horas previo a su análisis. Muestras se trataron con agente desacoplante CCCP 50 μ M para inducir mitofagia 30 minutos previo a su análisis. Se usaron las siguientes condiciones: Control, *Ad- β -gal* MOI 1000, *Ad- β -gal* MOI 1000 + CCCP, *Ad-RCAN* MOI 1000, *Ad-RCAN* MOI 1000 + CCCP.

Silenciamiento con siRNA: Se utilizaron los siRNA para RCAN1.1 y RCAN1.4 por separado y en conjunto (doble knockdown, dKD), y un control negativo de acuerdo con las instrucciones del fabricante donde solo se tratan las células con lipofectamina. Las placas a una confluencia de 60% se pre-incubaron 1 hora con Y-27632 10 μ M. Se prepararon soluciones para la transfección en

medio Optimem® utilizando siRNA 50 nM, Y-27632 10 μ M y lipofectamina RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se transfectó durante 1 hora y se completó volumen con medio E8 comercial e Y-27632 10 μ M. Pasadas 24 horas, se cambió el medio a E8 comercial + Normocin 1 mg/mL y se dejaron incubando por 24 horas previo a su análisis. Muestras se trataron con agente desacoplante CCCP 50 μ M para inducir mitofagia 30 minutos previo a su análisis. Para los análisis por Western-Blot e inmunofluorescencia se usaron las siguientes condiciones: Control, CCCP, siRCAN1.1, siRCAN1.4, dKD y sin tratamiento (S/T); en los análisis por citometría de flujo se descartó la condición S/T.

Determinación de $\Delta\psi_m$, masa mitocondrial y generación de ROS: Los análisis de los distintos parámetros se realizaron mediante citometría de flujo y utilizando las siguientes sondas: TMRM 200 nM (excitación/emisión 543/560) para el $\Delta\psi_m$, MTG 400 nM (excitación/emisión 488/530) para la masa mitocondrial, DH-123 25 μ M (excitación/emisión 510/580) para generación de ROS. Las placas a confluencia de 80% se incubaron con las sondas, el agente desacoplante CCCP 50 μ M [21] y oligomicina 10 μ M (inhibidor ATP sintasa), por 30 minutos, se soltaron las células con Versene® y suero KO y se analizó su fluorescencia por citometría de flujo (equipo BD Accuri™ C6). Se utilizó CCCP y oligomicina como controles positivos y negativos, respectivamente, para el análisis del $\Delta\psi_m$.

Inmunofluorescencia para Grp75 y Parkin: Las placas se lavaron con PBS 1x y se fijaron por 20 minutos con PFA 4% en hielo. Luego se permeabilizaron 10 minutos con Tritón 0,01%, se lavaron nuevamente con PBS 1x (al menos 4 lavados para eliminar el Tritón) y se bloquearon 1 hora con BSA 1%. Luego se lavaron con PBS 1x y se incubaron toda la noche con anti-Grp75 (proteína mtHsp70) y anti-Parkin. Al día siguiente se lavaron con PBS 1x y se incubaron 2 horas con los anticuerpos secundarios Alexa 488 anti-rabbit y Alexa 569 anti-mouse. Finalmente se lavaron con PBS 1x y se montaron las muestras en portaobjetos usando Prolong Gold + DAPI.

Las imágenes confocal se tomaron utilizando un microscopio Zeiss LSM-5 Pascal 5 Axiovert 200 usando el software para análisis y captura de imagen LSM 5 3.2, y un objetivo Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC. Imágenes se analizaron con el software ImageJ para obtener coeficiente de Manders.

Cuantificación de proteínas: Placas se lavaron con PBS 1X y se lisaron con buffer RIPA + NP40. Se recolectó el sobrenadante en tubos, se centrifugaron a 12000 rcf por 12 minutos a 4°C, se recuperó la fase acuosa y se cuantificó mediante el método de Bradford. Las muestras fueron denaturadas con azul de bromofenol y β -mercaptoetanol por 5 minutos a 95°C a concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Western-Blot para Grp75, PGC-1 α , PINK1, RCAN1 y β -tubulina: Se corrieron 30 μg de las muestras en geles SDS-PAGE al 12% (Upper: Tris 0,5 M, SDS 1,4 mM, pH 6,8 HCl; Lower: Tris 1,5 M, SDS 1,4 mM, pH 8,8 HCl) en buffer electroforesis 1x (Tris 25 mM, glicina 0,19 M, SDS 3,5 mM) y se transfirieron las proteínas a membranas PDVF con 600 mA y buffer de transferencia 1x (Tris 25 mM, glicina 0,19 M, 20% metanol). Las membranas se bloquearon con leche en polvo al 5% en TBS-T (Tris 25 mM, KCl 27 mM, NaCl 0,14 M, 0,1% Tween 20, pH 7,4) y se dejaron toda la noche incubando con anticuerpo primario en solución de bloqueo (1,5% BSA, 0,05% NaN_3). Al día siguiente, las membranas se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios asociados a peroxidasa de rábano en solución de bloqueo por 2 horas previo a revelar. Las muestras se revelaron en equipo un G:BOX Chemi XT4 de SysGene. Las cuantificaciones se normalizaron respecto a la β -tubulina por un análisis densiométrico usando el programa ImageJ.

Análisis estadístico: la normalización de los datos se realizó en base al segundo método analizado en Degasperi et al ^[32]. Los datos se analizaron por ANOVA de una o dos vías dependiendo de los experimentos, y las comparaciones entre grupos se hicieron por un test de Tukey.

Tabla 1: Lista de anticuerpos

Anticuerpo	N° catálogo	Empresa	Especie	Dilución
Anti-Grp75	ab53098	Abcam	Conejo	1:500 (IF) 1:1000 (WB)
Anti-Parkin	MAB5512	Merck	Ratón	1:500 (IF) 1:1000 (WB)
Anti-PGC-1 α	NBP1-04676	NOVUS	Conejo	1:1000 (WB)
Anti-PINK1	ab23707	Abcam	Conejo	1:1000 (WB)
Anti-RCAN1	abx004072	Abexxa	Ratón	1:1000 (WB)
Anti- β tubulina	BT7R	ThermoFisher	Ratón	1:5000 (WB)
Alexa Fluor® 488 anti-rabbit	A11034	Life	Cabra	1:300 (IF)
Alexa Fluor® 568 anti-mouse	A11031	Life	Cabra	1:300 (IF)
Anti-Mouse IgG	402335	Calbiochem	Conejo	1:5000 (WB)
Anti-Rabbit IgG	401315	Calbiochem	Cabra	1:5000 (WB)

Se especifica empresa, especie y diluciones utilizadas dependiendo del experimento en que se usaron.

10 RESULTADOS

Debido a las condiciones experimentales utilizadas, los resultados de los objetivos 1 y 2 se describen en las mismas figuras:

10.1 El aumento de RCAN1 disminuye el $\Delta\psi_m$ y aumenta la producción de ROS en las mitocondrias de las iPSC

Ya que la bibliografía indica que existen problemas metabólicos en los pacientes con SD, primero se evaluó si existía diferencia en el $\Delta\psi_m$ entre las iPSC 2s y las iPSC 3s. Se utilizó la sonda TMRM para medir el $\Delta\psi_m$ de las muestras, y se determinó que el $\Delta\psi_m$ basal de las iPSC 3s es significativamente mayor respecto a las iPSC 2s (Fig. 8A). El potencial de ambas células

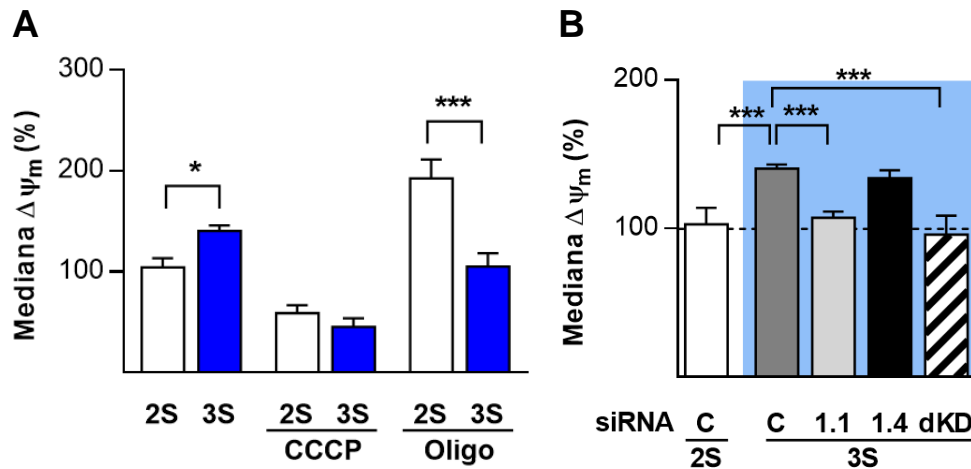


Figura 8: RCAN1 altera el $\Delta\psi_m$ en las iPSC 3s

(A) El $\Delta\psi_m$ basal, mínimo (CCCP) y máximo (Oligo) en las iPSC 2s y 3s (n=5). (B) Efecto del silenciamiento de RCAN1 sobre el $\Delta\psi_m$ en las iPSC 3s. Se presentan condiciones iPSC 2s Control y iPSC 3s Control y silenciadas con siRCAN1.1, siRCAN1.4 y dKD (n=5). Muestras fueron tratadas con TMRM y mediciones fueron normalizadas con MTG. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

respondió de igual forma al tratamiento con CCCP, pero al tratarlas con oligomicina el $\Delta\psi_m$ de las iPSC 3s no aumentó, incluso hubo una tendencia a su disminución respecto a su condición control.

Después, ya que sabemos que RCAN1 afecta la morfología mitocondrial en las iPSC, se determinó si este cambio en el $\Delta\psi_m$ también es dependiente de RCAN1. Al analizar los silenciamientos de las iPSC 3s, vemos que tanto el siRCAN1.1 y el dKD disminuyeron el $\Delta\psi_m$ hasta alcanzar niveles similares a las iPSC 2s, mientras que el siRCAN1.4 no afectó el $\Delta\psi_m$ (Fig. 8B).

Posterior a esto, se vio si había diferencias en la producción de ROS en las células. Se observó que las iPSC 3s tienen una mayor producción de ROS con respecto a las iPSC 2s. Además, al analizar si este aumento en las iPSC 3s es dependiente de RCAN1, se apreció que al tratar las células con siRCAN1.1 y el dKD la producción de ROS disminuía a niveles similares a las iPSC 2s, no así al tratarlas sólo con el siRCAN1.4 (Fig. 9).

Para finalizar con estos experimentos, se analizó también la señal de MTG con citometría de flujo en todas las muestras para determinar si la masa mitocondrial cambiaba, determinando que la masa no variaba significativamente en ninguna de las condiciones estudiadas (Fig. 10). Con los resultados del bajo $\Delta\psi_m$, la alta producción de ROS y la mantención de la masa mitocondrial, se vio que hay indicios de que las mitocondrias de las iPSC 3s tenían un metabolismo deficiente y que estos cambios eran dependientes de la expresión de RCAN1, específicamente, la isoforma RCAN1.1.

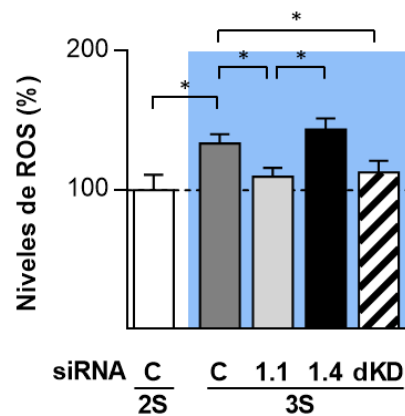


Figura 9: Generación de ROS en las mitocondrias iPSC 3s es dependiente de RCAN1

Células tratadas con DH-123 para medir la generación de ROS en las células. Gráfico representativo para visualizar expresión de ROS en las iPSC. Las iPSC 3s generan más ROS que las iPSC 2s, efecto que se ve inhibido con siRCAN1.1 y el dKD. El siRCAN1.4 no tuvo efectos en la generación de ROS de las iPSC 3s. (n=4). *P<0,05

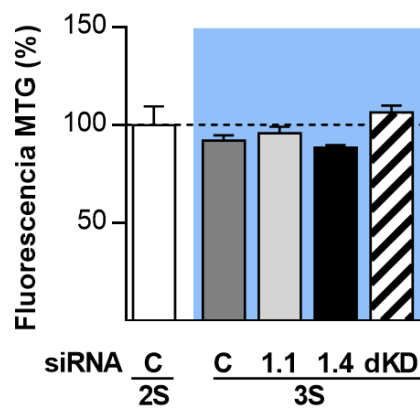


Figura 10: Masa mitocondrial no varía en las iPSC 2s y iPSC 3s

Gráfico muestra iPSC 2s control y iPSC 3s control y silenciadas. Muestras fueron tratadas con MTG y analizadas por citometría de flujo (n=5).

10.2 El aumento de RCAN1 disminuye la activación de vía mitofágica regulada por PINK1/Parkin en las iPSC

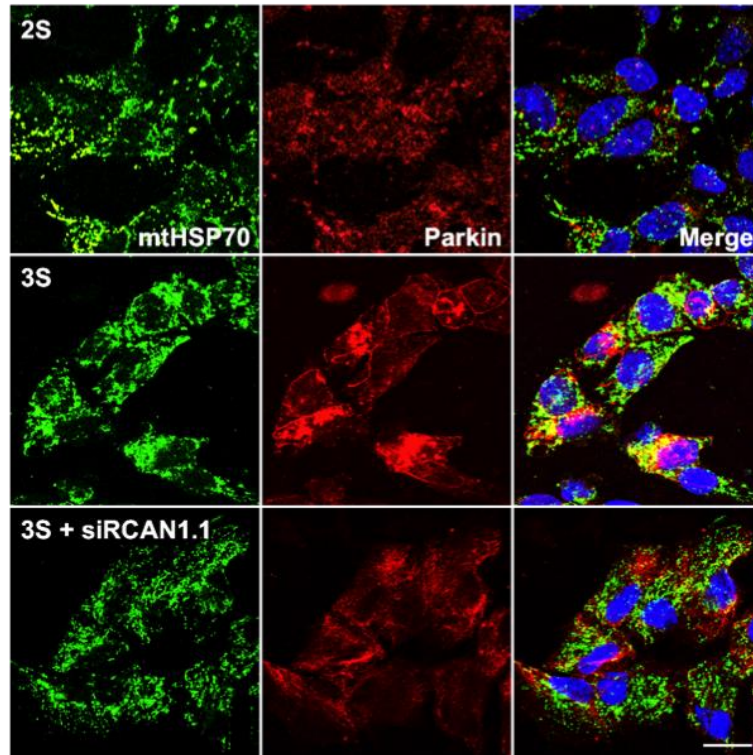
Una vez determinado que existe una diferencia en el $\Delta\psi_m$ que afecta el funcionamiento de las mitocondrias de las iPSC 3s, se prosiguió a analizar la morfología de las mitocondrias y la activación de la vía PINK1/Parkin. Se realizó una inmunofluorescencia de las iPSC donde se marcaron la proteína mitocondrial mtHsp70 con anticuerpo anti-Grp75 y un secundario que emite fluorescencia verde, y la proteína Parkin con anticuerpo anti-Parkin y un secundario que emite fluorescencia roja. Se analizó la morfología mitocondrial y la colocalización de ambas proteínas.

En concordancia con los datos obtenidos en el trabajo publicado por el laboratorio ^[26], las mitocondrias en las iPSC 2s son más abundantes, con un volumen pequeño y una red mitocondrial más fragmentada. Las mitocondrias de las iPSC 3s son de mayor tamaño y tienen una red mitocondrial más conectada. Al analizar la señal de Parkin, se vio que las iPSC 2s mostraron una localización citoplasmática. Las iPSC 3s mostraron una distribución aberrante respecto a las iPSC 2s y localizada hacia la membrana plasmática (Fig. 11A). La colocalización de Parkin con las mitocondrias es menor en las iPSC 3s (Fig. 11B). Esto sugiere que hay problemas en la activación de la vía PINK1/Parkin en las iPSC 3s. Pese a esto, la colocalización en las iPSC 3s aumentó considerablemente al tratarlas con CCCP, indicando que las células aún pueden activar mitofagia con el estímulo adecuado (Fig. 11B).

Al silenciar las iPSC 3s, el tratamiento con siRCAN1.1 redujo la morfología mitocondrial a una más fragmentada, tal como se observó en el trabajo previo. Al analizar Parkin, se vio que la señal disminuye a niveles similares a los observados en las iPSC 2s (Fig. 11A). Al observar la colocalización con las mitocondrias, vemos que ésta aumentó con siRCAN1.1 y el dKD, aunque

no se restauró por completo los niveles basales observados en las iPSC 2s. El siRCAN1.4 no

A



B

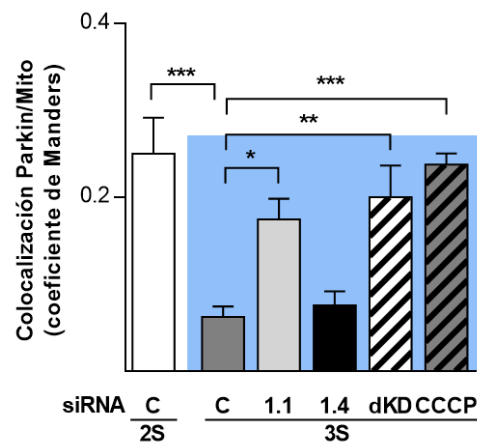


Figura 11: Localización de la proteína Parkin es distinta entre iPSC 2s y iPSC 3s

(A) Inmunofluorescencia que muestra señal de las mitocondrias (verde), Parkin (rojo) y el núcleo con DAPI (azul) en las iPSC 2s, iPSC 3s y iPSC 3s + siRCAN1.1 (barra de escala: 10 μ m) (n=6). (B) Coeficiente de Manders que muestra colocalización de Parkin con las mitocondrias. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

tiene efectos en ninguno de los parámetros. Los datos nos sugieren que en las iPSC 3s Parkin colocaliza menos con las mitocondrias, y la colocalización se restaura al silenciar RCAN1.1, mostrando diferencias ya en la mitofagia entre iPSC 2s y iPSC 3s.

Una vez vista la colocalización de Parkin en las mitocondrias, se analizó la expresión de las proteínas mtHsp70, PGC-1 α (marcador de biogénesis mitocondrial), PINK1 y RCAN1 en las iPSC 2s y iPSC 3s. Se realizó un Western-Blot para ver la activación de las proteínas involucradas en la vía (Fig. 12A), además de confirmar que el silenciamiento con los distintos siRNA efectivamente reducen la expresión de la isoforma RCAN1.1 en las iPSC 2s y iPSC 3s, siendo los tratamientos con siRCAN1.1 y el dKD los más efectivos (Fig. 12B). Se observó que la expresión de PINK1 en las iPSC 2s se mantuvo constante en todas las muestras. En las iPSC 3s la expresión estaba disminuida a la mitad de los valores basales. En las muestras silenciadas el siRCAN1.1 y el dKD recuperaron en parte los niveles de PINK1, sin alcanzar los niveles basales observados en las iPSC 2s (Fig. 12C).

Para confirmar que los cambios no implicaban un cambio en la masa de las mitocondrias y la biogénesis mitocondrial, se analizó el marcador de biogénesis PGC-1 α y la proteína mtHsp70. Ambos marcadores no varían de forma significativa en las muestras (Fig. 12D). Estos datos apoyan los resultados observados por citometría de flujo en la Fig. 10. Esto nos sugiere que las iPSC 3s tienen una menor expresión de PINK1, lo cual podría estar dificultando la activación de la vía PINK1/Parkin en estas células, y que esto afectaría las células a nivel de mitofagia y no de biogénesis.

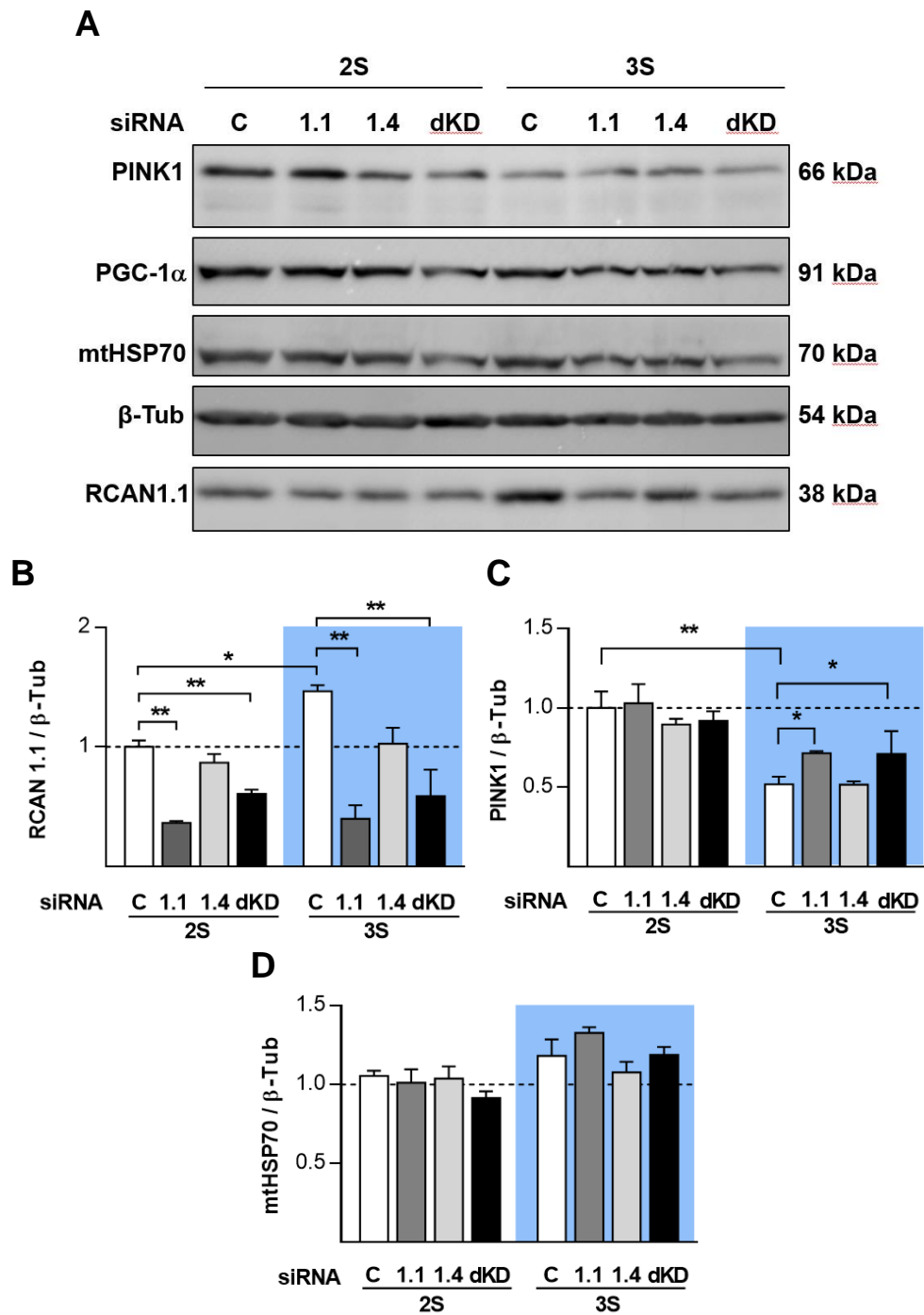


Figura 12: Expresión de PINK1 esta disminuida en las iPSC 3s

(A) Western-Blot que muestra la expresión de las proteínas mtHsp70, PGC-1 α , PINK1, RCAN1.1 y β -tubulina (β -Tub) en las muestras silenciadas de iPSC 2s y iPSC 3s. La cuantificación de las proteínas (B) PINK1 y (C) mtHsp70 se normalizó en base a β -tubulina (n=5). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

10.3 El aumento de RCAN1 por adenovirus en las iPSC 2s produce una disminución en la expresión de PINK1

Una vez determinado que las iPSC 3s tienen una disminución en la expresión de PINK1, y que al inhibir la expresión de la isoforma RCAN1.1 se recuperan los niveles de la proteína, se buscó ver si este efecto se repetía al aumentar los niveles basales de RCAN1.1 en las iPSC 2s. Para esto, se sobreexpresó la isoforma RCAN1.1 en las iPSC 2s con un adenovirus para RCAN1.1 (*Ad-RCAN*) y se usó como control un adenovirus para β -galactosidasa (*Ad- β -gal*). Se analizaron las muestras por Western-Blot para ver la expresión de PINK1 y RCAN1.1 (Fig. 13A). Al cuantificar las muestras se confirmó que la trasducción con *Ad-RCAN* aumentó los niveles de RCAN1.1 respecto al *Ad- β -gal* (Fig. 13B) a niveles similares a los observados en las iPSC 3s (Fig. 12B).

En condiciones basales, los niveles de PINK1 disminuyeron al tratar con *Ad-RCAN* (Fig. 13C) de forma similar a lo observado en las iPSC 3s (Fig. 12C). Al tratar las muestras con el inductor de mitofagia CCCP, se observó que ambas muestras aumentaban la expresión de PINK1, por lo que ambas deben ser capaces de inducir la vía mitofágica PINK1/Parkin. Sin embargo, este aumento fue mucho menor en las iPSC con *Ad-RCAN*, (Fig. 13C): Estos datos sugieren que un aumento en la expresión de RCAN1.1 en las iPSC 2s es suficiente para disminuir los niveles basales de PINK1 y dificultar la activación de la mitofagia por la vía PINK1/Parkin.

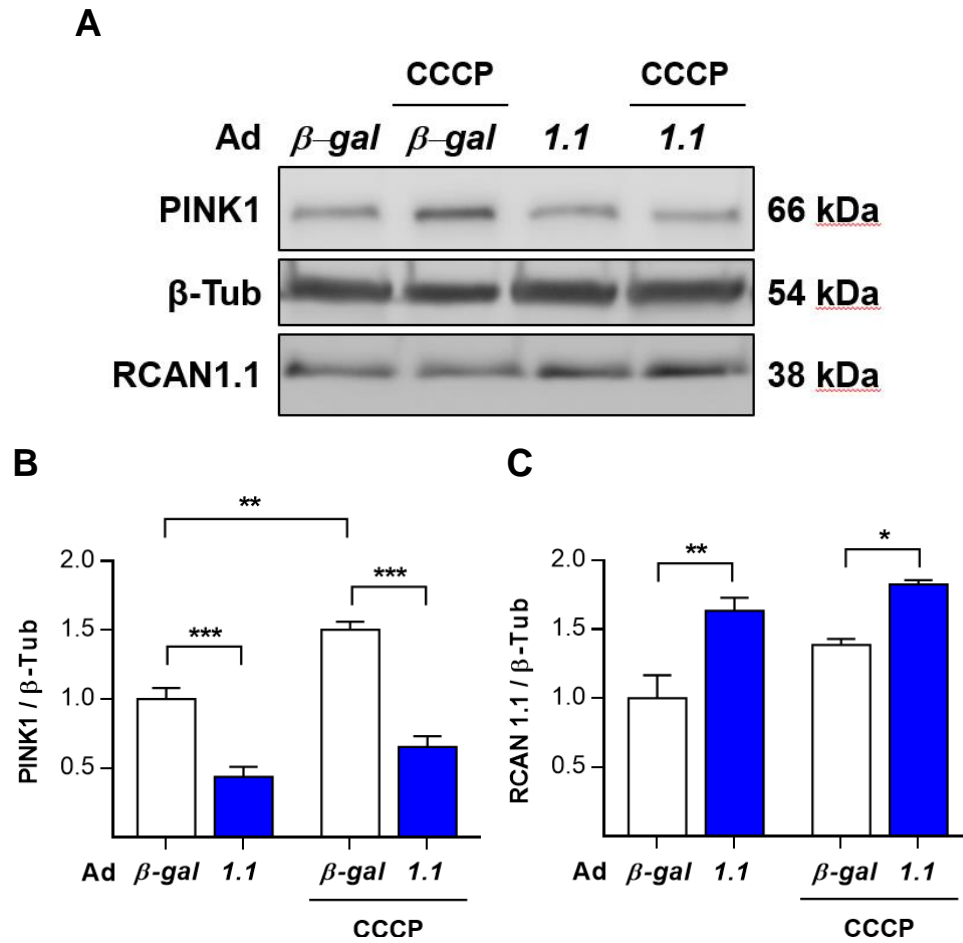


Figura 13: El aumento de RCAN1 en las iPSC 2s disminuye los niveles basales de PINK1

(A) Western-Blot que muestra la expresión de las proteínas PINK1, RCAN1.1 y β -tubulina (β -Tub) en las iPSC 2s transducidas. La cuantificación de las proteínas (B) PINK1 y (C) RCAN1.1 se normalizó en base a β -tubulina (n=4). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

11 DISCUSIÓN

11.1 SD y vía PINK1/Parkin

El SD es un trastorno genético que se caracteriza por la sobreexpresión de distintos genes producto de una copia extra del cromosoma 21, entre ellos RCAN1^[9]. Este gen codifica un regulador que inhibe la activación de la CaN. Esta fosfatasa afecta la morfología mitocondrial, y su inhibición disminuye la fisión y genera mitocondrias más grandes^[26]. En este trabajo, se utilizaron iPSC que presentan la trisomía del par 21 para analizar su metabolismo mitocondrial y su degradación. Se detectó un aumento en el $\Delta\psi_m$ y la generación de ROS en las iPSC con la trisomía. Además, se observó que estas iPSC con trisomía presentan menor activación de la vía mitofágica regulada por PINK1/Parkin. Todos estos cambios fueron dependientes de los niveles de RCAN1, específicamente, la isoforma RCAN1.1.

11.2 Integridad mitocondrial y vía PINK1/Parkin

En el trabajo previamente publicado por Parra et al^[26], se analizó la tasa de consumo de O₂ (OCR) de las iPSC 2s y iPSC 3s. Se determinó que la OCR de las iPSC 3s es mayor que la de las iPSC 2s. Sin embargo, al añadir CCCP a las muestras, el OCR de las iPSC 3s no cambió, indicando que, pese a tener un mayor consumo de O₂ que las iPSC 2s, las iPSC 3s presentaban un metabolismo glucolítico que funcionaba al máximo de su capacidad para así satisfacer la demanda energética de estas células^[33]. Al analizar los datos del $\Delta\psi_m$ en las iPSC 3s, esta idea parece confirmarse. El $\Delta\psi_m$ de estas células también está aumentado con respecto a las iPSC 2s. Al añadir oligomicina a las muestras, el $\Delta\psi_m$ se mantuvo e, incluso, tendió a disminuir respecto a su muestra control. Esto puede explicarse debido a que, si el metabolismo de las iPSC 3s ya está al máximo, al inhibir la ATP sintasa las células no tienen suficientes sustratos para seguir generando NADH

y FADH₂ a través del ciclo de Krebs en las cantidades suficientes. Esto evitaría que el $\Delta\psi_m$ aumente o que su aumento no sea sostenible en el tiempo al momento de analizar las células. Sumando a esto, los datos obtenidos con la generación de ROS en las mitocondrias, tradicionalmente usados como marcador de daño por la generación de estrés oxidativo y la activación de vías autofágicas en la célula ^[19,23], determinamos que en las iPSC 3s la generación de ROS también está aumentada respecto a las iPSC 2s. Esto reforzaría la idea que el metabolismo de las mitocondrias en las iPSC 3s está comprometido.

En las iPSC 3s se observó una distribución distinta de la proteína Parkin. Pese a presentar una señal más intensa que las iPSC 2s, las iPSC 3s presentaron menor colocalización con las mitocondrias. Además, al observar la expresión de PINK1 en las mitocondrias, en las iPSC 3s la proteína tuvo niveles más bajos que en los encontrados en las iPSC 2s. Esto puede deberse a que los niveles de PINK1 disminuyeron en las mitocondrias por su degradación en la membrana mitocondrial interna producto su migración por el $\Delta\psi_m$. Al estar éste aumentado en las iPSC 3s, la degradación de PINK1 aumentó aún más, dificultando su acumulación necesaria para la activación de la vía mitofágica PINK1/Parkin. Esto explicaría la distribución de Parkin en las iPSC 3s, ya que al no acumularse PINK1 no se generarían las señales adecuadas para que Parkin migre y se acumule en las mitocondrias y active su degradación. Lamentablemente, no se encontró mucha información sobre la acumulación extraña de Parkin en la bibliografía ya que no es un tema muy estudiado en la actualidad. Por esto son necesarios más estudios para entender el comportamiento de Parkin en estas circunstancias. Dos estudios específicos analizaron la acumulación de Parkin en las mitocondrias en distintos estados: uno de ellos relacionó un aumento en la actividad de la proteína quinasa A con una disminución de PINK1 y menor colocalización de Parkin con la mitocondria ^[34]. El otro relacionó la colocalización de Parkin con el crecimiento de las células, indicando una mayor acumulación de Parkin en el citoplasma en células jóvenes y

su posterior migración a las mitocondrias a medida que maduran ^[35]. Sin embargo, ninguno de los estudios utilizó iPSC como modelos de trabajo. En ambos modelos el $\Delta\psi_m$ disminuye o se mantiene constante, respectivamente. Estos resultados son diferentes de las iPSC 3s donde se observó un $\Delta\psi_m$ aumentado. Aunque ambos estudios sirven como evidencia como punto de partida para futuros análisis que describan mejor la interacción de Parkin con las mitocondrias en estas células, se destaca que no se encontraron mayores estudios que describieran la migración de Parkin ante un $\Delta\psi_m$ aumentado.

Como análisis extra, se analizó la proteína mtHsp70 para ver cambios en la masa mitocondrial y el marcador de biogénesis mitocondrial PGC-1 α para ver la activación de la biogénesis mitocondrial. Ninguna de las muestras presentó cambios significativos en los niveles de mtHsp70, indicando que la masa mitocondrial se mantuvo constante, afirmación que se respalda con los resultados de MTG por citometría de flujo. Sin embargo, tampoco se observan cambios en los niveles de PGC-1 α en ninguna de las muestras, indicando que la biogénesis se mantuvo constante. Este resultado es sorprendente ya que se observa una acumulación de mitocondrias disfuncionales y una masa mitocondrial constante. Para mantener la masa constante, se esperaba que el marcador PGC-1 α estuviera disminuido en las iPSC 3s, pero su expresión no cambió. Una de las posibles explicaciones para este fenómeno es que la biogénesis mitocondrial se mantiene, pero la degradación de las mitocondrias ocurre por una vía independiente de la mitofagia regulada por PINK1/Parkin. Lamentablemente, la bibliografía solo proporcionó información sobre otras vías mitofágicas en tejidos derivados de las iPSC, por lo que no sabemos si existen otras vías mitofágicas en ellas aparte de la vía PINK1/Parkin. A futuro, será necesario estudiar los mecanismos por los cuales la biogénesis se mantiene en las iPSC 3s. Una estrategia sería buscar marcadores específicos de autofagia para ver si se produce degradación o no en las

muestras, o estudiar si las iPSC poseen vías alternativas de mitofagia como la vía regulada por NIX y BNIP3 ^[21].

11.3 Rol de RCAN1 y modelo final

La proteína RCAN1 esta aumentada en los pacientes con SD. Su acumulación en las iPSC tiene efectos en la morfología mitocondrial, generando mitocondrias de mayor tamaño. De las dos isoformas más comunes de RCAN1 en el organismo, RCAN1.1 y RCAN1.4, las iPSC expresan principalmente la isoforma RCAN1.1 y presentan una expresión casi nula de RCAN1.4. Esto se asemeja a los resultados de la bibliografía, donde se observa que la isoforma RCAN1.1 se expresa más en muestras fetales, mientras que la isoforma RCAN1.4 se expresa más en tejidos adultos ^[11]. Ya que las iPSC representan un estado de pluripotencialidad, la expresión de las distintas isoformas de RCAN1 se asemeja a lo observado en la naturaleza. En las iPSC 3s se determinó que el silenciamiento con el dKD de RCAN1 no solo disminuyó el volumen mitocondrial, además disminuyó el $\Delta\psi_m$, la generación de ROS, y aumentó la migración de Parkin a la mitocondria y los niveles de PINK1. Al analizar cada isoforma, se observaron los mismos efectos con el silenciamiento de RCAN1.1, mientras el silenciamiento de RCAN1.4 no tuvo efecto en ninguno de los parámetros analizados. Además, al sobreexpresar los niveles de RCAN1.1 en las iPSC 2s a niveles similares a los observados en las iPSC 3s, también se observó una disminución similar de los niveles de PINK1. Esto nos indica que, además de ser la isoforma más expresada, RCAN1.1 es la isoforma con mayor importancia biológica en las iPSC. Además, en el trabajo publicado previamente por Parra et al ^[26] se analizó el rol de RCAN1 en la morfología mitocondrial de las iPSC y de cardiomiocitos de ratones. Pese a que los cardiomiocitos también expresan la isoforma RCAN1.4, la variación de sus niveles no afecta la integridad de las mitocondrias en las células. Se demostró que, al igual que en las iPSC, el metabolismo y la

morfología mitocondrial es regulada por los niveles de RCAN1.1 en los cardiomiocitos. En conjunto, los datos nos hacen sospechar que la isoforma RCAN1.1 es la principal reguladora de la función mitocondrial. Para corroborar esta hipótesis, se deben analizar más modelos celulares que muestren la expresión de ambas isoformas de RCAN1.

De acuerdo con los resultados observados en esta tesis, se propone que parte de los cambios que se producen en la morfología mitocondrial serían producto de la acción indirecta de RCAN1 sobre los procesos mitocondriales asociados a la morfología. Como RCAN1 disminuye la activación de DRP1, necesaria para separar las mitocondrias dañadas de la red mitocondrial previo a degradarlas por mitofagia, estas se acumularían, generando mayor cantidad de ROS, dañando más las mitocondrias y perjudicando su metabolismo. Estos efectos forzarían a aumentar

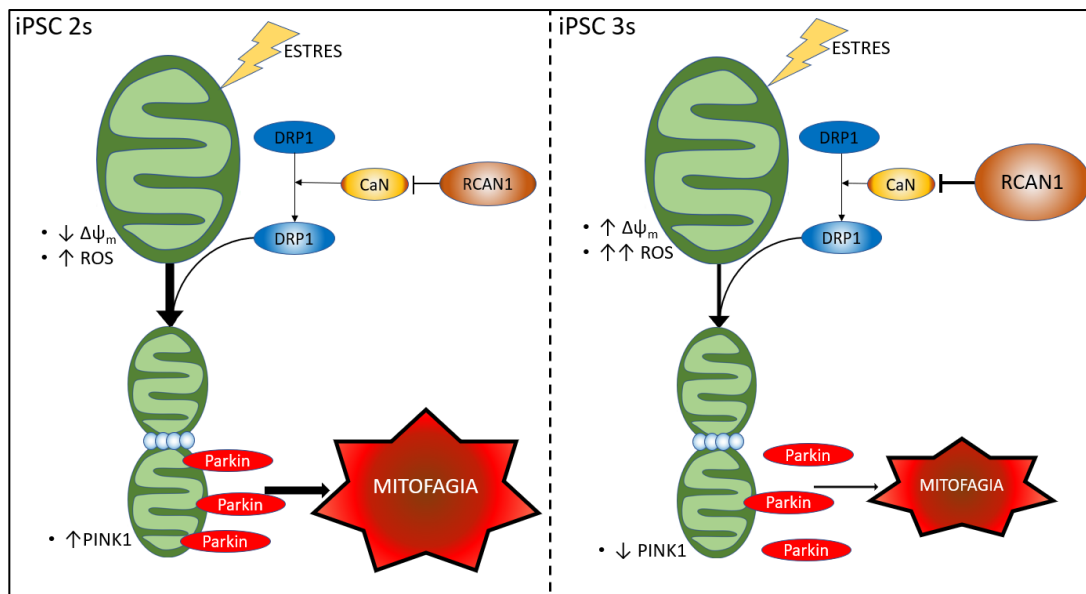


Figura 14: Modelo de trabajo propuesto para relación de RCAN1 con la mitofagia

La sobreexpresión de RCAN1 inhibe la actividad de la CaN, inhibiendo la activación de DRP1 necesaria para la fisión mitocondrial. Las mitocondrias dañadas no se separan de la red mitocondrial, lo que produce un aumento en la generación de ROS y el $\Delta\psi_m$, lo que disminuye los niveles de PINK1 y dificulta la colocalización de Parkin con las mitocondrias, inhibiendo la mitofagia.

su $\Delta\psi_m$ para compensar la demanda energética, disminuyendo más los niveles de PINK1 y dificultando la activación de la vía mitofágica PINK1/Parkin. El modelo final del trabajo propuesto se presenta en la Fig. 14.

Diferenciación de iPSC en cardiomiocitos (ver Anexo)

Las iPSC, al igual que las células madre embrionarias, tienen una red mitocondrial que refleja un metabolismo glucolítico, como la mayoría de las células del organismo. Como se observó en la bibliografía ^[8], los cardiomiocitos pasan por un remodelado profundo de la red mitocondrial para adecuarse al metabolismo β -oxidativo, generando una red mitocondrial más conectada ^[8,19]. Cualquier cambio que altere la dinámica mitocondrial durante este proceso de adaptación metabólica puede repercutir en el desarrollo de distintas patologías. Dada la alta demanda metabólica en el corazón, la desregulación de la red mitocondrial durante la diferenciación tiene mayor probabilidad de producir cardiopatías. Ya que más del 50% de los individuos con SD nacen con algún problema congénito asociado, una de las posibles causas de esto puede deberse a la sobreexpresión de RCAN1 que interviene con el remodelado de la red mitocondrial durante la diferenciación y generando cardiomiocitos deficientes.

En esta tesis, vemos que existen problemas metabólicos en las iPSC 3s. Las células presentan diferencias en la morfología de las mitocondrias respecto a las iPSC 2s. El cambio en la red mitocondrial visto en estas líneas es regulado en gran parte por RCAN1 y sus efectos en la activación de DRP1 y la mitofagia vía PINK1/Parkin. La finalidad de proceso fue ver si era posible la diferenciación de iPSC 3s en cardiomiocitos y, si los resultados eran positivos, estandarizar el proceso para futuros análisis. Pese a que se observaron diferencias en los latidos entre los cardiomiocitos diferenciados de iPSC 2s y los cardiomiocitos diferenciados de iPSC 3s, son necesarios más análisis a futuro para confirmar que estos cardiomiocitos diferenciados tienen un metabolismo deficiente.

11.4 Proyecciones

Las proyecciones de esta investigación son muchas. Se debe evaluar por qué el marcador de biogénesis mitocondrial no varía en las iPSC 3s pese tener menor activación de la mitofagia y su masa mitocondrial contante. Ya que es posible diferenciar las iPSC 3s en cardiomiocitos, es debe evaluar si poseen una red mitocondrial distinta a los cardiomiocitos derivados de iPSC 2s. También se debe evaluar si el metabolismo de los cardiomiocitos derivados de iPSC 3s está comprometido respecto al de los cardiomiocitos derivados de iPSC 2s.

Otro aspecto importante por evaluar es el rol de RCAN1 en estos cardiomiocitos diferenciados. A diferencia de las iPSC, el corazón presenta las isoformas RCAN1.1 y RCAN1.4 en abundancia ^[13]. Otro enfoque de estudio sería determinar si los cardiomiocitos diferenciados expresan la isoforma RCAN1.4 y cuál de las dos isoformas es la más biológicamente importante en ellos. Como se observa en el trabajo de Parra et al ^[26], en cardiomiocitos de ratón la isoforma RCAN1.4 no tiene efectos sobre la función mitocondrial. Es necesario ver si este efecto se mantiene en los cardiomiocitos diferenciados o si estos tienen mayor incidencia en estas mitocondrias. De poder realizar estos estudios con éxito, sería posible su aplicación en futuros análisis que abarquen la diferenciación a distintos tejidos de pacientes con SD para comprender mejor el desarrollo de este trastorno.

11.5 Conclusiones finales

En esta tesis hemos concluido que:

- Las iPSC 3s tienen mayor $\Delta\psi_m$ y mayor producción de ROS que las iPSC 2s.
- Las iPSC 3s tienen una localización distinta de la proteína Parkin respecto a las iPSC 2s y menor colocalización de Parkin con las mitocondrias.
- Las iPSC 3s tienen menores niveles de PINK1 que las iPSC 2s.

- El silenciamiento de RCAN1.1 en las iPSC 3s disminuye el $\Delta\psi_m$ y la producción de ROS.
- El silenciamiento de RCAN1.1 en las iPSC 3s aumenta la colocalización de Parkin con las mitocondrias y los niveles de PINK1.
- La sobreexpresión de RCAN1.1 en las iPSC 2s disminuye los niveles basales de PINK1.

Finalmente, concluimos en esta tesis que la activación de la mitofagia regulada por la vía PINK1/Parkin es regulada por la isoforma RCAN1.1 en las iPSC, y un aumento en sus niveles disminuye la activación de la vía como se observa en las muestras de pacientes con SD.

12 BIBLIOGRAFÍA

- [1] BRIGIDA, A. L., & SINISCALCO, D. (2016). Induced pluripotent stem cells as a cellular model for studying Down Syndrome. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine*, 12(2), 54.
- [2] BRIGGS, J. A., MASON, E. A., OVCHINNIKOV, D. A., WELLS, C. A., & WOLVETANG, E. J. (2013). Concise review: new paradigms for Down syndrome research using induced pluripotent stem cells: tackling complex human genetic disease. *STEM CELLS Translational Medicine*, 2(3), 175-184.
- [3] CAO, Y., & ZHANG, P. Y. (2017). Regenerative medicine in cardiovascular diseases—an update. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21(6), 1335-1340.
- [4] LEPETA, K., LOURENCO, M. V., SCHWEITZER, B. C., ADAMI, P. V. M., BANERJEE, P., CATUARA-SOLARZ, S., DE LA FUENTE REVENGA, M., GUILLEM, A. M., HAIDAR, M., IJOMONE, O. M., NADORP, B., QI, L., PERERA, N. D., REFSGAARD, L. K., REID, K. M., SABBAR, M., SAHOO, A., SCHAEFER, N., SHEEAN, R. K., SUSKA, A., VERMA, R., VICIDOMINI, C., WRIGHT, D., ZHANG, X., & SEIDENBECHER, C. (2016). Synaptopathies: synaptic dysfunction in neurological disorders—A review from students to students. *Journal of Neurochemistry*, 138(6), 785.
- [5] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Genes and chromosomal diseases: Down Syndrome. <<http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index1.html>> [consulta: 25 abril 2018].
- [6] LANA-ELOLA, E., WATSON-SCALES, S. D., FISHER, E. M., & TYBULEWICZ, V. L. (2011). Down syndrome: searching for the genetic culprits. *Disease Models & Mechanisms*, 4(5), 586-595.
- [7] DE RUBENS FIGUEROA, J., DEL POZZO MAGAÑA, B., HACH, J. L. P., JIMÉNEZ, C. C., & URBINA, R. C. (2003). Heart malformations in children with Down syndrome. *Revista Española de Cardiología*, 56(09), 894-899.
- [8] KUZMICIC, J., DEL CAMPO, A., LÓPEZ-CRISOSTO, C., MORALES, P. E., PENNANEN, C., BRAVO-SAGUA, R., HECHENLEITHER, J., ZEPEDA, R., CASTRO, P. F., VERDEJO, H. E., PARRA, V., CHIONG, M. & LAVANDERO, S. (2011). Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 64(10), 916-923.
- [9] FUENTES, J. J., PRITCHARD, M. A., PLANAS, A. M., BOSCH, A., FERRER, I., & ESTIVILL, X. (1995). A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Human Molecular Genetics*, 4(10), 1935-1944.
- [10] CHANG, K. T., SHI, Y. J., & MIN, K. T. (2003). The Drosophila homolog of Down's syndrome critical region 1 gene regulates learning: implications for mental retardation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15794-15799.

- [11] CHANG, K. T., & MIN, K. T. (2005). Drosophila melanogaster homolog of Down syndrome critical region 1 is critical for mitochondrial function. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1577-1585.
- [12] HARRIS, C. D., ERMAK, G., & DAVIES, K. J. A. (2005). Multiple roles of the DSCR1 (Adapt78 or RCAN1) gene and its protein product calcipressin 1 (or RCAN1) in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(21), 2477-2486.
- [13] FUENTES, J. J., PRITCHARD, M. A., & ESTIVILL, X. (1997). Genomic Organization, Alternative Splicing, and Expression Patterns of the DSCR1 (Down Syndrome Candidate Region 1) Gene. *Genomics*, 44(3), 358-361.
- [14] FUENTES, J. J., GENESCÀ, L., KINGSBURY, T. J., CUNNINGHAM, K. W., PÉREZ-RIBA, M., ESTIVILL, X., & DE LA LUNA, S. (2000). DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Human Molecular Genetics*, 9(11), 1681-1690.
- [15] TORAC, E., GAMAN, L., & ATANASIU, V. (2014). The regulator of calcineurin (RCAN1) an important factor involved in atherosclerosis and cardiovascular diseases development. *Journal of Medicine and Life*, 7(4), 481.
- [16] SOBRADO, M., RAMIREZ, B. G., NERIA, F., LIZASOAIN, I., ARBONES, M. L., MINAMI, T., REDONDO, J. M., MORO, M. A., & CANO, E. (2012). Regulator of calcineurin 1 (Rcan1) has a protective role in brain ischemia/reperfusion injury. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 48.
- [17] PEIRIS, H., DUFFIELD, M. D., FADISTA, J., JESSUP, C. F., KASHMIR, V., GENDERS, A. J., McGEES, S. L., MARTIN, A. M., SAIEDI, M., MORTON, N., CARTER, R., COUSINS, M. A., KOKOTO, A. C., OSKOLKOV, N., VOLKOV, P., HOUGH, T. A., FISHER, E. M. C., TYBULEWICZ, V. L. J., BUSCIGLIO, J., COSKUN, P. E., BECKER, A., BELICHENKO, P. V., MOBLEY, W. C., RYAN, M. T., CHAN, J. Y., LAYBUTT, D. R., COATES, P. T., YANG, S., LING, C., GROOP, L., PRITCHARD, M. A., & KEATING, D. J. (2016). A syntenic cross species aneuploidy genetic screen links RCAN1 expression to β -cell mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes. *PLOS Genetics*, 12(5), e1006033.
- [18] GLASSON, E. J., JACQUES, A., WONG, K., BOURKE, J., & LEONARD, H. (2016). Improved survival in Down syndrome over the last 60 years and the impact of perinatal factors in recent decades. *The Journal of Pediatrics*, 169, 214-220.
- [19] VÁSQUEZ-TRINCADO, C., GARCÍA-CARVAJAL, I., PENNANEN, C., PARRA, V., HILL, J. A., ROTHERMEL, B. A., & LAVANDERO, S. (2016). Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. *The Journal of Physiology*, 594(3), 509-525.
- [20] ROTTER, D., GRINSFELDER, D. B., PARRA, V., PEDROZO, Z., SINGH, S., SACHAN, N., & ROTHERMEL, B. A. (2014). Calcineurin and its regulator, RCAN1, confer time-of-day changes in susceptibility of the heart to ischemia/reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 74C, 103-111.

- [21] MELSER, S., LAVIE, J., & BÉNARD, G. (2015). Mitochondrial degradation and energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1853(10), 2812-2821.
- [22] ARCHER, S. L. (2013). Mitochondrial dynamics—mitochondrial fission and fusion in human diseases. *New England Journal of Medicine*, 369(23), 2236-2251.
- [23] YOULE, R. J., & VAN DER BLIEK, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337(6098), 1062-1065.
- [24] LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., & DARNELL, J. (2000). Electron Transport and Oxidative Phosphorylation. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman. Section 16.2.
- [25] CRIBBS, J. T., & STRACK, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Reports*, 8(10), 939-944.
- [26] PARRA, V. M., ALTAMIRANO, F., HERNÁNDEZ-FUENTES, C. P., TONG, D., KYRYCHENKO, V., ROTTER, D., PEDROZO, Z., HILL, J. A., EISNER, V., LAVANDERO, S., SCHNEIDER, J. W., ROTHERMEL, B. A. (2018). Down syndrome critical region 1 gene, Rcan1, helps maintain a more fused mitochondrial network. *Circulation Research*, CIRCRESAHA-117.
- [27] NARENDRA, D. P., JIN, S. M., TANAKA, A., SUEN, D. F., GAUTIER, C. A., SHEN, J., COOKSONS, M. R., & YOULE, R. J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLOS Biology*, 8(1), e1000298.
- [28] BURRIDGE, P. W., MATSA, E., SHUKLA, P., LIN, Z. C., CHURKO, J. M., EBERT, A. D., LAN, F., HUBER, B., MORDWINKIN, N. M., PLEWS, J. R., ABILEZ, O. J., CUIS, B., GOLD, J. D., & WU, J. C. (2014). Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nature Methods*, 11(8), 855.
- [29] HU, B. Y., WEICK, J. P., YU, J., MA, L. X., ZHANG, X. Q., THOMSON, J. A., & ZHANG, S. C. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), 4335-4340.
- [30] LUCENDO-VILLARIN, B., RASHIDI, H., CAMERON, K., & HAY, D. C. (2016). Pluripotent stem cell derived hepatocytes: using materials to define cellular differentiation and tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(20), 3433-3442.
- [31] GAUTHAMAN, K., FONG, C. Y., & BONGSO, A. (2010). Effect of ROCK inhibitor Y-27632 on normal and variant human embryonic stem cells (hESCs) in vitro: its benefits in hESC expansion. *Stem Cell Reviews and Reports*, 6(1), 86-95.
- [32] DEGASPERI, A., BIRTWISTLE, M. R., VOLINSKY, N., RAUCH, J., KOLCH, W., & KHOLODENKO, B. N. (2014). Evaluating strategies to normalise biological replicates of Western blot data. *PLOS One*, 9(1), e87293.

[33] VARUM, S., RODRIGUES, A. S., MOURA, M. B., MOMCILOVIC, O., EASLEY IV, C. A., RAMALHO-SANTOS, J., VAN HOUTEN, B. & SCHATTEN, G. (2011). Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One*, 6(6), e20914.

[34] AKABANE, S., UNO, M., TANI, N., SHIMAZAKI, S., EBARA, N., KATO, H., KOSAKO, H., & OKA, T. (2016). PKA regulates PINK1 stability and Parkin recruitment to damaged mitochondria through phosphorylation of MIC60. *Molecular Cell*, 62(3), 371-384.

[35] KURODA, Y., SAKO, W., GOTO, S., SAWADA, T., UCHIDA, D., IZUMI, Y., TAKAHASHI, T., KAGAWA, N., MATSUMOTO, M., MATSUMOTO, M., KAJI, R., MITSUI, T., & TAKAHASHI, R. (2011). Parkin interacts with Klokin1 for mitochondrial import and maintenance of membrane potential. *Human Molecular Genetics*, 21(5), 991-1003.

13 ANEXO: DIFERENCIACIÓN EN CARDIOMIOCITOS

Con el objetivo de abrir nuevas líneas de investigación en el laboratorio, se estandarizó un protocolo de diferenciación para las iPSC 2s y iPSC 3s en cardiomiocitos. La finalidad de esto fue ver si era posible la diferenciación a cardiomiocitos de las iPSC 3s para en un futuro estudiar los efectos de la sobreexpresión de RCAN1 en la dinámica mitocondrial durante la diferenciación. Para esto, se adaptó el protocolo utilizado por Burridge et al ^[28].

13.1 Estandarización del proceso de diferenciación de iPSC a cardiomiocitos

Se consideró día 1 al iniciar la diferenciación. Al alcanzar las placas una confluencia de 70%, se cambió el medio de las células a mTeSR + Normocin 1 mg/mL, ya que se consiguieron mejores diferenciaciones si las células crecían con este medio. El día 1 se eliminó el medio y se cambió a MDA (activación vía de diferenciación Wnt/ β -caterin) y se dejó incubando por dos días. El día 3 se eliminó el medio y se cambió a Medio de Diferenciación B (inhibición vía de diferenciación Wnt/ β -caterin), dejando incubar por dos días. El día 5 se eliminó el medio y se cambió a Medio de Mantenimiento de Cardiomiocitos (MMC), dejando incubar y reponiendo medio cada dos días. El día 10 se cambió a un Medio de Mantenimiento Enriquecido (MME), dejando incubar y reponiendo medio cada dos días. En el día 16, se cambió nuevamente a MMC, y se fue reponiendo cada dos días hasta completar el día 20 de diferenciación.

El MME se preparó (referencia de 100 mL de medio) a partir de 96,17 mL de medio RPMI 1640, 3,3 mL de “Bovine Albumin Fraction V” al 7,5%, 0,4 mL de lactato sódico 60% (en HEPES 1 M pH 7,2–7,5), y 0,13 mL de ácido ascórbico 250X. El medio se almacenó a 4°C y puede mantenerse hasta dos semanas (GIBCO N° de pieza de publicación MAN0014828).

13.2 Resultados

Hasta el día de hoy, se ha logrado estandarizar el proceso de ambas iPSC hasta el día 20 de diferenciación. La adición del MME induce el cambio metabólico en las células para que utilicen lactato como fuente de carbono en lugar de glucosa. Hasta este momento, sumado ambos procesos de diferenciación y suplemento con MME, se han obtenido cardiomiocitos contráctiles para ambas líneas de iPSC, los cuales se encuentran en los siguientes links:

- *Cardiomiocitos diferenciados de iPSC 2s (cardiomiocitos 2s):*
<http://www.cellsignalinglab.cl/images/2sE8.wmv>
- *Cardiomiocitos diferenciados de iPSC 3s (cardiomiocitos 3s):*
<http://www.cellsignalinglab.cl/images/3smTeSR.wmv>

Como se observa en los videos, ambas líneas presentan latidos. Los cardiomiocitos 2s presentan latidos uniformes y constantes. En contraste, los latidos de los cardiomiocitos 3s son más asincrónicos y leves. Los cardiomiocitos 2s comenzaron a latir alrededor del día 13 de diferenciación, mientras que los cardiomiocitos 3s latieron alrededor del día 18 de diferenciación. Estas diferencias muestran comportamientos distintos en la diferenciación a cardiomiocitos entre ambas iPSC. Actualmente se está trabajando en el laboratorio para continuar con los análisis de esta diferenciación mediante la expresión de algunos marcadores de diferenciación, inmunofluorescencia para visualizar la red mitocondrial en los cardiomiocitos, y medir la contracción como marcador de diferenciación efectiva.