



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Biotecnología

Diseño y optimización de biomodelos para el estudio de la  
sepsis

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Biomédica

AUTOR/A: Dolz Andrés, Enric

Tutor/a: Sirera Pérez, Rafael

Cotutor/a externo: GARCIA GIMENEZ, JOSE LUIS

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## Máster Universitario en Biotecnología Biomédica



### Diseño y optimización de biomodelos para el estudio de la sepsis

Trabajo Fin de Máster (TFM)

Autor

Enric Dolz Andrés

Directores

José Luis García Giménez

Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA

Facultad de Medicina i Odontología Departamento de Fisiología

Tutor académico

Rafael Sirera Pérez

Curso académico 2022/2023

València, septiembre 2023

## ÍNDICE

Resumen .....	1
Abstract .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1. Células madre pluripotentes inducidas humanas.....	7
3.1.1 Descongelación de las células madre pluripotentes inducidas humanas .....	7
3.1.2. Cultivo y mantenimiento de las células madre pluripotentes inducidas humanas.....	9
3.2. Generación de los biomodelos.....	11
3.2.1. Generación y caracterización del modelo de cardiomiocitos .....	11
3.2.2. Generación de organoides de riñón .....	20
3.3. Purificación de las histonas extracelulares .....	23
3.3.1. Cultivo de células HeLa .....	23
3.3.2. Extracción ácida de histonas.....	25
3.3.3. Cuantificación de las histonas por el método de Bradford .....	26
3.4. Tratamiento de los cardiomiocitos con histonas extracelulares .....	27
3.4.1 Estudio de la citotoxicidad mediante el ensayo MTT .....	27
3.4.2 Estudio de la viabilidad y muerte celular por citometría de flujo.....	28
3.4.3 Extracción y cuantificación de ARN del cultivo de cardiomiocitos.....	29
3.4.4 Realización de RT-PCR y PCR cuantitativa para el análisis de expresión diferencial de genes.....	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	34
4.1 Extracción y cuantificación de histonas .....	34
4.2 Confluencia celular adecuada para el cultivo de células madre .....	35
4.3 Generación de cardiomiocitos y ensayos de citotoxicidad .....	36
4.3.1 Seguimiento mediante imágenes tomadas por microscopía óptica del proceso de diferenciación de las células iPSCs humanas a cardiomiocitos maduros .....	36
4.3.2 Caracterización mediante inmunofluorescencia .....	38
4.3.3 Caracterización mediante detección de troponina por citometría de flujo .....	40
4.3.4 Evaluación de la citotoxicidad por ensayo del MTT .....	42
4.3.5 Ensayos de citotoxicidad celular con histonas: anexina-V/yoduro de propidio .....	44
4.3.6 Análisis de la expresión génica de IL- $\alpha$ , IL- $\beta$ e IL-18 en los cardiomiocitos tras el tratamiento citotóxico con histonas .....	46
4.3.7 Análisis de la expresión génica de GPX1, Catalasa, SOD1 y SOD2 en los cardiomiocitos tras el tratamiento citotóxico con histonas .....	47
4.4 Seguimiento del crecimiento y desarrollo de los organoides de riñón mediante microscopía óptica .....	49
5. CONCLUSIONES.....	51
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52

## Resumen

La sepsis es una condición sistémica grave causada por una respuesta exagerada del sistema inmunitario frente a una infección, en la que se liberan numerosas citoquinas inflamatorias provocando la desregulación del organismo, dañando tejidos, órganos y en última instancia la muerte. Las histonas tienen un papel importante en el desarrollo de la sepsis, las células de la inmunidad innata, principalmente los macrófagos y neutrófilos, liberan histonas al torrente sanguíneo por la formación de trampas extracelulares METs y NETs, respectivamente, con la finalidad de eliminar a los patógenos invasores y detener la infección. Pero también pueden contribuir a la progresión de la sepsis, actuando como patrones moleculares asociados a daño celular, DAMPs, provocando la liberación de citoquinas inflamatorias e induciendo a la aparición de procesos de muerte celular programada. Además, dentro de su capacidad citotóxica también provocan daño celular mediante la activación de estrés oxidativo. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de biomodelos en los que poder estudiar la sepsis e identificar nuevos biomarcadores con los que apoyar o mejorar los sistemas de diagnósticos actuales; como la sepsis es una afección principalmente sanguínea nos centraremos en el desarrollo de un biomodelo cardíaco y un organoide renal a partir de células madre pluripotentes inducidas humanas, iPSCs, en las que poder estudiar el efecto citotóxico de las histonas, así como la relevancia de las mismas en el desarrollo de esta condición fisiopatológica grave, para posteriormente poder identificar posibles biomarcadores y métodos de diagnóstico de la sepsis. El biomodelo cardíaco consistió en una monocapa de cardiomiocitos humanos maduros, los cuales se caracterizaron mediante la detección de expresión de troponina T cardíaca por citometría de flujo y por la detección de expresión de actinina- $\alpha$ , GATA-4 y la troponina T cardíaca mediante inmunofluorescencia, utilizando microscopía confocal. El biomodelo renal consistió en un organoide de riñón, y su desarrollo se siguió mediante la captación de imágenes mediante microscopía de campo claro utilizando el microscopio óptico. Se realizaron tratamientos con histonas extracelulares en el biomodelo cardíaco para analizar si al tratarlo con histonas extracelulares se producían mecanismos fisiopatológicos similares a los observados en la sepsis. Se realizó un ensayo de MTT para estudiar la viabilidad, se observó una disminución de la viabilidad dependiente de la dosis. A continuación, se llevó a cabo un análisis del tipo de muerte celular por citometría de flujo mediante detección de anexina-V y yoduro de propidio, observándose que la mayoría de las células morían por apoptosis primaria y secundaria. Centrándonos en la apoptosis secundaria, concretamente en la piroptosis debido a su asociación con la presencia de infección por patógenos externos y procesos inflamatorios, se analizaron las rutas de activación del inflammasoma canónica y no canónica mediante el análisis de la expresión génica de las interleucinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18 por PCR-cuantitativa; los resultados observados no indicaron un aumento de expresión de estas interleucinas. Al no poder confirmar la activación de piroptosis por esas rutas nos centramos en comprobar si el tratamiento con histonas extracelulares producía estrés oxidativo en los cardiomiocitos. Para ello analizamos mediante PCR-cuantitativa la expresión génica de enzimas antioxidantes, concretamente fueron las superóxido dismutasas SOD1 y SOD2, el glutatión peroxidasa 1, GPX1 y la catalasa, CAT. Los resultados obtenidos indicaron una disminución de la expresión de SOD2, por otro lado, se detectó un aumento significativo de catalasa, lo que sugiere una alteración del balance redox celular en los cardiomiocitos tras el tratamiento con las histonas extracelulares.

**Palabras clave:** Cardiomiocito, células madre pluripotentes inducidas, factores de diferenciación, organoide, histonas, sepsis, inflamación y apoptosis.

## Abstract

Sepsis is a severe systemic condition caused by an exaggerated immune system response to infection, in which numerous inflammatory cytokines are released causing dysregulation of the body, damaging tissues, organs and ultimately death. Histones play an important role in the development of sepsis, the cells of innate immunity, mainly macrophages and neutrophils, release histones into the bloodstream by the formation of extracellular traps METs and NETs, respectively, with the aim of eliminating invading pathogens and stopping the infection. But they can also contribute to the progression of sepsis, acting as cell damage-associated molecular patterns, DAMPs, triggering the release of inflammatory cytokines and inducing the onset of programmed cell death processes. In addition, within their cytotoxic capacity they also provoke cell damage through the activation of oxidative stress. The aim of this work was to develop biomodels in which to study sepsis and identify new biomarkers to support or improve current diagnostic systems; Since sepsis is mainly a blood disorder, we will focus on the development of a cardiac biomodel and a renal organoid from human induced pluripotent stem cells, iPSCs, in which to study the cytotoxic effect of histones, as well as their relevance in the development of this severe pathophysiological condition, in order to subsequently identify possible biomarkers and diagnostic methods for sepsis. The cardiac biomodel consisted of a monolayer of mature human cardiomyocytes, which were characterized by detection of cardiac troponin T expression by flow cytometry and by detection of actinin- $\alpha$ , GATA-4 and cardiac troponin T expression by immunofluorescence using confocal microscopy. The renal biomodel consisted of a kidney organoid, and its development was followed by image capture by bright-field microscopy using light microscopy. Extracellular histone treatments were performed on the cardiac biomodel to analyze whether treatment with extracellular histones produced physiopathological mechanisms similar to those observed in sepsis. An MTT assay was performed to study viability, a dose-dependent decrease in viability was observed. Next, an analysis of the type of cell death was performed by flow cytometry using annexin-V and propidium iodide detection, observing that most cells died by primary and secondary apoptosis. Focusing on secondary apoptosis, specifically pyroptosis due to its association with the presence of infection by external pathogens and inflammatory processes, canonical and non-canonical inflammasome activation pathways were analyzed by analyzing gene expression of interleukins IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-18 by quantitative PCR-quantitative; the results observed did not indicate increased expression of these interleukins. Since we were unable to confirm pyroptosis activation by these routes we focused on testing whether treatment with extracellular histones produced oxidative stress in cardiomyocytes. For this purpose, we analyzed by quantitative PCR the gene expression of antioxidant enzymes, specifically the superoxide dismutases SOD1 and SOD2, glutathione peroxidase 1, GPX1, and catalase, CAT. The results obtained indicated a decrease in the expression of SOD2, on the other hand, a significant increase in catalase was detected, suggesting an alteration of the cellular redox balance in cardiomyocytes after treatment with extracellular histones.

**Keywords:** Cardiomyocyte, induced pluripotent stem cells, differentiation factors, organoid, histones, sepsis, inflammation and apoptosis.

# 1. INTRODUCCIÓN

La sepsis se define como una condición sistémica grave y compleja causada por una respuesta exacerbada del sistema inmunitario frente a una infección, capaz de dañar los tejidos y órganos del paciente, causando disfunción orgánica y, en última instancia, la muerte. La sepsis puede avanzar a shock séptico, el cual se considera un subconjunto de la sepsis en el que las anomalías celulares, circulatorias y metabólicas son especialmente severas, asociándose con un mayor riesgo de mortalidad (1).

La incidencia mundial de la sepsis es de 48 millones de casos al año (2, 3), con una mortalidad de más de 11 millones de muertes al año en el mundo, de los cuales casi 3 millones son recién nacidos (4, 5); siendo una de las causas más frecuentes de muerte en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) de los hospitales (6). El coste económico de esta enfermedad supone más de 24.000 millones de dólares en Estados Unidos, y en Europa 7.600 millones de euros al año (7, 8, 9).

El tratamiento recomendado para la sepsis consiste en la administración de antibióticos con la mayor rapidez, a ser posible antes de las 6 horas tras la sospecha de la sepsis, para reducir al agente infeccioso inductor de la enfermedad, junto con el uso de vasopresores, reanimación con líquidos y técnicas de soporte vital durante el transcurso de la enfermedad (10), para intentar reducir el daño que puede provocar la sepsis en el paciente incluyendo daño cerebral, pulmonar, hepático, intestinal, renal y cardíaco.

La sepsis produce una respuesta inmunitaria exagerada en los pacientes, inducida inicialmente por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y por patrones moleculares asociados a daño celular (DAMP), los cuales pueden activar el sistema inmunitario innato del huésped uniéndose a los receptores de las células de este sistema (11, 12). La unión a los receptores causa la producción de numerosas citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, esta respuesta inflamatoria desemboca en una tormenta de citoquinas provocando una desregulación del organismo (13).

Las histonas extracelulares tienen un papel importante en el desarrollo de la sepsis, son liberadas al torrente sanguíneo con la finalidad de eliminar patógenos invasores y detener la infección (14). Esta liberación de histonas se produce principalmente por la activación de las células de la inmunidad innata, como son los macrófagos y los neutrófilos, mediante mecanismos conocidos como METs (en el caso de los macrófagos) y NETs (en el caso de los neutrófilos), creando una red pegajosa capaz de unirse los patógenos invasores y eliminarlos mediante efectos citotóxicos (15, 16).

Pero a su vez, estas moléculas liberadas desde las células inmunitarias actúan como DAMPs, activando procesos de inflamación mediados por el sistema inmune innato, lo que puede contribuir a la progresión de la sepsis (17, 18). Las histonas pueden inducir la liberación de citoquinas inflamatorias en las células de la inmunidad innata, principalmente mediante la liberación de citoquinas asociadas a la piroptosis como son la interleucina 1 (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) y la interleucina 18 (IL-18) provocando que se activen estos procesos de apoptosis en las células del organismo (19, 20), propagando la inflamación.

La piroptosis es un tipo de muerte celular programada estrechamente relacionada con la sepsis debido a que se produce principalmente como respuesta a la infección de patógenos. Este tipo de muerte celular inflamatoria se caracteriza por la activación del inflamasoma, activación de Caspasa 1 y liberación de citoquinas pro-inflamatorias (i.e. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18); y presenta características tanto de la apoptosis como de la necrosis (21, 22).

La piroptosis puede estar implicada en una gran variedad de enfermedades, como pueden ser enfermedades autoinmunes, inflamatorias, del sistema nervioso y cardiovasculares. Se desencadena principalmente por la activación del inflamasoma por la vía canónica y no canónica, por ejemplo, en los cardiomiocitos la formación del inflamasoma NLRP3 tiene la capacidad de inducir la piroptosis (23). La estimulación de canales de potasio

sensibles a ATP, la formación de poros por toxinas bacterianas, la desintegración lisosomal y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden inducir la activación del inflamasoma, dando lugar a la liberación de interleuquinas pro-inflamatorias, principalmente la IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  y IL-18 desencadenando en piroptosis (22).

En la vía canónica, las interleuquinas implicadas son las IL-1 $\beta$  e IL-18. Estas son liberadas por la activación del inflamasoma, previamente activado por la formación de un complejo macromolecular formado por tres componentes, entre los que se encuentran NLRP3 y la caspasa 1 (22).

La otra vía de señalización es la vía no canónica del inflamasoma, en la que actúan principalmente las interleuquinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, conllevando a la inflamación celular. En esta vía la caspasa 11 actúa junto a los componentes del inflamasoma NLRP3, induciendo la activación de IL-1 $\beta$ , IL-18, además, la caspasa 11 también está implicada en procesos de lisis celular y secreción de señales de peligro como la IL-1 $\alpha$ , dando lugar a la activación de un proceso inflamatorio (22).

Además, las histonas en sí mismas también tienen un papel importante en el desarrollo de las enfermedades relacionadas con la inflamación y la inmunosupresión, esto es porque la presencia de altas concentraciones de histonas extracelulares produce efectos citotóxicos en las células del individuo, principalmente mediante la activación de procesos de muerte celular por apoptosis (24, 25), causando daño a nivel sistémico y local en diferentes órganos.

Uno de los efectos que se producen en las células al estar expuestas a altas concentraciones de histonas extracelulares es la aparición de estrés oxidativo, desregulando la respuesta antioxidante celular. Un estrés oxidativo continuado puede inducir el desarrollo de una respuesta inflamatoria, disfunción mitocondrial y finalmente muerte celular, procesos implicados en la insuficiencia orgánica descritos en la sepsis (26).

Unas de las proteínas principales para la regulación del estrés oxidativo son la superóxido dismutasa 1 y 2 (SOD1 y SOD2), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa 1 (GPX1). La superóxido dismutasa (SOD) protege a la célula del daño producido por el superóxido, convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las tres diferentes variantes de la superóxido dismutasa se encuentran altamente compartimentadas, las SOD1 tiene una mayor localización en el citoplasma, la SOD2 en los espacios mitocondriales y la SOD3 se encuentra en los espacios extracelulares (27, 28).

Aguas abajo en la ruta, a nivel del peróxido del hidrógeno, actúan la catalasa y la glutatión peroxidasa 1, estas enzimas catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno a O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, y se localizan en las mitocondrias, citoplasma y membrana plasmática. La catalasa utiliza su grupo hemo para convertir el peróxido de hidrógeno en O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, por otro lado, la glutatión peroxidasa realiza la reducción del peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos de lípidos solubles mediante sus residuos de selenocisteína y cisteína y utilizando el glutatión, como agente que aporta el poder reductor. De esta manera al eliminar especies reactivas de oxígeno contribuyen a la preservación de la homeostasis redox celular, previniendo el daño oxidativo evitando la activación de las vías inflamatorias (29, 30).

Nuestro grupo estudia el efecto citotóxico de las histonas extracelulares utilizando diferentes biomodelos relacionados con el sistema cardiovascular, debido a que es el tejido con mayor exposición a las moléculas proinflamatorias circulantes. En estudios recientes se comprobó como la exposición a altas concentraciones de histonas provocaba en células endoteliales, la activación de procesos inflamatorios y muerte celular mediante apoptosis (31), autofagia (32) y piroptosis (33).

Además del tejido endotelial, nuestro grupo también ha publicado estudios sobre las consecuencias de la sepsis en el tejido cardiaco y renal, siendo el daño en estos tejidos muy frecuente en pacientes con sepsis (3, 34, 35, 36), y que pueden derivar en los pacientes supervivientes al desarrollo de patologías como la insuficiencia cardiaca, el infarto de miocardio, accidente cerebro vascular, revascularización coronaria y

fibrilación auricular; estas patologías cardiovasculares aumentan la tasa de mortalidad en los pacientes de sepsis.

En resumen, es fundamental poder detectar la sepsis en etapas tempranas para evitar su progresión hacia el daño multiorgánico. Además, como la sepsis es una enfermedad muy heterogénea que puede afectar a órganos y tejidos diversos es importante desarrollar un método para identificar los diferentes casos, de manera que se apliquen terapias más dirigidas, precisas y eficaces a los pacientes.

Nuestro grupo quiere desarrollar nuevos biomodelos con los que estudiar la sepsis e identificar nuevos biomarcadores con los que apoyar o mejorar los sistemas de diagnósticos actuales, para ello se quiere desarrollar un biomodelo cardíaco y un biomodelo renal, tejidos afectados en la sepsis. La finalidad de este trabajo es conseguir, a partir de células madre humanas, obtener un biomodelo cardíaco y renal, en los que poder comprobar si al igual que en el tejido endotelial las histonas producen un efecto citotóxico, para posteriormente poder identificar posibles biomarcadores y métodos de diagnóstico de la sepsis.



## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fin de máster es optimizar y poner a punto el diseño y protocolo para generar biomodelos en lo que poder estudiar la sepsis mediante la evaluación de la citotoxicidad mediada por las histonas extracelulares.

Para ello se han definido los siguientes objetivos específicos:

1. Cuantificar la concentración de histonas extraídas a partir de células HeLa.
2. Generar y caracterizar un biomodelo de cardiomiocitos.
  - 2.1 Diferenciar células madre IPSC a cardiomiocitos para obtener un modelo de estudio de la sepsis.
  - 2.2 Caracterizar mediante inmunofluorescencia y análisis de troponina por citometría.
  - 2.3 Comprobar el efecto citotóxico mediante MTT y analizar el tipo de muerte celular mediante detección de anexina yoduro por citometría al aplicar un tratamiento con histonas extracelulares.
  - 2.4 Estudiar el efecto de las histonas sobre de las rutas implicadas en la piroptosis y el estrés oxidativo mediante análisis de expresión génica
3. Generar y analizar el desarrollo de un biomodelo de organoide de riñón.
  - 3.2 Diferenciar células madre IPSC a organoide de riñón para obtener un modelo de estudio de la sepsis.
  - 3.3 Estudiar el crecimiento del biomodelo mediante observación en microscopio óptico.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Células madre pluripotentes inducidas humanas

##### 3.1.1 Descongelación de las células madre pluripotentes inducidas humanas

Para desarrollar los biomodelos se utilizan células madre pluripotentes inducidas humanas, iPSCs. Las iPSCs son células las cuales han pasado de manera artificial por un proceso de desdiferenciación, como resultado estas células han recuperado su capacidad pluripotente, por lo que son capaces de diferenciarse a un gran número de tipos celulares. En nuestro caso se han utilizado estas células para la generación de 2 biomodelos, el primero de ellos consistente en una monocapa de cardiomiocitos maduros funcionales, el segundo biomodelo consistirá en conseguir organoides con características funcionales de riñón.

El primer paso consistió en descongelar las iPSCs; las células estaban guardadas en un criopreservante consistente en 90% de suero bovino fetal inactivado con 10% DMSO, dentro del tanque de nitrógeno a -176°C para favorecer su conservación.

Para descongelar las células:

- Se extrajo el vial del tanque de nitrógeno
- Se introdujo 5 minutos en el incubador (Esco CelCulture® CO<sub>2</sub> Modelo: CCL-050B-8, Esco Lifesciences) en normoxia a una presión parcial del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C para que se descongelara el vial que contiene las células.
- Se resuspendieron las células contenidas en el criopreservante en 5 ml de medio DMEM F12 (ref: 31331028; Thermo Fisher Scientific; Paisley; Reino Unido) sin suplementar.

El medio DMEM F12 se utilizará como medio intermedio, es decir, no será el medio final en el que se cultiven las iPSCs, pero será muy útil para pasos intermedios del experimento, por ejemplo, para momentos en los que haya que recoger las células y después centrifugarlas para concentrarlas en un pellet; en los pasos en los que el medio únicamente se utiliza para recolectar células y se retira inmediatamente después se utilizará DMEM F12, en los momentos donde se vaya a utilizar medio para cultivar las células durante largos periodos de tiempo se utilizará el medio específico adecuado.

- Se pasó el contenido del criovial junto a los 5 ml de DMEM-F12 a un tubo de 15 ml
- Se centrifugó el tubo a 250 *xg* durante 5 minutos para concentrar las células en un pellet.
- Se retiró el medio DMEM F12 de manera que únicamente quedaron las células en el fondo del tubo.
- Se resuspendió el pellet de células en 1 ml de medio mTSER (ref: 100-0274; Stemcell Technologies; Estados Unidos) suplementado con Rock inhibitor Y-27632 (ref: 72304; Stemcell Technologies; Vancouver; Canadá), la proporción fue de 1 µl de Rock inhibitor por cada 1.000 µl de medio, dilución 1:1000.

Rock inhibitor, Y-27631, es un inhibidor selectivo competitivo de ATP de la proteína quinasa asociada a Rho llamada Rock (37). Se utiliza en neuronas o células madre pluripotentes derivadas principalmente de humanos, ratón, rata o primates no humanos, la función principal es mejorar la supervivencia celular de estas células. La exposición a Rock inhibitor produce un bloqueo de la apoptosis en las células madre embrionarias que se encuentran disociadas, aumenta la supervivencia y la eficiencia de clonación y no afecta a su capacidad de pluripotencia; además, mejora la tasa de supervivencia de las células embrionarias criopreservadas después de la descongelación y la supervivencia en monocapas celulares (38, 39).

Las células madre se expanden formando colonias, lo que es necesario para su supervivencia. Cuando se levantan las células para pasarlas a una placa de cultivo, en el proceso se disocian y separan las colonias de células madre. Se utilizará Rock inhibitor o la tiazovivina, a la hora de descongelar células y al hacer pases celulares para evitar que se activen procesos de muerte celular que deriven en apoptosis, además de para favorecer la formación de nuevas colonias, la supervivencia en monocapa, muy importante en las primeras fases de la diferenciación a cardiomiocitos y la adhesión de esas células tanto a la superficie del pocillo como entre ellas mismas. El Rock inhibitor solo se añade el día de descongelación o el día que se realice un pase celular, el resto de días que se lleve a cabo un cambio de medio se utilizará medio mTSER normal completo sin Rock inhibitor.

Por otro lado, el medio mTSER tiene sus propios suplementos, para hacer medio mTSER completo, se coge una botella de medio mTSER sin suplementar, 500 µl, y se añaden 100 µl del suplemento mTSER plus supplement y 2,5 ml de penicilina-estreptomicina (ref: 15140122; Invitrogen ThermoFisher Scientific; San Diego, CA; Estados Unidos) (*Tabla 1*).

**Tabla 1:** Volúmenes y cantidades de cada uno de los componentes del medio mTSER final.

Medio mTSER Completo	Proporción de suplementos adicionales
500 µl de medio	Rock inhibitor: 1 – 1.000
100 µl mTSER plus supplement	Tiazovivina: 2,6 – 13.000
2,5 ml penicilina-estreptomicina	

Las placas donde vamos a sembrar las células se tienen que preparar previamente para asegurar la viabilidad y estabilidad de las iPSCs. Las células madre pluripotentes inducidas son células muy sensibles que pueden morir con facilidad, tener más dificultades a la hora de adherirse a la superficie del pocillo o incluso pueden diferenciarse de manera no deseada, para evitar esto se utiliza Matrigel Matrix® (ref: 354277; Corning; New York; USA) y Rok inhibitor. El matrigel se añade a los pocillos de la placa mínimo 1 hora antes de que se vaya a sembrar las células, la función del Matrigel Matrix® es favorecer la viabilidad celular, principalmente, facilitando que las iPSCs se adhieran a la superficie del pocillo. Para preparar el recubrimiento de matrigel se utiliza el propio matrigel y se mezcla con la cantidad de medio DMEM-F12 correspondiente, la idea es poner en una placa de 6 pocillos la cantidad de matrigel y medio necesaria para que el volumen final de la mezcla sea de 1 ml por pocillo (*Tabla 2*). Una vez pasada la hora, se retira la solución con matrigel de los pocillos.

**Tabla 2:** volúmenes y contenido de Matrigel Matrix®

Medio DMEM-F12 (ml)	Matrigel Matrix® (µl)		
Proporción medio DMEM-F12 indicado por la casa comercial	Proporción Matrigel Matrix® indicada por la casa comercial		Cantidad total Matrigel Matrix®
25	300		5.000 (µl)
Volumen por alícuota	Volumen por alícuota	Número de alícuotas de Matrigel Matrix®	Cantidad de Matrigel Matrix® total por tipo de alícuota (µl)
12	144	11	1584
6	72	37	2664
3	36	20	720

- Se añadió 1 ml de Matrigel Matrix® a los pocillos de la nueva placa 1 hora antes de sembrar las células
- Se retiró el Matrigel Matrix®
- Se añadieron 2 ml de medio mTSER suplementado con Rock inhibitor dilución 1:1000, por pocillo de una placa de 6 pocillos
- Se cogieron las células resuspendidas en el tubo de 15 ml y se sembraron a una densidad celular de 100.000 células por pocillo.

Las células iPSCs en mantenimiento, es decir, en las que no se está realizando un proceso de diferenciación, se siembran y cultivan en placas de 6 pocillos, normalmente de un criovial se suelen sembrar y completar de 1 a 3 pocillos. Es muy importante realizar un cambio de medio al día siguiente porque no es bueno para las células que estén expuestas demasiado tiempo al Rock inhibitor.

- Se retiró el medio con Rock inhibitor a las 24 horas y se añadieron 2 ml de medio mTSER sin Rock inhibitor.

De esta manera se finalizó el proceso de descongelación de iPSC.

### **3.1.2. Cultivo y mantenimiento de las células madre pluripotentes inducidas humanas**

Una vez están las iPSCs en la placa de 6 pocillos lo suficientemente crecidas se realiza un pase celular. Se realiza un pase celular cada 2-3 días con una densidad celular de siembra de 150.000, 100.000 y 70.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos.

Para realizar el pase celular:

- Siguiendo las mismas indicaciones que en el proceso de descongelación, apartado 3.1.1, 1 hora antes de añadir las células hay que aplicar 1 ml de Matrigel Matrix® a los nuevos pocillos donde se vayan a sembrar las células.
- Se sacaron del incubador las placas de 6 pocillos con las células que se iban a pasar a nuevos pocillos;
- Se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con 1 ml de PBS estéril (ref: 09-9400-100; Medicago; Uppsala; Suecia) por pocillo.
- Se agregaron 300 µl de acutasa (ref: 07922; Stemcell Technologies; Vancouver BC; Canadá) y se incubó la placa durante 5-8 minutos en el incubador para levantar las células

La acutasa va a provocar que se eliminen las uniones celulares, tanto las uniones de las células con el material del pocillo, así como las uniones intercelulares, por lo que a partir de este paso pasaremos de tener iPSCs en colonias unidas a la placa a tener iPSCs sueltas y separadas.

- Se recogieron las células con 1-3 ml de medio DMEM-F12 y se pasaron a tubos de 15 ml.

Además de para recoger las células, el medio de cultivo tiene como segunda función neutralizar el efecto de la acutasa, una exposición prolongada a la acutasa puede provocar muerte celular.

- Se centrifugaron durante 5 minutos a 250 xg para obtener un pellet de células.

A partir de este punto se dejó de utilizar DMEM-F12 y se pasó a utilizar medio mTSER suplementado con tiazovivina (ref: 72254; Stemcell Technologies; Vancouver; Canadá). Como se ha comentado antes, la

tiazovivina funciona como inhibidor selectivo de la proteína quinasa asociada a Rho, ROCK que promueve la supervivencia de las células madre embrionarias durante la disociación y potencia los procesos de adhesión celular (40); se utilizará al realizar pases celulares de mantenimiento.

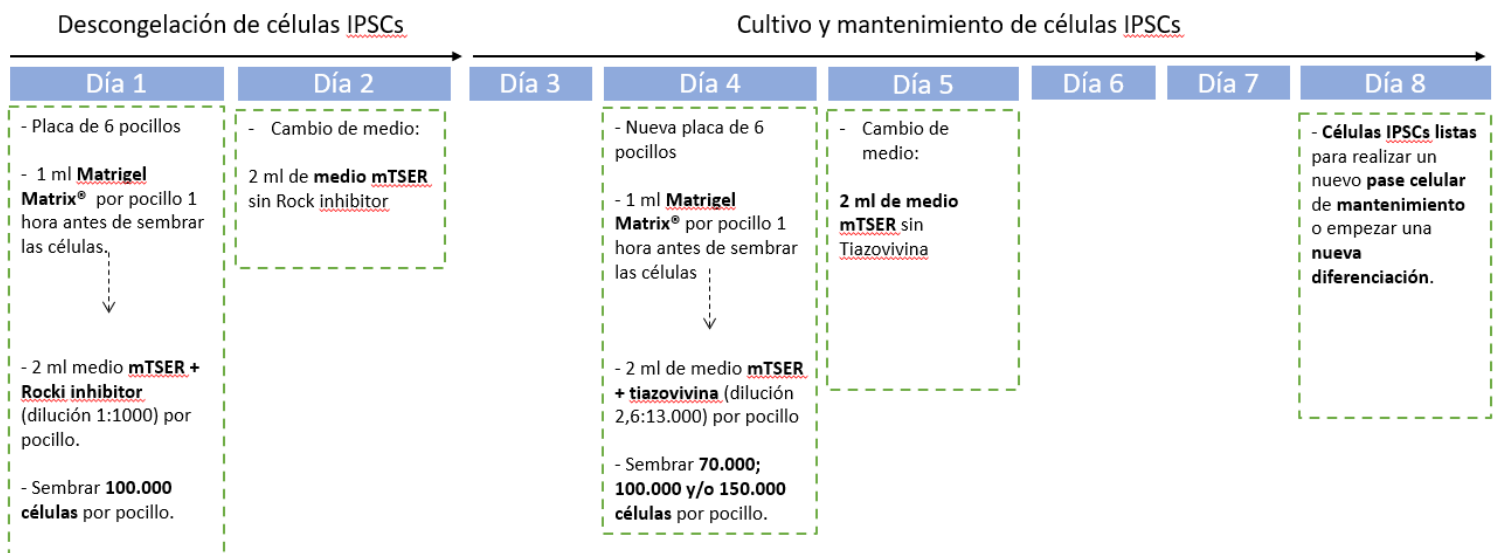
- Se suplementó tanto el medio en el que se iba a resuspender el pellet de células presente en el tubo de 15 ml como el medio que se añade previamente a los pocillos, siguiendo la proporción 2,6 µl de tiazovivina por cada 13.000 µl de medio mTSER.

- Se resuspendieron los pellets de células en 1 ml de medio mTSER suplementado con tiazovivina y se añadieron 2 ml de medio mTSER suplementado con tiazovivina a cada uno de los nuevos pocillos donde se iban a agregar las células.

- Una vez se resuspendió el pellet, se pasó a contar las células, haciendo una dilución 1/10 en un eppendorf. Para ello se mezclaron 45 µl de medio DMEM-F12 sin suplementar, 45 µl de azul tripano y 10 µl de medio mTSER con células, teniendo un volumen final de 100 µl. De ese volumen se cogieron 10 µl y se pasaron a una cámara Neubauer para realizar el conteo de células. Si se han seguido las proporciones indicadas, la fórmula para saber el número de células por ml contenidas en el tubo de 15 ml es la siguiente: número de células contadas \* 10 \* 10.000.

- Finalmente, se pusieron varias concentraciones de células para asegurar su supervivencia, las más utilizadas fueron 70.000, 100.000 y 150.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Es importante realizar un cambio de medio al día siguiente, retirar el medio mTSER con tiazovivina y añadir medio mTSER sin tiazovivina (Figura 1)

**ESQUEMA O CRONOGRAMA DEL CAMBIO DE MEDIO Y FACTORES, DESDE LA DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS IPSCS HASTA QUE ESTÁN LISTAS PARA LA DIFERENCIACIÓN**



**Figura 1:** Esquema de los diferentes procedimientos realizados desde que se descongelan las IPSCs hasta que están preparadas para empezar un nuevo proceso de diferenciación.

## 3.2. Generación de los biomodelos

### 3.2.1. Generación y caracterización del modelo de cardiomiocitos

#### 3.2.1.1 Diferenciación de las células madre pluripotentes inducidas humanas a cardiomiocitos

La diferenciación consta de dos fases, la primera tiene una duración de 20 días, empezando en el día -2 de la diferenciación y terminando el día 15. En esta primera fase las iPSCs pasarán a diferenciarse a cardiomiocitos fetales, a partir del día 15 ya se podrá empezar a detectar latido y las células podrán levantarse para realizar experimentos, el latido suele detectarse entre el día 15 y el día 20. La segunda fase empieza a partir del día 15 hasta el día 25, en esta segunda fase los cardiomiocitos fetales pasaran a ser cardiomiocitos maduros. En nuestro caso se levantarán las células para realizar los experimentos una vez lleguen al estadio de cardiomiocitos maduros, por lo que el proceso de diferenciación tiene una duración de 4 semanas.

**Día -2:** El primer paso consistió en levantar las iPSCs de la placa de 6 pocillos para pasarlas a una placa de 12 pocillos. El proceso para sembrar las iPSCs en la placa de 12 pocillos es el mismo que para realizar un pase de mantenimiento, apartado 3.1.2, las únicas diferencias son el tamaño de la placa, por lo que hay que ajustar los volúmenes de los reactivos, la confluencia celular y en lugar de suplementar el medio mTSER con tiazovivina hay que suplementarlo con ROCK inhibitor, dilución 1:1.000 (Tabla 3).

**Tabla 3:** Diferencias entre el procedimiento del pase celular para mantenimiento de las iPSCs y el pase celular y siembra para iniciar una diferenciación a cardiomiocitos.

	Volumen Matrigel Matrix® por pocillo	Volumen medio por pocillo	Confluencia celular	Suplemento
Pase mantenimiento (placa de 6 pocillos)	1 ml	2 ml	100.000 células por pocillo	Tiazovivina: 2,6-13.000
Pase para diferenciación (placa de 12 pocillos)	500 µl	1 ml	500.000 células por pocillo	Rock inhibitor: 1-1000

Para realizar la siembra, una hora antes se agregaron 500 µl de Matrigel Matrix® por pocillo en los nuevos pocillos de la placa de 12 donde se van a sembrar las células. Después, se añadió 1 ml de medio mTSER suplementado con Rock inhibitor por pocillo. Para la diferenciación es necesario que las células recubran todo el pocillo para favorecer la formación en monocapa y el correcto desarrollo de la diferenciación. Se requiere que la confluencia celular a las 48 horas sea del 95%, para ello, se levantaron las células de la placa de 6 pocillos y se sembraron 400.000 células por pocillo en la nueva placa de 12 pocillos

**Día -1:** Se realizó un cambio de medio.

- Se retiró el medio mTSER con Rock inhibitor
- Se agregaron 2 ml de medio mTSER sin Rock inhibitor por pocillo.

Una vez llegados al día 0, se comprobó que las células habían alcanzado el 95% de confluencia y se añadieron los factores de diferenciación que se fueron cambiando cada 2 días, según el procedimiento descrito a continuación.

Para llevar a cabo la diferenciación se utilizó el kit de diferenciación de STEMCELL llamado “STEMdiff™ Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Kit (ref: 05010; Stemcell Technologies; Vancouver, BC; Canadá), el cual incluye el medio basal de diferenciación de cardiomiocitos, el medio basal de mantenimiento de cardiomiocitos y los suplementos correspondientes. Los medios tienen que guardarse en la nevera y los suplementos a -20 °C; todos los materiales tienen que descongelarse a temperatura ambiente antes de ser utilizados. Para simplificar la explicación de los diferentes pasos de la diferenciación, a partir de ahora nos referiremos a los volúmenes de reactivos necesarios para un único pocillo, aunque en el laboratorio trabajemos con 8 pocillos por diferenciación, es decir, a partir de un mismo grupo de iPSCs se siembran 8 pocillos, de esta manera se obtendrá un mayor número de cardiomiocitos a la hora de realizar los experimentos. El volumen total de medio en cada pocillo fue de 2 ml.

**Día 0:** Se utilizó el medio basal de diferenciación (ref: 05011; Stemcell Technologies; Vancouver, BC; Canadá), el suplemento A (ref: 05012; Stemcell Technologies; Vancouver, BC; Canadá) y Matrigel Matrix®.

- El suplemento A se añadió en proporción 1:10, es decir, 1 µl de suplemento y 9 µl de medio, en nuestro caso utilizábamos un volumen final de 2 ml, por lo que cogimos 1.800 µl de medio basal de diferenciación y se completó con 200 µl de suplemento A.

- Durante la diferenciación el Matrigel Matrix® solo se añadió al medio basal de diferenciación el día 0. Se utilizó una dilución 1:100, por lo que se añadieron 20 µl de Matrigel Matrix® al medio de diferenciación suplementado con el suplemento A.

- Se retiró de cada pocillo el medio de cultivo y se añadieron 2 ml de medio basal de diferenciación suplementado con suplemento A y Matrigel Matrix® a cada pocillo.

- Se dejó la placa con las células en el incubador en normoxia a una presión parcial del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante 2 días.

**Día 2:** se realizó el segundo cambio de medio. Se utilizó el medio basal de diferenciación suplementado con suplemento B (ref: 05013; Stemcell Technologies; Vancouver, BC; Canadá), la dilución para el suplemento B fue 1:10, por lo que se añadieron 200 µl de suplemento B a 1.800 µl de medio para un volumen final de 2 ml.

- Se retiró el medio, y se añadió el medio nuevo con suplemento B

- Las células se dejaron en el incubador durante 3 días, hasta el día 5 del protocolo de diferenciación.

**Días 5 y 7:** se utilizó el medio de diferenciación suplementado con el suplemento C (ref: 05014/ Stemcell Technologies; Vancouver, BC; Canadá) en la misma proporción que en los casos anteriores, dilución 1:10.

- Se retiró el medio de cultivo y se añadió el medio basal de diferenciación enriquecido con el suplemento C.

- Se incubaron las células en normoxia a una presión parcial del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante dos días en el incubador.

**A partir del día 7** del protocolo de diferenciación: se utilizó el medio basal de mantenimiento, el cual fue reemplazado cada 2-3 días hasta llegar al día 15 de cultivo celular.

Para preparar el medio basal de mantenimiento (ref: 05015; Stemcell Technologies; Vancouver, BC; Canadá) completo se cogió la botella de 490 ml de medio de mantenimiento y se suplementó con 10 ml de suplemento de mantenimiento y 2,5 ml de antibiótico (penicilina-estreptomina), antes de mezclar es importante calentar el material a temperatura ambiente, una vez tengamos el medio basal de mantenimiento completo lo

guardaremos en la nevera hasta su uso.

**Una vez llegado al día 15** las células deberían haberse diferenciado a cardiomiocitos con características similares a cardiomiocitos fetales listos para levantar y hacer experimentos, podemos mantener los cardiomiocitos fetales durante 1 mes o más realizando un cambio de medio completo cada 2 días, agregando 2 ml de medio basal de mantenimiento completo por pocillo. Estos días de la diferenciación son muy importantes porque es cuando aparece el latido, los cardiomiocitos crecidos en monocapa son capaces de producir latido por sí mismos y es un indicativo de que la diferenciación se desarrolla correctamente, en concreto, entre el **día 14 y el 19** es cuando se debería empezar a ver latido (41, 42). Para continuar el desarrollo hasta cardiomiocitos maduros hay que pasar a la segunda fase, la cual empieza el **día 16** de la diferenciación.

**Día 16:** se siguió utilizando el medio basal de mantenimiento completo, la diferencia es que esta vez hay que suplementarlo con Torin1 (ref: 475991; EDM Milipore; Burlington, MA; Estados Unidos). Torin1 es un inhibidor de la vía mTOR, el tratamiento con Torin1 durante la diferenciación tardía induce en los cardiomiocitos a que se activen procesos de quiescencia celular y mejora los parámetros de maduración, por ejemplo, se ha visto que las células tratadas con Torin1 presentan una fuerza de contracción máxima relativa mayor del latido y también aumenta la tasa máxima de consumo de oxígeno. Este efecto parece que es provocado principalmente por la regulación positiva de p53, el cual favorece la inactividad celular y regular el transcriptoma cardíaco (43). Para realizar el tratamiento se aplicó un volumen final de 2 ml de medio basal de mantenimiento suplementado con Torin1 a una concentración de 200 nM por pocillo.

- Se realizó un cambio de medio en el que se aplicó el medio de mantenimiento suplementado con Torin1 cada 2-3 días.

Los días **16, 19 y 21:** se realizó el cambio de medio basal de mantenimiento suplementado con Torin1, hasta llegar al **día 23** de la diferenciación.

**Día 23:** terminado el tratamiento con Torin1, a partir de este día, cuando se realizó un cambio de medio se agregó medio basal de mantenimiento sin Torin1, en este día ya se hubieran podido levantar las células, pero es recomendable dejar madurar a los cardiomiocitos unos días después del tratamiento con Torin1 para que acaben la maduración correctamente.

**Día 26:** se procedió a levantar las células y a sembrarlas en placas de 24 pocillos, tras la siembra hay que dejar transcurrir 3-4 días para realizar los experimentos, tiempo necesario para que los cardiomiocitos se adecuen a la nueva placa. En este punto, también se procede a la caracterización celular mediante la detección de troponina (ref: MA512960; Life Technologies – ThermoFisher scientific; Waltham, MA; Estados Unidos) por citometría de flujo tal y como se describe en el apartado 4.3.3 (*Figura 2*).



<b>Día -2:</b> Siembra de las iPSCs en placas de 12 pocillos. Medio mTSEr + Rokit (dilución 1:1.000)	<b>Día -1:</b> Añadir medio mTSEr sin Rokit	<b>Día 0:</b> Añadir medio de Diferenciación + suplemento A (dilución 1:10) + Matrigel Matrix® (dilución 1:100)	<b>Día 1:</b> -	<b>Día 2:</b> Añadir medio de diferenciación + suplemento B (dilución 1:10)	<b>Día 3:</b> -	<b>Día 4:</b> -
<b>Día 5:</b> Añadir medio de diferenciación + suplemento C (dilución 1:10)	<b>Día 6:</b> -	<b>Día 7:</b> Añadir medio de diferenciación + suplemento C	<b>Día 8:</b> -	<b>Día 9:</b> Añadir medio de Mantenimiento	<b>Día 10:</b> -	<b>Día 11:</b> -
<b>Día 12:</b> Añadir medio de mantenimiento	<b>Día 13:</b> -	<b>Día 14:</b> Añadir medio de mantenimiento  <b>Entre el día 14 y el 19 es cuando deberíamos empezar a ver latido</b>	<b>Día 15:</b> A partir de este día deberían ser <b>cardiomiocitos fetales listos para levantar y hacer experimentos</b> , si queremos mantenerlos hasta un mes cambiar medio cada dos días y poner medio mantenimiento.	<b>Día 16:</b> Añadir Medio de mantenimiento + Torin (200 nM)	<b>Día 17:</b> -	<b>Día 18:</b> -
<b>Día 19:</b> Añadir Medio de mantenimiento + Torin (200 nM)	<b>Día 20:</b> -	<b>Día 21:</b> Añadir Medio de mantenimiento + Torin (200 nM)	<b>Día 22:</b> -	<b>Día 23:</b> Añadir medio de mantenimiento En este día ya se podrían levantar, ha finalizado el tratamiento con Torin, pero es mejor dejarlos madurar unos días.	<b>Día 24:</b> -	<b>Día 25:</b> -
<b>Día 26:</b> Añadir medio de mantenimiento  <b>Después del tratamiento con Torin deberían ser cardiomiocitos maduros. Aquí es cuando se deben levantar las células.</b> Una vez levantados y sembrados los cardiomiocitos hay que esperar mínimo 3-4 días para hacer los experimentos.  Para la caracterización con troponina, se puede realizar el mismo día que se levantan las células.	<b>Día 27:</b> -	<b>Día 28:</b> Añadir medio de mantenimiento	<b>Día 29:</b> -	<b>Día 30:</b> Añadir medio de mantenimiento Aunque a partir de los días 23-26 ya son cardiomiocitos maduros, es mejor dejarlos madurar un tiempo en la placa antes de hacer los experimentos. Por lo que parece que lo más <b>recomendable es levantarlos a partir del día 30 y así dejarlos reposar unos días después del tratamiento con Torin para que maduren.</b>	<b>Día 31:</b> -	<b>Día 32:</b> -
<b>Día 33:</b> Añadir medio de mantenimiento	<b>Día 34:</b> -	<b>Día 35:</b> Añadir medio de mantenimiento	<b>Día 36:</b> -	<b>Día 37:</b> Añadir medio de mantenimiento	<b>Día 38:</b> -	<b>Día 39:</b> -

**Figura 2:** Esquema con los procedimientos realizados durante el proceso de diferenciación de las células iPSCs hasta cardiomiocitos maduros. En él se indican los diferentes medio y factores de crecimiento utilizados en los diferentes días, también se indica el estado de diferenciación de las células durante el desarrollo.

### **3.2.1.2 Levantado y sembrado cardiomiocitos**

Para realizar los siguientes experimentos de citotoxicidad y caracterización de respuestas agudas en el modelo celular tras el tratamiento con las histonas extracelulares, los cardiomiocitos se levantaron de la placa de 12 pocillos donde se cultivan y se sembraron en las placas donde se van a realizar los experimentos, el tipo de placa cambia dependiendo del tipo de experimento en cuestión, por ejemplo, para realizar una MTT, se sembrarán en una placa de 96 pocillos; para analizar el tipo de muerte celular mediante anexina-yoduro se sembrarán en placas de 24 pocillos. Como en los procedimientos anteriores, los nuevos pocillos donde se vayan a sembrar los cardiomiocitos tienen que haber sido tratados previamente durante 1 hora con Matrigel Matrix®.

Cuando se trabajó con cardiomiocitos se utilizó el Cardiomyocyte support médium (ref: 05027; Stemcell Technologies; Vancouver; Canadá) como medio de cultivo y el Cardiomyocyte dissociation médium (ref: 05026; Stemcell Technologies; Vancouver; Canadá) para provocar que las células dejen de unirse a la superficie de pocillo.

El protocolo realizado fue el siguiente:

- Se retiró el medio de cultivo donde estaban los cardiomiocitos
- Se realizó un lavado con 1 ml de D-PBS (ref: 37350; Stemcell Technologies; Vancouver; Canadá).
- Se agregaron 500 µl de Cardiomyocyte dissociation médium por pocillo y se incubaron las células en normoxia a una presión parcial del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante 8-12 minutos.

El Cardiomyocyte dissociation médium tiene un efecto menos agresivo que otros compuestos con funciones similares como la tripsina o la acutasa, de manera que es menos dañino para las células, pero a su vez no las separa del pocillo de manera tan efectiva, por esto para recoger las células después de la incubación con Cardiomyocyte dissociation médium el procedimiento es un poco más complejo.

- Se agregó 1 ml de medio DMEM-F12 para recoger las células
- Se recogió el medio y las células levantadas utilizando la pipeta automática con un filtro de 5 ml, esto es porque la pipeta de 5 ml tiene una boca más ancha y daña menos a las células.
- Se agregó otro ml de DMEM-F12, pero esta vez con la pipeta de 1.000 µl.
- Se lavó varias veces el pocillo utilizando la pipeta para recoger la mayor cantidad de células.
- Se añadió otro ml de DMEM-F12 y se utilizó el scrapper para raspar el fondo del pocillo con la finalidad de acabar de levantar las células que aún seguían adheridas.
- Se recogieron las células con la pipeta de 1.000 µl.
- Una vez transferidos los 3 ml con células a un tubo de 15 ml, se centrifugaron a 250 xg durante 5 minutos para obtener un pellet de células.
- Se resuspendió el pellet de células contenido en el tubo de 15 ml en 1 ml de Cardiomyocyte support médium y se añadió 1 ml de Cardiomyocyte support médium sin células en los nuevos pocillos donde se sembrarán las células.

- Se contó el número de células con la cámara Neubauer siguiendo el método explicado en el apartado 3.1.2 sobre cómo realizar el pase celular y se sembraron las células.

A la hora de sembrar las células para un experimento es muy importante tener en cuenta la confluencia a la que se quiere tener el pocillo, por ejemplo, si se quiere analizar el tipo de muerte celular que se desencadena a raíz del tratamiento con histonas se necesita tener una confluencia superior al 80%, por lo que si se van a sembrar en una placa de 24 pocillos se siembra una cantidad de 200.000 células. Otro factor a tener en cuenta es que el tratamiento con Torin1 al que son sometidos los cardiomiocitos durante la diferenciación provoca que entren en quiescencia celular, es decir, no van a dividirse, por lo que el número de células presente en el pocillo no va a aumentar.

- A las 24 horas se cambió el Cardiomyocyte support médium en el que están los cardiomiocitos por medio basal de mantenimiento completo.

Si se quiere mantener a los cardiomiocitos en las nuevas placas habrá que realizar cambios de medio cada 2-3 días utilizando medio basal de mantenimiento completo.

### **3.2.1.3 Caracterización mediante técnicas de Inmunofluorescencia (IFI)**

Una manera de confirmar si la diferenciación hacia cardiomiocitos se ha desarrollado correctamente es mediante la detección de tres proteínas características de las células del músculo cardíaco por inmunofluorescencia, si se detecta que las células expresan estas proteínas quiere decir que la diferenciación ha sido un éxito y las células se han diferenciado correctamente a cardiomiocitos.

Para ello se utilizaron 3 anticuerpos primarios diferentes, cada uno con un target distinto, siendo los 3 anticuerpos generados en ratón, por lo que se aplicó un anticuerpo primario por pocillo y a un pocillo no se le aplicó ningún anticuerpo primario a modo de control negativo. Las proteínas que se querían detectar eran la Troponina T, proteína citoplasmática característica del músculo cardíaco, la cual se une a los filamentos de tropomiosina (44), la proteína Gata4, factor de transcripción característico con localización nuclear (45) y la actinina-  $\alpha$ , proteína citoplasmática que forma parte de los sarcómeros en el músculo cardíaco (42, 46). En cuanto al anticuerpo secundario se utilizó el Alexa fluor anti-mouse el cual emite en 488, verde (Tabla 4).

**Tabla 4:** Anticuerpos utilizados en la caracterización de los cardiomiocitos mediante microscopia de fluorescencia por microscopía confocal.

Troponina-T	Primario	Generado en ratón	Ref: MA5-12960	Life Technologies – ThermoFisher scientific	Waltham, MA; Estados Unidos
GATA-4	Primario	Generado en ratón	Ref: MA5-15532	Invitrogen – ThermoFisher scientific	San Diego, CA; Estados Unidos
Actinina- $\alpha$	Primario	Generado en ratón	Ref: A-7811	Merck-Sigma	Burlington, MA, USA
Alexa flour 488 (anti-mouse)	Secundario	Generado en cabra	Ref: A-11029	ThermoFisher Scientific	Eugene, Oregón; Estados Unidos

El protocolo realizado para preparar las células para la detección mediante inmunofluorescencia consta de dos días:

**Primer día:** Previamente se habían sembrado 150.000 células por condición en una placa de 16 pocillos y se dejaron incubando en normoxia a una presión parcial del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante 3 días para dejar que los cardiomiocitos se acomodaran a la nueva placa.

- Se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS.

- Se aplicó paraformaldehído (PFA) (ref: A11313; ThermoFisher Scientific; Paisley; Reino Unido) al 4% durante mínimo 10 minutos para fijar las células y que mantengan las características más parecidas posibles a cuando estaban vivas.

- Se permeabilizaron las células con PBS complementado con tritón X-100 (ref: A16046; ThermoFisher Scientific; Paisley; Reino Unido) al 0,5% durante 10 minutos.

El tritón es un detergente que va a crear agujeros en la membrana celular, permitiendo que posteriormente entren los anticuerpos al interior de las células, donde se encuentran las proteínas de interés.

- Se retiró el PBS-tritón a 0,5%.

- Se realizaron 3 lavados con PBS-tritón al 0,05%, en cada lavado se dejó la placa en agitación durante 5 minutos.

- Se retiró el PBS-tritón 0,05%.

- Se aplicó la solución de bloqueo sobre las muestras y se dejó incubando a temperatura ambiente durante al menos 1 hora.

La solución de bloqueo que se utilizó está formada por PBS complementado por FBS al 10% y tritón X-100 al 0,1%, esta solución se utilizó tanto para el bloqueo como para la incubación con anticuerpos. La fase de bloqueo es importante porque va a evitar que el anticuerpo se quedé fijado a la muestra mediante uniones inespecíficas, es decir, va a impedir que el anticuerpo se una a otros componentes de la muestra que no sean la biomolécula diana específica para la que se utiliza.

- Se retiró la solución de bloqueo.

- Se añadieron 100 µl de solución de bloqueo por muestra junto al anticuerpo primario correspondiente, y se dejó incubar toda la noche a temperatura ambiente.

Cada anticuerpo primario se utiliza a una dilución específica, la troponina T se utiliza a una dilución 1:100, el GATA-4 a dilución 1:50 y la actinina- α a dilución 1:500. Para preparar las muestras, como en cada pocillo tendremos una solución final de 100 µl de solución de bloqueo, se añadieron en los pocillos correspondientes 1 µl de troponina, 2 µl de Gata4 y 0,2 µl de actinina- α.

**Segundo día:**

- Se retiró la solución de bloqueo con el anticuerpo primario.

- Se realizaron tres lavados de 3 minutos con PBS.

- Se aplicaron 100 µl de solución de bloqueo por condición y el anticuerpo secundario anti-mouse a una dilución de 1:500, 0,2 µl por pocillo. A partir de este punto, es importante trabajar en condiciones de oscuridad para evitar que el anticuerpo secundario pierda fluorescencia.
- Se dejaron las muestras incubando durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Se retiró la solución de bloqueo con el anticuerpo secundario.
- Se realizaron 3 lavados con PBS durante 3 minutos.
- Se aplicaron 5 µl de solución de montaje con DAPI Fluoromount-G® (ref: 0100-20; Suothern Biotech; Birmingham; Reino Unido). El medio de montaje, al contener DAPI, permite realizar un marcaje nuclear de las células de la muestra.
- Finalmente, se sellaron las muestras utilizando esmalte de uñas para mejorar su conservación. Las muestras se guardaron en nevera y oscuridad hasta su uso, en un tiempo máximo de 2 semanas.

La caracterización se realizó mediante microscopia confocal, para ello se utilizó el microscopio confocal Spectra Leica TCS sp8, para tomar las imágenes se utilizó el aumento 40X, para el cual fue necesario aplicar el aceite de inmersión. En cuanto al análisis de las imágenes, el software de adquisición y análisis utilizado fue el LAS X Life Science. Las imágenes se tomaron en un mismo plano Z, tomándose imágenes de varios campos representativos de la muestra.

#### **3.2.1.4 Caracterización mediante detección de troponina por citometría**

Uno de los medios para confirmar si las iPSCs se han diferenciado correctamente es mediante la detección de niveles de troponina, TnT. La troponina es una proteína globular implicada en el proceso de contracción muscular presente en el sarcoplasma de las fibras de los músculos estriados, que son el músculo cardiaco y el esquelético. Esta proteína presenta varias isoformas características de un tipo de músculo estriado concreto, en nuestro caso se quiere detectar la troponina T cardiaca, cTnT. La troponina T cardiaca es una proteína característica del tejido cardiaco cuya cuantificación se realiza para determinar el grado de desarrollo de los cardiomiocitos (42, 44).

Para este experimento se necesita un control negativo, sin anticuerpo primario anti-troponina (ref: MA5-12960; Generado en ratón; Life Technologies – ThermoFisher scientific; Waltham, MA; Estados Unidos), y la muestra problema. Para que el citómetro pueda calcular la cantidad de expresión de troponina se utilizaron como referencia los valores obtenidos en el control negativo, tomando ese valor como 0, de esta manera al comparar los niveles de fluorescencia detectada en la muestra problema con el control negativo pudimos obtener el porcentaje de expresión relativa de troponina. Otro factor a tener en cuenta es el número de eventos, para cada condición se necesitaron 200.000 células para poder medir el suficiente número de eventos en el citómetro, 10.000 eventos por condición.

Los pasos realizados fueron:

- Se levantaron las células de la placa de 12 pocillos siguiendo el protocolo explicado en el apartado 3.2.1.2 hasta tenerlas concentradas en un pellet.
- Se resuspendieron las 200.000 células en 100 µl de PBS y se pasaron a un eppendorf de 1,5 ml.

Para realizar la fijación y permeabilización de las muestras en los pasos posteriores se utilizó el kit “eBioscience™ Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer Set” (ref 88-8824-00; Invitrogen

ThermoFisher Scientific; Carlsbad, CA; Estados Unidos).

- Se agregaron 100 µl del buffer de fijación (ref: 00-8222-49; Invitrogen ThermoFisher Scientific; Carlsbad, CA; Estados Unidos) y se dejaron incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente para que las células se fijen correctamente.

- Se realizó un lavado con 500 µl de PBS.

- Se centrifugó a 350 *xg* durante 8 minutos.

El siguiente paso consistió en la permeabilización y adición del anticuerpo primario.

- Se retiró el PBS y se resuspendió el pellet de células en 100 µl de buffer de permeabilización (ref: 00-8333-56; Invitrogen ThermoFisher Scientific; Carlsbad, CA; Estados Unidos).

- Se agregó el anticuerpo primario mouse anti-troponina en una dilución 1:100, es decir, 1 µl de anticuerpo anti-cTnT en 100 µl de buffer de permeabilización. Se dejó incubando la muestra a temperatura ambiente durante 30 minutos.

- Se realizó un lavado para retirar el exceso de anticuerpo primario con 500 µl de PBS.

- Se centrifugó a 350 *xg* durante 8 minutos.

En el siguiente paso se va a aplicar el anticuerpo secundario, a partir de ahora hay que tener en consideración dos cosas, la primera es que como el anticuerpo primario está generado en ratón, hay que utilizar un anticuerpo secundario que sea anti-mouse, en nuestro caso se utiliza el Alexa fluor anti-mouse 488 (ref: A-11029; Generado en cabra; ThermoFisher Scientific; Eugene, Oregón; Estados Unidos), que emite una longitud de onda verde. Lo segundo a tener en cuenta es que el anticuerpo secundario emite fluorescencia, por lo que es fotosensible, esto implica que a partir de ahora hay que trabajar en condiciones de oscuridad.

- Se añadieron 100 µl del buffer de lavado o flow buffer (ref: 00-4222-26; Invitrogen ThermoFisher Scientific; Carlsbad, CA; Estados Unidos) y el anticuerpo secundario en una dilución 1:500, 0,2 µl de anticuerpo secundario y 100 µl de buffer de lavado. Se incubó a temperatura ambiente durante mínimo 30 minutos.

- Se realizó un último lavado y centrifugación para eliminar el exceso de anticuerpo secundario.

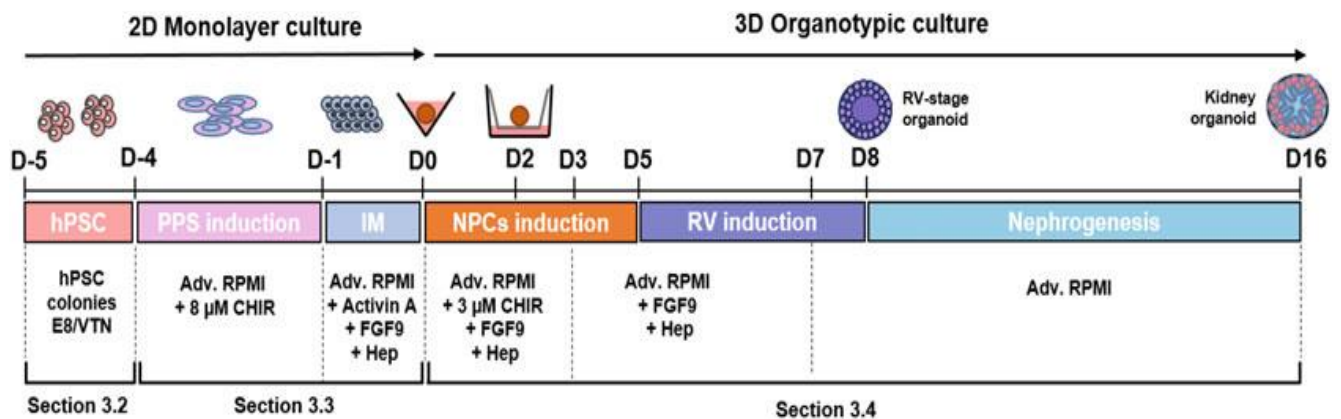
- Se resuspendió el pellet en 400 µl de flow buffer.

Una vez llegados a este punto, la muestra ya se encuentra lista para citometría, solo faltaba pasar los 400 µl de muestra a un tubo óptimo para el citómetro y acoplarlo para realizar la detección de señal de troponina.

Para la detección de expresión de troponina mediante citometría de flujo se utilizó el citómetro LSRFortesa X20 (ref: 658226R1; LSRFortesa X20; Becton, Dickinson and Company, B.D.; San José; Estados Unidos), el software de análisis empleado fue DIVA 8. Para poder dar por positivo el experimento, el porcentaje de señal de troponina detectado por el citómetro tiene que ser igual o mayor al 80%, lo que quiere decir que más del 80% de las células de la muestra expresan troponina, a partir de estos valores se puede decir que la diferenciación ha sido un éxito y las células se han diferenciado correctamente y son cardiomiocitos.

### 3.2.2. Generación de organoides de riñón

Para la diferenciación a organoide de riñón se utilizaron las mismas células que para la diferenciación a cardiomiocitos, las iPSCs. La diferencia se encuentra en los medios y factores de crecimiento que se utilizan, así como el tipo de placas y el recubrimiento. La diferenciación tiene una duración de 22 días, empezando en el día -5 y acabando en el día 16 (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema o cronograma con los diferentes procesos realizados durante el proceso de diferenciación desde células iPSCs hasta organoide de riñón. En él se indican los medios y factores de crecimiento utilizados en los diferentes días de la diferenciación, así como los diferentes estados por los que pasan las células iPSCs hasta completar su desarrollo (47).

En cuanto al recubrimiento se utilizó vitronectina (ref: A14700, ThermoFisher Scientific; Carlsbad, CA; Estados Unidos), para hacerlo se mezcló vitronectina y PBS en dilución 10:1000, es decir, por cada 1 ml de PBS se pusieron 10 μl de vitronectina. Después, se agregó la solución a los pocillos donde se iba a empezar la diferenciación y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente, una vez pasada la hora se retiró el PBS con vitronectina y se sembraron las iPSCs.

El tipo de placa en el que se realizó la primera parte de la diferenciación es una placa de 24 pocillos, para el recubrimiento se añadieron 500 μl de PBS más vitronectina por pocillo, y en cuanto al medio se añadieron 500 μl de medio mTSER suplementado con tiazovivina en la misma proporción que para la diferenciación de cardiomiocitos, 2,6 μl de tiazovivina en 13.000 μl de medio mTSER.

**Día -5:** siguiendo el protocolo explicado en el apartado 3.1.2, sobre realizar un pase celular, se levantaron las células iPSCs de la placa de 6 pocillos y se sembraron en la placa de 24 pocillos, es necesario que las células estén en un 80% de confluencia, para ello, se contaron las células y se sembraron 100.000 células por pocillo. Tanto para resuspender el pellet de células obtenido de la placa de 6 pocillos como para cultivar las células en la nueva placa de 24 pocillos se utilizó medio mTSER suplementado con tiazovivina, concretamente se agregaron 500 μl de medio por pocillo.

Una vez pasadas 24 horas en el incubador, en normoxia a una presión parcial del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, se empezó el protocolo para el día -4.

**Día -4:** en este día se retiró el medio mTSER y se agregó el medio específico suplementado con factores de diferenciación.

El medio que se utilizó es el medio RPMI, para preparar medio RPMI (ref: 12633-012, Life Technologies - ThermoFisher scientific; Nueva York; Estados Unidos) completo se cogió la botella de medio RPMI con 500 ml y se le agregaron 5 ml de glutamax (ref: 35050-038; Life Technologies - ThermoFisher Scientific; Paisley; Reino Unido), y 5 ml de antibiótico, penicilina-estreptomicina.

Una vez preparado el medio, se le agregó el factor de diferenciación, en este caso se utilizó CHIR (ref: SML1046-5MG; Merck – Sigma; Burlington, MA; Estados Unidos) a 8  $\mu$ M en un volumen final de 500  $\mu$ l, esto es porque se necesita aplicar un volumen de 500  $\mu$ l de medio RPMI completo más CHIR por pocillo.

- Se retiró el medio mTSER de los pocillos y se hizo un lavado con 500  $\mu$ l de PBS por pocillo.
- Se agregaron 500  $\mu$ l de medio RPMI suplementado con CHIR a 8  $\mu$ M por pocillo.
- Se dejó incubando las células durante 24 horas en normoxia a una presión parcial del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

**Días -3 y -2:** se realizó el mismo procedimiento que en el día -4, es decir, se llevó a cabo un cambio de medio en el que se agregaron 500  $\mu$ l de medio RPMI suplementado con CHIR a 8  $\mu$ M cada 24 horas.

**Día -1:** se aplicaron nuevos factores de diferenciación. Para ello se utilizó el medio RPMI completo utilizado hasta ahora, y se suplementó con 200 ng/ml de FGF9 (ref: 100-23B; Peprotech; Cranbury, NJ; Estados Unidos), 1  $\mu$ g/ml de heparina (ref: H3149-10KU; Merck – Sigma; Burlington, MA; Estados Unidos) y 10 ng/ml de activina A (ref: 338-AC; R&D Systems; Minneapolis, MN; Estados Unidos) en un volumen final de 500  $\mu$ l, que es el volumen necesario por pocillo.

- Se retiró el medio RPMI suplementado con CHIR donde se encontraban las células.
- Se realizó un lavado con 500  $\mu$ l de PBS por pocillo.
- Se agregaron 500  $\mu$ l de medio RPMI completo suplementado con FGF9 a 200 ng/ml, heparina a 1  $\mu$ g/ml y activina A a 10 ng/ml por pocillo.
- Se dejaron las células incubando en las condiciones indicadas anteriormente durante 24 horas.

**Día 0:** las células habrán pasado de tener una apariencia de grupos densos a tener una estructura en monocapa, más similar a como se distribuyen las células del mesodermo intermedio, IM. En esta segunda parte de la diferenciación las células se diferenciarán de células con características similares al mesodermo intermedio a células con funcionalidad y características renales (47).

Con la finalidad de que las células pasaran de estar en una estructura en monocapa a concentrarse en el fondo del pocillo, favoreciendo que formen un esferoide, en el día 0 se pasaron las células de la placa de 24 pocillos donde han estado durante toda la primera parte de la diferenciación a una placa de 96 pocillos con fondo en V (ref: 249935; ThermoFisher Scientific; Waltham, MA; Estados Unidos).

- Se retiró el medio RPMI suplementado con FGF9 a 200 ng/ml, heparina a 1  $\mu$ g/ml y activina A a 10 ng/ml.
- Se realizaron 2 lavados con 1 ml de PBS.
- Se agregaron 500  $\mu$ l de acutasa por pocillo y se incubó durante 1 minuto en normoxia a una presión parcial del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

La acutasa se aplicó durante un período corto de tiempo para posteriormente poder retirar la acutasa sin



llevarse las células junto a ella, es decir, sin levantar la capa de células.

- Una vez retirada la acutasa se utilizó el medio RPMI para disociar la monocapa de células, recoger la suspensión celular y pasar las células levantadas a un tubo de 15 ml.

- Se centrifugaron a 250 xg durante 5 minutos para concentrar las células en un pellet.

- Se resuspendió el pellet de células en 1 ml de RPMI suplementado con CHIR a 3  $\mu$ M, FGF9 a 200 ng/ml y heparina a 1  $\mu$ g/ml

Para contar las células se utilizó un protocolo diferente al explicado anteriormente, en este caso se separaron 100  $\mu$ l de la suspensión de células del tubo de 15 ml y se pusieron en un eppendorf, se completó ese eppendorf con medio RPMI sin células hasta llegar a los 1.000  $\mu$ l. Después, se cogieron 10  $\mu$ l del eppendorf, se pasaron a otro eppendorf donde se mezclaron con 10  $\mu$ l de tripano azul. En ese último eppendorf se tenía células y tripano azul, y se pusieron 10  $\mu$ l en la cámara Neubauer. Finalmente se contaron las células, una vez contadas las células se calculó el número de células por ml siguiendo la siguiente fórmula: número de células \* 2 \* 10 \* 10.000.

- Se añadieron 150  $\mu$ l de RPMI suplementado con CHIR a 3  $\mu$ M, FGF9 a 200 ng/ml y heparina a 1  $\mu$ g/ml sin células por pocillo a los nuevos pocillos de la placa de 96 donde se iban a sembrar las células.

- Se sembraron las células en la placa de 96 pocillos. En cuanto al número de células que se sembraron dependía del tamaño del organoide deseado, en nuestro caso se sembraron pocillos con 100.000 células, tamaño de esferoide normal, pocillo con 300.000 células, tamaño de esferoide grande.

A la hora de sembrar las células, al volumen de 150  $\mu$ l por pocillo se le restó el volumen de células que se iba a añadir, de manera que se mantuviera el volumen total de 150  $\mu$ l por pocillos.

- Para ayudar a las células a formar el organoide aparte de sembrarlas en pocillos con fondo en V también se centrifugó la placa de 96 pocillos a 300 xg durante 3 minutos, una vez sembradas las células.

- Acabado el protocolo del día 0 se dejaron las células incubando durante 48 horas en normoxia a una presión parcial del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

**Día 2:** se pasaron los organoides de riñón a transwells (ref: 9310412; CellQART - Sterlitech Corporation; Auburn, WA; Estados Unidos), cada transwell estaba colocado en un pocillo de una placa de 12 pocillos. Los transwell tienen una superficie membranosa sobre la que se colocan los futuros organoides de riñón, simulando el efecto de la membrana basal sobre la que estaría el riñón de manera natural; los organoides obtendrán los nutrientes del medio realizando una filtración a través de dicha membrana, lo que ayudará a que se desarrollen características funcionales de riñón en esas células.

Para pasar los esferoides de riñón de la placa de 96 pocillos con fondo en V a los transwells se utilizó una pipeta de 1.000  $\mu$ l y puntas con una apertura de mayor diámetro de lo normal, para dañar al organoide lo mínimo posible.

- Se recogió el organoide con la pipeta y se depositó sobre el transwell intentado arrastrar la mínima cantidad de medio posible.

- Se añadió el medio RPMI completo suplementado con 3  $\mu$ M de CHIR, 200 ng/ml de FGF9 y 1  $\mu$ g/ml de heparina; se utilizó un volumen de 500  $\mu$ l por pocillo.

- Se dejaron incubar los organoides en normoxia a una presión parcial del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24 horas.

**Día 3:** se reemplazaron los factores de crecimiento mediante un cambio de medio.

- Se retiró el medio de los pocillos de la placa de 12 pocillos con los transwells donde estaban las células.

- Se agregaron 500 µl de RPMI suplementado con FGF9 a 200 ng/ml y heparina a 1 µl g/ml por pocillo.

- Se dejaron incubando los organoides en las condiciones anteriormente explicadas durante 48 horas, hasta el día 5.

Es importante comprobar que el medio se encuentra tanto en la base del pocillo como recubriendo el transwell donde está el esferoide.

**Día 5:** se realizó el mismo procedimiento que en el día 3, es decir, se agregó medio RPMI suplementado con FGF9 y heparina y se incubaron durante 48 horas.

**Día 7:** se retiraron los factores de crecimiento.

- Se retiró el medio RPMI suplementado.

- Se agregó únicamente medio RPMI completo, sin factores de crecimiento.

A partir del día 7, se realizó un cambio de medio cada dos días, repitiendo este procedimiento hasta el **día 16**; en este día ya se hubo completado la diferenciación hacia organoide de riñón.

### **3.2.2.1 Seguimiento del desarrollo del organoide de riñón mediante observación por microscopio óptico**

Una forma de realizar el seguimiento del crecimiento del organoide de riñón una vez pasado a transwell, día 2, hasta el final de su diferenciación, día 16, fue mediante la captación de imágenes con el microscopio óptico, viendo cómo se fueron desarrollando los componentes y vesículas internas durante la fase final de la diferenciación.

Las imágenes se tomaron con el programa Leica Application Suite (LAS), utilizando la microscopía óptica de campo claro con la lente de aumento de 5X, 10X y 20X, para ello se utilizó el microscopio LEICA DMI1 CAMERA STAND. Las imágenes se tomaron una vez los organoides estaban en transwells coincidiendo con los días de la diferenciación antes de realizar el cambio de medio.

## **3.3. Purificación de las histonas extracelulares**

### **3.3.1. Cultivo de células HeLa**

Las histonas utilizadas en los tratamientos se extraen de las células HeLa, la idea es cultivar estas células para posteriormente obtener un extracto de histonas provenientes de células humanas.

Lo primero que se hizo fue descongelar las células HeLa, que estaban guardadas en un vial de congelación en el tanque de nitrógeno a -176°C, preservadas con una solución formada por 10% de DMSO y 90% de suero bovino fetal inactivado.

Para descongelar se realizó el siguiente procedimiento:

- Se extrajo el vial del tanque de nitrógeno y se dejó 5 minutos en el incubador en normoxia a una presión parcial del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C para que se descongelara el criopreservante con las células.
- Se resuspendió el criopreservante con las células en 5 ml de medio DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement (ref: 61965-026; Life Technologies - ThermoFisher Scientific; Paisley; Reino Unido), a partir de este punto nos referiremos a él como medio DMEM.

El medio DMEM es el que se utilizó para el cultivo de las células HeLa, para preparar medio DMEM completo se cogió una botella de medio DMEM, 500 ml, y se agregaron 50 ml de suero bovino fetal inactivado, 5 ml de antibiótico, penicilina-estreptomicina y 5 ml de L-glutamina (ref: 25030081; Life Technologies - ThermoFisher Scientific, Nueva York; Estados Unidos).

- Se pasó la solución con células a un tubo de 15 ml y se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos para obtener el pellet de células.
- Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio DMEM, dependiendo del tamaño del pellet se pasaron las células a un frasco T-25, para un pellet pequeño, o a un frasco T-75, para un pellet grande.

Previamente se agregó medio DMEM al nuevo frasco, en el caso del T-25 se añadieron 5 ml, para un T-75 se añadieron 15 ml de medio. Es importante realizar un cambio de medio al día siguiente, porque el criopreservante es necesario para evitar que las células se dañen en el proceso de congelación, pero puede ser tóxico si se cultivan las células en él, para evitar la toxicidad se realizó al día siguiente un cambio de medio añadiendo medio DMEM en las cantidades indicadas según el tipo de frasco.

Normalmente, cuando se empieza a poner en marcha un cultivo celular, se utilizan los frascos T-25 y los T-75, debido a que la cantidad de células no será muy alta y no es bueno pasarlas a frascos grandes directamente, el objetivo final es cultivar las células en frascos de 150 mm, paellas, debido a que son frascos con mayor superficie, por lo que pueden contener una mayor cantidad de células por frasco, lo que a la hora de extraer histonas nos proporcionará una mayor cantidad. Así como en el T-25 se añadían previamente 5 ml de medio DMEM y en el T-75 15 ml, para los de 150 mm se aplicarán 25 ml de medio DMEM.

Para realizar un pase de células HeLa se realizaron los siguientes pasos:

- Se calentaron el medio DMEM y los reactivos necesarios, concretamente tripsina, Trypsin-EDTA (ref: 25200056; Life Technologies - ThermoFisher Scientific; Paisley; Reino Unido), para levantar las células y PBS para los lavados. Se calentó el material durante 15-20 minutos en el baño a temperatura para que alcanzaran la temperatura de 37 °C.
- Se retiró el medio del frasco donde estaban las células.
- Se realizaron 3 lavados con PBS, la cantidad de PBS que se utilizó fue entre 3 y 5 ml.
- Se añadió tripsina para levantar las células, las cantidades de tripsina utilizadas varían dependiendo del tipo de frasco, para un T-25 se usó 1 ml de tripsina, para un T-75 1,5 ml y para un frasco de 150 mm, 2 ml. Se incubaron las células con tripsina durante 5-6 minutos en el incubador en normoxia a una presión parcial del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.
- Se utilizaron 10 ml de medio DMEM para recoger las células del frasco y se pasaron a un tubo de 15 ml.

- Se centrifugó el tubo con células a 1.500 rpm durante 5 minutos.
- Se retiró el sobrenadante del tubo y se resuspendió el pellet de células en la cantidad de medio deseada.
- Finalmente se pasó el medio con células a los nuevos frascos en los que previamente se había puesto la cantidad de medio indicada anteriormente. De esta manera se pudo expandir y mantener el cultivo de células HeLa.

Para la extracción de histonas, antes de pasar las células a un nuevo frasco de cultivo, en vez de retirar el sobrenadante y resuspender el pellet del tubo de 15 ml, únicamente se retiró el sobrenadante y se guardó el tubo con el pellet de células a -20 °C hasta que se vaya a realizar el protocolo de extracción de histonas.

Una vez que no fue necesario utilizar las células HeLa, se congelaron de nuevo. Para congelar las células se siguió el protocolo de pase celular hasta tener las células concentradas en un pellet dentro de un tubo de 15 ml. A continuación, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 1 ml de medio de criopreservación, 10% DMSO y 90% suero bovino fetal inactivado, y se pasaron las células con el criopreservante a un criovial. Posteriormente, se guardaron las células a -80 °C durante 24 horas y finalmente se guardó el criovial con las células en el tanque de nitrógeno hasta que sean necesarias nuevamente.

### **3.3.2. Extracción ácida de histonas**

El protocolo para extraer histonas consta de dos días, la extracción ácida durante el primer día permite lisar las células y purificar los núcleos sin que estos se rompan, para luego en el segundo día precipitar las histonas (48).

Las histonas se extrajeron a partir de los pellets de células guardados a -20°C en tubos de 15 ml obtenidos a partir de las células HeLa cultivadas. Se realizó la extracción cuando se obtienen 10 o 20 tubos listos para extraer histonas.

Primer día:

- Se atemperaron los tubos congelados a temperatura ambiente, hasta que estuvieron descongelados.
- Se realizó un lavado con 500 µl de PBS frío, a 4°C.
- Se pasó el pellet de células resuspendido en PBS de un tubo de 15 ml a un eppendorf, es decir, si se parte de 10 tubos se pasará a tener 10 eppendorfs.
- Se centrifugaron los eppendorf a 2.000 rpm durante 5 minutos en frío, para la extracción de histonas todas las veces que se centrifugó fue con la centrifuga a 4°C.
- Se lisaron las células utilizando el buffer hipotónico de lisis, a la mezcla se le añadió ortovonadato e inhibidor de proteasas.

El buffer hipotónico de lisis provoca que las células se rompan por osmosis, la función del ortovonadato (ref: 081104.36; ThermoFisher Scientific; Waltham, MA; Estados Unidos) y el inhibidor de proteasas "Complete ULTRA Tablets, Mini, Easypack" (ref: 05892970001; Merck – Sigma; Burlington, MA; Estados Unidos) consiste en evitar que las proteínas se degraden una vez sean liberadas de la célula al romperse. Por cada eppendorf con células se utilizó 1 ml de buffer de lisis más ortovonadato e inhibidor de proteasas.

Para simplificar la explicación, a partir de ahora desarrollaremos el protocolo para 10 eppendorfs, es decir, para preparar y utilizar 10 ml de buffer hipotónico de lisis. Para preparar dicha mezcla, primero se pasaron 10 ml de buffer hipotónico de lisis a un tubo de 15 ml, a continuación, se añadió una pastilla de inhibidor de proteasas, obteniendo una concentración de 2 µl de inhibidor de proteasas por 1 ml de buffer de lisis. También se agregaron 100 µl de ortovonadato al buffer de lisis, obteniendo una concentración de 10 µl por 1 ml de buffer de lisis. Se utilizó el vortex para que todo se mezclara correctamente.

- Una vez se preparó el buffer, se cogieron los eppendorf con células que se habían centrifugado anteriormente, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis.
- Se llevaron los eppendorf a la cámara fría y se utilizó el agitador orbital para dejarlos en rotación durante 30 minutos.
- Se centrifugaron los eppendorfs a 10.000 rpm durante 4 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante.
- Se resuspendieron los pellets en 320 µl de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 0,5 N.
- Finalmente se llevaron los eppendorf a la cámara fría dejándolos en rotación durante toda la noche.

Segundo día:

- Se procedió a centrifugar los eppendorfs con las muestras a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Se recogió el sobrenadante y se transfirió a un nuevo eppendorf.

Este es el único paso en el que se recogió el sobrenadante y se descartó el pellet, debido a que después del procedimiento de lisis hipotónica y posterior mantenimiento en ácido sulfúrico, las histonas se encuentran en suspensión en la solución.

- Se agregaron Se agregaron 132 µl de TCA (ref: T0699; Merk -Sigma; Burlington, MA; Estados Unidos) y se dejó incubando la muestra durante 30 minutos en hielo, es recomendable invertir los eppendorfs cada 10 minutos durante la incubación.

El TCA, Trichloroacetic acid solution, al 100 %, el TCA se une a las histonas disueltas y hace que precipiten (34), a partir de este paso las histonas vuelven a estar en el pellet.

- Se centrifugó la muestra a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante.
- Se realizaron 2 lavados con acetona con el objetivo de eliminar el ácido de la suspensión y disolver lo máximo posible el precipitado de histonas (48), para los lavados se resuspendió el pellet en 500 µl de acetona y se centrifugó a 13.000 rpm, 10 minutos, 4°C.
- Finalmente, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet de histonas en 100 µl de agua destilada y se guardaron los eppendorf con las histonas purificadas a -20°C hasta que se vaya a realizar la cuantificación de histonas.

### **3.3.3. Cuantificación de las histonas por el método de Bradford**

Para la cuantificación de las histonas se realizó un ensayo Bradford para saber la concentración de histonas con las que posteriormente se tratarán las células.

- Se cogieron todos los eppendorfs con histonas extraídas que se habían guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se juntaron y mezclaron bien en un único tubo.

- Se pasó una pequeña parte del contenido de ese tubo a diferentes pocillos de una placa de 96 pocillos y se mezcló con el reactivo Bradford (ref: 500-0006; BIO-RAD; Hercules, CA; Estados Unidos). Concretamente se aplicaron  $198\ \mu\text{l}$  de reactivo Bradford y  $2\ \mu\text{l}$  de histonas por pocillo, y se realizaron 3 réplicas de cada uno de los extractos purificados de histonas.

- También se usaron concentraciones de proteínas conocidas para hacer una recta patrón, concretamente se utilizaron muestras de seroalbúmina bovina (BSA). En nuestro caso utilizamos muestras de BSA a concentraciones de  $0\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $0,25\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $0,5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$  y  $2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , se hicieron 3 réplicas de cada concentración.

- Se dejó incubar la mezcla de reacción del reactivo durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Es muy importante evitar la exposición a la luz lo máximo posible, debido a que se van a analizar las concentraciones de histonas mediante el espectrofotómetro.

Para la detección por espectrofotometría se utilizó el espectrofotómetro Spectra Max PLUS 384 (Spectra max PLUS 384; Molecular Devices, San José, CA; Estados Unidos) y el software de análisis utilizado fue el SoftMax Pro 6.2.2.

Finalmente, se obtuvieron los valores de absorbancia para las muestras con concentraciones de BSA conocidas y el valor de absorbancia de nuestra muestra de histonas, de la que desconocíamos su concentración. Con los valores de absorbancia y concentración de las muestras de BSA se calculó la recta patrón, comparando los valores de absorbancia obtenidos a partir de las muestras de histonas se calculó la concentración de las mismas.

### **3.4. Tratamiento de los cardiomiocitos con histonas extracelulares**

#### **3.4.1 Estudio de la citotoxicidad mediante el ensayo MTT**

Para ver si la viabilidad celular disminuía al aplicar el tratamiento con histonas sobre los cardiomiocitos humanos se realizó un ensayo MTT (ref: M6494; Thermo Fisher Scientific, Nueva York; Estados Unidos). El ensayo MTT se utiliza para medir la viabilidad celular mediante espectrofotometría. En concreto se basa en la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular, basándose en la reducción enzimática de la sal soluble de tetrazolio, MTT, de color amarillo, a formazán insoluble, de color azul, que se produce al exponerlo a células vivas; a mayor intensidad de absorbancia detectada en el espectrofotómetro mayor porcentaje de viabilidad.

Para este ensayo se preparó una placa de 96 pocillos con 30.000 cardiomiocitos por pocillo y se aplicaron diferentes concentraciones de histonas de manera creciente para analizar cuáles eran las concentraciones que afectaban significativamente al porcentaje de viabilidad de los cardiomiocitos. Las concentraciones utilizadas fueron  $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $150\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$  y  $250\ \mu\text{g}/\text{ml}$  y una condición control con  $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$  de histonas, en un volumen total de  $150\ \mu\text{l}$  por pocillo.

- El primer paso consistió en aplicar el tratamiento con histonas, para ello se retiró el medio basal de mantenimiento y se realizó un lavado con  $50\ \mu\text{l}$  de PBS por pocillo. A continuación, se añadió el medio con las histonas a la concentración deseada y se dejaron actuar durante 1 hora y 30 minutos.

- Se retiró el medio con histonas y se hicieron dos lavados con  $50\ \mu\text{l}$  de PBS por pocillo.

- Se añadieron 100 µl por pocillo de la solución con MTT, la cual se preparó con MTT a una dilución 1:11, es decir, 1 µl de MTT junto a 10 µl de medio basal de mantenimiento.

- Se dejó incubando la placa de 96 durante 3 horas en normoxia a una presión parcial del 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Es importante trabajar en condiciones de oscuridad.

- Se retiró la solución MTT, se añadieron 100 µl de DMSO por pocillo para resuspender el formazán precipitado y se mantuvo la placa en agitación durante 10 minutos.

Finalmente, las muestras estuvieron listas para ser cuantificadas mediante el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 590 nm. Para medir la absorbancia se utilizó el espectrofotómetro Spectra Max PLUS 384 y el software de análisis utilizado fue el SoftMax Pro 6.2.2.

Una vez obtenidos los datos se tomó la media de los valores de viabilidad de la condición control como 100% de viabilidad y se calculó el porcentaje de viabilidad relativa de todas las muestras de las diferentes condiciones por separado, comparándolo respecto a ese valor de referencia. A continuación, se compararon los valores de las diferentes condiciones utilizando el test estadístico de no paramétrico de Mann-Whitney utilizando el programa estadístico GraphPad Prism.

### **3.4.2 Estudio de la viabilidad y muerte celular por citometría de flujo**

Para analizar el tipo de muerte celular se realizó un ensayo de detección de anexina-yoduro con el kit Annexin V – FITC KIT Apoptosis Detection (ref: ANXVKF-100T; Cayma Chemical Company; Ellsworth Ann Arbor, MI; Estados Unidos) mediante citometría de flujo.

La proteína anexina V se utiliza para el estudio de células apoptóticas, esta proteína se une a la fosfatidilserina, proteína que en condiciones normales se encuentra en la superficie interior de la membrana citoplasmática de células. La anexina V se une a fosfatidilserina expuesta indicando que la célula se encuentra en proceso de apoptosis, emite fluorescencia verde (49).

Por otro lado, el yoduro de propidio es una tinción nuclear y cromosómica que es impermeable a la membrana plasmática, por lo que únicamente puede entrar en las células cuya membrana está rota diferenciando células viables y no viables, emite fluorescencia roja (49).

Los resultados del experimento se interpretan de manera que las células negativas para anexina V, AV, y yoduro de propidio, IP, son células viables; las positivas únicamente para AV son células en apoptosis temprana o primaria, las positivas únicamente para IP se encuentran en necrosis y las positivas para AV e IP se encuentran en apoptosis secundaria o tardía (49) (Tabla 5).

**Tabla 5:** Tabla resumen de indicadores de citometría de flujo utilizados para identificar células viables, apoptosis primaria, necrosis y apoptosis secundaria.

Estado celular	Anexina V	Yoduro de propidio
Células viables	Negativo	Negativo
Apoptosis primaria	Positivo	Negativo
Necrosis	Negativo	Positivo
Apoptosis secundaria	Positivo	Positivo

La primera parte del procedimiento fue el tratamiento con histonas:

- Se retiró el medio donde tenemos los cardiomiocitos maduros, se realizó un lavado con 500  $\mu$ l de PBS y se añadieron 500  $\mu$ l de medio basal de mantenimiento.
- Se añadieron las histonas a la concentración deseada, en nuestro caso se utilizaron tres condiciones, una condición control en la que no se agregaron histonas, una condición con 100  $\mu$ g/ml de histonas y una tercera condición a 150  $\mu$ l/ml de histonas. Una vez añadidas las histonas extracelulares a los cardiomiocitos, se dejaron actuar durante 1 hora y 30 minutos.

La segunda parte consistió en el tratamiento con anexina-V y yoduro de propidio:

- Se procedió a preparar un eppendorf para cada réplica y el mix de binding buffer. Para hacer el mix de binding buffer se diluyó el binding buffer en PBS, dilución 1:10; por ejemplo, 1 ml de binding buffer y 9 ml de PBS.
- Se recogió el sobrenadante de los pocillos y se pasó a los eppendorfs correspondientes; en el sobrenadante es donde estaban los cardiomiocitos muertos que se han despegado de la superficie del pocillo.
- Se levantaron los cardiomiocitos que se mantenían adheridos a la placa siguiendo el protocolo explicado anteriormente en el apartado 3.2.1.2, y se pasaron a los eppendorfs donde previamente se había puesto el sobrenadante, de esta manera se tuvo en un mismo eppendorf las células muertas y vivas de una misma réplica.
- Se centrifugaron los eppendorfs a 400  $xg$  durante 8 minutos obteniendo el pellet de células.
- Se resuspendió el pellet en 100  $\mu$ l del mix de binding buffer.
- Se añadieron 5  $\mu$ l de anexina V y 5  $\mu$ l de yoduro de propidio por eppendorf, es muy importante trabajar en oscuridad para que los reactivos no pierdan la fluorescencia.
- Se incubaron las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Finalmente, se agregaron 250  $\mu$ l del mix de binding buffer por eppendorf y se pasaron las muestras por el citómetro para contar los distintos eventos y obtener los resultados. El citómetro utilizado fue el LSR Fortesa X20 y los resultados fueron evaluados con el software DIVA 8.

Una vez se realizados todos los ensayos de análisis de tipo de muerte celular por anexina-V yoduro de propidio se calcularon los porcentajes de viabilidad, apoptosis primaria, apoptosis secundaria y necrosis. Para ello se calculó la media de los valores de viabilidad de las diferentes muestras del grupo control y se tomó ese valor de referencia como el 100%. Posteriormente, se compararon todos los valores obtenidos por el citómetro de las diferentes muestras y condiciones por separado con el valor de referencia (media grupo control) para calcular los porcentajes relativos de cada muestra. Finalmente, se unificaron todos los valores de las diferentes muestras, para obtener los valores totales del experimento y utilizando el programa estadístico GraphPad Prism se analizaron los datos mediante el test estadístico no paramétrico test de Mann-Whitney, comparando todas las condiciones con respecto al control y entre ellas.

### **3.4.3 Extracción y cuantificación de ARN del cultivo de cardiomiocitos**

La extracción de ARN se realizó una vez los cardiomiocitos llegaron al estadio de cardiomiocitos maduros y se les aplicó el tratamiento con histonas. La finalidad es extraer ARN para ver la diferencia en la expresión de los posibles genes implicados en el daño celular, así como de los posibles genes implicados en el proceso de apoptosis, de esa manera se podrá saber que vías conducen a la muerte celular en los cardiomiocitos al ser



expuestos al efecto citotóxico de las histonas libres.

El procedimiento constó de dos partes, en la primera parte se partió del cultivo de cardiomiocitos vivos tratados con histonas para extraer los compuestos del interior de las células, en la segunda parte se aisló únicamente el material genético del conjunto de compuestos celulares.

Primera parte:

- Se retiró el medio con el tratamiento de histonas, los cardiomiocitos se encontraban en placas de 24 pocillos.
- Se realizaron 2 lavados con 500 µl de PBS.
- Se trataron las células con Qiazol Lysis Reagent, el cual tiene como función lisar las células y eliminar el ADN genómico mejorando la eficiencia de recuperación de ARN, 500 µl por pocillo
- Se dejaron incubando las células con qiazol durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se utilizó un scrapper para raspar el pocillo donde se encontraban las células, al final de este paso las células se encontraban lisadas y los compuestos celulares estaban en suspensión o disueltos en el qiazol.
- Finalmente se recogieron los 500 µl de qiazol con los compuestos celulares y se guardaron a -20°C hasta empezar la segunda parte de la extracción.

Segunda parte: Para la segunda parte de la extracción de ARN se utilizó el miRNeasy Mini Kit Qiagen (ref: 74104; Quiagen; Hilden; Alemania) para separar el ARN del resto de componentes celulares obtenidos de la lisis de los cardiomiocitos, gracias a la acción de la membrana de sílice que forman las columnas del kit de extracción de ARN.

- Se agregó en el eppendorf con la muestra (células lisadas) el mismo volumen de etanol al 70% que de muestra de lisado celular, se mezcló todo utilizando el vortex.
- Se transfirió el contenido del eppendorf en la columna de extracción de ARN del kit, se centrifugó durante 15 segundos a 8.000 *xg* y se retiró el líquido de la base de la columna.

Las columnas de extracción funcionan de manera que la parte de la muestra deseada, el ARN, se queda retenida en la membrana de sílice mientras que el resto de componentes celulares caen al fondo de la base de la columna, de esta manera se fueron añadiendo buffers para ir eliminando todos los restos celulares no deseados y finalmente tener retenido en la columna únicamente el ARN, para su posterior recolección.

- Se añadieron 500 µl del buffer RW1 y se centrifugó la columna durante 15 segundos a 8.000 *xg*. Se retiró el contenido de la base de la columna
- Se repitió el proceso con el buffer RPE.
- Se realizó un segundo lavado con 500 µl de buffer RPE, pero se centrifugó durante 2 minutos a 8.000 *xg*. Una vez llegados a este paso, en la columna estaba retenido únicamente el ARN.
- Se cambió la base de la columna por eppendorfs donde guardar las muestras.
- Se aplicaron 50 µl de RNA-ase free wáter y se centrifugó 1 minuto a 8.000 *xg* para provocar que el ARN retenido eluya y caiga a la base de la columna, donde se habían colocado nuestros eppendorfs.

Al final de este proceso el ARN estaba extraído, aislado y guardado en eppendorfs, el siguiente y último paso fue la cuantificación del material genético obtenido, para ello el nanodrop utilizado fue el Nanodrop 2000 (ThermoFisher- Scientific; New York, NY; Estados Unidos). Para que el nanodrop pueda cuantificar la cantidad de ARN primero se realizó un blanco para calibrarlo.

- Se utilizó 1  $\mu$ l de ARN-ase free wáter para el blanco.
- Para cuantificar el ARN, se agregó 1  $\mu$ l de muestra en el sensor del nanodrop; el nanodrop indica la concentración de ARN en  $\mu$ g/  $\mu$ l presente en la muestra.
- Finalmente se obtuvo la concentración de ARN extraído de las diferentes muestras y se guardaron a -20  $^{\circ}$ C hasta su posterior utilización.

#### **3.4.4 Realización de RT-PCR y PCR cuantitativa para el análisis de expresión diferencial de genes**

Antes de la PCR cuantitativa se realizó una retrotranscripción, RT-PCR, del ARN extraído a partir del cultivo de cardiomiocitos para convertirlo en ADN, cADN. Para la reacción se utilizó una placa de 96 pocillos y el kit del Mix de la RT-PCR Hig Capacity cDNA reverse transcription kit (ref: 2735981; Applied biosystems – ThermoFisher scientific; Vilna; Lituania).

Para preparar las muestras se utilizó agua libre de ARN-asas (RNA-ase free water) y las muestras con ARN. Al lisar las células y extraer el ARN lo normal es que no haya la misma cantidad de ARN en todas las muestras, en unas puede haberse extraído más y en otras menos, esto puede provocar que los resultados sean erróneos debido a que las diferencias en las cantidades de ARN de interés detectadas en las diferentes muestras no sean debidas a que las células hayan expresado más o menos esos genes, sino porque hubiera más material genético de partida en una muestra que en otra.

Para evitar este error se igualaron todas las muestras a la misma concentración de material genético, en nuestro caso se igualaron a 120 ng, para ello se mezcló la cantidad de muestra y agua libre de ARN-asas necesaria para que en cada tubo hubiera una cantidad de 10  $\mu$ l de muestra con una cantidad de 120 ng.

Por otro lado, en cada pocillo se añadieron también 10  $\mu$ l del Mix de la RT-PCR. Para preparar el Mix se mezclaron por muestra 2  $\mu$ l de Pool RT primers, 0,8  $\mu$ l de dNTPs, 1  $\mu$ l de transcriptasa inversa, 2  $\mu$ l de Reverse transcription buffer y 4,2  $\mu$ l de agua libre de ARN-asas.

Una vez igualadas las muestras a 120 ng y se preparó el Mix de la RT-PCR se realizó el siguiente procedimiento:

- Se añadieron 10  $\mu$ l de muestra y 10  $\mu$ l del Mix por pocillo en la placa de 96 pocillos, obteniendo un volumen total de 20  $\mu$ l por pocillo. Se realizaron dos réplicas por muestra/condición.
- Se recubrió la placa firmemente con parafilm, para evitar que los componentes se pierdan al evaporarse o salirse del pocillo durante la centrifugación, además de para evitar que se contamine la muestra.
- Se centrifugó la muestra para mezclar todos los reactivos.
- Finalmente se introdujo en el termociclador, en nuestro caso se utilizó el termociclador QuantiStudio 5 (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA; Estados Unidos), para llevar a cabo los ciclos necesarios para la reacción. Los ciclos utilizados para la RT-PCR fueron 10 minutos a 25 $^{\circ}$ C, 120 minutos a 37 $^{\circ}$ C para que se sintetice el cADN y 5 minutos a 95 $^{\circ}$ C para inactivar las enzimas.
- Se retiró la placa con el material genético amplificado y se guardó a -20 $^{\circ}$ C, la RT-PCR no se realizó de manera

específica para un gen en concreto, es decir, se amplificaron y se convirtieron en cADN todos los genes presentes en la muestra, no únicamente los genes de interés.

Una vez acabada la RT-PCR en la placa de 96 el ARN estaba amplificado y en forma de cADN, el siguiente paso fue realizar la PCR cuantitativa para poder determinar la expresión diferencial de genes en las células sometidas a las diferentes condiciones del experimento (0 µg/ml, 100 µg/ml y 150 µl/ml de histonas). El ensayo se llevó a cabo en una placa de 384 pocillos y se realizaron 4 réplicas por muestra.

- Se aplicó un volumen total de 10 µl en cada pocillo, formado por 1 µl de muestra obtenida a partir de la RT-PCR y 9 µl del Mix para la PCR.

Para preparar el Mix de la PCR se agregaron 5 µl de TaqMan universal máster Mix (ref: 4304437; Applied Biosystems; Foster City, CA.; Estados Unidos), 3,5 µl nuclease free wáter y 0,5 µl de la sonda específica para el gen de interés por pocillo.

Para las sondas se utilizaron sondas específicas prediseñadas para cada gen de interés de la tecnología TaqMan Gene expression assays (Life Technologies; Carlsbad, CA; Estados Unidos), una sonda para cada gen. Este tipo de sondas está formado por un fluoroforo unido a uno de sus extremos y un quencher unido en el otro extremo. En su estado normal, el quencher no dejará que la fluorescencia emitida por el fluoroforo sea detectada, una vez la sonda se une a la secuencia específica de cADN se liberará el quencher gracias a la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa, al liberarse el quencher la fluorescencia emitida por el fluoroforo podrá ser detectada, indicando la presencia del gen en la muestra, a mayor fluorescencia detectada mayor cantidad de cADN en la muestra, lo que querrá decir que ha habido una mayor expresión de ese gen.

- Se agregó en cada pocillo una sonda para un gen en concreto, el tipo de sonda varía dependiendo del gen de interés, también se analizó la cuantificación de un gen constitutivo o de referencia, el GAPDH, con la finalidad de normalizar los resultados.

- Para la cuantificación se utilizó el termociclador ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Foster City, CA.; Estados Unidos), y los ciclos para la PCR fueron 10 min a 95°C para activar la enzima y 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 1 minuto a 60°C.

Una vez acabada la PCR cuantitativa se analizaron los datos obtenidos a partir de la fluorescencia detectada, la cuantificación de cADN se hizo de manera relativa, comparando los valores obtenidos de los genes de interés con un gen de referencia. El gen de referencia utilizado fue el GAPDH, esto es debido a que es un gen que se expresa de manera constitutiva, es decir, se expresa igual y de manera constante en todas las muestras analizadas independientemente de la condición con la que hayan sido tratadas. Comparando los niveles de expresión de los genes de interés con los niveles de expresión de GAPDH se identificó la cantidad de expresión relativa de estos genes.

Para realizar esta cuantificación relativa se utilizó el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , en este método se toma en cuenta el valor de CT (cycle threshold) detectado por la máquina. Durante la PCR cuantitativa se aplicaron a las muestras una gran cantidad de ciclos de amplificación, en nuestro caso se aplicaron 45 ciclos. La sonda se unirá de manera específica a la secuencia de ADN y esta unión provocará que se libere el quencher y se emita fluorescencia, la cual será detectada por la máquina; a mayor cantidad de copias del gen mayor número de sondas estarán unidas al mismo emitiendo fluorescencia. El valor de CT es el ciclo de amplificación en el que el nivel de fluorescencia de la sonda detectado por la máquina es superior al ruido de fondo, es decir, la secuencia de ADN se va amplificando conforme pasan los ciclos, el ciclo en el que haya suficientes copias del gen para que la máquina detecte la fluorescencia será el valor de CT. A mayor cantidad de ADN menor será el valor de CT, pues si hay más copias del gen (se ha expresado más) se llegará antes a la intensidad de fluorescencia necesaria para que la máquina la diferencie del ruido de fondo.

El método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  permite cuantificar la cantidad de material genético de interés presente en la muestra comparando los valores de CT de la muestra problema con los valores de CT del gen de referencia, siendo en este caso el GAPDH. El programa estadístico utilizado fue GraphPad Prism, se analizaron los datos mediante el test estadístico no paramétrico test de Mann-Whitney comparando todas las condiciones con respecto al control y entre las diferentes condiciones.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

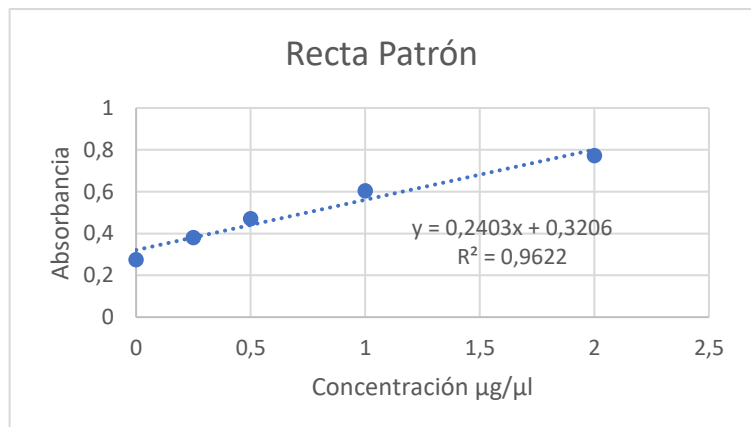
El objetivo principal de este TFM ha sido la generación de biomodelos obtenidos a partir de células iPSCs para el estudio de la citotoxicidad mediada por las histonas extracelulares y su implicación en la fisiopatología de la sepsis. Para ello se aisló un pool de histonas fisiológicas a partir de cultivos de células HeLa; en paralelo, se cultivaron y diferenciaron IPCSs con la finalidad de obtener una monocapa de cardiomiocitos y un organoide de riñón.

### 4.1 Extracción y cuantificación de histonas

A partir del cultivo de células HeLa se obtuvieron los pellets de células de los que se extrajeron las histonas. Mediante los resultados del ensayo Bradford pudimos cuantificar la concentración de histonas extracelulares en los extractos purificados.

Cuantificamos las histonas mediante espectrofotometría obteniendo el valor de absorbancia para las concentraciones de muestras de seroalbúmina bovina (BSA) conocidas, con ellos calculamos la recta patrón. También obtuvimos el valor de absorbancia de los extractos de histonas purificados, donde estaban las histonas extraídas, y mediante la interpolación con la recta de calibrado calculamos la concentración de histonas de la muestra (Figura 4).

Recta patrón	
Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Media absorbancia
0	0,275966667
0,25	0,380533333
0,50	0,471933333
1	0,603866667
2	0,771966667
Pendiente	Ordenada en el origen
0,2403	0,3206



Muestra	
Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Media absorbancia
1,705229574	0,730366667

Concentraciones usadas en el experimento	Volumenes finales $\mu\text{l}$
Para 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	29,32156512
Para 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$	43,98234768

**Figura 4:** Recta patrón y absorbancia calculada de la muestra de histonas.

En la parte superior, tabla de la izquierda se observan los valores con los que se calculó la recta patrón, así como la pendiente y la ordenada en el origen de la misma. A la derecha, recta patrón.

En la parte inferior, tabla de la izquierda, figura la media de la absorbancia de las tres réplicas obtenidas de la muestra con histonas extraídas y la concentración de histonas en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  calculada a partir de la ecuación de la recta patrón.

En la tabla de la derecha se indican las concentraciones de histonas más utilizadas en los experimentos, siendo 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en un volumen total de 500  $\mu\text{l}$ . También se indica el volumen de histonas total necesario para cada condición.

La concentración del pool de histonas extracelulares fue de 1,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , una vez conocido este dato se pudo calcular la cantidad de volumen necesario para realizar los tratamientos de citotoxicidad mediada por las histonas extracelulares en los cardiomiocitos.

Para los tratamientos en varias condiciones se prepararon diferentes concentraciones de histonas, concretamente aplicamos histonas a 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y a 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Estas concentraciones se corresponden a niveles previamente medidos en pacientes con sepsis.

#### **4.2 Confluencia celular adecuada para el cultivo de células madre**

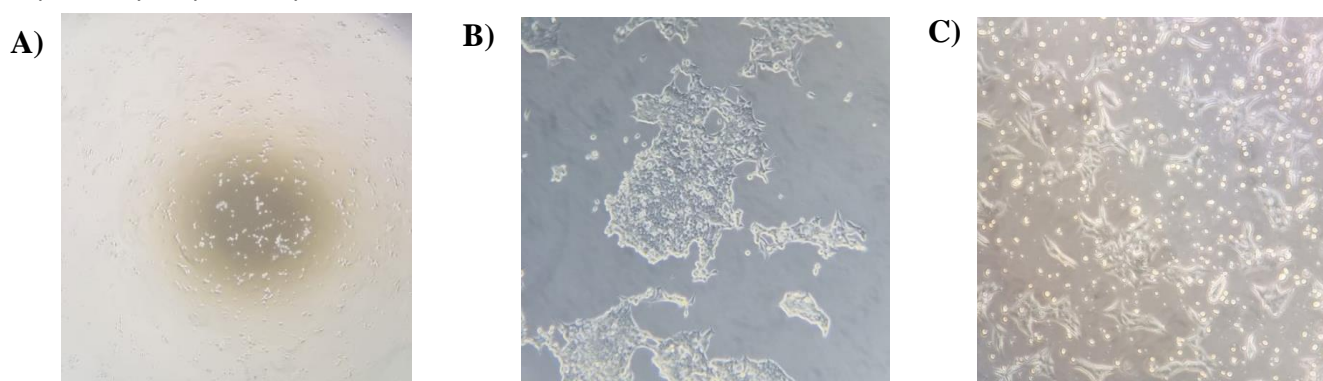
Las iPSCs son células muy sensibles, por lo que la confluencia celular, es decir, la cantidad de células que hay en la superficie del pocillo, es un factor muy importante a tener en cuenta. Uno de los problemas iniciales fue que, al realizar pases de mantenimiento normales para mantener o expandir el cultivo de iPSCs, las células no sobrevivían.

Una de las dificultades fue conseguir identificar el porcentaje de confluencia celular necesario para realizar el pase celular. Tanto un pase a baja densidad de número de células como un pase con elevada densidad celular producía efectos negativos en las células, provocando tanto, muerte celular en el pocillo en el que estaban como menor tasa de supervivencia en el nuevo pocillo.

Inicialmente se realizó el pase una vez se identificaba, mediante el microscopio, que la confluencia celular era de alrededor del 80%. Lo siguiente que se probó fue realizar un pase celular a distintos periodos entre pase y pase, siguiendo siempre el mismo protocolo. Después de varios intentos se comprobó que cuando más sobrevivían las células era dejando un período de 2-3 días entre pase y pase, por lo que se realizaron dos pases a la semana.

La densidad celular que finalmente se evaluó para ver la mayor tasa de supervivencia en las células iPSCs fue de 70.000, 100.000 y 150.000 células por pocillo, en placas de 6 pocillos.

Se comprobó que la mejor densidad celular en placas de 6 pocillos fue de 100.000 células por pocillo y que el mejor periodo de mantenimiento entre los pases fue de 2-3 días (*Figura 5*). Los pases celulares de mantenimiento se realizan en placas de 6 pocillos, hasta que se empezó un proceso de diferenciación a cardiomiocitos, momento en el que las iPSCs se pasaron a placas de 12 pocillos. Realizando los pases siguiendo estas condiciones se consiguió tener suficientes células para poder pasarlas a 8 pocillos en una placa de 12 pocillos y empezar el proceso de diferenciación.



**Figura 5:** Imágenes de células iPSCs en cultivo vistas mediante microscopía óptica de campo claro. Las imágenes se tomaron utilizando el microscopio LEICA DMI1 CAMERA STAND, con la lente de aumento de 10X. El programa utilizado fue Leica Application Suite (LAS).

**A)** Células iPSCs prácticamente recién sembradas. Las células se están acomodando a la nueva superficie, aún presentan morfologías muy redondeadas y no forman grandes colonias, están dispersas por la superficie del pocillo.

**B)** Células iPSCs en una confluencia óptima formando colonias. Ya no se ven las células individualmente, es difícil distinguir cuando acaba una y empieza la siguiente; presentan la morfología alargada característica.

**C)** Células iPSCs llegando a una confluencia demasiado alta, las colonias empiezan a estar muy próximas unas a otras. Se pueden ver tanto células con morfología alargada, adheridas y formando colonias, como células muertas las cuales presentan morfología redondeada y están flotando en la suspensión.

### **4.3 Generación de cardiomiocitos y ensayos de citotoxicidad**

#### **4.3.1 Seguimiento mediante imágenes tomadas por microscopía óptica del proceso de diferenciación de las células iPSCs humanas a cardiomiocitos maduros**

Una vez las células iPSCs fueron sembradas en la placa de 12 pocillos se empezó la diferenciación hacia cardiomiocitos. La diferenciación empieza en el día -2, en los días -2 y -1 las células aún eran iPSCs normales (*Figura 6A*), en el día 0 alcanzaron más del 95% de confluencia, concentración necesaria para empezar la diferenciación.

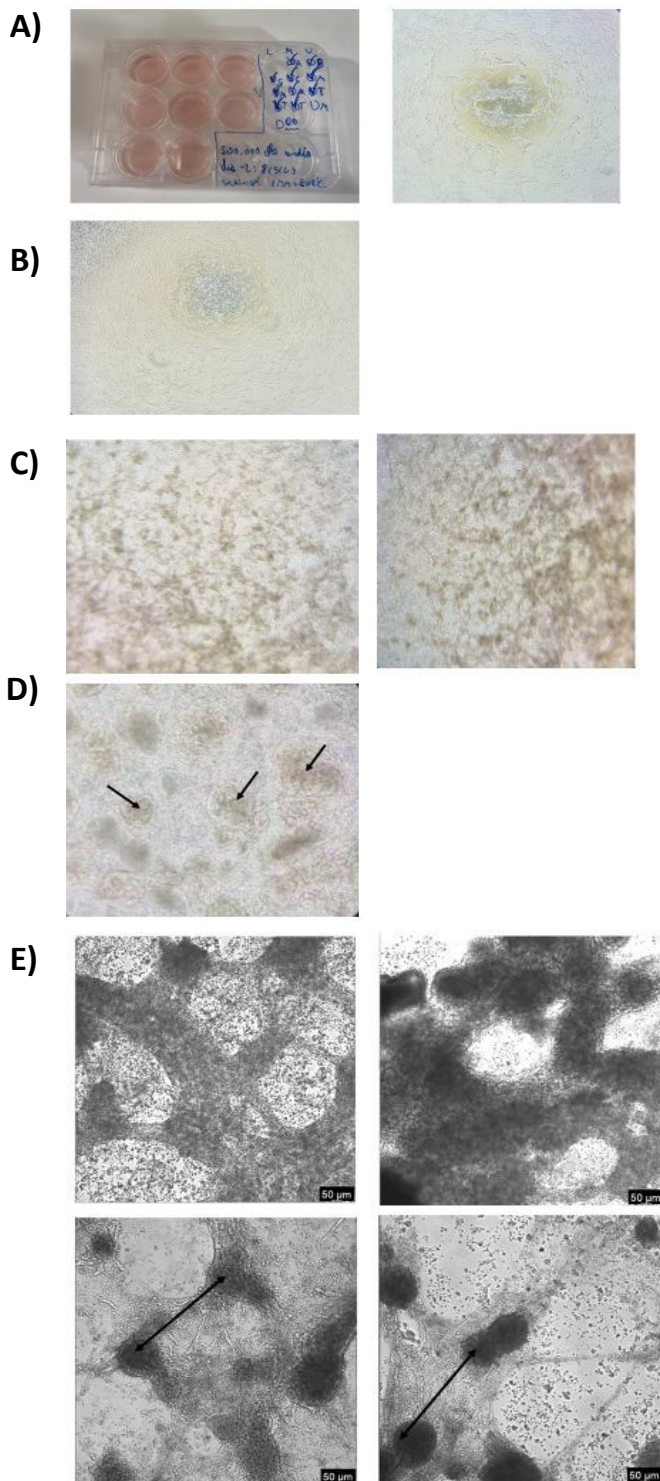
En el día 0 es cuando se empezaron a aplicar factores de diferenciación, el primer cambio que observamos es que las células dejaron de tener su estructura *fibroblast-like* característica y distribución en colonias, pasando a formar una única monocapa de células que recubría toda la superficie del pocillo (*Figura 6B*).

En los siguientes días las células empezaron a mostrar características de cardiomiocitos, se observaban grupos más densos de células conectados entre sí, e incluso cambio de color al visualizarlos con el microscopio óptico, utilizando la microscopía óptica de campo claro. Además, consumían una mayor cantidad de recursos del medio de cultivo, así como al cultivar las iPSCs el medio de cultivo mantenía el tono rosado, al cultivar cardiomiocitos era normal que el medio pasará a un color más amarillento, debido a que los cardiomiocitos tienen una actividad más intensa (*Figura 6C*).

En el día 15 se había completado la primera fase de la diferenciación, las células pasaron a ser células con características similares a cardiomiocitos fetales. Se empezó a detectar que las células se habían organizado en pequeñas fibras o cúmulos y latían por sí mismas (*Figura 6D*).

Llegados al día 25 habíamos completado el proceso de diferenciación. Los cardiomiocitos maduros presentaban una morfología parecida a los cardiomiocitos fetales, la diferencia es que las fibras o grumos que formaban los cardiomiocitos maduros eran de mayor tamaño, si se expandían lo suficiente podían incluso llegar a conectarse diferentes fibras o cúmulos densos de células entre sí, en estos casos se podía observar como la frecuencia del latido llegaba a sincronizarse. La contracción de las células al latir también era más intensa, haciéndola más visible (*Figura 6E*) ([Video: cardiomiocitos maduros diferenciados a partir de iPSCs humanas latiendo](#)).





**Figura 6:** Imágenes captadas a lo largo de los diferentes días del proceso de la diferenciación de las iPSCs hacia cardiomiocitos.

**A)** En la imagen de la izquierda, placa de 12 pocillos donde se cultivaron las células iPSCs durante todo el proceso de diferenciación hacia cardiomiocitos. En ella se indican los diferentes días que se realizó el cambio de medio y el tipo de medio o factor aplicado en cada caso (A: Medio diferenciación + suplemento A; B: Medio diferenciación + suplemento B; C: Medio diferenciación + suplemento C; M: Medio mantenimiento; T: Medio mantenimiento + Torin). También está indicada la fecha de inicio de la diferenciación, contando como primer día el día -2 y el número de células que fueron sembradas por pocillo, 500.000 células por pocillo. Imagen de la derecha, células iPSCs vistas mediante microscopía óptica de campo claro en el día -1 en proceso de alcanzar el 95% de confluencia. Las células aún son iPSC normales, no se ha empezado el proceso de diferenciación; aún se pueden observar espacios vacíos entre grupos de células.

**B)** Imagen tomada con microscopía óptica de campo claro. Células iPSCs que han empezado la diferenciación hacia cardiomiocitos. Las células presentan una estructura en monocapa, ya no se observan espacios entre grupos de células.

**C)** Imágenes tomadas con microscopía óptica de campo claro. iPSCs empezando a ser cardiomiocitos. Se observan grupos de células más densos, las células empiezan a estructurarse y conectarse entre sí formando "fibras". Se ha producido un cambio de color, las iPSCs son totalmente transparentes al observarlas con el microscopio óptico, los cardiomiocitos suelen presentar un color más marrón.

**D)** Imagen tomada por microscopía óptica de campo claro de cardiomiocitos con características similares a cardiomiocitos fetales. En la imagen se puede ver como las células se han organizado en cúmulos de pequeño tamaño, las flechas indican diferentes cúmulos de cardiomiocitos que laten a su propio ritmo, independientemente del resto de cúmulos de la muestra. Las imágenes A)-D) se tomaron utilizando el microscopio LEICA DMI1 CAMERA STAND, con la lente de aumento de 10X. El programa utilizado fue Leica Application Suite (LAS).

**E)** Imágenes tomadas por microscopía óptica de campo claro utilizando el microscopio óptico de células viva-FRET, DMi8 LEICA, con la lente de aumento 10X y el software de adquisición fue el LASX. Los cardiomiocitos maduros forman estructuras de mayor tamaño que los cardiomiocitos fetales, y el latido es de mayor intensidad. En las dos primeras imágenes se observan cardiomiocitos maduros agrupados formando cúmulos densos de células, en las dos fotos inferiores se pueden observar cardiomiocitos maduros formando estructuras similares a fibras. En el estadio anterior de cardiomiocitos fetales los grupos de célula son más pequeños y laten de manera independiente, en los cardiomiocitos maduros, como se puede ver en las imágenes, los grupos de células son tan grandes que han llegado a conectarse entre sí, produciendo que el latido ocurra de manera sincronizada. Las flechas muestran acumulaciones de cardiomiocitos unidas por estructuras fibrilares y latiendo de manera sincrónica.



#### **4.3.2 Caracterización mediante inmunofluorescencia**

En la primera diferenciación, para caracterizar si las iPSCs se habían diferenciado correctamente a cardiomiocitos se realizó un análisis de inmunofluorescencia mediante el uso de anticuerpos específicos con la finalidad de detectar mediante microscopía confocal la presencia de tres proteínas características del músculo cardíaco: la actinina- $\alpha$ , GATA-4 y la troponina T cardíaca (cTnT).

La actinina- $\alpha$ , es una proteína de unión a la actina que se encuentra formando el sarcómero, concretamente se localiza en la línea Z. Esta proteína se expresa débilmente en los estadios iniciales del desarrollo de los cardiomiocitos, siendo una de las proteínas que se expresa en las etapas más tempranas en el desarrollo, al igual que proteínas fundamentales para el funcionamiento de la contracción del sarcómero como la actina, miosina y la tropomiosina (41, 42, 46, 50).

La expresión de estas proteínas aumenta a medida que se avanzó la diferenciación, coincidiendo con cambios en la expresión de otros filamentos intermedios, teniendo utilidad como marcador del grado de diferenciación, así como de la maduración morfofuncional de la célula cardíaca (46, 50).

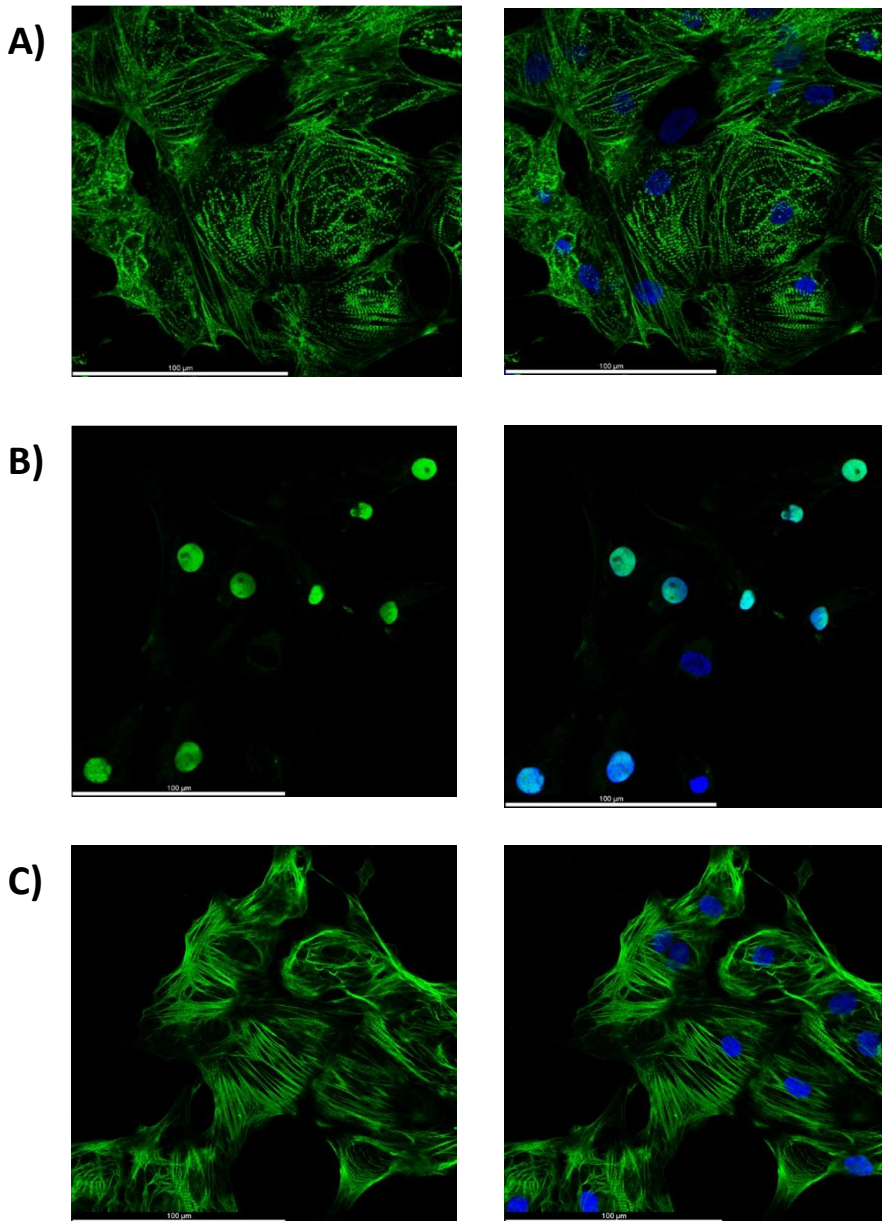
Gata-4 es un factor de transcripción, situado en el núcleo celular, que regula genes implicados en la diferenciación y función del miocardio. Esta proteína se encuentra expresada en el endodermo visceral y definitivo, y en el mesodermo cardíaco; es una de las proteínas reguladoras clave de linaje que está implicada en el inicio de la diferenciación cardíaca (50).

Gata-4 tiene un papel fundamental en el desarrollo de los cardiomiocitos, es un promotor del desarrollo cardíaco, que actúa junto a otras proteínas como regulador transcripcional reclutando a otros factores de transcripción y alterando la expresión de genes necesarios para el desarrollo a cardiomiocito, así como el desarrollo normal del corazón y la contracción muscular, además, también actúa reprimiendo genes que inducen a otros destinos celulares, por ejemplo, genes implicados en el desarrollo endotelial (41, 42, 45, 51).

La troponina T cardíaca es una proteína de unión a tropomiosina característica del tejido cardíaco implicada en la regulación de la contracción muscular, formada por una parte soluble libre en el citoplasma y otra unida al sistema fibrilar, concretamente se une a la tropomiosina. La detección de la isoforma cardíaca de la troponina T, cTnT, se utiliza para cuantificar el grado de desarrollo de los cardiomiocitos (41, 42, 44, 51). Además, en la práctica clínica el análisis de la presencia de troponina T cardíaca en sangre también es utilizado como medidor de daño cardíaco (46).

En nuestro caso, para realizar la caracterización de los cardiomiocitos, se marcaron células de diferentes pocillos con anticuerpos específicos contra estas proteínas; todas las células provenían de una misma población, en cada pocillo se utilizó un tipo de anticuerpo primario diferente y en todos se utilizó anticuerpo secundario que emitía fluorescencia verde.

Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia confocal (Figura 7), mostraron la expresión de las 3 proteínas en la población celular, lo que nos permite confirmar que las iPSCs se han diferenciado correctamente a cardiomiocitos. La actinina- $\alpha$  (Figura 7A) se observa en el citoplasma formando parte de la estructura del sarcómero, pudiendo verse incluso las diferentes líneas Z que lo forman. La Gata-4 (Figura 7B) la podemos detectar marcando el núcleo celular de los cardiomiocitos. Por último, la troponina T (Figura 7C) cardíaca se puede observar en el citoplasma celular unida a los filamentos del citoesqueleto de los cardiomiocitos. Todas las muestras también presentan marcaje con DAPI, el cual está incluido en el medio de montaje.



**Figura 7:** Imágenes de las células pertenecientes a la diferenciación 1 tomadas por microscopía de fluorescencia confocal. Todas las fotos se tomaron a partir de cardiomiocitos maduros pertenecientes a una misma población celular. La caracterización se realizó utilizando el microscopio confocal Espectra Leica TCS sp8 y el aumento 40X, para el cual fue necesario aplicar el aceite de inmersión. En cuanto al análisis de las imágenes, el software de adquisición y análisis utilizado fue el LAS X Life Science. Las imágenes se tomaron en un mismo plano Z, tomándose imágenes de varios campos representativos de la muestra.

**A)** Las células han sido marcadas con anticuerpo anti-actinina- $\alpha$  (verde) y DAPI (azul). A la izquierda, se observa la actinina- $\alpha$  en el citoplasma celular, concretamente formando las líneas Z de los sarcómeros. A la derecha, podemos ver tanto la actinina- $\alpha$  como el marcaje nuclear con DAPI.

**B)** Las células han sido marcadas con anticuerpo anti-Gata4 (verde) y DAPI (azul). A la izquierda, se observan los núcleos de las diferentes células marcados en verde debido a la presencia de Gata-4, el cual es un factor de

transcripción con localización nuclear. A la derecha, podemos ver tanto la presencia de Gata-4 como el marcaje nuclear con DAPI; en este caso los dos colores coinciden debido a que tanto la proteína como el marcaje se localizan en el núcleo.

**C)** Las células han sido marcadas con anticuerpo anti-cTnT (verde) y DAPI (azul). A la izquierda, se observa la troponina T cardíaca, cTnT, en el citoplasma celular, las formas fibrilares que se observan son debidas a que se encuentra unida a los filamentos del citoesqueleto de las diferentes células. A la derecha, podemos ver tanto la troponina T cardíaca como el marcaje nuclear con DAPI.

### **4.3.3 Caracterización mediante detección de troponina por citometría de flujo**

Para las siguientes diferenciaciones se utilizó el ensayo de detección de troponina por citometría de flujo para caracterizar a los cardiomiocitos adultos diferenciados a partir de las células madre iPSCs. Este ensayo se basa en la expresión de troponina, una proteína característica del músculo cardíaco, por lo que si las células expresan en su citoplasma la proteína podemos confirmar que se han diferenciado correctamente (36). Para ello se necesitan un mínimo de 10.000 eventos por muestra registrados con el citómetro y una expresión de 80% o más de troponina, lo que indica que el 80% de las células de la muestra son cardiomiocitos. En todos los experimentos se utilizaron dos condiciones, un control negativo sin anticuerpo primario anti-troponina y la muestra problema, el control negativo se utilizó como referencia para calcular el porcentaje de expresión relativa de troponina de las muestras, es decir, el citómetro tomaba como valor 0 de expresión el nivel de troponina detectado en el control negativo y a partir de ese valor calculaba el porcentaje de expresión de troponina de las muestras.

Se caracterizaron varias diferenciaciones (*Tabla 6*), en la primera diferenciación se sembraron de inicio 500.000 células por pocillo en 8 pocillos en una placa de 12 pocillos. Para el experimento se juntaron las células de los 8 pocillos y se separaron un total de 200.000 células por condición. En este ensayo el porcentaje de señal de troponina no alcanzó el 80% necesario, por lo que no se pudo confirmar que eran cardiomiocitos (diferenciación 1 porcentaje troponina: 8,8%; *Tabla 6*).

Uno de los principales problemas que surgieron con el primer experimento fue que los cultivos de células presentes en los diferentes pocillos de la placa de 12 pocillos no eran homogéneos, es decir, en unos pocillos se observaban más células que latían que en otros, por lo que al juntarlos la cantidad de cardiomiocitos correctamente diferenciados estimada era mucho menor. Para intentar evitar este problema en la siguiente diferenciación se levantaron y se sembraron las células de los diferentes pocillos por separado, de igual manera se realizó la detección de troponina para las células provenientes de cada pocillo de manera independiente, para comprobar si había pocillos donde se había realizado correctamente la diferenciación y en otros no, y de esta manera poder ir descartando los que no estaban correctamente diferenciados.

En este caso, al no juntar las células, teníamos una menor cantidad de células para realizar los experimentos posteriores, por lo que sembramos 100.000 células por control negativo y por muestra problema. El problema fue que al dividir tanto las células, el número de eventos (células) era demasiado bajo, no llegando a los 10.000 eventos por condición, aunque los valores de expresión de troponina aumentaron, viendo los resultados no se pudo confirmar que fueran cardiomiocitos la totalidad de las células diferenciadas (diferenciación 2 porcentaje troponina: 47,3%, 68,1%, 36,3%; *Tabla 6*).

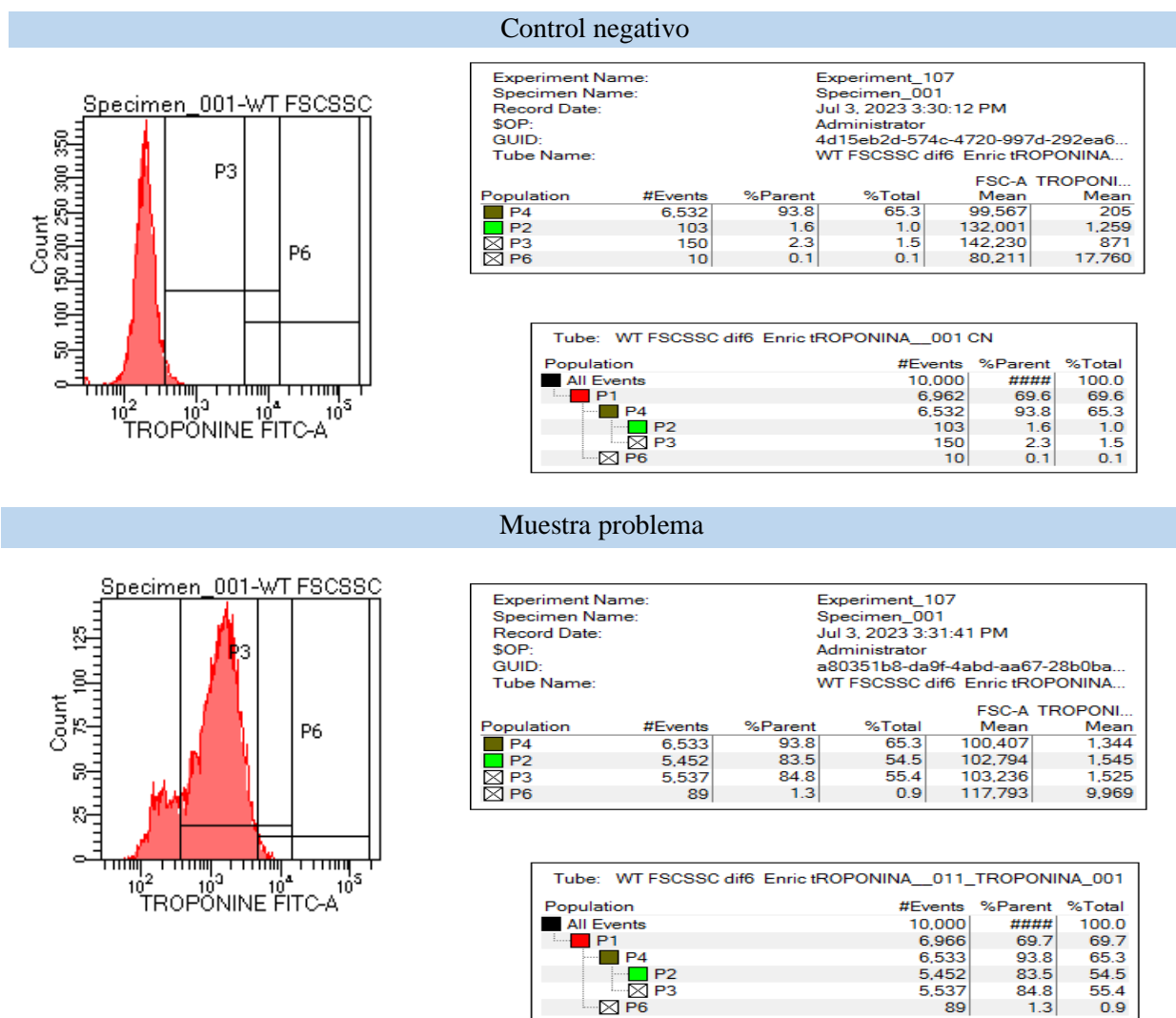
Debido a que al caracterizar los pocillos de manera independiente no se alcanzó el número de eventos necesarios para el ensayo, ni se garantizaba que el porcentaje de expresión de troponina fuera un éxito, para la siguiente diferenciación se juntaron todas las células de los pocillos en los que se observaba un mayor porcentaje de latido. Se obtuvo un porcentaje de troponina aún insuficiente para confirmar el éxito de la diferenciación, pero se llegó sin problema al número de eventos necesarios (diferenciación 3 porcentaje troponina: 39,5%; *Tabla 6*).

Para la siguiente diferenciación se realizó la prueba de troponina siguiendo los mismos parámetros, juntar las células de todos los pocillos donde se observó un gran porcentaje de latido y separar 200.000 células por condición. La diferencia fue el número de células sembrado en un principio en la placa de 12 pocillos del inicio de la diferenciación, así como en el protocolo original se sembraban 500.000 células por pocillo, en este caso se sembraron 450.000 células por pocillo en una placa de 12 pocillos. El resultado fue considerablemente mejor, aproximándose al 80% de expresión de troponina (diferenciación 4 porcentaje troponina: 59,1%; *Tabla 6*).

Al analizar los resultados de la última diferenciación se comprobó que al sembrar una menor cantidad de

células al inicio de la diferenciación el resultado de la caracterización fue mejor, acercándose más al 80%. Por este motivo, para la diferenciación posterior se siguieron las mismas condiciones anteriores, pero reduciendo el número de células sembradas al inicio de la diferenciación, se sembraron 400.000 células por pocillo en la placa de 12. Finalmente, se obtuvo un resultado exitoso de 84,8% (Figura 8) de expresión de troponina, por lo que se pudo confirmar que en este caso la diferenciación a cardiomiocitos se había realizado correctamente (diferenciación 5 porcentaje troponina: 84,8%; Tabla 6). La siguiente diferenciación se repitió siguiendo los mismos parámetros, obteniendo también resultados positivos (diferenciación 6 porcentaje troponina: 88,6%; Tabla 6).

Con los cardiomiocitos obtenidos en las diferentes diferenciaciones realizadas se llevaron a cabo ensayos de análisis del tipo de muerte celular por anexina- yoduro de propidio y análisis de expresión génica mediante PCR-cuantitativa después de aplicarles el tratamiento con histonas; se realizaron las pruebas de citotoxicidad teniendo en cuenta que el resultado no siempre alcanzó el 80% de detección de troponina.



**Figura 8:** Histogramas y tabla de resultados obtenidos del citómetro de la diferenciación 5. En la parte superior se encuentran los valores del control negativo y en la parte inferior los de la muestra problema. En el histograma se refleja la intensidad de fluorescencia, directamente asociada con la expresión de troponina, para que la intensidad de fluorescencia sea válida tiene que detectarse en la muestra problema un valor de fluorescencia superior al detectado en el control negativo. En cuanto a la tabla, tanto el valor de P2 como P3 indican el porcentaje de troponina detectada en la muestra. En "All events" se indica la cantidad de células captadas por el citómetro. El citómetro utilizado fue LSRFortesa X20 (ref: 658226R1; LSRFortesa X20; Becton, Dickinson and Company, B.D.; San José; Estados Unidos), el software de análisis empleado fue DIVA 8.

Los resultados de la muestra problema indican que el porcentaje de células que expresan troponina es del 84,8%, alcanzando el 80% necesario para poder confirmar que la diferenciación ha sido un éxito y las células eran cardiomiocitos.

**Tabla 6:** Resultados de las caracterizaciones mediante la detección de la expresión de troponina de las diferentes diferenciaciones. Los valores fueron obtenidos a partir del citómetro LSRFortesa X20 (ref: 658226R1; LSRFortesa X20; Becton, Dickinson and Company, B.D.; San José; Estados Unidos), el software de análisis empleado fue DIVA 8.

En la tabla se muestran los valores del porcentaje de troponina detectado y el número de eventos (células) analizados para los controles negativos (muestra con cardiomiocitos sin aplicar el anticuerpo primario anti-troponina) y las muestras problemas (muestra con cardiomiocitos en los que se quiere detectar la intensidad de expresión de troponina).

Diferenciación	Tipo de muestra	% Troponina	Nº eventos
1	Control negativo	1,5	2.166
1	Muestra Troponina	8,8	2.789
2 (pocillo 2)	Control negativo	0,9	3.775
2 (pocillo 2)	Muestra Troponina	47,3	5.221
2 (pocillo 5)	Control negativo	6,1	7.103
2 (pocillo 5)	Muestra Troponina	68,1	3.807
2 (pocillo 6)	Control negativo	39,9	2.070
2 (pocillo 6)	Muestra Troponina	36,3	3.090
3	Control negativo	2	10.000
3	Muestra Troponina	39,5	10.000
4	Control negativo	3,6	4.685
4	Muestra Troponina	59,1	16.877
5	Control negativo	2,3	10.000
5	Muestra Troponina	84,8	10.000
6	Control negativo	4,6	10.000
6	Muestra Troponina	88,6	10.000

#### 4.3.4 Evaluación de la citotoxicidad por ensayo del MTT

Una vez se completó la caracterización de los cardiomiocitos, se procedió a la evaluación de la citotoxicidad mediada por las histonas extracelulares, se hizo un ensayo MTT. La presencia de elevadas concentraciones de histonas y su efecto sobre los cardiomiocitos se ha descrito previamente en trabajos en el ámbito del infarto de miocardio (52).

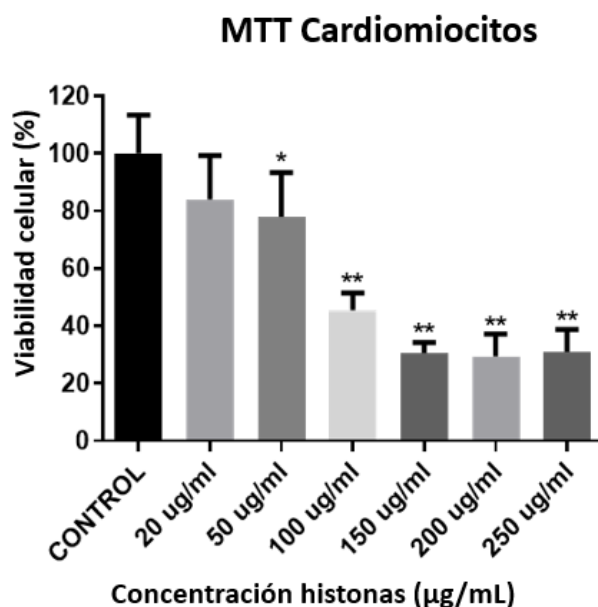
En la bibliografía se han descrito en ratones durante infarto de miocardio concentraciones de histonas por encima de los niveles normales, además, si se trata un cultivo primario de cardiomiocitos de ratón durante 1 hora con histonas la muerte celular aumenta significativamente (52). En nuestro laboratorio también se han realizado ensayos de citotoxicidad con histonas en células endoteliales humanas, en concreto con cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), con estos ensayos se detectó que la presencia de elevadas concentraciones de histonas, se activan procesos inflamatorios en las células dando lugar a muerte celular por apoptosis a través de mecanismos similares a los descritos en la sepsis (33, 53).

Se realizó un ensayo MTT para ver si los cardiomiocitos humanos también morían después de tratarlos con

histonas extracelulares. Este experimento se llevó a cabo con los cardiomiocitos obtenidos de la primera diferenciación y las concentraciones de histonas utilizadas fueron 20  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 150  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$  y 250  $\mu\text{g/ml}$  y una condición control con 0  $\mu\text{g/ml}$ , en un volumen total de 150  $\mu\text{l}$  por pocillo en una placa de 96 pocillos. En cuanto al tiempo de incubación seguimos el tiempo descrito en el cual se detecta daño celular por histonas en cultivos primarios de células cardíacas de ratón, 1 hora y 30 minutos de incubación con histonas (52).

Con el ensayo MTT (Figura 9) se comprobó que la viabilidad de los cardiomiocitos disminuía después del tratamiento con histonas de manera dependiente de la dosis. Analizando los datos se vio que partir de la concentración de histonas 50  $\mu\text{g/ml}$  había una diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad con respecto al grupo control, 0  $\mu\text{g/ml}$ ; otro valor importante es el de 100  $\mu\text{g/ml}$  de histonas, en esta condición vimos que se morían alrededor del 50% de células de la muestra. A partir del valor 150  $\mu\text{g/ml}$  el porcentaje de viabilidad se mantiene estable, y no se incrementó mucho más al aumentar la concentración de histonas extracelulares.

Los siguientes experimentos de citotoxicidad, se realizaron con las condiciones de 100  $\mu\text{g/ml}$  y de 150  $\mu\text{g/ml}$  de histonas extracelulares ya que consiguieron producir alrededor de un 50% de muerte celular. En cuanto al tiempo de tratamiento se siguió aplicando durante 1 hora y 30 minutos en los posteriores ensayos.



**Figura 9:** Valores de viabilidad obtenidos a partir de la prueba MTT realizada sobre cardiomiocitos expuestos a altas concentraciones de histonas durante 1 hora y 30 minutos. Las concentraciones utilizadas fueron 20  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 150  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$  y 250  $\mu\text{g/ml}$  y una condición control con 0  $\mu\text{g/ml}$  de histonas, en un volumen total de 150  $\mu\text{g/ml}$  por pocillo en una placa de 96 pocillos. Para medir la absorbancia se utilizó el espectrofotómetro Spectra Max PLUS 384 (Spectra max PLUS 384; Molecular Devices, San José, CA; Estados Unidos) y el software de análisis utilizado fue el SoftMax Pro 6.2.2.

Los porcentajes de viabilidad en las diferentes condiciones se obtuvieron calculando la media de la absorbancia de los controles, 0  $\mu\text{g/ml}$  de histonas, y tomando ese valor como el 100% de viabilidad celular. Posteriormente se referenciaron todos los valores de absorbancia de las 7 réplicas de las diferentes condiciones con ese valor para obtener un porcentaje de viabilidad relativo de cada muestra. Los resultados se representan como la media y las barras de error referencian la desviación típica de los datos. Todas las condiciones han sido referenciadas por separado con la media de la viabilidad de la condición control, concretamente mediante el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney. Los asteriscos de la gráfica indican cuando la condición presenta una diferencia significativa con respecto al control, 0  $\mu\text{g/ml}$ ; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

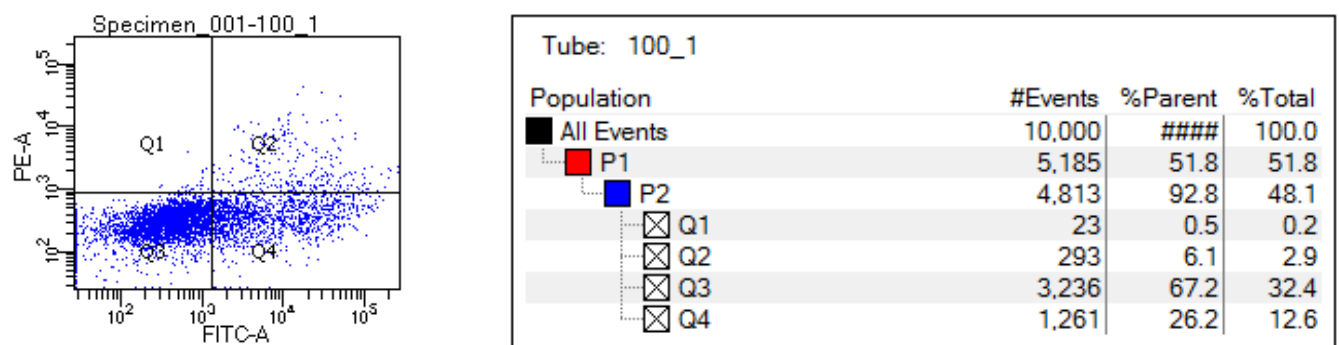


#### 4.3.5 Ensayos de citotoxicidad celular con histonas: anexina-V/yoduro de propidio

En el ensayo MTT se comprobó que al tratar los cardiomiocitos con histonas se provoca muerte celular y en que concentraciones se morían. En este segundo experimento se analizó el tipo de muerte celular para comprobar si el tratamiento con histonas desembocaba en procesos inflamatorios y apoptóticos similares a los descritos en sepsis, se tenía un principal interés en el porcentaje de apoptosis secundaria o tardía.

Las concentraciones de histonas utilizadas en todos los experimentos fueron tres: un control con 0 µg/ml de histonas; una segunda condición con 100 µg/ml, concentración en la que el ensayo MTT se detectó un 50% de mortalidad; y una tercera condición a 150 µg/ml concentración en la que se detectó que el porcentaje de viabilidad no aumentó mucho más al aumentar la concentración de histonas extracelulares (Figura 9).

En las tablas obtenidas de la citometría (Figura 10) se indicaba: el porcentaje de células vivas, cuadrante Q3 (negativas para anexina V e yoduro de propidio); el porcentaje de células en apoptosis primaria, cuadrante Q4 (positivas para anexina V y yoduro de propidio); el porcentaje de células en apoptosis secundaria, cuadrante Q2 (positivas para anexina V); y el porcentaje de células en necrosis, cuadrante Q1 (positivas para yoduro de propidio). Las células se registraban en un cuadrante u otro dependiendo de la intensidad de fluorescencia y el número de eventos óptimo para el experimento era de 10.000 eventos por muestra.



**Figura 10:** Gráfica y tabla obtenidas mediante citometría de flujo. Valores obtenidos de una muestra de cardiomiocitos tratados con una concentración de 100 µg/ml de histonas durante 1 hora y 30 minutos. Los valores fueron obtenidos a partir del citómetro LSRFortesa X20 (ref: 658226R1; LSRFortesa X20; Becton, Dickinson and Company, B.D.; San José; Estados Unidos), el software de análisis empleado fue DIVA 8.

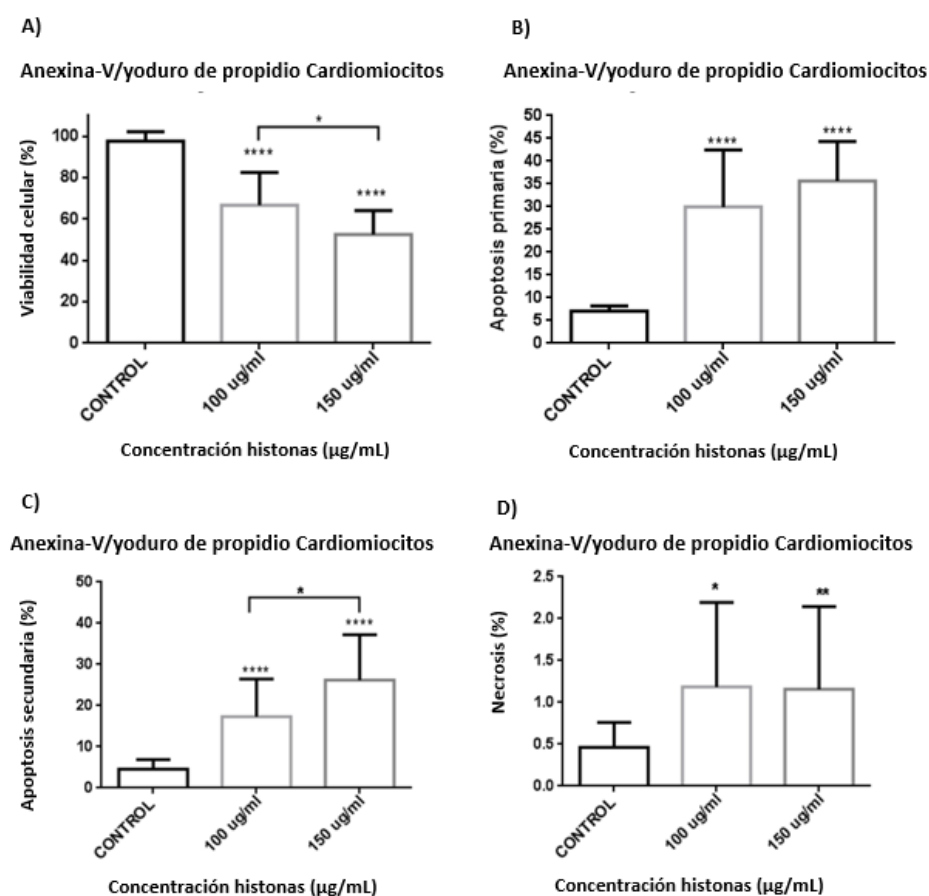
La gráfica de la derecha está dividida en cuatro cuadrantes. Dependiendo de la intensidad de fluorescencia de la anexina-V y el yoduro de propidio, la célula analizada quedará registrada en uno de ellos. Cada punto de la gráfica hace referencia a un evento (célula). En el cuadrante 1, Q1, se encuentran las células en necrosis; en el cuadrante 2, Q2, las células en apoptosis secundaria; en el cuadrante 3, Q3, las células en apoptosis primaria, y en el cuadrante 4, Q4, las células vivas.

La tabla de la derecha se calcula a partir de los datos la gráfica, se puede ver el porcentaje de células que se encuentra en cada uno de los cuatro cuadrantes; así como el número de eventos registrados. En este caso se detectó un porcentaje del 67,2% de células vivas, del 26,2% de células en apoptosis primaria, del 6,1% de células en apoptosis secundaria y del 0,5% de células en necrosis.

Se realizaron estos experimentos para las distintas muestras obtenidas de las diferenciaciones a cardiomiocitos, pese a no alcanzar el 80% de expresión de troponina necesario para poder afirmar que más del 80% de las células eran cardiomiocitos en la mayoría de los casos (Tabla 6). Se obtuvieron resultados similares en todos ellos, independientemente del tanto por cien de troponina, además, las células se morían en el mismo tiempo de tratamiento que los cardiomiocitos correctamente caracterizados en los que se realizó la MTT y presentaban porcentajes muy similares de viabilidad y muerte celular.

Una vez se realizaron todos los ensayos de análisis de tipo de muerte celular por anexina-V yoduro de propidio para poder calcular los porcentajes de viabilidad y tipo de muerte celular se referenciaron los valores obtenidos de las diferentes muestras con respecto a la media del control, se tomó la media de todos los valores del control como el 100% de viabilidad y se compararon los valores obtenidos con respecto a ese 100% para calcular los porcentajes relativos de cada muestra. A continuación, se unificaron todos los valores de las diferentes muestras, para obtener los valores totales del experimento. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism para analizar los datos mediante el test estadístico no paramétrico test de Mann-Whitney, comparando todas las condiciones con respecto al control y entre ellas (*Figura 11*).

La gráfica obtenida de los datos de la viabilidad (*Figura 11A*) indicó que el porcentaje de viabilidad de las células tratadas con 100  $\mu\text{g/ml}$  y 150  $\mu\text{g/ml}$  de histonas disminuía significativamente con respecto al control, además, también se vieron diferencias significativas entre las condiciones 100  $\mu\text{g/ml}$  y 150  $\mu\text{g/ml}$ . En cuanto a la apoptosis primaria (*Figura 11B*) y secundaria (*Figura 11C*) se comprobó que ambas aumentaban de manera significativa a medida que se aumentaba la dosis de histonas. Además, se observaron diferencias significativas entre los grupos 100  $\mu\text{g/ml}$  y 150  $\mu\text{g/ml}$  en la apoptosis secundaria. Respecto a la necrosis (*Figura 11D*) los valores también aumentaban de forma significativa con respecto al control, aunque eran tan bajos que tenían una mayor variabilidad entre ellos.



**Figura 11:** Gráficas obtenidas a partir de los porcentajes de **A)** viabilidad, **B)** apoptosis primaria, **C)** apoptosis secundaria y **D)** necrosis analizados mediante la prueba de anexina-yoduro de propidio por citometría de flujo. Los datos fueron obtenidos con el citómetro LSRFortesa X20 (658226R1; LSRFortesa X20; Becton, Dickinson and Company, B.D.; San José; Estados Unidos), el software de análisis empleado fue DIVA 8.

El ensayo se llevó a cabo con una  $n$  de 3 (tres diferenciaciones diferentes) y un número de 11 réplicas para la condición control (0  $\mu\text{g/ml}$ ), 13 réplicas para la condición 100 $\mu\text{g/ml}$  y 11 réplicas para la condición 150  $\mu\text{g/ml}$ . Los resultados se representan como la media y las barras de error referencian la desviación típica de los datos. Los resultados se analizaron mediante un test estadístico no paramétrico test de Mann-Whitney. Los asteriscos indican que hay una diferencia significativa entre los grupos correspondientes, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

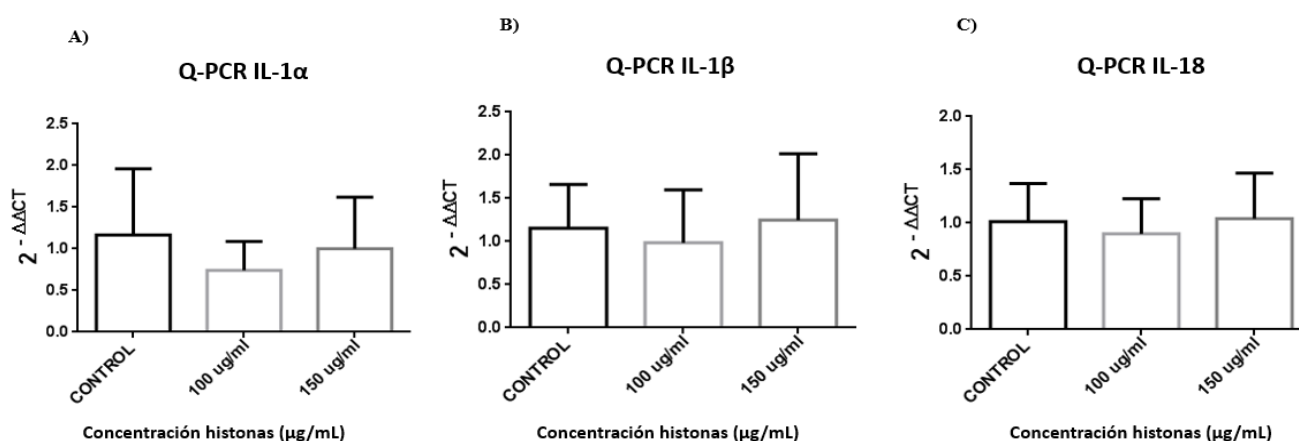


#### 4.3.6 Análisis de la expresión génica de IL- $\alpha$ , IL- $\beta$ e IL-18 en los cardiomiocitos tras el tratamiento citotóxico con histonas

Con el análisis del tipo de muerte celular mediante anexina-V/yoduro de propidio comprobamos que había un gran porcentaje de apoptosis primaria y secundaria. En este estudio nos centramos en el estudio de la apoptosis secundaria, y concretamente en los mecanismos relacionados con la activación del inflammasoma y la muerte celular por piroptosis ocurridos en los cardiomiocitos.

La muerte celular por apoptosis está asociada a una respuesta inflamatoria y tiene características similares tanto de la apoptosis como de la necrosis. En diversas enfermedades cardiacas, como son el infarto de miocardio y la insuficiencia cardiaca, se ha descrito que los cardiomiocitos entran en piroptosis, provocando la activación del inflammasoma y la liberación de citocinas proinflamatorias (22, 54). En nuestro laboratorio se procedió a estudiar si en los cardiomiocitos tratados con histonas extracelulares también se activaba la piroptosis. Para ello nos centramos en detectar la expresión de las interleucinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18. Estas interleucinas inflamatorias están implicadas en la ruta canónica (IL-1 $\beta$  e IL-18) y no canónica (principalmente IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , aunque también se expresa la IL-18) de la piroptosis, mediada por el inflammasoma, (22, 23).

Para estudiar si había activación del inflammasoma y muerte celular por piroptosis en los cardiomiocitos tratados con histonas extracelulares, se realizó una PCR-cuantitativa de las muestras obtenidas a partir de los cardiomiocitos en las distintas condiciones aplicadas (condición control 0  $\mu\text{g/ml}$ , una segunda condición con 100  $\mu\text{g/ml}$ , y una tercera condición con 150  $\mu\text{g/ml}$  de histonas; mismas condiciones utilizadas para el ensayo MTT y anexina-V/yoduro de propidio). Los genes de interés fueron los que codifican para las interleucinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18 (Figura 12).



**Figura 12:** Gráficas obtenidas a partir de los datos obtenidos de la PCR-cuantitativa de los genes IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18. Para llevar a cabo la PCR-cuantitativa se utilizó el termociclador ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Foster City, CA.; Estados Unidos), aplicándose 45 ciclos y sondas específicas prediseñadas para cada gen de interés de la tecnología TaqMan Gene expression assays (Life Technologies; Carlsbad, CA; Estados Unidos). La expresión de los genes se cuantificó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  y los datos se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism, mediante un test estadístico no paramétrico test de Mann-Whitney comparando todas las condiciones con respecto al control y entre las diferentes condiciones. Los resultados se representan como la media y las barras de error referencian la desviación típica de los datos.

El ensayo se llevó a cabo con una  $n$  de 3 (tres diferenciaciones diferentes) con un total de 48 replicados técnicos para el grupo control (0  $\mu\text{g/ml}$ ), 16 replicados técnicos para el grupo 100  $\mu\text{g/ml}$  y 44 replicados técnicos para el grupo 150  $\mu\text{g/ml}$ .

Los resultados obtenidos (Figura 12) no mostraron una diferencia significativa en la expresión relativa de los genes IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18, por lo que no pudimos confirmar que la piroptosis se activara por ninguna de las rutas del inflammasoma. En los ensayos de anexina-V/yoduro de propidio (Figura 11) comprobamos que se está activando la apoptosis secundaria en los cardiomiocitos y cabría esperar que la muerte activada por las histonas extracelulares vaya por esta vía. También puede ser debido a que las histonas provoquen apoptosis secundaria por una ruta diferente, una de las posibles rutas podría ser la mediada por GSDMD (gasdermina D) o GSDME (gasdermina E), en la cual también se presenta un importante factor inflamatorio y se ha detectado en eventos como el infarto de miocardio (21, 23).

#### ***4.3.7 Análisis de la expresión génica de GPX1, Catalasa, SOD1 y SOD2 en los cardiomiocitos tras el tratamiento citotóxico con histonas***

A continuación, se evaluó si la muerte celular por apoptosis podría producirse como consecuencia del daño celular por estrés oxidativo en las células.

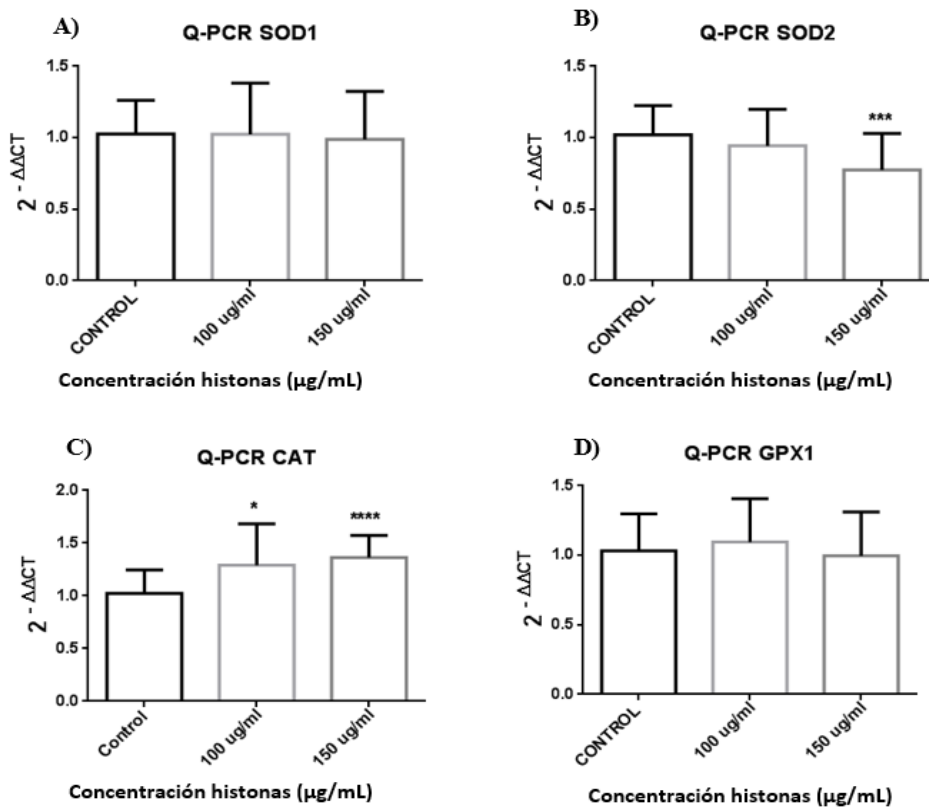
El estrés oxidativo es uno de los estímulos que pueden dar lugar a muerte celular. También, el estrés oxidativo puede ser un factor importante en la aparición y desarrollo de la sepsis, por ejemplo, aumentando la respuesta inflamatoria, induciendo procesos de muerte celular e insuficiencia orgánica (26).

Además, en trabajos anteriores de nuestro grupo se ha demostrado que, en células endoteliales HUVEC, la exposición a histonas extracelulares induce a la aparición de estrés oxidativo, desregulando la respuesta antioxidante celular (26), activando procesos de inflamación y apoptosis (55).

En este trabajo se quiso estudiar si en los cardiomiocitos también se producía daño por estrés oxidativo al igual que en las células endoteliales. Para ello se analizó mediante PCR-cuantitativa la expresión génica de las principales enzimas encargadas de reducir los compuestos dañinos implicados en el estrés oxidativo, las enzimas en las que nos centramos fueron el superóxido dismutasas SOD1 y SOD2, el glutatión peroxidasa GPX1 y la catalasa.

Analizando la expresión génica de estos genes mediante PCR cuantitativa se puede estudiar si la célula se está defendiendo ante un episodio de estrés oxidativo, además, podemos saber a qué nivel de la ruta se está produciendo el daño, si están sobreexpresadas las SOD1 y SOD2 indicará que la ruta está actuando al nivel del radical libre superóxido, si están sobreexpresadas la catalasa y GPX1 indicará que la ruta está actuando al nivel del peróxido de hidrógeno.

Los resultados de expresión se pueden ver en la Figura 13, las condiciones aplicadas fueron una condición control 0  $\mu\text{g/ml}$ , una segunda condición con 100  $\mu\text{g/ml}$ , condición en la que en los experimentos anteriores se detectó un 50% de mortalidad, y una tercera condición con 150  $\mu\text{g/ml}$  de histonas, en la que se detectaron los valores más altos de mortalidad (Figuras 9 y 11).



**Figura 13:** Gráficas obtenidas a partir de los datos obtenidos de la PCR-cuantitativa de los genes superóxido dismutasa 1 (SOD1), superóxido dismutasa 2 (SOD2), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa 1 (GPX1). Para llevar a cabo la PCR-cuantitativa se utilizó el termociclador ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Foster City, CA.; Estados Unidos), aplicándose 45 ciclos y sondas específicas prediseñadas para cada gen de interés de la tecnología TaqMan Gene expression assays (Life Technologies; Carlsbad, CA; Estados Unidos). La expresión génica se cuantificó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Para realizar las gráficas se juntaron todos los valores de las diferentes diferenciaciones, obteniendo así los valores totales. El ensayo se llevó a cabo con una  $n$  de 2 (dos diferenciaciones diferentes), con un total de 32 replicados técnicos para el grupo control (0 µg/ml), 16 replicados técnicos para el grupo 100 µg/ml y 28 replicados técnicos para el grupo 150 µg/ml.

Los resultados se representan como la media y las barras de error referencian la desviación típica de los datos. Los resultados se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism, mediante el test estadístico no paramétrico test de Mann-Whitney comparando todas las condiciones con respecto al control y entre las diferentes condiciones. Los asteriscos indican que hay una diferencia significativa entre los grupos correspondientes, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$

El aumento o disminución de la expresión de enzimas antioxidantes puede ser indicativo de estrés oxidativo. Al disminuir la expresión de enzimas antioxidantes las células tienen una menor defensa antioxidante frente a las especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, si se produce el aumento de la expresión de enzimas antioxidantes es un indicativo de que las células están respondiendo frente a ese estrés oxidativo.

En el primer nivel de la ruta de detoxificación de los radicales libres, se vio que la expresión de SOD1 (Figura 13A) no tuvo prácticamente variaciones entre el grupo control y los grupos tratados. En cuanto a SOD2 (Figura 13B) se observó que su expresión disminuyó, incluso detectándose una bajada significativa en el grupo tratado con 150 µg/ml de histonas, lo que puede implicar que las células disponen de una menor defensa antioxidante frente al radical superóxido, cuando estas son tratadas con 150 µg/ml de histonas extracelulares.

A nivel del peróxido de hidrógeno se observó que se producía un aumento de la expresión de GPX1 (Figura 13D) en el grupo tratado con 100 µg/ml, la catalasa (Figura 13C) es la que presentó unos niveles de expresión más elevados, presentando un aumento significativo en los dos grupos con respecto al control, observándose los valores más altos en el grupo 150 µg/ml. Esto podría indicar que sí se está produciendo en los cardiomiocitos un estrés oxidativo, siendo la catalasa la principal implicada en su regulación.

#### **4.4 Seguimiento del crecimiento y desarrollo de los organoides de riñón mediante microscopía óptica**

El seguimiento del crecimiento de los organoides de riñón se realizó mediante microscopía de campo claro, las imágenes se tomaron los días 3, 5, 9 y 11 de la diferenciación, una vez las células presentaron una estructura en esferoide tridimensional y estuvieron cultivadas en placas de 12 pocillos sobre los transwells. Para la captación de imágenes se utilizó el microscopio LEICA DMI1 CAMERA STAND y las lentes de aumento 5X, 10X y 20X, el software utilizado fue Leica Application Suite (LAS).

Antes del cultivo en 3D en *transwells*, las células estaban cultivadas en un cultivo bidimensional en monocapa, cuando llegaron a la fase de diferenciación en estado de mesodermo intermedio, IM, las células se agregaron en esferoides y se pasaron a *transwells* siguiendo el protocolo indicado en el apartado 3.2.2, para darles una estructura y condiciones organotípicas durante los siguientes días de la diferenciación.

A partir de este punto, durante los siguientes días de la diferenciación, las células pasaron de IM a células progenitoras de nefronas y finalmente a vesículas renales y estructuras similares a nefronas (47).

El día 2 de la diferenciación fue cuando se pasaron los esferoides al *transwell*, en los siguientes días se siguieron cultivando las células con medio enriquecido con los factores de crecimiento, para inducir las células progenitoras de nefronas (47); en el día 3 (Figura 14A) se observa como las células están agrupadas formando el esferoide. El esferoide no presentaba todavía estructuras internas, pero si se puede observar una línea que lo delimita del exterior, lo que indica su correcta formación.

Se siguieron añadiendo los factores de crecimiento durante los siguientes tres días, en este tiempo se deberían empezar a formar las vesículas renales que darán lugar a las estructuras similares a las nefronas en los días posteriores de la diferenciación (47). En el día 5 (Figura 14B) en nuestro caso, se observó que la línea que delimitaba el organoide se había difuminado, por otro lado, se observaron estructuras esféricas tanto en el interior como el exterior del organoide, pudiendo ser las vesículas renales que deberían aparecer en esta etapa de la diferenciación; en cuanto a las vesículas observadas fuera del organoide podrían ser vesículas formadas por él mismo y secretadas al exterior.

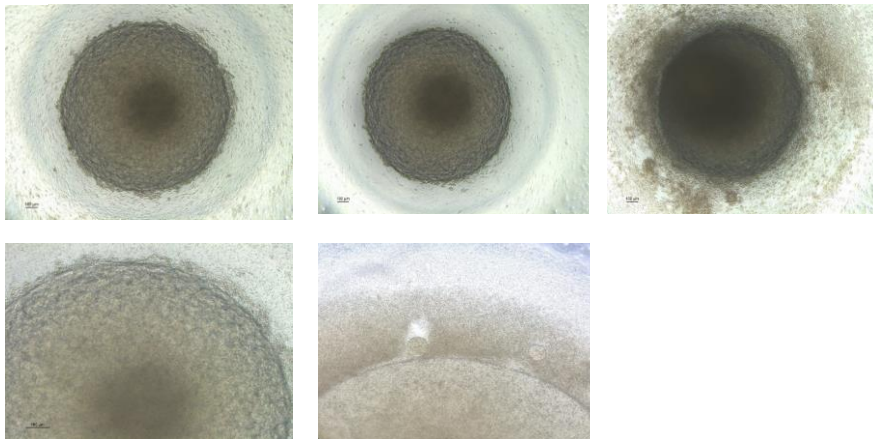
A partir del día 7 de la diferenciación, se retiraron los factores de crecimiento, en este paso deberían aparecer las estructuras precursoras de nefronas en el interior del organoide (47). En el día 9 (Figura 14C) los organoides presentaron una estructura esférica, comparado con la forma más aplanada que se observaba en el día 5; se seguían observando numerosas vesículas las cuales parecen ordenadas hacia la parte exterior del organoide, también se observó un mayor número de vesículas fuera del mismo, lo que indica una mayor secreción de estas. Igualmente, no se pudo confirmar la presencia de estructuras precursoras de nefronas.

En los días posteriores, hasta el día 16, las vesículas deberían adquirir polaridad proximal-distal y desarrollarse a estructuras similares a nefronas con funcionalidad similar a las células de riñón (47). En el día 11 (Figura 14D) en nuestro caso, el organoide es muy similar al descrito en el día 7, mantienen su forma esférica y se siguen observando vesículas sobre todo en la parte distal del mismo, hacía el exterior, además de observarse multitud de vesículas en el exterior. Pese a todo, aunque con la microscopía de campo claro se pudo realizar un seguimiento del crecimiento del organoide, no se pudieron caracterizar las estructuras internas, no se pudieron identificar las estructuras similares a nefronas con funcionalidad renal.

Fuera del marco de este trabajo TFM, se sigue investigando el desarrollo del organoide con características funcionales de riñón. Junto con la ayuda y dirección de la investigadora predoctoral Elena Nácher se quiere optimizar el protocolo de diferenciación para poder obtener un organoide funcional en el que poder evaluar el efecto citotóxico de las histonas y así poder identificar la importancia de estas en el desarrollo de la sepsis, así como aportar nuevas soluciones al método de diagnóstico. Actualmente, se continúa con la caracterización

de los organoides de riñón mediante la identificación de proteínas específicas por microscopía confocal en cada fase de diferenciación, de esta manera se quiere evaluar si las células están alcanzando el estadio de diferenciación correspondiente en cada fase y de este modo mejorar del protocolo de diferenciación.

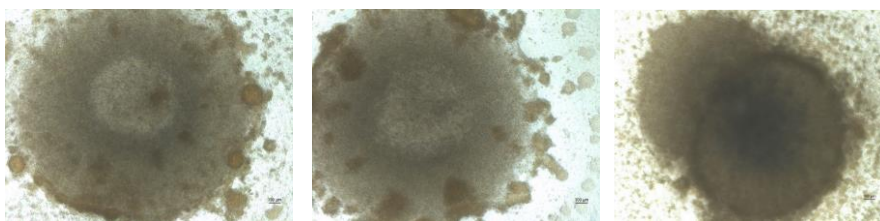
A)



**Figura 14:** Imágenes de 3 organoides de riñón tomadas durante diferentes momentos de su desarrollo, a partir del día 2 hasta el día 11 de la diferenciación. Las imágenes fueron tomadas utilizando la microscopía óptica de campo claro con el programa Leica Application Suite (LAS), se utilizaron las lentes de aumento de 5X, 10X y 20X y el microscopio utilizado fue LEICA DMI1 CAMERA STAND.

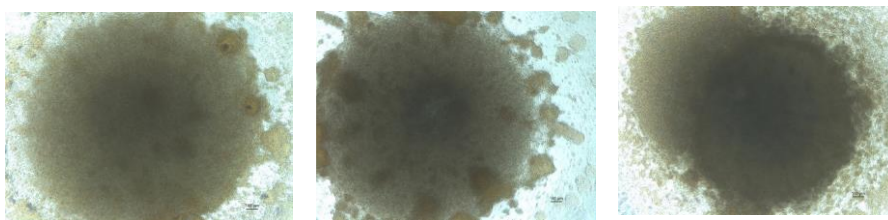
**A)** En las tres primeras imágenes podemos ver a los organoides en el día 3 de la diferenciación, se puede visualizar la línea que separa el interior del exterior del organoide. Las imágenes de la parte inferior fueron tomadas del primer organoide a diferentes aumentos, 10X y 20X respectivamente; en la imagen a 20x se puede observar una pequeña vesícula.

B)



**B)** Organoides en el día 5 de la diferenciación. La línea que separa el interior del exterior del organoide se observa más difuminada, por otro lado, hay una mayor presencia de vesículas tanto en el interior como el exterior de los organoides. En el organoide de la derecha se puede ver como una parte del mismo parece que ha sobrepasado la línea que dividía el interior del exterior del organoide, así como la presencia de un mayor número de vesículas que en los otros dos, aunque de menor tamaño; esta morfología se mantuvo hasta el final del proceso de diferenciación.

C)



**C)** Organoides en el día 9 de la diferenciación. En este punto se dejaron de aplicar los factores de crecimiento, los organoides parecían recuperar un poco su morfología esférica, comparada con la morfología más aplanada o difusa de las imágenes en día 5. También se puede observar como el interior del organoide presenta un tono más oscuro, lo que puede indicar una mayor agrupación celular. Además, las vesículas parecen concentrarse más hacia el exterior del organoide.

**D)** Organoides en el día 11 de la diferenciación. Los organoides son visualmente muy similares a cuando se encontraban en día 9, mantienen su estructura esférica, su tonalidad oscura y las vesículas parecen concentrarse en la parte exterior o distal de los mismos.

## 5. CONCLUSIONES

- Las células iPSCs humanas son capaces de diferenciarse en un cultivo en monocapa de cardiomiocitos maduros, los cuales presentan tanto características fisiológicas como funcionales del tejido cardiaco, observándose que los cardiomiocitos se organizaban y latían por sí mismos.
- Los cardiomiocitos maduros presentan proteínas características del tejido cardiaco, expresando proteínas como la troponina T, la cual se encuentra en el citoesqueleto unida a la tropomiosina; la actinina- $\alpha$ , proteína que forma parte del sarcómero de los cardiomiocitos, y Gata-4, el cual es un factor de transcripción localizado en el núcleo.
- La presencia de troponina T indica que, a menor cantidad de células sembradas al comienzo de la diferenciación, se obtienen mejores eficiencias de diferenciación de las iPSCs a cardiomiocitos.
- Los cardiomiocitos humanos maduros son sensibles a la exposición a elevadas concentraciones de histonas extracelulares, provocando muerte celular por apoptosis de forma dosis-dependiente, indicando que las histonas por sí mismas pueden ser una de las causas principales del daño orgánico y tisular descritos en la sepsis.
- El estudio realizado mediante técnicas de detección de expresión génica como la PCR-cuantitativa no ha mostrado un aumento de la expresión de las interleucinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18, por lo que la piroptosis no tiene lugar en nuestro modelo de cardiomiocitos.
- El análisis de la expresión de las enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, GPX1 y Catalasa, indica disminución de las enzimas implicadas en la reducción del radical superóxido en las células expuestas a altas concentraciones de histonas, concretamente de SOD2. Por otro lado, la expresión de las enzimas implicadas en la reducción del peróxido de hidrógeno aumenta, sobre todo la expresión de catalasa, lo que significa que se está produciendo una defensa de los cardiomiocitos frente al peróxido de hidrógeno a elevadas concentraciones histonas extracelulares.
- Los organoides de riñón diferenciados a partir de la iPSCs presentan una morfología esférica, delimitada por una línea que separa el interior y el exterior del mismo. A medida que avanza la diferenciación aparecen vesículas situadas en la zona distal del organoide y en el exterior. No se puede afirmar que se haya obtenido un organoide, debido que no se ha podido comprobar la presencia de estructuras internas, ni se ha medido la expresión de marcadores específicos, ni evaluado la capacidad de realizar funciones características del riñón.

### Futuros experimentos

- Los siguientes posibles pasos a seguir para continuar con el estudio de los cardiomiocitos como biomodelo de estudio de la sepsis sería seguir analizando mediante técnicas de detección de expresión génica y técnicas de detección de proteínas que rutas de todas las posibles son las que están participando en la muerte celular de los mismos al ser expuestos a altas concentraciones de histonas y, por consiguiente, son las responsables del daño celular y orgánico.
- Además se continuará con la caracterización del organoide de riñón para poder reproducir sistemáticamente el procedimiento de obtención de este organoide y utilizarlo como biomodelo para testar la citotoxicidad mediada por las histonas extracelulares.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA – J Am Med Assoc.* 2016; 315:801–10.
2. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, Angelis G De, Falcone M, Frank U, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 20, 1-55.
3. Cánovas-Cervera, I., Nácher-Sendra, E., Osca-Verdegal, R., Dolz-Andrés, E., Beltrán-García, J., Rodríguez-Gimillo, M., et al. The Intricate Role of Non-Coding RNAs in Sepsis-Associated Disseminated Intravascular Coagulation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023; 24(3), 2582.
4. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet (London, England).* 2020; 395(10219):200–11.
5. Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, Schlapbach LJ, Reinhart K, Kissoon N. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. Vol.6, *The Lancet Respiratory Medicine.* Lancet Publishing Group; 2018. p. 223–30.
6. Torio CM, Andrews RM. STATISTICAL BRIEF # 160 National Inpatient Hospital Costs: The Most. *Healthc Cost Util Proj Stat Br #160 Natl Inpatient Hosp Costs Most Expens Cond by Payer, 2011.* 2013; 31(1):1–12.
7. Paoli CJ, Reynolds MA, Sinha M, Gitlin M, Crouser E. Epidemiology and costs of sepsis in the United States-an analysis based on timing of diagnosis and severity level. *Crit Care Med.* 2018; 46(12):1889–97.
8. Liu V, Escobar GJ, Greene JD, Soule J, Whippy A, Angus DC, et al. Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. *JAMA.* 2014; 312(1):90–2.
9. Torio C, Moore B. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2013. *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs [Internet].* 2016.
10. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of clinical criteria for sepsis for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *J Am Med Assoc.* 2016; 315(8):762–74.
11. Christaki E, Anyfanti P, Opal SM. Immunomodulatory therapy for sepsis: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9(11):1013–33.
12. Giamarellos-Bourboulis EJ, Raftogiannis M. The immune response to severe bacterial infections: consequences for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012; 10(3):369–80.
13. Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.* 2010; 2(3):161–75.

14. Hoeksema M, van Eijk M, Haagsman HP, Hartshorn KL. Histones as mediators of host defense, inflammation and thrombosis. *Future Microbiol.* 2016; 11(3):441–53.
15. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Saraiva EM. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol Res.* 2012; 2012:1–11.
16. Mao L, Mostafa R, Ibili E, Fert-Bober J. Role of protein deimination in cardiovascular diseases: potential new avenues for diagnostic and prognostic biomarkers. *Expert Rev Proteomics.* 2021; 18(12):1059–71.
17. Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2010; 36(8):1286–98.
18. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med.* 2009; 15:1318–21.
19. Sollberger G. Approaching Neutrophil Pyroptosis. *J Mol Biol.* 2022; 434(4):167335.
20. Chen KW, Groß CJ, Sotomayor FV, Stacey KJ, Tschopp J, Sweet MJ, et al. The Neutrophil NLRC4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1 $\beta$  Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge. *Cell Rep.* 2014; 8(2):570–82.
21. Shi H, Gao Y, Dong Z, Yang J. E, Gao R, Li X, et al. GSDMD-mediated cardiomyocyte pyroptosis promotes myocardial I/R injury. *Circ. Res.*, 2021; 129(3), 383-396.
22. Suárez R, Buelvas N. El inflammasoma: mecanismos de activación. *Invest Clín.*, 2015; 56(1), 074-099.
23. Zeng C, Duan F, Hu J, Luo B, Huang B, Lou X, et al. NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis contributes to the pathogenesis of non-ischemic dilated cardiomyopathy. *Redox Biol.*, 2020; 34, 101523.
24. Carson WF, Kunkel SL. Regulation of cellular immune responses in sepsis by histone modifications. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2017; 106(1):191–225.
25. Silk E, Zhao H, Weng H, Ma D. The role of extracellular histone in organ injury. *Cell Death Dis.* 2017; 8(5):2812.
26. Beltran-Garcia J, Osca-Verdegal R, García-Giménez JL, Pallardó F V. Oxidative stress leads to severe phenotypes in sepsis through activation of NLRP3-pyroptosis. *Redox Exp Med.*, 2022; 2022(1), 84-95.
27. Miao L, Clair D K S. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic. Bio. Med.*, 2009; 47(4), 344-356.
28. Zelko I. N, Mariani T. J, Folz R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33(3), 337-349.
29. Gebicka L, Krych-Madej J. The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *J. Inorg. Biochem.*, 2019; 197, 110699.



30. Handy D. E, Loscalzo J. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2022; 188, 146-161.
31. Pérez-Cremades D, Bueno-Betí C, García-Giménez JL, Ibañez-Cabellos JS, Hermenegildo C, Pallardó F V., et al. Extracellular histones disarrange vasoactive mediators release through a COX-NOS interaction in human endothelial cells. *J Cell Mol Med.* 2017; 21(8):1584–92.
32. Ibañez-Cabellos JS, Aguado C, Pérez-Cremades D, García-Giménez JL, Bueno-Betí C, García-López EM, et al. Extracellular histones activate autophagy and apoptosis via mTOR signaling in human endothelial cells. *Biochim Biophys acta Mol basis Dis.* 2018; 1864(10):3234–46.
33. Beltrán-García J, Osca-Verdegal R, Pérez-Cremades D, Novella S, Hermenegildo C, Pallardó F V, et al. Extracellular Histones Activate Endothelial NLRP3 Inflammasome and are Associated with a Severe Sepsis Phenotype. *J Inflamm Res.* 2022; Volume 15:4217–38.
34. Beltrán-García J, Osca-Verdegal R, Náchter-Sendra E, Cardona-Monzonís A, Sanchis-Gomar F, Carbonell N, et al. Role of non-coding RNAs as biomarkers of deleterious cardiovascular effects in sepsis. *Prog Cardiovasc Dis.* 2021; 68:70–7.
35. Osca-Verdegal R, Beltrán-García J, Pallardó F V., García-Giménez JL. Role of microRNAs As Biomarkers in Sepsis-Associated Encephalopathy. *Mol Neurobiol.* 2021; 58(9):4682–93
36. Osca-Verdegal R, Beltrán-García J, Górriz JL, Martínez Jabaloyas JM, Pallardó F V., García-Giménez JL. Use of Circular RNAs in Diagnosis, Prognosis and Therapeutics of Renal Cell Carcinoma. *Front Cell Dev Biol.* 2022; 10(June):1–14.
37. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol.* 2000; 57(5): 976–83.
38. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007; 25(6): 681–6.
39. Li X, Krawetz R, Liu S, Meng G, Rancourt, D. E. ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 2009; 24(3): 580–9
40. Xu Y, Zhu X, Hahm H. S, Wei W, Hao E, Hayek A, et al. Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(18): 8129–34.
41. Ye L, Qiu L, Feng B, Jiang C, Huang Y, Zhang H, et al. Role of blood oxygen saturation during post-natal human cardiomyocyte cell cycle activities. *JACC Basic Transl. Sci.*, 2020; 5(5), 447-460.
42. Wamaitha S. E, Grybel K. J, Alanis-Lobato G, Gerri C, Ogushi S, McCarthy A, et al. IGF1-mediated human embryonic stem cell self-renewal recapitulates the embryonic niche. *Nat Commun*, 2020; 11(1), 764
43. Garbern J. C, Helman A, Sereda R, Sarikhani M, Ahmed A, Escalante G. O, et al. Inhibition of mTOR signaling enhances maturation of cardiomyocytes derived from human-induced pluripotent stem cells via p53-induced quiescence. *Circulation*, 2020; 141(4), 285-300.
44. Kattman S. J, Huber T. L, Keller G. M. Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev. Cell*, 2006; 11(5), 723-732.

45. Meistermann D, Bruneau A, Loubersac S, Reignier A, Firmin J, François-Campion, V, et al. Integrated pseudotime analysis of human pre-implantation embryo single-cell transcriptomes reveals the dynamics of lineage specification. *Cell Stem Cell*, 2021; 28(9), 1625-1640.
46. Ieda M, Fu, J. D, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau B. G, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 2010; 142(3), 375-386.
47. Selfa I. L, Gallo M, Montserrat N, Garreta E. Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells for the Generation of High-Order Kidney Organoids. *Program. Morphog. Methods Protoc. Methods Mol. Biol*, 2021; 171-192.
48. Shechter D, Dormann H. L, Allis C. D, Hake S. B. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat. Protoc.*, 2007; 2(6), 1445-1457.
49. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184(1):39–51.
50. Prados J, Melguizo C, Marchal J. A, Velez C, Alvarez L, Aránega A. Immunohistochemical analysis of the changes in the  $\alpha$ -actinin expression during cardiac chick development. *Rev. chil. anat.* 1998; 16(2):255-261.
51. Ang Y. S, Rivas R. N, Ribeiro A. J, Srivas R, Rivera J, Stone N. R, et al. Disease model of GATA4 mutation reveals transcription factor cooperativity in human cardiogenesis. *Cell*, 2016; 167(7), 1734-1749.
52. Shah, M, He, Z, Rauf A, Beikoghli Kalkhoran S, Heiestad, C. M, Stensløykken K. O, et al. Extracellular histones are a target in myocardial ischaemia–reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2022; 118(4), 1115-1125.
53. Osca-Verdegal R, Beltrán-García J, Paes AB, Náchter-Sendra E, Novella S, Hermenegildo C, et al. Histone Citrullination Mediates a Protective Role in Endothelium and Modulates Inflammation. *Cells*, 2022; 11(24):4070.
54. Gao Y, Shi H, Dong Z, Zhang F, Sun A, Ge J. Current knowledge of pyroptosis in heart diseases. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2022; 171, 81-89
55. Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res.*, 2011; 34(6):665–73.