



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Estudio de la expresión de proteínas relacionadas con la homeostasis del calcio en cardiomiocitos diferenciados a partir de iPSCs derivados de pacientes con ataxia de Friedreich.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Noverques Chermés, Rita

Tutor/a: Galindo Orozco, Máximo Ibo

Cotutor/a externo: Gonzalez Cabo, Maria Pilar

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
RELACIONADAS CON LA HOMEOSTASIS DEL
CALCIO EN CARDIOMIOCITOS DIFERENCIADOS
A PARTIR DE iPSCs DERIVADAS DE PACIENTES
CON ATAXIA DE FRIEDREICH.**



UNIVERSITAT
POLITÀCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agrònoma
i del Medi Natural



INCLIVA | VLC
Instituto de Investigación Sanitaria

**Universitat Politècnica de València (Escola Tècnica Superior d'Enginyeria
Agrònoma y del Medi Natural) – Fundació INCLIVA**

Alumno/a: Rita Noverques Chermés

Tutor/a interno: Pilar González Cabo

Tutor/a externo: Máximo Ibo Galindo

Curso académico: 2023-2024

Valencia, septiembre de 2024

Estudio de la expresión de proteínas relacionadas con la homeostasis del calcio en cardiomiocitos diferenciados a partir de iPSCs derivadas de pacientes con ataxia de Friedreich.

RESUMEN

La ataxia de Friedreich es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria recesiva, que es la forma más común de ataxia hereditaria, afectando principalmente el sistema nervioso central y el corazón. Está causada por una expansión del triplete GAA en el intrón 1 del gen FXN (9q21.11), que conduce a la disminución de la expresión de la frataxina, una proteína implicada en la función mitocondrial. La deficiencia de frataxina resulta en una disfunción mitocondrial y en la producción de especies reactivas de oxígeno, provocando estrés oxidativo, daño celular y una alteración de la homeostasis del calcio, especialmente en las células con alta demanda energética como las neuronas y las células cardíacas. Esta acumulación de daño celular desencadena una serie de procesos patológicos que contribuyen a los síntomas característicos de la enfermedad, como la ataxia progresiva, la disartria, la neuropatía periférica y la cardiomiopatía, siendo esta última la causa principal de muerte entre los pacientes.

Estudios recientes han demostrado que los miARN participan en perfiles de expresión genética alterados que desencadenan el desarrollo de enfermedades mitocondriales y la homeostasis redox celular. Se ha confirmado la participación de los miARN en la regulación de los niveles de frataxina y se han propuesto como marcadores de pronóstico tempranos de la enfermedad. Para ello, un estudio previo desarrolló una firma de siete miARN diferencialmente expresados entre pacientes y controles, que fue posteriormente validada por qPCR.

Para este estudio se ha seleccionado genes diana de dos de los miRNAs diferencialmente expresados, hsa-miR-323a-3p y hsa-miR-142-3p, debido a su asociación con alteraciones cardíacas. Se eligieron dianas relacionadas con la homeostasis de calcio, pues la frataxina desempeña un papel importante en el manejo adecuado del calcio (Ca^{2+}), un segundo mensajero fundamental para generar el potencial de acción en neuronas y cardiomiocitos. La deficiencia de frataxina en los cardiomiocitos produce una pérdida de la capacidad de amortiguación de Ca^{2+} en las mitocondrias que conduce a un aumento de los niveles de Ca^{2+} en el citosol y una reducción del contenido en el retículo sarcoplásmico (RS).

Se ha elegido como modelo de estudio los cardiomiocitos diferenciados a partir de iPSCs debido la implicación de la disfunción cardíaca en la enfermedad y a la limitada disponibilidad de tejido cardíaco humano.

Así pues, el objetivo de este trabajo es el estudio de la expresión de proteínas relacionadas con la homeostasis del calcio y reguladas por los miRNAs diferencialmente expresados en los cardiomiocitos, con el propósito de profundizar en la comprensión de la enfermedad y potencialmente contribuir al desarrollo de terapias efectivas.

Palabras clave: FRDA; cardiomiocitos; calcio; transportadores; retículo sarcoplásmico; estrés oxidativo; disfunción mitocondrial

Study of the expression of proteins related to calcium homeostasis in cardiomyocytes differentiated from iPSCs derived from patients with Friedreich's ataxia.

ABSTRACT

Friedreich's ataxia is a recessive hereditary neurodegenerative disease, which is the most common form of hereditary ataxia, mainly affecting the central nervous system and the heart. It is caused by an expansion of the GAA triplet in intron 1 of the FXN gene (9q21.11), leading to decreased expression of frataxin, a protein involved in mitochondrial function. Frataxin deficiency results in mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species (ROS) production, causing oxidative stress, cellular damage, and alteration of calcium homeostasis, especially in cells with high energy demand such as neurons and cardiac cells. This cellular damage accumulation triggers a series of pathological processes contributing to the characteristic symptoms of the disease, such as progressive ataxia, dysarthria, peripheral neuropathy, and cardiomyopathy, with the latter being the leading cause of death among patients.

Recent studies have shown that miRNAs are involved in altered gene expression profiles that trigger the development of mitochondrial diseases and cellular redox homeostasis. The involvement of miRNAs in regulating frataxin levels has been confirmed, and they have been proposed as early prognostic markers of the disease. To this end, a previous study developed a signature of seven differentially expressed miRNAs between patients and controls, which was subsequently validated by qPCR.

For this study, target genes of two differentially expressed miRNAs, hsa-miR-323a-3p and hsa-miR-142-3p, were selected due to their association with cardiac alterations. Targets related to calcium homeostasis were chosen because frataxin plays a significant role in proper calcium (Ca²⁺) management, a fundamental second messenger for generating action potential in neurons and cardiomyocytes. Frataxin deficiency in cardiomyocytes leads to a loss of Ca²⁺ buffering capacity in mitochondria, resulting in increased cytosolic Ca²⁺ levels and reduced content in the sarcoplasmic reticulum (SR).

iPSC-derived cardiomyocytes were selected as the study model due to the involvement of cardiac dysfunction in the disease and the limited availability of human cardiac tissue.

Therefore, the aim of this study is to investigate the expression of proteins related to calcium homeostasis and regulated by differentially expressed miRNAs in cardiomyocytes, aiming to deepen the understanding of the disease and potentially contribute to the development of effective therapies.

Keywords: FRDA; cardiomyocytes; calcium; transporters; sarcoplasmic reticulum; oxidative stress; mitochondrial dysfunction

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer agradecimiento al grupo del CIBERER del departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia por su cálido recibimiento y por brindarme la oportunidad de aprender de cada uno de ellos, siempre en un excelente ambiente de trabajo.

A Pili, por brindarme la oportunidad y por compartir conmigo tu pasión por la investigación. Gracias por tu paciencia, por siempre estar dispuesta a resolver mis dudas y por motivarme a seguir adelante en cada etapa de este proyecto.

A Nuria, por ser mi roca y mi confidente, porque sin ti no estaría aquí. Agradezco a la universidad haberte encontrado y puesto en mi camino, porque te has convertido en una persona imprescindible en mi vida.

A la meua família, per estar al meu costat en cada pas del camí, per la seua confiança absoluta i per recordar-me constantment que soc capaç d'aconseguir el que em propose, fins i tot quan jo mateixa dubte. Gràcies per haver estat i estar sempre al meu costat.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ABREVIATURAS.....	V
INTRODUCCIÓN	1
1. Ataxia de Friedreich (FRDA)	1
1.1. Genética molecular de la FRDA	2
1.2. Sintomatología	2
2. Fisiología cardíaca	3
2.1. Características de la célula cardíaca	3
3. Patología cardíaca en la FRDA.....	8
3.1. Manifestaciones cardíacas de la FRDA.....	8
3.2. Modelos de estudio de la cardiomiopatía en FRDA.....	9
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
1. Material biológico	12
1.1. Líneas celulares	12
1.2. Anticuerpos	12
1.3. Cebadores de PCR	13
2. Métodos.....	13
2.1. Cultivo iPSC.....	13
2.1.1. Preparación Matrigel	13
2.1.2. Descongelación iPSC	13
2.1.3. Pase iPSC	13
2.2. Diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos.....	14
2.2.1. Siembra (día -2).....	14
2.2.2. Diferenciación (hasta día 15).....	14
2.2.3. Maduración de los cardiomiocitos	15
2.3. Citometría de flujo	16
2.4. Ensayo de inmunofluorescencia	16
2.5. RT-qPCR	17
2.6. Western blot	18
2.7. Análisis estadístico.....	18
RESULTADOS.....	20

1. Diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos.....	20
2. Caracterización de los cardiomiocitos	21
2.1. Cálculo del porcentaje de cardiomiocitos obtenidos mediante citometría de flujo	21
2.2. Comprobación de la expresión de marcadores cardiacos mediante inmunofluorescencia	22
2.3. Cuantificación de la expresión de marcadores cardiacos mediante RT-qPCR	23
3. Cuantificación de la expresión de dianas de miRNA.....	24
3.1. <i>CACNA1C</i>	25
3.2. <i>SERCA2</i>	26
3.3. <i>CALHM5</i>	28
DISCUSIÓN.....	29
1. Modelado de cardiomiopatías en iPSC-CMs	29
2. Impacto de la deficiencia de frataxina en la homeostasis del calcio	31
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los sarcómeros.....	4
Figura 2. Esquema de los túbulos T en los cardiomiocitos.....	5
Figura 3. Esquema del ciclo de los puentes cruzados en un sarcómero durante la contracción del cardiomiocito.....	6
Figura 4. Esquema del potencial de acción cardíaco.....	7
Figura 5. Acoplamiento excitación-contracción en el cardiomiocito.....	8
Figura 6. Protocolo de diferenciación a cardiomiocitos ventriculares a partir de iPSC y maduración mediante la adición de Torin1.....	15
Figura 7. Seguimiento del proceso de diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos.....	20
Figura 8. Análisis representativo de la expresión de troponina cardíaca (cTnT) por citometría de flujo.	21
Figura 9. Confirmación de la expresión de marcadores cardíacos en los iPSC-CM mediante inmunofluorescencia.....	22
Figura 10. Cuantificación de la expresión de marcadores cardíacos mediante RT-qPCR.....	24
Figura 11. Cuantificación de la expresión del gen <i>CACNA1C</i> , diana del miR-323a-3p, en los iPSC-CM.....	26
Figura 12. Cuantificación de la expresión del gen <i>SERCA2</i> , diana del miR-142-3p, en los iPSC-CM.....	27
Figura 13. Cuantificación de la expresión del gen <i>CALHM5</i> , diana del miR-323a-3p, en los iPSC-CM.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados.....	12
Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados.....	13
Tabla 3. Cebadores de PCR utilizados.....	15

ABREVIATURAS

Ca²⁺: Calcio

Ca_v1.2: Canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje de tipo L

cTnT: Troponina T cardíaca

D-PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

FRDA: Ataxia de Friedreich

FXN: Frataxina

iPSC: Induced Pluripotent Stem Cell

iPSC-CM: Induced Pluripotent Stem Cell derived Cardiomyocytes

ISC: Iron Sulfur Clusters

MCU: Mitochondrial Calcium Uniporter

MIENTURNET: MicroRNA Enrichment TURned NETwork

MLC: Cadena ligera de miosina

MLC2v: Isoforma ventricular de la cadena ligera reguladora de miosina 2

MLC2A: Isoforma auricular de la cadena ligera reguladora de miosina 2

NAV: Nodo auriculoventricular

NCX: Intercambiador de Na⁺/Ca²⁺

NSA: Nodo sinoauricular

PA: Potencial de acción

qPCR: PCR cuantitativa

ROCK: Quinasa asociada a Rho

ROCKi: Rho kinase inhibitor

ROS: Reactive Oxygen Species

RS: Retículo Sarcoplásmico

RyR: Receptor de Rianodina

SERCA2: ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico

Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

A. Indicar el grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero				X
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad	X			
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras		X		
ODS 10. Reducción de las desigualdades			X	
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables				X
ODS 13. Acción por el clima				X
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

B. Describir brevemente la alineación del TFG con los ODS, marcados en la tabla anterior, con un grado alto.

En relación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se pueden establecer las siguientes relaciones con los diferentes objetivos que proponen:

ODS 3: Salud y bienestar. La investigación sobre enfermedades neurodegenerativas y el desarrollo de terapias para la ataxia de Friedreich se alinean con las metas de mejorar la salud global, tratar enfermedades no transmisibles y fortalecer la investigación biomédica para enfermedades raras.

ODS 4: Educación de calidad. Se está realizando una investigación científica que genera y recopila nuevos avances, contribuyendo a una mayor comprensión de los mecanismos subyacentes a la ataxia de Friedreich (FRDA).

INTRODUCCIÓN

1. Ataxia de Friedreich (FRDA)

La ataxia de Friedreich (FRDA, OMIM229300) es una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva. Aunque presenta una prevalencia de 1 cada 30,000 individuos, siendo considerada una enfermedad rara, es la ataxia hereditaria más común en Europa. La FRDA está causada por la hiperexpansión de las repeticiones GAA localizadas en el primer intrón del gen *FXN* (Campuzano et al., 1996), que inhibe su expresión, por lo que los pacientes homocigotos para la expansión GAA tienen niveles muy bajos de ARNm y la proteína denominada frataxina en comparación con los portadores heterocigotos y los controles sanos.

En el fenotipo clásico de la enfermedad, la edad de aparición de los síntomas ronda la pubertad, y casi siempre antes de los 25 años, siendo los síntomas iniciales la inestabilidad en la marcha y la torpeza en los movimientos. La progresión de la enfermedad es variable, aunque la mayoría de los pacientes requieren del uso de silla de ruedas entre una y dos décadas tras el inicio de los síntomas (M B Delatycki et al., 1999; Dürr et al., 1996). En los casos atípicos, los síntomas pueden aparecer de manera temprana (antes de los 10 años), lo que se asocia con una progresión acelerada de la enfermedad, o tardía (después de los 25 años), relacionada con una progresión más lenta. La edad media de fallecimiento de los pacientes se sitúa en los 36,5 años (rango de edad 12-87), siendo la disfunción cardíaca la causa más común de muerte (Tsou et al., 2011).

La frataxina se expresa de manera ubicua a niveles relativamente bajos. En humanos adultos, la frataxina se expresa predominantemente en tejidos y células con una alta tasa metabólica, como el hígado, el riñón, el corazón y las neuronas, reflejando los principales sitios de la patología de la FRDA (Koeppen, 2011). Esta proteína, de 210 aminoácidos, es codificada nuclearmente, pero posee una secuencia N-terminal de orientación mitocondrial que se elimina durante el procesamiento (Campuzano et al., 1996; Gibson et al., 1996). Una vez procesada, la frataxina se localiza predominantemente dentro de las mitocondrias y se asocia con membranas mitocondriales, crestas y como proteína soluble libre dentro de la matriz (Gibson et al., 1996). Cuando se describió la enfermedad, se determinó que frataxina tenía una función reguladora de la homeostasis del hierro, principalmente como cofactor en la biosíntesis de grupos de hierro-azufre (Pastore y Puccio, 2013). La deficiencia de frataxina provoca una disminución de la actividad de la aconitasa y otras proteínas que contienen hierro-azufre, así como un déficit general en la producción de energía celular y otros procesos metabólicos que dependen de los clústeres de hierro-azufre, incluyendo la síntesis y reparación del ADN (Bulteau et al., 2004; Martelli et al., 2007). Esto da lugar a la acumulación de hierro intracelular, que en las células del corazón y el cerebro de los pacientes con FRDA favorece la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y provoca daños mitocondriales. Este daño conduce en última instancia a una degeneración progresiva del sistema nervioso, problemas de movimiento y disfunción cardíaca.

En la FRDA, la deficiencia de frataxina también altera la homeostasis del calcio intracelular, un factor clave en la patología cardíaca asociada con esta enfermedad. La frataxina juega un papel crucial en la regulación del calcio mitocondrial y en la protección contra el estrés oxidativo (Gonzalez-Cabo et al., 2010). La disminución de frataxina en los cardiomiocitos de pacientes con FRDA se traduce en un manejo deficiente del calcio, afectando tanto la captación como la liberación de Ca^{2+} . Esta disfunción contribuye a una alteración en el acoplamiento excitación-contracción (E-C), que se

manifiesta en una contracción ineficaz y un aumento en el riesgo de arritmias (Gomez et al., 2020). El manejo deficiente del Ca^{2+} en los cardiomiocitos de FRDA puede provocar una exacerbación de la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, acelerando la progresión de la cardiomiopatía en esta enfermedad.

1.1. Genética molecular de la FRDA

En un 96% de los casos, la mutación patogénica de la FRDA consiste en una expansión homocigótica del triplete GAA en el intrón 1 del gen FXN, que codifica la proteína frataxina. Los casos restantes (1-3%) son heterocigotos compuestos, que presentan una expansión en uno de los alelos y una mutación puntual, inserción o deleción en el otro (Galea et al., 2016). Los alelos de rango no afectado contienen hasta de 33 tripletes y los alelos expandidos causantes de la enfermedad pueden albergar hasta 1500 repeticiones GAA (Delatycki et al., 2000). Este elevado número de repeticiones provoca una deficiencia en la transcripción del gen de la frataxina, que es responsable del daño progresivo en el sistema nervioso central y periférico que presentan los pacientes que sufren de FRDA. Como consecuencia de la expansión, los pacientes presentan una reducción en los niveles de la proteína frataxina. Los pacientes tienen entre un 5 y un 35% de los niveles de frataxina de los individuos sanos, mientras que los sujetos heterocigotos asintomáticos tienen >50% (Campuzano et al., 1997; Deutsch et al., 2010).

El fenotipo clínico está determinado por el tamaño de la expansión, así pues, cuanto mayor es el número de repeticiones, mayor es la deficiencia de frataxina, más precoz es la aparición de los síntomas y mayor es la severidad de la enfermedad (Bidichandani et al., 1998; Ohshima et al., 1998; Pandolfo, 2002). También se ha relacionado directamente el tamaño de la expansión con la incidencia de cardiomiopatía (Dürr et al., 1996). Sin embargo, existen diferencias fenotípicas notables incluso entre individuos con la misma mutación genética (Rajagopalan et al., 2010).

1.2. Sintomatología

La ataxia de Friedreich causa la neurodegeneración primaria de los ganglios de la raíz dorsal, lo que se manifiesta clínicamente con una ataxia progresiva de la marcha y de las extremidades, arreflexia, disartria y pérdida de la sensación propioceptiva. Los síntomas iniciales suelen incluir inestabilidad en la marcha y torpeza en los movimientos, progresando gradualmente hacia una pérdida de la coordinación en las extremidades. Otros síntomas neurológicos incluyen un aumento del tono muscular, debilidad muscular, dificultad para tragar (disfagia), neuroinflamación, atrofia óptica y defectos auditivos (Apolloni et al., 2022; Khan et al., 2022; Delatycki y Bidichandani, 2019; Marmolino, 2011).

La FRDA también está vinculada a manifestaciones no neurológicas, como la miocardiopatía hipertrófica, la intolerancia a la glucosa y la diabetes mellitus (Campuzano et al., 1996; Gottesfeld, 2019). La cardiomiopatía es la principal causa de muerte (59%) (Tsou et al., 2011), afectando a los pacientes generalmente entre la tercera y quinta década de vida. Las complicaciones cardíacas en la FRDA incluyen miocardiopatía hipertrófica, fibrosis, acumulación de hierro, miocarditis y necrosis de las fibras cardíacas (Koeppen et al., 2015). Además, aproximadamente el 10% de los pacientes desarrollan diabetes, con alta prevalencia de resistencia a la insulina y disfunción de las células β (Cnop et al., 2012).

En ciertos pacientes, las deformidades en los pies y la escoliosis se presentan como signos iniciales de la enfermedad, mientras que, en otros, la miocardiopatía puede ser la primera manifestación clínica detectable (Pandolfo, 2009). La diabetes mellitus tiende a desarrollarse en las etapas más avanzadas de la enfermedad (De Michele et al., 1996).

2. Fisiología cardíaca

El corazón es un órgano muscular vital encargado de bombear sangre a través del sistema circulatorio, suministrando oxígeno y nutrientes a los tejidos del cuerpo y eliminando desechos metabólicos. El corazón de los mamíferos está formado por cuatro cavidades: las aurículas izquierda y derecha y los ventrículos izquierdo y derecho.

Funciona de manera continua y rítmica gracias a un complejo sistema de regulación eléctrica y mecánica, lo que permite al corazón muscular bombear sangre a través de la vasculatura pulmonar y sistémica. Este proceso vital se rige por un meticuloso ciclo de contracción y relajación, conocido como ciclo cardíaco, fundamental para mantener la perfusión adecuada de oxígeno y nutrientes a los tejidos corporales, a través de una serie de eventos altamente coordinados (Fukuta y Little 2008). Así pues, cada latido del corazón se compone de dos fases distintas: la diástole, donde las aurículas y ventrículos se relajan para llenarse de sangre, seguida de la sístole, donde ocurre la contracción vigorosa que impulsa la sangre hacia los vasos sanguíneos arteriales.

La actividad contráctil del corazón está regulada por una serie de señales eléctricas que comienzan en el nodo sinoauricular (NSA), ubicado en la aurícula derecha. Este nodo genera un potencial de acción que se propaga por las aurículas, provocando su contracción y el envío de sangre a los ventrículos. La señal llega al nodo auriculoventricular (NAV), que retrasa brevemente la señal para asegurar la finalización de la contracción auricular. Luego, el impulso se transmite al haz de His y las fibras de Purkinje, activando la contracción de los ventrículos y permitiendo que la sangre sea expulsada hacia la arteria pulmonar y la aorta. La excitación resultante de los cardiomiocitos por este potencial de acción induce un incremento en la concentración intracelular de iones calcio, activando a su vez las proteínas contráctiles que desencadenan la contracción muscular.

2.1. Características de la célula cardíaca

Los cardiomiocitos son las células individuales que componen el músculo cardíaco. La función principal de los cardiomiocitos es contraerse, lo que genera la presión necesaria para bombear la sangre a través del sistema circulatorio.

A nivel estructural, los cardiomiocitos poseen características distintivas que les permiten cumplir con su función de contracción rítmica y continua. Estas células presentan una forma alargada y ramificada, con un tamaño que puede variar entre 50 a 100 micrómetros de largo y alrededor de 10 a 25 micrómetros de diámetro (Martini et al., 2009).

Un aspecto notable es la presencia de un núcleo central, aunque algunas células pueden tener dos núcleos, lo que contrasta con las células musculares esqueléticas, que suelen contener muchos núcleos. La presencia de numerosas mitocondrias en los cardiomiocitos es otro aspecto a destacar, ya que se encargan de la generación del ATP necesario para las elevadas demandas energéticas del tejido cardíaco (Roth et al., 2014).

Además, los cardiomiocitos vecinos están unidos entre sí por discos intercalares, estructuras especializadas que facilitan la transmisión rápida de impulsos eléctricos y la coordinación sincronizada de las contracciones (Bers, 2002), creando un sincitio de células cardíacas.

Los discos intercalares contienen tres tipos principales de uniones celulares: desmosomas, uniones gap y fascias adherentes. Los desmosomas proporcionan conexión mecánica manteniendo las células unidas durante la contracción, las uniones gap permiten el paso de iones y pequeñas moléculas, facilitando la propagación de la despolarización entre cardiomiocitos, y las fascias adherentes transmiten la fuerza de contracción entre células adyacentes (Sallé et al., 2007).

A nivel ultraestructural, los cardiomiocitos contienen miofibrillas, estructuras compuestas por filamentos de actina y miosina dispuestos en unidades repetitivas llamadas sarcómeros. Estos sarcómeros son la unidad funcional de la contracción muscular y están organizados de manera regular, confiriendo al músculo cardíaco su apariencia estriada (figura 1). La interacción entre los filamentos gruesos de miosina y los filamentos delgados de actina en presencia de calcio y ATP es lo que permite la contracción muscular. Este proceso se activa a partir de la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico (RS) cuando se produce un potencial de acción en el músculo, en un proceso denominado acoplamiento excitación-contracción. El deslizamiento de la actina y la miosina entre sí produce la formación de "puentes cruzados", lo que provoca la contracción del corazón y la generación de fuerza. Esta disposición estructural permite que el corazón se contraiga de manera eficiente y eficaz, impulsando la sangre a través del sistema circulatorio (Kohl y Noble, 2009).

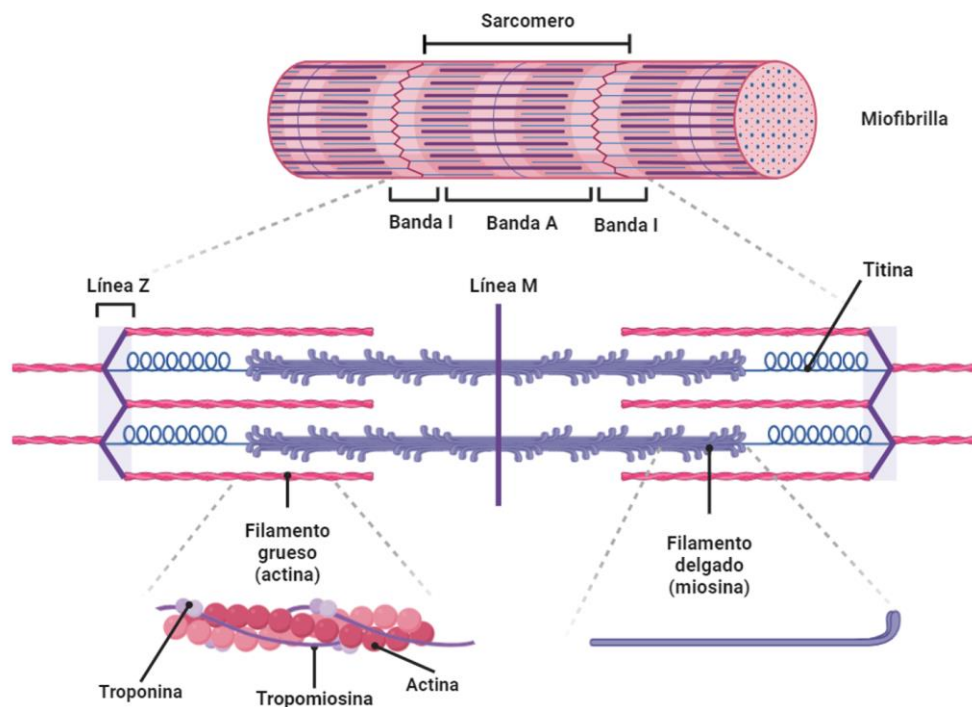


Figura 1. Estructura de los sarcómeros. Los sarcómeros se componen de proteínas largas que se organizan en filamentos gruesos y finos, llamados miofilamentos (Thompson et al., 2014), aunque también contienen proteínas como la troponina y la tropomiosina (Klabunde, 2011c). Encontramos también la titina, una proteína filamentosa larga que contribuye a mantener los filamentos gruesos centrados en el medio del sarcómero, en la denominada banda M (Lange et al., 2020). Cada sarcómero está delimitado por dos líneas Z, una banda estrecha formada por la proteína α -actinina. Figura original creada con Biorender.com.

Los cardiomiocitos están rodeados por una membrana plasmática denominada sarcolema, que actúa como una barrera entre el ambiente extracelular e intracelular. Esta membrana presenta invaginaciones hacia el interior de la célula conocidas como túbulos transversos (túbulos T), fundamentales para la función contráctil del corazón (figura 2) (Di Maio et al., 2007). Además, los túbulos T no solo facilitan una distribución homogénea de las señales de calcio dentro del miocito, sino que también actúan como andamios para las proteínas involucradas en la señalización de Ca^{2+} , como los canales de calcio tipo L, intercambiadores de sodio-calcio (NCX), ATPasas de calcio, y receptores beta-adrenérgicos, lo que es crucial para una contracción cardíaca eficiente (Chase y Orchard, 2011).

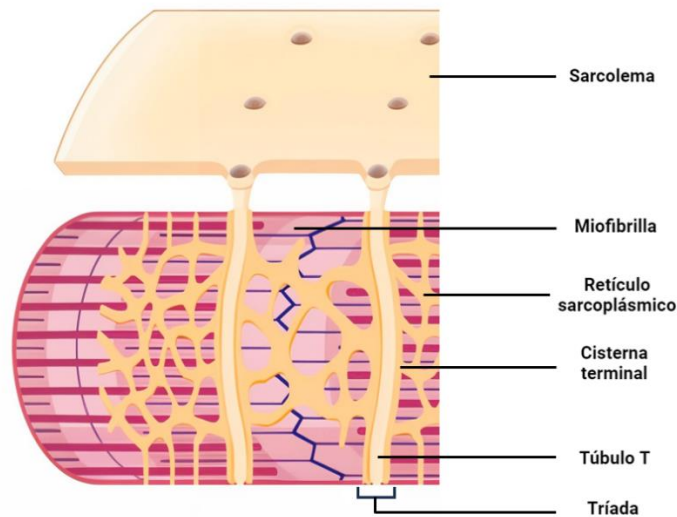


Figura 2. Esquema de los túbulos T en los cardiomiocitos. Los túbulos T están organizados en una red que se encuentra adyacente a las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico, formando estructuras llamadas tríadas. Estas tríadas son esenciales para el acoplamiento excitación-contracción (EC-coupling) en los miocitos ventriculares, facilitando la sincronización de los transitorios de calcio (Ca^{2+}) en toda la célula durante la contracción cardíaca. La proximidad de los túbulos T con las cisternas terminales permite que la despolarización de la membrana, iniciada por el potencial de acción que se origina en el nodo sinoauricular, active rápidamente las unidades contráctiles sarcoméricas a través de la liberación de Ca^{2+} . Figura original creada con Biorender.com.

2.2. Mecanismo de contracción cardíaca

La contracción del cardiomiocito se produce por el acortamiento de sus sarcómeros, debido al deslizamiento de la actina entre los filamentos de miosina. En reposo, la tropomiosina bloquea el sitio de unión con la miosina. Cuando los iones Ca^{2+} se unen a la troponina-C, se libera el sitio de unión de la actina, permitiendo que las cabezas de miosina se anclen. Este anclaje cambia el ángulo de las cabezas de miosina, desplazando los filamentos de actina y acortando los sarcómeros, lo que provoca la contracción (figura 3) (Klabunde, 2011c; Levick, 1991).

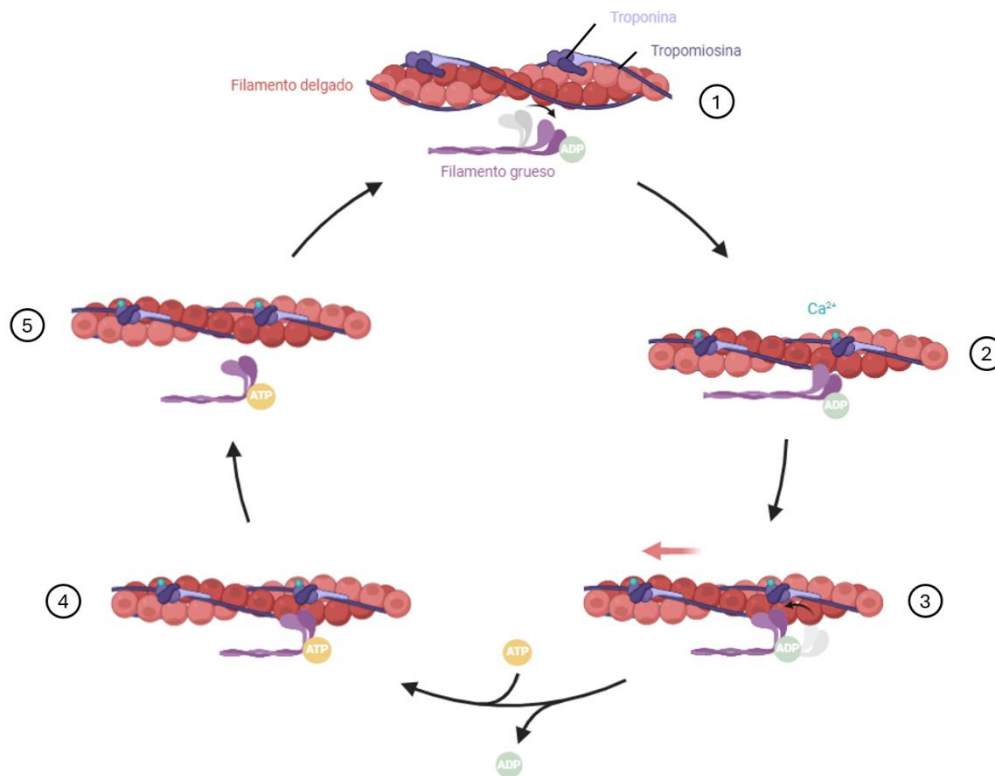


Figura 3. Esquema del ciclo de los puentes cruzados en un sarcómero durante la contracción del cardiomiocito. Cada molécula de miosina tiene dos cabezas que se unen al sitio de unión de la actina, formando puentes cruzados necesarios para la contracción y regulados por el complejo troponina-tropomiosina en respuesta al ion Ca^{2+} (Solaro y Rarick, 1998). 1. La cabeza de miosina unida a ADP está lista para unirse a la actina. 2. En presencia de Ca^{2+} , este se une a la troponina, exponiendo los sitios de unión para la miosina. 3. La miosina unida gira su cabeza, generando un "golpe de fuerza". 4. Una molécula de ATP se une a la cabeza de la miosina. 5. La actina y la miosina se separan. Figura original creada con Biorender.com.

2.3. Potencial de acción

El potencial de acción cardíaco se desarrolla a lo largo de cinco fases distintas, numeradas del 0 al 4, cada una marcada por cambios específicos en el potencial de membrana y en la actividad de los canales iónicos involucrados, de manera que se desencadena la contracción cardíaca al provocar cambios en la permeabilidad de la membrana (figura 4) (Bers, 2002).

En la fase 0, conocida como despolarización rápida, el potencial de membrana comienza en aproximadamente -90 mV y se eleva rápidamente hacia valores positivos, alcanzando alrededor de $+20$ a $+30 \text{ mV}$. Esta fase ascendente del potencial de acción se debe principalmente a un influjo transitorio y rápido de Na^+ a través de la apertura de canales rápidos de sodio.

Posteriormente, en la fase 1, o repolarización inicial, los canales de sodio se inactivan tras la despolarización, y se abren los canales de potasio (K^+), permitiendo una breve salida de potasio y el movimiento de iones cloruro (Cl^-). Como resultado, el potencial de membrana desciende ligeramente hacia valores cercanos a 0 mV , sin repolarizarse más allá de este punto. Esta fase forma parte del periodo refractario absoluto, crucial para el corazón ya que permite el tiempo necesario para que las cámaras se llenen y expulsen la sangre, evitando contracciones tetánicas.

La fase 2, conocida como fase de meseta, el potencial de membrana se estabiliza cerca de 0 mV, consecuencia del equilibrio entre el influjo de calcio (Ca^{2+}) a través de los canales de Ca^{2+} tipo L y el eflujo de corrientes de potasio (K^+) repolarizantes. Este influjo de calcio ralentiza la repolarización y da lugar a la característica meseta del PA cardíaco, crucial para una contracción eficiente del corazón.

Durante la fase 3, o repolarización rápida, los canales de calcio tipo L se cierran, mientras que los canales de potasio permanecen abiertos, lo que permite la salida continua de potasio. Esto provoca que el potencial de membrana descienda de manera más pronunciada hacia -90 mV, restaurando el estado de reposo. Esta fase marca el inicio del periodo refractario relativo, en el que es posible excitar la célula, pero el PA resultante tiene una menor amplitud debido a que no todos los canales de sodio están completamente activados.

Finalmente, en la fase 4, conocida como potencial de reposo, la bomba Na^+/K^+ ATPasa restablece el potencial de membrana al nivel basal de -90 mV, intercambiando iones de sodio y potasio a través de la membrana celular. Esta fase también forma parte del periodo refractario relativo y prepara la célula para un nuevo ciclo de despolarización.

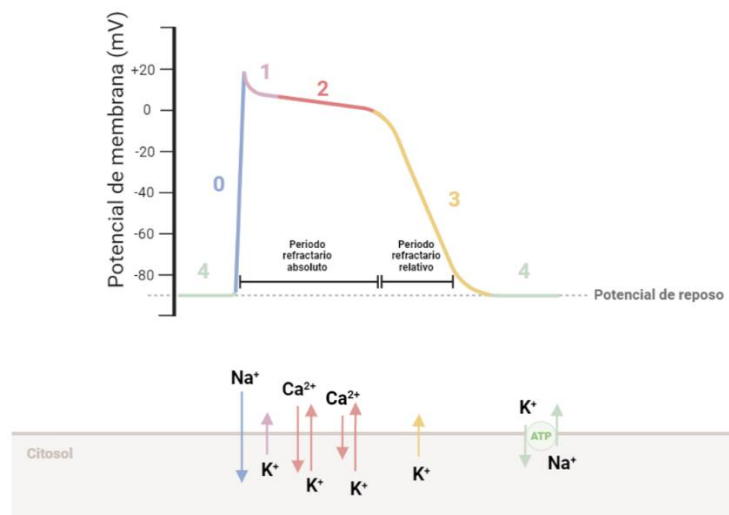


Figura 4. Esquema del potencial de acción cardíaco. Se ilustran las cinco fases (0 a 4), los movimientos de iones (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), y los cambios en el potencial de membrana durante el ciclo de despolarización y repolarización. Figura original creada con Biorender.com.

2.4. Acoplamiento excitación-contracción

El acoplamiento excitación-contracción (E-C) es el proceso mediante el cual la excitación eléctrica de la membrana celular, generada por el potencial de acción, se traduce en contracción muscular (figura 5). Este fenómeno crucial depende de los cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} para su correcto funcionamiento.

En el corazón, este proceso comienza cuando un potencial de acción cardíaco despolariza la membrana del cardiomiocito, abriendo los canales de calcio tipo L en la membrana celular y permitiendo la entrada de Ca^{2+} al citosol. Este incremento inicial en la concentración de calcio intracelular desencadena una liberación adicional de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático a través de los receptores de rianodina (RyR2), en un fenómeno conocido como liberación de calcio inducida por calcio (CICR) (Bers, 2002).

La combinación del flujo de Ca^{2+} y su liberación aumenta la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), permitiendo la unión de este ion a la troponina C, lo que induce cambios conformacionales en el complejo troponina-tropomiosina y expone los sitios de unión de la actina para la miosina, iniciando así la contracción del sarcómero (Solaro y Rarick, 1998).

Una vez que la contracción se ha producido, la relajación del cardiomiocito requiere la eliminación del Ca^{2+} del citosol, permitiendo su disociación de la troponina y restaurando el potencial de reposo de la célula. Este proceso involucra el retorno del Ca^{2+} al retículo sarcoplasmático a través de la bomba de calcio ATPasa del retículo sarcoplasmático (SERCA), y la expulsión del Ca^{2+} fuera de la célula mediante el intercambiador de sodio-calcio (NCX) y, en menor medida, por las bombas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (Klabunde, 2011b).

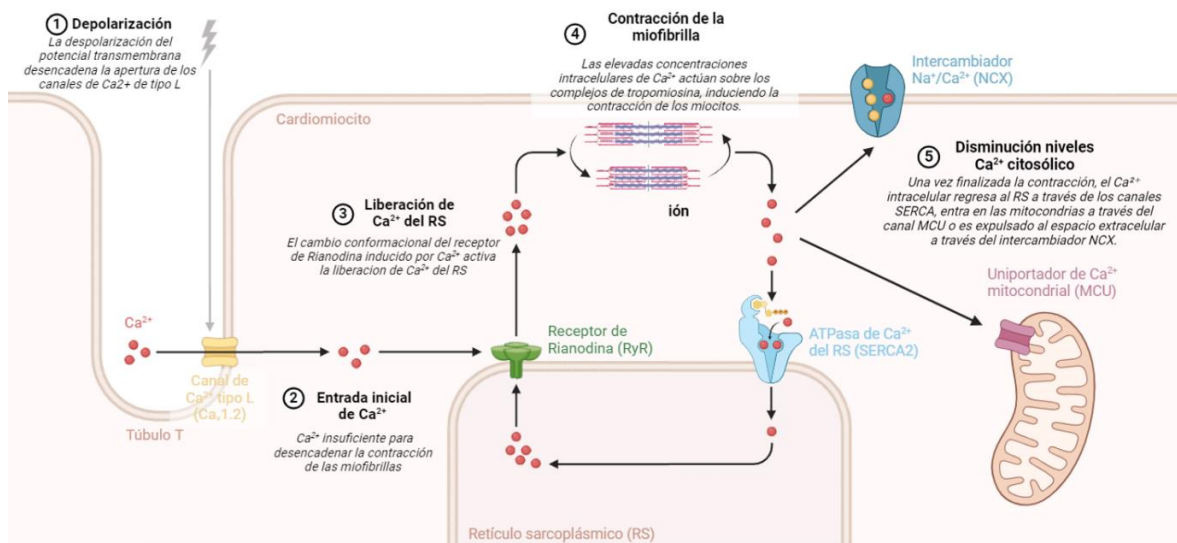


Figura 5. Acoplamiento excitación-contracción en el cardiomiocito. El potencial de acción se propaga por los túbulos T del cardiomiocito, activando la apertura de los canales de tipo L dependientes de voltaje y permitiendo la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula. Este Ca^{2+} activa los receptores RyR2, provocando la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático (RS) y aumentando rápidamente la concentración de Ca^{2+} en el citosol, en un proceso denominado como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . El Ca^{2+} citosólico se une a la troponina, lo que desencadena la contracción (sístole) del cardiomiocito. La relajación (diástole) ocurre cuando los niveles de Ca^{2+} citosólico disminuyen, ya sea por su recaptación en el RS mediante la bomba SERCA2 o por su expulsión al exterior celular a través del intercambiador NCX. El Ca^{2+} también puede ser absorbido por la mitocondria a través del canal MCU, ajustando la producción de ATP a las necesidades energéticas del cardiomiocito. Figura original creada con Biorender.com.

3. Patología cardíaca en la FRDA

3.1. Manifestaciones cardíacas de la FRDA

Aunque la FRDA se considera una enfermedad neurodegenerativa, su fenotipo indica una disfunción multisistémica, afectando también al miocardio, el páncreas y el sistema musculoesquelético.

La cardiomiopatía es una complicación común en los pacientes con FRDA, afectando hasta al 95% de los casos y siendo la principal causa de muerte en esta población (Child et al., 1986). Los estudios patológicos han identificado cambios significativos en el corazón de estos pacientes, incluyendo una acumulación de hierro en el corazón, pérdida de fibras contráctiles reemplazadas por tejido fibroso,

y una hipertrofia de los cardiomiocitos restantes con núcleos agrandados y deformes (Hewer, 1969), los cuales contribuyen al desarrollo de complicaciones como fallo cardíaco, arritmias y problemas de conducción (Hanson et al., 2019; Reetz et al., 2018). La mayoría de las muertes se deben a cardiomiopatía dilatada y arritmias, mientras que la cardiomiopatía hipertrófica no está asociada con la muerte (Tsou et al., 2011).

La progresión de la cardiomiopatía en FRDA muestra variabilidad en términos de gravedad y curso clínico. Inicialmente, se observa un engrosamiento concéntrico del ventrículo izquierdo, lo que lleva a una cardiomiopatía hipertrófica disminuyendo el tamaño del ventrículo y dificultando la función diastólica. Esto se manifiesta en síntomas como disnea y palpitaciones (Hanson et al., 2019). A medida que progresa la enfermedad, los cambios histológicos muestran hipertrofia celular, fibrosis difusa y necrosis miocárdica focal, con un riesgo creciente de cardiomiopatía dilatada y arritmias graves, como fibrilación auricular y taquicardia supraventricular (Regner et al., 2012).

3.2. Modelos de estudio de la cardiomiopatía en FRDA

La dificultad de acceder a los tipos celulares más afectados por la FRDA, como es el caso del cardiomiocito, representa un obstáculo en el estudio de la fisiopatología de la enfermedad. Para abordar esta limitación, se han desarrollado diversos modelos animales, como el ratón KIKO con déficit sistémico de frataxina, y ratones humanizados que expresan el gen humano de frataxina, pero estos modelos presentan un fenotipo cardíaco limitado. Para abordar esta limitación, se han creado modelos específicos que permiten la eliminación condicional de frataxina exclusivamente en el tejido cardíaco. Estos modelos, como el ratón con Cre recombinasa bajo el promotor MCK, reproducen la cardiomiopatía observada en los pacientes con FRDA, mostrando acumulación de hierro y defectos en enzimas de clústeres hierro-azufre (ISCs) (Perdomini et al., 2013).

Sin embargo, aunque se han conseguido avances con estos modelos, ninguno de ellos consigue recapitular adecuadamente las características fenotípicas de la enfermedad, lo que ha llevado a generar modelos celulares más sofisticados. Así pues, los avances en el campo de la tecnología de las células madre y las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) han proporcionado a los investigadores una prometedora herramienta celular para estudiar la FRDA, permitiendo desarrollar modelos con el fondo genético de los pacientes.

Desde 2011, se han generado neuronas y cardiomiocitos a partir de iPSC derivadas de pacientes con FRDA. Estos últimos han emergido como un modelo prometedor para el estudio de la patología cardíaca de la FRDA. Los cardiomiocitos derivados de iPSC (iPSC-CM) han demostrado características típicas de la enfermedad, como defectos electrofisiológicos consistentes con la enfermedad clínica, además de observar una correlación positiva entre la expresión de *FXN* y la contractilidad, proliferación de mitocondrias dañadas y alteraciones en la homeostasis mitocondrial (Wong et al., 2019; Hick et al. 2013). Estudios recientes han revelado que los iPSC-CMs derivados de pacientes con FRDA presentan alteraciones significativas en la regulación del Ca^{2+} , lo cual impacta directamente en la función cardíaca. Por ejemplo, Hick et al. (2013) identificaron que estos cardiomiocitos muestran anomalías en la captación y liberación de Ca^{2+} , que están vinculadas a un aumento del estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. Estas alteraciones contribuyen a una contracción muscular ineficaz y a un mayor riesgo de arritmias, características comunes en pacientes con FRDA.

Además, investigaciones adicionales, como las realizadas por Li et al. (2019), han demostrado que los iPSC-CMs de pacientes con FRDA exhiben tanto alteraciones estructurales como funcionales similares a las observadas en los tejidos cardíacos de los pacientes. Estas alteraciones incluyen una respiración mitocondrial reducida y una regulación del Ca^{2+} alterada, que en conjunto contribuyen a la progresiva disfunción cardíaca observada en esta enfermedad.

Por otra parte, en un trabajo previo del laboratorio, se identificó una firma de miARN circulantes sobreexpresados en el plasma de los pacientes de FRDA, que podrían modular rutas clave en la fisiopatología de la enfermedad. Además, uno de los miARN, el miR-323a-3p, se propuso como un biomarcador para monitorizar la progresión de la cardiomiopatía asociada a FRDA (Seco-Cervera et al., 2017). Para investigar si estos miARNs pudieran esclarecer las vías moleculares implicadas en la cardiomiopatía de FRDA, se evaluó su expresión en cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas (iPSC-CM). Utilizando RT-qPCR, se midió la expresión de una serie de miARNs (miR-151a-5p, miR-625-3p, miR-330-3p, miR-128-3p, miR-142-3p, y miR-323a-3p) en tres líneas de iPSC-CM. Los resultados revelaron una sobreexpresión de estos miARNs en una o ambas líneas de iPSC-CM derivadas de pacientes con FRDA en comparación con las líneas control, sugiriendo su posible implicación en la patología cardíaca. Para determinar las rutas reguladas por estos miARNs sobreexpresados, se realizó un análisis de las dianas de los miARNs utilizando bases de datos como miRTarBase, miRDB y la herramienta MIENTURNET, que identifica genes diana comunes a varios miARNs (Lapeña-Luzón, 2024). Se identificaron 85 genes que son diana de al menos dos de los miARNs sobreexpresados en los iPSC-CM, algunos de los cuales fueron estudiados en el trabajo realizado el curso pasado para la asignatura “Estancias en centros de investigación”.

En este trabajo hemos empleado el modelo de iPSC-CM para evaluar la expresión de proteínas clave involucradas en la homeostasis del calcio e investigar los efectos de la deficiencia de frataxina en la función cardíaca.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La FRDA es una enfermedad genética neurodegenerativa que se asocia con una cardiomiopatía severa, que representa la principal causa de fallecimiento en estos pacientes. Esta cardiomiopatía está relacionada con alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular, un factor esencial para la regulación adecuada de la contracción y relajación del músculo cardíaco. Un equilibrio preciso en los niveles de calcio dentro de las células cardíacas es crucial para asegurar una contracción eficiente del corazón y mantener su ritmo regular.

La hipótesis de esta investigación es que las alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular en los cardiomiocitos derivados de iPSC de pacientes FRDA pueden contribuir a las disfunciones en el mecanismo contráctil del corazón, y así a la progresiva insuficiencia cardíaca observada en estos pacientes.

Por todo, el objetivo principal de este trabajo es investigar la implicación de la homeostasis de Ca^{2+} en la afectación cardíaca observada en la FRDA. Para alcanzar este objetivo general, se han definido los siguientes objetivos específicos:

1. Obtención de un modelo de cardiomiocitos ventriculares derivados de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) procedentes de pacientes con FRDA.
2. Estudio de los genes diana de los miRNA sobreexpresados en los iPSC-CM y relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} : *CALHM5* y *CACNA1C*, dianas del miR-323a-3p; y *ATP2A2*, diana del miR-142-3p.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Líneas celulares

Para el desarrollo de los experimentos, se emplearon dos líneas de células madre humanas pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés induced Pluripotent Stem Cells) derivadas de fibroblastos de pacientes con FRDA, y una línea celular procedente de una persona sana, que fue utilizada como control, todas adquiridas a través del Friedreich's Ataxia Cell Line Repository (FACLR).

Respecto a las características de las líneas celulares, una de ellas, de en adelante FRDA1, proviene de una paciente de 20 años, cuya edad de debut fue 12 años. Como comorbilidades, la paciente presentaba cardiomiopatía. Presenta una expansión del triplete GAA en ambos alelos, que fue cuantificada en los fibroblastos contando con 650 repeticiones del triplete GAA en uno de los alelos y 719 repeticiones en el otro.

La otra línea de FRDA, en adelante FRDA2, se obtuvo de una mujer de 28 años, cuyos síntomas iniciaron a los 6 años. Esta paciente, además de cardiomiopatía, esta paciente presentaba diabetes. En esta línea, la expansión del triplete GAA es más pronunciada, con 870 repeticiones en un alelo y 1470 en el otro.

Por su parte, la línea control se obtuvo a partir de fibroblastos de una mujer de 22 años aparentemente sana.

1.2. Anticuerpos

En la Tabla 1 se recogen los anticuerpos primarios utilizados, la técnica donde se han empleado y la concentración de uso, y en la Tabla 2 los anticuerpos secundarios.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados.

Nombre y referencia	Concentración de uso
Anti-cTnT (Abcam, ab8295)	Citometría de flujo: 1:100 Inmunofluorescencia: 1:200
Anti- α -actinin (Merck, A7811)	Inmunofluorescencia: 1:250
Anti-GATA4 (SantaCruz Biotech, sc-25310)	Inmunofluorescencia: 1:100
Anti-CACNA1C (SantaCruz Biotech, sc-398433)	Western blot: 1:1000
Anti-SERCA2 (SantaCruz Biotech, sc-376235)	Inmunofluorescencia: 1:100 Western blot: 1:2000
Anti-CALHM5 (Thermo Fisher Scientific, PA5-25712)	Western blot: 1:2000
Anti-GAPDH (SantaCruz Biotech, sc-32233)	Western blot: 1:2000

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados.

Nombre y referencia	Concentración de uso
Goat anti-Mouse IgG (H&L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate (Thermo Fisher Scientific, A28175)	Citometría de flujo: 1:500 Inmunofluorescencia: 1:2000
Mouse IgG HRP Linked Whole Ab (Cytiva, NA931)	Western blot: 1:5000
Rabbit IgG HRP Linked Whole Ab (Cytiva, NA934)	Western blot: 1:10000

1.3. Cebadores de PCR

En la Tabla 3 se muestran los cebadores utilizados para llevar a cabo las reacciones de PCR y la secuencia de los mismos.

Tabla 3. Cebadores de PCR utilizados.

Transcrito	Primer directo (5'-3')	Primer reverso (5'-3')
<i>CACNA1C</i>	GTACTGGGTCAATGATGCCG	TTGGAAAACCTCTCCGCTAAGC
<i>ATP2A2</i>	CTGCAGGATGTTTATTCTGG	TATCATCTTTATGCACTTCTCC
<i>CALHM5</i>	AGTCTCAGATTCTAGGATGG	CCTTTTGTGCATATGTCTTCC
<i>MYL2</i>	AAACTTAAGGGAGCGGACCC	TCCTTGGAAAACCTCTCCGC
<i>MYL7</i>	AAGCTCAATGGGACAGACCC	CTGGAGAGAACTTGTCTGCC
<i>GAPDH</i>	GACTTGATTTTGGAGGGATCTCGC	TGGCAAATCCATGGCACCCG

2. Métodos

2.1. Cultivo iPSC

2.1.1. Preparación Matrigel

Para el cultivo de las iPSC es necesario el recubrimiento previo de las placas con Matrigel, que favorece la adhesión de estas al fondo de los pocillos. Para la preparación del Matrigel se reconstituyó una alícuota de Matrigel en medio DMEM-F12 frío, teniendo en cuenta el factor de dilución de Matrigel indicado en las instrucciones proporcionadas por la casa comercial, pues la concentración de proteína difiere entre diferentes lotes del producto. Una vez diluido el Matrigel en el volumen correspondiente de DMEM-F12, se recubrió una placa de 6 pocillos con 1 ml de la dilución por pocillo, asegurando que cubría la totalidad de la superficie. Se dejaron incubar a temperatura ambiente durante mínimo 1 hora, y pasado el tiempo de incubación se aspiró el Matrigel de los pocillos y se añadieron 2 ml de medio mTESR Plus atemperado.

2.1.2. Descongelación iPSC

Para descongelar las iPSCs, se sacaron los viales del tanque de nitrógeno líquido y se sumergieron parcialmente en un baño de agua a 37°C hasta que quedó solo un pequeño fragmento de hielo. Rápidamente, se añadió la suspensión celular a un tubo falcon con 5 ml de medio DMEM/F12 y se centrifugó a 250 G durante 6 minutos a temperatura ambiente. Luego, se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de medio mTESR Plus, suplementado con 10 µM de inhibidor de Rho-quinasa (ROCKi) Y-27632 (StemCell Technologies, 72302), con el fin de mantener la viabilidad celular, previniendo la apoptosis inducida por disociación (anoikis), lo que mejora la eficiencia de la diferenciación y el rendimiento final de cardiomiocitos (Ke et al., 2020). Finalmente, las células se sembraron en la placa de 6 pocillos previamente recubierta con Matrigel. Pasadas 24 horas desde la siembra, se retiró el medio suplementado con el inhibidor de Rho-quinasa y se añadió 2 ml de mTESR Plus sin suplementar por pocillo.

2.1.3. Pase iPSC

Después de 48 horas de incubación se observó la formación de colonias celulares. Una vez que los bordes de estas colonias estaban cerca de tocar colonias adyacentes se procedió con el pase celular. Primeramente, se realizó un lavado con Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (StemCell

Technologies, 37350). A continuación, se añadieron 300 µl de Accutase (StemCell Technologies, 07920) por pocillo y se incubó la placa a 37º grados durante 6 minutos para disgregar e individualizar las células. Pasado el tiempo de incubación, se comprobó en el microscopio que las células se habían despegado de la placa y las colonias se habían individualizado. Posteriormente, se recogieron las células, se transfirieron a un falcon con 5 ml de DMEM/F12 y se centrifugaron a 250 G durante 6 minutos. Tras la centrifugación, se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de mTESR Plus suplementado con 2 µM de tiazovivina (StemCell Technologies, 72252). La tiazovivina es un inhibidor de la ruta ROCK que mejora la adhesión celular y el mantenimiento de la capacidad de pluripotencia mediante el bloqueo de la diferenciación espontánea (Park et al., 2015).

Para la siembra de las células, primeramente, se realizó una dilución 1/10 de la suspensión celular con azul de tripano (Corning, 25-900-CI) para el conteo de las células en una cámara de Neubauer. Dependiendo del crecimiento de cada línea, se sembraron entre 150.000 y 200.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos previamente recubiertos con Matrigel. Pasadas 24 horas de la siembra, se retiró el medio suplementado con tiazovivina y se sustituyó por 2 ml por pocillo de mTESR Plus sin suplementar.

2.2. Diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos

Una vez que realizado al menos un pase celular, se realizó la siembra de las iPSC para su diferenciación a cardiomiocitos (iPSC-CM) y posterior maduración. Un esquema del protocolo se muestra en la figura 6.

2.2.1. Siembra (día -2)

Para la siembra de las iPSCs para su diferenciación a cardiomiocitos se utilizaron placas de 12 pocillos previamente recubiertas con Matrigel. Se siguió el mismo procedimiento que para el pase celular descrito en el apartado anterior. Brevemente, se lavaron las células con D-PBS, se disgregaron con Accutase, se realizó un conteo con azul de tripano y se sembraron con medio suplementado con 10 µM de inhibidor de Rho-quinasa (ROCKi) Y-27632. Se sembraron 550.000 células por pocillo de cada línea, tanto la línea control como la FRDA1, pues se requería una confluencia superior al 90% después de 48 horas de la siembra para proceder con la diferenciación. Tras 24 horas de incubación se sustituyó el medio suplementado por medio mTESR Plus fresco sin suplementar.

2.2.2. Diferenciación (hasta día 15)

El día 0, 48 horas después de la siembra, y en caso de que los cultivos hubieran alcanzado el 90% de confluencia, se inició el protocolo de diferenciación utilizando el kit Ventricular Cardiomyocyte Differentiation STEMdiff™ (StemCell Technologies, 05010). Este protocolo incluye cambios de medio cada 48-72 horas, ajustando el medio conforme avanza la diferenciación. Los volúmenes empleados para los diferentes medios son 2 ml por pocillo de placa de 12. Cabe remarcar que, de aquí en adelante, para los cambios de medio se utilizó una pipeta electrónica, pues el uso de una bomba de vacío podría despegar las células de la placa.

El día 0 se retiró el medio mTESR y se sustituyó por medio de diferenciación A suplementado con Matrigel. Para su preparación se realizó una dilución 1:10 del suplemento A, y se le agregó Matrigel a una dilución 1:100. El día 2 se realiza un cambio completo de medio por medio de diferenciación B (dilución 1:10). Los días 5 y 7 se retiró el medio y se sustituyó por medio de diferenciación C, preparado de la misma manera que el medio B.

En el día 9, el medio se reemplazó por medio de mantenimiento, realizando cambios completos de medio en los días 12 y 14, con el objetivo de promover una mayor diferenciación. Para la preparación de este medio, se añadieron los 10 ml de suplemento de mantenimiento a la botella de medio basal.

Se realizó un seguimiento diario de las células mediante microscopía óptica para evaluar la evolución del proceso de diferenciación. A partir del día 8, se pueden observar pequeñas áreas de cardiomiocitos latiendo, que progresan hasta alcanzar un latido generalizado en todo el pocillo alrededor del día 12.

2.2.3. Maduración de los cardiomiocitos

Los días 16, 19 y 21 de diferenciación, los cardiomiocitos fueron tratados con medio de mantenimiento suplementado con Torin1, un inhibidor selectivo de las quinasas mTOR. Esta vía de señalización ha demostrado ser un regulador clave en la maduración de los cardiomiocitos, aumentando la expresión de genes esenciales para la maduración cardíaca, mejorando la función contráctil y metabólica de los cardiomiocitos, y promoviendo un fenotipo más maduro y funcional (Garbern et al., 2020).

El día 23 de diferenciación, una vez ya finalizado el tratamiento para maduración de los cardiomiocitos, se retomó el medio de mantenimiento sin suplementar, cambiando el medio cada 2-3 días hasta alcanzar el día 33, tiempo necesario para permitir a los cardiomiocitos completar la maduración. Llegado el día 33, los cardiomiocitos ya maduros se levantaron y se sembraron a las concentraciones requeridas para los siguientes experimentos o bien se recogieron pellets celulares para posteriormente realizar extracciones de ARN y proteína.

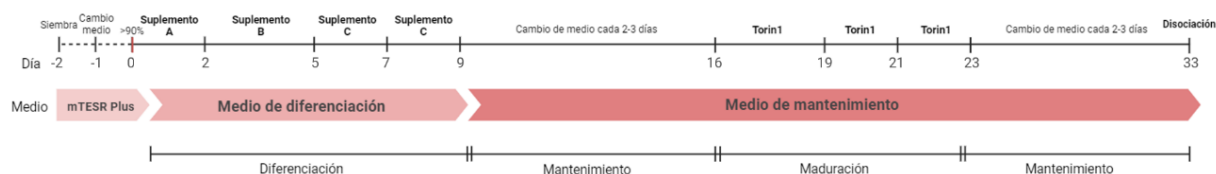


Figura 6. Protocolo de diferenciación a cardiomiocitos ventriculares a partir de iPSC y maduración mediante la adición de Torin1. Dos días antes de iniciar el protocolo de diferenciación, las iPSC fueron disociadas y sembradas en placas de 12 pocillos con medio mTeSR Plus, a una densidad de 550.000 células por pocillo. Al día siguiente (día -1), el medio fue reemplazado por mTeSR Plus fresco. En el día 0, se aspiró el medio y se añadieron 2 ml de medio A de diferenciación para iniciar la inducción de las iPSC hacia cardiomiocitos. El día 2, se realizó un cambio de medio utilizando medio B, y los días 4 y 7 con medio C. En el día 9 se sustituyó el medio por el medio de mantenimiento del kit, que se reemplazó cada 2-3 días. Para promover la maduración de los cardiomiocitos, se suplementó el medio de mantenimiento con 200 nM de Torin1 los días 16, 19 y 21 de diferenciación. El día 23 se reemplazó el medio por medio de mantenimiento, que fue reemplazado cada 2-3 días hasta el día 33, en el que los cardiomiocitos se disociaron para la realización de los experimentos.

2.2.4. Disociación y siembra de los cardiomiocitos

El día 33 del protocolo, una vez terminada la maduración, los cardiomiocitos se disociaron empleando el kit STEMdiff™ Cardiomyocyte Dissociation Kit (StemCell Technologies, #05025). Este kit se compone de un medio de disociación y un medio de soporte que reduce el estrés de los cardiomiocitos durante la disociación y siembra, manteniendo su viabilidad y capacidad funcional.

Para ello, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con 1 ml de D-PBS. A continuación, se agregaron 500 µl de Cardiomyocyte dissociation medium por pocillo y se incubaron las células a 37°C durante 10 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se agregó 1 ml de medio DMEM-F12 para recoger las células, utilizando para ello una pipeta serológica de 5 ml. Se pipeteó arriba y abajo durante 3-4 veces y las células se transfirieron inmediatamente a un tubo falcon vacío. Se repitió el procedimiento, pero ahora con la pipeta automática de 1 ml, lavando varias veces para recoger la mayor cantidad posible de células y transfiriéndolo al mismo falcon. En caso de ser necesario, pues aún quedaban remanentes de células pegadas a la placa, se añadió 500 µl de DMEM-F12 por pocillo, y con la ayuda de un raspador de plástico se despegaron las células. El volumen recuperado se transfirió al falcon, que se centrifugó a 250 G durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 1 ml de medio de soporte y se contaron las células con azul de tripano y la cámara de Neubauer.

Parte de las células se destinaron para la caracterización mediante citometría de flujo, otra parte se sembró en placas previamente recubiertas con Matrigel para la caracterización y el estudio de las proteínas de interés mediante inmunofluorescencia indirecta, y las células restantes se destinaron a extracción de ARN y proteínas.

2.3. Citometría de flujo

Las células se disociaron utilizando el medio de disociación, como se describió en el apartado 2.4.4. *Disociación y siembra de los cardiomiocitos*. Se reservaron 200.000 células por condición para la realización del experimento, incluyendo un control negativo que no se incubó con el anticuerpo primario para la troponina. Este control se utilizó para ajustar la configuración del citómetro y evaluar la unión inespecífica del anticuerpo secundario. A continuación, se incubaron durante 15 minutos con el Kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD™ Fixable azul, para excitación por luz ultravioleta (UV) (Invitrogen, L23105) a una dilución 1:100. Este paso permitió determinar la viabilidad de las células antes de la fijación y la permeabilización, para lo que se utilizó el kit Intracell (Immunostep), que permite el marcaje de proteínas intracelulares, como la cTnT. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario cTnT (tabla 2) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Alexa Fluor-488-conjugated Goat Anti-mouse (tabla 5) a una dilución de 1:500 durante 30 minutos. Finalmente, las células se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer (Invitrogen, 00-4222-26).

Las células fueron analizadas utilizando el citómetro de flujo LSR Fortessa™ X-20. Primero, se identificó la población celular y se excluyeron los restos celulares mediante el análisis de forward versus side scatter (FSC vs SSC). A continuación, se utilizó la intensidad de fluorescencia del Kit de tinción de células muertas para identificar la población de células muertas. Estas fueron excluidas del cálculo del porcentaje de células que expresaban cTnT, basado en la intensidad de fluorescencia del anticuerpo secundario. Se consideraron exitosas las diferenciaciones en las que más del 80% de las células mostraban expresión de cTnT.

2.4. Ensayo de inmunofluorescencia

Los iPSC-CM se levantaron el día 33 de diferenciación y se sembraron en medio de soporte 30.000 células por pocillo en placas de 8 pocillos con fondo de cristal (Ibidi, 80827) previamente recubiertas con Matrigel, tal y como se indica en el apartado 2.1.1. *Preparación Matrigel*. Tras 24 horas de

incubación, se eliminó el medio de soporte y se añadió medio de mantenimiento. Tras la siembra, se dejaron crecer durante 72 horas, y se fijaron con paraformaldehído en PBS al 4% durante 15 minutos. Posteriormente, se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS y se realizó una permeabilización y bloqueo simultáneos durante 30 minutos a temperatura ambiente en Tritón X-100 al 0,1%, BSA al 1% y FBS al 5% en PBS. Los anticuerpos primarios (tabla 1) se incubaron durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Tras ello, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios correspondientes (tabla 2) a una dilución 1:2000 durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Los núcleos se detectaron con el colorante DAPI (Stem Cell, 75004). Las imágenes se tomaron utilizando un microscopio confocal Leica TSC SP8 equipado con un microscopio invertido (DMI8; Leica) y un objetivo HC PL APO 63x de aceite de inmersión. Para la cuantificación de las imágenes 2D obtenidas se utilizó el software CellProfiler. Se diseñó un flujo de trabajo esquemático para reconocer automáticamente los núcleos marcados con DAPI en el canal azul y las células completas basadas en la fluorescencia en el canal verde. A partir de los objetos reconocidos como células se midió la intensidad media de cada célula.

2.5. RT-qPCR

A partir del pellet celular recogido se realizó una extracción de RNA total usando el miRVANA™ miARN Isolation Kit (Invitrogen, AM1560), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, primero se lisa la muestra en una solución de lisis desnaturalizante que estabiliza el ARN e inactiva las RNAsas. A continuación, el lisado se extrae una vez con ácido-fenol, eliminando la mayoría de los demás componentes celulares y dejando una muestra de ARN semipura. Seguidamente, se añade etanol a las muestras proporcionar las condiciones de unión ideales y se carga el lisado sobre un filtro de fibra de vidrio que permite la inmovilización del RNA y la eliminación de contaminantes mediante lavados. Por último, el ARN puro concentrado se eluyó en la solución de elución proporcionada por el kit y la concentración se midió en el espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop One/One^c (Thermo Fisher Scientific).

Posteriormente, el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, 4368814) se utilizó para la síntesis de ADNc a partir de 200 ng de ARN.

Se diseñaron *primers* específicos para cada gen (tabla 3), incluyendo GAPDH que fue utilizado como control housekeeping. El tamaño específico de banda de cada amplicón se verificó mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa, confirmando asimismo la presencia de una banda única.

Las PCRs cuantitativas (qPCR) se realizaron con el kit SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, K0222), en un volumen de reacción total de 10 µl. Cada reacción contenía 5 µl de SYBR Green; 0,3 µl de cada uno de los cebadores (concentración de stock: 10 µM); 3,4 µl de agua libre de RNAsas; y 1 µl del producto de la RT-PCR. El programa utilizado fue el siguiente: hold stage para evitar contaminaciones de ARN y activar la polimerasa (50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos); PCR stage (40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 58°C durante 1 minuto); melting curve stage para comprobar que el amplicón era único (95°C durante 15 segundos, 58°C durante 1 minuto; y 95°C durante 15 segundos).

Todas las reacciones qPCR se realizaron por triplicado y se normalizaron con respecto al gen GAPDH como gen de control endógeno. La expresión relativa de cada muestra se calculó mediante el método comparativo delta-delta CT ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

2.6. Western blot

En primer lugar, para el Western blot se realizó una extracción de proteína total con tampón de lisis RIPA [150 mM cloruro de sodio, 1% Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0] suplementado con inhibidores de proteasas (Roche, 05892970001) y de fosfatasas (Roche, PHOSS-RO). Para ello, los precipitados de las líneas celulares recogidos se lavaron con D-PBS, y se resuspendieron en 125 µl del tampón de lisis. A continuación, las muestras se mantuvieron en hielo durante 30 minutos, mezclándolas con el vortex cada 5 minutos. Después, las muestras se sometieron a ciclos de congelación en nitrógeno líquido seguidos de descongelación en hielo, durante dos veces consecutivas. Finalmente, se centrifugaron a 4°C durante 20 minutos a máxima velocidad y se recogió el sobrenadante. Los extractos proteicos se cuantificaron utilizando el kit Pierce™ BCA (Thermo Fisher Scientific, 23225).

Para la electroforesis, se utilizó el sistema Miniprotein Electroforesis System (BioRad). Se usaron geles de poliacrilamida al 8% y el tampón 10X Tris/Glycine/SDS (BioRad, 1610772) preparado al 1X con agua destilada. Para cargar el gel, 30 µg de proteínas se resuspendieron en tampón de carga de proteínas 5x [Tris-HCl 250 mM pH 6.8, SDS 10% (p/v), azul de bromofenol 0,5% (p/v), glicerol 50% (v/v) y DTT 500 mM], que fueron posteriormente desnaturalizadas mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos. La electroforesis se llevó a cabo en dos fases: una primera fase de entrada y concentración de muestras en el gel a un voltaje constante de 120 V, seguida de una segunda fase de separación de proteínas a 200 V constantes.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) durante 3 horas a 100 V constantes y 4°C, utilizando tampón de transferencia 10X Tris/Glicina (BioRad, 1610771) diluido a 1X con adición de 20% (v/v) de metanol. Para verificar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana, se tiñeron las membranas con solución de rojo Ponceau [Ponceau S 0,1% (p/v), ácido acético 5% (v/v)] durante 5 minutos. Después, se lavaron las membranas con agua destilada y se bloquearon con solución de bloqueo [BSA 5% en TBS-T 0,1%] durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C y en agitación con los anticuerpos primarios (tabla 1). Al día siguiente, después de tres lavados con TBS-T 0.1%, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron otros tres lavados con TBS-T 0.1%, y las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema de detección ECL Plus Western Blotting (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las imágenes se capturaron en el lector ChemiDoc (BioRad), y la densitometría se llevó a cabo utilizando el software Fiji/ImageJ. Para cada muestra y proteína, la señal se normalizó respecto a la señal de GAPDH correspondiente, y se calculó el porcentaje de expresión con respecto a la media de las muestras control, considerada como el 100% de expresión.

2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism versión 8 (GraphPad Software). En primer lugar, se verificó que cada grupo de datos siguieran una distribución normal mediante el test de normalidad de Shapiro-Wilk. De no rechazarse la hipótesis de normalidad, se aplicó el F-test para evaluar la homogeneidad de las varianzas entre grupos.

Para los datos que cumplieran ambos criterios, normalidad y homocedasticidad, se llevó a cabo el estadístico t de Student para comparar variables continuas entre grupos. En el caso de que no se cumplieran las condiciones para realizar pruebas paramétricas, se utilizó la prueba de Mann-Whitney.

Los datos se presentan como media \pm SEM. Las diferencias se consideraron significativas cuando el p-valor fue inferior a 0,05, lo cual se indica en las figuras como “*”, mientras que un p-valor inferior a 0,01 se indica como “**”, y uno inferior a 0,001 como “***”. Los valores exactos del p-valor aparecen en el Anexo I de Anexos.

RESULTADOS

1. Diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos

Para la diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos se emplearon la línea FRDA1 y la línea control. Las líneas de iPSC ya habían sido expandidas en cultivo y se había comprobado previamente la expresión de marcadores de pluripotencia mediante RT-qPCR e inmunofluorescencia antes de iniciar las diferenciaciones. Ambas líneas presentaban un ritmo de crecimiento similar, por lo que se sembró la misma densidad de células tanto para el pase como para la diferenciación.

La principal manifestación de la patología cardíaca en la FRDA es la hipertrofia de la pared ventricular izquierda; por lo tanto, se seleccionaron los cardiomiocitos ventriculares para modelar la enfermedad.

Un esquema del protocolo de diferenciación puede encontrarse en la figura 6, y el protocolo detallado en el apartado 2.2. *Diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos* de Materiales y Métodos. Tras la siembra, las iPSC se dejaron crecer durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, a día 0 del protocolo de diferenciación, se comprobó la confluencia de los cultivos, pues es imprescindible que el cultivo cubra al menos el 90% de la superficie disponible para iniciar el protocolo de diferenciación.

En la figura 7 puede observarse el seguimiento de los cultivos a diferentes días del proceso de diferenciación a cardiomiocitos. A partir del día 8, se empezaron a observar pequeñas áreas de cardiomiocitos latiendo. Para el día 12-14, si la diferenciación había sido exitosa, el latido era generalizado en todo el pocillo. El día 16 se inició la maduración de los cardiomiocitos mediante la inhibición de la ruta de mTOR y los experimentos se realizaron a partir del día 33.

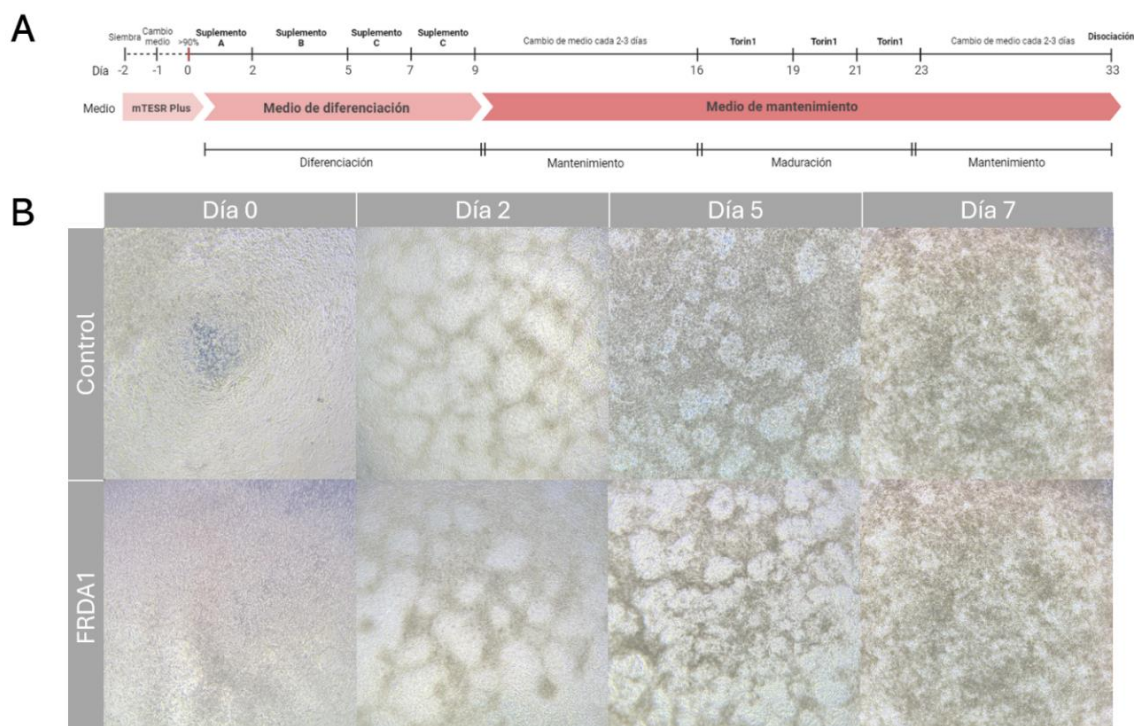


Figura 7. Seguimiento del proceso de diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos. A) Esquema del protocolo de diferenciación a cardiomiocitos. B) Morfología celular del cultivo a día 0, 2, 5 y 7 tomadas mediante microscopio invertido. Objeto: 10X.

En el QR pueden observarse los iPSC-CM latiendo en cultivo a día 30 de diferenciación.



2. Caracterización de los cardiomiocitos

2.1. Cálculo del porcentaje de cardiomiocitos obtenidos mediante citometría de flujo

Para verificar que la diferenciación se había llevado a cabo de manera exitosa, se cuantificó mediante citometría de flujo el porcentaje de células obtenidas que expresaban la troponina T cardíaca (cTnT), marcador cardíaco indicativo de una correcta diferenciación (figura 8). La troponina T cardíaca (cTnT) es una proteína de unión a la tropomiosina en el tejido cardíaco y juega un papel clave en la regulación de la contracción muscular. La detección de cTnT se utiliza para evaluar el grado de desarrollo de los cardiomiocitos y, en la práctica clínica, también sirve como un indicador de daño cardíaco.

Se llevaron a cabo seis experimentos de diferenciación independientes. De estos, se obtuvieron cinco diferenciaciones exitosas a partir de la línea FRDA1 y cuatro de la línea control, todas con un porcentaje de troponina mayor al 80%. Las diferenciaciones restantes fueron descartadas por no alcanzar el umbral mínimo de troponina necesario para confirmar que las células obtenidas correspondían efectivamente a cardiomiocitos.

Cabe destacar que en las diferenciaciones en las que no se alcanzó el porcentaje mínimo de troponina, no se observó la aparición del latido alrededor del día 8, como era de esperar, ni al término del proceso de diferenciación. Esto sugiere que la ausencia de latido puede ser un indicador temprano del éxito o fracaso de la diferenciación, permitiendo evaluar el proceso antes de su conclusión.

Las diferenciaciones exitosas fueron seleccionadas para continuar con los experimentos posteriores, asegurando así la validez de los resultados obtenidos.

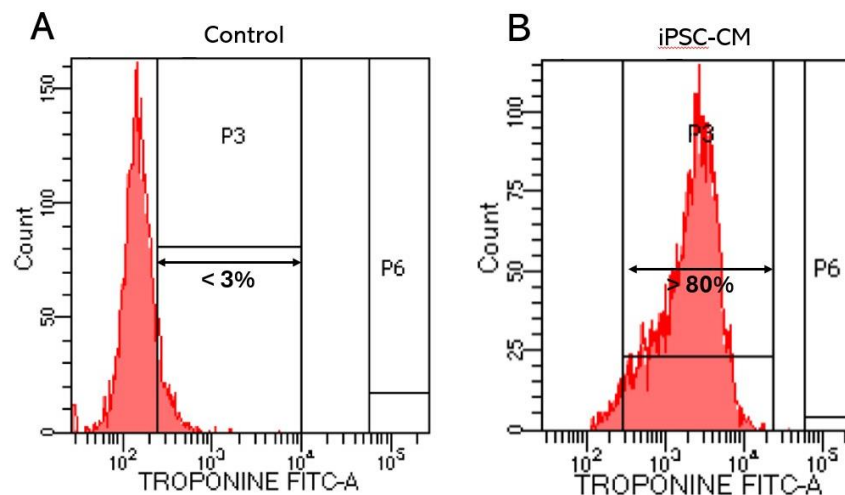


Figura 8. Análisis representativo de la expresión de troponina cardíaca (cTnT) por citometría de flujo. A) Muestras usadas como control. B) Muestras de iPSC-CM. La diferenciación se considera eficiente cuando al menos el 80% de los iPSC-CM son positivos para la cTnT.

2.2. Comprobación de la expresión de marcadores cardíacos mediante inmunofluorescencia

De igual manera, para verificar que la diferenciación se había llevado a cabo correctamente, se confirmó la expresión de marcadores cardíacos en los iPSC-CM mediante inmunofluorescencia: α -actinina, GATA-4 y troponina T cardíaca (cTnT).

La α -actinina es una proteína de unión a la actina que se encuentra formando el sarcómero, concretamente se localiza en la línea Z. Su expresión aumenta a medida que progresa la diferenciación de manera que sirve como marcador del grado de diferenciación y maduración de los cardiomiocitos, ya que se expresa débilmente en los estadios iniciales del desarrollo y se incrementa junto con otros componentes esenciales del sarcómero como actina, miosina y tropomiosina.

GATA-4 es un factor de transcripción con localización nuclear, crucial para la regulación de genes implicados en la diferenciación y función del miocardio. Promueve la diferenciación cardíaca al reclutar otros factores de transcripción y regular la expresión de genes necesarios para el desarrollo de los cardiomiocitos y la contracción muscular, además de reprimir genes que inducen destinos celulares alternativos.

La expresión de troponina cardíaca (cTnT) y del factor GATA-4 en los iPSC-CM obtenidos fue confirmada mediante inmunofluorescencia, observándose en la imagen el marcaje de los filamentos de actina donde permanece unida la cTnT y la colocalización de GATA-4 con marcaje nuclear realizado con DAPI (figura 9).

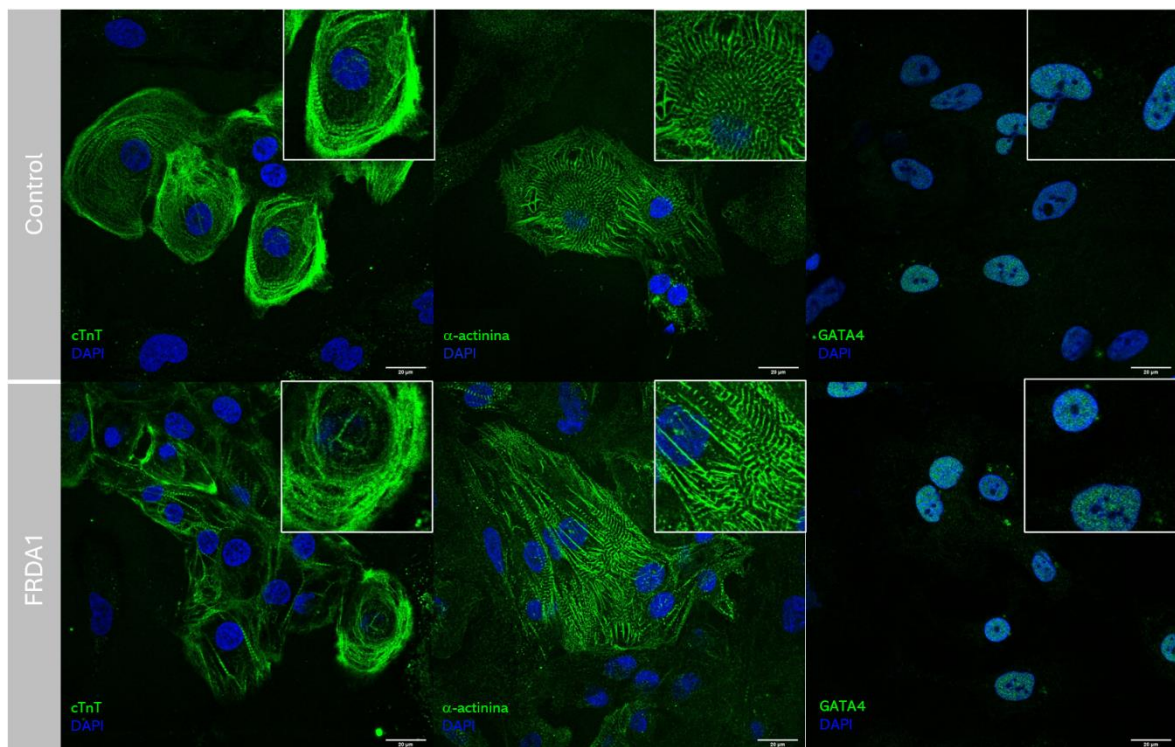


Figura 9. Confirmación de la expresión de marcadores cardíacos en los iPSC-CM mediante inmunofluorescencia. Inmunomarcaje de los marcadores cardíacos cTnT, α -actinina y GATA4, marcados en verde. Los núcleos se marcaron en azul con DAPI. La figura muestra la superposición de ambos canales. La barra de escala representa 20 μ m.

Sin embargo, durante el análisis del marcaje de α -actinina, se observó una variabilidad en la expresión: algunas células mostraron el patrón estriado característico de esta proteína al encontrarse formando las líneas Z de los sarcómeros, mientras que otras no presentaron tal estriación (figura 9). Es posible que las células en etapas diferentes de maduración muestren distintos niveles de organización de los filamentos de actina, lo cual influye en la visualización del patrón estriado. Además, la presencia de subpoblaciones con distintos grados de maduración o la heterogeneidad en la eficiencia de la diferenciación de las iPSCs y en la formación de sarcómeros funcionales podría contribuir a esta variabilidad en el marcaje de α -actinina.

2.3. Cuantificación de la expresión de marcadores cardíacos mediante RT-qPCR

Para verificar que la población de cardiomiocitos obtenida en la diferenciación se correspondía con cardiomiocitos ventriculares, como se indica en el kit de diferenciación, se analizó la expresión de los marcadores cardíacos *MYL7* y *MYL2* a día 16 y día 33 de la diferenciación.

MYL7 codifica la isoforma atrial de la cadena ligera reguladora de miosina (MLC2a). Su expresión es más prominente en los cardiomiocitos auriculares, pero también se observa en etapas tempranas del desarrollo cardíaco en otras regiones del corazón, lo que la convierte en un marcador clave durante las fases iniciales de la cardiogénesis. *MYL2* codifica la isoforma ventricular de la cadena ligera reguladora de miosina 2 (MLC2v), siendo un indicador crucial de la diferenciación de cardiomiocitos hacia el linaje ventricular.

Mediante RT-qPCR se cuantificó la expresión de los genes *MYL7* y *MYL2* en los iPSC-CM (figura 10), comparando su expresión con las líneas de iPSC a partir de las cuales se habían diferenciado, y que fueron usadas como control negativo de expresión de marcadores cardíacos.

La expresión relativa de cada muestra se calculó mediante el método comparativo delta-delta CT ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), comparando la expresión de los cardiomiocitos obtenidos frente a las iPSCs de partida. El gen *GAPDH* fue utilizado como control interno para la normalización de los niveles de ARNm de cada muestra.

Se observó una sobreexpresión significativa del gen *MYL2* en ambas líneas de iPSC-CM a día 33 respecto a día 16, mientras que las diferencias no llegan a alcanzar la significancia en el caso del gen *MYL7*, posiblemente por la variabilidad de los resultados y el tamaño muestral ($n=3$) (figura 10).

El ratio *MYL2/MYL7*, que es un indicador clave de la maduración del tejido cardíaco, muestra un incremento notable en ambas líneas celulares. Sin embargo, el cambio relativo en la expresión (fold change) es significativamente menor de lo esperado ($MYL2/MYL7 = 9.8$, Proyecto Encode), ya que la expresión de *MYL7* es considerablemente superior a la de *MYL2*. El incremento observado en el ratio *MYL2/MYL7* a día 30, en comparación con el día 16, indica un avance en la maduración de los cardiomiocitos. *MYL2*, típicamente asociado con cardiomiocitos más maduros, presenta una expresión relativa inferior en comparación con *MYL7*, más vinculado a los estadios tempranos del desarrollo cardíaco. Esto sugiere que las células podrían no haber alcanzado un estado completo de maduración.

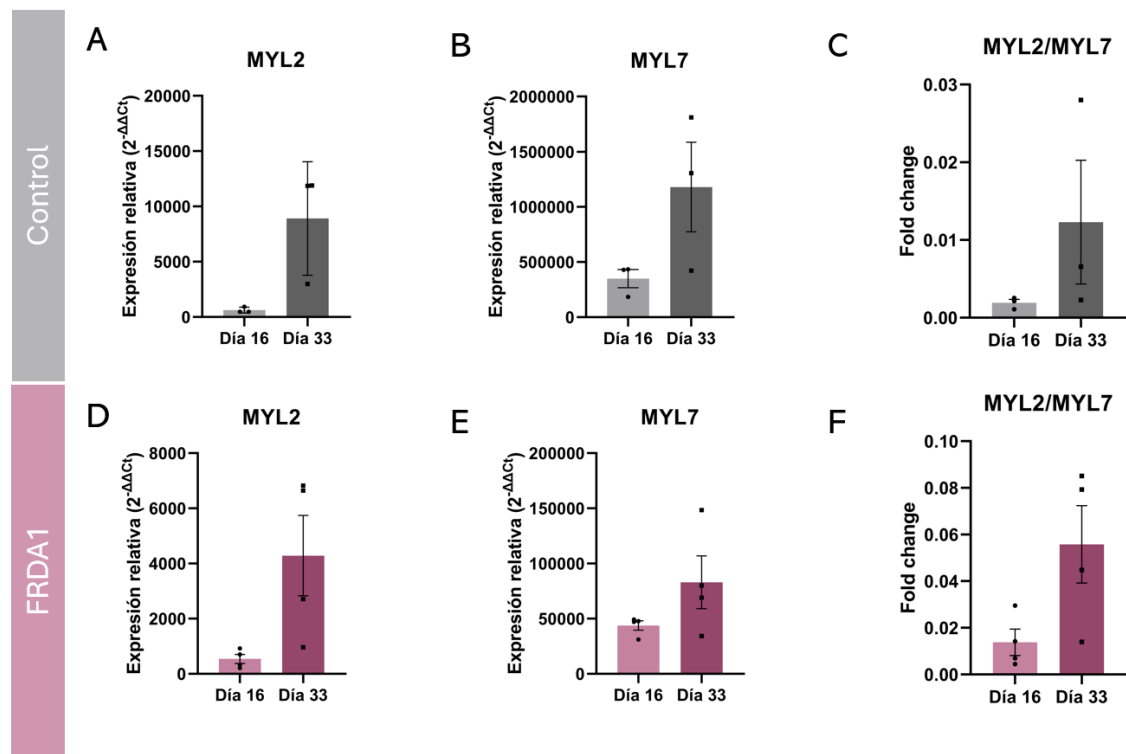


Figura 10. Cuantificación de la expresión de marcadores cardíacos mediante RT-qPCR. A) Cuantificación de la expresión de los genes cardíacos *MYL2* y *MYL7* mediante RT-qPCR y del ratio *MYL2/MYL7*. Los resultados se muestran como la media±SEM de los niveles de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de los iPSC-CM comparados con las iPSC de partida. A-C) iPSC-CM de la línea control. D-F) iPSC-CM de la línea FRDA1. Los resultados se relativizaron frente a la expresión del gen *GAPDH* (n=3 experimentos de diferenciación independientes; *p<0,05).

3. Cuantificación de la expresión de dianas de miRNA

En resultados anteriores del grupo, se determinó una firma de miARNs sobreexpresados en pacientes FRDA, que posteriormente confirmamos en el modelo de iPSCs-CM FRDA. Se realizó una selección de genes diana de dichos miRNAs para cuantificar su expresión por RT-qPCR, inmunofluorescencia indirecta y Western blot. El filtro aplicado fue genes que tuvieran relación con la homeostasis del calcio, dada la importancia de este proceso en el acoplamiento excitación-contracción.

El miR-142-3p presenta como diana el gen *ATP2A2*, que codifica la bomba ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA2), que secuestra el Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el interior del retículo sarcoplásmico durante la fase de relajación muscular, reduciendo así la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma (Morlà et al., 2007).

También se cuantificó la expresión de *CACNA1C* y *CALHM5*, ambos diana del miR-323a-3p. Por su parte, el gen *CACNA1C* codifica la subunidad α_{1C} del canal de calcio $Ca_v1.2$, un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje perteneciente a la familia de canales tipo L (LTCC). Este canal está ubicado en la membrana del cardiomiocito y juega un papel crucial en la entrada de Ca^{2+} al interior celular en respuesta a la despolarización de la membrana (Shaw y Colecraft, 2013). El gen *CALHM5* codifica un canal iónico que forma parte de una familia de canales dependientes de voltaje. Estos canales se activan en respuesta a la despolarización de la membrana o a una disminución en la concentración

de Ca^{2+} extracelular, lo que permite la entrada de Ca^{2+} al citosol. Esta función es crucial para diversas respuestas celulares, incluyendo la regulación de procesos de señalización intracelular y la homeostasis de calcio (Ma et al., 2016).

Para la cuantificación la expresión de las dianas seleccionadas mediante RT-qPCR se disponía de material genético de iPSC-CM de la línea FRDA1 y FRDA2. Se diseñaron cebadores que amplificaran específicamente los genes de interés (tabla 3). A continuación, se realizó una extracción de ARN, y una RT-qPCR mediante el sistema SYBR/Green, tal como se ha explicado previamente en el apartado 2.2.7. *RT-qPCR*. La expresión de las líneas de FRDA en cada caso se relativizó frente a la línea control y los niveles de expresión se normalizaron frente a la expresión del gen endógeno *GAPDH*.

3.1. CACNA1C

En los resultados de qPCR obtenidos, los iPSC-CM de las líneas FRDA1 y control muestran una alta variabilidad en los datos de expresión de *CACNA1C*. En la línea FRDA2, aunque se detectó una reducción en la expresión de *CACNA1C*, esta disminución no alcanzó significancia estadística, probablemente debido a la variabilidad (figura 11A). La alteración en la expresión de este canal puede influir en la fuerza de contracción de los iPSC-CM y contribuir en la aparición de arritmias cardíacas (Zaveri et al., 2023).

Para corroborar los resultados anteriores, se realizó un Western blot para cuantificar la expresión de la subunidad α_{1C} del canal de calcio $\text{Ca}_v1.2$, la proteína codificada por *CACNA1C*. Las intensidades de banda se cuantificaron mediante densitometría (figura 11B). Se observan dos bandas correspondientes a diferentes isoformas generadas por empalme alternativo. Tras la cuantificación, se detectó una sobreexpresión del canal en las muestras de FRDA1 en comparación con las muestras control, lo cual es inconsistente con los resultados obtenidos a nivel de ARNm.

La discrepancia entre niveles bajos de mRNA y niveles altos de proteína puede explicarse por varios mecanismos celulares interrelacionados. El mRNA podría estar siendo degradado rápidamente, mientras que la proteína resultante, debido a su mayor estabilidad, persiste en mayores cantidades. Este fenómeno puede ser exacerbado por una alta eficiencia en la traducción del mRNA en proteína, permitiendo que se produzca más proteína incluso a partir de menos mRNA. Adicionalmente, la regulación post-transcripcional y la estabilidad de la proteína juegan un papel crucial en este proceso, pudiendo contribuir a la acumulación de proteínas a pesar de los niveles reducidos de mRNA.

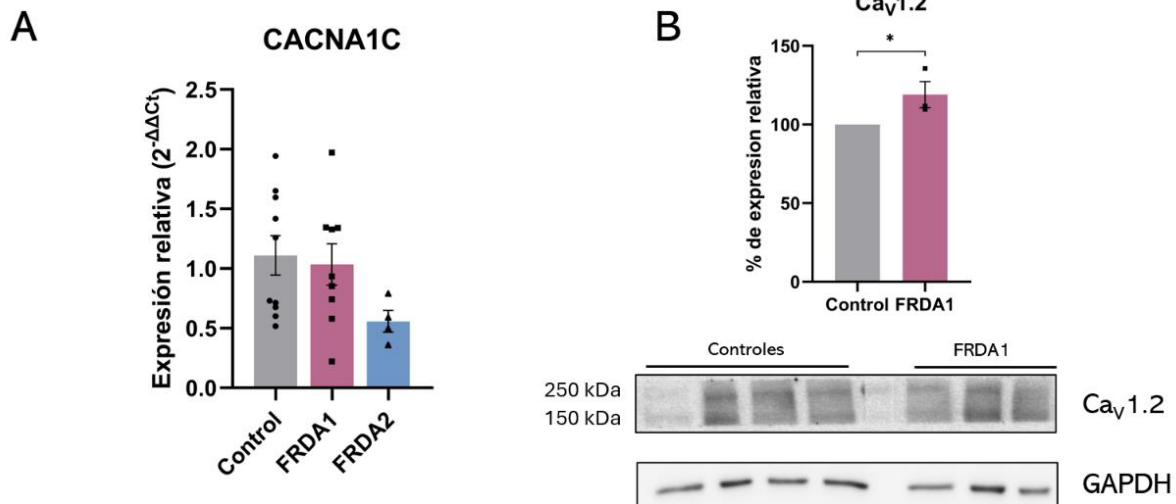


Figura 11. Cuantificación de la expresión del gen *CACNA1C*, diana del miR-323a-3p, en los iPSC-CM. A) Cuantificación mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de los niveles de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de los genes diana en los iPSC-CM de FRDA comparado con la línea control. Los resultados se normalizaron frente a la expresión del gen endógeno *GAPDH*. ($n \geq 3$ experimentos de diferenciación independientes; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). B) Cuantificación mediante Western blot. Niveles relativos de las proteínas de pacientes con respecto a controles sanos. Los resultados del Western blot se cuantificaron por densitometría. La intensidad de señal de la proteína de interés fue normalizada frente a la de *GAPDH*. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. (* $p \leq 0,05$; $n = 3-4$ experimentos de diferenciación independientes).

3.2. *SERCA2*

En cuanto a *ATP2A2*, en los resultados de la RT-qPCR se observó una disminución significativa en los niveles de expresión en ambas líneas de FRDA (figura 12A). La reducción de la expresión de *SERCA2* en los cardiomiocitos de FRDA1 se cuantificó también mediante *Western blot* (figura 12B), aunque en este caso no se alcanzó la significancia estadística.

Adicionalmente, se realizó un inmunomarcaje contra la proteína *SERCA2* en los iPSC-CM. Para ello, los iPSC-CM se levantaron a día 33 y se sembraron en placas IBIDI, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.6. *Ensayo de inmunofluorescencia* de Material y Métodos. Se observa la expresión de *SERCA2* con el patrón característico del retículo sarcoplásmico (figura 12C), y se aprecia una reducción significativa en la expresión de esta proteína en los iPSC-CM de FRDA en comparación con el control (figura 12D).

La reducción detectada podría implicar una disfunción en la capacidad del retículo sarcoplásmico para regular el Ca^{2+} intracelular, afectando negativamente la eficiencia del ciclo de contracción y relajación muscular. Dado que *SERCA2* es esencial para la recaptación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico durante la relajación, una expresión inferior de la misma puede contribuir a alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} , potencialmente causando disfunción contráctil y arritmias cardíacas en los pacientes con FRDA.

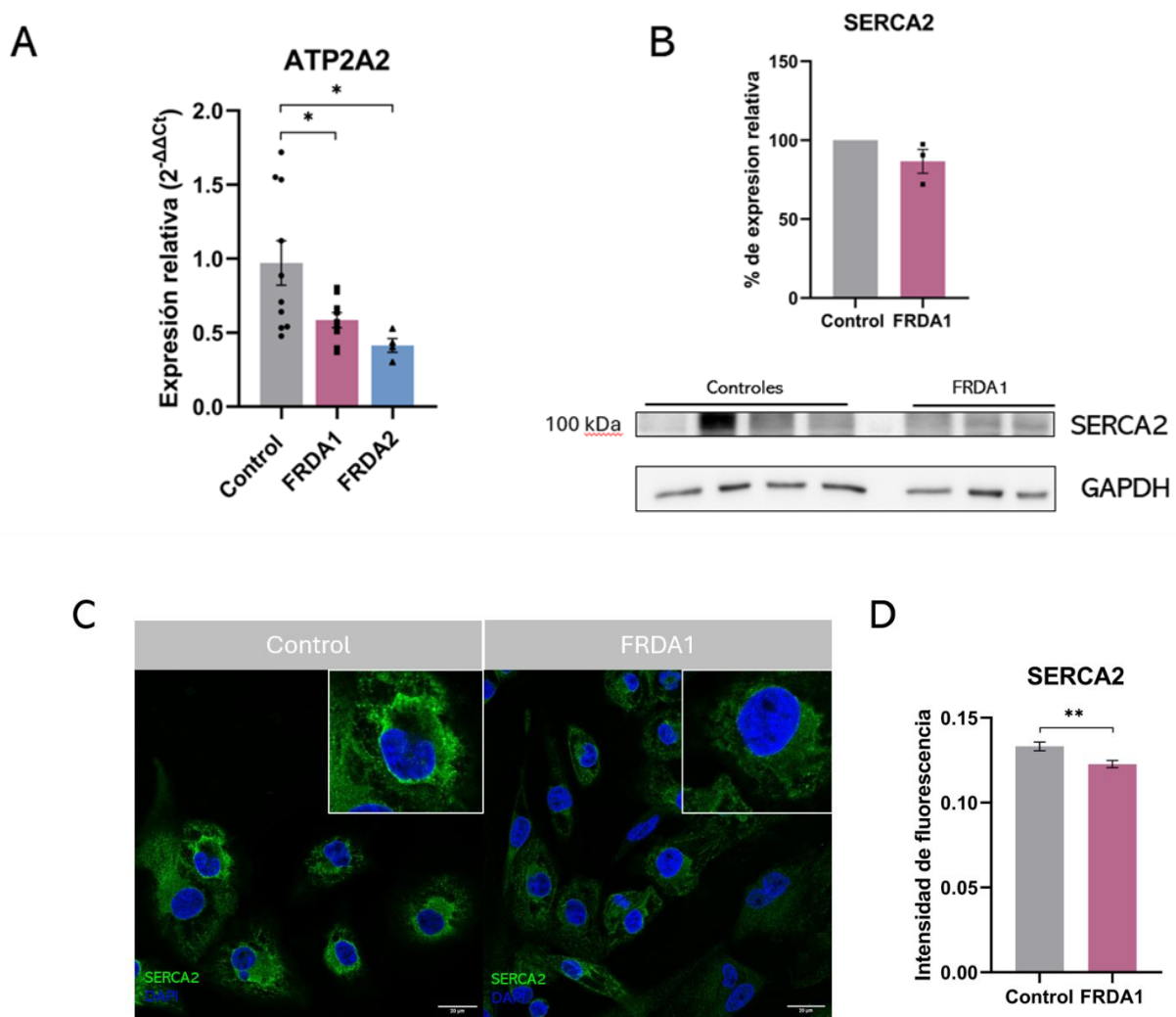


Figura 12. Cuantificación de la expresión del gen *SERCA2*, diana del miR-142-3p, en los iPSC-CM. A) Cuantificación mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de los niveles de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de los genes diana en los iPSC-CM de FRDA comparado con la línea control. Los resultados se normalizaron frente a la expresión del gen endógeno *GAPDH*. ($n \geq 3$ experimentos de diferenciación independientes; $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$). B) Cuantificación mediante Western blot. Niveles relativos de las proteínas de pacientes con respecto a controles sanos. Los resultados del Western blot se cuantificaron por densitometría. La intensidad de señal de la proteína de interés fue normalizada frente a la de *GAPDH*. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. ($*p \leq 0,05$; $n = 3-4$ experimentos de diferenciación independientes). C) Inmunomarcaje representativo de *SERCA2* en los iPSC-CM control y iPSC-CM de FRDA1. La imagen es la superposición del marcate de *SERCA2* (verde) y del núcleo (azul). La barra de escala es de 20 μ m. D) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del inmunomarcaje de *SERCA2* en iPSC-CM. Se cuantificaron un total de 344 células para los iPSC-CM control y 560 células para los iPSC-CM de FRDA1. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de la intensidad de fluorescencia de *SERCA2* en los iPSC-CM de FRDA comparado con la línea control ($**p \leq 0,01$).

3.3. CALHM5

Para el gen *CALHM5* se demostró una sobreexpresión muy marcada en la línea FRDA1 a nivel de ARNm (figura 13A). Por otro lado, en los resultados del Western blot apenas se detecta un cambio en la expresión proteica (figura 13B), lo que no concuerda con los resultados obtenidos en la RT-qPCR. Esto podría sugerir que la regulación post-traducciona está afectando la estabilidad o la existencia de problemas en la traducción que reducen la eficiencia de la traducción del ARNm en proteína, influyendo así en la cantidad detectable de *CALHM5* a nivel proteico, a pesar del aumento en los niveles de ARNm.

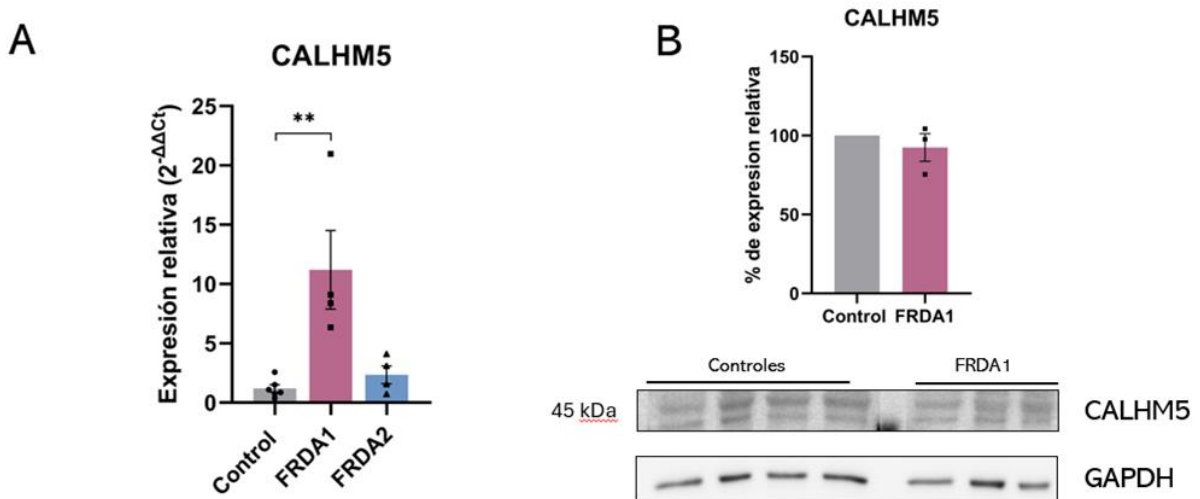


Figura 13. Cuantificación de la expresión del gen *CALHM5*, diana del miR-323a-3p, en los iPSC-CM. A) Cuantificación mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de los niveles de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de los genes diana en los iPSC-CM de FRDA comparado con la línea control. Los resultados se normalizaron frente a la expresión del gen endógeno *GAPDH*. ($n \geq 3$ experimentos de diferenciación independientes; $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$). B) Cuantificación mediante Western blot. Niveles relativos de las proteínas de pacientes con respecto a controles sanos. Los resultados del Western blot se cuantificaron por densitometría. La intensidad de señal de la proteína de interés fue normalizada frente a la de *GAPDH*. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. ($*p \leq 0,05$; $n = 3-4$ experimentos de diferenciación independientes).

Los resultados obtenidos revelan alteraciones en los niveles de expresión de genes clave para la homeostasis del Ca^{2+} en los iPSC-CM derivados de líneas FRDA. Estas alteraciones sugieren que el flujo intracelular de Ca^{2+} , un proceso esencial para una contracción muscular adecuada, podría estar comprometido en los pacientes con FRDA, lo cual puede afectar negativamente la funcionalidad de los cardiomiocitos y predisponer a disfunciones contráctiles y arritmias cardíacas.

DISCUSIÓN

1. Modelado de cardiomiopatías en iPSC-CMs

El uso de cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) representa una excelente herramienta alternativa para el estudio *in vitro* de las cardiomiopatías, superando las limitaciones asociadas con el acceso y la manipulación de los cardiomiocitos primarios. A pesar de que son genéticamente idénticos a las células primarias del paciente y replican algunas de las características básicas de los cardiomiocitos, los hiPSC-CMs presentan un grado de madurez comparable al de los cardiomiocitos fetales (Yang et al., 2014), lo que limita su capacidad para modelar con precisión enfermedades específicas del paciente.

Como resultado, los iPSC-CM exhiben un menor tamaño, un reducido desarrollo de la organización sarcomérica, latido espontáneo irregular, contractilidad reducida y un metabolismo predominantemente basado en la glicólisis, a diferencia del metabolismo de oxidación de ácidos grasos característico de los cardiomiocitos maduros (Guo y Pu, 2020).

Además, estos cardiomiocitos presentan una expresión disminuida de proteínas clave en la regulación del calcio, como SERCA2, RyR y fosfolambano. Presentan una ausencia de túbulos T, que provoca una falta de organización de los canales de calcio tipo L (LTCC), incrementando su distancia con los receptores de Rianodina (RyR), lo que reduce la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS) y aumenta la dependencia del Ca^{2+} que entra a través de los canales de tipo L para la contracción, resultando en una dinámica del calcio más lenta y un acoplamiento excitación-contracción anormal. También se observa una falta de desarrollo en la ultraestructura celular y en la relación entre el RS y las mitocondrias, resultando en un acoplamiento deficiente entre la contracción y la producción de energía (Zhang y Morad, 2016).

En nuestro modelo de iPSC-CM se observa una sobreexpresión de los genes *MYL7* y *MYL2*, que codifican la isoforma atrial y ventricular, respectivamente, de la cadena ligera reguladora de miosina, indicando un progreso en el estado de diferenciación a día 33 respecto a día 16. Sin embargo, muestran un ratio alterado de *MYL2/MYL7*, siendo el cambio relativo en la expresión (fold change) significativamente menor de lo esperado ($MYL2/MYL7 = 9.8$, Proyecto Encode). Esto se debe a que *MYL2*, típicamente asociado con cardiomiocitos de linaje ventricular, presenta una expresión relativa inferior en comparación con *MYL7*, que, si bien se expresa predominantemente en cardiomiocitos auriculares, también lo hace en estadios tempranos del desarrollo cardíaco, evidenciando una maduración deficiente de los iPSC-CM.

Este fenómeno se alinea con lo observado por Friedman et al. (2018), quienes identificaron que, en las primeras etapas de diferenciación, los cardiomiocitos derivados de iPSCs tienden a expresar tanto marcadores auriculares como ventriculares antes de alcanzar una especialización celular completa.

Por otro lado, en el inmunomarcaje de la α -actinina se detectó que algunas de las células marcadas no presentaban el patrón estriado característico de la proteína, que se localiza formando las líneas Z de los sarcómeros. Es posible que las células en etapas diferentes de maduración muestren distintos niveles de organización de los filamentos de actina, lo cual influye en la visualización del patrón estriado. Además, la presencia de subpoblaciones con distintos grados de maduración o la

heterogeneidad en la eficiencia de la diferenciación de las iPSCs y en la formación de sarcómeros funcionales podría contribuir a esta variabilidad en el marcaje de α -actinina.

En cardiomiocitos inmaduros, los sarcómeros no están completamente desarrollados, de manera que las líneas Z pueden no mostrarse bien definidas o alineadas. Diversas investigaciones han demostrado que estos cardiomiocitos muestran estructuras sarcoméricas incompletas o desorganizadas. Por ejemplo, Fenix et al. (2018) observaron que en cardiomiocitos derivados de células madre humanas, los filamentos de actina se organizan inicialmente en fibras de estrés muscular antes de formar sarcómeros completos, con la α -actinina apareciendo primero en puntos dispersos que eventualmente se alinean en las líneas Z durante el desarrollo sarcomérico. Asimismo, Prill et al. (2019) señalaron que proteínas esenciales para la formación del sarcómero, como la miomesina, se incorporan en etapas tardías del proceso de maduración, lo que sugiere que la falta de una estructura sarcomérica bien definida es un signo de inmadurez celular.

Para abordar la inmadurez presentada por los iPSC-CM, se han desarrollado múltiples métodos de maduración. Entre estos métodos se incluyen el cultivo a largo plazo (Sartiani et al., 2007; Lundy et al., 2013), la inducción bioquímica mediante hormonas y factores de crecimiento (Yoshida et al., 2018; Selvaraj et al., 2019), la modulación biofísica a través de estímulos mecánicos y optogenéticos, la generación de estructuras multicelulares en 3D y el uso de tejidos cardíacos bioingenierizados (EHT) (Tiburcy et al., 2017; Ronaldson-Bouchard et al., 2018; Ulmer et al., 2018). Cada una de estas estrategias busca emular las condiciones presentes en el entorno cardíaco adulto, promoviendo así la maduración de los hiPSC-CMs hacia un fenotipo más cercano al de los cardiomiocitos adultos.

El protocolo de diferenciación empleado en el estudio consta de dos fases: una inicial de diferenciación y una segunda de maduración. Durante la fase de maduración se adiciona al medio de cultivo un inhibidor de la vía de señalización mTOR (mammalian target of rapamycin). La vía mTOR actúa como un sensor de nutrientes, modulando la proliferación celular y actuando como un interruptor metabólico entre la glucólisis y la fosforilación oxidativa. Además, mTOR desempeña un papel crucial en la decisión de las células de entrar en quiescencia o senescencia al salir del ciclo celular. La detención del ciclo sin inhibición de mTOR lleva a la senescencia, mientras que su inhibición favorece la quiescencia, un estado asociado con la maduración celular. En este contexto, el tratamiento con Torin1, un inhibidor de mTOR, durante la fase tardía de diferenciación induce quiescencia celular, produciendo un aumento en la fuerza máxima relativa de contracción y una mayor tasa máxima de consumo de oxígeno en cardiomiocitos derivados de iPSC. Este efecto parece estar, al menos en parte, mediado por la sobreexpresión de p53, que puede inducir la quiescencia celular y regular el transcriptoma cardíaco (Garbern et al., 2020).

Recientemente, Gao et al. (2023), describieron un método de maduración empleando ácido ascórbico que demostró promover la diferenciación de los cardiomiocitos hacia linaje ventricular, aumentando asimismo la expresión de la proteína MLC2v. Este enfoque consiguió aumentar también la expresión de RyR y $Ca_v1.2$, ambas proteínas involucradas en la homeostasis del calcio y la excitación-contracción de los cardiomiocitos, de manera que resultaría interesante su implementación en futuros estudios centrados en la homeostasis del calcio.

Así pues, aunque se logró la diferenciación de las iPSCs en cardiomiocitos, es importante señalar que las condiciones de diferenciación utilizadas en este estudio no fueron las óptimas. La expresión alterada de marcadores clave y la inmadurez observada en la ultraestructura celular sugieren la

necesidad de optimizar las condiciones experimentales para alcanzar una maduración más completa de las células, lo que es crucial para su aplicación en estudios de fisiología cardíaca y modelado de enfermedades.

2. Impacto de la deficiencia de frataxina en la homeostasis del calcio

La homeostasis del Ca^{2+} en el cardiomiocito requiere una regulación minuciosa de las vías de entrada y salida de Ca^{2+} a través de la membrana, modulados por el potencial de membrana, junto con la captación y liberación de Ca^{2+} en el interior celular, principalmente mediadas por el RS. En este contexto, numerosos estudios han relacionado la deficiencia de frataxina con un desequilibrio en la regulación del calcio intracelular, sugiriendo que la frataxina desempeña un papel crucial en la homeostasis del calcio (Bolinches-Amorós et al., 2014; Mollá et al., 2017). Alteraciones en este equilibrio crítico pueden causar disfunciones significativas en la contracción y relajación del corazón, potencialmente resultando en insuficiencia cardíaca, como se ha descrito en modelos cardiacos de FRDA (Abeti et al., 2018; Crombie et al., 2017).

En un trabajo previo del laboratorio se demostró un incremento en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} intracelular en iPSC-CM de FRDA estimulados a 1 Hz, lo que indica que se produce o bien una mayor entrada de Ca^{2+} al citosol por los canales dependientes de voltaje de la membrana y/o bien una mayor salida de Ca^{2+} desde el RS.

Una de las dianas de los miRNAs sobreexpresados en los iPSC-CM de FRDA es *CACNA1C*, que codifica la subunidad α_{1C} del canal de calcio $\text{Ca}_v1.2$, un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje perteneciente a la familia de canales tipo L (LTCC). En nuestro modelo se observó una sobreexpresión de dicha proteína en una de las líneas de FRDA. La sobreexpresión de este canal podría provocar un incremento en la entrada de Ca^{2+} , pudiendo dar una explicación al aumento de la amplitud del transitorio.

Crombie et al. (2017) describieron en iPSC-CM derivados de pacientes de FRDA que la nifedipina, un inhibidor de canales de Ca^{2+} de membrana dependientes de voltaje, conseguía revertir el fenotipo de los iPSC-CM, incluidas las arritmias observadas en el modelo. Dado que nuestros resultados sugieren un aumento en la entrada de Ca^{2+} como un posible mecanismo de disfunción, resulta coherente que la nifedipina consiga mejorar la homeostasis del Ca^{2+} y pueda ser examinada como potencial agente terapéutico.

Crombie et al. (2017) también observaron una reducción en el contenido de Ca^{2+} del retículo en iPSC-CM de pacientes con FRDA, que fue confirmado por Abeti et al. (2018) en cardiomiocitos HL-1 deficientes en frataxina, sugiriendo que la disfunción de la bomba SERCA2 podría ser responsable de esta depleción del RS.

En nuestro modelo de iPSC-CM, se ha observado una reducción en la expresión del gen *ATP2A2*, que codifica SERCA2 y es diana de uno de los miARN sobreexpresados en FRDA, lo que apoya la implicación de SERCA2 en las alteraciones de la homeostasis del Ca^{2+} . Esto ha sido respaldado por el estudio de Czornobil et al. (2023), en el que se ha descrito una reducción en la expresión de la proteína en muestras de ventrículo humano de pacientes con FRDA. Además, se ha demostrado que niveles reducidos de ARNm de *ATP2A2* afectan la función cardíaca y están asociados con la hipertrofia cardíaca (Piacentino et al., 2003; Mercadier et al., 1990).

Así pues, un aumento en la entrada de Ca^{2+} al citosol, combinado con una reducción en la carga del RS, podría resultar en una acumulación de Ca^{2+} en el citosol. Este fenómeno ha sido documentado en varios modelos cardíacos. En un estudio de Kruger et al. (2016) en muestras cardíacas de pacientes con FRDA, se observó un aumento significativo en los niveles de calcio en la pared ventricular derecha, y se identificaron depósitos de Ca^{2+} en algunos cardiomiocitos de pacientes con cardiomiopatía severa por FRDA. Asimismo, en cardiomiocitos primarios derivados del modelo YG8R, la deficiencia de frataxina resultó en una reducción de calcio en el retículo sarcoplásmico y una respuesta mitocondrial ineficiente a las señales de liberación de calcio, lo que provocó una acumulación consiguiente en el citosol (Abeti et al., 2018).

La tercera de las dianas estudiadas, *CALHM5*, que codifica el miembro 5 de la familia de moduladores de la homeostasis del Ca^{2+} , se encuentra formando un poro en la membrana permitiendo así la entrada de iones Ca^{2+} en respuesta a la despolarización de la membrana (Ma et al., 2016). Si bien se mostraba una acusada sobreexpresión en la línea FRDA1 a nivel de ARNm, dicha sobreexpresión no se mantenía a niveles proteicos, evidenciando una posible disfunción en la traducción o una degradación acelerada de la proteína debido a la regulación postraduccional.

Con todo, en el modelo de iPSC-CM de FRDA se observa una disfunción en la homeostasis del Ca^{2+} , determinada en nuestro laboratorio *in vivo*, provocando alteraciones en el latido cardíaco y arritmias de tipo post-despolarizantes. En este proceso podrían intervenir las proteínas estudiadas en este trabajo, promoviendo la amplitud del transitorio de Ca^{2+} intracelular, lo que provocaría alteraciones en la contracción y relajación del corazón, contribuyendo a los síntomas típicos de la enfermedad, como la hipertrofia cardíaca, arritmias y eventualmente insuficiencia cardíaca severa.

CONCLUSIONES

1. El protocolo de diferenciación demuestra ser efectivo en la diferenciación de iPSCs a cardiomiocitos, pero los cardiomiocitos obtenidos exhiben inmadurez, reflejada en la alteración de la expresión de genes claves (*MYL2/MYL7*) y el subdesarrollo de estructuras celulares (sarcómero).
2. Los iPSC-CM de FRDA presentan un incremento en la expresión de la subunidad α_{1c} del canal de calcio $Ca_v1.2$, un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje perteneciente a la familia de canales tipo L. El gen *CACNA1C*, que codifica esta proteína, es diana del miR-323a-3p.
3. Los iPSC-CM de FRDA presentan una disminución en la expresión del gen *ATP2A2* que es diana del miR-142-3p, y de la proteína que codifica, SERCA2. Esto implica una disfunción en la capacidad del retículo sarcoplásmico para regular el Ca^{2+} intracelular, que podría explicar las arritmias descritas en el modelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abeti, R., Brown, A. F., Maiolino, M., Patel, S., & Giunti, P. (2018). Calcium Deregulation: Novel Insights to Understand Friedreich's Ataxia Pathophysiology. *Frontiers in cellular neuroscience*, *12*, 264. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00264>
- Apolloni, S., Milani, M., & D'Ambrosi, N. (2022). Neuroinflammation in Friedreich's Ataxia. *International journal of molecular sciences*, *23*(11), 6297. <https://doi.org/10.3390/ijms23116297>
- Bers D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, *415*(6868), 198–205. <https://doi.org/10.1038/415198a>
- Bidichandani, S. I., Ashizawa, T., & Patel, P. I. (1998). The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *American journal of human genetics*, *62*(1), 111–121. <https://doi.org/10.1086/301680>
- Bolinches-Amorós, A., Mollá, B., Pla-Martín, D., Palau, F., & González-Cabo, P. (2014). Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism. *Frontiers in cellular neuroscience*, *8*, 124. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00124>
- Bulteau, A. L., O'Neill, H. A., Kennedy, M. C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G., & Szweda, L. I. (2004). Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5681), 242–245. <https://doi.org/10.1126/science.1098991>
- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S. J., Faucheux, B., Trouillas, P., Authier, F. J., Dürr, A., Mandel, J. L., Vescovi, A., Pandolfo, M., & Koenig, M. (1997). Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Human molecular genetics*, *6*(11), 1771–1780. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.11.1771>
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M. D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Cañizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S. I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., De Frutos, R., ... Pandolfo, M. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science (New York, N.Y.)*, *271*(5254), 1423–1427. <https://doi.org/10.1126/science.271.5254.1423>
- Chase, A., & Orchard, C. H. (2011). Ca efflux via the sarcolemmal Ca ATPase occurs only in the t-tubules of rat ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *50*(1), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.10.012>
- Child, J. S., Perloff, J. K., Bach, P. M., Wolfe, A. D., Perlman, S., & Kark, R. A. (1986). Cardiac involvement in Friedreich's ataxia: a clinical study of 75 patients. *Journal of the American College of Cardiology*, *7*(6), 1370–1378. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(86\)80159-0](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(86)80159-0)
- Cnop, M., Igoillo-Esteve, M., Rai, M., Begu, A., Serroukh, Y., Depondt, C., Musuaya, A. E., Marhfour, I., Ladrière, L., Moles Lopez, X., Lefkaditis, D., Moore, F., Brion, J. P., Cooper, J. M., Schapira, A. H., Clark, A., Koeppen, A. H., Marchetti, P., Pandolfo, M., Eizirik, D. L., ... Féry, F. (2012). Central role and mechanisms of β -cell dysfunction and death in friedreich ataxia-associated diabetes. *Annals of neurology*, *72*(6), 971–982. <https://doi.org/10.1002/ana.23698>

- Crombie, D. E., Curl, C. L., Raaijmakers, A. J., Sivakumaran, P., Kulkarni, T., Wong, R. C., Minami, I., Evans-Galea, M. V., Lim, S. Y., Delbridge, L., Corben, L. A., Dottori, M., Nakatsuji, N., Trounce, I. A., Hewitt, A. W., Delatycki, M. B., Pera, M. F., & Pébay, A. (2017). Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes display electrophysiological abnormalities and calcium handling deficiency. *Aging*, *9*(5), 1440–1452. <https://doi.org/10.18632/aging.101247>
- Czornobil, R., Abou-Assali, O., Remily-Wood, E., Lynch, D. R., Noujaim, S. F., & Chidipi, B. (2023). The Cardiac Calcium Handling Machinery is Remodeled in Friedreich's Ataxia. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2023.11.09.566141. <https://doi.org/10.1101/2023.11.09.566141>
- De Michele, G., Perrone, F., Filla, A., Mirante, E., Giordano, M., De Placido, S., & Campanella, G. (1996). Age of onset, sex, and cardiomyopathy as predictors of disability and survival in Friedreich's disease: a retrospective study on 119 patients. *Neurology*, *47*(5), 1260–1264. <https://doi.org/10.1212/wnl.47.5.1260>
- Delatycki, M. B., & Bidichandani, S. I. (2019). Friedreich ataxia- pathogenesis and implications for therapies. *Neurobiology of disease*, *132*, 104606. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104606>
- Delatycki, M. B., Paris, D. B., Gardner, R. J., Nicholson, G. A., Nassif, N., Storey, E., MacMillan, J. C., Collins, V., Williamson, R., & Forrest, S. M. (1999). Clinical and genetic study of Friedreich ataxia in an Australian population. *American journal of medical genetics*, *87*(2), 168–174. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19991119\)87:2<168::aid-ajmg8>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19991119)87:2<168::aid-ajmg8>3.0.co;2-2)
- Delatycki, M. B., Williamson, R., & Forrest, S. M. (2000). Friedreich ataxia: an overview. *Journal of medical genetics*, *37*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.1.1>
- Deutsch, E. C., Santani, A. B., Perlman, S. L., Farmer, J. M., Stolle, C. A., Marusich, M. F., & Lynch, D. R. (2010). A rapid, noninvasive immunoassay for frataxin: utility in assessment of Friedreich ataxia. *Molecular genetics and metabolism*, *101*(2-3), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.07.001>
- Di Maio, A., Karko, K., Snopko, R. M., Mejía-Alvarez, R., & Franzini-Armstrong, C. (2007). T-tubule formation in cardiomyocytes: two possible mechanisms?. *Journal of muscle research and cell motility*, *28*(4-5), 231–241. <https://doi.org/10.1007/s10974-007-9121-x>
- Dürr, A., Cossee, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., Penet, C., Mandel, J. L., Brice, A., & Koenig, M. (1996). Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *The New England journal of medicine*, *335*(16), 1169–1175. <https://doi.org/10.1056/NEJM199610173351601>
- Dürr, A., Cossee, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., Penet, C., Mandel, J. L., Brice, A., & Koenig, M. (1996). Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *The New England journal of medicine*, *335*(16), 1169–1175. <https://doi.org/10.1056/NEJM199610173351601>
- Fenix, A. M., Neining, A. C., Taneja, N., Hyde, K., Visetsouk, M. R., Garde, R. J., Liu, B., Nixon, B. R., Manalo, A. E., Becker, J. R., Crawley, S. W., Bader, D. M., Tyska, M. J., Liu, Q., Gutzman, J. H., & Burnette, D. T. (2018). Muscle-specific stress fibers give rise to sarcomeres in cardiomyocytes. *eLife*, *7*, e42144. <https://doi.org/10.7554/eLife.42144>
- Friedman, C. E., Nguyen, Q., Lukowski, S. W., Helfer, A., Chiu, H. S., Miklas, J., Levy, S., Suo, S., Han, J. J., Osteil, P., Peng, G., Jing, N., Baillie, G. J., Senabouth, A., Christ, A. N., Bruxner, T. J., Murry, C. E., Wong, E. S., Ding, J., Wang, Y., ... Palpant, N. J. (2018). Single-Cell Transcriptomic Analysis of Cardiac Differentiation from Human PSCs Reveals HOPX-Dependent Cardiomyocyte Maturation. *Cell stem cell*, *23*(4), 586–598.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.09.009>

- Fukuta, H., & Little, W. C. (2008). The cardiac cycle and the physiologic basis of left ventricular contraction, ejection, relaxation, and filling. *Heart failure clinics*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2007.10.004>
- Gao, Y., Su, L., Wei, Y., Tan, S., Hu, Z., Tao, Z., Kovalik, J. P., Soong, T. W., Zhang, J., Pu, J., & Ye, L. (2023). Ascorbic acid induces MLC2v protein expression and promotes ventricular-like cardiomyocyte subtype in human induced pluripotent stem cells derived cardiomyocytes. *Theranostics*, 13(11), 3872–3896. <https://doi.org/10.7150/thno.80801>
- Garbern, J. C., Helman, A., Sereda, R., Sarikhani, M., Ahmed, A., Escalante, G. O., Ogurlu, R., Kim, S. L., Zimmerman, J. F., Cho, A., MacQueen, L., Bezzerides, V. J., Parker, K. K., Melton, D. A., & Lee, R. T. (2020). Inhibition of mTOR Signaling Enhances Maturation of Cardiomyocytes Derived From Human-Induced Pluripotent Stem Cells via p53-Induced Quiescence. *Circulation*, 141(4), 285–300. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044205>
- Gibson, T. J., Koonin, E. V., Musco, G., Pastore, A., & Bork, P. (1996). Friedreich's ataxia protein: phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction. *Trends in neurosciences*, 19(11), 465–468. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)20054-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)20054-2)
- Gomez, D. F., Laperle, A., Lee, G., & Parker, J. E. (2020). Friedreich ataxia and cardiac calcium mishandling: Evidence from stem cells and animal models. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 145, 77-89. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.06.009>
- Gonzalez-Cabo, P., Ros, S., & Palau, F. (2010). Flavin adenine dinucleotide rescues the phenotype of frataxin deficiency. *PLoS one*, 5(1), e8872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008872>
- Gottesfeld J. M. (2019). Molecular Mechanisms and Therapeutics for the GAA·TTC Expansion Disease Friedreich Ataxia. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 16(4), 1032–1049. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00764-x>
- Guo, Y., & Pu, W. T. (2020). Cardiomyocyte Maturation: New Phase in Development. *Circulation research*, 126(8), 1086–1106. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315862>
- Hanson, E., Sheldon, M., Pacheco, B., Alkubeysi, M., & Raizada, V. (2019). Heart disease in Friedreich's ataxia. *World journal of cardiology*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.4330/wjc.v11.i1.1>
- Hewer, R. (1969). The heart in Friedreich's ataxia. *British Heart Journal*, 31(1), 5 LP - 14. <https://doi.org/10.1136/hrt.31.1.5>
- Hick, A., Wattenhofer-Donzé, M., Chintawar, S., Tropel, P., Simard, J. P., Vaucamps, N., ... & Puccio, H. (2013). Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *Disease Models & Mechanisms*, 6(3), 608-621. <https://doi.org/10.1242/dmm.010900>
- Ke, M., Ji, M., Wang, H., Yao, Y., Wu, Y., & Qi, N. (2020). Inhibition of Rho-associated protein kinase improves the survival of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes after dissociation. *Experimental and therapeutic medicine*, 19(3), 1701–1710. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8436>
- Khan, W., Corben, L. A., Bilal, H., Vivash, L., Delatycki, M. B., Egan, G. F., & Harding, I. H. (2022). Neuroinflammation in the Cerebellum and Brainstem in Friedreich Ataxia: An [18F]-FEMPA PET Study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 37(1), 218–224. <https://doi.org/10.1002/mds.28825>

- Klabunde, R. E. (2011b). Chapter 2. Electrical Activity of the Heart. In *Cardiovascular Physiology Concepts* - 2nd ed. (pp. 9-40). Wolters Kluwer
- Klabunde, R. E. (2011c). Chapter 3. Cellular Structure and Function. In *Cardiovascular Physiology Concepts* - 2nd ed. (pp. 41-59). Wolters Kluwer.
- Koeppen A. H. (2011). Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *Journal of the neurological sciences*, 303(1-2), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.01.010>
- Koeppen, A. H., Ramirez, R. L., Becker, A. B., Bjork, S. T., Levi, S., Santambrogio, P., Parsons, P. J., Kruger, P. C., Yang, K. X., Feustel, P. J., & Mazurkiewicz, J. E. (2015). The pathogenesis of cardiomyopathy in Friedreich ataxia. *PloS one*, 10(3), e0116396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116396>
- Kohl, P., & Noble, D. (2009). Systems biology and the virtual physiological human. *Molecular systems biology*, 5, 292. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.51>
- Kruger, P. C., Yang, K. X., Parsons, P. J., Becker, A. B., Feustel, P. J., & Koeppen, A. H. (2016). Abundance and Significance of Iron, Zinc, Copper, and Calcium in the Hearts of Patients With Friedreich Ataxia. *The American journal of cardiology*, 118(1), 127-131. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2016.04.024>
- Lange, S., Pinotsis, N., Agarkova, I., & Ehler, E. (2020). The M-band: The underestimated part of the sarcomere. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1867(3), 118440. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.02.003>
- Lapeña-Luzón, T. (2024). *Obtención y caracterización de un modelo de cardiomiocitos derivados de iPSC para el estudio de la cardiomiopatía en la ataxia de Friedreich* [Tesis doctoral, Universitat de València].
- Levick, J. R. (1991). Chapter 3. Cardiac excitation and contraction. In *An Introduction to Cardiovascular Physiology* (pp. 23-45). Butterworth & Co.
- Li, Y., Polak, U., Clark, A., Bhalla, A. D., Chen, Y., Mishra, R., & Napierala, M. (2019). Exome and RNA sequencing of Friedreich's ataxia iPSC-derived cardiomyocytes reveal aberrant regulation of transcriptional and splicing networks related to RNA processing. *Human Molecular Genetics*, 28(9), 1628-1643. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy438>
- Lundy, S. D., Zhu, W. Z., Regnier, M., & Laflamme, M. A. (2013). Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem cells and development*, 22(14), 1991-2002. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0490>
- Ma, Z., Tanis, J. E., Taruno, A., & Foskett, J. K. (2016). Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 468(3), 395-403. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1757-6>
- Ma, Z., Tanis, J. E., Taruno, A., & Foskett, J. K. (2016). Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 468(3), 395-403. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1757-6>
- Marmolino D. (2011). Friedreich's ataxia: past, present and future. *Brain research reviews*, 67(1-2), 311-330. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2011.04.001>

Martelli, A., Wattenhofer-Donzé, M., Schmucker, S., Bouvet, S., Reutenauer, L., & Puccio, H. (2007). Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Human molecular genetics*, 16(22), 2651–2658. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm163>

Martini, F. H., Timmons, M. J., & Tallitsch, R. B. (2009). *Human anatomy* (6th ed.). Pearson Benjamin Cummings.

Mercadier, J. J., Lompré, A. M., Duc, P., Boheler, K. R., Fraysse, J. B., Wisnewsky, C., Allen, P. D., Komajda, M., & Schwartz, K. (1990). Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *The Journal of clinical investigation*, 85(1), 305–309. <https://doi.org/10.1172/JCI114429>

Mollá, B., Muñoz-Lasso, D. C., Riveiro, F., Bolinches-Amorós, A., Pallardó, F. V., Fernandez-Vilata, A., de la Iglesia-Vaya, M., Palau, F., & Gonzalez-Cabo, P. (2017). Reversible Axonal Dystrophy by Calcium Modulation in Frataxin-Deficient Sensory Neurons of YG8R Mice. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 264. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00264>

Morlà, M., Iglesias, A., Sauleda, J., Cosio, B., Agusti, A., & Busquets, X. (2007). Disminución de la expresión de la bomba de calcio sarcoplásmica (SERCA2) en el músculo esquelético de pacientes con EPOC y bajo peso corporal. **Archivos de Bronconeumología*, 43*, 4–8. <https://doi.org/10.1157/13096994>

Ohshima, K., Montermini, L., Wells, R. D., & Pandolfo, M. (1998). Inhibitory effects of expanded GAA.TTC triplet repeats from intron I of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 273(23), 14588–14595. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14588>

Pandolfo M. (2002). Frataxin deficiency and mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion*, 2(1-2), 87–93. [https://doi.org/10.1016/s1567-7249\(02\)00039-9](https://doi.org/10.1016/s1567-7249(02)00039-9)

Pandolfo, M., & Pastore, A. (2009). The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *Journal of neurology*, 256 Suppl 1, 9–17. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-1003-2>

Park, S., Kim, D., Jung, Y. G., & Roh, S. (2015). Thiazovivin, a Rho kinase inhibitor, improves stemness maintenance of embryo-derived stem-like cells under chemically defined culture conditions in cattle. *Animal reproduction science*, 161, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.003>

Pastore, A., & Puccio, H. (2013). Frataxin: a protein in search for a function. *Journal of neurochemistry*, 126 Suppl 1, 43–52. <https://doi.org/10.1111/jnc.12220>

Perdomini, M., Hick, A., Puccio, H., & Pook, M. A. (2013). Animal and cellular models of Friedreich ataxia. *Journal of neurochemistry*, 126 Suppl 1, 65–79. <https://doi.org/10.1111/jnc.12219>

Piacentino, V., 3rd, Weber, C. R., Chen, X., Weisser-Thomas, J., Margulies, K. B., Bers, D. M., & Houser, S. R. (2003). Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circulation research*, 92(6), 651–658. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000062469.83985.9B>

Prill, K., Carlisle, C., Stannard, M., Windsor Reid, P. J., & Pilgrim, D. B. (2019). Myomesin is part of an integrity pathway that responds to sarcomere damage and disease. *PloS one*, 14(10), e0224206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224206>

- Rajagopalan, B., Francis, J. M., Cooke, F., Korlipara, L. V., Blamire, A. M., Schapira, A. H., Madan, J., Neubauer, S., & Cooper, J. M. (2010). Analysis of the factors influencing the cardiac phenotype in Friedreich's ataxia. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, *25*(7), 846–852. <https://doi.org/10.1002/mds.22864>
- Reetz, K., Dogan, I., Hohenfeld, C., Didszun, C., Giunti, P., Mariotti, C., Durr, A., Boesch, S., Klopstock, T., Rodríguez de Rivera Garrido, F. J., Schöls, L., Giordano, I., Bürk, K., Pandolfo, M., Schulz, J. B., & EFACTS Study Group (2018). Nonataxia symptoms in Friedreich Ataxia: Report from the Registry of the European Friedreich's Ataxia Consortium for Translational Studies (EFACTS). *Neurology*, *91*(10), e917–e930. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006121>
- Regner, S. R., Lagedrost, S. J., Plappert, T., Paulsen, E. K., Friedman, L. S., Snyder, M. L., Perlman, S. L., Mathews, K. D., Wilmot, G. R., Schadt, K. A., Sutton, M. S., & Lynch, D. R. (2012). Analysis of echocardiograms in a large heterogeneous cohort of patients with friedreich ataxia. *The American journal of cardiology*, *109*(3), 401–405. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.09.025>
- Ronaldson-Bouchard, K., Ma, S. P., Yeager, K., Chen, T., Song, L., Sirabella, D., Morikawa, K., Teles, D., Yazawa, M., & Vunjak-Novakovic, G. (2018). Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature*, *556*(7700), 239–243. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0016-3>
- Roth, G. M., Bader, D. M., & Pfaltzgraff, E. R. (2014). Isolation and physiological analysis of mouse cardiomyocytes. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (91), e51109. <https://doi.org/10.3791/51109>
- Sallé, L., & Brette, F. (2007). T-tubules: a key structure of cardiac function and dysfunction. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*, *100*(3), 225–230.
- Sartiani, L., Bettiol, E., Stillitano, F., Mugelli, A., Cerbai, E., & Jaconi, M. E. (2007). Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *25*(5), 1136–1144. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0466>
- Seco-Cervera, M., González-Rodríguez, D., Ibáñez-Cabellos, J. S., Peiró-Chova, L., González-Cabo, P., García-López, E., Vílchez, J. J., Sanz-Gallego, I., Pallardó, F. V., & García-Giménez, J. L. (2017). Circulating miR-323-3p is a biomarker for cardiomyopathy and an indicator of phenotypic variability in Friedreich's ataxia patients. *Scientific reports*, *7*(1), 5237. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04996-9>
- Selvaraj, S., Mondragon-Gonzalez, R., Xu, B., Magli, A., Kim, H., Lainé, J., Kiley, J., Mckee, H., Rinaldi, F., Aho, J., Tabti, N., Shen, W., & Perlingeiro, R. C. (2019). Screening identifies small molecules that enhance the maturation of human pluripotent stem cell-derived myotubes. *eLife*, *8*, e47970. <https://doi.org/10.7554/eLife.47970>
- Shaw, R. M., & Colecraft, H. M. (2013). L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. *Cardiovascular research*, *98*(2), 177–186. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt021>
- Solaro, R. J., & Rarick, H. M. (1998). Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circulation research*, *83*(5), 471–480. <https://doi.org/10.1161/01.res.83.5.471>

- Thompson, B. R., & Metzger, J. M. (2014). Cell biology of sarcomeric protein engineering: disease modeling and therapeutic potential. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 297(9), 1663–1669. <https://doi.org/10.1002/ar.22966>
- Tiburcy, M., Hudson, J. E., Balfanz, P., Schlick, S., Meyer, T., Chang Liao, M. L., Levent, E., Raad, F., Zeidler, S., Wingender, E., Riegler, J., Wang, M., Gold, J. D., Kehat, I., Wettwer, E., Ravens, U., Dierickx, P., van Laake, L. W., Goumans, M. J., Khadjeh, S., ... Zimmermann, W. H. (2017). Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and Repair. *Circulation*, 135(19), 1832–1847. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024145>
- Tsou, A. Y., Paulsen, E. K., Lagedrost, S. J., Perlman, S. L., Mathews, K. D., Wilmot, G. R., Ravina, B., Koeppe, A. H., & Lynch, D. R. (2011). Mortality in Friedreich ataxia. *Journal of the neurological sciences*, 307(1-2), 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.05.023>
- Ulmer, B. M., Stoehr, A., Schulze, M. L., Patel, S., Gucek, M., Mannhardt, I., Funcke, S., Murphy, E., Eschenhagen, T., & Hansen, A. (2018). Contractile Work Contributes to Maturation of Energy Metabolism in hiPSC-Derived Cardiomyocytes. *Stem cell reports*, 10(3), 834–847. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.01.039>
- Wong, A. O., Wong, G., Shen, M., Chow, M. Z., Tse, W. W., Gurung, B., Mak, S. Y., Lieu, D. K., Costa, K. D., Chan, C. W., Martelli, A., Nabhan, J. F., & Li, R. A. (2019). Correlation between frataxin expression and contractility revealed by in vitro Friedreich's ataxia cardiac tissue models engineered from human pluripotent stem cells. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1305-y>
- Yang, X., Pabon, L., & Murry, C. E. (2014). Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circulation research*, 114(3), 511–523. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300558>
- Yoshida, S., Miyagawa, S., Fukushima, S., Kawamura, T., Kashiyama, N., Ohashi, F., Toyofuku, T., Toda, K., & Sawa, Y. (2018). Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes by Soluble Factors from Human Mesenchymal Stem Cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(11), 2681–2695. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.08.012>
- Zaveri, S., Srivastava, U., Qu, Y. S., Chahine, M., & Boutjdir, M. (2023). Pathophysiology of Ca_v1.3 L-type calcium channels in the heart. *Frontiers in physiology*, 14, 1144069. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1144069>
- Zhang, X. H., & Morad, M. (2016). Calcium signaling in human stem cell-derived cardiomyocytes: Evidence from normal subjects and CPVT afflicted patients. *Cell calcium*, 59(2-3), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.12.002>