



Rol de RCAN1 en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) y cardiomiocitos derivados de iPSCs de pacientes con Síndrome de Down

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular

Memoria para optar al título de Bioquímico

Francisco Javier Bravo Acuña

Dra. Valentina María Parra Ortiz

Directora de Tesis

Laboratorio de Diferenciación Celular y Metabolismo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Universidad de Chile

2021

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

FRANCISCO JAVIER BRAVO ACUÑA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día de del año 2021.

Directora de Tesis:

Dra. Valentina María Parra Ortiz

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Jenny Fiedler

Dr. Mario Chong

Dr. Fernando Ezquer

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Metabolismo (LDyM), dirigido por la Dra. Valentina Parra, perteneciente al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y al Centro de Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS) ubicado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Esta tesis conto con el financiamiento de: Fondecyt 1190743.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- **Francisco Javier Bravo.** Sebastián Leiva-Navarrete, Carla Arias-Durán, Valentina Parra. “Effect of RCAN1 overexpression on proliferation and DNA damage in induced pluripotent stem cells (iPSC) of subjects with Down Syndrome”. XLL annual meeting of the Chilean Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBMCh) and XIV annual meeting of Chilean Society of Plant Biologists (CSPB), held at Iquique, Chile from October 8 to 11, 2019.
- **Francisco Bravo,** Sebastián Leiva, Carla Arias, Valentina Parra. “Role of RCAN1 in induced pluripotent stem cells (iPSC) and iPSC-derived cardiomyocytes from Down Syndrome patients”. Reunión de la sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas (SCHCF) y la Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas (ALACF), de noviembre 16-20, 2020, Chile.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero dar gracias a mi directora de tesis la Dra. Valentina Parra por aceptarme como su estudiante, cuando me encontraba en la nada sin saber dónde realizar mi tesis, por guiarme durante ella y darme los mejores consejos para realizarla.

También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio que son muchos, los que fueron un gran apoyo y compañía para trabajar, en especial doy gracias a los que me enseñaron muchas cosas; como la Carla, la Nico, el Ema, el tío Felipe entre otros y en especial gracias a don Sebastián o Apu-sama por tenerme paciencia y enseñarme muchas cosas durante toda esta tesis.

Agradezco también a mis amigos que hice durante el transcurso de la carrera con lo cuales se hizo mas ameno el paso por la Universidad, la Mane, el Daniel, la Dana, la Angie y el Chang los cuales los llevo en el kokoro.

Y finalmente agradezco a mi familia, mi madre y mi abuela que a pesar de todas las dificultades han estado conmigo durante este largo trayecto y gracias a los que no están porque fueron una parte importante de esto.

Bonus: gracias a mis mascotas por ser una compañía que estuvo durante esas largas noches de estudios al Pluto a la Claire y al pato.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	iii
Índice figuras y tablas.....	vii
Abreviaturas.....	ix
Resumen.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introducción.....	1
1.1 Síndrome de Down.....	1
1.2 Cromosoma 21 (Hsa21)	3
1.3 Enfermedades Cardiovasculares y Síndrome de Down.....	5
1.4 RCAN1 y Disfunción Mitocondrial en el Síndrome de Down.....	9
1.5 Proliferación, Disfunción Mitocondrial y Diferencia Celular.....	13
1.6 Modelo de Estudio de Síndrome de Down con iPSC.....	15
2. Hipótesis.....	19
3. Objetivo General.....	19
4. Objetivos Específicos.....	19
5. Materiales y Métodos.....	22
5.1 Reactivos y materiales.....	22
5.1.1 Cultivo celular.....	22
5.1.2 Transfección de RNAs interferentes (siRNA).....	22
5.1.3 Reactivos de Diferenciación a cardiomiocitos.....	23
5.1.4 Inmunofluorescencia.....	23
5.1.5 Citometría de Flujo y Ciclo Celular.....	23

5.1.6 Extracción RNA.....	24
5.1.7 RT-qPCR.....	24
5.1.8 Anticuerpos.....	24
5.1.9 Lista de Partidores.....	25
5.1.10 Clones celulares.....	26
5.2 Metodología.....	27
5.2.1 Cultivo celular.....	27
5.2.2 Transfección iPSC 2S y 3S.....	27
5.2.3 Inmunofluorescencia iPSC.....	28
5.2.4 Análisis de Inmunofluorescencia.....	28
5.2.5 Citometría de Flujo.....	29
5.2.6 Diferenciación de cardiomiocitos derivados de iPSC.....	29
5.2.7 Extracción de RNA.....	30
5.2.8 RTqPCR.....	30
5.2.9 Estímulos con Norepinefrina.....	31
5.2.10 Análisis estadísticos.....	31
6. Resultados.....	31
6.1 Analizar el efecto de la trisomía del cromosoma 21 sobre la proliferación celular de iPSC disómicas y trisómicas y estudiar el rol de RCAN1 en este proceso.....	32
6.1.1 Efectos de RCAN1 sobre la proliferación de iPSC.....	32
6.1.2 Efecto de RCAN1 sobre el ciclo celular de iSPC disómicas y trisómicas.....	35
6.1.3 Expresión génica de marcadores de proliferación en iPSC disómicas y trisómicas.....	38

6.2 Determinar el daño al DNA presente en iPSC y cardiomiocitos derivados de iPSC presentes con la trisomía 21 y ver si se rescata este daño al recuperar la función normal de RCAN1 en estas células.....	40
6.2.1 Daño al DNA visto por Inmunofluorescencia de 8-Oxoguanina en iPSC 2S y 3S.....	40
6.2.2 Expresión de genes marcadores de daño al DNA en iPSC 2S y 3S.....	42
6.3 Evaluar y caracterizar el rol de RCAN1 en el proceso de diferenciación de cardiomiocitos derivados de iPSCs 2S y 3S.....	44
6.3.1 Caracterización del proceso de diferenciación de cardiomiocitos derivados de iPSC mediante la expresión de genes.....	44
6.3.2 Análisis funcional de cardiomiocitos derivados de iPSC 2S y 3S.....	49
6.3.3 Efecto del silenciamiento de RCAN1 sobre cardiomiocitos derivados de iPSC 2S y 3S.....	50
6.3.4 Efecto del silenciamiento de RCAN1 sobre la funcionalidad de cardiomiocitos derivados de iPSC 2S y 3S.....	52
7. Discusión.....	54
7.1 Efecto de la sobreexpresión de RCAN1 sobre la proliferación celular de iPSC provenientes de sujetos con SD.....	54
7.2 Efecto de la sobreexpresión de RCAN1 sobre el daño al DNA en iPSC 3S.....	57
7.3 Evaluación del proceso de diferenciación de iPSC 3S a cardiomiocitos.....	59
7.4 Efecto de la sobreexpresión de RCAN1 sobre la funcionalidad de cardiomiocitos derivados de iPSC 3S.....	61
8. Limitaciones y Proyecciones Futuras.....	63
9. Conclusiones.....	65
10. Referencias.....	67

ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Figura 1: Cromosoma 21 (Hsa21)	3
Figura 2: Defectos Cardiacos Congénitos.....	6
Figura 3. Representación esquemática del metabolismo anormal redox que existente en los individuos con Síndrome de Down.....	8
Figura 4: Principales patologías que afectan a los adultos con Síndrome de Down.....	9
Figura 5: Morfología mitocondrial de iPSCs disómicas y trisómicas.....	10
Figura 6: Niveles de ROS en iPSCs disómicas y trisómicas es dependiente de RCAN1.....	11
Figura 7: Estructura del Cromosoma 21 y ubicación de RCAN1.....	12
Figura 8: Relación inversa entre Proliferación Celular y Diferenciación.....	15
Figura 9: Aplicación de iPSCs para medicina regenerativa, modelado de enfermedades y selección de medicamentos.....	17
Figura 10: Proliferación de iPSC 2S y 3S por inmunofluorescencia de Ki67.....	34
Figura 11: Ciclo celular de iPSC 2S y 3S.....	36
Figura 12: Evaluación de la proliferación por medio de la expresión de mRNAs en iPSC disómicas y trisómicas.....	39
Figura 13: Daño al DNA de iPSC 2S y 3S por inmunofluorescencia de 8-Oxoguanina.....	41
Figura 14: Evaluación del daño al DNA por medio de la expresión de mRNAs en iPSC disómicas y trisómicas.....	43
Figura 15: Esquema general del proceso de diferenciación celular de iPSC 2S y 3S.....	46
Figura 16: Expresión de genes pluripotenciales en iPSC 2S y 3S. A-C.....	47
Figura 17: Expresión de genes cardiacos en iPSC 2s y 3S.....	48
Figura 18: Cambios en la tasa de latidos de iPSC disómicas (2S) y trisómicas (3S) en función del tiempo.....	49
Figura 19: Expresión de genes cardiacos luego del silenciamiento de RCAN1 de cardiomiocitos derivados de iPSC 2S y 3S.....	51
Figura 20: A y B. Efecto del silenciamiento de RCAN1 sobre el perfil de latidos de cardiomiocitos derivados de iPSC 2S y 3S.....	53

Tabla 1: Anticuerpos utilizados para Inmunofluorescencias de Ki67 y 8-Oxoguanina.....	24
Tabla 2: Partidores para evaluar daño al DNA, proliferación, diferenciación y pluripotencialidad.....	25
Tabla 3: Características de los clones de iPSCs usados para la diferenciación.....	26
Tabla 4: Porcentajes de las poblaciones celulares de iPSCs 2S y 3S en las diferentes etapas del ciclo celular.....	37

ABREVIATURAS

- 2S: iPSC disómicas
- 3S: iPSC trisómicas
- 8-Oxo: 8-Oxoguanina
- ATP: Adenosin trifosfato
- CaM: Calmodulina
- CaN: Calcineurina
- CAT: Catalasa
- CD1: Ciclina D1
- dKD: doble knock down (silenciamiento con siRCAN1.1 + siRCAN1.4)
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DRP1: Proteína relacionada a la familia de las dinaminas tipo 1
- DSCR: Región candidata del síndrome de Down
- H2AX: miembro de la familia de histonas H2A X
- hESCs: Células madre embrionarias humanas
- Hsa21: Cromosoma humano 21
- I/R: Isquemia y reperfusión
- iPSC: Células madre pluripotentes inducidas
- Ki67: antígeno Ki67
- MDA: Medio de diferenciación A
- MDB: Medio de diferenciación B
- MMC: Medio de mantención de cardiomiocitos

- MME: Medio de mantención enriquecido
- NE: Norepinefrina
- NFAT: Factor nuclear de células T activadas
- OGG1: 8-Oxoguanina glicosilasa
- OXPHOS: Fosforilación oxidativa
- PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- RCAN1: Regulador de la Calcineurina 1, DSCR1, adapt78, MCIP1, calcipresina.
- RNA: Ácido ribonucleico
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- SD: Síndrome de Down
- si1.1: silenciamiento de RCAN1.1
- si1.4: silenciamiento de RCAN1.4
- siRNA: RNA pequeño de interferencia
- SOD1: Superóxido dismutasa-1
- TPX2: Proteína dirigida a Xklp2

RESUMEN

El Síndrome de Down (SD) corresponde a una afección causada por la presencia de una trisomía del cromosoma 21 (Hsa21) que genera un fenotipo altamente complejo caracterizado por provocar trastornos neuronales, inmunitarios y defectos cardíacos. La sobreexpresión de genes del Hsa21 ha demostrado ser un claro responsable de la patogenia del SD, específicamente los de la región crítica del síndrome de Down (DSCR). Muchos de estos genes están implicados en la regulación de la función mitocondrial, como consecuencia se genera en estos pacientes un notorio desbalance de las especies reactivas del oxígeno (ROS), provocando cambios metabólicos secundarios como apoptosis celular y fragmentación mitocondrial, que los hace más propensos a sufrir malformaciones cardíacas. Por otro lado, reportes previos han dado cuenta que los procesos de diferenciación neuronal se ven alterados en SD, generando patologías características de este síndrome que se vincularían con la relación inversa entre la proliferación y diferenciación celular, donde la falencia de un proceso afecta al otro. En consideración a estos antecedentes, se ha identificado a RCAN1 como un importante regulador de la función y dinámica mitocondrial, resultando relevante para los procesos relacionados al sistema cardiovascular. RCAN1 posee diversas isoformas expresadas en tejido cardíaco y se caracteriza por ser una de las principales proteínas sobreexpresadas en SD. También se sabe que RCAN1 es una proteína codificada en la DSCR, la cual tiene como función principal inhibir la actividad de la fosfatasa Calcineurina entre varias otras funciones. Actualmente, los modelos animales de SD fallan en reproducir el fenotipo de la patología cardíaca observada en humanos. Es así como ha surgido el uso de iPSC como un novedoso modelo que permite estudiar de mejor forma este síndrome debido a una variedad de ventajas que las iPSC poseen por sobre los modelos murinos. Por ende, a partir de los antecedentes expuestos, se propuso la siguiente hipótesis: La sobreexpresión de RCAN1 aumenta los marcadores de proliferación y daño al DNA en células madre pluripotenciales inducidas trisómicas (iPSCs) y disminuye los de diferenciación cardíaca en cardiomiocitos derivados de iPSCs de pacientes con SD. Para comprobar la hipótesis de este trabajo se evaluaron los siguientes objetivos: 1) Analizar el efecto de la trisomía del cromosoma 21 sobre la proliferación celular de iPSC disómicas y trisómicas y estudiar el rol de RCAN1 en este proceso. 2) Determinar el daño al DNA presente en iPSCs disómicas y trisómicas, y ver si se rescata este daño al recuperar la función

normal de RCAN1 en estas células y; finalmente, 3) Evaluar y caracterizar el rol de RCAN1 en el proceso de diferenciación de cardiomiocitos derivados de iPSCs disómicas y trisómicas.

Para esta tesis se logró comprobar que iPSC 3S proliferan más que iPSC 2S en condiciones controles por medio de la inmunomarcación del marcador de proliferación Ki67 y la expresión de genes indicadores de proliferación celular (*Ki67*, *TPX2*), y al usar un siRNA de RCAN1 se disminuyó la proliferación vista en iPSC 3S. Por otro lado, se logró evaluar el daño al DNA en estas células identificando una mayor acumulación en iPSC 3S por medio de la inmunomarcación de 8-Oxoguanina y la expresión de genes marcadores de daño al DNA (*OGGI*). El silenciamiento de RCAN1 fue capaz de rescatar este daño observado en iPSC 3S. Finalmente, se pudo evaluar la capacidad de diferenciación de iPSC 2S y 3S, donde se logró comprobar que cardiomiocitos derivados de iPSC 3S presentan alteraciones en la expresión de genes marcadores cardiacos dando cuenta de fallas en su diferenciación, lo cual fue rescatado al silenciar RCAN1. Además, en estas muestras se apreció disfuncionalidad en los cardiomiocitos, lo cual fue atribuido a la sobreexpresión de RCAN1 que está presente en SD. Este es el primer estudio que relaciona la sobreexpresión de RCAN1 en células iPSC de pacientes con SD con una mayor proliferación de estas células y una menor capacidad de diferenciación, lo cual se puede relacionar, en parte, con la alta frecuencia de malformaciones cardiacas observadas en esta condición.

“Role of RCAN1 in Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) and iPSC-derived Cardiomyocytes from Down Syndrome Patients”

ABSTRACT

Down Syndrome (DS) corresponds to a condition caused by the presence of a trisomy of chromosome 21 (Hsa21) that generates a highly complex phenotype characterized by causing neuronal and immune disorders and heart defects. The overexpression of Hsa21 genes has shown to be clearly responsible for the pathogenesis of DS, specifically those of the critical region of Down syndrome (DSCR). Many of these genes are involved in the regulation of mitochondrial function, in consequence, a noticeable imbalance of reactive oxygen species (ROS) is generated in these patients, causing secondary metabolic changes such as cell apoptosis and mitochondrial fragmentation, which makes them more prone to suffer cardiac malformations. On the other hand, it has been seen that neuronal differentiation processes are altered in DS, generating characteristic pathologies of this syndrome that could be linked to the inverse relationship between proliferation and differentiation where the failure of one affects the other. In consideration of these antecedents, RCAN1 has been identified as an important regulator of mitochondrial function and dynamics, being relevant for processes related to the cardiovascular system. RCAN1 has various isoforms expressed in cardiac tissue and is characterized as one of the main proteins overexpressed in SD. It is also known that RCAN1 is a protein encoded in the DSCR, whose main function is to inhibit the activity of Calcineurin phosphatase among several other functions. Currently, animal models of SD fail to reproduce the phenotype of heart disease observed in humans. This is how the use of iPSC has emerged as a novel model that allows this syndrome to be better studied due to a variety of advantages that iPSCs have over murine models. Therefore, based on the exposed antecedents, the following hypothesis was proposed: The overexpression of RCAN1 increases the markers of proliferation and DNA damage in trisomic induced pluripotent stem cells (iPSCs) and decreases those of cardiac differentiation in cardiomyocytes derived from iPSCs of patients with DS. In order to verify the hypothesis of this work, the following objectives were evaluated: 1) To analyze the effect of the trisomy of chromosome 21 on the cell proliferation of disomic and trisomic iPSCs and to study the role of RCAN1 in this

process. 2) Determine the damage to the DNA present in disomic and trisomic iPSCs, and see if this damage is rescued by recovering the normal function of RCAN1 in these cells and; finally, 3) To evaluate and characterize the role of RCAN1 in the differentiation process of cardiomyocytes derived from disomic and trisomic iPSCs.

For this thesis, it was possible to verify that iPSC 3S proliferate more than iPSC 2S under control conditions using the immunostaining of the proliferation marker Ki67 and the expression of cell proliferation indicator genes (Ki67, TPX2), and by using an RCAN1 siRNA proliferation seen in iPSC 3S decreased. On the other hand, it was possible to evaluate the DNA damage in these cells by identifying a greater accumulation in iPSC 3S through the immunostaining of 8-Oxoguanine and the expression of DNA damage marker genes (H2AX and OGG1). The silencing of RCAN1 was able to rescue this damage observed in iPSC 3S. Finally, it was possible to evaluate the differentiation capacity of iPSC 2S and 3S, where it was possible to verify that cardiomyocytes derived from iPSC 3S present alterations in the expression of cardiac marker genes, accounting for failures in their differentiation, which was rescued by silencing RCAN1. In addition, these samples showed dysfunction in the cardiomyocytes, which was attributed to the overexpression of RCAN1 that is present in SD. This is the first study that relates the overexpression of RCAN1 in iPSC cells of patients with DS with a greater proliferation of these cells and a lower capacity for differentiation, which may be related, in part, to the high frequency of cardiac malformations observed in this condition.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Síndrome de Down

El Síndrome de Down (SD) corresponde a la aneuploidía autosómica más común compatible con la supervivencia postnatal que afecta a 1 de cada 700 recién nacidos a nivel mundial, lo que ha ido en aumento con el paso de los años (Izzo *et al.*, 2018). Esta condición es causada principalmente por la presencia de una trisomía del cromosoma 21 (Hsa21) (Izzo *et al.*, 2018) y fue descrito por primera vez en 1866 por John Langdon Down, aunque recién, casi un siglo después, el síndrome fue asociado con la trisomía de este cromosoma (Down, 1866; Hall, 1964). En un Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC) se informó que existe una tasa de nacimientos promedio de 1,88 por mil nacidos vivos en Latinoamérica. Por otro lado, en Chile la tasa de pacientes con SD corresponde a la más alta de Sudamérica, alcanzando el valor de 2,47 por cada mil nacidos vivos (Donoso *et al.*, 2017). Esta prevalencia de SD es dependiente de varios factores tanto socioculturales como genéticos. Por ejemplo, en países donde el aborto es ilegal, como es el caso de Chile, su prevalencia es mayor. Por el contrario, en países donde esto es legal, como Francia, la prevalencia de SD es más baja (1 en 2000) probablemente debido al alto porcentaje de abortos por esta condición (Donoso *et al.*, 2017; Cruz *et al.*, 2019).

Los pacientes con SD se caracterizan por tener un fenotipo altamente complejo mostrando características constantes, como retraso mental, rasgos dimórficos e hipotonía, y características variables, que incluyen susceptibilidad a Alzheimer, diabetes tipo 2, obesidad y trastornos inmunitarios. El SD también es un factor de riesgo para diversas enfermedades, tales como la disfunción tiroidea, leucemia y otras malformaciones congénitas, siendo los más frecuentes, los defectos cardíacos (Izzo *et al.*, 2018).

Actualmente existen pocos estudios que den cuenta de cuál es la causa de la copia extra del cromosoma 21 que lleva al fenotipo de SD, no obstante, se han descrito diversos factores de riesgo que llevarían a generar esta patología. En la trisomía en el cromosoma 21, la mayor parte de los casos es producto de un error durante la segregación de los cromosomas maternos durante la meiosis I, siendo la edad materna un factor que guarda directa relación con la aparición de SD (Yoon *et al.*, 1996). Además, existen algunas

hipótesis que sugieren que estos errores ocurren por diversos factores como el envejecimiento de los gametos, la madurez de los ovocitos, la selección embrionaria alterada y la reserva de ovocitos limitada (Vundinti & Gosh, 2011).

Desde un punto de vista citogenético el SD puede ser causado por una trisomía 21 libre (95%), mosaicismos (2-4%), traslocaciones robertsonianas (2-4%) u otros reordenamientos estructurales (<1%). Para el primer caso, existen 3 copias completas del cromosoma 21 a diferencia de sujetos sanos que presentan 2 copias y su aparición ocurre en función de la edad de la madre; para el mosaicismo existe la presencia de 2 o más líneas celulares con diferente constitución cromosómica en un mismo individuo; para las traslocaciones robertsonianas existe la fusión de dos cromosomas acrocéntricos por su centrómero donde una copia del cromosoma 21 se adosa a un cromosoma del grupo D; para el último caso, rara vez ocurre que una copia extra del cromosoma 21 o parte de este se encuentre como parte de reordenamientos cromosómicos diversos (Kaminker & Armando, 2008).

Es bien conocido que sujetos con SD presentan una variedad de manifestaciones clínicas características como, por ejemplo, una mayor frecuencia a padecer malformaciones congénitas cardíacas y gastrointestinales, desórdenes orgánicos como la enfermedad celíaca, hipotiroidismo, infecciones respiratorias y alteraciones hematológicas. En conjunto, lo anterior conlleva al aumento de la morbimortalidad y tasa de hospitalización de estos sujetos (Donoso *et al.*, 2017), siendo las cardiopatías congénitas el defecto estructural asociado a SD más frecuente (40-45%), especialmente los defectos del tabique auriculoventricular que inciden en la tasa de mortalidad de niños con SD; lo que es seguido por anomalías del tracto digestivo (12%) y anomalías a la cadera (8%). No obstante, los mecanismos que conllevan al fenotipo del DS aún son en gran parte desconocidos y hasta la fecha se ha registrado poco progreso en un enfoque terapéutico orientado a mejorar la calidad de vida de estos pacientes (Cruz *et al.*, 2019; Donoso & Vera, 2016).

Con el avance actual de la medicina infantil, a pesar de los defectos cardíacos que presentan estos pacientes, como son las cardiopatías congénitas, ha habido un incremento notable en la sobrevivencia de los sujetos con SD producto de las cardiocirugías que se les realizan. Sin embargo, a largo plazo sigue siendo un problema que los aqueja en el

transcurso de sus vidas dadas las diferentes complicaciones cardiovasculares que se generan, por ende, adquiere relevancia realizar estudios desde el punto de vista cardiovascular en personas con SD.

1.2 Cromosoma 21 (Hsa21)

Hsa21 se encuentra entre los cromosomas humanos más pequeños, su brazo largo alcanza los 33,6 Mb con más de 500 genes, lo cual representa aproximadamente el 1% de las secuencias totales obtenidas por el NCBI (**Figura 1**). Es sabido que una copia extra de este cromosoma es responsable de generar el SD a nivel gestacional, por ende, es relevante caracterizar la expresión de genes del Hsa21 para poder entender cómo el desbalance en el dosaje de estos genes provoca los diferentes fenotipos observados en este síndrome (Antonarakis *et al.*, 2004).

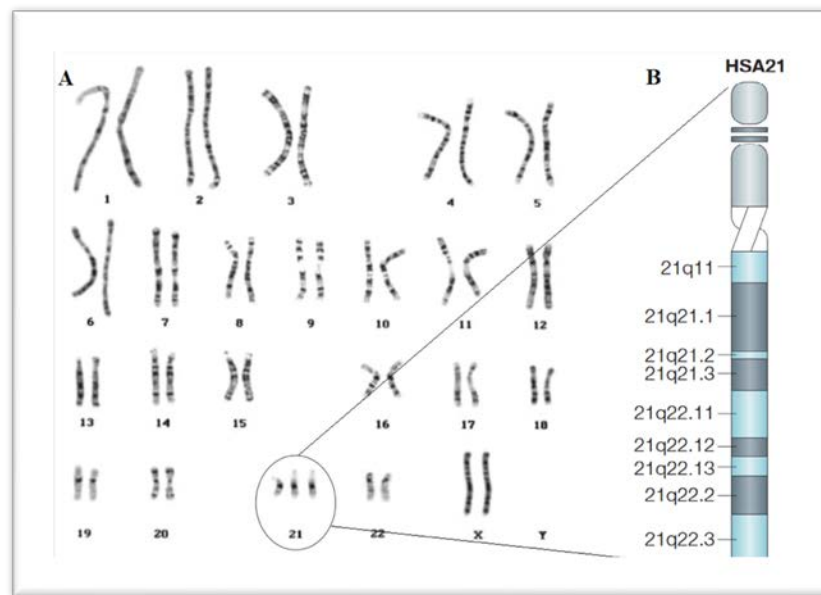


Figura 1: Cromosoma 21 (Hsa21). A. Cariotipo de una trisomía 21 femenina. B. Estructura del cromosoma 21 con sus diferentes regiones. Adaptado de “Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology” por Antonarakis *et al.*, 2004.

La sobreexpresión de genes del cromosoma 21 (Hsa21) ha demostrado ser un claro responsable de la patogénesis del SD, tanto de forma directa o indirecta, pues los genes de Hsa21 que se ven sobreexpresados afectan la regulación de varios otros genes que mapean a diferentes cromosomas (Izzo *et al.*, 2018). A nivel global, la expresión de genes del Hsa21 ha sido encontrada regulada al alza 1,5 veces en muestras trisómicas (Mao *et al.*,

2005; Conti *et al.*, 2007). En adición, un metaanálisis de estudios de expresión génica identificó una variedad de genes regulados positivamente en SD, los cuales estaban involucrados en el fenotipo de SD. De estos genes se identificaron 6 que están directa o indirectamente involucrados en la función mitocondrial, los que corresponden a NRIP1, SUMO3, DYRK1A, DSCR1 / RCAN1, SOD1 y APP (Izzo *et al.*, 2018).

La mayoría de los estudios que buscan caracterizar los genes del Hsa21 que contribuyen al fenotipo de SD han sido centrados en la región crítica del síndrome de Down o por sus siglas en inglés *Down Syndrome Candidate Region*” (DSCR). Dicha región se ubica en la banda 21q22, la cual abarca aproximadamente una longitud de 5.4 Mb en el Hsa21 (Ronan *et al.*, 2007). Se ha postulado que esta área delimita un gen o genes dosis sensibles que son responsables de varias características del SD. Además, se ha identificado que el DSCR está asociado con varios fenotipos importantes del SD, como es el caso de los rasgos faciales que provocan dismorfología del esqueleto craneofacial (Olson *et al.*, 2004).

Con estudios de microarrays en conjunto con PCRs ha sido posible medir los niveles de RNA en tejidos de cerebelo y corazón de tejidos fetales humanos afectados con SD, confirmando que existen genes individuales expresados diferencialmente en comparación a controles euploides (Mao *et al.* 2005). Por otro lado, en modelos de ratón con SD por medio de estudios por PCR cuantitativo en tiempo real se han medido los genes ortólogos de ratón de Hsa21 donde la sobreexpresión media de los genes aneuploides está cerca de la descrita en literatura (1,5 veces). Sin embargo, existen genes que exceden dicho valor (*App*, *Adamis1*, *Mx1* y *DSCR5* entre otros), lo que los hace candidatos a ser responsables de los fenotipos observados en SD (Lyle *et al.*, 2004). En conjunto, estos estudios confirman que la aneuploidía da como resultado una sobreexpresión de genes del cromosoma 21, estableciendo que esta trisomía es la responsable de un aumento general de los genes de Hsa21.

También se ha visto que la expresión de la mayoría de los genes del Hsa21 y de muchos genes ubicados en otros cromosomas es desregulada en el corazón de fetos humanos trisómicos entre las 18–22 semanas de gestación. Por otro lado, muchos de estos genes están implicados en la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y, de manera más general, en la función mitocondrial. En este sentido, genes codificantes para enzimas mitocondriales son

regulados significativamente a la baja, mientras que genes que codifican las proteínas de la MEC se regulan al alza en todos los corazones de fetos trisómicos (Conti *et al.*, 2007). Por otro lado, genes como DSCR1 y DYRK1A ubicados en el Hsa21, ambos conocidos participantes de la vía de señalización de la vía calcineurina/NFAT, son claves en el proceso de organogénesis. Por último, se ha visto que factores transcripcionales de la familia de NFAT se expresan durante la tabicación cardíaca, viendo alterada su expresión en muestras de corazón de fetos humanos trisómicos, lo cual estaría dando cuenta de un preludeo a los defectos cardíacos presentes en sujetos con SD (Izzo *et al.*, 2018; Conti *et al.*, 2007).

1.3 Enfermedades Cardiovasculares y Síndrome de Down

La asociación con enfermedades cardiovasculares en pacientes con SD se ha reconocido durante varios años, lográndose identificar una enorme variedad de malformaciones cardiovasculares en estos pacientes, donde la mayoría de las malformaciones alcanza un grado agudo o crónico que ponen en peligro la vida (Spicer, 1984).

Las cardiopatías congénitas (CHD “*congenital heart defects*”) con mayor frecuencia en sujetos con SD corresponden al defecto del tabique auriculoventricular o del canal auriculoventricular (39% de los casos) siendo la hipertensión arterial una de las consecuencias frecuentes en los defectos del canal auriculoventricular, seguido por los defectos del tabique auricular secundum (42% de los casos), defectos del tabique ventricular (43% de los casos) y la Tetralogía de Fallot (6 % de los casos) (**Figura 2**) (Marino, 1993; Freeman *et al.*, 2008; de Rubens *et al.*, 2003). La mayoría de estos defectos son hemodinámicamente significativos y dan lugar a signos y síntomas clínicos de compromiso cardiopulmonar. Con los avances en el manejo médico y quirúrgico, los pacientes con defectos cardíacos han podido ser sometidos a procedimientos quirúrgicos exitosos a una edad temprana, logrando así mejorar la expectativa de vida de estos pacientes (Spicer, 1984).

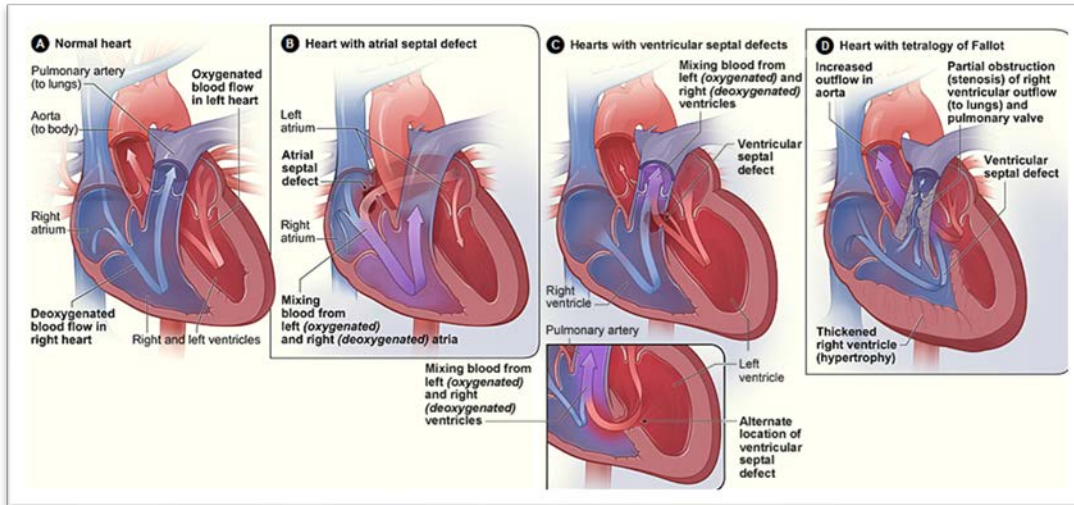
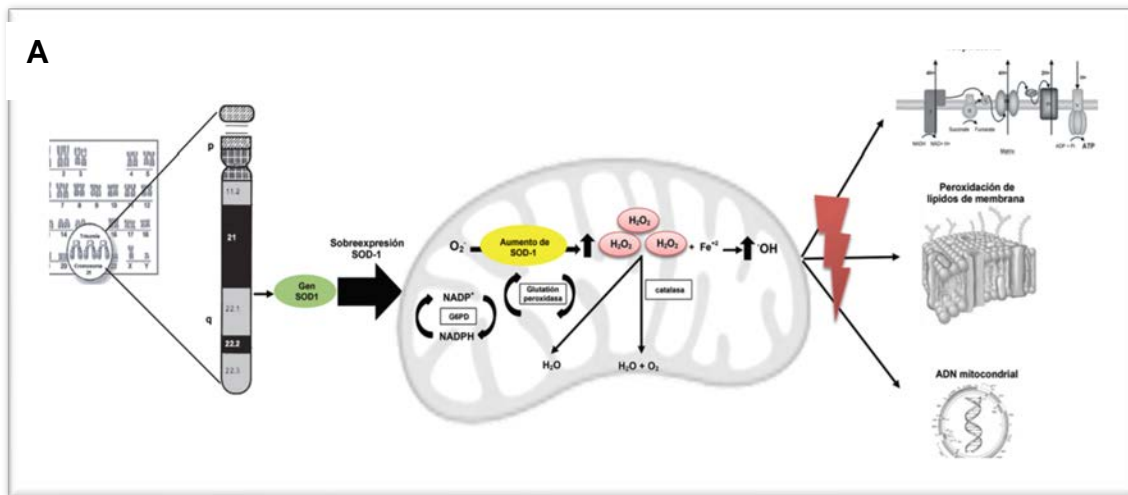


Figura 2: Defectos Cardiacos Congénitos. Comparación de un corazón normal con los principales defectos cardiacos congénitos que se pueden generar y sus principales complicaciones a nivel cardiovascular. **A.** Corazón Normal; **B.** Corazón con defectos ventrales auriculares; **C.** Corazón con defectos del tabique ventricular; **D.** Corazón con Tetralogía de Fallot. Adaptado de “Congenital Heart Defects” por National Heart, Lung and Blood Institute [NHLBI], s.f.

Adicionalmente, para los pacientes con SD también se tienen reportes de la existencia de una elevada actividad de la SOD-1 debido al efecto de la copia extra del gen, lo cual genera al parecer, en parte, la patogénesis de esta enfermedad. Este aumento en la actividad de SOD-1, la cual es un mecanismo antioxidante importante, se produce por la copia extra del Hsa21 y es la principal causa que lleva a una alteración en el equilibrio de las especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*; ROS) en el organismo. Lo anterior provoca cambios metabólicos secundarios, como el aumento de los radicales superóxidos que causa la elevación de los niveles de H_2O_2 (Kędziora & Bartosz, 1988). En vista de lo recién mencionado, se ha reportado que existe una relación entre las enzimas antioxidantes y sus correspondientes sustratos [SOD-1/(CAT+GPx)] aumentada en el SD, lo que generaría un desbalance en estos pacientes que favorecería el aumento de radicales hidroxilos ($^{\circ}OH$) (Donoso *et al.*, 2017). Además, se ha visto que una elevada producción de ROS produce daño a nivel celular, generando apoptosis en experimentos de cultivos neuronales de fetos con SD. Este incremento en el ROS y el daño oxidativo podría contribuir al desarrollo anormal del cerebro y al fenotipo mental observado en este Síndrome (Busciglio & Yankner, 1995).

Se ha comprobado también que la elevada producción de ROS en neuronas derivadas de iPSCs de pacientes con SD va acompañada de un aumento en el número de mitocondrias, generándose una mayor fragmentación de éstas. Por otro lado, también existe una disminución del potencial de membrana mitocondrial de estas mitocondrias, lo que en conjunto demuestra que existen perturbaciones generalizadas en la estructura y función de este organelo en el SD. Además, existe un notorio aumento en la rotura de la doble hélice de DNA de neuronas derivadas de iPSCs de estos pacientes, producto del desbalance en los ROS observados por medio del marcador de daño al DNA y H2AX (Murray *et al.*, 2015).

Varios estudios se han centrado en demostrar que este desbalance en las ROS en pacientes con SD es debido, en gran parte, a alteraciones en la estructura y funcionamiento metabólico de las mitocondrias, siendo este proceso, uno de los grandes implicados en la patogénesis de SD y estando vinculado de forma directa tanto al fenotipo observado en SD como a los diferentes defectos o enfermedades congénitas. Debido a lo anterior, dirigir estudios hacia el metabolismo de este organelo en pacientes con SD representa una prometedora estrategia terapéutica para corregir los fenotipos clínicos observados en estos pacientes (Valenti *et al.*, 2018).



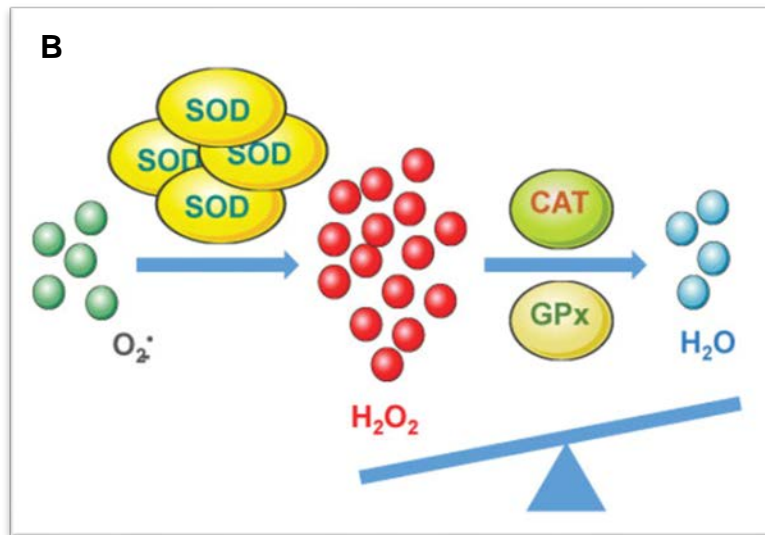


Figura 3. Representación esquemática del metabolismo anormal redox que existe en los individuos con Síndrome de Down. A: La copia extra del cromosoma 21 determina la existencia de un desbalance en la producción de ROS. Esto último, producto de que existe un aumento de la enzima antioxidante SOD-1, pero no así de las enzimas Catalasa (CAT) y Glutatión Peroxidasa (GPx), por ende, el equilibrio es desplazado hacia la formación de Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2). Adaptado de “El niño con síndrome de Down en la Unidad de Cuidados Intensivos” por Donoso, F. *et al.*, 2017. **B.** Esquema que da cuenta del desbalance redox producto de la copia extra del gen SOD-1 en Síndrome de Down.

Debido a la alta incidencia de malformaciones cardíacas en los sujetos con SD, ha sido de gran interés investigar genes blancos para revertir el fenotipo de estos pacientes, ya que se han identificado defectos cardíacos congénitos en más del 50% de los recién nacidos y, a pesar de que la mayoría de estos defectos son corregidos desde el nacimiento, siguen siendo una de las principales causas de mortalidad en los adultos con SD en conjunto con otras enfermedades como neumonía o enfermedades infecciosas respiratorias (**Figura 4**) (Landes *et al.*, 2020). Una variedad de estudios ha establecido el papel crítico de las disfunciones mitocondriales y el estrés oxidativo en una amplia gama de enfermedades cardiovasculares, incluyendo defectos cardíacos congénitos; por ende, estudiar estos procesos en SD cobra una especial relevancia.

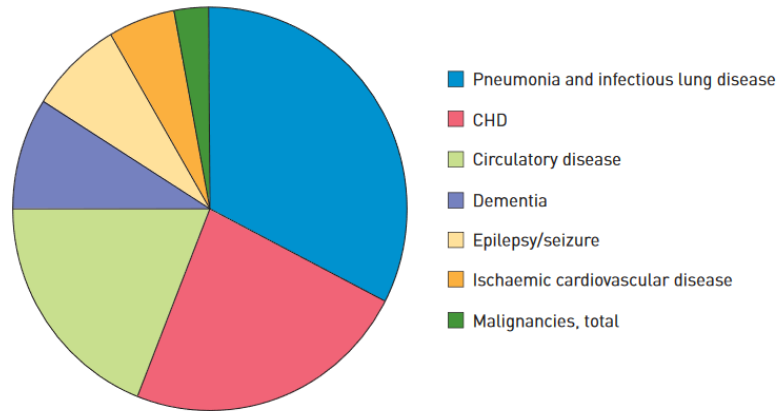


Figura 4: Principales patologías que afectan a los adultos con Síndrome de Down. Las enfermedades Cardiovasculares y pulmonares siguen siendo las principales causas de muerte de las personas con SD. La neumonía y las enfermedades pulmonares infecciosas, las cardiopatías congénitas (CC) y las enfermedades circulatorias representan aproximadamente el 75% de todas las muertes en personas con síndrome de Down. Adaptado de “What people with Down Syndrome can teach us about cardiopulmonary disease” por Colvin *et al.*, 2017.

1.4 RCAN1 y Disfunción Mitocondrial en el Síndrome de Down

La disfunción mitocondrial en si está implicada en trastornos metabólicos y relacionados con la edad, enfermedades neurodegenerativas y lesiones isquémicas en el corazón y en el cerebro. Específicamente en el SD, estudios de morfología mitocondrial en fibroblastos trisómicos (SD) fetales han demostrado que estos organelos están significativamente dañados, mostrando mitocondrias rotas y con alteraciones en el patrón de sus crestas en comparación con células sin la trisomía. Además, una comparación realizada entre tejidos de fetos con SD que presentan o no defectos cardíacos reveló que los fibroblastos con la trisomía 21 derivados de fetos con cardiopatías presentan una disfunción mitocondrial mucho más severa (Piccoli *et al.* 2012).

En este contexto, estudios de nuestro laboratorio han demostrado que existe una disfunción mitocondrial en células de pacientes con SD. Ya descrito por Parra *et al.* (2018), se ha visto que células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) con la trisomía, en comparación a iPSCs de células de sujetos normales, presentan alteraciones a nivel mitocondrial, pues en el caso de las primeras, éstas presentan una red del tipo más fusionada en comparación a células disómicas (**Figura 5A**). Por otro lado, en iPSCs trisómicas la cantidad de

mitocondrias es mucho menor que en células disómicas, pero las primeras poseen un mayor volumen mitocondrial (**Figura 5B**). Además, otras investigaciones realizadas por Gómez (2018) han comprobado que existe un desbalance de ROS en iPSCs trisómicas, lo que concuerda con la literatura para otros tipos celulares (**Figura 6**). A partir de esto, surge la incógnita por la existencia de alguna relación entre los cambios que ocurren a nivel mitocondrial en SD con la expresión de alguna proteína, identificándose a RCAN1 (regulador de la calcineurina 1) como un responsable en estos cambios mitocondriales morfológicos y funcionales que existen en los pacientes con SD.

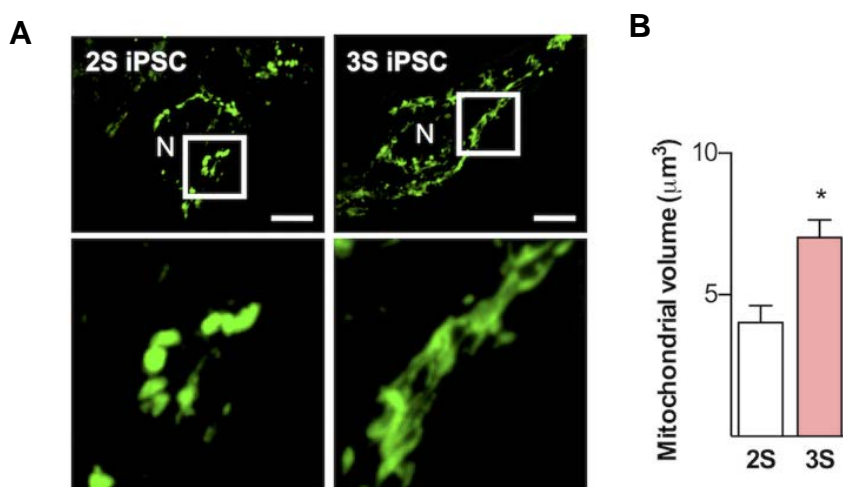


Figura 5: Morfología mitocondrial de iPSCs disómicas y trisómicas. A. Las iPSC trisómicas presentan una red mitocondrial más fusionada que iPSCs disómicas. Células fueron marcadas con MitoTracker Green (B) Volumen mitocondrial iPSCs disómicas y trisómicas donde existe un claro aumento de en las células 3S. Adaptado de “Down syndrome critical region 1 gene, Rcan1, helps maintain a more fused mitochondrial network” por Parra *et al.*, 2018.

La región crítica del gen 1 del SD o regulador de la calcineurina 1 (RCAN1), MCIP1, DSCR1, adapt78, o calcipresina como es conocido, ha sido demostrado que contribuye al control de la función y dinámica mitocondrial y se ha encontrado sobreexpresado en las células de pacientes con SD (Kim & Seo, 2011). RCAN1 consiste en 7 exones separados por 6 intrones que pueden sufrir *splicing* alternativo, generando predominantemente como producto 3 isoformas (RCAN1.1S, RCAN1.1L y RCAN1.4) de la proteína RCAN1, a saber, RCAN1.1 es codificada por el exón 1 y RCAN1.4 por el exón 4, las cuales difieren solo en su N-terminal (**Figura 7**) (Harris *et al.*, 2005; Ermak *et al.*, 2012). La isoforma de RCAN1.1 en adultos es mayoritariamente expresada en corazón, cerebro, músculo y

páncreas; mientras que la isoforma RCAN1.4 es mayoritariamente expresada en corazón, hígado, músculo, placenta, páncreas y riñones (Fuentes *et al.*, 1997). Las isoformas 1.1 y 1.4 de RCAN1 ejercen funciones diversas en los órganos. Por un lado, RCAN1.1 en el cerebro posee actividad proapoptótica en cambio RCAN1.4 regula el crecimiento del axón. En el corazón RCAN1.1 regula la apoptosis celular inducida por hipoxia y regula la mitofagia y RCAN1.4 regula el ritmo circadiano (Lee & Ahnn, 2020).

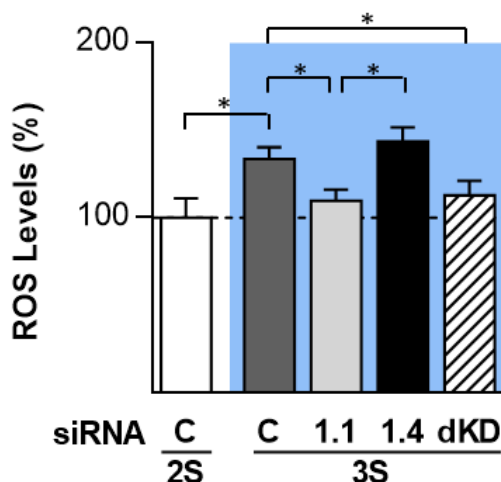


Figura 6: Niveles de ROS en iPSCs disómicas y trisómicas es dependiente de RCAN1. A. Células fueron tratadas con DH-123 para medir los niveles de ROS. Se ve un claro aumento en iPSCs trisómicas en comparación a disómicas y esto es revertido por el uso de un siRNA de RCAN1.1 y un doble *Knock-Down* de la proteína. Adaptado de Andrés Gómez *et al.*, 2018.

RCAN1.1 ha sido fuertemente relacionado con disfunción mitocondrial, entre lo que se incluye la reducción de la masa mitocondrial, la baja de los niveles celulares de ATP, apertura del mPTP (“*mitochondrial permeability transition pore*”, una proteína transmembrana que reside en la membrana interna mitocondrial) y la activación de la vía de señalización de las caspasas. De esta forma, un estudio mostró que la sobreexpresión de RCAN1.1S lleva a producir una función mitocondrial anormal; describiéndose una aceleración de la tasa de intercambio de ATP-ADP, mayor apertura del mPTP inducido por Ca^{+2} , aumento de la liberación de Cyt-c (“*cytochrome complex*”) y apoptosis de líneas celulares neuronales (Jiang *et al.*, 2017). Adicionalmente, y tal como se mencionó previamente, el silenciamiento de RCAN1.1 genera una red mitocondrial del tipo más fisiónada en iPSCs trisómicas, similar a lo visto en iPSCs disómicas y, que al medir los niveles de ROS, el silenciamiento de RCAN1.1 disminuye de forma significativa los

niveles de ROS a niveles similares a células disómicas (Gómez, 2018, Parra *et al.*, 2018) (Figura 6).

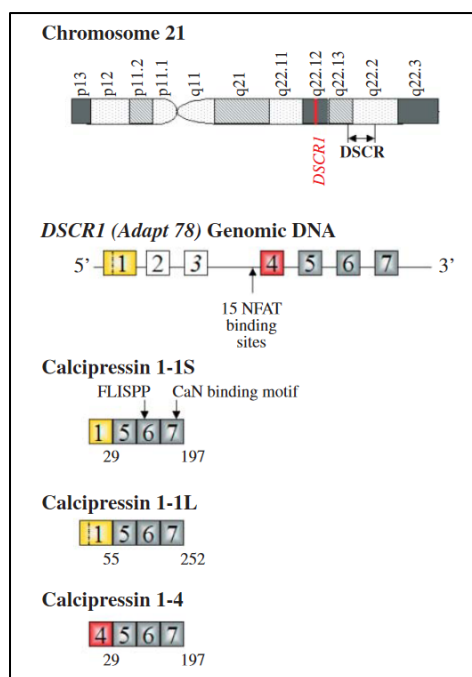


Figura 7: Estructura del Cromosoma 21 y ubicación de RCAN1. DSCR1 (RCAN1) se encuentra en el cromosoma 21 en la región q22.12. DSCR1 (Adapt78) consta de siete exones separados por seis intrones que se empalman alternativamente y varían en su exón 5'. Las principales isoformas conocidas de la proteína RCAN 1 son calcipresina 1-1, con los aminoácidos N-terminales codificados por el exón 1, y calcipresina 1-4, con los aminoácidos N-terminales codificados por el exón 4. Más recientemente, calcipresina 1-1L, con los aminoácidos N-terminales codificados por una versión alargada del exón 1. Adaptado de “Multiple roles of the DSCR1 (Adapt78 or RCAN1) gene and its protein product calcipressin 1 (or RCAN1) in disease” por Harris *et al.*, 2005.

Otros estudios, realizados en nuestro laboratorio, han demostrado la contribución de RCAN1 al control de la función y dinámica mitocondrial empleando miocitos ventriculares de ratas neonatas, cardiomiocitos ventriculares de ratones adultos, fibroblastos embriogénicos de ratón y células madre pluripotentes inducidas iPSCs de individuos con SD. En dichos experimentos, el silenciamiento de RCAN1.1, incrementó la fisión mitocondrial, disminuyendo la función metabólica y aumentando el daño celular luego de un evento de Isquemia / Reperfusión (I/R) (Parra *et al.*, 2018).

La sobreexpresión crónica de RCAN1 también ha sido asociada con DS y la enfermedad de Alzheimer (Ermak *et al.*, 2012). De todas las isoformas de RCAN1, RCAN1.1L es la predominantemente encontrada en cerebros humanos. Reportes previos indican que esta

proteína regula el mPTP, cuya apertura está asociada con el inicio de la autofagia y la degradación mitocondrial (mitofagia); además su sobreexpresión ha sido asociada con la reducción del contenido de DNA mitocondrial (Ermak *et al.*, 2012). Una expresión elevada de RCAN1 también ha sido encontrada en estudios de cerebros de fetos con SD y en la corteza peri-infarto de ratones, luego de una oclusión transitoria de la arteria cerebral media (Fuentes *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2008).

1.5 Proliferación, Disfunción Mitocondrial y Diferenciación Celular

Actualmente no se ha reconocido la causa exacta de los diferentes fenotipos observados a nivel cardiaco en SD como lo son las cardiopatías congénitas, pero sí ha sido posible inferir qué podría estar ocurriendo en este órgano que lleva a generar defectos, tales como, las fallas en la formación de las paredes del corazón, ventrículos, etc. (NHLBI, s.f.). En base a la literatura, nosotros postulamos que existe una disfunción a nivel gestacional de la proliferación de células madre que provocaría fallas en la diferenciación de células cardíacas generando el fenotipo descrito anteriormente y, específicamente en el caso de SD, un posible responsable sería RCAN1 al estar sobreexpresado en las células trisómicas.

La proliferación celular es un proceso que consume una gran cantidad de energía y está controlado por diferentes puntos de control del ciclo celular, donde las células que empiezan a dividirse deben estar preparadas metabólicamente para la demanda energética en los procesos de proliferación (Antico, 2012). Existe evidencia de una estrecha relación entre la disfunción mitocondrial y alteraciones en los procesos de proliferación. Se ha encontrado que en cultivos celulares de fibroblastos embrionarios de ratón *Knock-out* para DRP1 (“*dynamamin related-protein 1*”, proteína que participa de la fisión mitocondrial), la tasa de crecimiento es mucho más lenta que la de fibroblastos *Wild type*, lo cual también ha sido comprobado por medio del marcaje con Ki67, un marcador por excelencia de proliferación celular, donde células *Knock-out* para DRP1 tuvieron una disminución significativa de Ki67 en comparación a la condición *Wild type* (Wakabayashi *et al.*, 2009).

Continuando con lo anterior, se ha visto que diferentes alteraciones en la dinámica mitocondrial producen fallas en los mecanismos de apoptosis, proliferación y ciclo celular. Este último punto posee una relación directa con la dinámica mitocondrial, pues la activación de DRP1 va en conjunto con la activación de kinasas reguladoras como Ciclina

B1/CDK1 que responden a factores de crecimiento. La inhibición de la activación de DRP1 se ha visto que arresta el ciclo celular hacia G2/M, lo cual confirma la relación que existe entre procesos proliferativos y mitocondriales (Ryan *et al.*, 2015).

Por otro lado, existen otros estudios que describen una relación entre RCAN1 y proliferación. Se ha comprobado que el silenciamiento de RCAN1.4 resulta en crecimiento retardado de células U87MG (Células de glioblastoma humano) y, además, en la activación atenuada de la vía ERK en respuesta a factores de crecimiento. También se ha observado que el silenciamiento de RCAN1.4 suprimió la formación del complejo de iniciación de la traducción y la síntesis de proteínas totales de una manera independiente de la CaN, lo cual estaría afectando el crecimiento celular (Lee *et al.*, 2009).

Los procesos proliferativos, por ende, toman relevancia al ser esenciales para el correcto funcionamiento celular, pues se ha visto que poseen una relación inversa con procesos de diferenciación celular, esto último llama la atención pues podría dar cuenta de la razón por la cual se podrían estar generando las malformaciones cardíacas congénitas en SD. Con respecto a la relación inversa entre procesos proliferativos y de diferenciación (**Figura 8**), se ha visto que células que son altamente diferenciadas tienden a salir del ciclo celular y su tasa proliferativa es muy baja o casi nula, como en el caso de neuronas y músculos, a diferencia de células madre que poseen una alta tasa proliferativa. Por ende, esto sería un antecedente clave que ayudaría a dar una posible explicación de lo que sucede a nivel cardíaco en el SD, en conjunto con los problemas a nivel mitocondrial que finalmente gatillan el desbalance en los niveles de ROS y daño celular (Ruijtenberg & van den Heuvel, 2016).

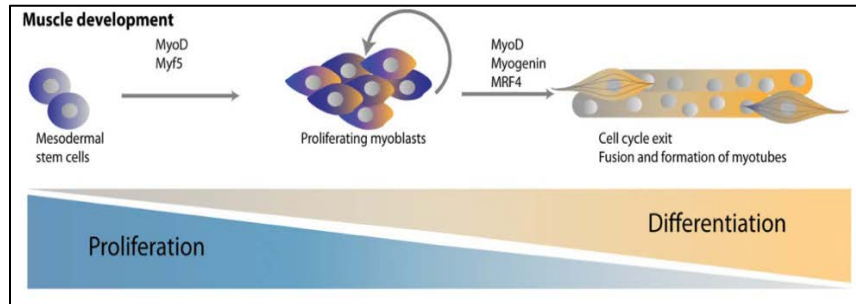


Figura 8: Relación inversa entre Proliferación Celular y Diferenciación. Células que poseen una alta tasa proliferativa como son las células madre tienen se encuentran en un estado no diferenciado en cambio células altamente diferenciadas como lo son el musculo su proliferación es mucho menor y tienden a salir del ciclo celular. Adaptado de “Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression” por Ruijtenberg & van den Heuvel, 2016.

1.7 Modelo de Estudio de Síndrome de Down con iPSC

Según la literatura, existen complicaciones para estudiar el SD y el Hsa21 y la generación de un modelo que adopte tanto las características genotípicas o fenotípicas del SD en modelos murinos, ya que no solo es un síndrome genético contiguo que abarca 35 Mb del brazo largo de Hsa21, sino que los modelos murinos presentan a los ortólogos de genes Hsa21 mapeados en 3 distintos segmentos de cromosomas de ratón, Mmu16, Mmu17 y Mmu10. Dentro de los modelos más empleados para estudiar esta patología se encuentra el ratón Ts65Dn que corresponde a una trisomía segmentaria para SD. Este modelo posee varias limitaciones, tales como, ser trisómico para 125 genes ortólogos que codifican proteínas humanas, de los cuales solo 90 son ortólogos para Hsa21. Además, este modelo carece de la trisomía para aproximadamente 75 genes ortólogos de Hsa21 (Gupta *et al.*, 2016). Otra de las desventajas de estos ratones transcromosómicos es que presentan una composición genética de mosaico, por tanto, no en todas las células está presente la trisomía. Esto último contribuye a generar variabilidad en la patogénesis de estos modelos murinos fallando así en reproducir los fenotipos en SD como son las cardiopatías generadas por la trisomía en humanos (Moore, 2006).

Recientemente, la generación de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) ha surgido como un prometedor modelo para poder estudiar de mejor forma enfermedades que son difíciles de caracterizar en modelos animales. Las primeras iPSCs fueron generadas desde

fibroblastos humanos empleando diferentes factores transcripcionales (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc). Las diferenciaciones cardiacas de iPSCs han sido ampliamente descritas con el fin de ayudar a generar modelos de enfermedades cardiacas *in vitro*, u otros desórdenes que requieren una cuidadosa caracterización de las propiedades de los cardiomiocitos (Zhang *et al.*, 2009; Ebert *et al.*, 2012).

En teoría, las propiedades ilimitadas de auto-renovación y diferenciación de las células madre les permiten producir grandes cantidades de tipos de células específicas para la investigación básica y el descubrimiento de fármacos (**Figura 8**). Como las células madre llevan el mismo genotipo que el paciente donante, el cual además presenta un fenotipo observable, se pueden generar modelos de enfermedad específicos para cada paciente. Hasta el momento, mediante el uso de iPSCs se han modelado enfermedades de diversos tejidos, incluidos hematopoyéticos, hepáticos, endoteliales, neurológicos y cardiovasculares (Ebert *et al.*, 2012). Las iPSCs por ende presentan la gran ventaja de permitir modelar trastornos cardiacos con el fin de dilucidar el mecanismo funcional subyacente de diferentes patologías y testear fármacos y agentes terapéuticos (Sterneckert *et al.*, 2014).

Estudios en donde se utilizan neuronas derivadas de iPSCs para estudiar enfermedades como el Alzheimer, una de las principales patologías vistas en el SD, proporcionan información sobre los mecanismos de la patología y permiten la evaluación de fármacos a nivel preclínico. Con los modelos recién mencionados ha resultado útil determinar en Alzheimer el rol de la trisomía en la generación de péptidos β -amiloide y cómo se ve afectado el fenotipo y la función de estas neuronas (Robbins & Price, 2017). Por otro lado, no existen estudios en los cuales se usen iPSCs con el fin de estudiar desde un punto de vista cardiovascular mecanismos que lleven al fenotipo cardiaco en SD, pero ya se han generado modelos de estudios en los cuales cardiomiocitos derivados de iPSCs son usados

para el monitoreo, por ejemplo, de la tasa de contracciones espontáneas en estas células con el fin de generar estudios para pruebas de fármacos (Sirenko *et al.*, 2013).

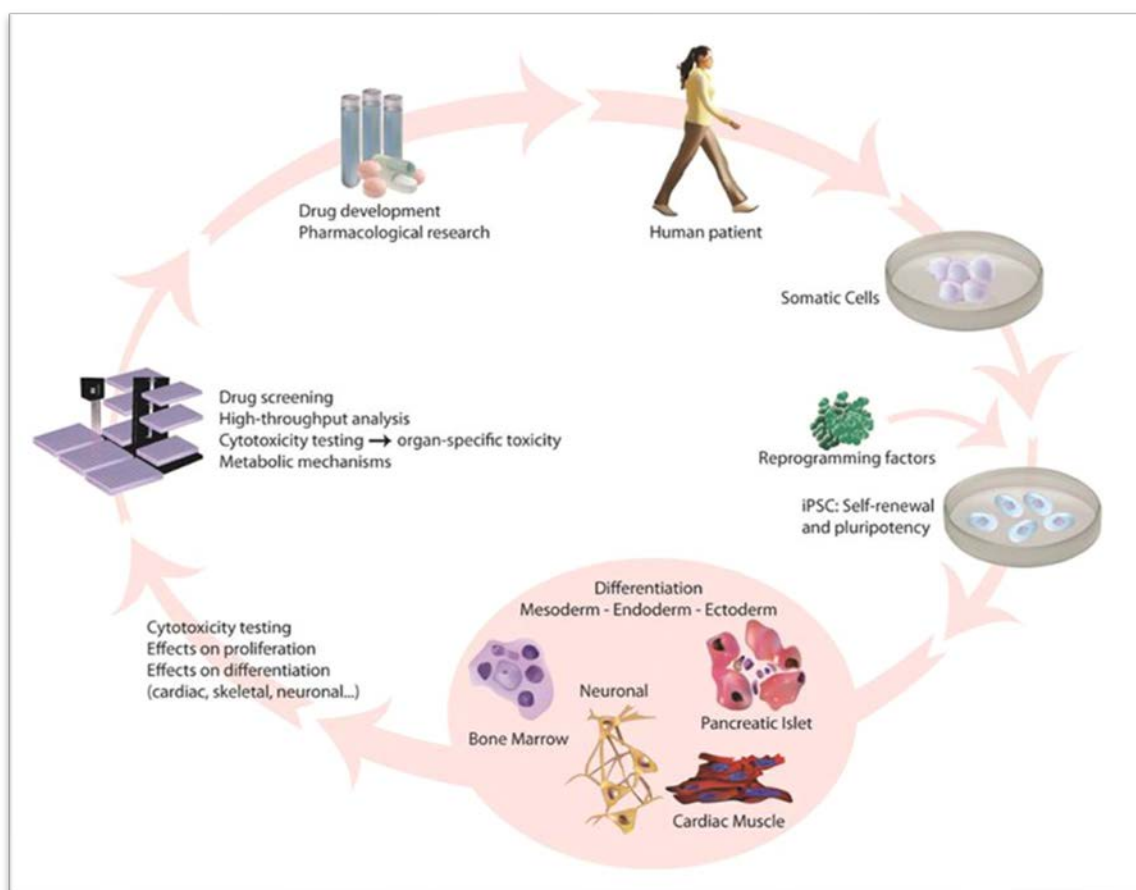


Figura 9: Aplicación de iPSCs para medicina regenerativa, modelado de enfermedades y selección de medicamentos. Después de la reprogramación de células somáticas derivadas de pacientes a un estado pluripotente inducido, los iPSCs pueden diferenciarse en tipos de células de las tres capas germinales. El uso de las células específicas de tejidos derivadas de iPSCs permite modelar enfermedades para comprender los complejos mecanismos que subyacen a diversas patologías. Adaptado de “Induced pluripotent stem cells as a disease modeling and drug screening platform” por Ebert *et al.*, 2012.

Además, otro punto importante a considerar es que el uso de iPSCs obtenidas directamente de tejidos somáticos de pacientes permite eludir las preocupaciones éticas que han afectado a las células madre embrionarias humanas (hESCs), como son la destrucción de embriones y ovocitos humanos. Todo lo cual acentúa su utilidad y versatilidad como modelos *in vitro* para estudiar el desarrollo de enfermedades (Sterneckert *et al.*, 2014).

Con el fin de poder entender mejor como las diferentes anomalías que existen a nivel del metabolismo mitocondrial por medio de la sobreexpresión de RCAN1 y cómo afectan

a células de pacientes con SD, emplearemos el modelo de células iPSCs y de cardiomiocitos derivados de éstas desde líneas obtenidas de pacientes con la trisomía del cromosoma 21. Al mismo tiempo, analizaremos cómo la trisomía de RCAN1 afecta las tasas de proliferación, diferenciación y de mutaciones en el DNA de estas células; lo cual es esencial para poder entender de mejor manera como la disfunción mitocondrial afecta la diferenciación de iPSCs hacia cardiomiocitos, tratar de prevenir esto en células de pacientes con SD y esclarecer si RCAN1 es causante de algunos de los diferentes fenotipos que se observan a nivel cardiaco en los pacientes con SD.

2. HIPÓTESIS

“La sobreexpresión de RCAN1 en el contexto de la trisomía del cromosoma 21 aumenta los marcadores de proliferación y daño al DNA en células madre pluripotenciales inducidas trisómicas (iPSCs) y disminuye los de diferenciación cardiaca en cardiomiocitos derivados de iPSCs de pacientes con Síndrome de Down”

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el rol de la sobreexpresión de RCAN1 en el contexto de la trisomía del cromosoma 21 sobre marcadores de proliferación y daño al DNA, así como en la expresión de marcadores de diferenciación cardiaca en cardiomiocitos derivados de iPSCs.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. *Analizar el efecto de la trisomía del cromosoma 21 sobre la proliferación celular de iPSCs disómicas y trisómicas, y estudiar el rol de RCAN1 en este proceso.*

Racional: sujetos que presentan la trisomía del cromosoma 21 poseen un metabolismo oxidativo alterado en gran parte debido a alteraciones en la estructura y funcionamiento de las mitocondrias (Murray *et al.*, 2015). RCAN1 ha sido identificada como una proteína responsable de estos cambios en la dinámica mitocondrial siendo sobreexpresada en SD. RCAN1 inhibe a la CaN, una proteína fosfatasa activada por Ca^{+2} encargada de desfosforilar NFAT y provocar su traslocación nuclear, regulando así procesos de proliferación, diferenciación y desarrollo de diferentes tipos celulares y órganos, procesos críticos para el desarrollo y reparación del corazón (Parra *et al.*, 2018; Ram *et al.*, 2018). Para resolver este objetivo, se emplearon iPSCs de pacientes sanos (2S) y con la trisomía 21 (3S) con el fin de estudiar las capacidades proliferativas de estas células, además se silenció RCAN1 en células 3S con el fin de determinar su rol en la proliferación de las iPSCs. **Diseño Experimental:** Para la realización de este objetivo se utilizaron dos líneas iPSCs tanto de pacientes sanos como con SD. Para evaluar la proliferación celular se empleó citometría de flujo y ensayos de ciclo celular,

así como inmunofluorescencia para Ki67. Para comprobar la contribución de RCAN1 en este proceso se realizó el *knockdown* de esta proteína usando siRNA contra las dos isoformas de RCAN con el fin de restaurar el fenotipo 2S de las iPSCs 3S.

2. *Determinar el daño al DNA presente en iPSCs disómicas y trisómicas, y ver si se previene este daño al recuperar la función normal de RCAN1 en estas células.*

Racional: En neuronas de individuos con SD se ha observado que existe un aumento en el número de mitocondrias lo cual es asociado a una mayor fragmentación mitocondrial, además de una elevada producción de ROS (Murray *et al.*, 2015). Adicionalmente, en este mismo estudio se comprobó que existe un aumento en las roturas de la doble hélice del DNA en pacientes con la trisomía 21 siendo esto utilizado como un indicador de envejecimiento acelerado en SD, adicionalmente también se observó mayor inestabilidad genómica en estas células (Murray *et al.*, 2015). Tras estos resultados y los obtenidos en nuestro laboratorio (**Figura 6**), se hipotetizó que en iPSC trisómicas existe un aumento del daño al DNA el cual es consecuencia de la disfunción mitocondrial causada por la trisomía 21 producto de la sobreexpresión de RCAN1. Para comprobar esto se utilizaron iPSCs trisómicas, además de siRNA contra RCAN1 para evaluar su participación en la generación del daño al DNA. **Diseño experimental:** Para llevar a cabo este objetivo, se emplearon también dos líneas de iPSCs tanto para pacientes sanos y con SD. El daño al DNA presente tanto en iPSCs 3S y cardiomiocitos derivados de estas se analizaron mediante la acumulación de 8-oxoguanina y cambios en la expresión génica de *H2AX* y *OGG1*. Para evaluar la función de RCAN1 en el proceso de daño al DNA se emplearon estudios de pérdida de función tal como fue descrito en el objetivo anterior.

3. *Evaluar y caracterizar el rol de RCAN1 en el proceso de diferenciación de cardiomiocitos derivados de iPSCs disómicas y trisómicas.*

Racional: En pacientes con SD existen diversas malformaciones a nivel cardiaco siendo las principales las cardiopatías congénitas a nivel gestacional, las cuales generan las diversas malformaciones en el corazón de estos sujetos (NHLBI, s.f.). Debido a lo anterior, se estudió cómo son los procesos de diferenciación de iPSCs

tanto 2S como 3S hacia un fenotipo de cardiomiocitos por medio del protocolo de diferenciación establecido en nuestro laboratorio de acuerdo con lo descrito por Burrige *et al.* (2014). En los cardiomiocitos obtenidos se midieron diferentes marcadores de diferenciación, además de la tasa de latidos por minuto. Para evaluar la implicancia de RCAN1 en este proceso, previo a iniciarse el proceso de diferenciación se utilizó siRNA para disminuir los niveles de la proteína. **Diseño Experimental:** Para cumplir con este objetivo se emplearon también dos líneas de iPSCs tanto para pacientes sanos y con SD y se usó un siRNA para RCAN1 como fue descrito anteriormente. Para la diferenciación de iPSCs a cardiomiocitos se utilizó el método descrito por Burrige y mediante RT-qPCR se midieron marcadores tanto de pluripotencialidad como de cardiomiocitos para seguir el proceso de diferenciación durante los días. Además, se midió la tasa de latidos por minutos de cardiomiocitos 2S y 3S con el fin de medir su funcionalidad en muestras sometidas también al siRNA de RCAN1.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos y materiales

5.1.1 Cultivo celular:

Matriz de membrana Matrigel obtenida de Corning (cód.354230), placas de cultivos de 6 pocillos estéril (cód.353046), placas de cultivo de 12 pocillos estéril (cód.353043) obtenidas de Falcon; DMEM F12 KO (cód.12660012) y TripleExpress (cód.12604013), medio esencial E8, suplemento de esencial E8 (cód.A1517001), kit de diferenciación de cardiomiocitos iPSC (incluye Medio de Diferenciación A (MDA), Medio de Diferenciación B (MDB) y Medio de Mantenición de Cardiomiocitos (MMC)) (cód.A2921201), Albumina bovina fracción V (BAF V) (cód.12659), suero fetal bovino HyClone™ (cód.SH30910.03), medio RPMI 1640 (cód.11879020), Versene® (cód.15040066) y Suero de reemplazo KnockOut™ - (cód.10828010) obtenidos de Thermo Fischer Scientific; inhibidor Y-27632 obtenido de Biorbyt (cód. ORB227384), Normocin™(ant-nr-2) obtenido de InvivoGen, HEPES (485) obtenido de Amresco, suero de albúmina bovina (BSA) obtenido de BioslabChile (cód. BM-0150), ácido láctico y ácido ascórbico obtenidos de Merck (cód.100127)

5.1.2 Transfección de RNAs interferentes (siRNA)

Lipofectamina™ RNA-iMAX (cód.13778030), y Agua destilada UltraPure™ DNase/RNase-Free (cód.10977035) obtenidas de Invitrogen, Normocin™(ant-nr-2) obtenido de InvivoGen, medio esencial E8 obtenido (cód.A1517001), suplemento de esencial E8 obtenido (cód.A1517001), medio Opti-MEM obtenidos de Thermo Fischer Scientific (cód.31965070), RNAs pequeños de interferencia (siRNA) obtenidos de Dharmacon™ ON-TARGETplus; Lafayette, CO, USA. Las secuencias de los siRNA para las isoformas de RCAN1 son las siguientes: siRCAN1.1, sentido (5'-GCUUCAUUGACUGCGAGAUU-3'), antisentido (5'-UCUCGCAGUCAAUGAAGCUU-3'); siRCAN1.4, sentido (5'-AGUGAUUAUCUUCAGCGAAAUU-3'), antisentido (5'-UUUCGCUGAAGAUUAUCACUUU-3').

5.1.3 Reactivos de Diferenciación a cardiomiocitos

Kit de diferenciación de cardiomiocitos derivados de iPSCs (Medio de Diferenciación A (MDA), Medio de Diferenciación B (MDB) y Medio de Mantenimiento de Cardiomiocitos (MMC)) (cód.A2921201), Tryple Express Enzyme (cód.12604013), suplemento 100X RevitaCell™ (cód.A2644501), obtenidos de Thermo Fischer Scientific; Medio Enriquecido de cardiomiocitos preparado a partir de: solución Acido Ascórbico 250X obtenido de Merck (cód.100127), lactato de Sodio 1M, HEPES libre de ácido – 0511-1kg obtenido de Amresco, fracción V de Albumina Bovina 7,5% (cód. 15260037), medio RPMI 1640 sin glucosa (cód.11879020), obtenidos de Thermo Fischer Scientific; y agua destilada UltraPure™ DNase/RNase-Free (cód.10977035) obtenida de Invitrogen.

5.1.4 Inmunofluorescencia

Para la preparación de muestras de inmunofluorescencia se emplearon placas de cultivo de 12 pocillos estéril (cód.353043) obtenidas de Falcon; cubreobjetos circulares de 18 mm (cód.0111580) y laminas portaobjetos obtenidos de Marienfeld Superior™ (cód.1000200), paraformaldehído 16% obtenido de Electron Microscopy Sci, (cód.15710), medio de montaje Prolong Gold + DAPI obtenido de Invitrogen (cód.P36935), PBS 1X, BSA 1% liofilizado obtenido de Winkler (cód. BM0150), Tritón X-100 0,1 % (cód.108643) y azida de sodio obtenidos de Merck Millipore (cód.106688). Los anticuerpos primarios y secundarios en conjunto con sus diluciones se encuentran detallados en la Tabla 1.

5.1.5 Citometría de Flujo y Ciclo Celular

Se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos con iPSCs 2S y 3S, yoduro de propidio (PI) obtenido de Invitrogen (cód.P1304MP), tubos FACS no estériles, suero fetal bovino obtenido de Biological Industries (cód.04-121-1A), una microcentrífuga a 4°C y Versene® (cód.15040-066) de Thermo Fischer Scientific, metanol absoluto frío (-20°C) obtenido de Merck (cód.106009), PBS 1X, Ribonucleasa A (RNasa A, 1mg/mL) y un citómetro de Flujo BD Accuri C6-653118.

5.1.6 Extracción RNA

Se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos con iPSCs 2S y 3S con una confluencia del 80%, una microcentrífuga a 4°C Thermo Fischer Scientific Heraeus™ Fresco™ (cód.17 – 75002420), PBS 1X filtrado frío, TRIZOL obtenido de Thermo Fisher Scientific (cód.15596018), cloroformo obtenido de Merck Millipore (cód.102445), isopropanol obtenido de J.T. Baker (cód.9084-03), microtubos estériles, etanol 75% frío obtenido de J.T.Baker (cód.9000-03), agua destilada UltraPure™ DNase/RNase-Free (cód.10977035) obtenida de Invitrogen y un equipo Nanodrop Heraeus™ Fresco™ (cód.17 – 75002420)

5.1.7 RT-qPCR

Para la generación del cDNA se utilizó un equipo Termociclador Biometra Tone de Analytik Jena (cód. - 846-2-070-301) y el kit IScript Reverse Transcription Supermix obtenido de Bio-Rad (cód.BR1708841). Para la cuantificación mediante qPCR se utilizó Master mix PowerUp SYBR Green obtenido de Thermo Fisher Scientific (cód.A25742), agua destilada UltraPure™ DNase/RNase-Free (cód.10977035) obtenida de Invitrogen. Los partidores utilizados para los diferentes objetivos se encuentran detallados en la Tabla 2.

5.1.8 Anticuerpos

Tabla 1: Anticuerpos utilizados para Inmunofluorescencias de Ki67 y 8-Oxoguanina

<i>Anticuerpo</i>	<i>Especie</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>	<i>N° Catálogo</i>
Anti-Ki67	Rabbit	1:400	<i>Cell signaling</i>	9129S
Anti-8-Oxoguanina	Mouse	1:100	<i>Merck</i>	MAB3560
Alexa Fluor® 488 anti-rabbit	Goat	1:300	<i>Invitrogen</i>	A11001
Alexa Fluor® 568 anti-mouse	Goat	1:300	<i>Invitrogen</i>	A11004

5.1.9 Lista de Partidores

Tabla 2: Partidores para evaluar daño al DNA, proliferación, diferenciación y pluripotencialidad.

Nombre Gen	Código	Forward	Reverse	Marca
H2A.X	H2AX_F1 y R1	TCCCTTCCAGCAAACCTCAAC	AACTCCCCAATGCCTAAGGT	IDT
OGG1	OGG1_F1 y R1	CAGGAAGGACAAGGCTCAAG	CTGTGGGTCTTGGGTGAGT	IDT
SOX2	FH1_SOX2 y RH1	ATAATAACAATCATCGGCGG	AAAAAGAGAGAGGCCAACTG	Sigma
NANOG	FH2_NANOG y RH2	CTATCCATCCTTGCAAATGTC	GTTCTGGTCTTCTGTTTCTTG	Sigma
POU5F1	FH1_POU5F1 y RH1	GATCACCTGGGATATACAC	GCTTTGCATATCTCCTGAAG	Sigma
MYH6	FH1_MYH6 y RH1	AGCAGAGAAACTTTGACAAG	TCCTGAAGGTTCTTGTCTC	Sigma
GATA4	FH1_GATA4 y RH1	AGACGTTCTCAGTCAGTG	ACGCAGTGATTATGTCCC	Sigma
NKX2.5	FH1_NKX2-5 y RH1	AAAGCCTGAAATTTAAGTCAC	CAGCATTTGTAGAAAGTCAGG	Sigma
TNNT2	FH1_TNNT2 y RH1	AGAGAGATGGACTTTGATG	TCCTCTTCTCCTGTTCTC	Sigma
Ki67	Ki-67 FH_2 Y RH_2	ATAAACACCCCAACACACACAA	GCCACTTCTTCATTCCAGTTACA	IDT
TPX2	TPX2 FH_1 Y RH_1	ACATCTGAACTACGAAAGCATCC	GGCTTAACAATGGTACATCCCTTA	IDT
Ciclina D1	Cyclin D1 FH_1 Y RH_1	TCGGTGTCTACTTCAAATGTGT	GGGATGGTCTCCTTCATCTTAG	IDT
PCNA	PCNA FH_2 Y RH_2	CCTTGGCGCTAGTATTTGAAGC	ACACAGCTGTACTCCTGTTCTG	IDT

5.1.10 Clones celulares

Tabla 3: Características de los clones de iPSCs usados para la diferenciación.

<i>Línea celular</i>	<i>Clon</i>	<i>Origen</i>	<i>Genotipo</i>
iPSC 3S	#440	Células madres embrionarias	47, XY, +21
iPSC 3S	#410	iPSC derivadas de fibroblastos	47, XY, +21
iPSC 2S	#409	iPSC derivadas de fibroblastos	46, XY
iPSC 2S	#406	Células madres embrionarias	46, XX

5.2 Metodología

5.2.1 Cultivo celular

Se utilizaron líneas de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) tanto de sujetos sanos (disómicas 2S, clones #406, #409) como pacientes con síndrome de Down (trisómicos 3S #410, #440). Las células fueron sembradas inicialmente en placas de 6 pocillos recubiertas con matrigel y mantenidas a 37°C al 5% de CO₂ con medio esencial 8 (E8) más suplemento con Normocin hasta alcanzar una confluencia del 80%. Luego de alcanzada la confluencia las células fueron desprendidas con Versene y expandidas a placas de 6 y 12 pocillos con el fin de obtener muestras para los diferentes experimentos.

5.2.2 Transfección iPSCs 2S y 3S

Se utilizaron los siRNA de RCAN1.1 y RCAN1.4 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las placas a una confluencia de 40% se preincubaron 1 hora con el inhibidor Y-27632 10 µM. Se prepararon soluciones para la transfección en medio Optimem® utilizando siRNA 50 nM, Y-27632 10 µM y lipofectamina RNAiMax dejándolas reposar 20 minutos para la formación de liposomas. Posteriormente se aspiró el medio E8 y se añadieron los siRNA de RCAN1 con los que se transfectaron las células durante 1 hora con las siguientes condiciones: siControl, siRCAN1.1, siRCAN1.4 y *doble-knockdown* (dKD). Luego de la hora, se completó volumen con medio E8 más el inhibidor Y-27632 10 µM. Pasadas 24 horas, se cambió el medio a E8 comercial + Normocin 1 mg/mL y se dejaron incubando por 24 horas hasta alcanzar la confluencia deseada para los experimentos. Con el uso de los siRNAs fue posible reducir los niveles de RCAN1.1; un 64% con el si1.1 de RCAN1 y un 40% con el dKD de RCAN1 en iPSC 2S, para iPSC 3S se redujo un 73% con el si1.1 de RCAN1 y 60% con el dKD de RCAN1 en términos de proteínas. Los transcritos de RCAN1.1 con los siRNA de RCAN fueron reducidos un 53% para el si1.1 de RCAN1 y el dKD en iPSC 2S; y un 75% para el si1.1 de RCAN1, 62% para el dKD de RCAN1 en iPSC 3S (Parra *et al.*, 2018).

5.2.3 Inmunofluorescencia iPSC

Se utilizaron muestras de cultivo tanto de iPSC 2S y 3S de los diferentes clones en placas de 12 pocillos con cubreobjetos para hacer inmunofluorescencias para Ki67 y 8-Oxoguanina. Se procedió a aspirar el medio de las placas con células luego de alcanzada una confluencia del 80% para las siguientes condiciones: siControl, siRCAN1.1, siRCAN1.4 y *doble knock-down* (dKD). Seguido de esto, se realizaron 3 lavados a las células con PBS 1X y se fijaron las células con PFA 4% v/v en PBS 1X durante 20 minutos trabajando con las muestras siempre en hielo. A continuación, se aspiró el PFA de las muestras y se lavó nuevamente con PBS 1X 3 veces. Con el fin de permeabilizar las células se empleó Tritón X-100 al 0,1 % por 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron nuevamente con PBS 1X 5 veces hasta eliminar todo el Tritón X-100, seguido se bloqueó las células con BSA 1% frío durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de la hora, se hicieron 3 lavados con PBS 1X y se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios anti-Ki67 y anti-8-Oxoguanina (detallados en la Tabla 1) diluidos en BSA 1% frío a 4°C en cámara húmeda durante toda la noche. Al día siguiente las muestras fueron nuevamente lavadas con PBS 1X 3 veces e incubadas en oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente detallado en la Tabla 1 (Alexa 488 anti-rabbit y Alexa 568 anti-mouse). Finalmente, las muestras fueron lavadas nuevamente con PBS 1X 3 veces y se procedió a montar en los cubreobjetos con Prolong Gold + DAPI. Las muestras se dejaron secando en oscuridad a temperatura ambiente durante toda la noche y se almacenaron hasta su visualización en el microscopio a 4°C y en oscuridad.

5.2.4 Análisis de Inmunofluorescencia

Las fotografías de las inmunofluorescencias fueron tomadas utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM 700 ubicado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, para estas se utilizó un objetivo de 63X tomando 4 fotos por condición experimental. Las imágenes fueron analizadas utilizando el *software* ImageJ midiendo la intensidad de fluorescencia total y la fluorescencia nuclear de las células.

5.2.5 Citometría de Flujo

Para el análisis del ciclo celular se usaron placas con iPSC tanto 2S y 3S hasta alcanzar una confluencia del 80% luego de la transfección con los siRNAs. Las células fueron tripsinizadas con Versene® y suero para detener la reacción, el medio fue luego traspasado a tubos Eppendorf en hielo y rotulados para las diferentes condiciones. Post-tripsinización, las muestras fueron rápidamente centrifugadas a 1000 G durante 5 minutos a 4°C. Obtenido el pellet, se eliminó el sobrenadante de los tubos y se resuspendieron las células en metanol absoluto frío (-20°C) lentamente y en agitación, posteriormente las muestras se colocaron a -20°C durante 15 minutos. Seguido de esto, las muestras se centrifugaron nuevamente a 1000 G durante 5 minutos a 4°C, luego se les eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en PBS 1X agregándoles RNasa A (1mg/mL), todo lo cual se incubó a 37°C durante 1 hora. Antes de la medición, las muestras se traspasaron a tubos FACS a los cuales se les agregó PI (1mg/mL) agitando y dejándose reposar en oscuridad durante 15 minutos. La medición se realizó después de agitar los tubos una última vez en un citómetro de flujo BD Accuri C. Para esta medición, se utilizaron las condiciones sin Sonda, siControl, siRCAN1.1, siRCAN1.4 y doble *Knock-down* (dKD). Los datos obtenidos se analizaron con el software BD Accuri C6 y FlowJo VX.

5.2.6 Diferenciación de cardiomiocitos derivados de iPSC

Se diferenciaron cardiomiocitos desde iPSCs según el método descrito por BurrIDGE *et al.* (2014) con el kit de diferenciación obtenido de Thermo. A placas de 12 pocillos con cultivo de iPSC 2S y 3S al alcanzar una confluencia del 80% se les aspiró el medio E8 y se les cambió por el Medio de Diferenciación A (MDA) manteniendo las células a 37°C con 5% de CO₂, considerándose este como el Día 1 del comienzo de la diferenciación. El MDA se dejó hasta el día 3 cuando se procedió a cambiar por el Medio de Diferenciación B (MDB), el cual se dejó hasta el día 5, comprobándose las células al microscopio cada día. Llegado el día 5 se aspiró el MDB y se cambió por Medio de Mantenimiento de Cardiomiocitos (MMC), cambiando este medio día por medio hasta llegar al día 10. El día 10 se aspiró el MMC y se cambió por Medio Enriquecido de Cardiomiocitos (MEC) dejando las células en incubación con este

medio hasta el día 16 y cambiándolo día por medio. El día 16 se aspiró el MEC y se cambió este por MMC, el cual fue colocado hasta el día 20 de la diferenciación cambiándolo día por medio. El día 20 se detuvo la diferenciación y las muestras se guardaron hasta la realización de los diferentes experimentos. Para la diferenciación las condiciones estudiadas fueron las siguientes: siControl, siRCAN1.1, siRCAN1.4 y *doble Knock-Down* (dKD); para el caso de los experimentos de PCR para evaluar marcadores de diferenciación se obtuvieron muestras de este proceso de los días 1, 10, 15 y 20 (D1, D10, D15 y D20). Para los experimentos de latidos se evaluó el estímulo de Norepinefrina en cardiomiocitos derivados de iPSC tanto 2S y 3S el día 15 de la diferenciación.

5.2.7 Extracción de RNA

Trabajando de forma estéril los cultivos de iPSCs 2S y 3S en placas de 6 pocillos fueron colocados en hielo y se les procedió a aspirar el medio, para luego ser lavados con PBS 1X frío 3 veces rápidamente. Luego del último lavado, las células se lisaron con TRIZOL en campana de extracción y las muestras fueron transferidas a microtubos estériles, a los cuales se les agregó cloroformo para luego agitar vigorosamente hasta mezclar las dos fases. Posteriormente, los tubos se incubaron en hielo por 5 minutos y luego se centrifugaron a 12.000 G por 15 minutos a 4°C. Tras esta última centrifugación, la fase acuosa (incolora/superior) se transfirió, evitando tomar la interfase, a un nuevo set de microtubos estériles rotulados para cada condición; se les agregó isopropanol e incubó durante 1 hora o toda la noche a -20°C. Obtenido el pellet, se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 mL de etanol 75% frío y centrifugación a 7.500 G por 5 minutos a 4°C; seguidamente se eliminó nuevamente el sobrenadante y el pellet se dejó secando a temperatura ambiente por inversión por aproximadamente 30 min. Finalmente, el pellet se disolvió en agua libre de nucleasas (20-30 µL) y la cantidad de RNA presente en la muestra se midió evaluando la razón 260/280 en un equipo Nanodrop.

5.2.8 RTqPCR

Para la obtención del cDNA a las muestras de RNA de iPSCs 2S y 3S se les realizó retrotranscripción en termociclador. Se trabajó con una concentración de 300 ng de

RNA en tubos de PCR a un volumen final de 20 μL haciendo un mix total de 20 μL (3 μL de la dilución de la muestra, 4 μL de IScript 5X buffer, 1 μL de enzima y 12 μL de agua libre de nucleasas). Posteriormente se corrieron las muestras preparadas en el Termociclador Biometra Tone mediante el programa con los parámetros establecidos en el laboratorio. Una vez terminada la reacción, las muestras de cDNA se trabajaron directamente o se almacenaron en frío a -20°C . Posteriormente, se preparó en tubos PCR la mezcla para qPCR utilizando el Master mix PowerUp SYBR Green de Thermo (5 μL) para cada muestra, agregándose agua libre de nucleasas (3 μL), los diferentes partidores *Forward* y *Reverse* (0.5 μL cada uno) y el cDNA preparado en el paso anterior (1 μL generalmente de una dilución 1/10, dependiendo de la validación de los partidores). Las secuencias de los partidores usados para cada gen se encuentran detallados en la Tabla 2. Los datos fueron normalizados con respecto al control interno rRNA 18S.

5.2.9 Estímulos con Norepinefrina

Luego de realizado el protocolo de diferenciación hacia cardiomiocitos a partir de células iPSCs 2S y 3S, se contaron los latidos de los cardiomiocitos antes y después de un estímulo con Norepinefrina a una concentración de 10 μM durante 5 minutos. Los latidos se contaron utilizando un microscopio invertido con el fin de evaluar la tasa de latidos por minuto de los cardiomiocitos diferenciados.

5.2.10 Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Para evaluar la significancia de cada resultado se aplicaron los siguientes tests estadísticos: ANOVA de 1 vía para comparaciones entre iPSCs 2S y 3S con siRNA con pos-test de Tukey de múltiples comparaciones y ANOVA de dos vías con post test de Sidak de múltiples comparaciones para muestras de iPSCs en diferentes días de diferenciación. Se consideró un $p < 0,05$ como significativo estadísticamente para los diferentes experimentos.

6. RESULTADOS

6.1 Analizar el efecto de la trisomía del cromosoma 21 sobre la proliferación celular de iPSC disómicas y trisómicas y estudiar el rol de RCAN1 en este proceso

6.1.1 Efectos de RCAN1 sobre la proliferación de iPSC

RCAN1 ha sido identificada como una proteína responsable de alteraciones en la mitocondria siendo sobreexpresada en SD (Jiang *et al.*, 2017), datos de nuestro laboratorio han demostrado que RCAN1 es sobreexpresado en células iPSCs trisómicas (3S) de forma significativa en comparación a células disómicas (2S) y que el silenciamiento de estas células por medio de un siRNA de RCAN1 revirtió los niveles de expresión de esta proteína. La disminución de los niveles de RCAN1 llevo a un incremento de la fisión mitocondrial de iPSC 3S afectando la dinámica mitocondrial (Parra *et al.*, 2018). Además, se ha visto que cambios a nivel mitocondrial pueden conducir a alteraciones en la proliferación y crecimiento celular (Ryan *et al.*, 2015).

Es por esto que para evaluar cómo RCAN1 afecta la proliferación se realizaron cultivos de iPSCs 2S y 3S, las cuales fueron sembradas y se mantuvieron en Medio E8 con Normocin® a una concentración de 50 mg/mL en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°. Las células crecieron en placas previamente recubiertas con Matrigel hasta alcanzar un 75-80% de confluencia cuando fueron silenciadas con el siRNA de RCAN1.1 y RCAN1.4. Tanto iPSCs 2S como 3S fueron fijadas con paraformaldehído 4%, permeabilizadas con Triton-X-100 0,1% por 20 minutos en PBS frío. Luego las células se incubaron con el anticuerpo primario contra Ki67, el cual ha sido demostrado que posee un comportamiento no binario lo que permite su medición por medio de la intensidad de fluorescencia nuclear. Posterior a la incubación con Ki67, las células se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente. La visualización de Ki67 se realizó por medio de microscopia confocal (Miller *et al.*, 2018; Parra *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos de las inmunofluorescencias muestran que las iPSCs presentan mayor intensidad de fluorescencia nuclear para la condición 3S control que

en células 2S control (**Figura 10A**). Para el caso del silenciamiento de iPSC 3S se observó una disminución de la fluorescencia nuclear al usar el siRNA de RCAN1.1, pero no para el siRNA de RCAN1.4 donde los niveles se mantienen similares al control. En el caso del doble *knock-down* se observó una disminución, pero no significativa. (**Figura 10A**). La cuantificación de estos resultados es mostrada en la (**Figura 10B**) donde se observa el aumento en la proliferación de iPSC 3S en contraste a las 2S, y que por medio del silenciamiento de la isoforma 1.1 de RCAN1 se disminuye la proliferación vista en iPSC 3S. Esto daría cuenta que la sobreexpresión de RCAN1 presente en SD tiene un rol en las diferencias existentes en la proliferación de iPSC 2S y 3S atribuible a la isoforma 1.1 de esta proteína. Dados estos resultados, para los siguientes experimentos de este objetivo, sólo se continuó trabajando con el siRNA de la isoforma 1.1 de RCAN y el doble *knock-down*.

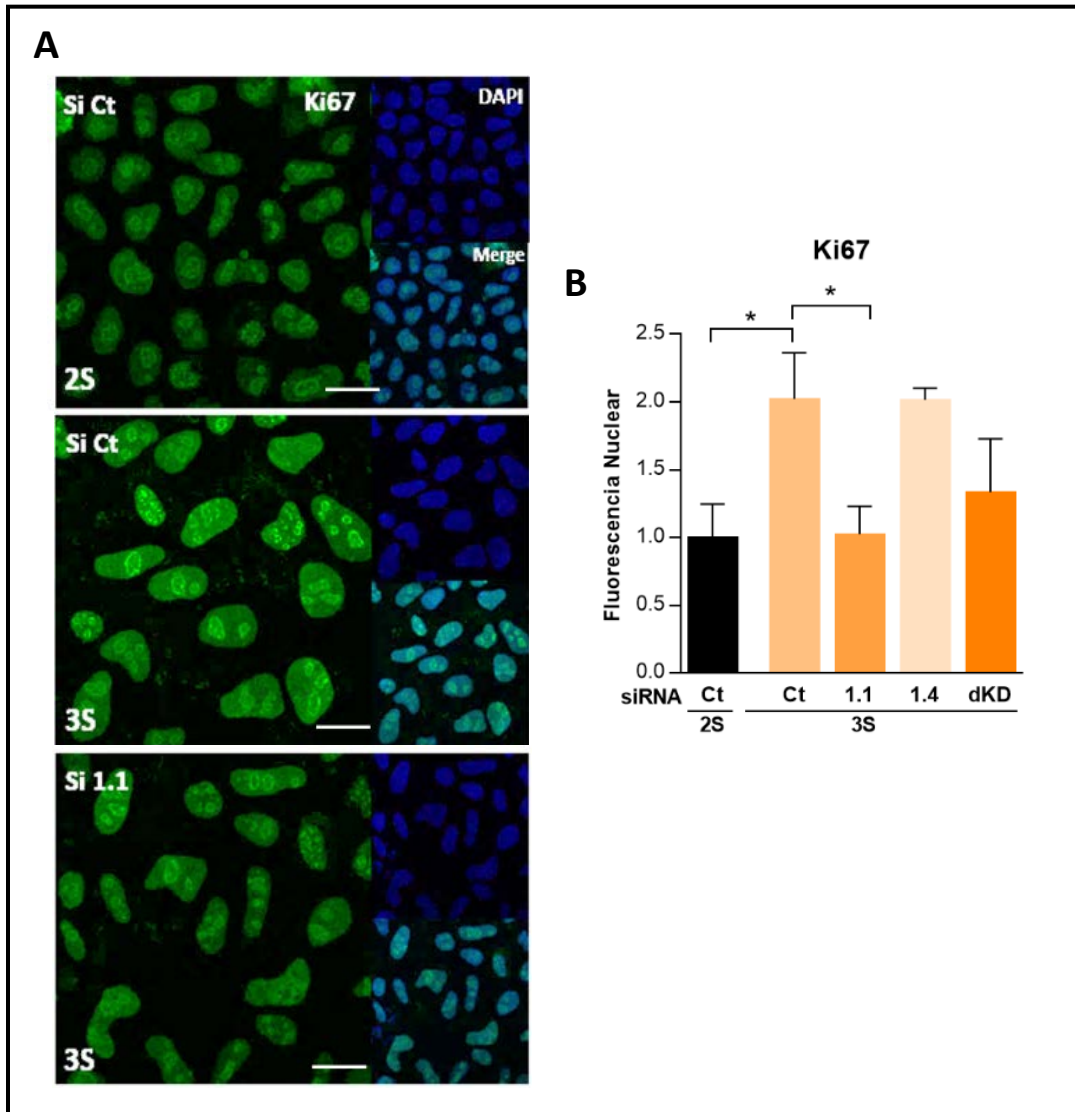


Figura 10: Proliferación de iPSC 2S y 3S por inmunofluorescencia de Ki67. A. Inmunofluorescencia para Ki67 por medio de microscopía confocal. iPSCs 2S y 3S fueron marcadas con Ki67 (verde) y DAPI (azul). **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia nuclear de las imágenes en panel A. Condición control (C) para 2S y 3S y silenciamiento de RCAN1.1 (si1.1), 1.4 (si1.4) y doble *knock-down* (dKD). Los datos corresponden al promedio \pm SEM para un $n=5$. Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de 1 vía con post test de Holm-Sidak de múltiples comparaciones con $* = p < 0,05$. La barra de escala corresponde a $150 \mu\text{m}$.

6.1.2 Efecto de RCAN1 sobre el ciclo celular de iPSC disómicas y trisómicas

Se ha demostrado que alteraciones en las etapas del ciclo celular, como el cambio en los niveles de ciclinas juegan un rol fundamental en la respuesta celular de proliferación (Yang *et al.*, 2006). Con el fin de comprobar esto y corroborar los resultados observados mediante la inmunofluorescencia de Ki67, se decidió analizar la proliferación de iPSC 2S y 3S y su dependencia frente a los niveles de expresión de RCAN1. Para esto, se estudió el ciclo celular de estas células en condiciones de silenciamiento (siRNA de RCAN1.1 y dKD), evaluando las etapas sub-G1, G1, S y G2/M mediante citometría de flujo.

Los resultados muestran, en primera instancia, los diagramas del ciclo celular tanto para iPSC 2S y 3S tratadas con el siRNA de RCAN1 (**Figura 11.A**) identificando cada fase del ciclo para las diferentes condiciones. Luego, cada fase se graficó según el número de células en cada etapa del ciclo celular (**Figura 11.B-E**). Dicho procedimiento no tuvo efectos significativos en las iPSC 2S y 3S tanto en fase G1, S y G2/M (**Figura 11.B-D**), pues no hubo cambios aparentes en los perfiles del ciclo en cada condición, ni tampoco fueron significativos en la representación gráfica de estos. Para el caso de la etapa sub-G1 (**Figura 11.E**) se apreció un aumento significativo en la población de iPSC 2S, en contraste a lo observado en iPSC 3S. En resumen, las etapas del ciclo celular G1, S y G2/M no se vieron afectadas de forma significativa por el siRNA de RCAN1.1 y su dKD en iPSCs 2S y 3S (**Figura 11.B-D**), y para el caso de la etapa sub-G1 las iPSC 2S tuvieron una mayor población celular en contraste a las 3S (**Figura 11.E**), posiblemente por tener un gran número de células que entran en apoptosis en cada ciclo. Sin embargo, para corroborar lo anterior de forma más minuciosa deben realizarse más análisis representativos del ciclo celular. Los porcentajes de cada población celular en las diferentes etapas del ciclo celular son señalados en la Tabla 4.

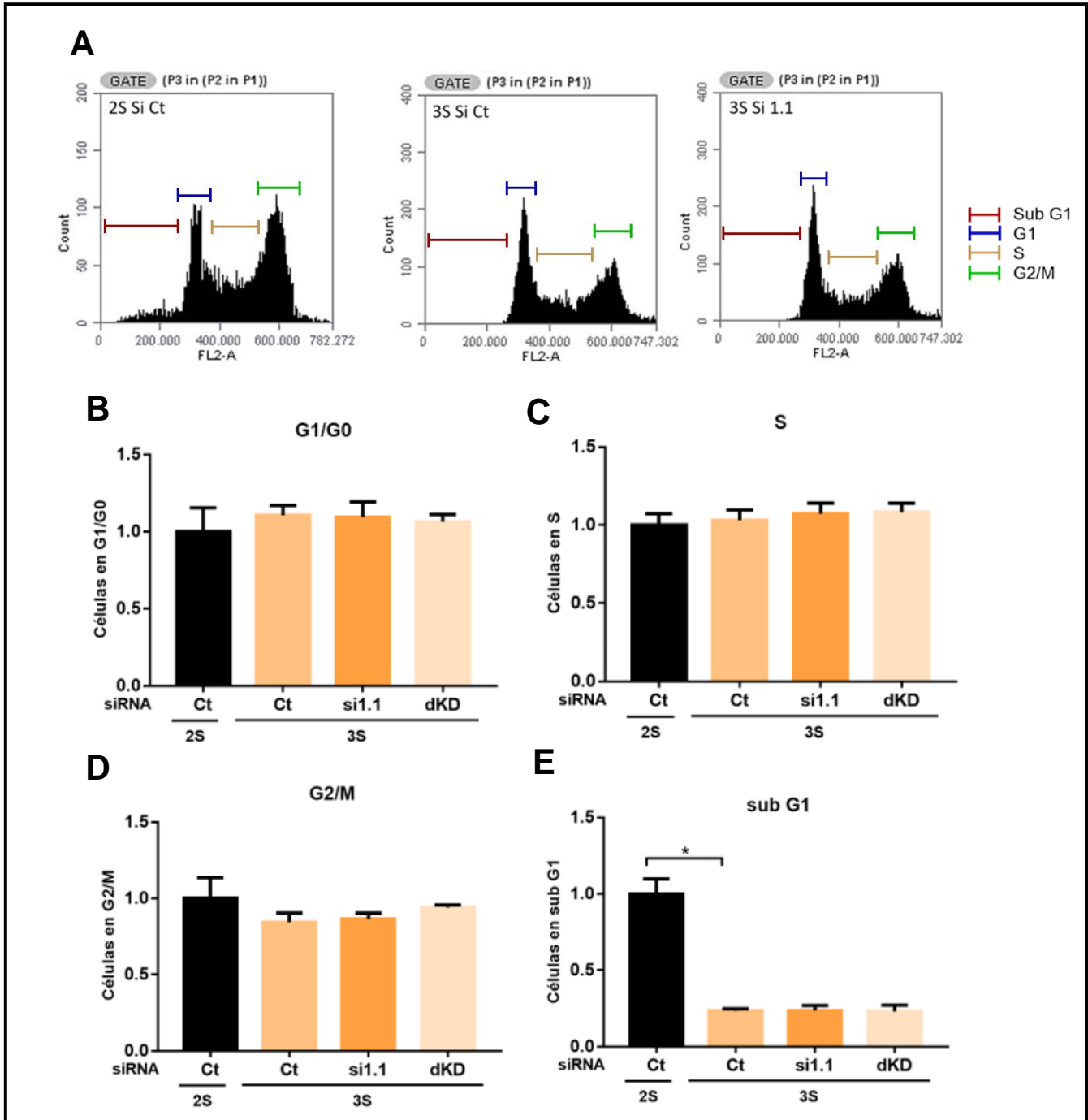


Figura 11: Ciclo celular de iPSC 2S y 3S. **A.** Diagramas de las fases del ciclo celular G1, S, G2/M y sub-G1 para iPSCs 2S y 3S en condiciones Control (C) y con silenciamiento de RCAN1.1 (1.1). Las células fueron tratadas con con PI y el ciclo celular se analizó mediante citometría de flujo. **B-E.** Porcentaje de células en cada etapa del ciclo celular para las diferentes condiciones. Condición Control (C) para 2S y 3S y silenciamiento de RCAN1.1 (1.1), 1.4 (1.4) y *doble knock-down* (dKD). Los datos corresponden al promedio \pm SEM para un $n=3$. Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de 1 vía con post test de Tukey de múltiples comparaciones. * = $p<0,05$

Tabla 4: Porcentajes de las poblaciones celulares de iPSCs 2S y 3S en las diferentes etapas del ciclo celular.

		% células en G1/G0	% células en S	% células en G2/M	% células en sub-G1
2S	Si control	31,13	20,39	38,18	5,81
3S	Si control	35,7	21,11	33,28	1,46
3S	Si RCAN1.1	35,57	21,76	33,98	1,49
3S	dKD	33,98	21,67	36,6	1,38

6.1.3 Expresión génica de marcadores de proliferación en iPSC disómicas y trisómicas

Con el fin de comprobar las alteraciones en la proliferación celular observadas en iPSC 3S mediante inmunomarcación con Ki67 (**Figura 10**), pero que no se pudieron corroborar mediante la técnica de ciclo celular y citometría de flujo (**Figura 11**); se decidió analizar la expresión de mRNAs marcadores de proliferación, previamente estandarizados para su uso en la clínica por medio de RT-qPCR (Magloire *et al.* 2011, Brizova *et al.* 2010) en las iPSC para las diferentes condiciones de silenciamiento de RCAN1 (**Figura 12**). Los genes que se escogieron para esto fueron *Ki67* (marcador de proliferación celular), *PCNA* (antígeno nuclear de células en proliferación), *Ciclina D1* (regulador de la proliferación/ciclo celular) y *TPX2* (proteína asociada al ensamblaje y crecimiento de los microtúbulos durante la mitosis).

Los resultados de los RT-qPCR muestran que para los genes *Ki67* y *TPX2* (**Figura 12A-B**) existe un aumento significativo en los niveles de mRNA en iPSC 3S en comparación a iPSC 2S, lo cual corrobora lo visto por las inmunofluorescencias de Ki67. En estos mismos genes se puede observar que al silenciar la isoforma de RCAN1 1.1 los niveles de mRNA disminuyen de forma eficaz en iPSC trisómicas a niveles similares a los vistos en iPSC disómicas, lo mismo fue observado al hacer un doble *knock-down* de RCAN 1.1 y 1.4.

En cuanto a los genes *PCNA* y *la Ciclina D1* (**Figura 12C-D**), a pesar de que se observa una importante tendencia con *PCNA*, no hubo diferencias significativas entre iPSC 2S y 3S en los niveles de los transcritos de los genes *PCNA* y *la Ciclina D1*.

Por tanto, estos datos dan cuenta y reafirman nuestros resultados observados por medio de las inmunofluorescencias donde Ki67 es mayor en iPSC 3S en comparación a 2S, lo cual es similar a lo visto en la expresión de mRNAs donde la sobreexpresión de RCAN1 impacta en la expresión de los genes *Ki67* y *TPX2* evaluado por RT-qPCR. Por ende, las células que presentan la trisomía proliferarían más que células disómicas y, por medio del silenciamiento de RCAN1, se generaría un fenotipo similar al observado en células disómicas.

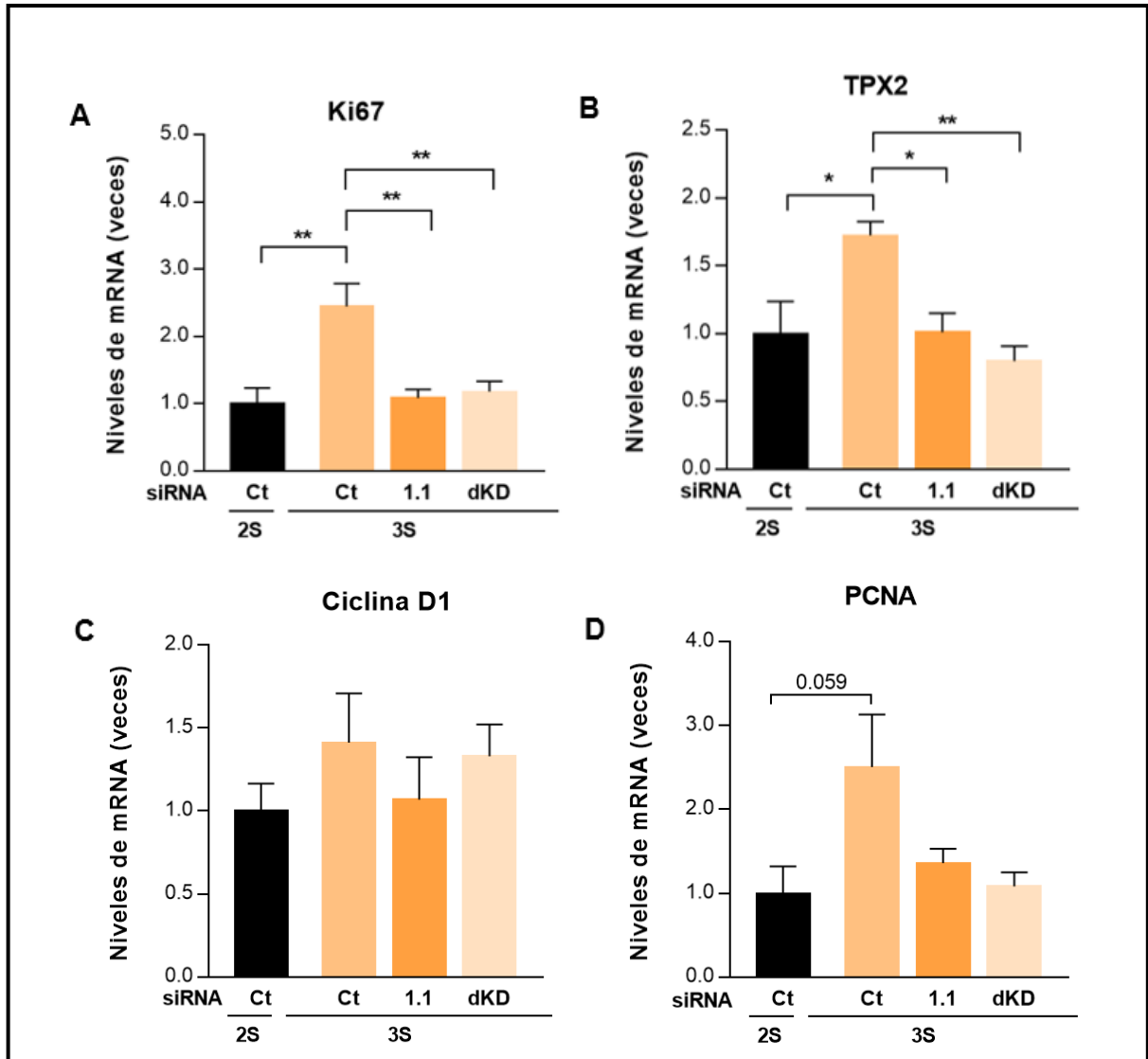


Figura 12: Evaluación de la proliferación por medio de la expresión de mRNAs en iPSC disómicas y trisómicas. Los niveles de transcritos para Ki67 (A), TPX2, *Targeting protein for Xklp2* (B) PCNA, *Proliferating cell nuclear antigen* (C) y Ciclina D1 (D) fueron cuantificados por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR). Los datos corresponden al promedio \pm SEM para un n=4. Los resultados fueron comparados utilizando un ANOVA de 1 vía con post test de Tukey de múltiples comparaciones. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

6.2. Determinar el daño al DNA presente en iPSC y cardiomiocitos derivados de iPSC presentes con la trisomía 21 y ver si se rescata este daño al recuperar la función normal de RCAN1 en estas células

6.2.1 Daño al DNA visto por Inmunofluorescencia de 8-Oxoguanina en iPSC 2S y 3S

Es sabido que en SD existe un notorio aumento en las roturas de las dobles hélices del DNA producto de las alteraciones metabólicas de estos sujetos como son el desbalance de radicales libres (Murray *et al.*, 2015). Además, de acuerdo con datos de nuestro laboratorio, se determinó que existe un aumento en la producción de ROS en iPSC 3S (Parra *et al.* 2018), lo cual postulamos podría llevar a un aumento en el daño al DNA visto en iPSC. En función de lo anterior, se evaluó el daño al DNA en iPSC 2S y 3S. Para analizar esto, se midieron los niveles del producto de oxidación (8-Oxoguanina) el cual es dependiente de la producción de ROS y es útil como marcador de daño al DNA (Obtułowicz *et al.*, 2010). Por lo anterior, se realizó una inmunofluorescencia para 8-Oxoguanina según la metodología descrita anteriormente en el objetivo 1 obteniendo los resultados de la **Figura 13**.

Los resultados obtenidos de las inmunofluorescencias de iPSC para el marcador 8-Oxoguanina muestran una mayor intensidad de fluorescencia total en iPSC 3S control que en células 2S control (**Figura 13A**), corroborando lo descrito en la literatura donde describen un daño al DNA mayor en sujetos con SD (Murray *et al.*, 2015). Para el caso del silenciamiento de iPSC 3S, se observó menor fluorescencia total al emplear el siRNA de la isoforma de RCAN1.1 (1.1) y el doble *knock-down* (dKD), pero no se observaron cambios para el siRNA de RCAN1.4 (1.4) (**Figura 13A**). La cuantificación de estos resultados es mostrada en la **Figura 13B** donde se ve un aumento significativo en los niveles de 8-Oxoguanina en iPSC 3S control en comparación a las 2S. Por otro lado, al usar los siRNAs se ve una disminución significativa para el si1.1 y dKD de RCAN1, pero no en el caso del si1.4 de RCAN1. Por tanto, esto daría cuenta que la sobreexpresión de RCAN1 presente en SD provocaría el daño al DNA de iPSC 3S demostrado por el aumento del producto 8-Oxoguanina, esto presumiblemente como consecuencia del desbalance existente en

la producción de ROS en estos pacientes. Dados estos resultados y al igual que en el Objetivo específico 1; para los siguientes experimentos de este objetivo, sólo se continuó trabajando con el siRNA de la isoforma 1.1 de RCAN y el doble *knock-down*.

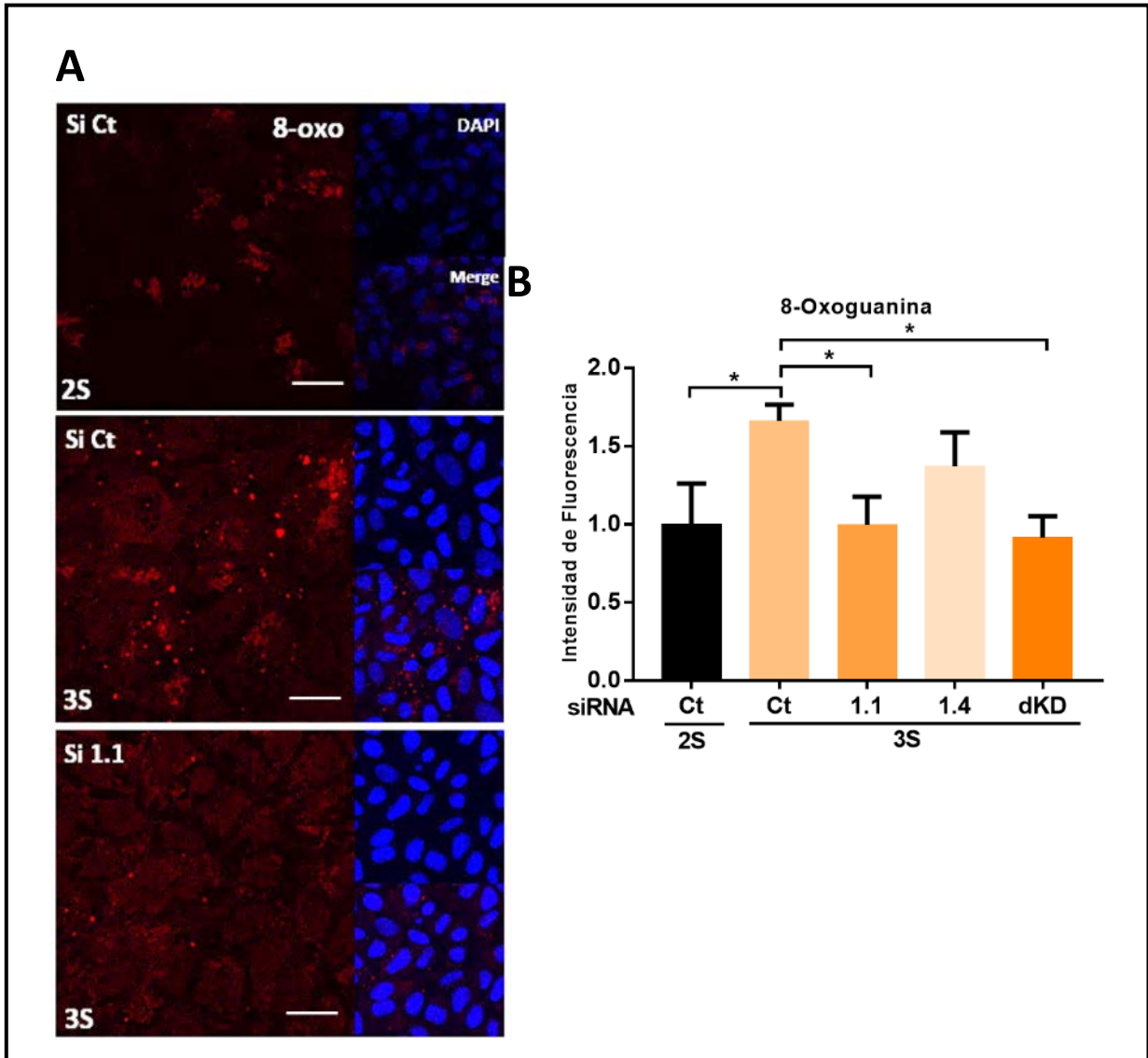


Figura 13: Daño al DNA de iPSC 2S y 3S por inmunofluorescencia de 8-Oxoguanina. A. Inmunofluorescencia para 8-Oxoguanina por medio de microscopía confocal. iPSCs 2S y 3S fueron marcadas con 8-Oxoguanina (rojo) y DAPI (azul). **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total de las imágenes del panel A. Condición control (Ct) para 2S y 3S y silenciamiento de RCAN1.1 (1.1), 1.4 (1.4) y doble *knock-down* (dKD). Los datos corresponden al promedio \pm SEM para un $n=6$. Los resultados fueron comparados utilizando ANOVA de 1 vía con post test de Tukey de múltiples comparaciones. * = $p<0,05$

6.2.2 Expresión de genes marcadores de daño al DNA en iPSC 2S y 3S

Para corroborar los datos obtenidos mediante la inmunofluorescencia contra el marcador 8-Oxoguanina en iPSC (**Figura 13**), se decidió evaluar la expresión de genes de daño al DNA. Se utilizó nuevamente para esto el siRNA humano específicos para la isoforma de RCAN1.1 el cual mostró una respuesta en la inmunofluorescencia y se evaluó la expresión de mRNAs por medio de RT-qPCR en estas células para las diferentes condiciones de silenciamiento de RCAN1. Los genes empleados para esto fueron *OGG1* (“8-Oxoguanine glycosylase”) y *H2AX* (“H2A histone family member X”), genes claves en la respuesta al daño al DNA (Obtułowicz *et al.*, 2010).

Los resultados de los RT-qPCR muestran que para el gen de *H2AX* no existen diferencias significativas entre iPSC 2S y 3S en condiciones controles, y para el caso del silenciamiento de la isoforma 1.1 de RCAN1 se observó una tendencia a la disminución de la expresión de *H2AX*, tal como se puede observar en el gráfico de la **Figura 14A**. En cuanto al doble *knockdown* de RCAN1 no hubo diferencias apreciables.

Por otra parte, para el caso del gen de *OGG1* en condiciones controles para iPSC 2S y 3S, se encontró que existe un aumento significativo de la expresión de este gen en 3S en comparación a las 2S. Respecto a la isoforma de RCAN1.1, al emplear el siRNA se logró obtener un resultado significativo para el uso de la isoforma RCAN1.1 que mostro una disminución significativa de la expresión de *OGG1* en iPSC 3S en contraste a la condición control (**Figura 14B**). En cambio, el dKD mostró cambios aparentes pero no significativos en los niveles de expresión de *OGG1*.

En conclusión, estos datos respaldan los resultados observados por medio de las inmunofluorescencias donde 8-Oxoguanina es mayor en iPSC 3S en comparación a 2S, similar a lo visto en la expresión del mRNA de *OGG1*, la cual corresponde a una enzima DNA glicosilasa encargada de procesar a 8-Oxoguanina. Por último, el silenciamiento de RCAN1.1 lleva a una disminución del daño al DNA presente en iPSC 3S a niveles similares a lo visto en iPSC 2S.

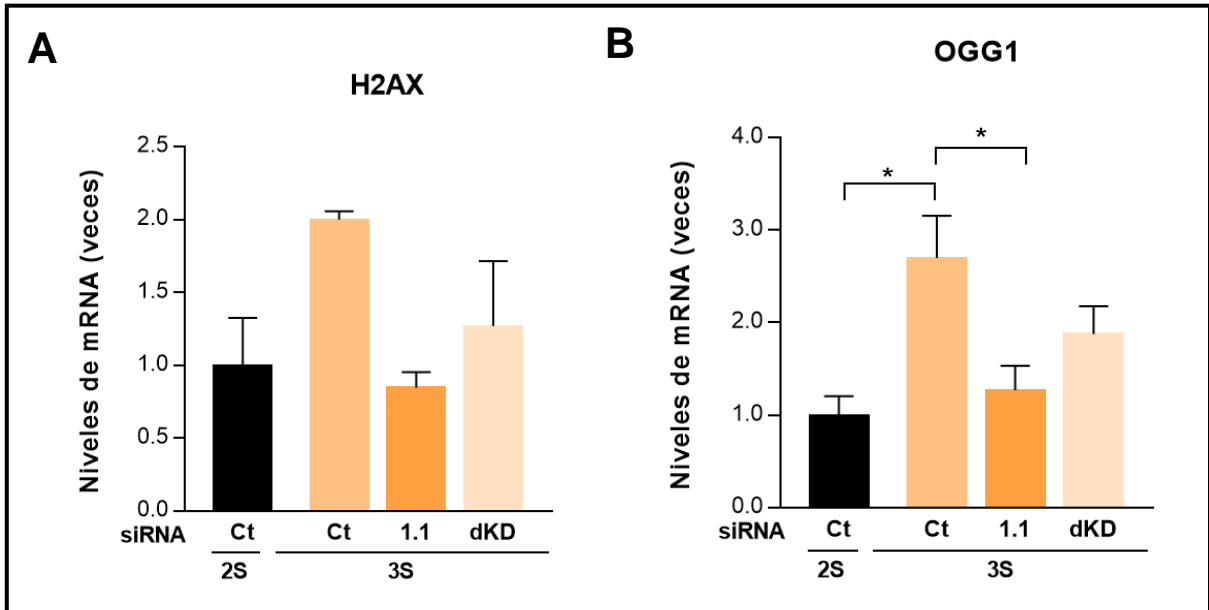


Figura 14: Evaluación del daño al DNA por medio de la expresión de mRNAs en iPSC disómicas y trisómicas. Los niveles de transcritos para H2AX, H2A histone family member X (A) y OGG1, 8-Oxoguanine glycosylase (B) fueron cuantificados por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR). Los datos corresponden al promedio \pm SEM para un n=4. Los resultados fueron comparados utilizando un ANOVA de 1 vía con post test de Tukey de múltiples comparaciones. * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$.

6.3. Evaluar y caracterizar el rol de RCAN1 en el proceso de diferenciación de cardiomiocitos derivados de iPSCs 2S y 3S.

6.3.1 Caracterización del proceso de diferenciación de cardiomiocitos derivados de iPSC mediante la expresión de genes

Evalutados ya los parámetros de proliferación y daño al DNA en iPSC 2S y 3S, logramos encontrar que RCAN1 provoca alteraciones en estos procesos dependientes de su expresión. Por otro lado, ya se ha descrito en literatura que pacientes con SD presentan diversas malformaciones a nivel cardiaco y que alteraciones en los procesos proliferativos pueden llevar a generar una disfunción en la diferenciación celular (Kędziora *et al.*, 1988; Ruijtenberg & van den Heuvel, 2016). En vista de esto, se empleó el proceso de diferenciación adaptado de Burridge *et al.* (2014), estandarizando este proceso (**Figura 15**) y evaluando como se ve alterada la diferenciación en cardiomiocitos derivados de iPSC, además de hacer estudios de funcionalidad de cardiomiocitos que derivan de iPSCs 2S y 3S.

Para el proceso de diferenciación se usaron dos líneas celulares de iPSC 2S y 3S empleando un Kit con MDA, MDB, MEC y MMC, durante un proceso de 20 días como se aprecia en la **Figura 15**. Empleando este protocolo de diferenciación se decidió evaluar la expresión tanto de genes pluripotenciales como cardiacos. Para esto se empleó RT-qPCR y se analizaron los genes *SOX2*, *NANOG* y *POU5F1*, genes ya descritos en literatura como pluripotenciales. Esto se evaluó los días 0, 10, 15 y 20 del proceso de diferenciación de iPSC 2S y 3S. Por otro lado, para evaluar en si el proceso de diferenciación, se analizó la expresión de los genes cardiacos tempranos *MYH6* y *GATA4*, como los genes tardíos *NKX2.5* y *TNNT2*.

Los resultados mostrados en la **Figura 16** dan cuenta que para los genes pluripotenciales *SOX2*, *NANOG* y *POU5F1* estos se encuentran expresados durante el Día 0 de diferenciación en las muestras de iPSC y conforme avanza el proceso de diferenciación las células iPSC pierden su capacidad pluripotencial, visto así por medio de la disminución significativa de la expresión de los genes *SOX2*, *NANOG* y *POU5F1*. Cabe destacar que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de estos genes entre los cardiomiocitos derivados de iPSC 2S y 3S.

Al evaluar la expresión de los genes cardiacos tempranos *MYH6* y *GATA4* (**Figura 17A-B**) durante el día 0, su expresión fue casi nula y comenzaron a tener un aumento significativo luego del día 10 de la diferenciación, esto tanto en los cardiomiocitos derivados de iPSC 2S y 3S. Además, logramos ver un cambio significativo entre 2S y 3S en la expresión de estos genes cardiacos, principalmente durante el día 15. Por otro lado, para los genes cardiacos tardíos *NKX2.5* y *TNNT2* también se observó que su expresión durante el día 0 era casi nula, confirmando la pluripotencialidad tanto de los cardiomiocitos derivados de iPSC 2s y 3S. Al analizar la expresión durante el transcurso de los días se observa que estos genes aumentan de forma significativa con respecto a sus controles, siendo estos mayormente expresados en cardiomiocitos derivados de iPSC 2S que los derivados de 3S (**Figura 17C-D**).

Por tanto, a partir de esto podemos saber que el protocolo de diferenciación genera cardiomiocitos derivados de iPSC tanto de 2S y 3S. Esto fue confirmado por la expresión de genes tanto pluripotenciales como cardiacos, pues para el caso de los primeros disminuyeron de forma significativa en el transcurso de la diferenciación tanto en iPSC 2S y 3S, y, por otro lado, los genes cardíacos aumentaron de forma significativa encontrando diferencias entre los cardiomiocitos 2S y 3S siendo mayor en los 2S. Esto último estaría dando cuenta de una alteración en este proceso de diferenciación, lo cual posiblemente seria la causante de las disfunciones cardiacas visto en los sujetos con SD, no obstante, para confirmar esto más estudios serán necesarios.

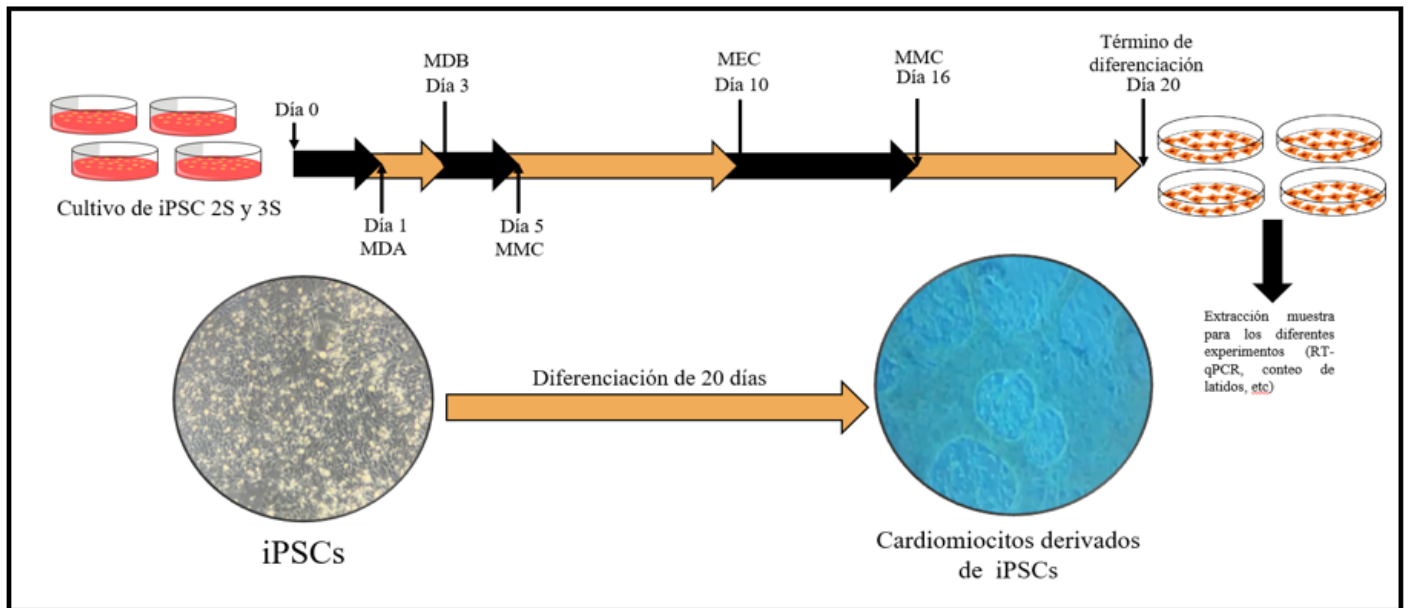


Figura 15: Esquema general del proceso de diferenciación celular de iPSC 2S y 3S. Esquema que da cuenta del protocolo de diferenciación hacia cardiomiocitos derivados de iPSC adaptado de Burrige *et al* (2014). Las muestras fueron obtenidas los días 0, 10, 15 y 20 para los diferentes experimentos.

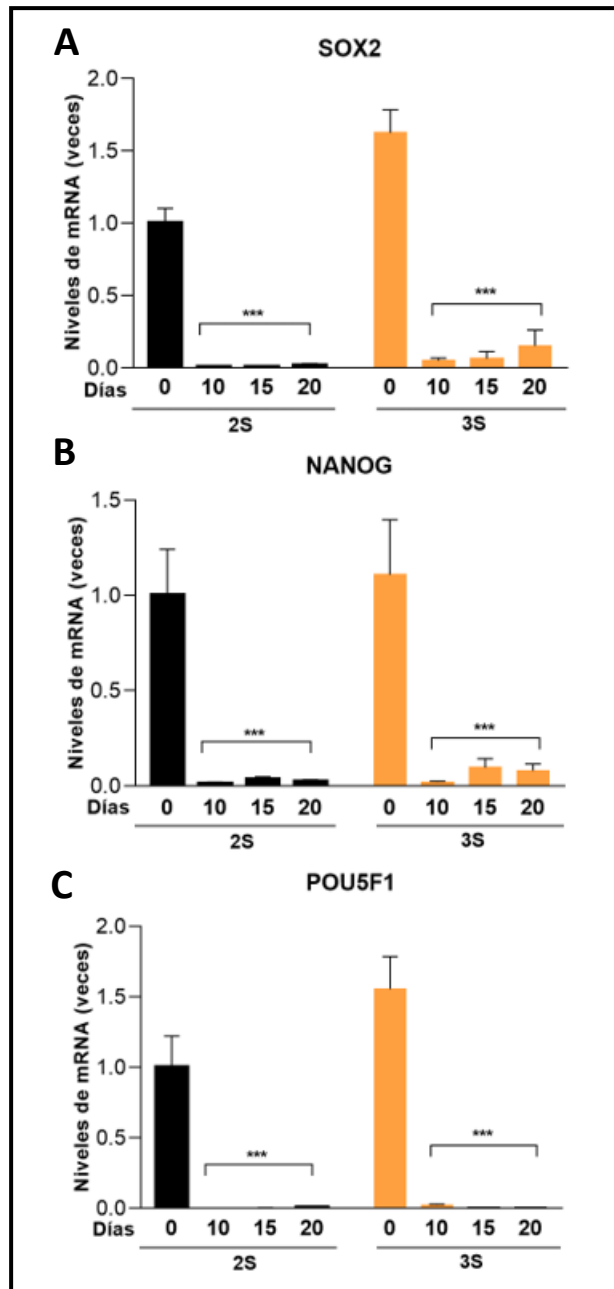


Figura 16: Expresión de genes pluripotenciales en iPSC 2S y 3S. A-C. RT-PCRs que muestran la expresión para genes pluripotenciales en células disómicas y trisómicas durante el paso de los días (Días 0, 10, 15 y 20). Los datos corresponden al promedio \pm SEM para un $n=5$. Los resultados fueron comparados utilizando un ANOVA de dos vías con un post test de Sidak de múltiples comparaciones. *** = $p < 0,001$ versus control día 0 correspondiente.

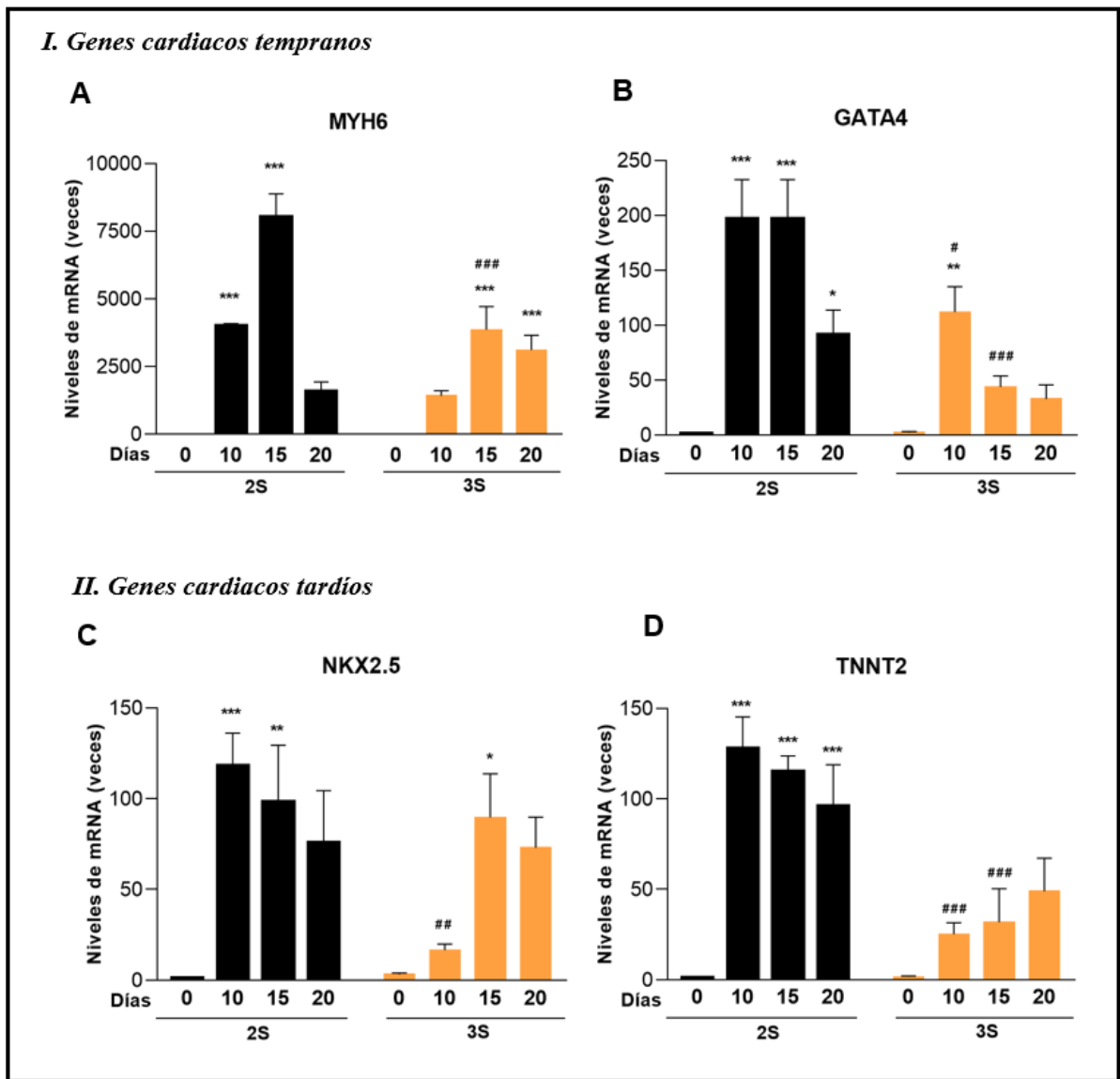


Figura 17: Expresión de genes cardiacos en iPSC 2s y 3S. RT-PCRs muestran la expresión para genes cardiacos tempranos (A-B) y tardíos (C-D) en células disómicas y trisómicas durante el paso de los días (Días 0, 10 15 y 20). Los datos corresponden al promedio \pm SEM para un $n=6$. Los resultados fueron comparados utilizando un ANOVA de dos vías con un post test de Sidak de múltiples comparaciones. * = comparaciones con respecto al control Día; # = comparaciones entre 2S y 3S. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, *** = $p<0,001$, # = $p<0,05$, ## = $p<0,01$, ### = $p<0,001$.

6.3.2 Análisis funcional de cardiomiocitos derivados de iPSC 2S y 3S

A partir de los resultados de expresión génica observados en los cardiomiocitos derivados de iPSCs (**Figura 16-17**) se procedió a evaluar la funcionalidad de estos mediante el conteo de latidos. Desde el día 15 ya se empezó a observar la presencia de latidos en los cardiomiocitos derivados de iPSC. Las muestras fueron analizadas durante el día 20, donde fue terminado el proceso de diferenciación para evaluar la funcionalidad de cardiomiocitos 2S y 3S. En este caso se empleó Norepinefrina (NE) para estimular estos cardiomiocitos y lograr encontrar diferencias entre los 2S y 3S, evaluando antes y después de añadir el estímulo de NE. Los resultados de este experimento son mostrados en la **Figura 18** y se logró observar que el perfil de latidos de cardiomiocitos 3S es significativamente mayor que cardiomiocitos 2S, pero no existe una respuesta de los cardiomiocitos 3S frente al uso de Norepinefrina, en contraste de las 2S que responden al estímulo de NE; lo que apoyaría la idea de una disfunción de las células 3S.

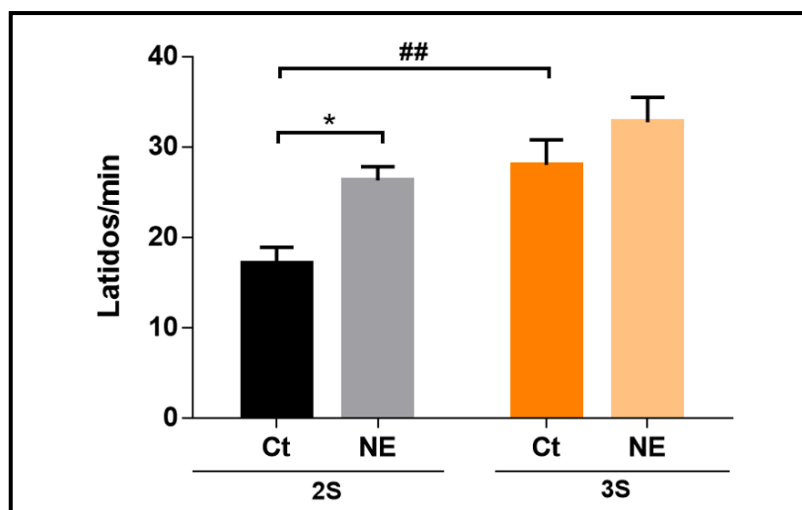


Figura 18: Cambios en la tasa de latidos de iPSC disómicas (2S) y trisómicas (3S) en función del tiempo. Se hizo un conteo de latidos en muestras de cardiomiocitos 2S y 3S con un estímulo de 10 mM de NE durante 5 minutos mediante microscopia. Condiciones Control (Ct) y con Norepinefrina (NE). Los datos corresponden al promedio \pm SEM para un $n=11$. Los resultados fueron comparados utilizando un ANOVA de dos vías con un post test de Sidak de múltiples comparaciones. * = comparaciones con respecto al control Día 0; # = comparaciones entre 2S y 3S. * = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$.

6.3.3 Efecto del silenciamiento de RCAN1 sobre cardiomiocitos derivados de iPSC 2S y 3S

Luego de evaluar el proceso de diferenciación mediante la expresión de genes pluripotenciales y cardiacos, se buscó determinar si RCAN1 tenía un efecto directo en la expresión de estos genes cardiacos en cardiomiocitos derivados de iPSC 2S y 3S. Para esto se generaron cardiomiocitos a partir de las iPSC 2S y 3S y, usando un siRNA de RCAN1.1, se hizo el silenciamiento de esta proteína antes de ser sometidas las iPSC al proceso de diferenciación. Finalmente, se evaluó por medio de RT-qPCR la expresión de los genes cardiacos, tanto tempranos *MYH6* y *GATA4* como los genes tardíos *NKX2.5* y *TNNT2*.

Al medir la expresión de los genes cardiacos *MYH6* y *GATA4* (**Figura 19A-B**) durante el día 15 de diferenciación, se observó que, como ya se vio en los resultados de la figura anterior, los cardiomiocitos derivados de iPSC 2S presentan mayores niveles de expresión de estos genes en comparación a los cardiomiocitos controles derivados de iPSC 3S. Sin embargo, por medio del silenciamiento de RCAN1.1 de la condición 3S podemos observar que existe un aumento significativo tanto para *MYH6* y *GATA4* en sus niveles de expresión en comparación a la condición 3S control. Por otro lado, para el caso de los genes cardiacos tardíos *NKX2.5* y *TNNT2* (**Figura 19C-D**) se observó que en la condición 2S la expresión de estos genes es significativamente mayor en comparación a la condición control 3S. Mediante el uso del siRNA de RCAN1.1 también logramos ver que para *NKX2.5*, por medio del silenciamiento de esta proteína, no hubo una respuesta en la expresión de su mRNA posiblemente producto de ser un gen cardiaco tardío el cual podría estar expresándose mayormente durante los días siguientes en la diferenciación. En el caso del gen *TNNT2*, en cambio, se obtuvo que el silenciamiento de RCAN1.1 en los cardiomiocitos derivados de iPSC 3S aumentó de forma significativa la expresión de *TNNT2* en comparación a la condición control. En conjunto, estos resultados darían cuenta de la existencia de un rescate de la expresión de los genes cardiacos tempranos y tardíos por medio del silenciamiento de la proteína RCAN1 en cardiomiocitos que derivan de iPSC 3S.

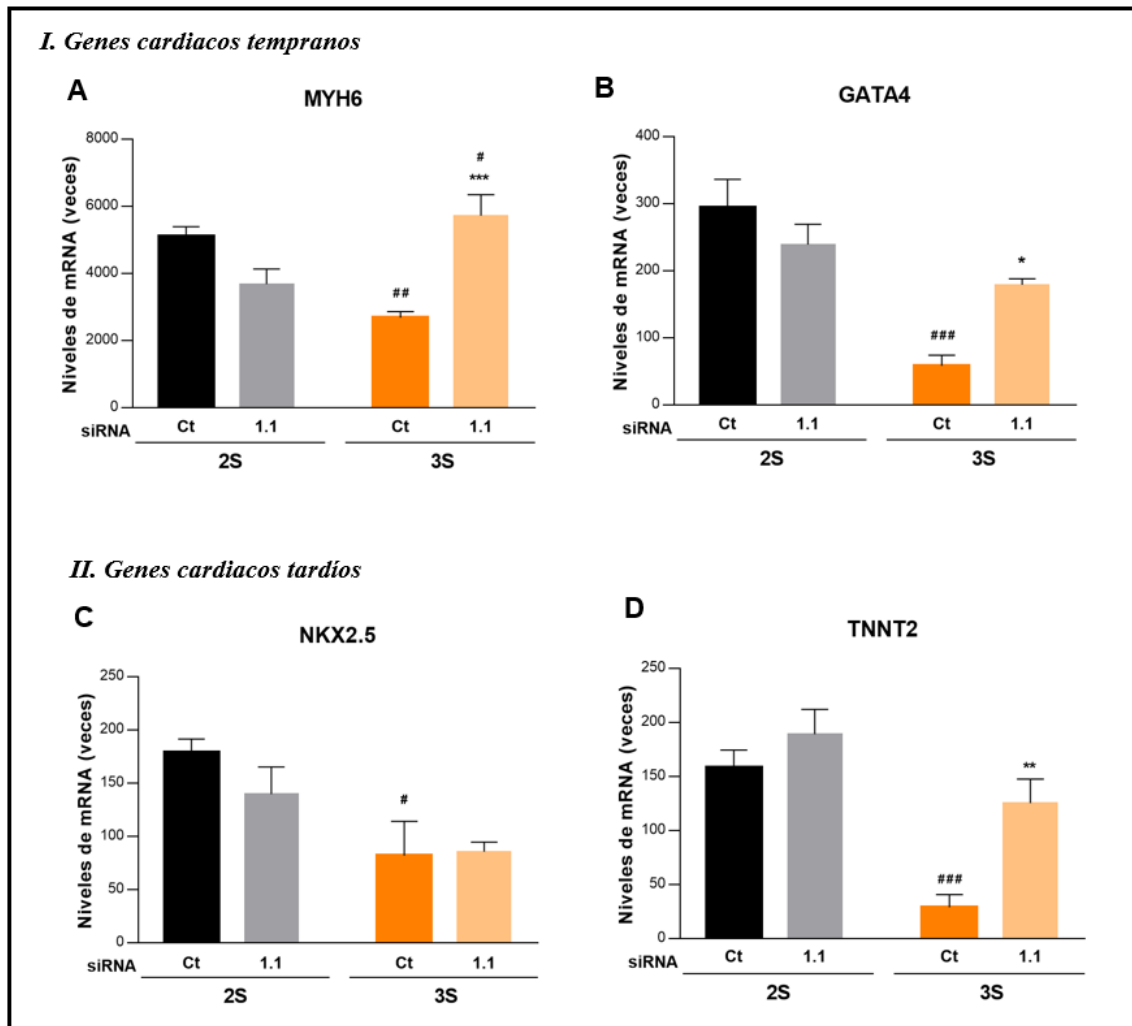


Figura 19: Expresión de genes cardiacos luego del silenciamiento de RCAN1 de cardiomiocitos derivados de iPSC 2S y 3S. RT-PCRs muestran la expresión para genes cardiacos tempranos (A-B) y tardíos (C-D) en células disómicas y trisómicas durante el día 15 de la diferenciación. Los datos corresponden al promedio \pm SEM para un $n=5$. Los resultados fueron comparados utilizando un ANOVA de dos vías con un post test de Sidak de múltiples comparaciones. * = comparaciones respecto al control, # = comparaciones entre 2S y 3S. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, # = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$, ### = $p < 0,001$.

6.3.4 Efecto del silenciamiento de RCAN1 sobre la funcionalidad de cardiomiocitos derivados de iPSC 2S y 3S

Lo siguiente fue evaluar si RCAN1 tenía un efecto sobre la tasa de latidos en los cardiomiocitos diferenciados a partir de iPSC 2S y 3S. Para esto se realizó un silenciamiento de RCAN1.1, el cual sabemos de experimentos anteriores que tiene mayores efectos sobre las iPSC y evaluamos la tasa de latidos por minutos de los cardiomiocitos sin y con un estímulo de NE. Para el caso de los latidos/min de los cardiomiocitos sin estímulo de NE se puede observar que existe una diferencia significativa entre los controles, dando cuenta que cardiomiocitos derivados de iPSC 3S laten más que 2S. Al hacer un silenciamiento de RCAN1.1 podemos observar que el número mayor de los latidos en iPSC 3S deja de ser significativamente más alto en comparación a los controles (**Figura 20A**). Por otro lado, centrándonos en las células 3S pudimos observar que frente a un estímulo con NE existe una leve tendencia a mostrar que el silenciamiento de RCAN1.1 disminuye los latidos, pero más experimentos son necesarios para corroborar esta idea (**Figura 20B**).

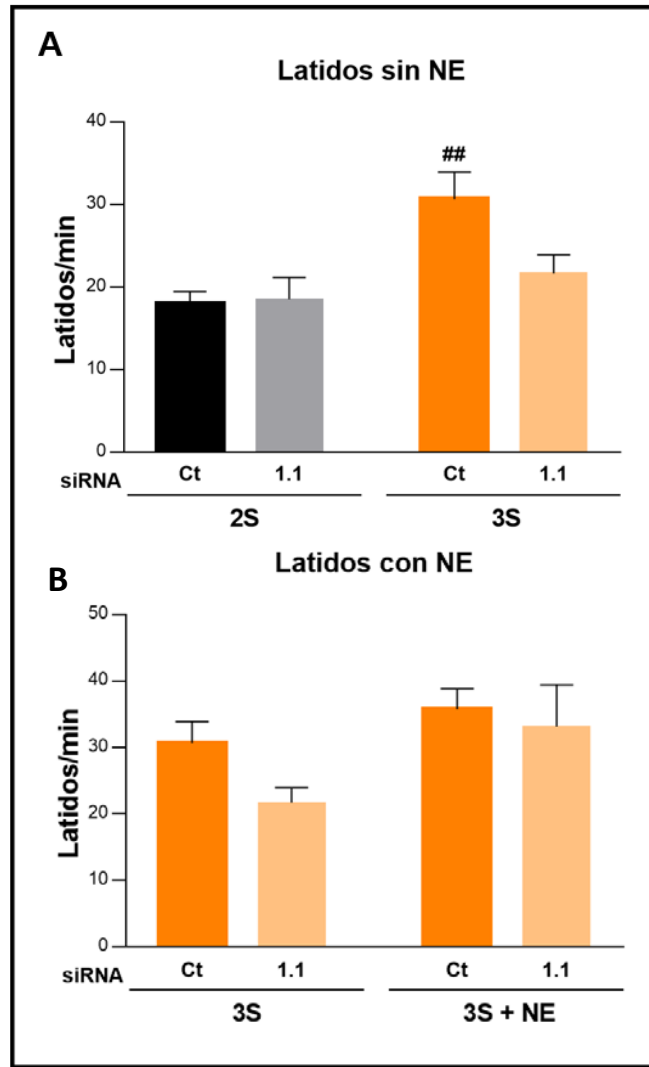


Figura 20: A y B. Efecto del silenciamiento de RCAN1 sobre el perfil de latidos de cardiomiocitos derivados de iPSC 2S y 3S. Condiciones: iPSC 2S Control (2S siCt), iPSC 2S siRNA de RCAN1.1 (2S si1.1), iPSC 3S Control (3S siCt), iPSC 3S siRNA de RCAN1.1 (3S si1.1), iPSC 3S Control + Norepinefrina (siCt 3S+NE) y iPSC 3S siRNA de RCAN1.1 + Norepinefrina (si1.1 3S+NE). Los datos corresponden al promedio \pm SEM para un $n = 5$. Los resultados fueron comparados utilizando un ANOVA de dos vías con un post test de Sidak de múltiples comparaciones. ## = comparaciones con respecto al control, ## = $p < 0,01$.

7. DISCUSIÓN

7.1 Efecto de la sobreexpresión de RCAN1 sobre la proliferación celular de iPSC provenientes de sujetos con SD

El Síndrome de Down (SD), también conocido por el nombre de “trisomía 21”, actualmente es la aneuploidía cromosómica que se presenta con mayor frecuencia en los recién nacidos (Lagan *et al.*, 2020), siendo la principal causa de esta patología la presencia en su totalidad o parcial de un tercer cromosoma 21 (Izzo *et al.*, 2018). En Latinoamérica se ha reportado que existe una tasa de 1,88 de por mil nacidos que presentan SD, siendo Chile uno de los países con más alto índice de ocurrencia de esta enfermedad (Donoso *et al.*, 2017).

Los defectos cardíacos congénitos son los más frecuentes en los recién nacidos con SD y están asociados a la mortalidad y morbilidad de estos pacientes, siendo los más frecuentes los defectos septales y la presencia de hipertensión pulmonar (Lagan *et al.*, 2020; Paladini *et al.*, 2000). Dichos defectos son el problema que nos llevó a buscar las implicaciones a nivel molecular que conducen a este fenotipo en células que presentan SD. Alteraciones a nivel mitocondrial son una de las principales causas que llevan a generar defectos a nivel cardíaco (Ong, & Hausenloy, 2010), Parra *et al.* (2018) demostraron que en iPSC 3S este organelo ve reducido su número por célula y tiene una red mitocondrial más fusionada que controles disómicos. Además, se reportó que estas células poseen una sobreexpresión de RCAN1, una de las principales proteínas que ve elevada su expresión en SD producto de la copia extra del cromosoma 21 (Lee & Ahnn, 2020).

A partir de este punto, nosotros nos propusimos evaluar el rol de esta proteína RCAN1 en iPSC provenientes de sujetos con SD sobre la proliferación celular, proceso que tiene una inversa relación con la diferenciación (Ruijtenberg & van den Heuvel, 2016). Entonces, quisimos dilucidar si las malformaciones cardíacas congénitas que se reportan en la literatura tienen alguna relación con la expresión de esta proteína, y si afecta estos procesos de proliferación y diferenciación.

En este trabajo se pudo observar, por medio de inmunomarcación de Ki67 **Figura 10** (marcador de proliferación) en iPSC 3S, que existe un aumento notorio en el marcaje de dicha proteína en estas células al ser comparadas con sus controles 2S, dando cuenta de una

diferencia en este proceso en los sujetos con SD. Para corroborar si RCAN1 tiene un efecto en este proceso, se trabajó con un siRNA de RCAN1 para sus dos isoformas (RCAN1.1 y RCAN1.4), observándose que existe una reducción del marcaje de Ki67 al silenciar RCAN1.1 a niveles similares a los observados en células 2S. Lo anterior demostraría que el proceso de proliferación es dependiente de los niveles de expresión RCAN1.1. La literatura reporta que progenitores hematopoyéticos que presentan la trisomía 21 exhiben un aumento significativo en su capacidad proliferativa (Chou *et al.*, 2008), lo cual apoyaría nuestro resultado donde iPSC proliferan más que iPSC 2S y que el causante de esto sería RCAN1. Dentro de las limitaciones de este experimento, no se pudo ver una respuesta similar al usar la isoforma de RCAN1.4 o al hacer un doble *knock-down* de las isoformas de esta proteína. Postulamos que lo anterior podría deberse a la ausencia o baja expresión de esta isoforma en estas células.

Cambios en la expresión de ciclinas llevan a alteraciones en el ciclo celular, lo cual afecta de forma directa al proceso de proliferación (Yang *et al.*, 2006). Como pudimos ver en nuestros resultados de ciclo celular (**Figura 11.B-D**), no se pudo apreciar un cambio significativo en las etapas del ciclo G1, S y G2/M ni en condiciones controles o al usar los siRNA de RCAN1. Esto pudo ocurrir producto de la baja sensibilidad de la técnica y al bajo N muestral, por ende, se necesitan más repeticiones para concluir si se ve afectado el ciclo celular en iPSC 3S. No obstante, encontramos que en el ciclo celular de iPSC 2S existen diferencias en la etapa sub-G1 (**Figura 11.E**) con respecto a las iPSC 3S, donde las primeras presentan una población significativa en esta etapa, dando cuenta de un gran número de células entrando en el proceso de apoptosis en cada ciclo. Este último punto puede ser explicado considerando que iPSC 3S son más resistentes a estímulos de daño como el ROS, el cual se ve aumentado en estas células (Parra *et al.* 2018). Además, esto concuerda con resultados reportados donde RCAN1.1 ejerce un rol protector contra la apoptosis en cardiomiocitos (Yan *et al.*, 2014). Por otro lado, una posible explicación para la diferencia observada en la figura **Figura 11.E** para las iPSC 3S, sería la ausencia de una población en sub-G1 producto de la copia extra del gen de la *SOD-1* presente en SD, lo cual podría estar actuando como el mecanismo de “defensa o acondicionamiento” al daño celular (Donoso *et al.*, 2017).

Con el objetivo de validar más aun nuestros resultados, nos propusimos evaluar cómo se ve afectada la proliferación por medio de la expresión de genes relacionados a este proceso, tanto en iPSC 2S y 3S sometidas al silenciamiento de RCAN1. Los genes que se evaluaron fueron *PCNA*, *Ki67*, *Ciclina D1* y *TPX2*, los que ya han sido descritos en estudios clínicos con RT-qPCR como genes marcadores de proliferación que aumentan frente a varias señales de estímulos, tales como los estrógenos, o en condiciones donde el ciclo celular es afectado. (Magloire *et al.* 2011; Brizova *et al.* 2010)

Nuestros resultados mostraron, por medio de RT-qPCR, que para muestras de iPSC 3S aumenta de forma significativa la expresión de los genes *Ki67* y *TPX2* (**Figura 12 A-B**) en comparación a iPSC 2S, corroborando nuestro resultado obtenido por medio de la inmunomarcación de Ki67. Esto daría cuenta que células con la trisomía 21 proliferarían más que células de pacientes sanos. Igualmente, esto también fue observado al hacer un silenciamiento de la isoforma de RCAN1.1 y al hacer un doble *knock-down* de las dos isoformas de esta proteína. A pesar de que en los genes *PCNA* y la *Ciclina D1* (**Figura 12 C-D**) no pudimos observar un cambio significativo entre las condiciones de iPSC 2S y 3S controles como esperábamos, es importante considerar que la expresión de estos genes no solo es producto del proceso de proliferación, por ejemplo, PCNA puede ver disminuida su expresión con una inhibición corticoesteroidea (Tsai *et al.*, 2002). Para el caso de la *Ciclina D1* (Magloire *et al.* 2011), su expresión puede verse alterada por procesos de reparación al DNA y, además, cabe destacar que en iPSC 2S pareciera haber una tendencia a tener menores niveles de expresión de *Ciclina D1* en comparación las otras condiciones de iPSC 3S. Nos resulta necesario destacar lo anterior, pues la literatura reporta una relación entre disminución de la expresión de esta ciclina y el inicio adecuado de la diferenciación en queratinocitos. Esto posiblemente ocurriría porque existiría un bloqueo por parte de la ciclina D1 de eventos transcripcionales específicos de diferenciación, pero se necesitan más experimentos para poder respaldar esta idea en iPSC (Nishi *et al.*, 2009).

Resumiendo, para los resultados del primer objetivo logramos comprobar que iPSC 3S proliferan mucho más que iPSC 2S, lo cual se observó por medio de inmunomarcación de Ki67 y genes de proliferación celular. Además, al hacer un silenciamiento de RCAN1.1 logramos reducir los niveles de proliferación a niveles similares a lo visto en los controles

2S, corroborando el rol de esta proteína en el proceso de diferenciación. También resultó destacable la presencia de diferencias en la fase sub-G1 del ciclo celular, apuntando a que iPSC 2S entrarían en apoptosis más fácilmente que iPSC 3S posiblemente producto de una mayor resistencia a un estímulo de daño de estas últimas. Sin embargo, para corroborar lo anterior se necesitan más estudios.

7.2 Efecto de la sobreexpresión de RCAN1 sobre el daño al DNA en iPSC 3S

Parra *et al.* (2018) han descrito en su trabajo que iPSC 3S presentan niveles elevados de ROS en comparación a iPSC. Producto de lo anterior, nos propusimos evaluar si estos cambios a nivel metabólico llevan a generar más daño al DNA en iPSC.

Nuestros resultados demostraron que en iPSC 3S presentan mayores cantidades del marcador 8-Oxoguanina que iPSC 2S, lo cual fue observado por medio de la inmunomarcación de este producto de daño al DNA. Esta lesión al DNA ha sido descrita como la más frecuente que se produce cuando el DNA de la célula se encuentra expuesto a la oxidación por ROS, ocurriendo bajo condiciones como el cáncer donde 8-Oxoguanina se encuentra elevado. Esto resulta similar a lo obtenido en nuestras muestras de iPSC 3S, donde los altos niveles de ROS provocan este aumento (Obtułowicz *et al.*, 2010). Además, por medio del uso de los siRNA de las isoformas de RCAN1 en muestras que fueron inmunomarcadas con 8-Oxoguanina, logramos ver que este daño al DNA era dependiente de la expresión de RCAN1, lo cual queda demostrado al observarse que con el siRNA de la isoforma de RCAN1.1 (1.1) y el doble *knock-down* (dKD) se lograba obtener una disminución significativa de los niveles de daño al DNA (**Figura 13A**) similares a los vistos en iPSC 2S. No obstante, es de interés evaluar si este daño al DNA es producto exclusivamente del desbalance de ROS que se genera por parte de iPSC 3S o debido a otra alteración que se genera producto de la copia extra en el cromosoma 21, estudios con adenovirus de RCAN1 podrían responder esta incógnita al sobreexpresar RCAN1 en células sin SD. También resulta relevante evaluar si este DNA dañado corresponde a nuclear o mitocondrial (mtDNA) por medios de estudios genómicos (Bohr & Dianov, 1999). Además, otro punto a considerar es que este daño al material genético puede ser producto de deficiencias en los mecanismos de reparación al DNA, lo cual se ha descrito que está presente en células con SD, donde se ven deterioradas las capacidades para reparar el daño oxidativo en el mtDNA con respecto a controles sanos (Druzhyna *et al.*, 1998).

A partir de este último punto, nos propusimos evaluar si se veía alterada la expresión génica de marcadores de daño al DNA por medio de la expresión de los genes en este caso *HA2X* y *OGGI*, con el fin de evaluar si esta acumulación de daño en el DNA vista en nuestros resultados, a través de la marcación con 8-Oxoguanina, van en conjunto con cambios en la expresión de estos genes y si esto es dependiente de la expresión de RCAN1.

Nuestros resultados han demostrado que por medio de RT-qPCR para el gen *H2AX* (**Figura 14A**) no hubo un cambio significativo en la expresión de esta histona al comparar nuestras muestras de iPSC 3S versus iPSC 2S en condiciones controles, pero si se vio una tendencia a la disminución de este gen al hacer uso del siRCAN1.1 en iPSC 3S. A pesar de esto, no descartamos que el no observar un cambio en estas condiciones no es un indicador claro de daño al DNA. En este sentido, una limitación de este estudio fue que la forma fosforilada *H2AXy* sería la que en sí estaría dando cuenta de un daño al DNA, lo cual ya ha sido reportado en SD, no obstante, nosotros postulábamos que producto del aumento de daño al DNA que se estaba generando al formar *H2AXy* como un pseudo mecanismo compensatorio, esto llevaría a generar más histona en su forma no fosforilada “*H2AX*”. Sin embargo, más estudios son necesarios para corroborar esta idea, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo contra la forma fosforilada de *H2AX* con el objetivo de estudiar, a través de la inmunofluorescencia de esta proteína, el daño al DNA presente en iPSC 3S (Murray *et al.*, 2015).

En cuanto a nuestro segundo resultado para el gen *OGGI* (**Figura 14B**), logramos concluir que este se encuentra elevado significativamente en muestras de iPSC 3S versus sus controles las 2S, lo cual apoya nuestros resultados previos vistos en la **Figura 13**. Esto va en concordancia con lo visto en literatura donde la enzima DNA glicosilasa (OGG1), ubicada en la mitocondria y que se encarga de procesar 8-Oxoguanina, se encuentra aumentada en Parkinson, una enfermedad caracterizada por tener alteraciones en la mitocondria y, por tanto, en los procesos oxidativos que provocan daño al DNA (Fukae *et al.*, 2005). Para el caso del silenciamiento de RCAN1.1, en estas muestras se vio una disminución significativa de la expresión de *OGGI* en iPSC 3S versus su control, concordando con lo ya descrito. Por tanto, RCAN1.1 sí estaría generando un cambio en los niveles de expresión de *OGGI* y estaría, de alguna forma, afectando el procesamiento de daño al DNA. Sin embargo, para

corroborar esto a profundidad más repeticiones podrían realizarse del experimento u otros marcadores de daño al DNA podrían emplearse para esto.

En resumen, para nuestro objetivo 2, los datos expuestos en esta tesis respaldan la idea de que iPSC 3S, células que presentan alteraciones a nivel mitocondrial llevan a un desbalance en el ROS, generando como consecuencia un daño aumentado en estas células en su material genético. Lo anterior fue evaluado por medio de la generación de productos de oxidación, como 8-Oxoguanina, y por cambios en la expresión de genes marcadores de daño al DNA analizados por RT-qPCR. Como consecuencia, creemos que esto estaría generando alteraciones en el DNA de las iPSC 3S, lo que podría aumentar la tasa de mutaciones o errores en la replicación, llevando a generar alteraciones en los procesos de diferenciación celular en el contexto de SD.

7.3 Evaluación del proceso de diferenciación de iPSC 3S a cardiomiocitos

Hasta el momento, los estudios de muestras de iPSC 3S, mostraron que estas células tienen un aumento tanto en su tasa proliferativa como en el daño al DNA dependiente de los niveles de expresión de RCAN1 en comparación a iPSC 2S. A partir de ello, se evaluaron si estas alteraciones generarían un efecto en el proceso de diferenciación hacia un fenotipo cardiaco, del cual ya se ha comprobado en literatura con análisis de ultraestructura y funcionalidad que es posible de realizar a partir de iPSC. (Snir *et al.*, 2003; Burridge *et al.* 2014). Desde la base de que células más proliferativas tienen una relación inversa con su tasa de diferenciación, nosotros hipotetizamos que esto sería en parte una de las causas para las diferentes alteraciones cardiacas que presentan sujetos con SD, tal como se detalló anteriormente (Kędziora *et al.*, 1988; Ruijtenberg & van den Heuvel, 2016).

Los resultados de diferenciación cardiaca observados en esta tesis dan cuenta que se logró obtener cardiomiocitos a partir de iPSC 2S y 3S por el método de diferenciación que se estandarizó en el laboratorio (**Figura 15**). A partir de este proceso mediante RT-qPCR, se obtuvieron resultados tanto para la expresión de genes pluripotenciales (*SOX2*, *NANOG* y *POU5F1*) como para genes cardiacos (*MYH6*, *GATA4*, *NKX2.5* y *TNNT2*), que mostraron cambios en la expresión génica del proceso de diferenciación durante los 20 días. En cuanto a los genes pluripotenciales, se pudo ver que para el comienzo de la diferenciación estos se encontraban expresados, pero con el transcurso de la diferenciación cardiaca la expresión de

estos disminuyo significativamente. De esta manera, lo anterior confirmaría el estado pluripotencial en un comienzo y la pérdida de este estado con el paso de los días esto tanto en las muestras de iPSC 2S como 3S (**Figura 16A-C**). Con respecto a la expresión de los genes cardiacos para *MYH6*, *GATA4*, *NKX2.5* y *TNNT2*, durante el día 0 la expresión de ellos fue casi nula en todas las muestras de iPSC. Esto resulta concordante con lo esperado ya que estas células no se encuentran en etapa de diferenciación, pero con el transcurso de los días la expresión de estos empezó a aumentar en iPSC 2S y 3S. Al comparar estas muestras, nuestros resultados demostraron que existen cambios significativos entre muestras de iPSC 2S y 3S donde la expresión de estos 4 genes tanto cardiacos tempranos como tardíos fue mayormente expresada en cardiomiocitos 2S que 3S. De esta forma, los hallazgos concuerdan con nuestra hipótesis donde planteamos que iPSC 3S presentan una falencia en su capacidad de diferenciación hacia cardiomiocitos 3S, lo que asociamos a las alteraciones cardiacas congénitas que se presentan con frecuencia en el SD (**Figura 17A-D**) (Vis *et al.*, 2009).

Luego de esto, nuestro propósito fue evaluar la funcionalidad de los cardiomiocitos derivados de iPSC 3S y 2S. Por medio del conteo de latidos, logramos ver que los cardiomiocitos presentaban una tasa promedio más alta en la condición 3S que la 2S en condiciones basales. Esto resulta curioso, pues en el microscopio se apreciaba que la arquitectura en las muestras trisómicas no era uniforme en comparación a la de cardiomiocitos 2S, donde se veía una mejor estructura además de presentar un latido más sincronizado. Las muestras también fueron sometidas a un estímulo de NE que demostró que los cardiomiocitos 3S no son capaces de responder a este estímulo como los 2S, los cuales tendieron a latir más (**Figura 18**). En vista de esto, surgieron dos ideas que explicarían lo anterior. La primera de ellas fue que estos cardiomiocitos 3S no están respondiendo a NE, dando cuenta de una disfunción cardiaca en las muestras que provienen de SD, lo que se halla en consonancia con nuestros resultados de expresión génica. La segunda explicación consistiría en que las muestras ya no responden a un estímulo como el de NE, debido a que estarían en su máxima capacidad de latidos.

7.4 Efecto de la sobreexpresión de RCAN1 sobre la funcionalidad de cardiomiocitos derivados de iPSC 3S

En este punto, por medio de la diferenciación de iPSC a cardiomiocitos logramos evaluar si RCAN1 era causante de las alteraciones observadas en todos nuestros resultados anteriores, y en lo que reporta la literatura como las anomalías cardíacas más frecuente en los recién nacidos con SD (Freeman *et al.*, 2008).

Evaluando la expresión de genes cardíacos, nuestros resultados exhibieron que tanto los tempranos, *MYH6* y *GATA4*, como los tardíos *NKX2.5* y *TNNT2* (**Figura 19A-D**) mostraron en el día 15 de diferenciación que, en condiciones controles, los cardiomiocitos derivados de iPSC 2S expresan mayores niveles de mRNAs de estos genes en comparación a las muestras de cardiomiocitos que derivan de iPSC 3S. No obstante, al hacer uso de los siRNA de RCAN1.1, la isoforma con la que más cambios observamos, se revertía lo visto en cardiomiocitos iPSC 3S controles. Esto permite dar cuenta de una restauración de los niveles de expresión de parte de estos genes cardíacos a niveles similares a los observados en muestras 2S. Considerando lo anterior, corroboramos uno de nuestros principales objetivos orientado a evidenciar que RCAN1 tiene un rol en la diferenciación cardíaca, lo cual se condice con lo reportado en literatura donde se ha descrito que RCAN1 ejerce un rol en la mantención y desarrollo del sistema cardiovascular (Wang *et al.*, 2020). En vista de esto, podemos afirmar que la isoforma de RCAN1.1 pudo rescatar la expresión de estos genes en nuestras muestras, lo que llevaría a un fenotipo “normal”. Por lo tanto, esperaríamos que no se observaran las alteraciones a nivel cardíaco, pudiéndose corroborar con varios estudios que reportan un efecto positivo de la isoforma RCAN1.1 sobre la fisión mitocondrial y mitofagia para proteger frente a eventos de I/R o apoptosis (Wang *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2014).

A partir de lo anterior, evaluamos si se veía alterada la funcionalidad de estos cardiomiocitos al someterse a este mismo silenciamiento de RCAN1.1, generando cardiomiocitos que eran silenciados también al comienzo de su diferenciación y los cuales eran analizados al final del proceso mediante el conteo de sus latidos y frente al estímulo de NE. Logramos ver que, al silenciar RCAN1.1, el número de latidos/min en las muestras 3S dejó de ser significativamente más alto que en los controles por tanto veíamos un fenotipo similar al 2S

(Figura 20A). Por otra parte, en el experimento realizado con la finalidad de determinar si las muestras trisómicas respondían o no frente a un estímulo de NE, no obtuvimos un resultado significativo de un rescate del perfil de latidos/min de los cardiomiocitos derivados de iPSC 3S, pero cabe destacar que se notó una leve tendencia a que el silenciamiento de esta proteína disminuiría los latidos en las muestras 3S. En este sentido, se deberían realizar estudios con mayor profundidad para evaluar si lo anterior afecta la diferenciación en sí de estos cardiomiocitos, como en el trabajo realizado por Lee *et al.* (2015) donde las alteraciones en la expresión de RCAN1 perturban la diferenciación neuronal en SD.

En resumen, los resultados de esta tesis dan cuenta que RCAN1 está involucrado en varios procesos como de proliferación, daño al DNA y en la diferenciación cardiaca en muestras de pacientes con SD. Esto resulta novedoso considerando que no se han reportado aun estudios de esta índole. Además, este efecto de RCAN1 nos estaría dando pistas de que es un factor clave en la generación del fenotipo característico de los pacientes con SD, a saber, las malformaciones cardiacas. En este sentido, es de suma importancia seguir realizando estudios que aborden este tema para comprender aún más los mecanismos que llevan a generar estas patologías. Además, estos resultados postulan a RCAN1 en el contexto de la trisomía del cromosoma 21, como un blanco terapéutico potencial para tratar algunas de las alteraciones a nivel cardiaco que se observan en SD.

8. LIMITACIONES Y PROYECCIONES FUTURAS

A partir de este estudio se obtuvieron interesantes resultados que dan cuenta de un rol para RCAN1 en procesos de proliferación, daño al DNA y en el proceso de diferenciación cardíaca en iPSC de pacientes con SD. Sin embargo, se desprenden varias incógnitas que podrían ser estudiadas a futuro. Una de ellas guarda relación con el proceso de proliferación y si es que RCAN1 afecta también la expresión de, por ejemplo, otras ciclinas que forman parte del ciclo celular. Complementando lo anterior, se podría estudiar el uso de vector adenoviral para RCAN1 con el fin de recrear el fenotipo de iPSC 3S en iPSC 2S. También resultaría interesante poder evaluar si las diferencias vistas en sub-G1 son producto exclusivo de la trisomía y determinar si estas células son más resistentes a estímulos de daño. Por último, con respecto a la proliferación, resultaría beneficioso evaluar si estas diferencias vistas en iPSC están presentes en otro tipo celular que presente la trisomía 21.

Con respecto a nuestros resultados de daño al DNA, estos son coherentes con lo descrito en literatura donde los pacientes con SD tienen un aumento en sus niveles de ROS y, producto de esto, se generaron los cambios en el daño al DNA que observamos en nuestras muestras. Uno de los puntos que nos gustaría evaluar a futuro apunta a establecer si este daño al DNA es influenciado por otras condiciones en iPSC 3S que no sean los niveles de ROS, además de diferenciar que tipo de DNA es. Por otra parte, también sería interesante ver si este daño puede ser generado en iPSC 2S al ser sometidas a un vector adenoviral que sobreexpresa RCAN1 para simular el fenotipo visto en iPSC 3S. Otros estudios también podrían evaluar, por medio de otras técnicas o estímulos de daño, la maquinaria de reparación de daño al DNA presente en iPSC 3S y 2S, por ejemplo, el uso de la forma fosforilada de H2AXy en inmunofluorescencia. También queda a futuro estudiar si este daño es acumulativo y si lleva a generar las deficiencias en los procesos de diferenciación de cardiomiocitos derivados de iPSC 3S. Por otro lado, sería interesante investigar si esta sobreexpresión de RCAN1 presente en iPSC 3S protege frente a eventos de daño como el de I/R. Esto ya ha sido estudiado en otros tipos celulares donde RCAN1 ejerce un rol protector, resultando llamativo pues podría explicar por qué estos pacientes son más resistentes a estos eventos (Rotter *et al.*, 2014).

Para nuestros resultados de diferenciación de cardiomiocitos, destacamos la generación de un protocolo que toma 20 días de diferenciación donde se puede observar la expresión

necesaria de genes cardiacos para nuestros experimentos. Sin embargo, no descartamos que esto se pudiera extender más días para lograr ver algún cambio en el proceso de diferenciación en la expresión de genes cardiacos y en la funcionalidad y estructura de estos cardiomiocitos que derivan tanto de muestras 2S como 3S. Por otro lado, al evaluar la funcionalidad de RCAN1 en este proceso no descartamos que en nuestros experimentos el uso del siRNA pudo ser una limitación dado que no aseguramos niveles constantes de RCAN1 con los siRNA durante los 20 días de diferenciación. En ese sentido, sería interesante ir silenciando durante los días de diferenciación para mantener constantes los niveles de RCAN1, no obstante, nos limitaría si esto interfiere en la diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos, por lo tanto, más estudios son necesarios para poder corroborar estas ideas.

9. CONCLUSIONES

I.

- iPSCs trisómicas proliferan más en comparación a células con la disomía, visto por medio del aumento en la inmunomarcación de Ki67 y la expresión de genes de proliferación celular (*Ki67*, *TPX2*).
- El silenciamiento de la isoforma de RCAN1.1 reduce de forma significativa la capacidad de proliferación de iPSC 3S en comparación a iPSC 2S, reduciendo los niveles de expresión de genes de proliferación celular (*Ki67*, *TPX2*) y una disminución de la inmunomarcación de Ki67.

II.

- iPSC trisómicas poseen mayor daño al DNA, en este caso evaluado por la elevación en los niveles de 8-Oxoguanina en comparación a células disómicas, esto probablemente producto del exceso de ROS que se evidencia en iPSC provenientes de pacientes con SD.
- El aumento en el daño al DNA evaluado por inmunomarcación de 8-Oxoguanina también se logró comprobar por medio del aumento de la expresión de genes marcadores de daño al DNA en este caso *H2AX* y *OGG1* los cuales presentan niveles elevados de expresión en iPSC 3S en comparación a iPSC 2S.
- El silenciamiento de RCAN1.1 es capaz de reducir los niveles de 8-Oxoguanina y genes de daño al DNA en iPSC 3S a niveles similares a los presentes en iPSC 2S.

III.

- La expresión de genes de pluripotencialidad (*SOX2*, *NANOG* y *POU5F1*) disminuyen de forma significativa con el paso de los días en la diferenciación hacia cardiomiocitos 2S y 3S. Por otro lado, genes de diferenciación cardíaca (*TNNT2*, *MYH6*, *GATA4* y *NKX2.5*) aumentan a través de los días mayormente en iPSC 2S que células 3S, dando cuenta de una disfunción en el proceso de diferenciación de estas últimas.

- La funcionalidad de cardiomiocitos 3S da cuenta de una disfunción de estos vistos por medio del perfil de latidos, donde estos últimos frente a un estímulo como NE no generan una respuesta.
- El silenciamiento de RCAN1.1 en el contexto de SD genera un rescate en la expresión tanto de los genes cardiacos tempranos (*MYH6* y *GATA4*) como los genes cardiacos tardíos (*TNNT2* y *NKX2.5*) en iPSC 3S.
- El silenciamiento de RCAN1.1 en el contexto de SD lleva a una tendencia a generar una leve respuesta frente a NE en el perfil de latidos de iPSC 3S.

10. REFERENCIAS

- Antico, V., Elguero, M., Poderoso, J. & Carreras, M. (2012). Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxidants & redox signaling*, 16(10), 1150-1180. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4085>
- Antonarakis, S., Lyle, R., Dermitzakis, E., Reymond, A. & Deutsch, S. (2004). Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nature reviews genetics*, 5(10), 725-738. <https://doi.org/10.1038/nrg1448>
- Bohr, V. A. & Dianov, G. L. (1999). Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie*, 81(1-2), 155-160. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(99\)80048-0](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(99)80048-0)
- Brizova, H., Kalinova, M., Krskova, L., Mrhalova, M., & Kodet, R. (2010). A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase IIalpha, and TPX2): an immunohistochemical correlation, testing, and optimizing for mantle cell lymphoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 456(6), 671-679. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-0922-8>
- Burridge, P., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z. C., Churko, J., Ebert, A., Lan, F., Diecke, S., Huber, B., Mordwinkin, N., Plews, J., Abilez, O., Cui, B., Gold, J. & Wu, J. C. (2014). Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nature methods*, 11(8), 855-860. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2999>
- Busciglio, J. & Yankner, B. A. (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature*, 378(6559), 776. <https://doi.org/10.1038/378776a0>
- Cho, K. O., Kim, Y. S., Cho, Y. J. & Kim, S. Y. (2008). Upregulation of DSCR1 (RCAN1 or Adapt78) in the peri-infarct cortex after experimental stroke. *Experimental neurology*, 212(1), 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.03.017>
- Chou, S. T., Opalinska, J. B., Yao, Y., Fernandes, M. A., Kalota, A., Brooks, J. S., Choi, J. K., Gewirtz, A. M., Danet-Desnoyers, G. A., Nemiroff, R. L. & Weiss, M. J. (2008). Trisomy 21 enhances human fetal erythro-megakaryocytic development. *Blood*, 112(12), 4503-4506. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-157859>

- Colvin, K. & Yeager, M. (2017). What people with Down Syndrome can teach us about cardiopulmonary disease. *European Respiratory Review*, 26(143), 160098. <https://doi.org/10.1183/16000617.0098-2016>
- Conti, A., Fabbrini, F., D'Agostino, P., Negri, R., Greco, D., Genesio, R. & Nitsch, L. (2007). Altered expression of mitochondrial and extracellular matrix genes in the heart of human fetuses with chromosome 21 trisomy. *Bmc Genomics*, 8(1), 268. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-268>
- Cruz, E., Liñan, A., Prötzel, A., Mayorga, G., Ota, A., Gamarra, N. & Dueñas, M. (2019). Incidencia y patologías asociadas del Síndrome Down en recién nacidos del Hospital Edgardo Rebagliati Martins. *Revista Médica Basadrina*, 9(1), 15-19. <https://doi.org/10.33326/26176068.2015.1.572>
- De Rubens, J., del Pozzo, B., Hach, J., Jiménez, C. & Urbina, R. (2003). Heart malformations in children with Down syndrome. *Revista española de cardiología*, 56(9), 894-899. [https://doi.org/10.1016/s0300-8932\(03\)76978-4](https://doi.org/10.1016/s0300-8932(03)76978-4)
- Donoso, E. & Vera, C. (2016). Aumento de la mortalidad infantil en niños con síndrome de Down: Chile 1997-2013. *Revista médica de Chile*, 2016, 144(11), 1432-1439. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872016001100009>
- Donoso, F., Montes F., Neumann B., Ulloa V., Contreras E. & Arriagada S. (2017). El niño con síndrome de Down en la Unidad de Cuidados Intensivos. *Revista Chilena de Pediatría*, 88(05), 668-676. <https://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062017000500016>
- Down, J. (1866). Observations on an ethnic classification of idiots. *London Hospital Clinical Lectures and Reports Volume 3* (259–262).
- Druzhyina, N., Nair, R. G., LeDoux, S. P. & Wilson, G. L. (1998). Defective repair of oxidative damage in mitochondrial DNA in Down's syndrome. *Mutation research*, 409(2), 81–89. [https://doi.org/10.1016/s0921-8777\(98\)00042-1](https://doi.org/10.1016/s0921-8777(98)00042-1)
- Ebert, A., Liang, P. & Wu, J. C. (2012). Induced pluripotent stem cells as a disease modeling and drug screening platform. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 60(4), 408-416. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318247f642>
- Ermak, G., Sojitra, S., Yin, F., Cadenas, E., Cuervo, A. & Davies, K. (2012). Chronic expression of RCAN1-1L protein induces mitochondrial autophagy and metabolic

- shift from oxidative phosphorylation to glycolysis in neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 14088-14098.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.305342>
- Freeman, S., Bean, L., Allen, E., Tinker, S., Locke, A., Druschel, C., Hobbs C., Romitti P., Royle M., Torfs C., Dooley K. & Sherman, S. (2008). Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. *Genetics in Medicine*, 10(3), 173-180.
<https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181634867>
- Fuentes, J., Genescà, L., Kingsbury, T., Cunningham, K., Pérez-Riba, M., Estivill, X. & Luna, S. D. L. (2000). DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Human molecular genetics*, 9(11), 1681-1690. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.11.1681>
- Fuentes, J., Pritchard, M. & Estivill, X. (1997). Genomic Organization, Alternative Splicing, and Expression Patterns of the DSCR1 (Down Syndrome Candidate Region 1) Gene. *Genomics*, 44(3), 358-361.
<https://doi.org/10.1006/geno.1997.4866>
- Fukae, J., Takanashi, M., Kubo, S., Nishioka, K., Nakabeppu, Y., Mori, H., Mizuno, Y. & Hattori, N. (2005). Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Acta neuropathologica*, 109(3), 256–262. <https://doi.org/10.1007/s00401-004-0937-9>
- Gupta, M., Dhanasekaran, A. & Gardiner, K. (2016). Mouse models of Down syndrome: gene content and consequences. *Mammalian genome*, 27(11-12), 538-555.
<https://doi.org/10.1007/s00335-016-9661-8>
- Hall, B. (1964). Mongolism in newborns. *Acta Paediatr Scand*, 154, 1–95.
- Harris, C., Ermak, G. & Davies, K. (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.
<https://doi.org/10.1007/s00018-005-5085-4>
- Izzo, A., Mollo, N., Cicatiello, R., Genesio, R., Paladino, S., Conti, A. & Nitsch, L. (2018). Mitochondrial Abnormalities in Down Syndrome: Pathogenesis, Effects and

- Therapeutic Approaches. In Subtrata, D. (Ed), *Advances in Research on Down Syndrome*. IntechOpen. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0004-y>
- Jiang, H., Zhang, C., Tang, Y., Zhao, J., Wang, T., Liu, H. & Sun, X. (2017). The regulator of calcineurin 1 increases adenine nucleotide translocator 1 and leads to mitochondrial dysfunctions. *Journal of neurochemistry*, 140(2), 307-319. <https://doi.org/10.1111/jnc.13900>
- Kaminker, P. & Armando, R. (2008). Síndrome de Down: Primera parte: enfoque clínico-genético. *Archivos argentinos de pediatría*, 106(3), 249-259.
- Kędziora, J. & Bartosz, G. (1988). Down's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 4(5), 317-330. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90052-4](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90052-4)
- Kim, S. & Seo, S. (2011). The regulator of calcineurin 1 (RCAN1/DSCR1) activates the cAMP response element-binding protein (CREB) pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 286(43), 37841-37848. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.232165>
- Lagan, N., Huggard, D., Mc Grane, F., Leahy, T. R., Franklin, O., Roche, E., Webb, D., O' Marcaigh, A., Cox, D., El-Khuffash, A., Grealley, P., Balfe, J. & Molloy, E. J. (2020). Multiorgan involvement and management in children with Down syndrome. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 109(6), 1096–1111. <https://doi.org/10.1111/apa.15153>
- Landes, S. D., Stevens, J. D. & Turk, M. A. (2020). Cause of Death in Adults with Down Syndrome in the US. *Disability and Health Journal*, 13(4), 100947. <https://doi.org/10.1016/j.dhjo.2020.100947>
- Lee, E. H., Kim, S. S., Lee, S., Baek, K. H. & Seo, S. R. (2015). Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide (PACAP) Targets Down Syndrome Candidate Region 1 (DSCR1/RCAN1) to control Neuronal Differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 290(34), 21019–21031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.639476>
- Lee, H. J., Kim, Y. S., Sato, Y. & Cho, Y. J. (2009). RCAN1-4 knockdown attenuates cell growth through the inhibition of Ras signaling. *FEBS letters*, 583(15), 2557-2564. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.023>

- Lee, S. K. & Ahnn, J. (2020). Regulator of Calcineurin (RCAN): Beyond Down Syndrome Critical Region. *Molecules and cells*, 43(8), 671–685.
<https://doi.org/10.14348/molcells.2020.0060>
- Lyle, R., Gehrig, C., Neergaard-Henrichsen, C., Deutsch, S. & Antonarakis, S. (2004). Gene expression from the aneuploid chromosome in a trisomy mouse model of down syndrome. *Genome research*, 14(7), 1268-1274.
<https://doi.org/10.1101/gr.2090904>
- Magloire Ketcha Wanda, G. J., Njamen, D., Tagatsing, F. M., Yankep, E., & Vollmer, G. (2011). Regulation of CD1, Ki-67, PCNA mRNA expression, and Akt activation in estrogen-responsive human breast adenocarcinoma cell line, MCF-7 cells, by griffonianone C, an isoflavone derived from *Millettia griffoniana*. *Pharmaceutical biology*, 49(4), 341–347.
<https://doi.org/10.3109/13880209.2010.517210>
- Mao, R., Wang, X., Spitznagel, E., Frelin, L., Ting, J., Ding, H., Kim, J., Ruczinski, I., Downey, T. & Pevsner, J. (2005). Primary and secondary transcriptional effects in the developing human Down syndrome brain and heart. *Genome biology*, 6(13), R107. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-13-r107>
- Marino, B. (1993). Congenital heart disease in patients with Down's syndrome: anatomic and genetic aspects. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 47(5), 197-200.
[https://doi.org/10.1016/0753-3322\(93\)90056-Q](https://doi.org/10.1016/0753-3322(93)90056-Q)
- Miller, I., Min, M., Yang, C., Tian, C., Gookin, S., Carter, D., & Spencer, S. L. (2018). Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell reports*, 24(5), 1105–1112.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.110>
- Moore, C. S. (2006). Postnatal lethality and cardiac anomalies in the Ts65Dn Down syndrome mouse model. *Mammalian genome*, 17(10), 1005-1012.
<https://doi.org/10.1007/s00335-006-0032-8>
- Murray, A., Letourneau, A., Canzonetta, C., Stathaki, E., Gimelli, S., Sloan-Bena, F., Abrehart, R., Goh, P., Lim, S., Baldo, C., Dagna-Bricarelli, F., Hannan, S., Mortensen, M., Ballard, D., Syndercombe Court, D., Fusaki, N., Hasegawa, M.,

- Smart, T., Bishop, C., ... Nizetic, D. (2015). Brief report: isogenic induced pluripotent stem cell lines from an adult with mosaic down syndrome model accelerated neuronal ageing and neurodegeneration. *Stem Cells*, 33(6), 2077-2084. <https://doi.org/10.1002/stem.1968>
- National Heart, Lung and Blood Institute. (s.f.). *Congenital Heart Defects*. <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/congenital-heart-defects>.
- Nishi, K., Inoue, H., Schnier, J. B. & Rice, R. H. (2009). Cyclin D1 downregulation is important for permanent cell cycle exit and initiation of differentiation induced by anchorage-deprivation in human keratinocytes. *Journal of cellular biochemistry*, 106(1), 63–72. <https://doi.org/10.1002/jcb.21978>
- Obtulowicz, T., Swoboda, M., Speina, E., Gackowski, D., Rozalski, R., Siomek, A., Janik, J., Janowska, B., Ciesla, J. M., Jawien, A., Banaszkiwicz, Z., Guz, J., Dziaman, T., Szpila, A., Olinski, R. & Tudek, B. (2010). Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients. *Mutagenesis*, 25(5), 463-471. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq028>
- Olson, L., Richtsmeier, J., Leszl, J. & Reeves, R. (2004). A chromosome 21 critical region does not cause specific Down syndrome phenotypes. *Science*, 306(5696), 687-690. <https://doi.org/10.1126/science.1098992>
- Ong, S. B. & Hausenloy, D. J. (2010). Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 88(1), 16–29. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq237>
- Paladini D, Tartaglione A, Agangi A, Teodoro A, Forleo F, Borghese A & Martinelli P. (2000). The association between congenital heart disease and Down syndrome in prenatal life. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 15(2):104-8. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.2000.00027.x>
- Parra, V., Bravo-Sagua, R., Norambuena-Soto, I., Hernández-Fuentes, C. P., Gómez-Contreras, A. G., Verdejo, H. E., Mellado, R., Chiong, M., Lavandero, S., & Castro, P. F. (2017). Inhibition of mitochondrial fission prevents hypoxia-induced metabolic shift and cellular proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(11), 2891–2903.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.018>
- Parra, V., Altamirano, F., Hernández-Fuentes, C., Tong, D., Kyrychenko, V., Rotter, D., Pedrozo, Z., Hill, J., Eisner, V., Lavandero, S., Schneider, J. & Rothermel, B. (2018). Down syndrome critical region 1 gene, Rcan1, helps maintain a more fused mitochondrial network. *Circulation research*, 122(6), e20-e33. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311522>
- Piccoli, C., Izzo, A., Scrima, R., Bonfiglio, F., Manco, R., Negri, R., Quarato, G., Cela, O., Ripoli, M., Prisco, M., Gentile, F., Calì, G., Pinton, P., Conti, A., Nitsch, L. & Capitanio, N. (2012). Chronic pro-oxidative state and mitochondrial dysfunctions are more pronounced in fibroblasts from Down syndrome foeti with congenital heart defects. *Human molecular genetics*, 22(6), 1218-1232. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds529>
- Ram, B., Dolpady, J., Kulkarni, R., Usha, R., Bhorja, U., Poli, U., Islam, M., Trehanpati, N. & Ramakrishna, G. (2018). Human papillomavirus (HPV) oncoprotein E6 facilitates Calcineurin-Nuclear factor for activated T cells 2 (NFAT2) signaling to promote cellular proliferation in cervical cell carcinoma. *Experimental cell research*, 362(1), 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.11.010>
- Robbins, J. & Price, J. (2017). Human induced pluripotent stem cells as a research tool in Alzheimer's disease. *Psychological medicine*, 47(15), 2587-2592. <https://doi.org/10.1017/S0033291717002124>
- Ronan, A., Fagan, K., Christie, L., Conroy, J., Nowak, N. & Turner, G. (2007). Familial 4.3 Mb duplication of 21q22 sheds new light on the Down syndrome critical region. *Journal of medical genetics*, 44(7), 448-451. <https://doi.org/10.1136/jmg.2006.047373>
- 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. *J Mol Cell Cardiol*, 74, 103–11. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.05.004>
- Ruijtenberg, S. & van den Heuvel, S. (2016). Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene

- expression. *Cell cycle*, 15(2), 196-212.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1120925>
- Ryan, J., Dasgupta, A., Huston, J., Chen, K. & Archer, S. (2015). Mitochondrial dynamics in pulmonary arterial hypertension. *Journal of molecular medicine*, 93(3), 229-242.
<https://doi.org/10.1007/s00109-015-1263-5>
- Sirenko, O., Crittenden, C., Callamaras, N., Hesley, J., Chen, Y. W., Funes, C., Rusyn, I., Anson, B. & Cromwell, E. F. (2013). Multiparameter in vitro assessment of compound effects on cardiomyocyte physiology using iPSC cells. *Journal of biomolecular screening*, 18(1), 39-53. <https://doi.org/10.1177/1087057112457590>
- Snir, M., Kehat, I., Gepstein, A., Coleman, R., Itskovitz-Eldor, J., Livne, E. & Gepstein, L. (2003). Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 285(6), H2355–H2363.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00020.2003>
- Spicer, R. (1984). Cardiovascular disease in Down syndrome. *Pediatric clinics of north America*, 31(6), 1331-1343. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(16\)34725-3](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(16)34725-3)
- Sternecker, J., Reinhardt, P. & Schöler, H. (2014). Investigating human disease using stem cell models. *Nature Reviews Genetics*, 15(9), 625-639.
<https://doi.org/10.1038/nrg3764>
- Tsai, W. C., Tang, F. T., Wong, M. K., Yen, H. C. & Pang, J. H. (2002). Decreased expression of proliferating cell nuclear antigen is associated with dexamethasone inhibition of the proliferation of rat tendon fibroblasts. *The Journal of rheumatology*, 29(11), 2397–2402.
- Valenti, D., Braidy, N., De Rasmio, D., Signorile, A., Rossi, L., Atanasov, A., Volpicella, M., Henrion-Caude, A., Nabavi, S. & Vacca, R. (2018). Mitochondria as pharmacological targets in Down syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, 114, 69-83. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.014>
- Vis, J. C., Duffels, M. G., Winter, M. M., Weijerman, M. E., Cobben, J. M., Huisman, S. A. & Mulder, B. J. (2009). Down syndrome: a cardiovascular perspective. *Journal*

- of intellectual disability research : JIDR*, 53(5), 419–425.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2009.01158.x>
- Vundinti, B. & Ghosh, K. (2011). Incidence of Down syndrome: hypotheses and reality. *Indian journal of human genetics*, 17(3), 117-119. <https://doi.org/10.4103/0971-6866.92080>
- Wakabayashi, J., Zhang, Z., Wakabayashi, N., Tamura, Y., Fukaya, M., Kensler, T. W., Iijima, M. & Sesaki, H. (2009). The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *Journal of Cell Biology*, 186(6), 805-816. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903065>
- Wang, S., Wang, Y., Qiu, K., Zhu, J. & Wu, Y. (2020). RCAN1 in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and a potential therapeutic target. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 26(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00249-0>
- Yan, L., Yang, H., Li, Y., Duan, H., Wu, J., Qian, P., Li, B. & Wang, S. (2014). Regulator of calcineurin 1-1L protects cardiomyocytes against hypoxia-induced apoptosis via mitophagy. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 64(4), 310–317. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000121>
- Yang, K., Hitomi, M., & Stacey, D. W. (2006). Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell division*, 1, 32. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-1-32>
- Yoon, P., Freeman, S., Sherman, S., Taft, L., Gu, Y., Pettay, D., Flanders, W., Khoury, M. & Hassold, T. (1996). Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of chromosomal error: a population-based study. *American journal of human genetics*, 58(3), 628-633.
- Zhang, J., Wilson, G., Soerens, A., Koonce, C., Yu, J., Palecek, S., Thomson, J. & Kamp, T. (2009). Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circulation research*, 104(4), e30-e41. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.192237>

