

Organoides cardiacos: estudiando el desarrollo cardiaco humano en la tercera dimensión

Andrea Sánchez Bueno, Felipe Prosper, Manuel Mazo Vega.

Programa de Medicina Regenerativa, Cima Universidad de Navarra y Clínica Universidad de Navarra.

El corazón es el primer órgano en adquirir actividad funcional durante el desarrollo. Su importancia y la del sistema cardiovascular en su conjunto se evidencia en que las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la principal causa de muerte en el mundo. Sin embargo, es quizá menos conocido que las alteraciones cardiacas son el defecto congénito más frecuente en recién nacidos. Existe un vacío de conocimiento respecto a estas patologías del desarrollo, lo que deriva en una incapacidad fundamental de desarrollar tratamientos efectivos. Una de las principales causas de ello es la falta de sistemas que modelicen en el laboratorio estos síndromes y nos permitan obtener información básica del mecanismo por el que se producen y progresan. A pesar del enorme valor de los experimentos en animales, la propia evolución del campo los ha señalado como uno de los problemas principales, dada la inherente diferencia entre el desarrollo y fisiología cardiacas animal y humana. Además de esto, dificultades tanto técnicas como éticas han limitado la capacidad de ampliar el horizonte de conocimiento.

El desarrollo del campo de las células madre ha intentado llenar este vacío. No fue hasta la derivación de las primeras líneas de células madre embrionarias humanas (hESC – *human Embryonic Stem Cells*), cuando se estableció la capacidad de generar células cardiacas humanas en el laboratorio. Sin embargo, ha sido tras el descubrimiento en 2006 por Takahashi y Yamanaka del proceso de conversión de una célula adulta a una pluripotente inducida (iPSC – *induced Pluripotent Stem Cell*) por el proceso de reprogramación celular, y su aplicación a células humanas en 2007, cuando el límite tecnológico ha comenzado a expandirse realmente. Así, es ahora posible obtener células madre pluripotentes humanas (hPSC – *human Pluripotent Stem Cells*) a partir de cualquier individuo, incluidos aquellos portadores de mutaciones causantes de defectos cardiacos congénitos. Es a partir de entonces cuando un número creciente de laboratorios por todo el mundo demuestran la reproducibilidad de este fenómeno, así como la capacidad de generar células cardiacas humanas *in vitro*, tanto con fines terapéuticos como para el estudio del propio desarrollo cardiaco. Pero, ¿cómo ocurre esta cardiogénesis?

CARDIOGÉNESIS EMBRIONARIA:

Aprendiendo de la naturaleza para simularla *in vitro*

El inicio de la diferenciación cardiaca comienza en el embrión tan pronto como las células del epiblasto migran a través de la línea primitiva y se exponen a la acción de diferentes factores de señalización. Durante la gastrulación (formación de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo), estas células forman dos campos cardiacos mesodérmicos diferentes. El primer campo cardiaco (FHF – *First Heart Field*), formará el futuro ventrículo izquierdo y parte de las aurículas. El segundo campo cardiaco (SHF – *Second Heart Field*) por su parte, dará lugar al ventrículo derecho, el tracto de salida y también parte de las aurículas. La especificación de ambos tipos de progenitores está regulada por vías de señalización altamente conservadas (WNT, BMP, NOTCH). La primera estructura en observarse es la cresta cardiaca, formada principalmente por células del FHF. Posteriormente, ambos campos se fusionan para formar el tubo cardiaco primitivo (primera estructura que comienza a latir), compuesto por dos capas: células miocárdicas y células endoteliales. Las células del SHF, que se encuentran en ambos polos del tubo, comienzan a añadirse, y este inicia su torsión y rotación en 3D, hasta que finalmente se forman las cámaras cardiacas con la concurrencia de un proceso de crecimiento en volumen (*ballooning*). En paralelo a la formación del miocardio, se crea una membrana externa de células de epicardio que encapsula al corazón, una capa de células de endocardio que recubre el interior de las cavidades cardiacas y la formación de redes vasculares y neuronales propias.

Actualmente, existen protocolos robustos para la obtención de todos los tipos celulares cardiacos a partir de hPSC (englobando tanto hESCs como hiPSCs). En general, se basan en la adición de factores exógenos (moléculas que activan o reprimen distintas vías de señalización) a los medios de cultivo, replicando las señales que ocurren durante la cardiogénesis natural. Así, a partir de un cultivo de hPSCs que podemos expandir indefinidamente, se pueden obtener con una alta eficiencia y pureza un gran

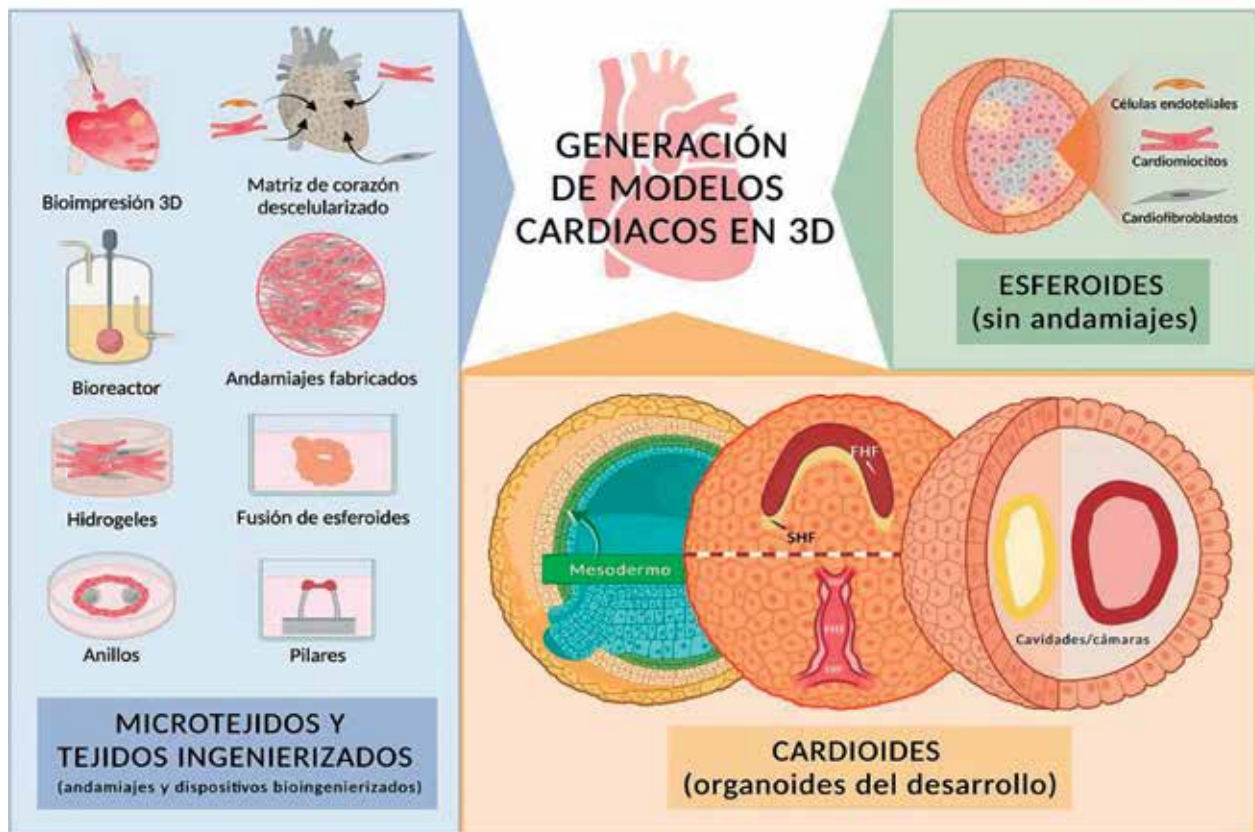


Figura 1

Estrategias de generación de modelos cardíacos en 3D: microtejidos y tejidos ingenierizados, esferoides y cardioides. Figura creada con *BioRender.com*

número de células de un fenotipo concreto como, por ejemplo, los cardiomiocitos. Estos fenotipos diferenciados se están constituyendo como un modelo preclínico muy relevante en el descubrimiento y testeo de fármacos, así como para el estudio de la biología humana. Sin embargo, en ellos las interacciones célula-célula y célula-matriz en 3D, esenciales dentro del tejido nativo y durante la organización y desarrollo del embrión, no están presentes. Esto hace que la utilidad de estos sistemas de diferenciación tradicionales para el estudio del desarrollo humano sea limitada. Asimismo, estos modelos son generalmente monocultivos que no representan la heterogeneidad celular del tejido en estudio, de gran importancia tanto en un órgano sano como enfermo. En el caso del corazón, la mayoría de modelos se han basado en cardiomiocitos, ignorando otros tipos celulares como las células del endocardio o epicardio, los linajes vasculares o los fibroblastos.

DEL 2D AL 3D: ORGANOIDES Y CARDIOIDES

Por tanto, aumentar la representatividad de estos modelos requiere incorporar una pluralidad de fenotipos y dar el salto a la tridimensionalidad. En la aplicación orientada a la terapia, esto se ha reflejado en el desarrollo de la Ingeniería Tisular. En el estudio del desarrollo humano, se

ha plasmado en la generación de los conocidos *organoides*, para el tejido cardíaco, también denominados *cardioides*. Estos se posicionan como puente de unión entre los sistemas 2D tradicionales y el proceso natural *in vivo*, ideales por tanto para estudiar el desarrollo embrionario de tejidos y órganos humanos en miniatura, pudiendo recapitular tanto las condiciones fisiológicas como patológicas. En la literatura, sin embargo, el término organoide se aplica a múltiples modelos dentro de la ingeniería de tejidos y por tanto pueden surgir confusiones de terminología en cuanto a sus diferencias. Así que, en rasgos generales ¿cuáles son actualmente las opciones existentes para la generación de modelos cardíacos en 3D? Estas pueden englobarse en tres tipos de estrategias fundamentales que representamos en la *Figura 1*.

En primer lugar, están aquellas estrategias que requieren de andamiajes o dispositivos bioingenierizados para formar modelos 3D del corazón más complejos. Los andamiajes son matrices exógenas que simulan la matriz extracelular (ECM) y dan soporte mecánico al constructo celular, además de recrear el microambiente y organización originales. Estos en combinación con el cultivo de células cardíacas derivadas de hPSCs, favorecen su orientación espacial, su maduración y permiten recapitular características importantes como el acoplamiento electromecánico de los cardiomiocitos, la alineación de las fibras musculares y la inclusión de la red vascular prediseñada. >>>

Por otro lado, están los esferoides cardíacos, que son agregados celulares generados por autoensamblaje o por nucleación forzada, en las que se combinan distintos tipos de células cardíacas ya diferenciadas (p.e. cardiomiocitos, fibroblastos y células endoteliales) que terminan de madurar y organizarse en el agregado final. No requieren del uso de andamiajes y son un buen modelo para estudiar el microambiente cardíaco y las interacciones entre tipos celulares de forma controlada. Sin embargo, no permiten controlar el patrón de distribución celular y las proporciones celulares finales no son las observadas *in vivo*, limitando la aparición de estructuras cardíacas complejas y la comprensión de las propiedades mecánicas del corazón.

Finalmente, están los organoides cardíacos, también conocidos como cardioides, propiamente dichos. Estos se generan a partir de células madre y mediante protocolos de diferenciación *in vitro* recrean la cardiogénesis natural, consiguiendo reproducir los principales eventos morfológicos. Lo cual incluye la organización de las cámaras cardíacas, la especificación auriculoventricular y la obtención de la mayoría de tipos celulares del corazón de forma ordenada y en 3D, con gran similitud al desarrollo natural humano. Normalmente son de un tamaño pequeño, de unas 100 micras aproximadamente.

Los organoides se describen como cultivos 3D *in vitro* derivados de la diferenciación de agregaciones de células madre con capacidad de autoorganización y autoensamblaje, que asemejan la arquitectura y función *in vivo* del órgano de interés. En definitiva, para que un modelo 3D de un órgano humano sea relevante debe cumplir los siguientes atributos: asemejarse en cuanto a composición celular, mimetizar la organización espacial 3D y recapitular la función de su homólogo *in vivo*. El concepto de autoorganización, implica polarización celular y segregación de los distintos linajes de forma autónoma. Según la hipótesis de adhesión diferencial de Steinberg, los clústeres iniciales de células madre van estableciendo interacciones a través de proteínas de adhesión celular de superficie con otras con un perfil de adhesión similar, siguiendo el patrón termodinámicamente más estable. Así, se van autoensamblando hasta formar estructuras homogéneas que, mediante la exposición a un régimen de señales de diferenciación, van generando los tejidos que constituyen el órgano.

En los estudios actuales, que recrean la trayectoria de las etapas tempranas de la organogénesis, se forman inicialmente agregados de células madre (pluripotentes generalmente, o progenitoras) en lo que se conoce como cuerpos embrioides (EBs – *Embryoid Bodies*). Estos EBs se generan por el cultivo en suspensión de altas densidades celulares en placas de ultra-baja adherencia, empleando la técnica de hanging-drop o por la siembra en placas de baja adhesión con fondo curvado en -U- y posterior centrifugación. Uno de los factores críticos para el desarrollo

eficiente del organoide es el tamaño inicial y la forma de los clústeres, así como las interacciones de estos con la ECM que regulan la capacidad de autorenovación y diferenciación y dan soporte mecánico. Por esto último algunos protocolos agregan las células sólo en medio de cultivo y otros junto con matrices 3D. Además, es esencial tener en cuenta el efecto del microambiente. Las señales moleculares bioquímicas y estímulos mecánicos del entorno embrionario afectan a la expresión génica de las células madre, modulando su comportamiento y decisión del destino final. De este modo, debemos conocer previamente las claves del entorno embrionario (en su orden espacio-temporal) para recapitular *in vitro* los eventos morfogénicos que lideran el desarrollo del órgano *in vivo*. Aunque obtener toda esta información no es nada fácil.

CARDIOIDES DEL DESARROLLO: Clasificación de los modelos actuales y aplicaciones

En estos últimos años, se han hecho grandes avances en el desarrollo de organoides cardíacos que recapitulan la cardiogénesis temprana humana con mínima intervención externa, aunque todavía quedan muchas preguntas por resolver. Ampliamente se podrían clasificar en 3 grupos (*Figura 2*), según la fase del desarrollo que alcanzan a modelar: organoides precardiacos, organoides cardíacos del desarrollo (gastruloides) y organoides de las cámaras del corazón.

Los organoides precardiacos intentan recapitular la etapa de la gastrulación. Estos modelos son capaces de autoorganizarse y mostrar un patrón primitivo previo a la etapa de la cresta cardíaca, pero no generan ningún evento morfogénico importante. En 2009, Domian y colaboradores generaron EBs con líneas embrionarias reporteras fluorescentes que marcaban los dos campos cardíacos (FHF y SHF), con el objetivo de aislar progenitores cardíacos y obtener a partir de ellos cardiomiocitos ventriculares. Sin embargo, este sistema, que recae en la sencillez de la generación espontánea de células ventriculares (método de hanging drop) a partir de EBs, omite cualquier control del patrón y organización celular. El uso de células madre reporteras fluorescentes es muy útil para seguir los linajes de interés a través del proceso de desarrollo del organoide, pudiendo identificar su ubicación espacial y facilitar su aislamiento. Siguiendo esta idea, Andersen et al generaron en 2018 organoides a partir de líneas ESCs de ratón reporteras para ambos campos cardíacos y dirigieron la diferenciación de los EBs junto con la adición exógena de los factores de crecimiento BMP4 y Activina A, que han demostrado ser esenciales para la inducción del mesodermo cardíaco. Con este modelo se demostró que la especificación de los campos se inicia en regiones espaciales distintas (como sucede *in vivo*) y se identificó el receptor Cxcr4 como marcador identificativo de los progenitores SHF *in vivo* e *in vitro*. No obstante, la adición de BMP4

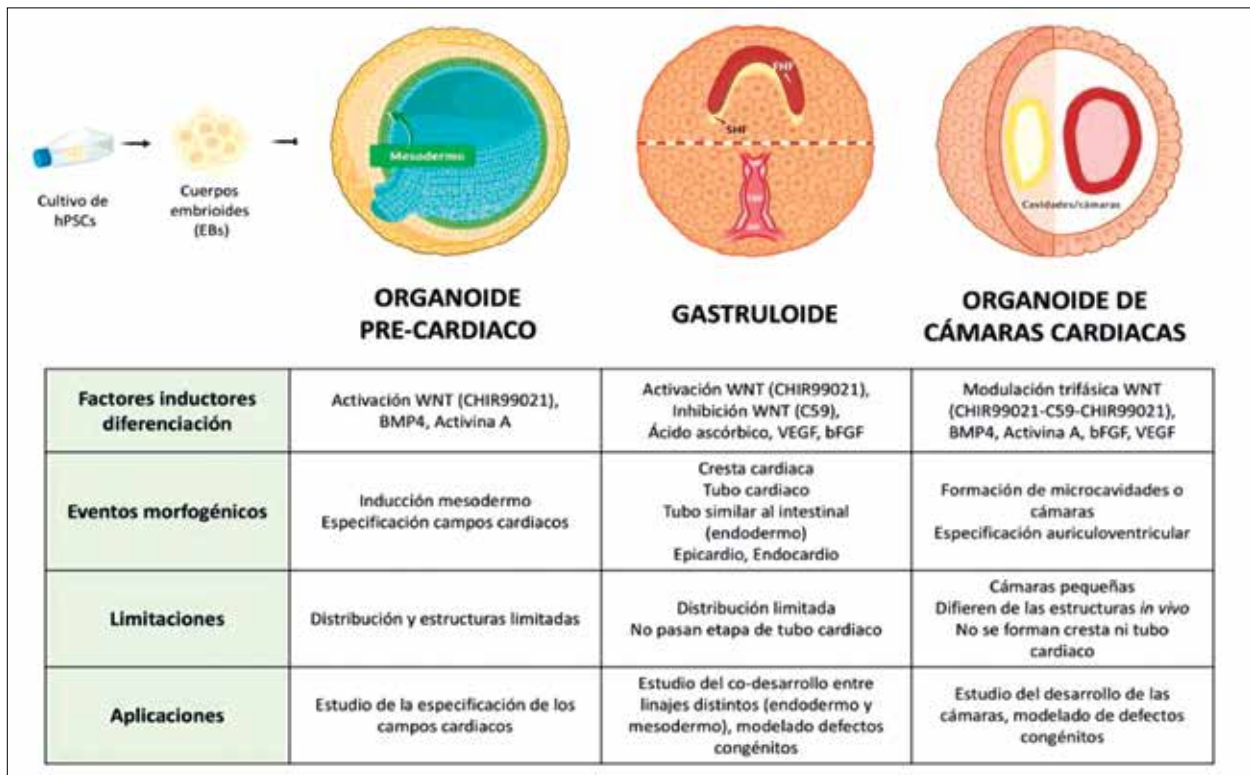


Figura 2

Esquema gráfico y tabla resumen de los tres principales grupos de cardioides del desarrollo humano: precardiaco, gastruloide y de las cámaras cardiacas. Moléculas empleadas en la inducción de las etapas de diferenciación, estructuras 3D generadas y limitaciones y aplicaciones de cada modelo. Figura creada con *BioRender.com*

y Activina A no fueron suficientes para inducir ningún patrón claro, ni la aparición de formas más allá de la especificación de los campos.

El segundo grupo, los cardioides del desarrollo, también conocidos como gastruloide, permiten recapitular la dinámica morfogénica del corazón mediante el co-desarrollo sinérgico junto con otros tejidos no cardiacos. Así, por señalización paracrina entre distintos tipos celulares de las capas germinales, se consigue un mayor nivel de autoorganización y la aparición de estructuras más similares a las naturales. En los últimos meses, se han publicado tres importantes trabajos de organoides multilínea. En estos estudios es esencial, en primer lugar, la inducción de la especificación de las capas germinales con la molécula CHIR99021, un inhibidor GSK-3, que activa la vía de WNT e induce la formación de mesodermo (corazón). Silva y colaboradores, describen un modelo de organoide formado a partir de suspensión orbital rotatoria de células progenitoras mesendodérmicas humanas (células multipotentes que se pueden diferenciar a células del mesodermo y endodermo). Aquí, tras una modulación bifásica de

la vía de señalización de WNT (activación/inhibición) y junto con la adición de ácido ascórbico, se forman organoides que contienen los linajes mesodérmico (corazón) y endodérmico (sistema digestivo). Sin embargo, aunque la región cardiaca no consigue generar estructuras relevantes, se ha visto que el co-desarrollo con tejido endodérmico favorece la maduración de los cardiomiocitos mediante la secreción de señales como Activina A y FGF. Posteriormente, Rossi et al ha generado cardioides con un patrón multiaxial y diferentes tipos celulares de las capas germinales: progenitores de los campos cardiacos, cardiomiocitos, células endoteliales y endodérmicas. En este caso, tras la adición de CHIR a los EBs de ESC de ratón, se introdujeron a día 4 los factores cardiogénicos bFGF, VEGF y ácido ascórbico, pudiendo observarse la formación de una estructura tubular similar a la intestinal (procedente de la región endodérmica), la capa de endocardio y algo de vascularización. A diferencia del modelo de Silva, estos gastruloide sí recapitulan la aparición de estructuras tempranas como la cresta cardiaca y el tubo cardiaco primitivo, pero no consiguen ir más allá en cuanto a morfogénesis. Tal vez esta diferencia con Silva pueda darse porque en su protocolo los agregados 3D se forman a partir de células pre-disociadas a día 4 de su diferenciación en monocapa y este paso pueda afectar a las interacciones entre células, fundamentales en los primeros pasos de autoorganización y ensamblaje del organoide. Sería interesante intentar reproducir el protocolo de Silva partiendo de agregados de células pluripotentes, tal y como hizo Rossi. No obstante, se ha observado una mayor dificultad a la hora de generar organoides de iPSC humanas en comparación con los

generados a partir de ESC de ratón, insinuándose algunas cuestiones especie-específicas que podrían afectar a su formación y que deben ser estudiadas. De forma similar a Silva, Drakhlis y colaboradores han desarrollado gastruloides a partir de iPSC humanas con una estructura 3D organizada por capas única: una capa interna con estructuras similares a la red vascular, rodeada por una región miocárdica y células del endocardio, la formación externa de proepicardio (población progenitora de cardiofibroblastos y células de músculo liso) y la aparición de dos compartimentos endodérmicos independientes en el espacio (hígado e intestino). Los agregados pluripotentes iniciales se embebieron en *Matrigel*TM (una mezcla heterogénea de proteínas de la matriz extracelular) y sus derivados se mantuvieron en cultivo hasta 146 días. Con este sistema los autores pudieron además estudiar algunos defectos genéticos empleando líneas iPSC modificadas genéticamente a las que se eliminó el gen NKX2.5, que controla la expresión de genes cardíacos. Dichos organoides mostraron un fenotipo similar al observado previamente en modelos animales transgénicos de malformación cardíaca. No obstante, estos cardioides representan un estadio bastante temprano del desarrollo en el que no se aprecia una formación clara de estructuras cardíacas relevantes y cuya organización difiere de su homólogo *in vivo*.

Por último, un grupo de cardioides con morfología más avanzada que los anteriores, intenta modular la formación de las cámaras cardíacas o por lo menos la aparición de cavidades y de cierta presencia vascular. Lewis-Israelí y colaboradores han sido los primeros en recrear un organoide con microcámaras mediante 3 fases de activación-inhibición-activación de la vía de WNT y la adición de los factores BMP y Activina A a agregados de iPSCs humanas. Con esta modulación trifásica se permite lo siguiente: inducción del mesodermo, inducción de mesodermo cardíaco y formación del epicardio, respectivamente. A pesar de que estas microcavidades no son similares a las nativas ni presentan un patrón claro de distribución, en general estos modelos son similares a tejidos cardíacos fetales tempranos a nivel transcripcional y permiten reproducir la especificación auriculoventricular de los cardiomiocitos. Los autores, describen ciertas características electrofisiológicas y de maduración del tejido y emplean el sistema para recrear *in vitro* el efecto de la diabetes pregestacional sobre el corazón humano, que induce la aparición de defectos cardíacos congénitos. En continuación con este sistema, Hofbauer et al mejoró la capacidad de formación de las cámaras desarrollando un organoide cardíaco (con iPSC humanas) que sin necesidad de su co-desarrollo con tejido endodérmico, presenta pequeñas cámaras que se fusionan formando cavidades de mayor tamaño según avanza el proceso de diferenciación. Con este modelo se ha demostrado que la modulación de los ejes WNT-BMP induce la expresión de HAND1, necesario para la formación de las cáma-

ras, pero que además la aparición de estas no va ligada necesariamente a la especificación cardíaca y formación de los cardiomiocitos. Sin embargo, este método, a pesar de recapitular esta arquitectura, no recrea las estructuras previas a la cresta ni el tubo cardíaco. En contraste, el trabajo de Lee et al generó organoides a partir de ESC de ratón que demostraron recapitular la especificación auriculoventricular (presenciando cardiomiocitos auriculares y ventriculares en regiones espaciales distintas) y la formación de 4 cámaras similares a las cardíacas (aurícula derecha e izquierda y ventrículo derecho e izquierdo). En este protocolo se añadieron el complejo laminina-entactina como ECM de soporte y los factores FGF, BMP y activadores de la vía WNT. Como vemos, estos estudios emplean métodos de formación y moléculas inductoras diferentes, por lo que debe estudiarse en profundidad el papel que juega cada uno en el progreso de desarrollo del organoide y cómo mejorar su reproducibilidad de lo *in vivo*. Asimismo, es muy importante no sólo recapitular fases tempranas sino conseguir un desarrollo más maduro del organoide para llegar a generar protocolos más robustos y reproducibles a gran escala. Un último ejemplo de las oportunidades que brindan los organoides cardíacos es su uso como plataforma de testeo de fármacos que provocan malformaciones cardíacas durante el embarazo. En un reciente estudio, Hoang y colaboradores generaron cardioides bajo confinamiento espacial geométrico y se evaluó el efecto teratogénico de diversos fármacos clasificados como de riesgo en la etapa gestacional según la *Food and Drug Administration* (FDA). Este sistema permitió analizar su efecto sobre la diferenciación cardíaca, morfología tisular 3D y función contráctil de los organoides, que confirmaron ser un buen modelo humano sensible a defectos morfológicos como resultado de la exposición a dichos fármacos.

Como vemos, los organoides/cardioides han abierto la puerta a estudiar el desarrollo humano en 3D, incluso en sus etapas más tempranas. Específicamente para la cardiogénesis, se prevé que esto de lugar a nuevos descubrimientos sobre la organización cardíaca y cómo esta se ve alterada por circunstancias ambientales o congénitas. Esto podrá a su vez establecer por primera vez vías de actuación y tratamiento tempranas para enfermedades en muchos casos huérfanas. Además, a través de la implementación de nuevas tecnologías y la optimización e innovación de los protocolos actuales, en los próximos años veremos grandes avances que den luz a este maravilloso y complejo campo de la modelación cardíaca.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está financiado por fondos del ISCII(PI19/01350), cofinanciado por fondos FEDER, y por el Programa H2020 de la UE bajo el acuerdo No 874827. ■