

2016 Mayo, 6(2): 1-2

GENERACIÓN DE CARDIOMIOCITOS HUMANOS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS (iPSCs) GENERADAS A PARTIR DE ERITOBLASTOS DE SANGRE PERIFÉRICA

López-León M; Lehmann M; Coeli Goldenberg R; Goya RG

INIBIOLP, FCM, UNLP, 1900. mmicalopezleon@gmail.com

Introducción

La obtención de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) constituye un logro de enorme potencial clínico ya que las iPSC pueden diferenciarse a estirpes celulares de interés clínico. En tal sentido la generación de cardiomiocitos (CM) a partir de iPSC derivadas del propio paciente resulta de gran interés para el tratamiento del infarto de miocardio, ya que el músculo cardíaco adulto posee una débil capacidad regenerativa endógena, la cual disminuye con la edad. Los CM derivados de iPSCs para terapias de reemplazo celular, podrían solventar potencialmente el problema de la disponibilidad de tejido cardíaco humano. También poseen un gran potencial para el estudio de enfermedades cardiovasculares humanas por modelaje in vitro, como es el caso del Síndrome QT largo (SQTL), una canalopatía arritmogénica caracterizada por una grave alteración en la repolarización ventricular, traducida electrocardiográficamente por una prolongación del intervalo QT. Predispone a muerte súbita por arritmias ventriculares malignas. A 11 años de la identificación de los principales canales afectados en esta enfermedad, se han descrito cientos de mutaciones distribuidas en hasta ahora 10 genes relacionados con el síndrome. A pesar de que los modelos animales han contribuido enormemente a nuestro conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que causan trastornos cardíacos, su uso trae aparejada serias limitaciones a causa de la especificidad del genoma humano y la considerable diferencia entre la fisiología cardíaca en seres humanos y en animales modelo comúnmente utilizados. Por tanto, la posibilidad de generar CM derivados de iPSCs paciente-específicos revela nuevas oportunidades para la investigación acerca de los mecanismos de la patogénesis de la enfermedad cardíaca genética, y también para el descubrimiento de nuevos tratamientos farmacológicos mediante el testeado de drogas in vitro. Actualmente, existe una intensa búsqueda de una fuente de células somáticas humanas con alta eficiencia de reprogramación y que al mismo tiempo sea seguro y de simple recolección para el paciente. La sangre periférica surge como una fuente promisoría para la generación de iPSCs, ya que puede ser obtenida en cantidades suficientes y no requiere de técnicas invasivas.

Objetivos

- 1) Generar y caracterizar líneas de iPSCs a partir de eritoblastos de sangre periférica humana de pacientes con Síndrome QT largo e individuos sanos control, por medio de la transducción con vectores virales conteniendo las regiones codificantes de los genes de los factores de transcripción OCT3/4, SOX2, KLF4 y c-MYC.
- 2) Diferenciar dichas líneas de iPSCs a cardiomiocitos con la finalidad futura de modelar in vitro esta cardiopatía y realizar estudios comparativos a nivel morfológico y funcional entre las células derivadas de individuos sanos y pacientes, así como testear posibles drogas.

Materiales y métodos

-Células: se utilizaron eritoblastos de sangre periférica humana colectada de pacientes con Síndrome QT Largo, así como de individuos sanos (parientes) como control, para la obtención de líneas de iPSCs a partir de ellas. Se utilizó la línea de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) irradiados, como capa alimentadora sobre la cual se cultivaron los clones de iPSCs.

-Vectores virales: se utilizó el Kit comercial CytoTune™-iPS Sendai Reprogramming (Invitrogen), conteniendo 4 vectores basados en una forma modificada y no replicativa del virus Sendai (SeV), para entregar y expresar de forma efectiva y segura, individualmente cada uno de los 4 genes de pluripotencia hOct3/4, hSox2, hKlf4 y hc-Myc.

-Protocolo de reprogramación celular: Se colectaron 8 ml de sangre periférica de cada persona donante mediante el uso de jeringa y aguja en condiciones de asepsia. Se procedió a aislar las células mononucleares mediante centrifugación en un gradiente de densidad con Ficoll (GE). Con el objetivo de expandir la población de eritoblastos deseada, se sembraron 2×10^6 células en 2 ml de Medio de Expansión en un well de una placa de 12 wells estéril. Se incubó en estufa a 37°C en una atmósfera 5% de CO₂, durante 48 hs. Se realizó cambio de medio cada 48 hs y se crecieron las células durante 12 días. Se procedió a cuantificar la población celular mediante citometría de flujo, usando anticuerpos para los marcadores de superficie específicos de eritoblastos CD71 y CD36, para determinar si la población se enriqueció en el tipo celular deseado. El día 0 se realizó la transducción de los eritoblastos con una multiplicidad de infección (MOI) igual a 10 de los vectores virales Sendai portadores de los 4 genes de pluripotencia. El día 3 post-transducción se procedió a plaquear las células transducidas sobre una capa alimentadora de MEFs irradiados en una placa de Petri de 100 mm de diámetro. Luego de 9-12 días con cambios de medio correspondientes, emergieron las primeras colonias de iPSCs bien definidas. Cuando éstas adquirieron un tamaño considerado apto, fueron repicadas en forma manual para su aislamiento, purificación y expansión individual. Las células parcialmente reprogramadas fueron raspadas de la placa diariamente.

2016 Mayo, 6(2): 2-2

-Caracterización de líneas de iPSCs: Se analizó el cariotipo y el perfil de expresión génica de marcadores de pluripotencia por RT-PCR, para lo cual debió extraerse RNA total de las células en cultivo, realizar la retro-transcripción de los mRNA y llevar a cabo las correspondientes RT-PCR para analizar la expresión de los genes endógenos OCT4, sox2, nanog, klf4, rex1, dnmt3b, gdf3, tert, nodal, lin28 y dppa4, y de los genes exógenos sev_otc4, sev_klf4, sev_sox2, sev-cmyc y sev_r/f. Se utilizó GAPDH como control positivo. Se analizó el inmunofenotipo mediante la evaluación de la expresión de los factores de transcripción nuclear SOX2, NANOG y OCT3/4, TRA1-60, así como de los marcadores de superficie TRA1-81/-60 y SSEA-4, mediante citometría de flujo.

-Diferenciación a cardiomiocitos: se estableció el protocolo de diferenciación de iPSCs a CM utilizando una línea celular de iPSCs control generada, crecida sobre Matrigel. El primer paso corresponde a la generación de cuerpos embrionarios (CE) formados por 10-20 células. El día 1 de diferenciación se realizó la inducción a mesodermo, ensayando 3 condiciones diferentes que varían en la concentración relativa de los factores de diferenciación Activina A, BMP4 y CHIR. Se analizó la población celular mediante citometría de flujo para los marcadores de células mesodérmicas CD56 y PDGFR α . El día 4 se ensayaron 4 condiciones diferentes en el Medio de Inducción a linaje cardíaco, variando la concentración relativa de los factores cardiomiogénicos XAV, Dorso y SB. Luego de obtenerse CE latentes vistos al microscopio (día 15 aprox.), se determinó la efectividad de la inducción a CM mediante la medida de la expresión de Troponina T cardíaca.

Resultados

Se generaron exitosamente líneas de iPSCs provenientes de 2 pacientes SQTL y un individuo control. La expansión de eritoblastos resultó ser efectiva en la mayoría de los casos, mostrando una población celular aproximadamente 95% doble positiva para los marcadores CD36 y CD71 entre los días 9-12. Las líneas de iPSCs fueron caracterizadas mostrando un cariotipo normal (46 cromosomas) y la expresión esperada del set de genes endógenos de pluripotencia por RT-PCR. Aquellos clones que mostraron expresión de genes de pluripotencia exógenos, debieron ser expandidos a fin de aumentar el número de pasaje y diluir el virus hasta perder dicha expresión. El inmunofenotipo analizado por citometría de flujo mostró un alto porcentaje de células positivas para los factores de transcripción y marcadores de superficie específicos de células pluripotentes. Se estableció el protocolo de diferenciación de iPSCs a CM, obteniéndose una población 18.1-49.3% CD56/ PDGFR α positiva al evaluar la inducción a mesodermo al día +3 para las 3 condiciones ensayadas, y una población 20.7-50.2% expresando Troponina T al evaluar la eficiencia de diferenciación cardíaca al día +15 para una única condición (XAV) en la inducción a linaje cardíaco de las 3 ensayadas, mientras que para las restantes condiciones la expresión fue 9-21% o nula.

Conclusión

El protocolo utilizado permite la obtención de líneas de iPSCs a partir de eritoblastos de sangre periférica humana, obtenidos del paciente en cantidad suficiente y mediante una técnica no invasiva. Los eritoblastos poseen claras ventajas frente a otras fuentes de células somáticas a reprogramar. Se logró establecer un protocolo de diferenciación hacia CM, haciendo posible entonces el modelaje in vitro paciente-específico de la cardiopatía SQTL para el estudio de los mecanismos de dicha enfermedad y para un posible testeo de drogas.