



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Fisiología
Programa de doctorado: 3139 Medicina

**Obtención y caracterización de un modelo de
cardiomiocitos derivados de iPSC para el estudio de la
cardiomiopatía en la ataxia de Friedreich**

Tesis Doctoral presentada por:

Tamara Lapeña Luzón

Dirigida por:

Dr. Federico V. Pallardó Calatayud

Dra. M^a Pilar González Cabo

Valencia, febrero de 2024

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: Pallardó Calatayud, Federico Vicente; N.I.F: 22685282Z; Departamento/Instituto: Departamento de Fisiología; Centro: Facultad de Medicina

2.- Apellidos y nombre: González Cabo, María Pilar; N.I.F: 20164778B; Departamento/Instituto: Departamento de Fisiología; Centro: Facultad de Medicina

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos y nombre: Pallardó Calatayud, Federico Vicente; N.I.F: 22685282Z, Departamento/Instituto: Departamento de Fisiología; Centro: Facultad de Medicina

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: "Obtención y caracterización de un modelo de cardiomiocitos derivados de iPSC para el estudio de la cardiomiopatía en la ataxia de Friedreich"

de D/Dña. Tamara Lapeña Luzón,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe favorable (*favorable/desfavorable*) para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 13 de febrero de 2024

FEDERICO VICENTE|
PALLARDO|
CALATAYUD

Firmado digitalmente por
FEDERICO VICENTE|PALLARDO|
CALATAYUD
Fecha: 2024.02.13 11:23:58 +01'00'

Fdo.: Federico V. Pallardó Calatayud

Director y tutor

Firmado por MARIA PILAR
GONZALEZ CABO - NIF:20164778B
el día 14/02/2024
con un certificado emitido por
ACCVCA-120

Fdo.: María Pilar González-Cabo

Directora

ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor **Fede**, por confiar en mí y en esta tesis más que nadie. Por cada explicación de fisiología, que es una clase maestra. Por ser un ejemplo de lo que significa ser un profesor y un guía. Me llevo de ti muchas lecciones, tanto profesionales como personales.

A mi directora **Pili**, por darme la oportunidad de hacer la tesis. Por preocuparte de que tengamos financiación para llevar a cabo los proyectos y pagar los contratos, porque es lo que permite que podamos dedicarnos a hacer ciencia. Por estar siempre disponible, ver el lado positivo que yo no veo, exigirme y darme libertad para desarrollar mis propias ideas. Te lo agradezco mucho.

A **Ana María Gómez**, por aceptarme en tu laboratorio para hacer la estancia e implicarte con este proyecto. Por enriquecer, no solo los resultados de la tesis y mis conocimientos sobre cardiología, sino también la experiencia que ha sido hacer el doctorado.

A **Noelia**, por enseñarme a trabajar con las iPSC y ayudarme a arrancar esta investigación, por estar siempre dispuesta a resolver mis dudas y darme los mejores consejos. A **Laura**, por ser mi GPS cuando entré al laboratorio y la mejor compañera de bancada, alegrías y penas. A **Conchín**, por compartir conmigo esta etapa. A **Carlos, José Luis, Juan Antonio, Toni, Víctor, Elena, Irene, Enric, Susana, Miguel, Inma, Rebeca, César, Jose, Shuai**, y a todos los que han colaborado de una u otra forma con esta tesis y me han permitido ir “a hombros de gigantes”. Sin vosotros no hubiera sido posible.

A **Maidier, Bea, Susana y Patri**, por hacer de un piso un hogar y escucharme hablar más horas de las que me gustaría reconocer. Por las sobremesas que se alargan imaginando nuestro futuro y por todos los momentos cotidianos que hacen la rutina más llevadera. Porque cuando recuerde esta época de mi vida va a ser imposible no acordarme de vosotras.

A **Lucas**, porque no podías no estar en estas páginas. Por impregnarme de tu carácter relativista (tan gallego). Por empujarme a hacer las cosas que no me atrevo y ser mi refugio durante estos años.

A **mis amigos**, por ser siempre el lugar al que volver. A **Inés**, por ser mi incondicional después de todo lo que ha llovido. A **Itziar**, por escuchar mi vida en audio en versión extendida. Y a **Salva**, por enseñarme a ver las cosas desde otro prisma.

A **mi hermana** y, en especial, a **mis padres**, por apoyarme en todas mis decisiones y creer que no tengo límites. Por darme unas raíces fuertes, pero, sobre todo, unas alas para ser independiente y elegir mi propio camino. La confianza que siempre habéis puesto en mí es lo que me ha traído hasta aquí.

ABSTRACT

Friedreich's ataxia (FRDA, OMIM: 229300) is a neurodegenerative and hereditary disease, with a prevalence of 1 in every 30,000 individuals in Europe, making it considered a rare disease. This condition arises from the expansion of a GAA triplet in intron 1 of the FXN gene, which encodes the frataxin protein. Frataxin is primarily a mitochondrial protein associated with the formation of iron-sulfur clusters, essential for the proper functioning of numerous enzymes involved in metabolism, oxidative stress management, and calcium homeostasis. The expansion of the GAA triplet leads to a reduction in frataxin levels, resulting in the disease. Since Nikolaus Friedreich's description of the pathology in 1863, it has been observed that, in addition to the characteristic neurodegeneration, patients exhibit cardiac abnormalities such as cardiac hypertrophy, arrhythmias, or fibrosis. Indeed, cardiac pathology is the leading cause of death in FRDA patients. However, despite this information, there are not many studies focused on the cardiac pathology of FRDA, so knowledge about these alterations remains limited. This is mainly due to the low prevalence of the disease, variability in the type and severity of symptoms, complications in patient monitoring, and the limited availability of animal and cellular models that accurately recapitulate the cardiac phenotype.

Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) were first described by Yamanaka in 2006. Since then, iPSCs have been a revolution in biomedical research since, from the patient's own fibroblasts or lymphocytes, it is possible to obtain a multitude of cell types while maintaining the patient's genetic information. Since 2011, iPSC-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs) have been developed from FRDA patients with the aim of studying the pathophysiological mechanism responsible for cardiomyopathy. It was observed that iPSC-CMs from FRDA show alterations in electrophysiology, mitochondrial function, and iron-related protein expression. However, studies are very limited, and more research is needed to clarify the alterations in mechanisms such as calcium homeostasis, a process

that has been altered in FRDA models of neurodegeneration and which is key to proper cardiac function.

In this context, the development and implementation of an induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte (iPSC-CMs) model from Friedreich's ataxia (FRDA) patients are proposed in the laboratory. Through characterization, this model aims to shed light on the molecular mechanisms affected in FRDA cardiac pathology.

To address this main objective, two iPSC lines were obtained from Dr Napierala's laboratory from two FRDA patients, which have different numbers of GAA triplet repeats, which is associated with the severity of the symptoms. Another iPSC line was also obtained from a healthy individual to be used as a control. First, a protocol was established for differentiating iPSCs into ventricular cardiomyocytes. To check whether the differentiation had been successful, the expression of cardiac markers was quantified by different molecular techniques and the decrease in pluripotency markers was verified with respect to the starting iPSCs. Once the cellular model had been obtained and validated, we began to investigate the possible alterations responsible for the cardiac pathology in FRDA.

In a previous study from our laboratory, a series of circulating miRNAs had been identified as potential biomarkers of FRDA. Specifically, one of these miRNAs, miR-323a-3p, was identified as a biomarker of cardiomyopathy in FRDA. Therefore, we decided to quantify the miRNA signature in FRDA iPSC-CMs and to perform a study of their targets in order to investigate the involvement of epigenetics in cardiac pathophysiology. The results showed that FRDA iPSC-CMs also exhibit an overexpression of the miRNA signature identified in the study. Furthermore, the functional enrichment analysis revealed that miRNA targets are involved in cardiac pathology. Indeed, it was found that the targets of the miRNA signature are linked to processes relevant to heart function such as calcium homeostasis or cytoskeleton dynamics. Among these targets, we found genes encoding membrane calcium channels such as CACNA1C, CACNA1D

and CALHM5, as well as the gene encoding the pump that introduces calcium into the sarcoplasmic reticulum, ATP2A2. Moreover, we identified that FRDA iPSC-CMs show alterations in the expression of these genes, suggesting an impairment in calcium homeostasis. Similarly, CFL2, the gene encoding the cardiac isoform of cofilin-2, a protein involved in cytoskeletal dynamics and related to FRDA, was also found to be a target of one of the miRNAs and its expression was found to be decreased in FRDA iPSC-CMs indicating possible alterations in the cytoskeleton dynamics.

On the other hand, it was observed that FRDA iPSC-CMs show alterations in cardiac rhythm and post-depolarization arrhythmias in the measurement of the associated action potential. Therefore, and in addition to the alterations in the expression of different calcium channels, it was decided to study Ca^{2+} homeostasis as a possible mechanism of the failure causing the arrhythmias. Intracellular Ca^{2+} fluxes were studied by confocal microscopy, where it was observed that FRDA iPSC-CMs show an increase in cytosolic Ca^{2+} levels after each stimulus compared to the control line. However, this increase is not accompanied by increased Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum, indicating an increase in Ca^{2+} levels entering the cell through membrane channels, whose expression has been demonstrated to be altered in FRDA iPSC-CMs. Furthermore, FRDA iPSC-CMs showed an increase in the rate of Ca^{2+} extrusion to the cell exterior, suggesting enhanced activity of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX. This increased Ca^{2+} efflux activity through NCX could hinder repolarization, contributing to the occurrence of post-depolarization arrhythmias.

In addition to these alterations in Ca^{2+} homeostasis, FRDA iPSC-CMs exhibited abnormalities in the structure of their mitochondria, characterized by a more elongated morphology, and a loss of crest structure, suggesting disruptions in mitochondrial fission-fusion processes as well as altered metabolic function. Calcium homeostasis and contraction processes require

significant energy demand, so mitochondrial impairment could lead to cardiac failure.

Structural abnormalities in the sarcomere were also observed, remaining barely recognizable in the FRDA line with a more aggressive phenotype. In addition, there is a tendency for sarcomere shortening in both lines, which may cause problems in the contraction process.

Furthermore, given the implication of cofilin-2 in the pathology of FRDA, it was decided to measure the levels of cofilin-2 in the plasma of patients. It was observed that there is an increase of cofilin-2 in the plasma of patients, and this is inversely proportional to age and more pronounced in those patients with electrocardiogram alterations. Therefore, cofilin-2 is proposed as a possible biomarker for alterations in the ST/T segment of the electrocardiogram.

Therefore, during the development of this thesis, an in-depth characterization of a model of ventricular cardiomyocytes derived from iPSCs of patients with FRDA has been carried out, revealing alterations in calcium homeostasis, in the structure of mitochondria and the cytoskeleton, and in the expression of genes related to these mechanisms, which contributes to the understanding of the cardiac pathophysiology of FRDA. Furthermore, cofilin-2 is proposed as a biomarker that may contribute to the early diagnosis of cardiomyopathy in FRDA. Overall, this work represents an advancement in the understanding of the pathology, which is pivotal for the development of new therapies, as well as in its diagnosis.

RESUMEN

La ataxia de Friedreich (FRDA, OMIM: 229300) es una enfermedad neurodegenerativa y hereditaria, que tiene una prevalencia de 1 cada 30.000 personas en Europa, de manera que se considera una enfermedad rara. Esta enfermedad se produce por la expansión de un triplete GAA en el intrón 1 del gen *FXN*, que codifica la proteína frataxina. La frataxina es una proteína principalmente mitocondrial, que se ha relacionado con la formación de centros hierro-azufre, necesarios para el correcto funcionamiento de multitud de enzimas que participan en el metabolismo, el manejo del estrés oxidativo o la homeostasis del calcio. La expansión del triplete GAA provoca una reducción en los niveles de frataxina, lo que da lugar a la enfermedad. Desde la descripción de la patología por Nikolaus Friedreich en 1863, se observó que, aparte de la neurodegeneración característica, los pacientes presentaban alteraciones cardíacas, tales como la hipertrofia cardíaca, las arritmias o la fibrosis. De hecho, la patología cardíaca supone la principal causa de muerte de los pacientes con FRDA. Sin embargo, a pesar de este dato, no son muchas las investigaciones centradas en la patología cardíaca de la FRDA, por lo que el conocimiento sobre estas alteraciones continúa siendo limitado. Este se debe, principalmente, a la baja prevalencia de la enfermedad, la variabilidad en el tipo y gravedad de los síntomas, las complicaciones en el seguimiento de los pacientes y la escasa disponibilidad de modelos animales y celulares que recapitulen correctamente el fenotipo cardíaco.

Las células troncales pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés *induced Pluripotent Stem Cell*) fueron descritas por primera vez por Yamanaka en el año 2006. Desde entonces, han supuesto una revolución para la investigación biomédica puesto que, a partir de fibroblastos o linfocitos del propio paciente, permiten la obtención de multitud de tipos celulares manteniendo la información genética del paciente. A partir del año 2011 comenzaron a desarrollarse cardiomiocitos derivados de iPSC (iPSC-CM) de pacientes con FRDA con el objetivo de estudiar el mecanismo fisiopatológico responsable de

la cardiomiopatía. Se observó que los iPSC-CM de FRDA presentaban alteraciones en la electrofisiología, en la función mitocondrial y en la expresión de proteínas relacionadas con el hierro. No obstante, los estudios realizados son muy limitados y se requiere más investigación para aclarar las alteraciones presentes en mecanismos como la homeostasis del calcio, proceso que se ha visto alterado en modelos de neurodegeneración de FRDA y que resulta clave para el correcto funcionamiento cardíaco.

En este contexto, se propone el desarrollo e implantación en el laboratorio de un modelo de iPSC-CM procedente de pacientes con FRDA que, mediante su caracterización, permita aportar luz sobre los mecanismos moleculares afectados en la patología cardíaca de la FRDA.

Para abordar este objetivo principal, se obtuvieron dos líneas de iPSC del laboratorio del Dr. Napierala procedentes de dos pacientes de FRDA, que presentan distinto número de repeticiones del triplete GAA, lo que está asociado con la gravedad de los síntomas. También se obtuvo otra línea de iPSC procedente de un individuo sano para ser utilizada como control. En primer lugar, se puso a punto el protocolo para diferenciar las iPSC a cardiomiocitos ventriculares. Para comprobar si la diferenciación había sido exitosa, se cuantificó la expresión de marcadores cardíacos por diferentes técnicas moleculares y se comprobó la disminución de marcadores de pluripotencia respecto a las iPSC de partida. Una vez obtenido y validado el modelo celular, comenzaron a investigarse las posibles alteraciones responsables de la patología cardíaca en la FRDA.

En un trabajo previo de nuestro laboratorio, se había identificado una serie de miARN como posibles biomarcadores de FRDA. En concreto, uno de los miARN, el miR-323a-3p se identificó como un biomarcador de cardiomiopatía en la FRDA, por lo que se decidió cuantificar la firma de miARN en los iPSC-CM de FRDA y realizar un estudio de sus dianas con el objetivo de comprobar la implicación de la epigenética en la fisiopatología cardíaca. Se observó que en los iPSC-CM de FRDA existe también una sobreexpresión de la firma de miARN

del estudio. Además, el análisis del enriquecimiento funcional mostró que las dianas de los miARN están implicadas en patología cardíaca. De hecho, se localizaron dianas ligadas a procesos relevantes para el funcionamiento del corazón como la homeostasis del calcio o la dinámica del citoesqueleto. Entre estas dianas, se encuentran genes que codifican canales de calcio de membrana como *CACNA1C*, *CACNA1D* y *CALHM5*, o el gen que codifica la bomba que introduce calcio en el retículo sarcoplásmico, *ATP2A2*. Los iPSC-CM de FRDA mostraron alteraciones en la expresión de estos genes sugiriendo una afectación en la homeostasis del calcio. De la misma forma, se observó que *CFL2*, el gen que codifica la isoforma cardíaca de cofilina-2, una proteína implicada en la dinámica del citoesqueleto y relacionada con la FRDA, también es diana de uno de los miARN y su expresión se encontró disminuida en los iPSC-CM de FRDA señalando posibles alteraciones en el citoesqueleto.

Por otra parte, se observó que los iPSC-CM de FRDA presentan alteraciones en el latido cardíaco y arritmias de tipo post-despolarizantes en la medida del potencial de acción asociado. Por ello, y sumado a las alteraciones en la expresión de diferentes canales de calcio, se decidió estudiar la homeostasis del Ca^{2+} como posible mecanismo del fallo causante de las arritmias. Los flujos de Ca^{2+} intracelulares se estudiaron mediante microscopía confocal, donde se observó que los iPSC-CM de FRDA presentan un incremento en los niveles de Ca^{2+} citosólico tras cada estímulo en comparación con la línea control. Sin embargo, este incremento no va acompañado de una mayor salida de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, por lo que debe existir un aumento en los niveles de Ca^{2+} que entran a la célula por los canales de membrana, cuya expresión se ha demostrado que se encuentra alterada en los iPSC-CM de FRDA. Por otra parte, los iPSC-CM de FRDA mostraron un incremento en la velocidad de extrusión de Ca^{2+} al exterior celular, lo que sugiere un aumento de actividad por parte del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, NCX. Este incremento en la actividad de salida de Ca^{2+} por el NCX podría dificultar la repolarización, lo que contribuiría a la aparición de arritmias de tipo post-despolarizantes.

Aparte de estas alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} , los iPSC-CM de FRDA mostraron anomalías en la estructura de sus mitocondrias, observándose una morfología más alargada y una pérdida de la estructura de las crestas, lo que sugiere tanto alteraciones en los procesos de fisión-fusión mitocondrial como una función metabólica alterada. Los procesos de homeostasis del calcio y de contracción requieren una gran demanda energética, por lo que la afectación mitocondrial podría llevar al fallo cardíaco.

También se observan alteraciones en la estructura del sarcómero, que apenas permanece reconocible en la línea de FRDA que cuenta con un fenotipo más agresivo. Además, existe una tendencia al acortamiento del sarcómero en ambas líneas, lo que puede causar problemas en el proceso de contracción.

Por otra parte, dada la implicación de la cofilina-2 en la patología de la FRDA, se decidió medir los niveles de cofilina-2 en el plasma de pacientes. Se observó que existe un incremento de cofilina-2 en el plasma de pacientes y que éste es inversamente proporcional a la edad y más acusado en aquellos pacientes con alteraciones en el electrocardiograma. Por ello, se propone la cofilina-2 como un posible biomarcador de alteraciones en el segmento ST/T del electrocardiograma.

Por tanto, durante el desarrollo de esta tesis, se ha llevado a cabo una profunda caracterización de un modelo de cardiomiocitos ventriculares derivados de iPSC de pacientes con FRDA, encontrándose alteraciones en la homeostasis del calcio, en la estructura de las mitocondrias y del citoesqueleto, y en la expresión de genes relacionados con estos mecanismos, lo que supone una contribución al entendimiento de la fisiopatología cardíaca de la FRDA. Además, se propone la cofilina-2 como un biomarcador que puede contribuir al diagnóstico precoz de la cardiomiopatía en la FRDA. Por todo, este trabajo supone un avance tanto en el conocimiento de la patología, que es la base del desarrollo de nuevas terapias, como en el diagnóstico de la misma.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1 Fisiología cardíaca	1
1.1 Estructura de la célula cardíaca	1
1.2 Mecanismo de contracción	4
1.3 Potencial de acción cardíaco	5
1.4 Acoplamiento excitación-contracción	6
2 La ataxia de Friedreich	10
2.1 Genética	12
2.2 Frataxina	14
2.2.1 Funciones de frataxina	15
2.3 Aspectos clínicos de la ataxia de Friedreich	21
2.3.1 Características neurológicas	21
2.3.2 Características no neurológicas	22
3 Patología cardíaca en la FRDA	24
3.1 Aspectos clínicos	24
3.2 Diagnóstico y tratamiento. Nuevos biomarcadores	25
3.3 Patología celular	26
3.3.1 Hipertrofia, mitocondria y metabolismo	27
3.3.2 Papel del hierro y muerte celular	28
3.3.3 Citoesqueleto y contracción	29
3.3.4 Acoplamiento excitación-contracción. Alteraciones en la homeostasis del calcio	30
4 Modelos para el estudio de la cardiomiopatía en la FRDA	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1 Material Biológico	43
1.1 Líneas celulares	43

1.2	Muestras de plasma	44
1.3	Anticuerpos y sondas fluorescentes	45
1.4	Cebadores de PCR	46
2	Métodos.....	47
2.1	Cultivo de las iPSC.....	47
2.1.1	Preparación del Matrigel.....	47
2.1.2	Descongelación de las iPSC	48
2.1.3	Pase de iPSC	48
2.2	Diferenciación y cultivo de los cardiomiocitos derivados de las iPSC.....	49
2.2.1	Siembra de las iPSC (día -2)	49
2.2.2	Diferenciación y mantenimiento de cardiomiocitos ventriculares (Día 0 – Día 15)	49
2.2.3	Maduración de los cardiomiocitos.....	51
2.2.4	Disociación y siembra de los cardiomiocitos.....	52
2.3	Caracterización de las líneas iPSCs y cardiomiocitos	53
2.3.1	Comprobación de la expresión de marcadores de pluripotencia y marcadores cardíacos mediante inmunofluorescencia	53
2.3.2	Cuantificación de la expresión de marcadores de pluripotencia y marcadores cardíacos mediante RT-qPCR.....	54
2.3.3	Cálculo del porcentaje de cardiomiocitos obtenidos mediante citometría de flujo.....	55
2.3.4	Análisis de los niveles de frataxina	55
2.4	Estudio de miARN y su papel en la fisiopatología de la FRDA.....	57
2.4.1	Cuantificación de miARN en los iPSC-CM por RT-qPCR.....	57
2.4.2	Búsqueda de genes diana y funciones enriquecidas.....	58
2.4.3	Cuantificación de la expresión de dianas por RT-qPCR	59
2.5	Análisis del latido cardíaco	59
2.6	Medida del potencial de acción.....	62
2.7	Análisis del flujo de calcio intracelular.....	63
2.8	Estudio de las mitocondrias mediante microscopía electrónica de transmisión	67
2.9	Estudio de la organización y longitud del sarcómero	68
2.10	Cuantificación de los niveles de cofilina 2 en plasma.....	69

2.11	Análisis estadístico	71
RESULTADOS		76
1	Caracterización de las líneas de iPSC.....	76
2	Diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos.....	78
3	Confirmación de la expresión de marcadores cardíacos.....	80
4	Confirmación de la reducción de la expresión de frataxina.....	83
5	Los iPSC-CM de FRDA presentan una sobreexpresión de una firma de miARN	84
6	Las dianas de los miARN sobreexpresados sugieren alteraciones en el citoesqueleto y en el flujo de Ca^{2+} intracelular en los iPSC-CM de FRDA	86
7	Los iPSC-CM de FRDA presentan alteraciones en el latido cardiaco.....	90
8	Los iPSC-CM de la FRDA manifiestan arritmias en la evaluación del potencial de acción.....	92
9	Los iPSC-CM de FRDA presentan alteraciones en la homeostasis del calcio ..	95
10	Las mitocondrias de los iPSC-CM de FRDA muestran una morfología alargada y una pérdida de la estructura de las crestas mitocondriales	99
11	Los iPSC-CM de FRDA presentan anomalías en la estructura del sarcómero	102
12	Cofilina-2 como biomarcador de alteraciones de afectación cardíaca en la FRDA	105
DISCUSIÓN		114
1	Modelando cardiomiopatías con iPSC-CM.....	114
2	Papel del Ca^{2+} en la disfunción cardiaca de la FRDA.....	117
3	Citoesqueleto y contracción en los iPSC-CM de FRDA.....	121
4	Función de frataxina en la patogénesis	124
5	Cofilina-2 como biomarcador de cardiomiopatías	126
CONCLUSIONES		130

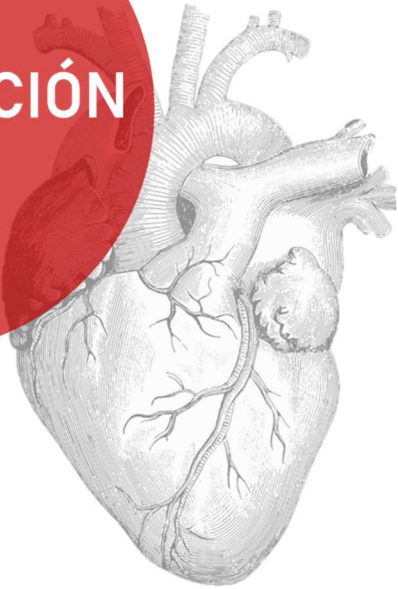
REFERENCIAS136

ÍNDICE DE FIGURAS163

ÍNDICE DE TABLAS166

ANEXOS169

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1 Fisiología cardíaca

El corazón es un órgano que actúa como una bomba que toma sangre de los vasos sanguíneos venosos a baja presión, y la impulsa a una presión superior hacia los vasos sanguíneos arteriales (Klabunde 2011a). El corazón humano pesa solamente entre 300 y 350 gramos, pero es capaz de bombear unos 200 millones de litros de sangre durante la vida de una persona. En cada latido, el corazón experimenta una fase de relajación, llamada diástole, donde aurículas y ventrículos se llenan de sangre, seguida de una fase de contracción, la sístole, que impulsa la sangre a todo el cuerpo. Un corazón aislado de un animal de sangre fría, al ser colocado en una solución adecuada, continúa latiendo durante un largo periodo de tiempo, ilustrando que esta función contráctil es mediada por la actividad eléctrica del propio corazón, a diferencia del músculo esquelético, que requiere inervación externa (Levick 1991). El impulso eléctrico, o potencial de acción (PA), es generado por unas células especializadas que forman un grupo conocido como nodo sinoauricular (NSA), localizado en la aurícula derecha. El PA, generado en el NSA, se propaga a ambas aurículas, alcanza el nodo auriculoventricular (NAV), y se distribuye a los ventrículos a través del haz de His y las fibras de Purkinje. Cuando el PA excita a los cardiomiocitos ventriculares, se produce un incremento en la concentración de iones calcio dentro de la célula, lo cual activa las proteínas contráctiles, produciendo así la contracción, que comienza en las aurículas hasta el extremo inferior de los ventrículos (Klabunde 2011c; Levick 1991).

1.1 Estructura de la célula cardíaca

Los miocitos cardíacos son células de aproximadamente 25 μm de diámetro y unas 100 μm de longitud, que generalmente cuentan con un único núcleo y un patrón de bandas o estrías cruzadas, por lo que representan un tipo de músculo estriado. Los cardiomiocitos individuales se conectan unos a otros formando redes ramificadas a través de estructuras llamadas discos intercalares. Dentro de estos discos intercalares, se encuentran los desmosomas, que permiten la

INTRODUCCIÓN

adhesión mecánica entre células, y las uniones de tipo gap, que funcionan como canales de comunicación permitiendo el paso de iones de una célula a otra. La característica clave de estas uniones es su baja resistencia al flujo iónico, lo que facilita una rápida transferencia de iones, permitiendo que el miocardio se comporte como un sincitio funcional, es decir, actúe como una unidad contráctil (Lo 2000).

Cada cardiomiocito se compone de un haz de miofibrillas, que están compuestas a su vez de miofilamentos. Los sarcómeros son las unidades contráctiles de la fibra muscular estriada cardíaca, y están organizados en serie a lo largo de la célula muscular. En el sarcómero, se pueden distinguir dos tipos de filamentos: los filamentos gruesos, formados por la proteína miosina, y los filamentos delgados, compuestos principalmente por actina, aunque también contienen proteínas como la troponina y la tropomiosina (Klabunde 2011c; Levick 1991). Cada sarcómero está delimitado por la línea Z, que es una banda estrecha que separa las unidades contráctiles y que está formada por la proteína α -actinina. La distancia entre líneas Z marca la longitud del sarcómero que se encuentra entre 1,6 y 2,2 μm en el corazón humano (Levick 1991), lo cual determina la fuerza de contracción del cardiomiocito. Por su parte, la titina, una larga proteína filamentosa, ayuda a mantener los filamentos gruesos centrados en el medio del sarcómero, en lo que se conoce como banda M (Lange et al. 2020). La estructura de la célula cardíaca se encuentra representada en la **figura 1**.

Por su relevancia en el desarrollo de esta tesis, cabe destacar la función de la proteína cofilina-2 (CFL2). La CFL2 es la isoforma específica del músculo perteneciente a la familia de proteínas *Actin-Depolymerizing Factor* (ADF)/cofilina, que actúan principalmente uniéndose a los filamentos de actina (F-actina) y regulando su dinámica (**figura 2**). En concreto, la CFL2 se sitúa en la banda M del cardiomiocito, donde se encuentran los extremos de la F-actina, y se une a ellos produciendo el corte de monómeros de actina (G-actina) del filamento. De esta forma, la CFL2 promueve la dinámica de la actina, regulando

la longitud de los filamentos y reponiendo el conjunto de G-actina que queda disponible para nuevas rondas de ensamblaje (Kremneva et al. 2014). La función de la CFL2 se regula mediante fosforilación por la proteína LIM quinasa (LIMK), que inactiva la CFL2, y que es, a su vez, regulada por la quinasa asociada a Rho (ROCK). La reducción en los niveles de expresión de CFL2 está relacionada con la afectación de la organización de los sarcómeros (Lin et al. 2021), y la dilatación y adelgazamiento de la pared del ventrículo izquierdo. De hecho, en muestras cardíacas de pacientes de cardiomiopatía dilatada idiopática se detectaron agregados de CFL2 en su estado fosforilado (inactivo) (Subramanian et al. 2015).

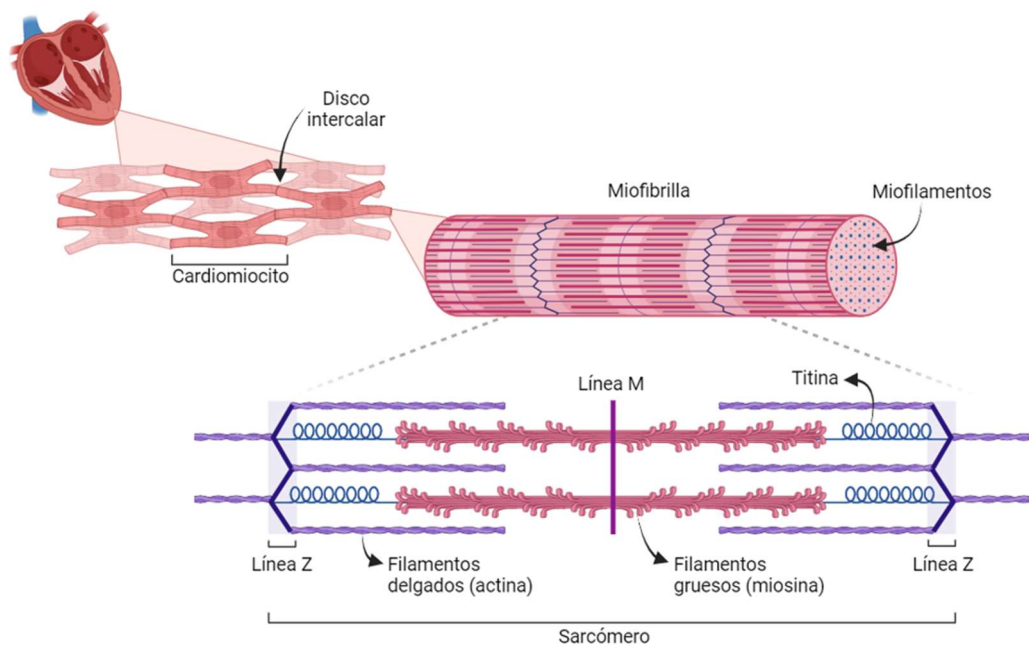


Figura 1 | Estructura de los miocitos cardíacos. Los cardiomiocitos se unen por discos intercalares para formar un sincitio funcional. Cada cardiomiocito está formado por miofibrillas, que contienen a su vez miofilamentos compuestos de actina (filamentos delgados) y miosina (filamentos gruesos). Cada grupo de miofilamentos forma una unidad contráctil, conocida como sarcómero, que está limitada por la línea Z. Figura original creada con Biorender.com.

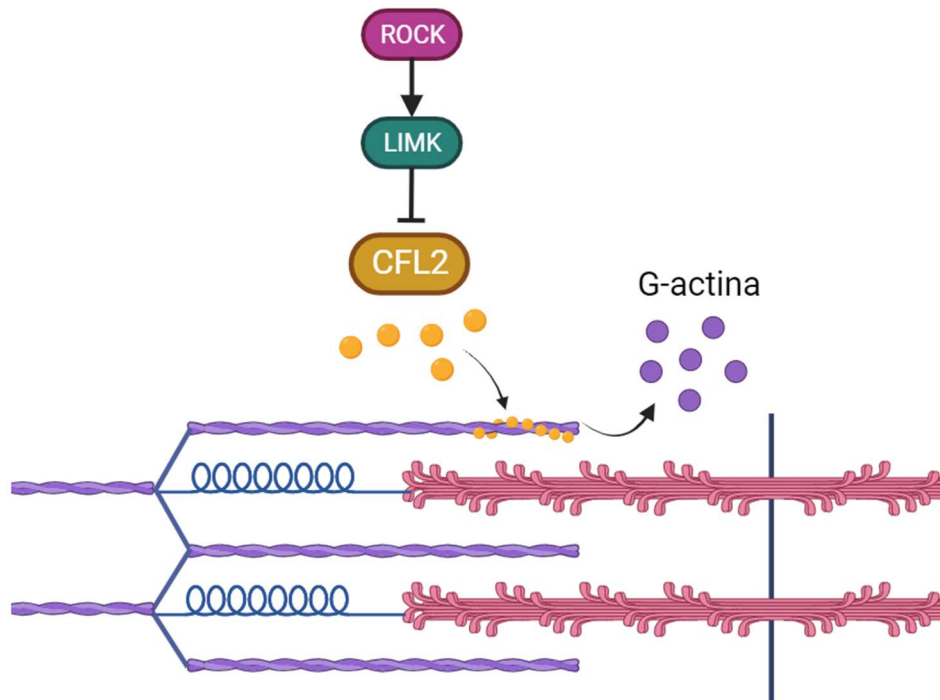


Figura 2 | Función de la cofilina-2. La CFL2 se une a los extremos de los filamentos de actina (F-actina) cercanos a la banda M y produce el corte de los monómeros de actina (G-actina) del filamento, promoviendo la dinámica de la actina y regulando la longitud de los filamentos. La función de CFL2 se regula mediante fosforilación por LIMK, quien es a su vez regulada por ROCK, y que inactivan la función de CFL2. CFL2: Cofilina-2; LIMK: LIM quinasa; ROCK: Quinasa asociada a Rho. Figura original creada con Biorender.com.

1.2 Mecanismo de contracción

La contracción del cardiomiocito es causada por el acortamiento de sus sarcómeros, en concreto, por el deslizamiento de la actina entre los filamentos de miosina. Cada molécula de miosina contiene dos cabezas que se unen al sitio de unión de la actina permitiendo la formación de puentes cruzados entre ambos filamentos. A su vez, estas cabezas de miosina sirven para unir la enzima miosina ATPasa, que hidroliza ATP, el cual se requiere para la formación

de los puentes cruzados, que están regulados por el complejo troponina-tropomiosina, entre otros, en respuesta al ion Ca^{2+} (Solaro and Rarick 1998). La tropomiosina, en condiciones de reposo, se encuentra enrollada alrededor de la actina bloqueando el sitio de unión con la miosina. Cuando los iones Ca^{2+} se unen a la subunidad troponina-C, se produce un cambio conformacional en todo el complejo (formado también por la troponina-T y la troponina-I) liberando el sitio de unión de la actina y dejándola accesible para el anclaje de las cabezas de miosina. Una vez producida la unión, el ángulo de las cabezas de miosina cambia, desplazando así a los filamentos de actina sobre la miosina provocando el acortamiento de los sarcómeros y, con ello, la contracción (Klabunde 2011c; Levick 1991).

1.3 Potencial de acción cardíaco

El potencial de acción (PA), el cual provoca cambios en la permeabilidad de la membrana, es el desencadenante de la contracción (Bers 2002). El corazón comprende tanto miocitos de trabajo, que presentan potenciales de reposo más estables, como células del marcapasos, que cuentan con potenciales de reposo más pequeños e inestables, de manera que pueden despolarizarse espontáneamente con mayor facilidad, generando la actividad eléctrica intrínseca del corazón (Pinnell, Turner, and Howell 2007). A diferencia del PA de otras células excitables, el PA cardíaco presenta una duración superior, encontrándose en el rango de 200 a 400 milisegundos y, caracterizándose, por una prolongada fase de meseta (Ackerman and Clapham 2004). Estas diferencias responden a una disimilitud en las conductancias iónicas responsables de generar los cambios en el potencial de membrana (Klabunde 2011b).

En un cardiomiocito de trabajo, el PA de una célula adyacente provoca una rápida despolarización (fase 0) desde el potencial de reposo (-90 mV), iniciada por la entrada masiva de Na^+ a través de los canales de sodio dependientes de voltaje (I_{Na}). Tras unos pocos milisegundos, los canales de Na^+ se inactivan y se produce una ligera repolarización (fase 1) debida al movimiento transitorio de

los iones K^+ hacia el exterior celular (I_{to}). La entrada lenta de Ca^{2+} a través de los canales iónicos de tipo L (I_{Ca}), que se abren cuando el potencial de membrana se encuentra sobre los -40 mV, produce un retraso en la repolarización, dando lugar a la característica meseta del PA cardíaco (fase 2). La repolarización (fase 3) se produce cuando se cierran los canales de calcio de tipo L, mientras que canales lentos de K^+ continúan abiertos (I_{Ks}), asegurando una corriente de K^+ hacia fuera. El proceso se aligera con la apertura de canales rápidos de K^+ (I_{Kr}), hasta que se alcanza el potencial de reposo de la membrana, que se sitúa en los -90 mV (fase 4). Esta fase es asociada con la diástole.

Durante las fases 0, 1, 2 y parte de la 3, la célula es incapaz de despolarizarse de nuevo, es lo que se conoce como periodo refractario absoluto. Esto tiene una función protectora, al permitir que el corazón tenga el tiempo necesario para llenarse y expulsar la sangre. Además, evita que puedan generarse contracciones sostenidas, de tipo tetánico, como sucede en el músculo esquelético. Al final del periodo refractario absoluto, hay un periodo refractario relativo, donde es posible excitar a la célula, pero los PA generados tendrán menor amplitud, debido a que no todos los canales de sodio están en estado de reposo.

1.4 Acoplamiento excitación-contracción

El enlace entre la excitación eléctrica y la contracción cardíaca es un proceso conocido como acoplamiento excitación-contracción, que depende de transitorios de Ca^{2+} intracelulares para su correcto funcionamiento. Los transitorios de Ca^{2+} son una secuencia de eventos de señalización que comienzan con la entrada inicial de Ca^{2+} en la célula activada por el PA, seguida de una liberación masiva de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS), y concluyen con la eliminación subsiguiente de Ca^{2+} durante la diástole a través de la reabsorción del Ca^{2+} por el RS y la extrusión al exterior celular (Jing Li, Richmond, and Hong 2022). Un esquema del proceso puede encontrarse en la **figura 3**.

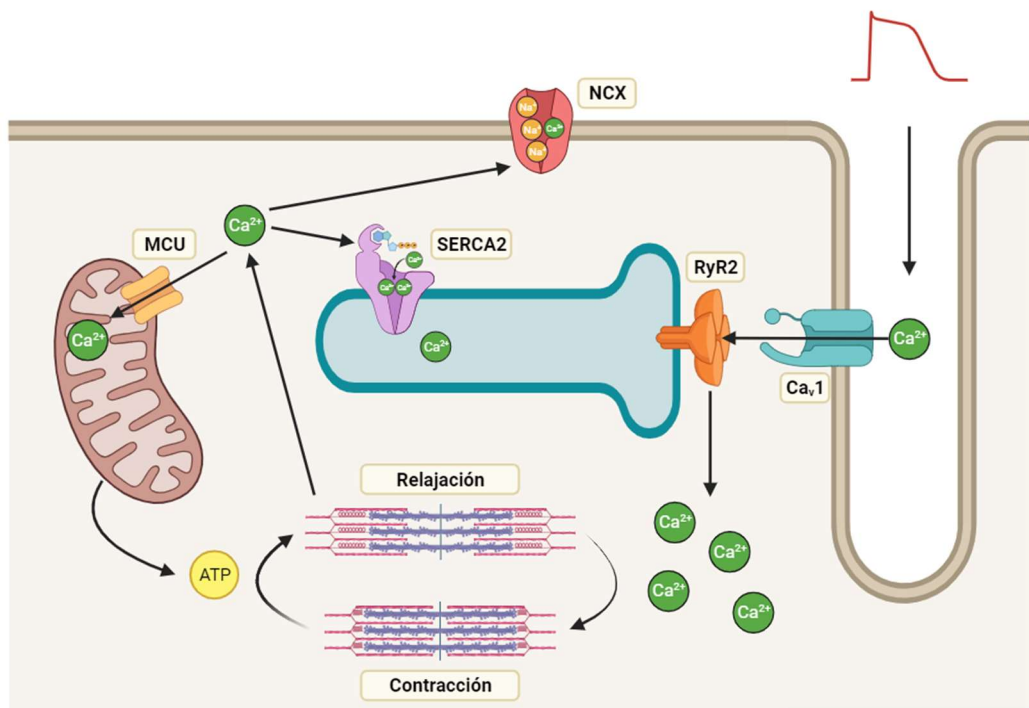


Figura 3 | Acoplamiento excitación-contracción en el cardiomiocito. El potencial de acción se propaga por los túbulos T del cardiomiocito, provocando la apertura de los canales de tipo L dependientes de voltaje y, con ello, la entrada de Ca^{2+} al interior celular, que estimula el $RyR2$ produciendo la salida de Ca^{2+} del RS incrementando rápidamente la concentración de Ca^{2+} citosólico, en un proceso conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . El Ca^{2+} citosólico se une entonces a la troponina dando lugar a la contracción (o sístole) del cardiomiocito. La relajación (o diástole) se produce cuando disminuyen los niveles de Ca^{2+} citosólico, bien porque el Ca^{2+} es recaptado por el RS a través de la bomba $SERCA2$, o bien porque son extruidos al exterior celular NCX . El Ca^{2+} también puede ser tomado por la mitocondria a través del canal MCU para ajustar la producción de ATP a la demanda energética del cardiomiocito. Ca_v1 : Canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo L; RyR : Receptor de Rianodina; $SERCA2$: ATPasa de Ca^{2+} del RS; NCX : Intercambiador de Na^+/Ca^{2+} ; MCU : Uniportador de Ca^{2+} mitocondrial. Figura creada con Biorender.com.

Cuando el PA alcanza la membrana del cardiomiocito, la señal se propaga al interior de la fibra muscular cardíaca a través de las membranas de los túbulos transversos (túbulos T). Los túbulos T son unas invaginaciones profundas, que están presentes, sobre todo, en los cardiomiocitos ventriculares, y que permiten que el estímulo eléctrico se transmita rápidamente al interior de la célula. Cuando el PA causa la despolarización del cardiomiocito, se produce la apertura de canales dependientes de voltaje de tipo L situados en la

INTRODUCCIÓN

membrana de los túbulos T. Los iones Ca^{2+} entran dentro de la célula a través de estos canales y activan al receptor de rianodina (RyR), que se localiza en las membranas del RS. El RS es un orgánulo desarrollado a partir del retículo endoplásmico (RE), basado en un sistema de membranas tubulares que cuenta con cisternas terminales próximas a los túbulos T, y que supone el almacén de iones Ca^{2+} del cardiomiocito. El reconocimiento del Ca^{2+} por los RyR desencadena la liberación de grandes cantidades de Ca^{2+} almacenadas en el RS, incrementándose la concentración de Ca^{2+} intracelular unas cien veces, en un proceso conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Bers 2002).

El Ca^{2+} libre se une entonces a la troponina-C produciendo la contracción (ver apartado 1.2. *Mecanismo de contracción*). Con el fin de la fase de meseta del PA, se cierran los canales de tipo L, produciendo una reducción en la entrada de Ca^{2+} . En este punto, la ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA2) secuestra el Ca^{2+} dentro del RS en un proceso dependiente de ATP y contragradiente. Por otro lado, parte del Ca^{2+} se extruye al exterior celular por el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), que introduce 3 Na^+ y expulsa 1 Ca^{2+} , y, en menor medida, por la ATPasa de Ca^{2+} del sarcolema, impidiendo que la célula se sobrecargue de Ca^{2+} (Bers 2008). Al disminuir la concentración de Ca^{2+} libre del citosol, éste se disocia de la troponina-C, la actina y la miosina se sueltan (lo cual también requiere ATP) y se restaura la longitud inicial del sarcómero produciéndose la relajación.

Los flujos de Ca^{2+} pueden regularse a través de la señalización β -adrenérgica, lo que regula, a su vez, la contractilidad (inotropismo) y la relajación (lusitropismo). La estimulación de los receptores B-adrenérgicos activan las proteínas de unión a GTP, que estimulan a la adenil ciclasa para producir AMP cíclico, lo cual activa la proteína quinasa A (PKA). PKA fosforila multitud de proteínas relacionadas con el acoplamiento excitación-contracción, como los canales de tipo L, el RyR, la troponina I o fosfolambano (PLN), que funciona como un inhibidor de SERCA2 que, al fosforilarse, deja de ejercer su efecto represor permitiendo la rápida toma de Ca^{2+} por el RS. De esta forma, la

fosforilación de PLN tiene un efecto lusitrópico al acelerar la caída de Ca^{2+} intracelular. A su vez, esto provoca una mayor disponibilidad de Ca^{2+} en el retículo que, junto al aumento de la actividad de los canales de tipo L, producen un incremento en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} y, con ello, favorecen el inotropismo (Bers 2008). Esta interrelación entre lusitropismo e inotropismo mediada por Ca^{2+} permite al miocardio aumentar la contracción y acelerar la relajación en respuesta a determinados estímulos (Katz 1990). Además, los flujos de Ca^{2+} pueden regularse a través de la actividad de la Ca^{2+} /calmodulina proteína quinasa II (CAMKII), que también puede fosforilar PLN y RyR, aparte de transducir las señales de Ca^{2+} al núcleo para regular la transcripción génica (Grimm and Brown 2010).

La gran cantidad de energía necesaria para la contracción es aportada, en su mayor parte (95% del ATP), por la mitocondria (Kolwicz, Purohit, and Tian 2013). Las mitocondrias cuentan con canales de Ca^{2+} , siendo el mejor caracterizado el *Mitochondrial Calcium Uniporter* (MCU), que permiten a la mitocondria responder a los niveles de Ca^{2+} citosólico. De esta forma, el Ca^{2+} mitocondrial se incrementa en respuesta al incremento de Ca^{2+} en el citosol durante la contracción, lo cual supone una señal para adaptar la producción de ATP a la demanda energética del momento (K. Wang et al. 2018). De esta forma, el Ca^{2+} actuaría como un segundo mensajero, en lo que podría definirse como el acoplamiento excitación-metabolismo (Cao et al. 2019). Por otra parte, la capacidad de captar Ca^{2+} de la mitocondria permite que este orgánulo participe activamente en el tamponamiento de Ca^{2+} citosólico en multitud de tipos celulares (Duchen 2000). Sin embargo, en el cardiomiocito existe controversia sobre la relevancia de la mitocondria en este proceso, debido a que no se conoce cómo afecta la toma de Ca^{2+} por parte de la mitocondria a los niveles de Ca^{2+} citosólico en cardiomiocitos adultos (Boyman et al. 2014; Drago et al. 2012; Sullivan, Balke, and Esser 2006).

2 La ataxia de Friedreich

La ataxia de Friedreich (FRDA, OMIM no. 229300) es una enfermedad neurodegenerativa con herencia autosómica recesiva. A pesar de considerarse una enfermedad rara, es la ataxia hereditaria más común en Europa, con una prevalencia de 1 cada 30.000 individuos, aunque existen diferencias regionales dentro del continente, siendo más prevalente en el suroeste europeo (Vankan 2013).

En 1863, Nikolaus Friedreich (1825-1882), un patólogo alemán, realizó la primera descripción de la enfermedad que ahora lleva su nombre. Friedreich describió la patología de 6 pacientes, pertenecientes a 2 familias no relacionadas, quienes mostraban una “atrofia degenerativa de las columnas posteriores espinales”. Clínicamente, estos pacientes presentaban problemas en el equilibrio y la marcha, debilidad en las piernas, alteraciones en la coordinación y en la sensibilidad, disartria, nistagmo, escoliosis y deformidades en los pies (Friedreich 1863). Curiosamente, Friedreich también describió alteraciones en el corazón de los pacientes, afirmando que “la musculatura del ventrículo izquierdo...es algo más gruesa de lo normal, aunque flácida y marchita; en un corte, se muestra significativamente anémica y de apariencia peculiarmente manchada, jaspeada” (Friedreich 1863). Todas estas características clínicas, junto con la pérdida temprana de los reflejos tendinosos profundos, forman el núcleo de la descripción clásica de la FRDA. Durante el siguiente siglo, hubo mucho debate motivado por la variabilidad fenotípica de los casos reportados, de manera que no se sabía si la condición representaba una única entidad nosológica, ni tampoco si los casos atípicos debían ser incluidos dentro de la definición de la enfermedad. En los años 70 y 80, se llevó a cabo una descripción fenotípica sistemática, lo que permitió el desarrollo de criterios clínicos de diagnóstico fiables (Geoffroy et al. 1976; Harding 1981). También, se incluyeron entre los síntomas la atrofia óptica, la sordera y la diabetes (Thorén 1962), de manera que la enfermedad pasó a considerarse una alteración multisistémica.

En el fenotipo clásico de la enfermedad, la edad de aparición de los síntomas

ronda la pubertad, y casi siempre ocurre antes de los 25 años, siendo los síntomas iniciales la inestabilidad en la marcha y la torpeza en los movimientos (M B Delatycki et al. 1999; HARDING 1981). Con el tiempo, los pacientes desarrollan ataxia del tronco y de las extremidades, lo que dificulta la vida diaria. La progresión de la enfermedad es variable, aunque la mayoría de los pacientes requieren del uso de silla de ruedas en aproximadamente 11-15 años tras el inicio de los síntomas (M B Delatycki et al. 1999; Dürr et al. 1996). En los casos atípicos, los síntomas pueden aparecer de manera temprana (antes de los 10 años), lo que se asocia con una progresión acelerada de la enfermedad, o tardía (después de los 25 años), relacionada con una progresión más lenta. La edad media de fallecimiento de los pacientes se sitúa en los 36,5 años (rango de edad 12-87), siendo la disfunción cardíaca la causa más común de muerte (Tsou et al. 2011).

En 1876, Friedreich, tras un seguimiento de 14 años a las familias afectadas, postuló que la causa de la enfermedad podría ser hereditaria (Friedreich 1876). Sin embargo, no fue hasta 120 años más tarde cuando se descubrió la causa genética responsable de la FRDA (Campuzano et al. 1996). Gracias a este descubrimiento, se pudieron diagnosticar los fenotipos atípicos de la FRDA, lo que reveló que solo el 75% de los pacientes se diagnosticaban adecuadamente como casos de FRDA según los criterios iniciales de Harding (McCabe et al. 2000). Actualmente, se conoce que el 96% de los casos están causados por una expansión homocigótica del triplete GAA en el intrón 1 del gen *FXN*, que codifica la proteína frataxina. Los casos restantes (1-3%) son heterocigotos compuestos, que presentan una expansión en uno de los alelos y una mutación puntual, inserción o delección en el otro (Galea et al. 2016). Como consecuencia de la expansión, los pacientes presentan una reducción en los niveles de la proteína frataxina.

Actualmente, no se conoce cura para la FRDA. El tratamiento se basa en la fisioterapia, la logopedia, la terapia ocupacional y la cirugía. Recientemente, se ha aprobado el primer tratamiento farmacológico por la FDA (*Food and Drug Administration*) llamado Omaveloxolona (SKYCLARYS™), tras demostrar

mejorar de manera significativa la evaluación neurológica de los pacientes de forma dosis-dependiente ((FDA) 2023; Lynch et al. 2023; Lynch, Chin, et al. 2021).

2.1 Genética

La frataxina es una pequeña proteína encontrada principalmente en la mitocondria y muy conservada a lo largo de la evolución (Campuzano, 1997). En humanos, está codificada en el núcleo por el gen *FXN*, situado en el *locus* 9q21.11 (versión GRCh38.p13 [GCF_000001405.39]). En la mayoría de los casos, la FRDA se produce cuando la transcripción del gen *FXN* se reduce debido a una expansión anómala en ambos alelos de repeticiones de un trinucleótido GAA, localizadas en una secuencia Alu en el intrón 1 del mismo gen. Los casos restantes (1-3%) son heterocigotos compuestos, que cuentan con una expansión en uno de los alelos y una mutación puntual o delección en el otro. En cualquier caso, la expresión de la frataxina se ve reducida hasta un 5-35% de los niveles que presentan los individuos sanos. En el caso de los portadores heterocigotos, estos presentan un 50% de los niveles de expresión de la proteína y son asintomáticos (Campuzano et al. 1997). La tasa de portadores entre los europeos es de aproximadamente 1 entre 85 individuos (Brown et al. 2021; Cossée et al. 1997).

El fenotipo clínico está determinado por el tamaño de la expansión, el cual se ha relacionado inversamente con la edad de inicio y de confinamiento en silla de ruedas, y directamente con la incidencia de cardiomiopatía (Dürr et al. 1996; Filla et al. 1996). Por lo general, los pacientes presentan entre 70 y 1500 repeticiones del triplete GAA, siendo lo más común entre 600 y 900 (M Pandolfo 2001). La expansión más pequeña que ha sido asociada con la FRDA es de 44 repeticiones, mientras que los cromosomas considerados normales presentan menos de 33 repeticiones (M Pandolfo 2001). Además, la expansión es inestable, tanto en meiosis como en mitosis, por lo que puede cambiar a lo largo de la vida de una persona, y también de unas generaciones a otras (Long et al. 2017).

El hecho de que una expansión en una región no codificante produzca una disminución en los niveles de frataxina ha dado lugar a multitud de

investigaciones acerca de los mecanismos de silenciamiento del gen. La combinación de varios mecanismos parece ser la responsable de la inhibición de la expresión. Por una parte, existe un bloqueo físico en la transcripción debido a que la repetición del triplete GAA formaría estructuras no canónicas (*sticky DNA*) y estructuras híbridas de DNA-RNA (*R-loops*) (Sakamoto et al. 1999). Estas estructuras impedirían el progreso de la ARN polimerasa II bloqueando la transcripción.

Otro de los mecanismos de silenciamiento implicados está relacionado con la regulación epigenética y consiste en el balance anormal entre la eucromatina (transcripcionalmente activa) y la heterocromatina (transcripcionalmente inactiva). En concreto, se ha observado un incremento en la trimetilación de histonas (H3K9me3 y H3K27me3) e hipoacetilación en los residuos de lisina de las H3 y H4 de las regiones flanqueantes a los tramos de expansión GAA (Al-Mahdawi et al. 2008). Además, el tratamiento con inhibidores de histona deacetilasa ha conseguido producir la reactivación parcial del gen silenciado en modelos animales y celulares de FRDA (Herman et al. 2006; Rai et al. 2008). En otro trabajo realizado en organoides de raíces del ganglio dorsal se ha observado que la excisión de la expansión GAA no consigue rescatar la expresión del gen *FXN*, pero esto sí es posible cuando se elimina el intrón 1 por completo. Este resultado sugiere que es la heterocromatinización anormal de la región flanqueante a la expansión la que provoca el silenciamiento del gen (Mazzara et al. 2020). Por otra parte, el gen *FXN* contiene una isla CpG cubriendo el promotor, el primer exón y el principio del primer intrón, además de otros residuos CpG flanqueando las repeticiones GAA, lo que hace a esta región óptima como diana de metilación de ADN. Estudios en células mononucleares aisladas de sangre periférica de pacientes mostraron niveles significativamente más altos de metilación en la región 5' proximal a la región de expansión del *locus FXN* (Castaldo et al. 2008). Además, se ha encontrado que existe una correlación positiva entre el silenciamiento del gen *FXN*, la severidad de la enfermedad y el nivel de metilación del ADN (Evans-Galea et al. 2012), lo que sugiere que la metilación tiene un importante papel en la patogénesis de la

enfermedad.

2.2 Frataxina

El gen *FXN* codifica frataxina, una proteína expresada de manera ubicua a niveles relativamente bajos. En humanos adultos, la frataxina se expresa principalmente en los ganglios de la raíz dorsal, la médula espinal, el núcleo dentado del cerebelo, el córtex cerebral, el páncreas, el corazón, el hígado y el músculo esquelético (Campuzano et al. 1996, 1997), reflejando los principales sitios de la patología de la FRDA (Arnulf H Koeppen 2011). Estudios recientes de RNA-seq han identificado también su expresión enriquecida en tejidos endocrinos, ovarios y médula ósea (Uhlén et al. 2015). Para reflejar la importancia de la frataxina, cabe destacar que es una proteína altamente conservada a través de la evolución desde las bacterias hasta los humanos (Gibson et al. 1996). Además, su expresión es imprescindible para el desarrollo, ya que se ha demostrado en ratones que la falta de frataxina produce letalidad embrionaria (Cossée et al. 2000).

La frataxina se produce principalmente a partir del transcrito más abundante del gen *FXN*, el derivado de los exones 1-5a (Campuzano et al. 1996). La frataxina se codifica en el núcleo y se expresa en el citoplasma como un precursor polipeptídico de 210 aminoácidos (23 kDa). Tras ello, el precursor de frataxina es transportado a la mitocondria debido a una señal de localización mitocondrial situada en su extremo N-terminal donde se produce su maduración por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP), en un proceso de dos pasos (Schmucker et al. 2008). En el primer paso, la MPP corta el extremo N-terminal entre los aminoácidos 41 y 42, produciendo una forma intermedia de la proteína de 144 aminoácidos, y finalmente, produce un último corte entre los aminoácidos 80 y 81, resultando en la forma de frataxina madura, siendo esta última forma de 130 aminoácidos (14,2 kDa) la más abundante en células sanas y de pacientes (Condò et al. 2007). Esta forma madura se presenta plegada en un motivo estructural tipo sándwich α - β - α . El extremo C-terminal se encuentra muy conservado evolutivamente, presentando una región ácida

con una superficie cargada negativamente, responsable de la unión a iones metálicos (Musco et al. 2000). Aparte de esta frataxina canónica, se han identificado otras cuatro isoformas de la proteína, que parecen ser específicas de tejidos, y difieren también en cuanto a localización subcelular, encontrándose algunas de ellas en el citosol y en el núcleo (Pérez-Luz et al. 2015; Xia et al. 2012). Sin embargo, no se conoce con exactitud la función de estas isoformas, ni tampoco su papel en la fisiopatología de la FRDA.

2.2.1 Funciones de frataxina

Desde el descubrimiento de la frataxina, se ha propuesto su participación en multitud de procesos celulares (Annalisa Pastore and Puccio 2013), aunque su función biológica todavía hoy no se conoce en su totalidad. Las principales funciones y sus implicaciones en la enfermedad se resumen en la **figura 4**.

- **Homeostasis del hierro**

Los primeros estudios sobre la función de la frataxina vinieron del análisis del mutante de *S. cerevisiae* deficiente en el gen homólogo de la frataxina (Yfh1) (Babcock et al. 1997; Foury and Cazzalini 1997; Koutnikova et al. 1997). Este modelo presentaba una ratio de respiración reducida y un incremento del hierro mitocondrial (Wilson and Roof 1997), lo que unido al hallazgo de acúmulos de hierro en el tejido cardíaco de pacientes con FRDA (Sanchez-Casis, Cote, and Barbeau 1976), sugirió que la frataxina debía presentar un papel en la homeostasis de este ion. La primera hipótesis fue que la frataxina era una proteína de almacenaje de hierro similar a la ferritina (Adamec et al. 2000). En el modelo de levadura, se observó que Yfh1 podía unir cationes de hierro y formar agregados, de forma que el hierro continuaba estando biodisponible, pero de una forma no tóxica (Cavadini et al. 2002). Sin embargo, varios estudios han rechazado la función de la frataxina como proteína de almacenaje de hierro (Aloria et al. 2004; Levi et al. 2001). Por ejemplo, en un estudio demostraron que, en organismos superiores, la mitocondria contiene una ferritina especializada que, cuando se expresa en levadura, previene la acumulación de hierro causada por la delección de *Yfh1*. Por tanto, la función de almacenaje de hierro de la

frataxina sería redundante, al menos en mamíferos (Levi et al. 2001).

Adicionalmente, en biopsias de corazón de pacientes con cardiomiopatía hipertrófica se encontró una deficiencia de los complejos I, II y III de la cadena de transporte de electrones y de la actividad de la enzima aconitasa (Rotig et al. 1997). Todas estas enzimas presentan centros hierro-azufre (*Iron Sulfur Clusters* o ISC) en sus sitios activos, los cuales son imprescindibles para el funcionamiento de procesos celulares fundamentales como la producción de ATP, la replicación, la reparación del ADN o la traducción, además de resultar muy sensibles al estrés oxidativo. Numerosos estudios sugieren que la frataxina está directamente involucrada en la síntesis *de novo* de ISC, actuando como una chaperona que permite la formación de estos centros. Se ha encontrado que la frataxina interacciona de manera directa con dos proteínas claves en la formación de estos centros. Por una parte, con la cisteína desulfurasa Nfs1, encargada de proveer el grupo sulfuro al ISC, y cuya actividad se ve muy mermada al disminuir los niveles de frataxina (Bridwell-Rabb et al. 2014; Fox et al. 2015; Tsai and Barondeau 2010). Por otra parte, también interacciona con Iscu, la proteína *scaffold* donde se ensambla el ISC (Johnson et al. 2005). La síntesis ineficiente de ISC podría ser la causa de acumulación de hierro mitocondrial, ya que en algunos modelos de ratón se ha observado que es un evento posterior a la disfunción de los ISC (Massimo Pandolfo and Pastore 2009). También relacionado con la homeostasis del hierro, se ha sugerido que la frataxina podría estar implicada en la síntesis de grupos hemo, al interaccionar con la ferroquelatasa, una enzima que cataliza el paso final en la biosíntesis de estos grupos (Lesuisse et al. 2003), aunque no existe consenso acerca de esta función, ya que la biosíntesis de grupos hemo podría estar afectada directamente por los defectos en la formación de ISC.

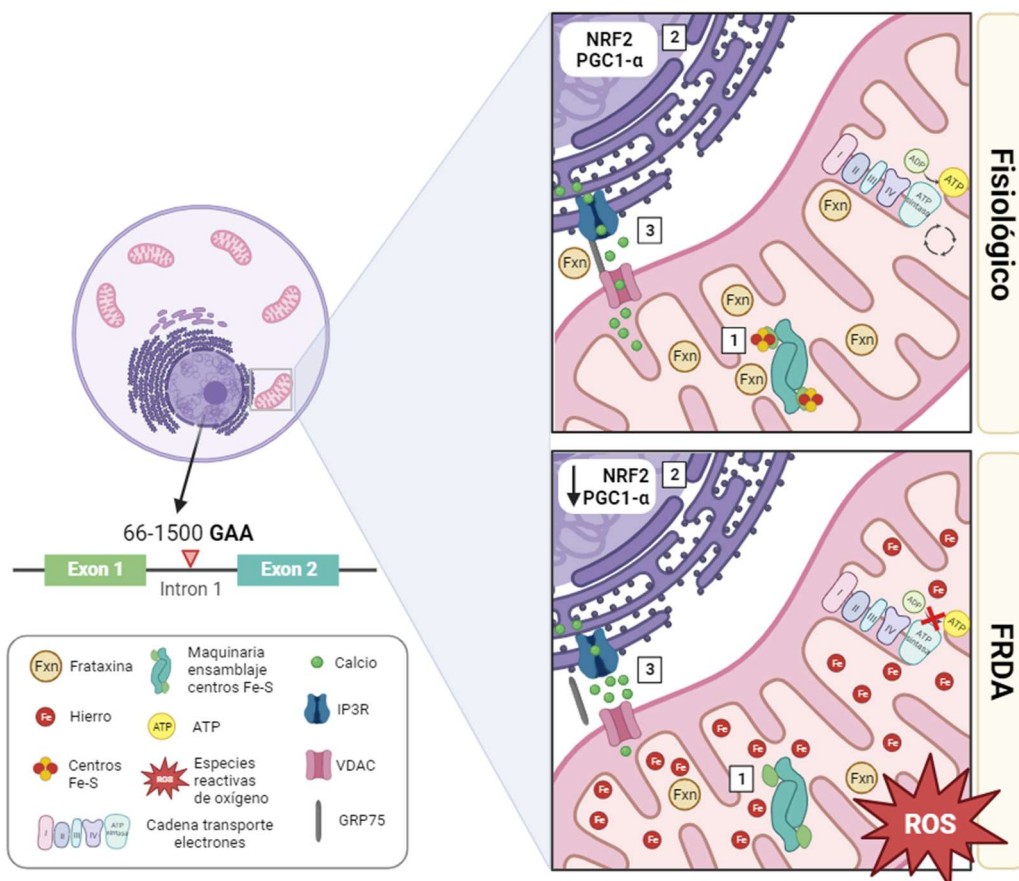


Figura 4 | Funciones de la frataxina en la mitocondria e implicaciones en la FRDA. La FRDA se produce una reducción de los niveles de frataxina como consecuencia de la expansión del triplete GAA en el intrón 1 del gen FXN. (1) En condiciones fisiológicas, la frataxina actúa como una chaperona permitiendo el ensamblaje de centros Fe-S, implicados en el funcionamiento de enzimas como la aconitasa y los complejos I, II y III de la cadena de transporte de electrones. El déficit de frataxina impide la formación de los centros Fe-S, provocando una acumulación de hierro libre y de ROS como consecuencia del mal funcionamiento de los complejos respiratorios. (2) Frataxina también participa en la respuesta antioxidante mediada por NRF2 y PGC1-α, de manera que la reducción de frataxina supone una disminución en la expresión de NRF2 y PGC1-α, incrementándose la susceptibilidad al estrés oxidativo. (3) Frataxina participa en el intercambio de Ca^{2+} entre el RE y la mitocondria, por lo que su déficit provoca una alteración en la homeostasis del Ca^{2+} , proceso clave para la supervivencia neuronal o la contracción cardíaca. Figura creada con Biorender.com

- **Regulación del estrés oxidativo**

Otra de las funciones propuestas de la frataxina es la de regular el estrés oxidativo en la célula. En muestras de pacientes, se reportó un incremento de marcadores de estrés oxidativo (Emond et al. 2000; Schulz et al. 2000), lo que,

junto a la hipersensibilidad al estrés oxidativo observada en fibroblastos y linfoblastos de pacientes (A. Wong et al. 1999), culminó en la hipótesis de que la frataxina desempeñaba una función en la regulación de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*). Recientemente, se ha descubierto que, en condiciones anaerobias, la biogénesis de los ISC funciona de manera correcta en ausencia de frataxina (Ast et al. 2019). Esto sugiere que la proteína evolucionó en organismos primitivos cuando la atmósfera se volvió rica en oxígeno y apunta a una posible función relacionada con este elemento. Sin embargo, existe debate sobre si el daño oxidativo asociado con el déficit de frataxina se debe a un incremento en la formación de ROS o a una pérdida de la defensa antioxidante, lo que, en cualquier caso, desembocaría en una hipersensibilidad de la célula al estrés oxidativo.

Por una parte, no resulta difícil relacionar la formación de ROS con el fallo de los ISC producido por el déficit de frataxina a través de la reacción de Fenton. En esta reacción, el H_2O_2 reacciona con el Fe^{2+} generando el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), el cual resulta altamente tóxico (Meneghini 1997). El déficit de frataxina incrementa los niveles de los dos elementos necesarios para la reacción de Fenton: el hierro, cuyos niveles aumentan debido a la síntesis ineficiente de ISC, y el H_2O_2 , cuyo incremento se produce como resultado de la alteración de las enzimas de los complejos respiratorios I, II y III, que también contienen ISC (Massimo Pandolfo and Pastore 2009). Precisamente, como consecuencia del mal funcionamiento de los complejos respiratorios, se produce también un incremento en la fuga de anión superóxido (O_2^-) durante el transporte de electrones. Sin embargo, existe controversia sobre si el estrés oxidativo está relacionado con la expresión de frataxina (Seznec et al. 2005).

Por otra parte, la hipersensibilidad al estrés oxidativo en los modelos de FRDA podría deberse a una alteración en la respuesta antioxidante debida a un fallo en la señalización de NRF2. NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) es un factor de transcripción considerado como el regulador por excelencia de la respuesta antioxidante. Está involucrado en la expresión de enzimas

antioxidantes que comparten una secuencia promotora común, denominada elemento de respuesta antioxidante (*Antioxidant Response Element* o ARE). Bajo condiciones de estrés oxidativo, NRF2 se transloca al núcleo, donde activa la transcripción de los genes que contienen ARE, manteniendo un estado redox adecuado en la célula (Niture, S.K., Khatri, R. and Jaiswal 2013). En varios modelos celulares y animales de FRDA, se ha demostrado que hay una baja expresión de NRF2, tanto en mensajero como en proteína, y que esta expresión es dependiente de frataxina (Shan et al. 2013). En consecuencia, la expresión de diferentes genes citoprotectores disminuye, entre los que se encuentran los genes que codifican SOD, catalasa, glutatión S-transferasa, etc (Paupe et al. 2009). De esta forma, la respuesta antioxidante se ve comprometida, potenciando la hipersensibilidad celular a las agresiones oxidativas.

- **Homeostasis del Ca^{2+}**

Numerosos estudios han relacionado la deficiencia de frataxina con un desequilibrio en la regulación del calcio intracelular, lo que sugiere que frataxina tiene un papel relevante en la homeostasis del calcio (Mincheva-Tasheva et al. 2014; Mollá et al. 2017). El equilibrio del calcio intracelular es crucial para la supervivencia de las neuronas y la función contráctil del corazón, por lo que su desregulación se asocia con problemas neurodegenerativos y cardíacos (Gilbert et al. 2020; Rodríguez et al. 2022).

En varios modelos neuronales y cardíacos, se ha descrito un desequilibrio en la homeostasis del calcio. Por ejemplo, en células SH-SY5Y deficientes en frataxina, se observó una acumulación de calcio citosólico, acompañada de una disminución en la incorporación de calcio mitocondrial y un mayor estrés de retículo (Bolinches-Amorós et al. 2014). Estos resultados se confirmaron en neuronas del DRG del modelo de ratón YG8R, que mostraron una acumulación anormal de calcio citosólico, que fue directamente relacionada con la disfunción mitocondrial (Mollá et al. 2017). Por su parte, en cardiomiocitos primarios derivados del modelo YG8R, la deficiencia de frataxina provocó una depleción de calcio en el RS y una baja respuesta mitocondrial a las señales de liberación

de calcio, llevando a una consecuente acumulación en el citosol (Abeti et al. 2018).

Estos estudios demuestran que la deficiencia de frataxina está directamente relacionada con la homeostasis del calcio. Sin embargo, no se conocía el mecanismo subyacente a esta alteración. Recientemente, en nuestro grupo, se describió por primera vez la participación de frataxina como un miembro de la red de proteínas que conforman las membranas asociadas a RE y mitocondria (*Endoplasmic Reticulum-mitochondrial associated membranas* o MAM), las cuales regulan el intercambio de calcio entre ambos compartimentos. La frataxina interacciona con dos de las principales proteínas implicadas en la comunicación entre RE y mitocondria. De esta forma, se observó que el déficit de frataxina provoca un tamponamiento deficiente de calcio citosólico, que puede revertirse tras el tratamiento con antioxidantes (Rodríguez et al. 2020).

- **Participación en otros procesos**

Los modelos de FRDA han mostrado afectación en diversos procesos celulares, sugiriendo que la frataxina podría tener una función en los mismos. Es el caso, por ejemplo, de la biogénesis y la dinámica mitocondrial. Bajo condiciones fisiológicas, la biogénesis mitocondrial se incrementa debido a la demanda de energía. Sin embargo, en fibroblastos y linfocitos de pacientes se ha descrito una regulación negativa de la vía PGC-1 α /PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Co-Activator 1- α / Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma), principal reguladora de la biogénesis mitocondrial, lo que impide a la célula contrarrestar el incremento del estrés oxidativo. Respecto a la dinámica mitocondrial, varios modelos deficientes en frataxina han mostrado redes mitocondriales alteradas debido a un aumento de la fragmentación mitocondrial o por un incremento en el proceso de fusión mitocondrial.

Otro de los procesos afectados es la comunicación de la mitocondria con el citoesqueleto. En fibroblastos de FRDA, se ha observado una desorganización de las estructuras de los filamentos, con cambios en el tamaño celular y en la forma, ligada a un incremento en los niveles de actina glutationilada como

consecuencia del estrés oxidativo (Anna Pastore et al. 2003). Adicionalmente, en neuronas del DRG de un modelo de ratón se ha descrito un incremento de la ratio entre la actina filamentosa (F-actina) y la actina globular (G-actina), lo que afecta a la dinámica del cono de crecimiento neuronal. Esta alteración estaría mediada por la hiperactivación de la proteína cofilina (Muñoz-Lasso et al. 2020).

Por tanto, aunque es evidente la participación de la frataxina en multitud de vías moleculares como las ya mencionadas, además de otros procesos como la autofagia (Schiavi et al. 2013) y la peroxidación lipídica (Navarro et al. 2010), no se conoce con exactitud la función exacta de esta pequeña pero esencial proteína. El estrés oxidativo podría ser el nexo común entre todas las rutas afectadas, de manera que la frataxina tendría una implicación en todos estos procesos a través del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial.

2.3 Aspectos clínicos de la ataxia de Friedreich

2.3.1 Características neurológicas

El espectro neurológico de la FRDA comprende tanto alteraciones en el sistema nervioso central como en el periférico. En concreto, los síntomas clínicos y el examen neurológico indican que la FRDA corresponde a una ataxia sensorial y cerebelosa mixta, la cual afecta tanto a las vías propioceptivas en el sistema nervioso periférico, como a la médula espinal y al núcleo dentado del cerebelo (Durr et al. 1996; Harding 1981). Las principales características clínicas se recogen en la figura 5.

En los estudios patológicos, se ha observado una pérdida de mielinización en los axones de las grandes neuronas sensoriales, además de una pérdida de neuronas propioceptivas en el DRG (Arnulf H Koeppen et al. 2009). Además, el diámetro de la médula espinal se reduce y se produce una atrofia de los tractos corticoespinales y espinocerebelosos (Cook and Giunti 2017). En consecuencia, los pacientes presentan alteraciones en la propiocepción, la vibración, la temperatura, el dolor y el tacto ligero. Como consecuencia de la neuropatía periférica, hay una ausencia de reflejos, más acusada en las extremidades inferiores. Los pacientes presentan el signo de Babinski y, en menor porcentaje,

espasticidad muscular, que puede cursar con dolor, contracturas y espasmos (Arnulf H Koeppen and Mazurkiewicz 2013).

En lo que respecta al cerebelo, la principal lesión es la atrofia del núcleo dentado del mismo, lo que produce una pérdida del control motor GABAérgico y glutamatérgico, además de verse afectada la capacidad de hablar de los pacientes (Rance et al. 2008). Con la evolución de la enfermedad, también presentan dificultades para formar conceptos y en el razonamiento visoespacial (A.H. Koeppen, Davis, and Morral 2011).

Por otra parte, los pacientes pueden presentar disfunción auditiva y visual, produciéndose una degeneración progresiva del nervio óptico y una reducción de la capa de fibras nerviosas de la retina. También son frecuentes los problemas de fijación de la mirada, como el nistagmo (Fortuna et al. 2009). Con el avance de la enfermedad, aparecen problemas como la disfagia (dificultad para tragar), que dificulta la calidad de vida del paciente, pudiendo necesitar de una sonda para su alimentación, además de poder derivar en una neumonía por broncoaspiración de alimentos (Keage et al. 2017).

2.3.2 Características no neurológicas

A pesar de que la FRDA está considerada una enfermedad neurodegenerativa, su fenotipo se corresponde con el de una disfunción multisistémica, ya que existe también una afectación del miocardio, el páncreas y el sistema musculoesquelético.

La enfermedad cardíaca afecta hasta al 95% de los pacientes (Child et al. 1986). De hecho, la cardiomiopatía es la principal causa de muerte en la FRDA. Entre los cambios patológicos, se encuentran la hipertrofia de la pared del ventrículo izquierdo, la fibrosis intersticial y la acumulación de hierro en el corazón (Hanson et al. 2019; Reetz et al. 2018).

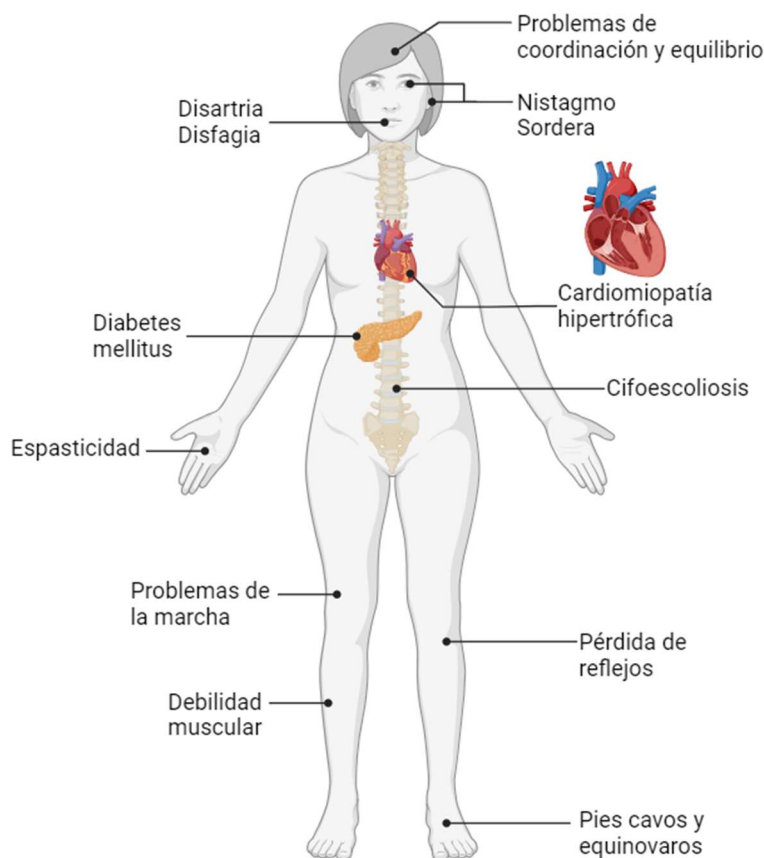


Figura 5 | Características clínicas de la FRDA. La FRDA corresponde a una ataxia sensorial y cerebelosa mixta, afectando tanto a las vías propioceptivas del sistema nervioso periférico, como a la médula ósea y al núcleo dentado del cerebelo. Como consecuencia, hay problemas de coordinación y equilibrio, alteraciones en la marcha, pérdida de reflejos y disartria. Otras características neurológicas incluyen la disfunción de los sistemas oculomotor y auditivo, además de la disfagia. Entre las características no neurológicas, se incluyen la cardiomiopatía, generalmente hipertrófica, y que supone la principal causa de muerte de los pacientes; la diabetes mellitus; la escoliosis; la debilidad muscular y las anomalías en los pies.

Por otra parte, sobre el 10% de los pacientes desarrollan diabetes mellitus, y entre el 20%-40% presentan intolerancia a los carbohidratos. La causa de esta alteración incluye la disfunción de las células β -pancreáticas y la resistencia periférica a la insulina. Esta condición contribuye al agravamiento de la enfermedad promoviendo el síndrome metabólico (Worth et al. 2015). Entre las anomalías musculoesqueléticas, los pacientes pueden presentar cifoescoliosis, que puede cursar con dolor y problemas cardiorrespiratorios, y pies cavos y

equinovaros, que dificultan la estabilidad y la movilidad (Martin B Delatycki et al. 2005).

3 Patología cardíaca en la FRDA

A pesar de que la FRDA se considera una enfermedad neurodegenerativa, la mayoría de los pacientes desarrolla problemas cardíacos en algún momento de su vida, que incluyen la hipertrofia cardíaca, el fallo cardíaco, las arritmias, los problemas en la conducción y la fibrosis cardíaca. De hecho, aproximadamente el 90% de los pacientes presentan alteraciones en el electrocardiograma (ECG), y hasta el 73% desarrollan síntomas cardíacos que resultan en el fallecimiento de hasta el 59% de los afectados (Child et al. 1986; McCabe et al. 2000; Tsou et al. 2011). A pesar de estos datos, la patología cardíaca en la FRDA permanece poco estudiada en comparación con la neurodegeneración y no se conoce el mecanismo fisiopatológico por el cual la disminución en los niveles de frataxina conduce a la disfunción cardíaca. Un resumen de la patología cardíaca aparece en la **figura 6**.

3.1 Aspectos clínicos

La cardiomiopatía en la FRDA presenta variaciones clínicas considerables entre pacientes en cuanto a gravedad y progreso de la enfermedad. La gravedad de los síntomas parece relacionarse con el tamaño de la expansión del triplete GAA, encontrándose en aquellos pacientes con más de 600 repeticiones del triplete en el alelo pequeño una cardiomiopatía hipertrófica más marcada, aunque el fenotipo puede ser variable incluso entre individuos con el mismo tamaño de expansión (Rajagopalan et al. 2010). En cualquier caso, la patología cardíaca debuta con el engrosamiento concéntrico de la pared ventricular izquierda produciendo una cardiomiopatía hipertrófica, la cual implica una disminución en el tamaño del ventrículo que dificulta la diástole, aunque la función sistólica se mantiene preservada. En este punto, la enfermedad puede ser asintomática, siendo el acortamiento de la respiración y las palpitaciones los principales síntomas (Hanson et al. 2019).

Conforme progresa la enfermedad a lo largo de los años, se produce una

pérdida de fibras contráctiles debido a un proceso de fibrosis subyacente, que puede iniciarse antes del inicio de los síntomas cardíacos (Raman et al. 2011). En algunos pacientes, como consecuencia de la fibrosis, la cardiomiopatía hipertrófica puede progresar a un adelgazamiento de la pared ventricular izquierda, comprometiendo la función sistólica y causando cardiomiopatía dilatada y arritmias que, en origen, son típicamente supraventriculares, como el *flutter*, la fibrilación auricular, y la taquicardia supraventricular (Regner et al. 2012). Respecto a la cardiomiopatía dilatada, aunque puede ser una consecuencia del progreso de la hipertrofia ventricular, también puede estar presente directamente en pacientes con diferente fenotipo cardíaco. No obstante, en ambos casos está relacionada con una patología más severa (Hanson et al. 2019).

La disfunción cardíaca supone la principal causa de fallecimiento de los pacientes (59%) (Tsou et al. 2011), produciendo una muerte temprana en comparación con la mortalidad producida por causas no cardíacas. De hecho, los pacientes cuyo fallecimiento está vinculado a problemas cardíacos suelen haber padecido la enfermedad durante un período igual o inferior a 10 años. Por otra parte, una duración de la enfermedad superior a 20 años reduce la predisposición a fallecer a causa de la disfunción cardíaca (F Weidemann et al. 2015). En particular, la mayoría de los fallecimientos se producen como consecuencia de la cardiomiopatía dilatada y las arritmias, mientras que la cardiomiopatía hipertrófica no está asociada con la muerte (Tsou et al. 2011).

3.2 Diagnóstico y tratamiento. Nuevos biomarcadores

El diagnóstico y seguimiento de la patología cardíaca en la FRDA suele realizarse mediante pruebas como el ECG, donde se puede observar una característica onda T plana o invertida y la presencia de arritmias, y pruebas de imagen, como el ecocardiograma y la resonancia magnética cardíaca, donde se aprecian los cambios en el grosor de las paredes del miocardio. Sin embargo, aunque la enfermedad cardíaca en la FRDA está bien definida, resulta complejo llevar a cabo un seguimiento de las manifestaciones clínicas (Lynch, Schadt, et

al. 2021). Por una parte, los síntomas pueden no ser visibles en los estadios iniciales de la enfermedad o estar enmascarados por la limitada actividad física de los pacientes como consecuencia de la neurodegeneración. Además, la evolución de la hipertrofia a la fibrosis es altamente variable entre individuos y difícil de predecir, y el deterioro progresivo que se produce a nivel celular en las paredes del ventrículo izquierdo no es detectable por las técnicas actuales de imagen, lo que supone una barrera a la hora de monitorizar la enfermedad (Lees et al. 2022).

En este contexto, surge la necesidad de desarrollar biomarcadores que apoyen las pruebas diagnósticas convencionales y que permitan estratificar a los pacientes y predecir el riesgo de desarrollar una cardiomiopatía grave. Uno de los biomarcadores más conocido de daño cardíaco es la troponina-I cardíaca. Se ha demostrado que la mayoría de pacientes con FRDA presentan una “fuga” crónica de troponina, cuya presencia en suero está asociada a la hipertrofia y al fallo cardíaco (Friedman et al. 2013). Adicionalmente, el propéptido N-terminal del procolágeno III (PIIINP) se ha propuesto como un biomarcador de fibrosis y de remodelación del ventrículo izquierdo (Blair et al. 2019). En nuestro grupo de investigación, se identificó al miR-323a-3p como un biomarcador de cardiomiopatía hipertrófica en la FRDA, que podría utilizarse para diagnosticar esta condición incluso antes de la aparición de síntomas (Seco-Cervera et al. 2017). Sin embargo, el uso de estos biomarcadores en la clínica es muy limitado y se necesita su validación en cohortes más amplias de pacientes.

Actualmente, no existe ningún tratamiento farmacológico que detenga o ralentice la progresión de la patología cardíaca en la FRDA. Cabe destacar la idebenona, un análogo de la coenzima Q10, que actúa como un antioxidante y que ha demostrado producir una reducción en el engrosamiento de la pared ventricular, aunque sin rescatar la función ventricular (Mariotti et al. 2003).

3.3 Patología celular

A nivel celular, la patología cardíaca en la FRDA está dominada por la hipertrofia de los cardiomiocitos y la fibrosis celular. A partir de los años 40,

comenzaron a realizarse estudios histológicos en muestras de tejido de pacientes con FRDA fallecidos a causa de la cardiomiopatía para descubrir los cambios patológicos responsables del fenotipo cardíaco. A nivel microscópico, se evidenció una acumulación de hierro, una pérdida de fibras contráctiles reemplazadas por fibrosis, y una hipertrofia de los cardiomiocitos restantes, que presentaban núcleos grandes y de forma aberrante (Hewer 1969) (**figura 6**).

3.3.1 Hipertrofia, mitocondria y metabolismo

El uso del microscopio electrónico reveló que la hipertrofia de los cardiomiocitos se origina como consecuencia de una proliferación anómala de mitocondrias (Arnulf H Koeppen et al. 2015), lo que también se ha observado en modelos de ratón (Vyas et al. 2012). Las mitocondrias del corazón en la FRDA presentan variaciones en forma y tamaño, mostrando una morfología hinchada y alargada, lo que se ha asociado con alteraciones en procesos de fisión y fusión mitocondrial (Chiang et al. 2021). Por su parte, las redes mitocondriales se encuentran desorganizadas y fragmentadas, y existe una pérdida en la estructura de las crestas, lo cual es característico de mitocondrias dañadas donde la respiración celular se encuentra comprometida (Hick et al. 2013; Lee et al. 2016). De hecho, el análisis de biopsias endomiocárdicas de dos pacientes con FRDA y cardiomiopatía hipertrófica reveló una actividad reducida de la aconitasa y de los complejos I, II y III de la cadena respiratoria mitocondrial, lo cual fue corroborado más tarde en un estudio post mortem realizado en 9 pacientes, confirmando la alteración en el metabolismo energético cardíaco (Bradley et al. 2000; Rotig et al. 1997). De esta forma, se sugiere que la falta de frataxina produce una disminución en la síntesis de centros Fe-S, necesarios para el funcionamiento de multitud de enzimas mitocondriales vitales para la generación de energía, dando lugar a una disfunción mitocondrial. Se ha descrito que la disfunción mitocondrial precede al desarrollo del proceso hipertrófico (Lodi et al. 2001), de manera que el fallo mitocondrial sería la causa y no la consecuencia de la remodelación del ventrículo. De este modo, parece que la proliferación de las mitocondrias podría constituir un mecanismo compensatorio en un intento de contrarrestar el déficit bioenergético del

cardiomiocito. No obstante, como efecto colateral, se produce una hipertrofia del mismo. Por su parte, el metabolismo lipídico también se encuentra afectado observándose en cardiomiocitos *in vitro* la acumulación de gotas lipídicas y la activación de perilipina 5 (PLIN5), la cual regula el balance entre lipogénesis y lipólisis a favor de la lipogénesis (Jixue Li et al. 2019).

3.3.2 Papel del hierro y muerte celular

En autopsias y en biopsias de miocardio de pacientes de FRDA se observa la presencia de inclusiones de hierro que, aparte del propio hierro, están formadas por ferritina citosólica, ferritina mitocondrial, y ferroportina. La ausencia de frataxina promueve la entrada de hierro al cardiomiocito, posiblemente para compensar la disminución en la síntesis de Fe-S (Whitnall et al. 2008), lo que supone una señal para el incremento de la expresión de las ferritinas citosólica y mitocondrial. Estas proteínas, junto a la ferroportina, forman agregados de hierro que, tras la muerte de los cardiomiocitos, son fagocitados por los macrófagos quedando visibles al microscopio (Michael et al. 2006; Ramirez et al. 2012). El mecanismo de muerte de los cardiomiocitos no se conoce con exactitud. La ferroptosis es un tipo de muerte celular producida por el incremento de ROS, la peroxidación lipídica y la propia acumulación de hierro, por lo que se sugirió que podría ser el mecanismo de muerte de la FRDA al estar presentes en la enfermedad las tres características de este tipo de muerte (Cotticelli et al. 2019), pero existe controversia sobre este tema. De hecho, a pesar de que se ha encontrado un aumento de proteínas relacionadas con la formación de ROS y una disminución de la respuesta antioxidante mediada por NRF2 en los cardiomiocitos (Anzovino et al. 2017), se ha puesto en duda incluso que el estrés oxidativo tenga un papel relevante en la fisiopatología cardíaca de la FRDA (Seznec et al. 2005). De la misma forma, los depósitos de hierro no parecen ser la causa inicial directa de la patología cardíaca, ya que en el modelo *knockout* de frataxina, los ratones mueren en el útero de la madre sin manifestaciones de depósitos de hierro (Hanson et al. 2019). Tampoco se ha encontrado que la densidad de los depósitos se correlacione con la gravedad de la disfunción cardíaca (Ramirez et al. 2012). Respecto al tipo de muerte, se

han observado signos de necrosis y también una activación de las vías de la apoptosis y de la autofagia (Huang et al. 2013; La Rosa et al. 2020), de manera que varios mecanismos podrían contribuir a la pérdida de fibras contráctiles y al reemplazo fibrótico.

3.3.3 Citoesqueleto y contracción

Por otra parte, y a diferencia del citoesqueleto de la neurona, cuyas alteraciones se conocen y se han vinculado a la patología neurodegenerativa (Muñoz-Lasso et al. 2020), apenas existen estudios relativos al citoesqueleto y a la estructura y función del sarcómero del cardiomiocito en la FRDA. Estudios de microscopía electrónica realizados en un modelo de ratón de la enfermedad han demostrado irregularidades en la estructura de las miofibrillas y una disminución en el número de sarcómeros del cardiomiocito (Hanson et al. 2019; Vyas et al. 2012). Además, en los ratones control, se ha observado que las mitocondrias se distribuyen uniformemente entre las miofibrillas, de manera que hay aproximadamente una mitocondria por sarcómero, pero esta distribución no está presente en el ratón deficiente de frataxina (Vyas et al. 2012), lo que puede afectar negativamente a la provisión de energía necesaria para la contracción. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con lo observado en un modelo de cardiomiocitos derivados de células troncales pluripotentes inducidas (iPSC-CM, del inglés *induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes*) donde no se aprecian anomalías estructurales ni en las miofibrillas ni en la estructura del sarcómero (Hick et al. 2013). En corazones de pacientes de FRDA, tampoco se observaron alteraciones en la propia estructura del sarcómero, aunque sí en las uniones intercalares entre cardiomiocitos, que se muestran fragmentadas y desorganizadas, lo cual puede afectar a la cohesión mecánica y al paso de iones entre células, contribuyendo a fallos en la contracción y al desarrollo de la cardiomiopatía (Arnulf H Koeppen et al. 2016, 2021). De hecho, en modelos de cardiomiocitos derivados de iPSC se ha observado una disminución en la fuerza de contracción, acompañada de alteraciones en la duración del PA (A. O.-T. Wong et al. 2019). De la misma forma, en un estudio reciente en revisión realizado en un modelo de ratón, se ha

observado una reducción en la fracción de eyección y un alargamiento en la duración del PA, específicamente, una prolongación en el segmento QT (Czornobil et al. 2023), lo cual es consistente con las observaciones clínicas que describen un QT largo y una onda T invertida (Frank Weidemann et al. 2015), representativa de problemas en la repolarización, aunque la fracción de eyección así como la función sistólica suelen estar conservadas hasta el final de la vida. Igualmente, estas alteraciones, unidas a las arritmias observadas en pacientes, han llevado a profundizar en el estudio del mecanismo de acoplamiento excitación-contracción y, en concreto, en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular como posible mecanismo del fallo.

3.3.4 Acoplamiento excitación-contracción. Alteraciones en la homeostasis del calcio

Como se ha mencionado anteriormente, la frataxina tiene un papel relevante en la homeostasis del calcio, por lo que su déficit produce un desequilibrio en la regulación del calcio intracelular.

En un estudio, se midió la frecuencia cardíaca y el flujo de calcio citosólico en cardiomiocitos derivados de iPSC de tres pacientes con FRDA y se observó que los cardiomiocitos de FRDA presentaban una variabilidad alta del ritmo cardíaco, y una disminución en los transitorios de Ca^{2+} , definidos como el incremento de Ca^{2+} citosólico que se produce con cada latido. Curiosamente, tanto la variabilidad en la frecuencia cardíaca como los niveles de Ca^{2+} citosólico, fueron remediados tratando a los cardiomiocitos con un inhibidor de canales de Ca^{2+} de tipo L, la nifedipina (Crombie et al. 2017). Sin embargo, resulta difícil conciliar cómo bloquear la entrada de Ca^{2+} puede restaurar los niveles de Ca^{2+} citosólico, cuando cabría esperar que los niveles de Ca^{2+} fueran incluso inferiores que en las células sin tratamiento. Paradójicamente, en otro estudio con cardiomiocitos derivados de iPSC, no se observaron diferencias en los transitorios de Ca^{2+} entre células de FRDA y el control de manera basal, aunque sí que se produjo una reducción en los transitorios de Ca^{2+} de los cardiomiocitos de FRDA cuando las células se sometieron a condiciones de estrés férrico. Este

fenotipo consiguió revertirse tratando a las células con deferiprona, un quelante del hierro, sugiriendo que la deferiprona reduce el estrés oxidativo inducido por hierro y, con ello, mejora el acoplamiento excitación-contracción, al resultar éste un proceso sensible al estrés oxidativo y muy demandante energéticamente (Lee et al. 2016).

Adicionalmente, en otro estudio realizado en dos líneas celulares cardíacas (HL-1 y H9c2) *knockdown* de frataxina, se observó que la carga de Ca^{2+} del RS era inferior en las líneas deficientes de frataxina respecto al control. Además, ambas líneas presentaban un incremento del estrés oxidativo, por lo que se hipotetizó que el ambiente oxidante podría modificar la apertura de los canales RyR y SERCA, ya que ambos presentan residuos de cisteínas en su estructura que pueden verse afectados por esta circunstancia (Abeti et al. 2018).

Por todo ello, la comprensión de cómo el déficit de frataxina conduce a la disfunción cardíaca sigue siendo un desafío significativo en la investigación de la FRDA. Aunque la identificación del gen responsable y el desarrollo de modelos han revelado la participación de frataxina en procesos celulares clave, como la bioenergética celular, el metabolismo del hierro y la homeostasis del calcio, el mecanismo fisiopatológico completo sigue siendo desconocido. Se plantean numerosas incógnitas, incluyendo la implicación y alteraciones del citoesqueleto y el calcio en la contracción, el tipo de muerte celular involucrado, el papel del estrés oxidativo y el hierro, etc. Dada la dificultad de acceder al tejido cardíaco y de disponer de muestras de pacientes al ser una enfermedad rara, es esencial continuar investigando en los modelos celulares y animales para avanzar en la comprensión de la disfunción cardíaca en la FRDA, ya que no es posible desarrollar nuevos fármacos sin conocer el mecanismo fisiopatológico al completo.

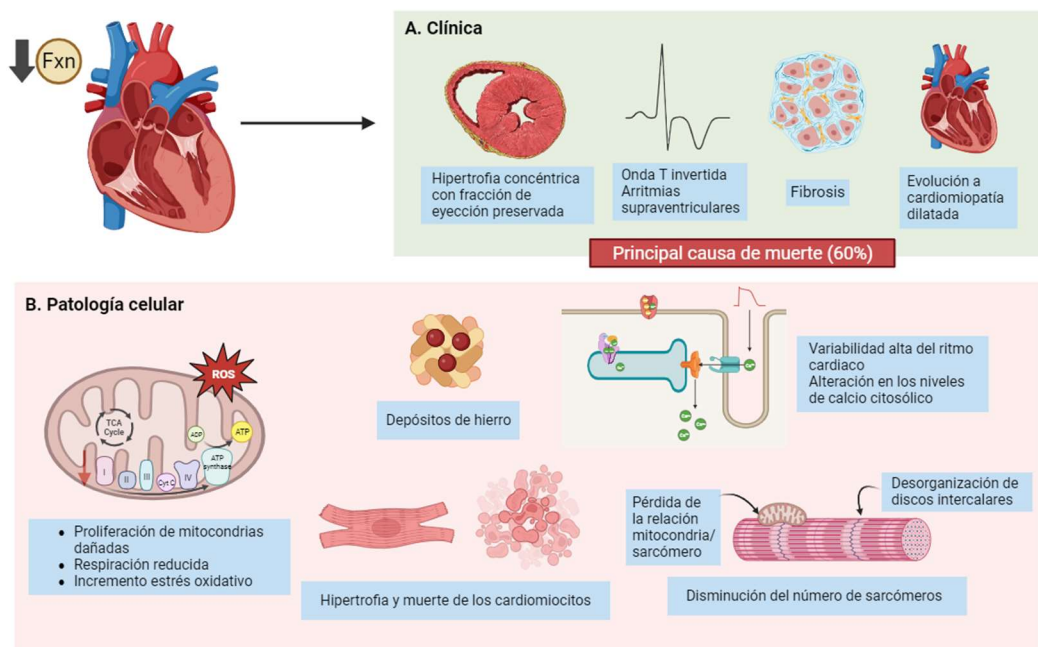


Figura 6 | Patología cardíaca en la FRDA. Respecto a la clínica (A), la patología cardíaca en la FRDA debuta con la hipertrofia concéntrica de la pared ventricular izquierda, aunque la función sistólica se mantiene conservada. En el ECG, se observa una onda T invertida o plana, y se advierte la presencia de arritmias supraventriculares producidas principalmente por la pérdida de fibras contráctiles y el posterior reemplazamiento fibrótico. Con el progreso de la enfermedad, el miocardio pierde elasticidad y la patología puede evolucionar a una cardiomiopatía dilatada, que está asociada con un pronóstico más grave. Respecto a la patología celular (B), la hipertrofia se produce por una proliferación anormal de mitocondrias en un intento de compensar el déficit bioenergético que se produce a consecuencia de la disminución de frataxina. También se observa la presencia de depósitos de hierro y de ROS. Por otra parte, existe una disminución en el número de sarcómeros y se pierde la relación mitocondria/sarcómero, lo que puede afectar a la provisión de energía necesaria para la contracción. El acoplamiento excitación-contracción también se encuentra alterado al observarse modificaciones en los niveles de calcio citosólico. Figura creada por Biorender.com.

4 Modelos para el estudio de la cardiomiopatía en la FRDA

La dificultad de acceder a los tipos celulares más afectados por la FRDA, como es el caso del cardiomiocito, representa un obstáculo en el estudio de la fisiopatología de la enfermedad. La consecuencia de ello ha sido la dependencia de los modelos animales para conocer los mecanismos moleculares alterados y para probar nuevos fármacos. Durante los últimos años se han generado

diferentes modelos de ratón deficientes en frataxina en un intento de recapitular el fenotipo de los pacientes de FRDA. Por una parte, se han desarrollado modelos con un déficit de frataxina a nivel sistémico como, por ejemplo, el ratón KIKO (*Fxn*(tm1Mkn/J), que presenta una expansión de 230 repeticiones de GAA en uno de los alelos y una delección del exón 4 en el otro (McMackin, Henderson, and Cortopassi 2017), y los ratones humanizados YG8R, YG8sR e YG8JR, que son ratones *knockout* para el gen murino *Fxn* a los que se ha añadido el transgén humano que codifica frataxina con diferente número de repeticiones del triplete GAA (Anjomani, Virmouni et al. 2014, 2015). Adicionalmente, dado que los modelos con déficit de frataxina a nivel sistémico presentan un limitado fenotipo cardíaco, se han generado modelos específicos para el estudio de la patología cardíaca en la FRDA, que presentan una disminución de la expresión de frataxina únicamente en el tejido muscular y cardíaco. Ejemplo de este tipo de modelo murino es el ratón MCK-Cre, que expresa la recombinasa Cre bajo el promotor de la creatina quinasa del músculo (MCK) permitiendo silenciar el gen *Fxn* únicamente en los tejidos muscular y cardíaco, lo que provoca la aparición de cardiomiopatía en el ratón a edades tempranas (Puccio et al. 2001). Basado en el mismo mecanismo, se desarrolló el ratón α Myhc, en el que se utilizó una recombinación subóptima del sistema Cre-Lox de manera que se consigue una excisión parcial del gen, dando lugar a un ratón sin fenotipo aparente, pero que muestra signos de patología cardíaca cuando es sometido a estrés (Salami et al. 2020). Sin embargo, aunque se han conseguido avances con estos modelos, ninguno de ellos consigue recapitular adecuadamente las características fenotípicas de la enfermedad, lo que ha llevado a generar modelos celulares más sofisticados.

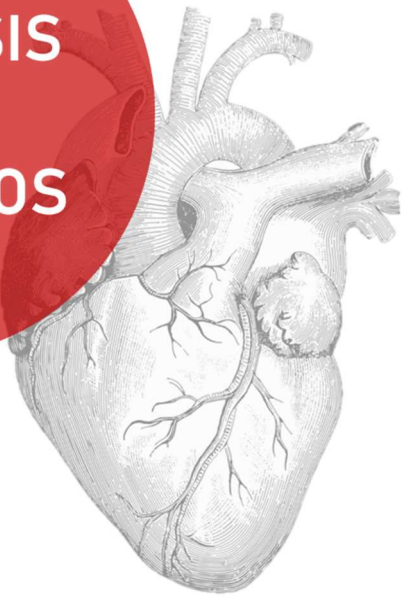
Las iPSC fueron descritas por primera vez por Yamanaka en el año 2006 (Takahashi and Yamanaka 2006). Estas células presentan similitudes con las células madre embrionarias, ya que poseen el potencial para propagarse de manera indefinida in vitro y diferenciarse a diferentes células maduras derivadas de cualquier capa germinal. Las iPSC, generalmente, se obtienen por reprogramación directa de células somáticas, normalmente fibroblastos o

linfocitos, a través de la sobreexpresión de factores de transcripción que inducen la pluripotencia, como pueden ser OCT4, SOX2, C-MYC o KLF4. A partir de las iPSC de pacientes, bien mediante la adición de moléculas al medio que simulan el desarrollo embrionario o mediante la sobreexpresión de factores de transcripción, pueden generarse modelos de cualquier tipo celular que cuenten con el mismo fondo genético que el paciente. En el año 2011, se generaron por primera vez neuronas y cardiomiocitos a partir de iPSC de pacientes de FRDA (Liu et al. 2011). Los iPSC-CM se generaron siguiendo un protocolo de 2 pasos, siendo el primero de ellos la formación de cuerpos embrioides, y el segundo el cultivo de los cuerpos embrioides en condiciones específicas para inducir la diferenciación cardíaca. Estos iPSC-CM presentaban características típicas de la patología cardíaca de la FRDA, como la proliferación de mitocondrias dañadas o la alteración en la homeostasis mitocondrial. Desde 2011, se han publicado más estudios realizados en iPSC-CM de FRDA que han servido para avanzar en el conocimiento de la patología cardíaca. Los resultados obtenidos en estos trabajos se resumen en la **tabla 1**. Sin embargo, el progreso en el desarrollo de modelos de células cardíacas ha sido inferior en comparación con el de modelos neuronales. La explotación de este modelo, que permite el estudio de tipos celulares de difícil acceso y que cuenta con el fondo genético del paciente, podría ampliar significativamente el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad y abrir nuevas vías para el diseño de estrategias terapéuticas personalizadas.

Tabla 1 | Estudios basados en cardiomiocitos derivados de iPSC para el estudio de la patología de la FRDA. Modificado de Maheshwari et al.

Estudio	Modelo	Año	Principales resultados
Liu et al.	Cardiomiocitos derivados de iPSC	2011	Generación de cardiomiocitos a partir de iPSC obtenidos de fibroblastos de pacientes.
Hick et al.	Cardiomiocitos derivados de iPSC	2013	Las iPSC de FRDA presentan inestabilidad en la expansión y expresión de <i>FXN</i> reducida, pero sin fenotipo biológico. Los cardiomiocitos obtenidos presentaban fenotipo mitocondrial.
Lee et al.	Cardiomiocitos derivados de iPSC	2014	Los cardiomiocitos derivados de iPSC de FRDA son similares en tamaño, ratio de producción de ATP y manejo del calcio intracelular comparado con los controles, a pesar de presentar defectos mitocondriales. Sin embargo, los anteriores procesos se veían afectados al generar un estrés inducido por hierro.
Crombie et al.	Cardiomiocitos derivados de iPSC	2017	Los cardiomiocitos derivados de iPSC demostraron alteraciones electrofisiológicas y en la homeostasis del calcio como un incremento en la variación del ritmo cardíaco (prevenida con nifedipina) y bajos transitorios de calcio.
Bolotta et al.	Cardiomiocitos derivados de iPSC	2019	Los cardiomiocitos derivados de iPSC presentan un incremento en la expresión de hepcidina y ferroportina y un descenso en los niveles de ferroportina nuclear.
Wong et al.	Modelo 3D de cardiomiocitos ventriculares derivados de iPSC	2019	Generación de un modelo 3D de tejido cardíaco a partir de iPSC. El modelo presentaba alteraciones electrofisiológicas y en la capacidad contráctil.
Cotticelli et al.	Cardiomiocitos derivados de iPSC	2022	Análisis transcriptómico de una línea de cardiomiocitos editados genéticamente para disminuir la expresión de <i>FXN</i> . El modelo muestra disfunción mitocondrial y una activación de la respuesta mediada por interferón tipo 1.
Angulo et al.	Cardiomiocitos derivados de iPSC	2022	Identificación de genes diferencialmente expresados demostrando que la glicólisis y las rutas que implican matriz extracelular son las más afectadas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La ataxia de Friedreich (FRDA) es una enfermedad genética neurodegenerativa que cursa con una cardiomiopatía subyacente, siendo ésta la principal causa de fallecimiento de los pacientes. Sin embargo, a pesar de su relevancia, la patología cardíaca de la FRDA permanece poco estudiada en comparación con la neurodegeneración. La falta de modelos específicos que recapitulen de manera precisa el fenotipo cardíaco de la FRDA ha limitado significativamente la comprensión de los mecanismos moleculares causantes de la cardiomiopatía. En este contexto, surge como una necesidad el desarrollo y la caracterización de modelos celulares cardíacos que permitan investigar los procesos que se han relacionado con el déficit de frataxina, como la homeostasis del calcio intracelular o la dinámica del citoesqueleto. En los últimos años, se ha puesto el foco en la obtención de diferentes tipos celulares a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), que permiten desarrollar modelos que cuentan con el fondo genético de los pacientes. La hipótesis de esta investigación es que los cardiomiocitos derivados de iPSC suponen una herramienta para el estudio de la fisiopatología cardíaca de la FRDA, recapitulando de manera efectiva el fenotipo asociado a la enfermedad, y posibilitando la identificación de mecanismos moleculares alterados, con especial énfasis en el flujo de calcio intracelular y las alteraciones del citoesqueleto, lo que permitirá avanzar en la comprensión de la enfermedad. Además, se plantea la hipótesis de que, cofilina, una de las proteínas implicadas en la dinámica del citoesqueleto y relacionada con la neurodegeneración de la FRDA pueda servir como un potencial biomarcador de alteraciones cardíacas en la FRDA.

Por todo, el objetivo principal de esta tesis es la obtención y caracterización de un modelo de cardiomiocitos ventriculares derivados de iPSC que permita avanzar en la comprensión de la fisiopatología cardíaca de la FRDA. Para abordar este objetivo, se presentan los siguientes objetivos específicos:

1.- Generación y validación de un modelo de cardiomiocitos ventriculares

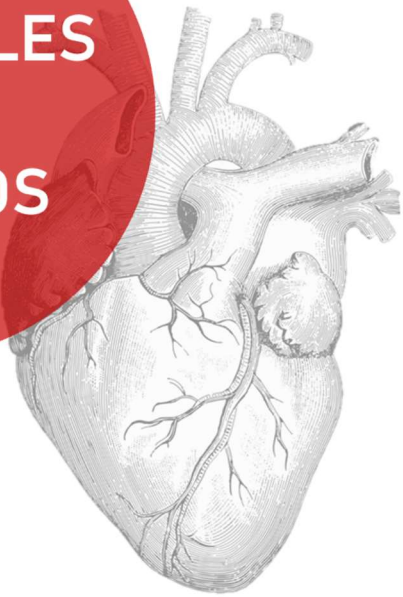
derivados de iPSC procedentes de pacientes con FRDA.

2.- Estudio de la implicación de la epigenética en la fisiopatología cardíaca. Análisis de una serie de miARN implicados en la FRDA y sus dianas en los iPSC-CM.

3.- Caracterización de los mecanismos moleculares alterados en los cardiomiocitos de FRDA: Estudio del latido, el potencial de acción, la homeostasis del calcio, la ultraestructura de las mitocondrias y el estado del citoesqueleto.

4.- Evaluación de la cofilina-2 como potencial biomarcador de alteraciones cardíacas en la FRDA.

**MATERIALES
Y
MÉTODOS**



MATERIALES Y MÉTODOS

1 Material Biológico

1.1 Líneas celulares

Para el desarrollo de los experimentos, se adquirieron dos líneas de células madre humanas pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés *induced Pluripotent Stem Cells*) derivadas de fibroblastos de pacientes con FRDA, y una línea celular procedente de una persona sana, que fue utilizada como control. Las iPSC se reprogramaron a partir de los fibroblastos en el laboratorio del Dr. Napierala (UT Southwestern Medical Center) usando, para ello, el virus Sendai (Fusaki et al. 2009; W. Yang et al. 2008). Estas líneas fueron adquiridas por nuestro laboratorio a través del *Friedreich's Ataxia Cell Line Repository* (FACLR). En el laboratorio de origen se comprobó que las líneas iPSC no presentaban anomalías cariotípicas ni expresión residual del virus de Sendai. También, se comprobó la expresión de marcadores de pluripotencia y la capacidad de las iPSC a diferenciarse a las tres capas embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo).

Respecto a las características de las líneas obtenidas, una de ellas, que se identificará como FRDA1 de aquí en adelante, procede de una mujer enferma de 20 años, que comenzó a desarrollar la enfermedad a la edad de 12 años. Como comorbilidades, la paciente presentaba cardiomiopatía. El diagnóstico molecular de esta paciente confirma una expansión del triplete GAA en ambos alelos, que fue cuantificada en los fibroblastos contando con 650 repeticiones del triplete GAA en uno de los alelos y 719 repeticiones en el otro.

La otra línea de FRDA, que será denominada FRDA2 de ahora en adelante, es originaria de una mujer de 28 años cuyos síntomas debutaron a la edad de 6 años. Esta paciente presentaba cardiomiopatía y diabetes. La expansión del triplete es más extensa en este caso, al contar con 870 repeticiones en un alelo y 1470 en el otro.

La línea control se obtuvo a partir de fibroblastos de una mujer de 22 años

aparentemente sana.

En la **tabla 2** se recogen las características de las tres líneas celulares.

Tabla 2 | Características principales de las líneas celulares iPSC empleadas. NA: No Aplica.

	Sexo	Edad muestra	Edad debut	Cardiomiopatía	Diabetes	Repeticiones fibroblastos	Repeticiones iPSC
FRDA1	F	20	12	Sí	No	650/719	522/875
FRDA2	F	28	6	Sí	Sí	870/1470	830/830
CONTROL	F	22	NA	No	No	NA	NA

1.2 Muestras de plasma

Durante el desarrollo de esta tesis, se utilizaron 15 muestras de plasma de pacientes de FRDA, que fueron cedidas por el Hospital Universitario y Politécnico de La Fe (Valencia) tras pasar los comités éticos correspondientes. En la **tabla 3** se recogen las principales características clínicas de los pacientes participantes en el estudio. Por su parte, como control se utilizaron 15 muestras de voluntarios sanos, cedidas por el Biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA (Valencia). Los controles se emparejaron lo máximo posible con los pacientes de FRDA del estudio respecto a edad (media/rango: 39 años (20-63)) y sexo (H/M: 9 (60%) / 6 (40%)), perteneciendo todos a la raza caucásica. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

Tabla 3 | Características clínicas de los pacientes de FRDA cuyo plasma fue utilizado para el estudio.

PACIENTES (N)	15
Sexo (H/M)	8 (53%) / 7 (47%)
Edad (Media/Rango)	40 años (19-65)
Edad de aparición (Media/Rango)	16 años (6-43)
Diabetes (N/%)	5 (33%)
Cardiomiopatía hipertrófica (N/%)	6 (40%)

Cardiomiopatía dilatada (N/%)	1 (7%)
Alteraciones segmento ST/T (N/%)	8 (53%)
Escoliosis (N/%)	10 (67%)

1.3 Anticuerpos y sondas fluorescentes

En la **Tabla 4** se recogen los anticuerpos primarios y las sondas fluorescentes utilizadas, la función de la proteína que reconocen, la técnica donde se han empleado y la concentración de uso, y en la **Tabla 5** los anticuerpos secundarios.

Tabla 4 | Anticuerpos primarios utilizados. IFI: Inmunofluorescencia. WB: *Western blot*.

NOMBRE Y REFERENCIA	FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA QUE RECONOCE	TÉCNICA Y CONCENTRACIÓN DE USO
Anti-OCT3/4 (SantaCruz Biotech, sc-5279)	Factor de transcripción implicado en la auto-renovación de células troncales no diferenciadas	IFI: 1:150
Anti-cTnT (Abcam, ab8295)	Proteína de unión a tropomiosina que participa en la contracción	Citometría de flujo: 1:100 IFI: 1:200
Anti-Actin, α-Smooth muscle (Sigma, a5228)	Isoforma de la actina que se expresa en el músculo liso	IFI: 1:150
Anti-GATA4 (SantaCruz Biotech, sc-25310)	Factor de transcripción que regula genes implicados en la diferenciación y función del miocardio	IFI: 1:100
Anti-FXN (Proteintech, 14147-1-AP)	Frataxina, proteína cuyo déficit causa la FRDA	WB: 1:1000 IFI: 1:150
Anti-α-actinin (Merck, A7811)	Proteína de unión a actina que se localiza en la línea Z del sarcómero	IFI: 1:250
Anti-cofilin 2 (SantaCruz Biotech, sc-166958)	Isoforma muscular de cofilina	WB: 1:1000

Anti-GAPDH (SantaCruz Biotech, sc-32233)	Proteína ubicua intracelular utilizada como control de carga	WB: 1:2000
---	--	------------

Tabla 5 | Anticuerpos secundarios utilizados. IFI: Inmunofluorescencia. WB: *Western blot*.

NOMBRE Y REFERENCIA	ESPECIFICACIONES	TÉCNICA Y CONCENTRACIÓN DE USO
Goat anti-Mouse IgG (H&L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate (Thermo Fisher Scientific, A28175)	IgG de ratón, conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 488	IFI: 1:2000 Citometría de flujo: 1:500
Goat anti-Rabbit IgG (H&L) Secondary Antibody, Texas Red conjugate (Thermo Fisher Scientific, T2767)	IgG de conejo, conjugado con el fluorocromo Texas Red	IFI: 1:2000
Mouse IgG HRP Linked Whole Ab (Cytiva, NA931)	IgG de ratón, conjugado con peroxidasa	WB: 1:5000
Rabbit IgG HRP Linked Whole Ab (Cytiva, NA934)	IgG de ratón, conjugado con peroxidasa	WB: 1:10000

1.4 Cebadores de PCR

En la **tabla 6** se muestran los cebadores utilizados para llevar a cabo las reacciones de PCR y la secuencia de los mismos.

Tabla 6 | Secuencia de los cebadores de PCR utilizados.

GEN	SECUENCIA 5'-3'
<i>POU5F1</i>	<i>Forward:</i> CCTGAAGCAGAAGAGGATCACC <i>Reverse:</i> AAAGCGGCAGATGGTCGTTTGG
<i>NANOG</i>	F: CTCCAACATCCTGAACCTCAGC R: CGTCACACCATTGCTTTCTTCG
<i>TNNT2</i>	F: GGAGTCCAAACCAAAGCCC R: CTTCTCCATGCGCTTCCG
<i>ACTA2</i>	F: CTGAAGAGCATCCCACCC R: AGCCACATACATGGCTGGG
<i>MYL2</i>	F: GAGGAAACCATTCTCAACGC R: TCCTTGAAAACCTCTCCG

<i>CFL2</i>	F: GTATTTATATTCTGGGCTCCTG
	R: CTTGCCACTCATGTTTAATACC
<i>MYLK</i>	F: GTCACCGTGGATGATGCTCC
	F: AGTCGCATCACTCTCAGTTCC
<i>CACNAC</i>	F: GTACTGGGTCAATGATGCCG
	R: TTGGAAAACCTCTCCGCTAAGC
<i>CACNAD</i>	F: AATCCAAACTCAGCCGACGC
	R: GTTAAGGTGTTTCAGAAACACCAGG
<i>CALHM5</i>	F: AGTCTCAGATTCTAGGATGG
	R: CCTTTTGTGCATATGTCTTCC
<i>ATP2A2</i>	F: CTGCAGGATGTTCAATTCTGG
	R: TATCATCTTTATGCACTTCTCC
<i>GAPDH</i>	F: GTATTTATATTCTGGGCTCCTG
	R: CTTGCCACTCATGTTTAATACC

2 Métodos

2.1 Cultivo de las iPSC

Las iPSCs se cultivaron en medio mTESR Plus (StemCell Technologies, 100-0276) suplementado con penicilina/estreptomicina (ThermoFisher Scientific, 15140122) al 0,5% sobre placas de 6 pocillos cubiertos con Matrigel cualificado para iPSCs (Corning, 354277). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Todas las líneas celulares se testaron de micoplasma regularmente.

2.1.1 Preparación del Matrigel

Para la preparación de Matrigel, se reconstituyó una alícuota de Matrigel con medio DMEM-F12 (Gibco, 11320033) frío. La concentración de proteína varía entre los diferentes lotes del producto, por lo que fue necesario acudir a las instrucciones de Corning para calcular el factor de dilución de Matrigel de cada lote. Inmediatamente, una vez diluido el Matrigel, se cubrieron los pocillos de una placa de 6 pocillos con 1 ml de la dilución, asegurando que el Matrigel cubría toda la superficie de los pocillos. Posteriormente, se incubaron las placas a

temperatura ambiente durante 1 hora, o bien se almacenaron a 4°C hasta 7 días. Para el caso de las placas mantenidas en refrigeración, éstas se atemperaron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de ser utilizadas. Por último, una vez pasados los tiempos de incubación, se aspiró el Matrigel de los pocillos y se añadieron 2 ml de medio mTESR Plus atemperado.

2.1.2 Descongelación de las iPSC

Para descongelar las iPSCs, el primer paso fue sacar los viales del tanque de nitrógeno líquido y sumergirlos parcialmente en el baño de agua a 37°C, hasta que solo quedara un pequeño trozo de hielo. En este punto, se añadió la suspensión celular a un tubo con 5 ml de medio DMEM/F12 y se centrifugó a 250 G durante 6 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se aspiró el sobrenadante, y se resuspendieron las células en 1 ml de medio mTESR Plus suplementado con 10 μ M de Y-27632 *Rho kinase inhibitor (ROCKi)* (StemCell Technologies, 72302), con el fin de favorecer la supervivencia celular. A continuación, las células se sembraron en los pocillos previamente cubiertos con Matrigel.

2.1.3 Pase de iPSC

Tras 48 horas de incubación se observó la formación de colonias celulares. Cuando los bordes de estas colonias estaban próximos a tocar colonias adyacentes se pasaron las células. El primer paso fue realizar un lavado con *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (D-PBS) (StemCell Technologies, 37350) y, a continuación, se añadieron 300 μ l de acutasa (StemCell Technologies, 07920) en cada pocillo para despegar e individualizar las células y se incubaron a 37° grados durante 6 minutos. Pasados los 6 minutos, se comprobó en el microscopio que las células se habían desprendido de la placa y que las colonias se habían disgregado e individualizado. Posteriormente, se transfirieron las células a un falcon con 5 ml de DMEM/F12 y se centrifugaron a 250 G durante 6 minutos. Tras la centrifugación, se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de mTESR Plus suplementado con 2 μ M de tiazovivina (StemCell Technologies, 72252). La

tiazovivina es otro inhibidor de la ruta ROCK que favorece la supervivencia de células individuales y el mantenimiento de la pluripotencia (Park et al. 2015). En un tubo aparte, se realizó una dilución 1/10 de la suspensión celular con azul de tripano (Corning, 25-900-CI) y se contaron las células en una cámara de Neubauer. Las células se sembraron en pocillos de placa de 6 previamente cubiertos con Matrigel. Por pocillo, se sembraron entre 100.000 y 200.000 células dependiendo del crecimiento de cada línea.

2.2 Diferenciación y cultivo de los cardiomiocitos derivados de las iPSC

Una vez que se había realizado al menos un pase celular, las iPSC se sembraron para comenzar la diferenciación a cardiomiocitos (iPSC-CM) y su posterior maduración. Un esquema del protocolo se muestra en la **figura 7**.

2.2.1 Siembra de las iPSC (día -2)

Para sembrar las iPSCs, se siguió el mismo protocolo que para el pase de iPSCs descrito en el apartado anterior. Es decir, se lavaron las células con D-PBS, se levantaron con acutasa, se contaron con azul de tripano y se sembraron las células en placas previamente tratadas con Matrigel. En este caso, la siembra se realizó en placas de 12 pocillos a una densidad celular elevada, ya que se requiere una confluencia superior al 90% tras 48 horas de incubación para poder comenzar la diferenciación. El número de células necesarias para alcanzar dicha confluencia fue puesto a punto sembrando diferentes concentraciones de células y observando la confluencia pasadas 48 horas. Finalmente, en el caso de las líneas control y FRDA1, se sembraron 500.000 células por pocillo, mientras que de la línea FRDA2 se sembraron 600.000 células en medio suplementado con 10 μ M de Y-27632, el inhibidor de ROCK, para mantener la supervivencia celular.

Tras 24 horas de incubación a 37°C, se cambió el medio por medio fresco sin suplementar.

2.2.2 Diferenciación y mantenimiento de cardiomiocitos ventriculares (Día 0 – Día 15)

El día 0, es decir, 48 horas después de sembrar las células, se comprobó

la confluencia de los cultivos. Solo en el caso de que las células hubieran alcanzado el 90% de confluencia, se continuó con el protocolo de diferenciación. La diferenciación se llevó a cabo con el kit *Ventricular Cardiomyocyte Differentiation STEMdiffSM* (StemCell Technologies, 05010) siguiendo las instrucciones del fabricante, aunque con algunas modificaciones del protocolo. Este protocolo se basa en diversos cambios de medio cada 48-72 horas, como se detalla a continuación.

El día 0 se añadieron 2 ml de medio de diferenciación A suplementado con Matrigel a cada pocillo de placa de 12. Para preparar este medio, se realizó una dilución 1:10 del suplemento A en medio de diferenciación, y se le añadió Matrigel a una dilución 1:100. A continuación, se aspiró el medio de los pocillos, se reemplazó por el medio recién preparado y se incubaron las células durante 48 horas a 37°C. El día 2 se cambió el medio por medio de diferenciación B. Por pocillo se prepararon 2 ml de medio de diferenciación al que se le habían añadido 200 μ l de suplemento B (1:10 en dilución). En este caso, y de aquí en adelante, para eliminar el medio de los cultivos se utilizó una pipeta electrónica, ya que el uso de la bomba de vacío puede provocar que se despeguen las células de la placa. Los días 5 y 7 se añadió a las células el medio C, preparado de la misma forma que se ha indicado para el medio B.

Los días 9, 12 y 14 se añadió el medio de mantenimiento del kit. Para prepararlo, se suplementó la botella de medio basal de mantenimiento con 10 ml de suplemento de mantenimiento. Se eliminó el medio de los pocillos y se reemplazó por el medio de mantenimiento que, una vez preparado, puede ser almacenado a 4°C hasta 4 semanas.

Diariamente, se monitorizaron las células en el microscopio óptico para comprobar el estado de la diferenciación. Generalmente, a partir del día 8 de diferenciación se observaron pequeñas áreas de iPSC-CM latiendo, mientras que a partir del día 12 se observó un latido generalizado por todo el pocillo.

2.2.3 Maduración de los cardiomiocitos

2.2.3.1 Mediante la inhibición de la ruta mTOR

Para madurar los cardiomiocitos, los días 16, 19 y 21 de diferenciación se suplementó el medio de mantenimiento con 200 nM de Torin1 (StemCell Technologies, 73492), un inhibidor de los complejos mTORC1 y mTORC2, que ha demostrado incrementar la fuerza de contracción de los cardiomiocitos y el consumo de oxígeno (Garbern et al. 2020). El día 23 de diferenciación se retomó el medio de mantenimiento sin suplementar y el día 26 se levantaron los iPSC-CM ya maduros y se sembraron en las concentraciones requeridas para los siguientes experimentos o se recogieron precipitados de células para realizar extracción de ARN y proteína.

2.2.3.2 Mediante la adición de hormonas tiroideas y glucocorticoides

Para los experimentos de medidas de calcio intracelular y potencial de acción, se llevó a cabo la maduración de los iPSC-CM mediante la adición de la hormona tiroidea triyodotironina (T3), y del glucocorticoide dexametasona (Dex). Estos compuestos han demostrado incrementar la maduración electrofisiológica en cardiomiocitos derivados de iPSC (L. Wang et al. 2021). Para ello, a partir del día 16 de diferenciación, se cambió el medio de mantenimiento del kit de *StemCell Technologies* por medio RPMI 1640 (Gibco, 11875093) suplementado con B-27™ (Gibco, 17504044), T3 (Sigma-Aldrich, T6397) a 100 nmol/L, y Dex (Sigma-Aldrich, D2915) a 1000 nmol/L. Este medio, en adelante, medio de maduración, se cambió cada 2-3 días hasta la utilización de las células para los experimentos.

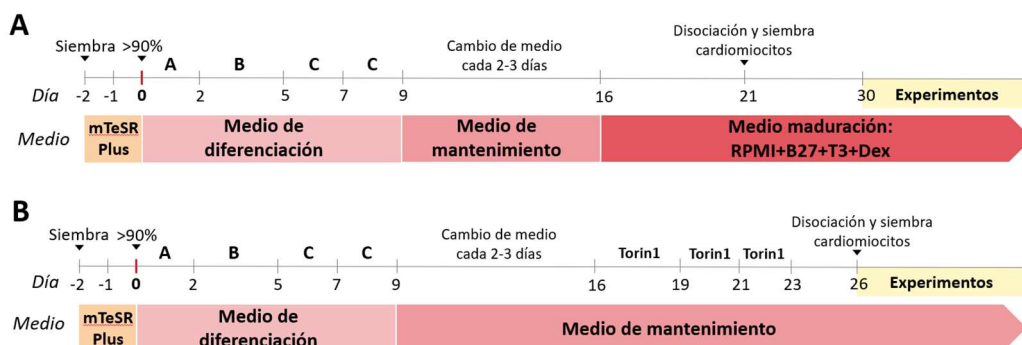


Figura 7 | Protocolo de diferenciación a cardiomiocitos ventriculares a partir de iPSC y maduración mediante la adición de Torin1 (A) u hormonas tiroideas y glucocorticoides (B). Dos días antes de comenzar con el protocolo de diferenciación, se disociaron las colonias de iPSC y se sembraron en placas de 12 pocillos con medio mTeSR Plus a una densidad de entre 500.000–600.000 células/pocillo. Pasado un día (día -1), se reemplazó el medio por medio mTeSR Plus fresco. El día siguiente (día 0), se aspiró el medio y se añadieron 2 ml de medio A de diferenciación para comenzar la inducción de las iPSC a cardiomiocito. El día 2 se realizó un cambio de medio con medio B, y los días 4 y 7 con medio C. El día 9, se cambió el medio al medio de mantenimiento del kit que fue reemplazado cada 2–3 días. Para promover la maduración de los cardiomiocitos, **A**) se suplementó el medio de mantenimiento con 200 nM de Torin1 entre los días 16 y 23 de diferenciación o **B**) se utilizó un medio casero de maduración basado en RPMI suplementado con B27, al que se adicionaron las hormonas triyodotironina (T3) y dexametasona (Dex).

2.2.4 Disociación y siembra de los cardiomiocitos

Los iPSC-CM ya maduros se disociaron el día 26 de diferenciación usando, para ello, el kit *STEMdiff™ Cardiomyocyte Dissociation Kit* (StemCell Technologies, #05025). Este kit se compone de un medio de disociación y un medio de soporte que reduce el estrés de los cardiomiocitos durante la disociación y siembra, manteniendo su viabilidad y capacidad funcional. Para ello, las células se lavaron con D-PBS, se añadió 1 ml por pocillo del medio de disociación y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. A continuación, y sin eliminar el medio de disociación, se añadieron 2 ml de medio de soporte por pocillo y con un raspador de plástico se despegaron las células de la superficie de la placa. Con una pipeta serológica, se pipeteó arriba y abajo durante 3–4 veces y las células se transfirieron inmediatamente a un tubo con 3 ml de DMEM/F12 y se centrifugaron a 300 G durante 5 minutos. Tras eliminar el

sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 1 ml de medio de soporte y se contó el número de células usando azul de tripano y un hemocitómetro. Las células se sembraron en medio de soporte en placas de diferentes formatos, dependiendo del experimento a realizar, previamente cubiertas con Matrigel. Tras 24 horas de incubación, se eliminó el medio de soporte y se añadió medio de mantenimiento que fue cambiado cada 2 días hasta la realización de los experimentos, que se llevaron a cabo a partir del día 26.

Los iPSC-CM que habían sido madurados por adición de hormonas tiroideas y glucocorticoides para los experimentos de calcio intracelular y potencial de acción se levantaron el día 20 de diferenciación y se sembraron en placas de 35 mm de diámetro con fondo de cristal (Ibidi, 81176). Estas placas cuentan con un molde de silicona que forma dos cámaras separadas del resto del pocillo, lo que permite sembrar las células en una superficie pequeña y conseguir una confluencia elevada. Para ello, se lavaron las células con D-PBS y se incubaron con 1 ml de TrypLE™ Express (Gibco, 10718463) durante 10 minutos a 37°C. Tras ello, se pipeteó arriba y abajo 4-5 veces y se transfirieron las células a un tubo de 15 ml con 3-4 ml de medio DMEM-F12. Se centrifugaron a 300 G durante 5 minutos y se resuspendió el precipitado en 1 ml de medio de maduración suplementado con *KnockOut™ Serum Replacement* (Gibco, 10828028) al 10% y 10 µM de Y-27632. Cada pocillo de placa de 12 se transfirió a 4-5 placas de Ibidi. Al día siguiente, cuando las células ya se habían adherido a la placa, se eliminó la silicona que conformaba los pocillos, y se cambió el medio por medio de maduración fresco. El medio de maduración fue reemplazado cada 2-3 días hasta la realización de los experimentos, que fueron llevados a cabo entre los días 30 y 35.

2.3 Caracterización de las líneas iPSCs y cardiomiocitos

2.3.1 Comprobación de la expresión de marcadores de pluripotencia y marcadores cardíacos mediante inmunofluorescencia

Las células iPSCs se sembraron sobre cristales de 13 mm Ø en placas de 24 pocillos. Los iPSC-CM se sembraron en placas con fondo de cristal (Ibidi,

81816). Previamente, todas las superficies se cubrieron con Matrigel. Tras la siembra, se dejaron crecer las células durante 48-72 horas y se fijaron con paraformaldehído en PBS al 4% durante 15 minutos. Posteriormente, se lavaron 3 veces con D-PBS, se permeabilizaron con PBS-Tritón-X al 0,5% durante 10 minutos y se bloquearon con suero bovino fetal (SBF) al 10% en PBS-Tritón-X al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios anti-OCT3/4, anti-cTnT, anti-*actin α -smooth muscle*, anti-GATA4 (tabla 4) se incubaron durante toda la noche a 4°C. Tras ello, las células se lavaron 3 veces durante 5 minutos con D-PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios correspondientes (tabla 5) a una dilución 1:2000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos se detectaron con *DAPI Fluoromount-G®* (Southern Biotech). Las imágenes se tomaron utilizando un microscopio confocal Leica TSC SP8 equipado con un microscopio invertido (DMI8; Leica) y un objetivo HC PL APO 63x y HC PL APO 40x de aceite de inmersión.

2.3.2 Cuantificación de la expresión de marcadores de pluripotencia y marcadores cardíacos mediante RT-qPCR

En primer lugar, se llevó a cabo una extracción de ARN total usando el *miRVANA™ miARN Isolation Kit* (Invitrogen, AM1560), y se cuantificó el ARN obtenido mediante el espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop One/One^c (Thermo Fisher Scientific). A continuación, 200 ng de este ARN se utilizaron para sintetizar el ADNc con el *High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit* (Applied Biosystems, 4368814). Las PCRs cuantitativas (qPCR) se realizaron con *Sybr Green/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, K0221) y los cebadores diseñados para amplificar *POU5F1*, *NANOG*, *TNNT2*, *MYL2* y *ACTA2* (tabla 6). El volumen de las reacciones de qPCR fue de 10 μ l, utilizando para ello 5 μ l de *Sybr Green*; 0,6 μ l de la mezcla equitativa de cebadores directo y reverso (concentración de stock: 10 μ M); 3,4 μ l de agua libre de RNAsas; y 1 μ l del producto de la RT-PCR. El programa utilizado fue el siguiente: *hold stage* para evitar contaminaciones de ARN y activar la polimerasa (50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos); *PCR stage* (40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 58°C durante 1 minuto); *melting curve stage* para comprobar que el

amplificación era único (95°C durante 15 segundos, 58°C durante 1 minuto; y 95°C durante 15 segundos). Los resultados se analizaron mediante el método comparativo delta-delta C_T ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), comparando la expresión de los cardiomiocitos obtenidos frente a las iPSCs de partida. Los niveles de ARNm se normalizaron frente a la expresión del gen GAPDH.

2.3.3 Cálculo del porcentaje de cardiomiocitos obtenidos mediante citometría de flujo

Mediante citometría de flujo, se cuantificó el porcentaje de células obtenidas en la diferenciación que expresaban la troponina T cardíaca (cTnT), es decir, que se habían diferenciado correctamente a cardiomiocitos. Para ello, las células se levantaron con el medio de disociación, como se ha explicado anteriormente, se fijaron y se permeabilizaron con el kit Intracell (Immunostep), que permite el marcaje de proteínas intracelulares, como es el caso de la cTnT. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario cTnT (**tabla 4**) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se incubó con el anticuerpo secundario *Alexa Fluor-488-conjugated Goat Anti-mouse* (**tabla 5**) a una dilución 1:500 durante 30 minutos. Por último, se centrifugaron las células y el precipitado se resuspendió en eBioscience™ *Flow Cytometry Staining Buffer* (Invitrogen, 00-4222-26). Las células se analizaron en el citómetro de flujo LSR Fortessa™ X-20. Primero, se identificó la población celular y se excluyeron los restos celulares mediante el *forward versus side scatter* (FSC vs SSC). A continuación, se calculó el porcentaje de células que expresaban la cTnT según la intensidad de fluorescencia. Las células iPSCs fueron utilizadas como control negativo. Las diferenciaciones con más de un 80% de células que expresaban la cTnT fueron consideradas exitosas.

2.3.4 Análisis de los niveles de frataxina

La expresión de los niveles de frataxina se analizó mediante RT-qPCR y *Western blot*, tanto en las líneas de iPSCs como en los iPSC-CM, para comprobar que las líneas de FRDA mantenían la reducción en los niveles de frataxina.

La RT-qPCR se realizó como se ha explicado anteriormente en el apartado 2.3.2 “Cuantificación de la expresión de marcadores de pluripotencia y marcadores cardíacos mediante RT-qPCR”, utilizando para ello los cebadores indicados en la **tabla 6** para el gen *FXN*. Los niveles de expresión de las líneas de FRDA se normalizaron frente a la expresión de *FXN* en la línea control.

Por su parte, para el *Western blot* se realizó una extracción de proteína total con tampón de lisis RIPA [150 mM cloruro de sodio, 1% Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0] suplementado con inhibidores de proteasas (Roche, 05892970001) y de fosfatasas (Sigma-Aldrich, 4906837001). Para ello, se recogieron precipitados de las líneas celulares, se lavaron con D-PBS, y se resuspendieron en 200 µl del tampón de lisis. A continuación, se dejaron las muestras en hielo durante 30 minutos, mezclándolas con el vortex cada 5 minutos. Tras ello, las muestras se sumergieron en nitrógeno líquido y se descongelaron en hielo durante tres veces consecutivas. Por último, se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a máxima velocidad y se recogió el sobrenadante. Los extractos proteicos se cuantificaron con el kit *Pierce™ BCA* (Thermo Fisher Scientific, 23225), y 30 µg de proteínas se resuspendieron en tampón de carga de proteínas 5x [Tris-HCl 250 mM pH 6.8, SDS 10% (p/v), azul de bromofenol 0,5% (p/v), glicerol 50% (v/v) y DTT 500 mM]. Posteriormente, las proteínas se desnaturalizaron hirviendo las muestras durante 5 minutos antes de cargarlas en un gel de acrilamida utilizando el sistema de electroforesis *Miniprotean Electroforesis System* (BioRad).

Para la electroforesis, se utilizaron geles de poli(acrilamida) al 12% y el tampón *10X Tris/Glycine/SDS* (BioRad, 1610772) preparado al 1X con agua destilada. La primera fase de entrada y concentración de las muestras en el gel se realizó a un voltaje constante de 120 V. La segunda fase de separación de las proteínas se realizó a un voltaje constante de 200 V. La transferencia de las proteínas se realizó a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) durante 1 hora a 100 V constantes y a 4°C. Para ello, se usó el tampón de transferencia

10X *Tris/Glycine* (BioRad, 1610771) preparado al 1X y al que se le había añadido metanol 20% (v/v). Para comprobar si las proteínas se habían transferido correctamente a la membrana, las membranas se tiñeron con solución de rojo Ponceau [Ponceau S 0,1% (p/v), ácido acético 5% (v/v)] durante 5 minutos. Posteriormente, las membranas se lavaron con agua destilada y se incubaron con la solución de bloqueo [leche desnatada 5% en TBS-T 0,1%] durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se incubó la membrana toda la noche a 4°C y en agitación con los anticuerpos primarios correspondientes, en este caso, el anticuerpo frente a frataxina (**Tabla 4**), y el anticuerpo frente a GAPDH, que fue utilizado como control de carga. Al día siguiente, tras lavar la membrana tres veces con TBS-T 0,1%, se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron otros tres lavados con TBS-T 0,1% y las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia, usando el reactivo *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes se tomaron en el lector *ChemiDoc* (BioRad). La densitometría se realizó utilizando el *software* Fiji/ImageJ. Para cada muestra, la señal de frataxina se normalizó frente a la señal del GAPDH correspondiente, y se calculó el porcentaje de expresión con respecto a la media de las muestras control, que fue considerada el 100% de expresión.

2.4 Estudio de miARN y su papel en la fisiopatología de la FRDA

2.4.1 Cuantificación de miARN en los iPSC-CM por RT-qPCR

Una vez obtenido el modelo, se llevó a cabo la cuantificación mediante RT-qPCR de una serie de miARN sobreexpresados en el plasma de pacientes. Los miARN analizados se muestran en la **tabla 7**. Para ello, se llevó a cabo una extracción de ARN mediante el kit mirVana™ (Thermo Fisher Scientific, AM1561). La concentración de ARN y su pureza se cuantificó en el Nanodrop. A continuación, se utilizaron 200 ng de ARN para llevar a cabo una RT-PCR en un volumen de 20 µl utilizando para ello el *Taqman miARN Reverse Transcription kit* (Thermo Fisher Scientific, 4366596) y sondas específicas para cada uno de

los microARN (Applied Biosystems). Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron por triplicado en un volumen de 10 µl usando 5 µl de *No UNG TaqMan 2x Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, 4440043), 0,5 µl de la sonda correspondiente [hsa-miR-128-3p (002216), hsa-miR-625-3p (002432), hsa-miR-151^a-5p (002642), hsa-miR-330-3p (000544), hsa-miR-323^a-3p (002227), hsa-miR-142-3p (000464) y RNU48 (001006)] (Applied Biosystems), 3,5 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl del producto de la RT-PCR. El programa de PCR utilizado fue: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. El RNU48 fue utilizado como control para normalizar la expresión de las distintas líneas celulares. Las diferencias en la expresión se calcularon con el método delta-delta CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Todos los resultados fueron referenciados a la línea control.

Tabla 7 | Datos de los miARN cuantificados en el modelo de iPSC-CM

miARN	Código de acceso miRBase	Secuencia madura del miARN
hsa-miR-128-3p	MIMAT0000424	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU
hsa-miR-625-3p	MIMAT0004808	GACUAUAGAACUUUCCCCCUCA
hsa-miR-151a-5p	MIMAT0004697	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU
hsa-miR-323a-3p	MIMAT0000755	CACAUUACACGGUCGACCUCU
hsa-miR-142-3p	MIMAT0000434	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA
hsa-miR-330-3p	MIMAT0000751	GCAAAGCACACGGCCUGCAGAGA

2.4.2 Búsqueda de genes diana y funciones enriquecidas

A continuación, se realizó una búsqueda de las dianas de los miARN sobreexpresados en la FRDA para encontrar posibles rutas o mecanismos alterados en la enfermedad. Para ello, se utilizó la base de datos de predicción de dianas, miRDB (Chen and Wang 2020). A continuación, se realizó un análisis de enriquecimiento de dianas para comprobar si había dianas reguladas por varios de los miARN de interés. Este análisis se realizó mediante la herramienta

web MIENTURNET (*MicroRNAEnrichmentTURNedNETwork*) (Licursi et al. 2019), que a su vez utiliza la base de datos miRTarBase. Esta base de datos recoge solamente las interacciones miARN-diana validadas experimentalmente. A partir de los datos obtenidos, se creó una red de interacciones entre los miARN y los genes diana, con el objetivo de facilitar la visualización de los datos. Se seleccionaron tanto las interacciones que tenían una evidencia fuerte, es decir, que habían sido validadas mediante métodos experimentales como ensayos de luciferasa o *Western blot*, como las que tenían una evidencia débil por ser validadas mediante ensayos tipo CLIP (*Cross-linking and ImmunoPrecipitation*). Por último, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional de los genes diana de los miARN sobreexpresados en la enfermedad. Para ello, MIENTURNET utilizó la base de datos de anotación funcional WikiPathways.

2.4.3 Cuantificación de la expresión de dianas por RT-qPCR

A partir de los datos obtenidos en la búsqueda de genes diana y el enriquecimiento tanto de genes como de funciones, se seleccionaron una serie de genes de interés para cuantificar su expresión por RT-qPCR. El filtro aplicado fue que los genes se hubieran relacionado previamente con la patología de la FRDA, o bien que tuvieran relación con algún mecanismo alterado en la enfermedad.

Para cuantificar la expresión de las dianas seleccionadas, se diseñaron cebadores que amplificaran específicamente los genes de interés (*CFL2*, *MYLK*, *CACNA1C*, *CACNA1D*, *CALHM5* y *ATP2A2*). A continuación, se realizó una extracción de ARN, y una RT-qPCR mediante el sistema *Sybr/Green*, tal como se ha explicado previamente en el apartado 2.3.2 “*Cuantificación de la expresión de marcadores de pluripotencia y marcadores cardíacos mediante RT-qPCR*”. Los niveles de expresión se normalizaron frente a la expresión del gen endógeno GAPDH. La secuencia de los cebadores se muestra en la **tabla 6**.

2.5 Análisis del latido cardíaco

Para monitorizar el latido de los iPSC-CM y comparar las diferentes líneas entre sí, se grabaron vídeos de los cultivos y se analizaron mediante un macro

de ImageJ/FIJI llamado *Myocyter* (Grune et al. 2019). Los vídeos se realizaron los días 12, 14, 16, 19, 21, 23 y 26 de diferenciación con el objetivo de observar si los parámetros cardíacos medidos presentaban variaciones durante el proceso de diferenciación y maduración de los cardiomiocitos. Para grabar los vídeos se utilizó el microscopio invertido DMI8 equipado con una cámara DFC9000 GT, ambos de Leica. Los vídeos se grabaron con el objetivo de 10X. Durante el tiempo de grabación, las células fueron mantenidas a 37°C y a 5% de CO₂. Cada día de grabación, se hicieron 3 vídeos de cada uno de los 6 pocillos por línea que componían una tanda de diferenciación. Los vídeos se grabaron a una frecuencia de 89 fotogramas por segundo y tenían una duración de 30 segundos.

El análisis de los vídeos se llevó a cabo mediante el macro *Myocyter* v1.3 en ImageJ/FIJI. Por vídeo, se analizaron dos ROI (del inglés, *Region of Interest*), que fueron seleccionados manualmente. A continuación, a partir del vídeo de cada ROI, el programa calculó la velocidad y la amplitud del movimiento. La velocidad se calculó como la diferencia en la posición entre dos fotogramas consecutivos, es decir, si hay grandes diferencias entre dos imágenes consecutivas, el programa interpreta que la velocidad del latido es alta. Por su parte, la amplitud se calculó como la diferencia entre cada fotograma y un fotograma de referencia seleccionado por el programa como el fotograma de reposo, es decir, una alta amplitud indica una fuerte desviación del estado de reposo. A partir de estos datos, se realizó un gráfico que representa la amplitud del latido a lo largo del tiempo. En este punto, se fijó un umbral por debajo del cual el movimiento observado se considera ruido de fondo. En nuestro caso, el umbral fue del 20%, es decir, para considerar que una señal no es ruido, esta debe superar el 20% de la señal máxima. El siguiente paso fue fijar el punto de **máxima amplitud**, es decir, el punto en el que un fotograma presenta la máxima diferencia (o máximo movimiento) respecto al fotograma de reposo. Este es el punto donde la contracción es máxima. Se hizo lo contrario con el punto de mínima amplitud que supera el umbral, es decir, el punto donde la relajación es máxima. La distancia entre el punto de mínima amplitud que supera el umbral y el de máxima amplitud es el **tiempo de contracción (sístole)**. La distancia entre

el punto de máxima amplitud y el de mínima amplitud es el **tiempo de relajación (diástole)**. La suma de los dos tiempos es el **tiempo de pico**. Por otra parte, la distancia entre dos picos de amplitud máxima es el tiempo que dura un latido, a partir del cual, se calculó la **frecuencia cardíaca**. Un esquema del análisis puede verse en la **figura 8**.

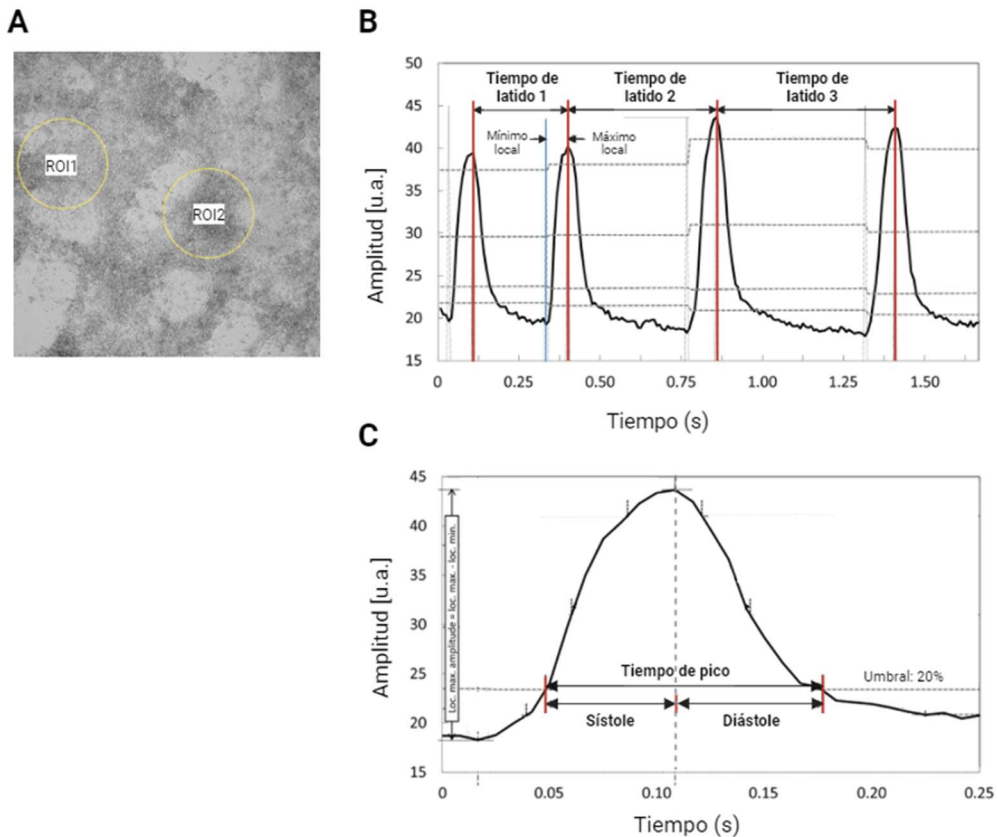


Figura 8 | Análisis del latido cardíaco. **A)** Selección manual de regiones de interés (ROI) para ser analizadas por el programa. **B)** Gráfico que muestra la amplitud del latido (unidades arbitrarias) frente al tiempo (segundos). En el gráfico se marca el mínimo local (línea azul vertical) y el siguiente máximo local (línea roja vertical). La distancia entre dos máximos consecutivos determina el tiempo de contracción (tiempo de latido), a partir del cual se calculó la frecuencia cardíaca. **C)** Gráfico que muestra el tiempo de pico, el tiempo de contracción (sístole) y el tiempo de relajación (diástole) estableciendo un umbral del 20% (línea gris horizontal punteada). Si la amplitud excede del umbral, comienza el tiempo correspondiente a la sístole. Después del máximo local, empieza a contar el tiempo de la diástole hasta que la amplitud cae por debajo del umbral. La suma de los tiempos de sístole y de diástole es el tiempo de pico. Figura adaptada de Grune *et al.*, 2019.

2.6 Medida del potencial de acción

Los cambios en el potencial de acción se midieron mediante microscopía confocal incubando las células con una sonda sensible a cambios en el voltaje llamada FluoVolt™ (Invitrogen, F10488). FluoVolt™ es un sensor fluorescente que responde de manera rápida y sensible a cambios en el potencial de membrana modulando la transferencia de electrones fotoinducida (PET) desde un donante de electrones hasta un fluoróforo. Durante la hiperpolarización, el campo eléctrico se alinea en sentido antiparalelo a la dirección de transferencia de electrones, lo que da como resultado una PET eficiente y la fluorescencia permanece apagada. La despolarización celular alinea el campo eléctrico en la dirección del PET, disminuyendo la tasa de transferencia de electrones y aumentando la fluorescencia (**figura 9**) (Miller et al. 2012).

Los iPSC-CM se incubaron con FluoVolt™ 1x y el concentrado PowerLoad™ 1x, incluido en el mismo kit y que alarga la supervivencia de las células, disueltos en la solución de Tyrode (tabla 3) durante 20 minutos. Tras ello, las células se lavaron una vez con la solución de Tyrode para eliminar los restos de la sonda fluorescente y, tras añadir, solución de Tyrode fresca se procedió al registro del potencial de acción. El registro del potencial de acción se llevó a cabo en un microscopio confocal Leica SP5 con el objetivo 20X de inmersión en agua. Como los cambios en el potencial de acción son rápidos, se activó el modo escáner de resonancia, utilizado para experimentos que requieren alta velocidad de escaneo. La fluorescencia se registró excitando a 488 nm y detectando a 510 nm en un campo de 512x20 μm , a 8000 Hz, con zoom de 1,7. El potencial de acción de los iPSC-CM latiendo espontáneamente se registró durante 10 segundos, tras lo cual, las células se sometieron a estimulación bajo campo eléctrico a 1 Hz y se registró el potencial de acción durante 20 segundos más.

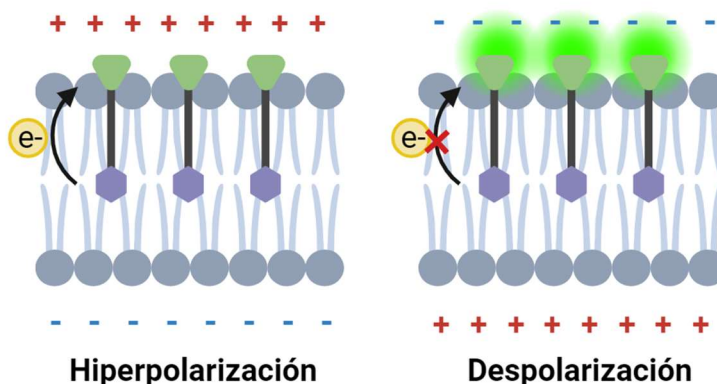


Figura 9 | Principio de la detección de voltaje mediante sensores fluorescentes basados en la transferencia de electrones fotoinducida (PET). El sensor de voltaje consta de un donante de electrones (hexágono morado), que se intercala en la membrana plasmática, y de un aceptor de electrones (triángulo verde), ambos unidos covalentemente. A potenciales hiperpolarizantes (estado de reposo), se acelera la transferencia de electrones del donante al aceptor, lo cual silencia al fluoróforo. La despolarización inhibe la PET, lo que resulta en un incremento de fluorescencia. Imagen creada con Biorender.com

2.7 Análisis del flujo de calcio intracelular

El flujo de Ca^{2+} intracelular se midió mediante microscopía confocal utilizando la sonda de unión a calcio Calbryte™ 520 AM (AAT Bioquest, 20651). Como otras sondas de tipo éster, una vez que Calbryte™ 520 AM entra en la célula, es hidrolizada por las esterasas intracelulares a su forma activa siendo capaz de incrementar su fluorescencia al unirse a Ca^{2+} . Una vez activada, la sonda adquiere carga negativa, de manera que es incapaz de difundir libremente a través de la membrana celular, quedando atrapada dentro de la célula. Los iPSC-CM se incubaron con 10 μM de Calbryte™ 520 AM disuelto en plurónico/DMSO durante 1 hora a 37°C seguidos de 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se reemplazó la solución de marcaje por la solución de Tyrode (**tabla 8**) con una concentración normal de glucosa de 100 mg/dL.

Tabla 8 | Composición de la solución de Tyrode

	Concentración (mM)
NaCl	140
KCl	4
MgCl₂	1,1
CaCl₂	1,8
HEPES	10
pH=7,4	

Los registros de Ca^{2+} se realizaron utilizando el microscopio confocal Leica® TCS SP5X con el objetivo 40X de inmersión en agua. Los iPSC-CM cargados con Calbryte™ 520 AM se excitaron a una longitud de onda de 492 nm y se recogieron las señales con longitudes de onda superiores a 510 nm. Primero, se tomó una imagen bidimensional de las células (formato: 512x512; zoom: 2,5) y, a continuación, se realizó un escaneo lineal (formato: 512x2048, velocidad: 700 Hz). La imagen obtenida por escaneo lineal muestra los cambios de fluorescencia a lo largo del tiempo, los cuales reflejan los cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico. Los registros se realizaron en células latiendo espontáneamente y, a continuación, en las mismas células bajo estimulación de campo eléctrico a 1 Hz con electrodos de platino.

La carga de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS) se evaluó mediante la aplicación rápida de una solución de cafeína (10 mM) con una velocidad de escáner de 400 Hz. La cafeína tiene una acción rápida y reversible sobre el RyR incrementando su sensibilidad al Ca^{2+} y manteniéndolo en un estado abierto. La apertura del RyR perdura tanto como la cafeína está presente en el medio, lo cual hace posible que el RS se vacíe de su contenido en calcio. La amplitud del transitorio de Ca^{2+} obtenido tras la aplicación de cafeína permite realizar una estimación de la carga de Ca^{2+} del RS (Cheng, Lederer, and Cannell 1993; Eisner

et al. 2017). Puesto que la carga depende de la frecuencia de transitorios, para poder comparar entre grupos, las células se estimularon con electrodos a 1 Hz hasta alcanzar un estado estable. Entonces, se perfundieron las células con cafeína 10 mM y, una vez, comenzó el vaciado del retículo, se detuvo la estimulación eléctrica.

La fluorescencia obtenida (F) fue normalizada por la fluorescencia en el estado de reposo (F_0) para calcular la amplitud del transitorio de Ca^{2+} evocado por la estimulación eléctrica (F/F_0). La misma operación se realizó para calcular la amplitud del transitorio evocado por la cafeína que, en este caso, supone una estimación del contenido de Ca^{2+} del RS. También se calculó el porcentaje de **liberación fraccionada**, dividiendo la amplitud del transitorio evocado por la estimulación entre la amplitud del transitorio de cafeína, es decir, para una cantidad dada de Ca^{2+} almacenado en el RS, qué porcentaje se libera en cada estímulo.

Por otra parte, se calculó el parámetro D_{50} (*“time to half decay”*) como el tiempo que tarda el pico de un transitorio en disminuir a la mitad de su amplitud máxima. Este parámetro representa principalmente la actividad de SERCA, que bombea el Ca^{2+} de regreso al RS, y en menor medida, la extrusión de Ca^{2+} a través del NCX. Para los datos obtenidos tras la adición de cafeína, se calculó el parámetro τ , ajustando la parte descendente del transitorio de cafeína mediante una función monoexponencial. Este parámetro representa principalmente la actividad de NCX, que extruye Ca^{2+} fuera de la célula, ya que la cafeína mantiene los canales de RyR abiertos, lo que permite que el Ca^{2+} fluya continuamente hacia el citoplasma, interfiriendo con la función de SERCA evitando que el Ca^{2+} pueda ser recapturado y almacenado en el RS.

Todos los análisis se llevaron a cabo mediante programas realizados en el propio laboratorio usando el *software* IDL 8.6 (Interactive Data Language). En la **figura 10** aparece un ejemplo de análisis de un transitorio de Ca^{2+} .

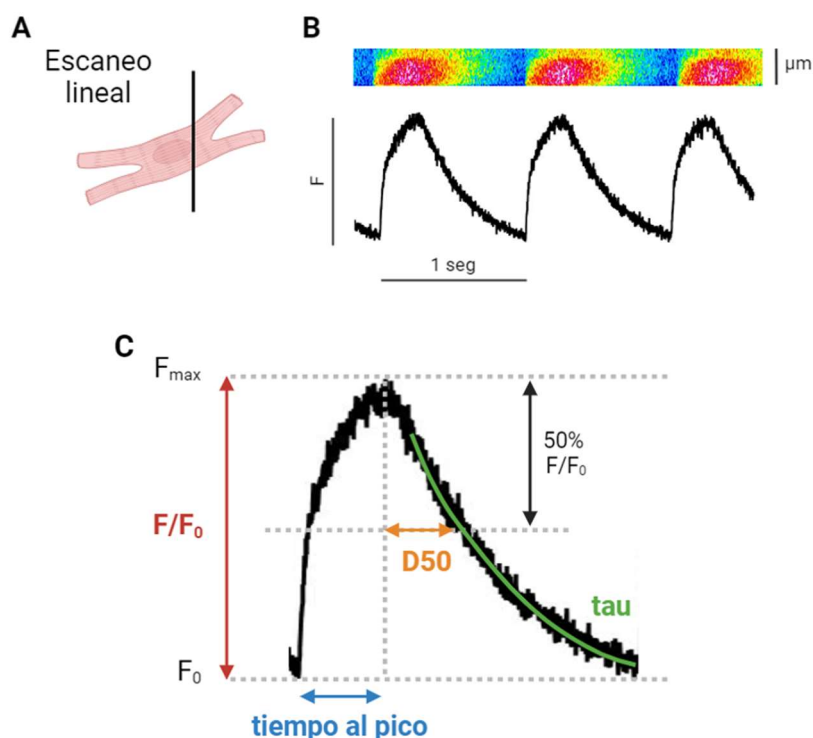


Figura 10 | Análisis de un transitorio de Ca^{2+} . **A)** Los iPSC-CM son escaneados por el láser de luz blanca (línea negra) cada 1,4 ms (700Hz). **B)** Ejemplo de una imagen de escaneo lineal de un cardiomiocito a lo largo del tiempo. El incremento de calcio citosólico que ocurre tras una despolarización lleva a un incremento de fluorescencia que resulta a un cambio en el color de azul a rojo. **C)** Gráfico de la señal de fluorescencia (F) normalizada por la fluorescencia basal (F_0) (en rojo) con respecto al tiempo. La reducción del transitorio de Ca^{2+} ajustó a una función monoexponencial (en verde) a partir del cual se calculó el parámetro tau. También se muestra el tiempo que tarda el transitorio en alcanzar el pico máximo (en azul) y el parámetro D50 (en naranja), medido como el tiempo que tarda el pico en disminuir a la mitad de su amplitud máxima.

Los experimentos de media del potencial de acción y del análisis del Ca^{2+} intracelular se realizaron durante mi estancia en el "Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) en la Universidad de Paris-Saclay.

2.8 Estudio de las mitocondrias mediante microscopía electrónica de transmisión

Los cardiomiocitos se disociaron y se sembraron en placas de PermanoxTM (Thermo Fisher Scientific, 177445) a razón de 60.000 células por pocillo. Tras dejar crecer las células durante 72 horas, se fijaron con glutaraldehído al 3,5% en 0,1 M de PBS durante 10 minutos a 37°C. A continuación, se reemplazó el glutaraldehído por glutaraldehído fresco y se incubaron las muestras durante 1 hora a 4°C. Tras ello, se aspiró el glutaraldehído, se lavó con PBS y se llevó a cabo una post-fijación con tetróxido de osmio (OsO_4) al 2% durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las muestras con agua destilada, y se deshidrataron parcialmente con etanol al 70%. Para teñir las muestras, se incubaron con el agente de contraste acetato de uranilo al 2% en 70% de etanol en oscuridad durante 2,5 horas a 4°C. A continuación, las muestras pasaron por un proceso adicional de deshidratación en etanol y se infiltraron durante toda la noche en la resina epoxi *Durcupan* ACM (Fluka, Sigma-Aldrich). Al día siguiente, las muestras se transfirieron a resina fresca y se dejaron endurecer durante 72 horas a 70°C. Tras el endurecimiento de la resina, se obtuvieron secciones semigruesas (1,5 μm) con una cuchilla de diamante utilizando un ultramicrotomo *Ultracut* UC7 (Leica). Las secciones se montaron en portaobjetos de microscopía de vidrio y se tiñeron ligeramente con azul de toluidina al 1%. Las secciones semigruesas seleccionadas se pegaron con Super Glue-3, Loctite (Henkel) a bloques de resina y se desprendieron del portaobjetos de vidrio mediante congelación repetida en nitrógeno líquido y descongelación. Se prepararon secciones ultradelgadas (60-80 nm) en el ultramicrotomo y se contrastaron utilizando citrato de plomo (solución de Reynolds). Finalmente, se obtuvieron fotomicrografías bajo el microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G 2 Spirit a 80 kV (FEI Europe), equipado con una cámara digital *XAROSA CMOS* (EMSIS GmbH). Una vez obtenidas las imágenes se llevó a cabo un análisis morfométrico utilizando el *software ImageJ*. Para ello, manualmente, se dibujó un ROI alrededor de la membrana mitocondrial externa, y a partir del mismo se midió el área y la circularidad,

calculada como $c = 4\pi \left(\frac{\text{área}}{\text{perímetro}^2} \right)$. Por otra parte, se midió la longitud de la mitocondria trazando una línea a lo largo del eje mayor de la mitocondria.

Esta técnica se llevó a cabo en colaboración con el Laboratorio de Neurobiología Comparada del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva (Universitat de València).

2.9 Estudio de la organización y longitud del sarcómero

Para observar la estructura del sarcómero se realizó una inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti- α -actinina. Para ello, se sembraron los cardiomiocitos en placas con fondo de cristal (Ibidi, 81816) previamente cubiertas con Matrigel. Tras dejar crecer las células durante 72 horas, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos. Posteriormente, se permeabilizaron con PBS-Tritón-X al 0,5% durante 10 minutos y se bloquearon con SBF al 10% en PBS-Tritón-X al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo contra α -actinina se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (tablas 5 y 6). Las imágenes se tomaron en un microscopio confocal Leica TSC SP8 con el objetivo HC PL APO 63x/1,40 CS2 de aceite de inmersión.

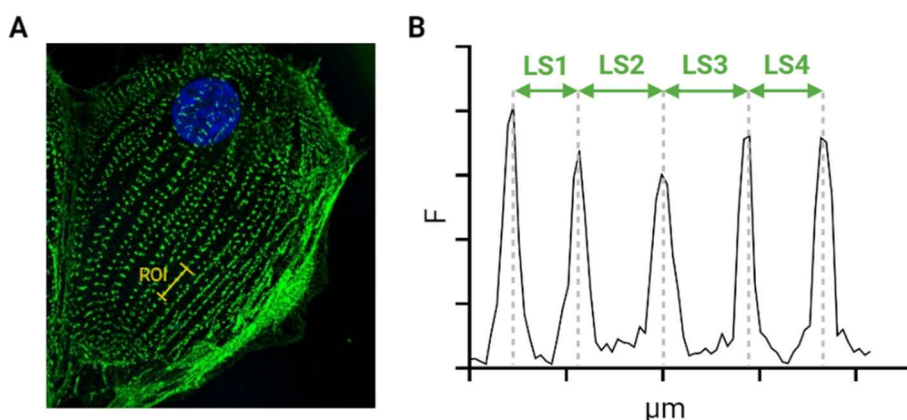


Figura 11 | Análisis de la longitud del sarcómero. **A)** Ejemplo de marcaje inmunofluorescente de la α -actinina en los iPSC-CM. Manualmente, se seleccionaron ROI (línea amarilla) donde medir la longitud del sarcómero. **B)** Gráfico de la intensidad de fluorescencia a lo largo del ROI. La longitud del sarcómero (LS) se calculó como la distancia entre dos picos consecutivos, que se corresponden con cada una de las bandas de α -actinina marcadas.

La medición de la longitud del sarcómero se realizó en el propio *software* de Leica. Para ello, se dibujó una línea recta (ROI) de 10 μm que atravesara perpendicularmente la línea Z de los sarcómeros marcada con el anticuerpo de α -actinina. La longitud del sarcómero se calculó midiendo la distancia entre los picos de intensidad máxima de fluorescencia, que se corresponden con los filamentos de α -actinina marcados (**figura 11**).

2.10 Cuantificación de los niveles de cofilina 2 en plasma

La cuantificación de los niveles de la isoforma 2 de la cofilina en plasma de pacientes con FRDA se realizó mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de tipo *sándwich*. Para ello, se usó el kit *Human CFL2 (Cofilin 2, Muscle) ELISA* (FineTest, EH2804).

Las muestras de plasma utilizadas son las recogidas en la **Tabla 3** del apartado Materiales y Métodos. En concreto, la cohorte estaba compuesta por 15 pacientes de FRDA, 8 hombres y 7 mujeres, con una edad media de 40 años, y edad de debut media de la enfermedad de 16 años. Respecto a las comorbilidades características de la FRDA, el 33% de los pacientes del ensayo presentaba diabetes, el 40% cardiomiopatía hipertrófica, y un 67% escoliosis. Como controles, se utilizó el plasma de 15 voluntarios sanos, que fueron seleccionados de manera que emparejaran por edad, sexo y raza con los pacientes del estudio.

Las muestras de plasma se obtuvieron a partir de muestras de sangre recogidas en tubos EDTA. La sangre se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos, y se recogió la fracción superior que corresponde con el plasma sanguíneo.

El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se diluyeron $\frac{1}{2}$ con el tampón de dilución del kit y 100 μl de las muestras diluidas se añadieron a los pocillos de la placa de ELISA, precubiertos con el anticuerpo de captura contra cofilina 2. La placa se incubó durante 90 minutos a 37°C. A continuación, se realizaron 2 lavados, y se incubó con 100 μl de anticuerpo de detección marcado con biotina durante 60 minutos a 37°C. Tras

lavar de nuevo los pocillos, se añadió la estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) para amplificar la señal, y se incubó de nuevo durante 30 minutos. Posteriormente, se lavaron los pocillos 5 veces para eliminar los conjugados no unidos, y se añadió el 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), que es un cromógeno que produce un color azul claro cuando se oxida por la HRP. Después de 30 minutos de incubación, se paró la reacción con la solución de parada del kit, y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas.

Una vez obtenidos los datos, se comprobó si había diferencias en los niveles de cofilina 2 entre pacientes y controles. Por otra parte, se examinó si existía alguna relación entre los niveles de cofilina 2 y las características clínicas de los pacientes. Para ello, se llevó a cabo una regresión lineal de los valores de absorbancia de la cofilina 2 en pacientes frente a la edad de los mismos, y también frente a la edad de aparición de los síntomas. Por otra parte, se realizaron distintos subgrupos de pacientes según su sexo, o si se les había diagnosticado o no con alguna de las siguientes comorbilidades: diabetes, cardiomiopatía hipertrófica, alteraciones en el segmento ST/T del electrocardiograma o escoliosis. Se comprobó si había diferencias en los valores de cofilina 2 para cada uno de los subgrupos realizados.

La capacidad de la cofilina 2 como biomarcador diagnóstico de la enfermedad o como biomarcador predictivo de alteraciones cardíacas se validó mediante un análisis de curvas ROC (del inglés, *receiver operating characteristic curve*). Se calculó el área bajo la curva, la especificidad y sensibilidad del diagnóstico y los valores predictivos positivos y negativos. Los puntos de corte óptimos se determinaron eligiendo el valor para el cual la suma de especificidad más sensibilidad fuera más alta.

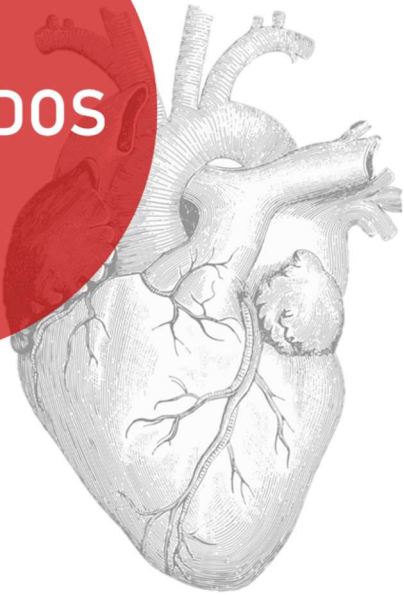
Los resultados obtenidos se confirmaron mediante *Western blot*, siguiendo el mismo protocolo que se ha detallado en 2.3.4. “Análisis de los niveles de frataxina”. En este caso, se utilizó el anticuerpo contra cofilina 2 (tabla 4).

2.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando los programas *OriginPro* (*OriginLab Corporation*) y *GraphPad Prism* versión 8 (*GraphPad Software*). Primero, se comprobó que cada grupo de datos constituía una población con una distribución normal. Para ello, se realizó el test de normalidad Shapiro-Wilk. En el caso de que no se pudiera rechazar la normalidad, se aplicó el F-test para comprobar la homogeneidad de varianzas entre grupos. Para los datos que cumplían ambos criterios (normalidad y homocedasticidad), se llevó a cabo el estadístico *t de Student* para comparar variables continuas entre grupos. En el caso de que no se cumplieran las condiciones para realizar pruebas paramétricas, se llevó a cabo la prueba de *Mann-Whitney*. Si se realizaron múltiples observaciones en cada diferenciación, por ejemplo, en los casos donde se analizaron células individuales, se aplicó una estadística estratificada o jerárquica. De esta forma, se tuvo en cuenta el factor principal (si la muestra es control o FRDA) y el factor anidado (diferenciación de la que procede la muestra). Para las proporciones, se realizó una tabla de contingencia y se llevó a cabo la prueba exacta de *Fisher*. Para comprobar la correlación entre dos variables continuas, se utilizó el coeficiente de correlación de *Pearson*.

Los datos son presentados como la media $\pm$ SEM. Las diferencias con *p-valor* inferior a 0,05 se consideraron significativas, lo cual aparece marcado en las figuras como “*”. *P-valor* inferior a 0,01 aparece como “**”, e inferior a 0,001 “***”. Los valores exactos del *p-valor* aparecen en la **tabla 1 de Anexos**.

RESULTADOS



RESULTADOS

1 Caracterización de las líneas de iPSC

Tras la recepción de las tres líneas de iPSC procedentes del laboratorio del Dr Napierala, éstas se expandieron en cultivo en nuestro laboratorio y se realizó una comprobación de la expresión de marcadores de pluripotencia previa al proceso de diferenciación. Diariamente, se monitorizó el crecimiento y la morfología de las líneas celulares utilizando, para ello, el microscopio invertido. Se observó que la línea FRDA2 presentaba un crecimiento ralentizado en comparación con las otras dos líneas, siendo necesaria la siembra de un mayor número de células para alcanzar la formación de colonias y la supervivencia de la línea. Asimismo, las colonias formadas presentaban diferencias en morfología y tamaño en las tres líneas. En la **figura 12**, se muestra una imagen de las células después de 72 horas en cultivo tras un pase celular. En el caso de la línea FRDA2, los bordes de las colonias estaban mejor definidos y se observó una tendencia a la diferenciación espontánea superior a la de las otras dos líneas. Además, las líneas control y FRDA1 presentaban una morfología de las colonias más redondeada, mientras que en la línea FRDA2 la morfología de las colonias era más irregular.

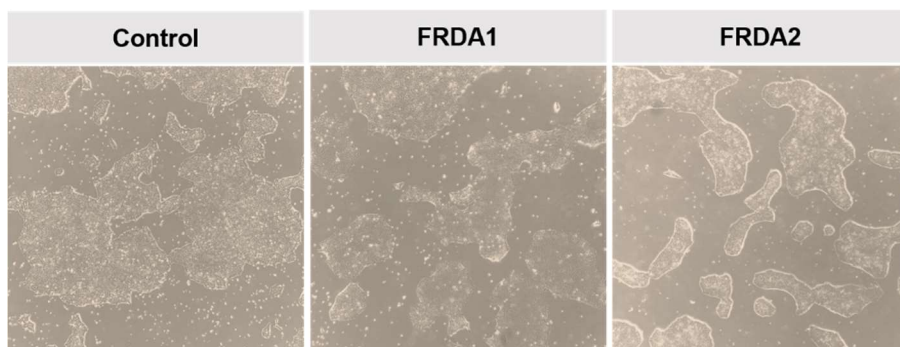
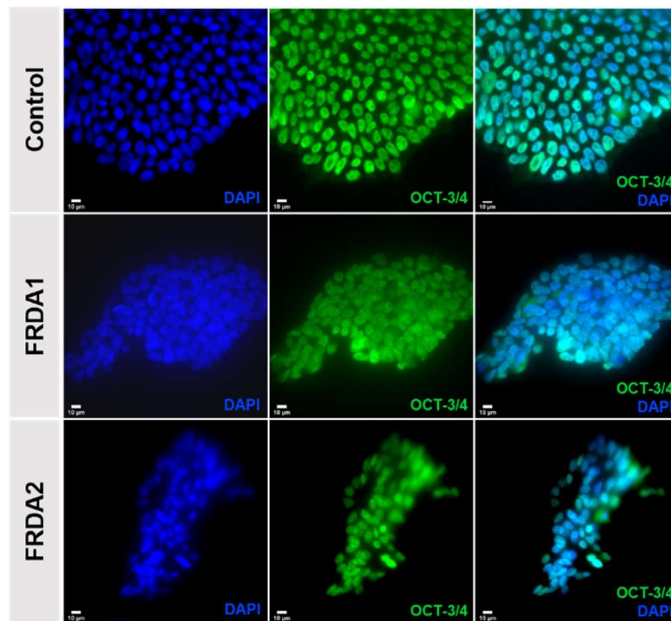


Figura 12 | Crecimiento de las líneas de iPSC en cultivo. Imágenes de las 3 líneas de iPSC tomadas en el microscopio invertido tras 72 horas en cultivo. Se observan diferencias en las líneas en cuanto a morfología y tamaño de las colonias. Objetivo: 10X.

La expresión endógena de los factores de pluripotencia en las iPSC, como paso previo a la diferenciación, se analizó mediante RT-qPCR e

inmunofluorescencia. Las iPSC mostraron una sobreexpresión de los genes de pluripotencia *POU5F1* y *NANOG* comparado con la expresión de los CM derivados de las propias iPSC, que fueron usados como control negativo de pluripotencia (**figura 13**). Ambos genes codifican para los factores de transcripción OCT-3/4 y *NANOG*, respectivamente. Estos factores de transcripción son utilizados para la reprogramación de las iPSC a partir de células somáticas, y tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la pluripotencia (Takahashi and Yamanaka 2006). La expresión proteica de OCT-3/4 fue confirmada en las tres líneas de iPSC mediante inmunofluorescencia.

A



B

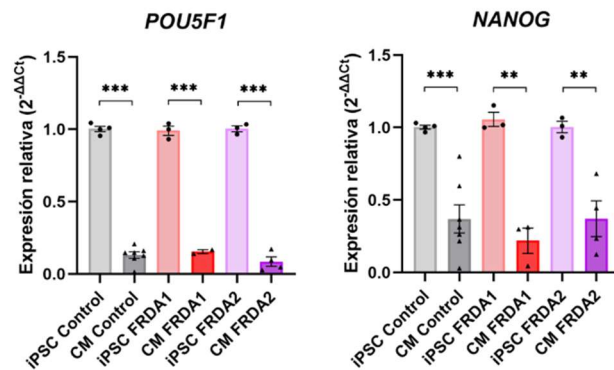


Figura 13 | Las iPSC expresan marcadores de pluripotencia. A) Inmunomarcaje del marcador de pluripotencia OCT3/4 (codificada por el gen *POU5F1*) en las tres líneas de iPSC. OCT3/4 se marcó en verde y los núcleos en azul con DAPI. La figura muestra también la superposición de ambos canales. La barra de escala representa 10 μm . **B)** Cuantificación de los marcadores de pluripotencia *POU5F1* y *NANOG* mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SEM de los niveles de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) de las iPSC frente a los CM obtenidos tras su diferenciación. Los resultados se normalizaron frente a la expresión del *GAPDH*. (N=3-7; significancia: **p $\leq$ 0,01; ***p $\leq$ 0,001; *t* de *Student*)

Por tanto, las iPSC mantienen su pluripotencia y, con ello, la capacidad de diferenciarse a otros tipos celulares. Por su parte, también se confirma la pérdida de expresión de los genes de pluripotencia tras la diferenciación a iPSC-CM.

2 Diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos

Una vez comprobada la pluripotencia de las iPSC, se sembraron las células para comenzar con el protocolo de diferenciación a cardiomiocitos ventriculares. La característica principal de la patología cardíaca en la FRDA es la hipertrofia de la pared ventricular izquierda, por lo que se eligieron los cardiomiocitos ventriculares para modelar la enfermedad. Un esquema del protocolo de diferenciación puede encontrarse en la **figura 14A**, y el protocolo detallado en el apartado *2.2 Diferenciación y cultivo de cardiomiocitos derivados de iPSC* de Materiales y Métodos. Tras la siembra, se dejaron crecer las iPSC durante 48 horas. En este momento (día 0), se comprobó la confluencia de los cultivos, ya que es necesario comenzar con una monocapa de células que cubra al menos el 90% de la superficie. Para lograr esto, se realizaron pruebas sembrando a diferentes confluencias y, a pesar de que en la línea FRDA2 se sembró a una densidad más elevada, no se consiguió una confluencia tan alta como en las otras dos líneas celulares (**figura 14B**), lo que concuerda con la ralentización del crecimiento observada anteriormente. En la **figura 14** puede también observarse el seguimiento de los cultivos a diferentes días del proceso de diferenciación a cardiomiocitos. A partir del día 8, se observaron pequeñas áreas de cardiomiocitos latiendo en el cultivo, mientras que a día 12-14, si la diferenciación había funcionado correctamente, el latido era generalizado en

todo el pocillo. El día 16 se comenzó con la maduración de los cardiomiocitos, bien mediante la inhibición de la ruta de mTOR o bien mediante la adición de hormonas tiroideas y glucocorticoides y, a partir del día 26, se realizaron los experimentos.

A



B

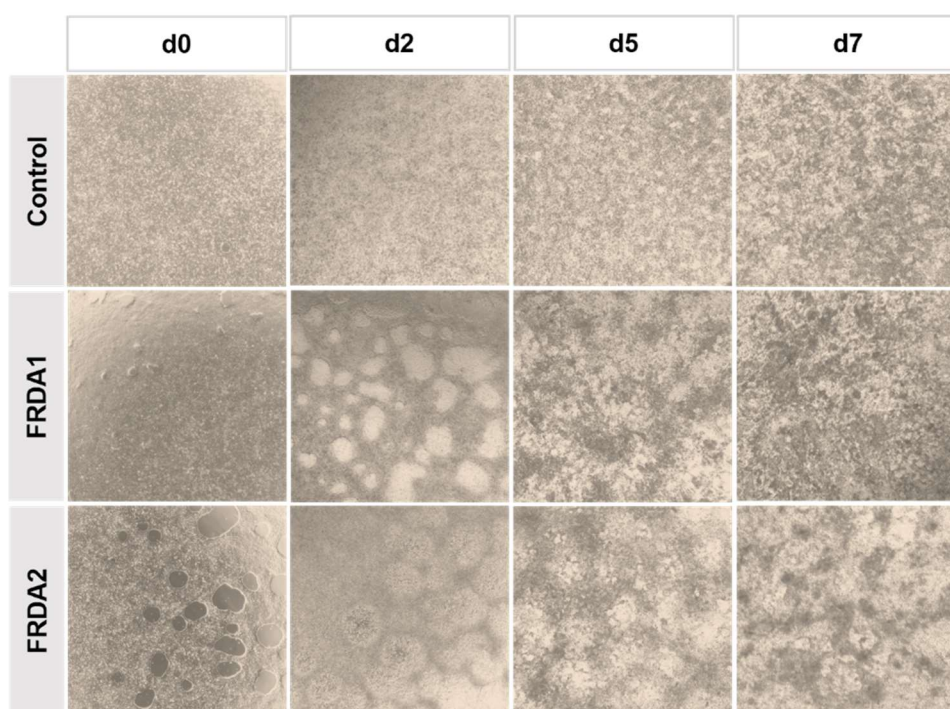


Figura 14 | Seguimiento del proceso de diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos. **A)** Esquema del protocolo de diferenciación. El día -2 se sembraron las iPSC y tras 48 horas en cultivo (día 0), comenzaron a añadirse los factores de diferenciación. Tras el proceso de diferenciación, se llevó a cabo la maduración de los iPSC-CM y, a partir del día 26, se realizaron los experimentos. **B)** Evaluación del cultivo durante el proceso de diferenciación a día 0, 2, 5 y 7 utilizando el microscopio invertido. A día 0 (d0), las células forman una monocapa con una confluencia >90%. A partir del día 8, se observan en el cultivo pequeñas áreas de iPSC-CM latiendo. Objetivo: 10X.

En el **QR** pueden observarse los iPSC-CM latiendo en cultivo a día 26 de diferenciación.



3 Confirmación de la expresión de marcadores cardíacos

Para comprobar si la diferenciación había sido exitosa, se confirmó la expresión de marcadores cardíacos en los iPSC-CM mediante RT-qPCR, citometría de flujo e inmunofluorescencia.

Mediante RT-qPCR se cuantificó la expresión de los genes *TNNT2*, *ACTA2* y *MYL2* en los iPSC-CM (**figura 15A**), comparando su expresión con las líneas de iPSC a partir de las cuales se habían diferenciado, y que fueron usadas como control negativo de expresión de marcadores cardíacos. En concreto, se observó una sobreexpresión significativa de los genes *TNNT2*, que codifica la troponina T cardíaca (cTnT), y *ACTA2*, que codifica la proteína α -actina del músculo liso (α -SMA), lo que confirma la obtención de cardiomiocitos. A pesar de que, como su propio nombre indica, la expresión de *ACTA2* está relegada al músculo liso, existe una expresión transitoria de *ACTA2* en el corazón en el feto y en el neonato. Otros autores también han demostrado la expresión de *ACTA2* en iPSC-CM, lo que sugiere que los iPSC-CM son similares a cardiomiocitos inmaduros (Zuppinger et al. 2017).

Por otra parte, *MYL2* codifica la isoforma ventricular de la cadena ligera reguladora de miosina 2 (MLC2v), siendo un marcador de cardiomiocitos ventriculares (Guo and Pu 2020). En este caso, se observa también una sobreexpresión de este gen en las líneas de iPSC-CM con respecto a las iPSC, aunque las diferencias no llegan a alcanzar la significancia en el caso de las líneas de FRDA (p-valor=0,06 (FRDA1); p-valor=0,17 (FRDA2), posiblemente por la variabilidad de los resultados y el tamaño muestral (n=3), ya que el incremento en la expresión de los iPSC-CM de FRDA con respecto a las iPSC es de mínimo 24,8 veces para el caso de los iPSC-CM de FRDA1 y de 9,69 veces en los iPSC-CM de FRDA2.

Asimismo, se comprobó la expresión de la troponina T cardíaca (cTnT) mediante citometría de flujo (**figura 15B**). Se comprobó que con el protocolo de diferenciación era posible conseguir más de un 80% de células positivas para la cTnT. La expresión de esta proteína en los iPSC-CM obtenidos también fue

confirmada mediante inmunofluorescencia (**figura 16**), observándose en la imagen el marcaje de los filamentos de actina donde permanece unida la cTnT. También se confirmó la expresión de α -SMA y de GATA4, un factor de transcripción implicado en la diferenciación y función del miocardio (Holtzinger, Rosenfeld, and Evans 2010). Al tratarse de un factor de transcripción, el marcaje de GATA4 colocaliza con el marcaje del núcleo realizado con DAPI (**figura 16**).

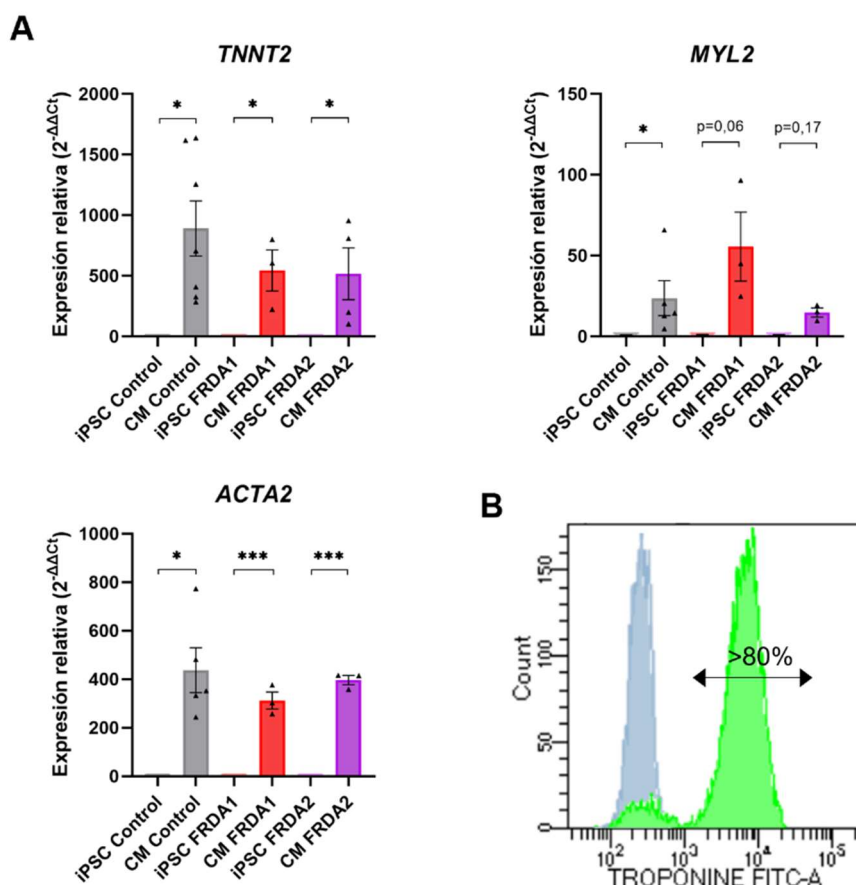


Figura 15 | Confirmación de la expresión de marcadores cardíacos mediante RT-qPCR y citometría de flujo. A) Cuantificación de la expresión de los genes cardíacos *TNNT2*, *ACTA2* y *MYL2* mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran como la media±SEM de los niveles de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de los iPSC-CM comparados con las iPSC de partida. Los resultados se relativizaron frente a la expresión del gen *GAPDH* (n=3-7 experimentos de diferenciación independientes; *p≤0,05; ***p≤0,001). **B)** Análisis representativo de la expresión de troponina cardíaca (cTnT) por citometría de flujo. En azul, se muestran las iPSC, que fueron usadas como control. En verde, aparecen los iPSC-CM. La diferenciación se considera eficiente cuando al menos el 80% de los iPSC-CM son positivos para la cTnT.

RESULTADOS

Por tanto, según los resultados obtenidos en la RT-qPCR, en la citometría de flujo y en la inmunofluorescencia, se puede confirmar que el protocolo de diferenciación permite la obtención de cardiomiocitos ventriculares, aunque es necesaria una caracterización más profunda para definir el nivel de maduración en el que se encuentran.

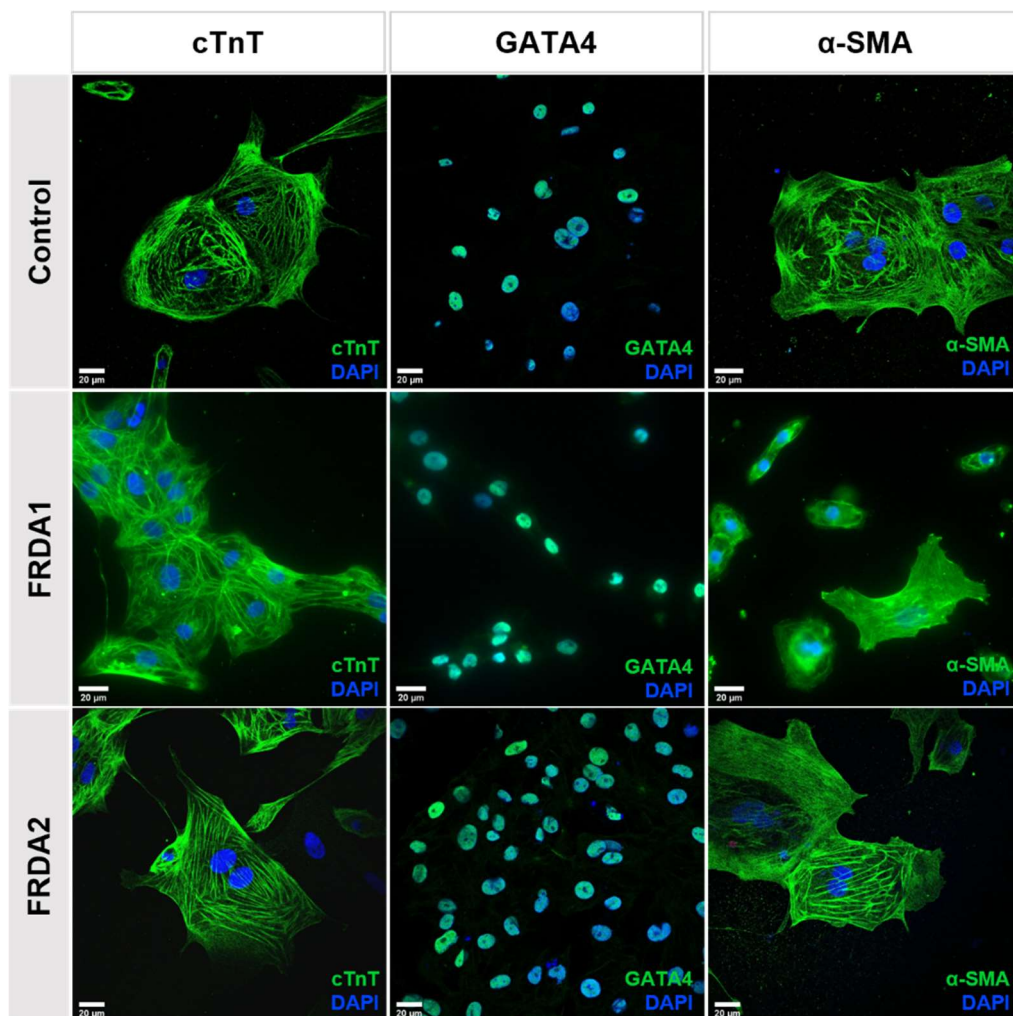
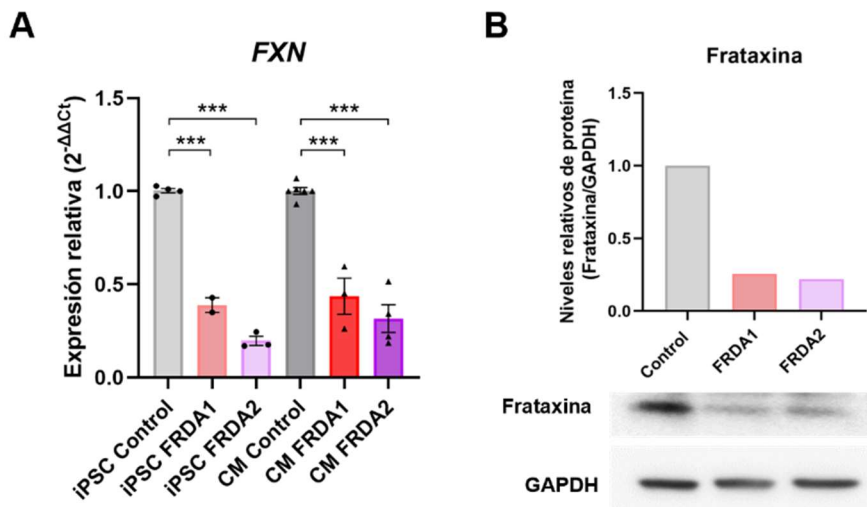


Figura 16 | Confirmación de la expresión de marcadores cardíacos en los iPSC-CM mediante inmunofluorescencia. Inmunomarcaje de los marcadores cardíacos cTnT, GATA4 y α -SMA, que fueron marcados en verde. Los núcleos se marcaron en azul con DAPI. La figura muestra la superposición de ambos canales. La barra de escala representa 20 μ m.

4 Confirmación de la reducción de la expresión de frataxina

El siguiente paso fue confirmar que la reducción en la expresión de frataxina presente en los pacientes de FRDA se mantenía después de la reprogramación y tras el protocolo de diferenciación. Para ello, mediante RT-qPCR se cuantificó la expresión del gen *FXN* tanto en las líneas de iPSC como en las líneas de iPSC-CM (**figura 17A**). La expresión de las líneas de FRDA en cada caso se relativizó frente a la línea control. Tanto las iPSC de FRDA como los iPSC-CM derivados de ellas mostraron una reducción significativa en la expresión de *FXN* respecto a las líneas de iPSC y de iPSC-CM control. La reducción de la expresión de frataxina en las iPSC se cuantificó también mediante *Western blot* (**figura 17B**). Por otra parte, se realizó un inmunomarcaje contra la proteína frataxina en los de iPSC-CM (**figura 17C**). Se observa la expresión de frataxina con el típico patrón mitocondrial, y se aprecia una reducción en la expresión de la proteína en los iPSC-CM de FRDA con respecto al control.



C

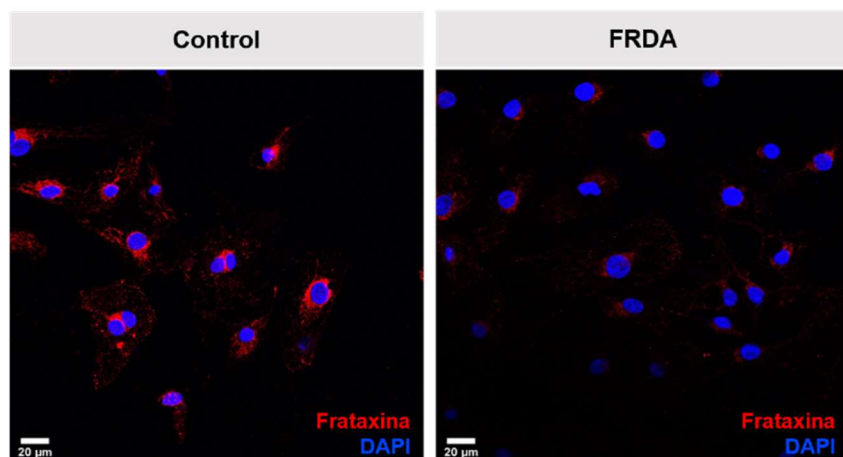


Figura 17 | Las líneas de iPSC de pacientes de FRDA y los cardiomiocitos derivados de ellas mantienen la reducción en la expresión de frataxina. A) Cuantificación de la expresión del gen FXN mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran como la media±SEM de los niveles de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de las líneas de iPSC y iPSC-CM de FRDA comparado con las líneas control. Los resultados se relativizaron frente a la expresión del GAPDH (n=2-6 experimentos de diferenciación independientes; *** $p \leq 0,001$). **B)** Comparativa de la expresión de frataxina de las iPSC de FRDA con respecto a las iPSC control medida por Western blot. Los resultados se analizaron por densitometría relativizando la señal frente al GAPDH. **C)** Inmunomarcage representativo de frataxina en los iPSC-CM control y iPSC-CM de FRDA. La imagen es la superposición del marcaje de frataxina (rojo) y del núcleo (azul). La barra de escala es de 20 μm .

5 Los iPSC-CM de FRDA presentan una sobreexpresión de una firma de miARN

En un trabajo previo de nuestro laboratorio, se identificaron una firma de miARN circulantes sobreexpresados en el plasma de los pacientes de FRDA, que podrían modular rutas clave en la fisiopatología de la enfermedad. Además, uno de los miARN, el miR-323a-3p, se propuso como un biomarcador para monitorizar la progresión de la cardiomiopatía (Seco-Cervera et al. 2017). Con el objetivo de determinar si los miARN, a través de la identificación de sus dianas, podrían contribuir a elucidar las rutas moleculares involucradas en la cardiomiopatía de la FRDA, nos propusimos examinar si su expresión estaba alterada en los iPSC-CM.

Para ello, mediante RT-qPCR, se cuantificó la expresión de la firma de miARN (miR-151a-5p, miR-625-3p, miR-330-3p, miR-128-3p, miR-142-3p, miR-323a-3p) en las tres líneas de iPSC-CM y se comprobó que había una sobreexpresión de todos ellos en una o en ambas líneas de iPSC-CM de FRDA comparado con la línea control (**figura 18**), sugiriendo que los miARN podrían estar relacionados con la patología cardíaca.

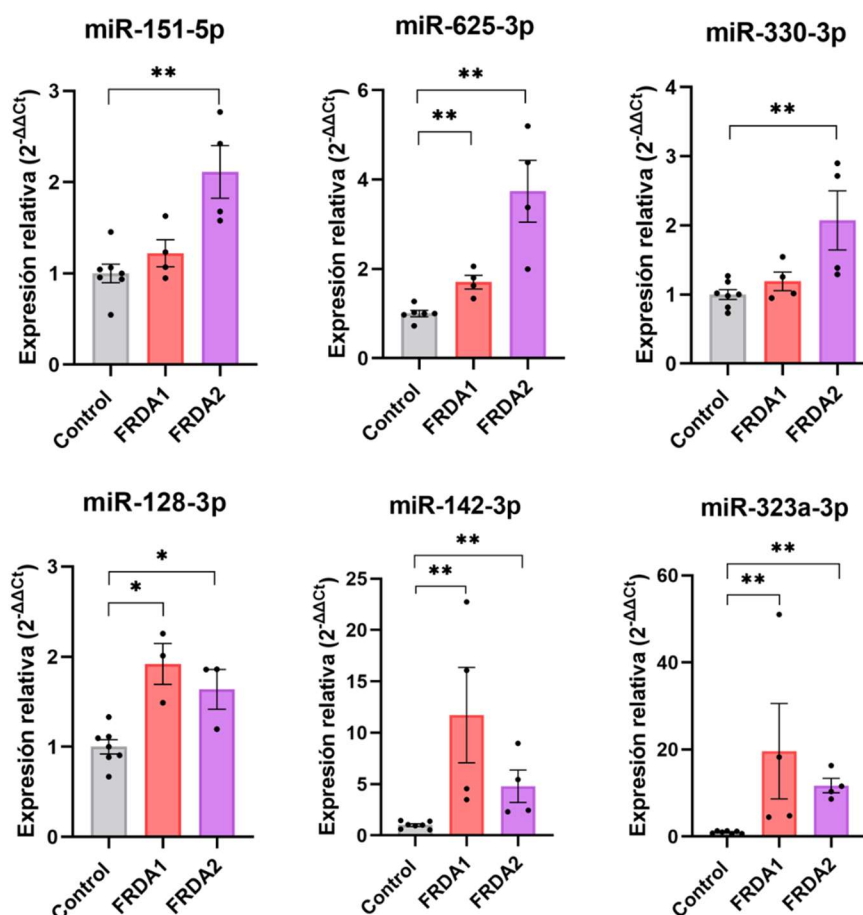


Figura 18 | Los iPSC-CM de FRDA presentan una sobreexpresión de una firma de miARN identificados como biomarcadores de FRDA. Cuantificación de la expresión de los miARN mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran como la media±SEM de los niveles de expresión relativa (2^{-ΔΔCt}) de los miARN en los iPSC-CM de FRDA comparado con la línea control. Los resultados se normalizaron frente a la expresión del RNU48. (n≥4 experimentos de diferenciación independientes; *p≤0,05; **p≤0,01).

6 Las dianas de los miARN sobreexpresados sugieren alteraciones en el citoesqueleto y en el flujo de Ca^{2+} intracelular en los iPSC-CM de FRDA

Para comprobar las rutas reguladas por los miARN sobreexpresados, se realizó un análisis de las dianas de los miARN utilizando las bases de datos miRTarBase, miRDB, y la herramienta web, MIENTURNET, que permite identificar genes diana comunes a varios miARN. De esta forma, se identificaron un total de 85 genes que eran diana de, al menos, dos de los miARN sobreexpresados en los iPSC-CM. En la **figura 19A** se muestra la red de interacciones entre los miARN y sus dianas. Los resultados del enriquecimiento funcional (**figura 19B**) mostraron que una de las vías enriquecidas era la de “Rutas hipotéticas implicadas en patogénesis cardiovascular”, lo que apoya que las dianas de los miARN sobreexpresados participan en la patología cardíaca.

Profundizando en dianas concretas para localizar qué funciones podrían estar alteradas en la FRDA, se encontró que el gen *ARHGAP12* era diana de tres de los miARN analizados (miR-142-3p, miR-128-3p y miR-330-3p) (**figura 19C**). Este gen codifica la proteína 12 activadora de Rho GTPasas que, entre otras funciones, regula negativamente la ruta de señalización Rho/ROCK. El estudio de esta ruta resulta interesante ya que implica proteínas directamente relacionadas con la función cardíaca y con la patología de la FRDA. Por una parte, ARHGAP12, a través de la vía Rho/ROCK, regula negativamente la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) y, con ello, la capacidad contráctil del cardiomiocito (Shimokawa, Sunamura, and Satoh 2016). Además, ROCK, entre otras funciones, regula la actividad de la proteína cofilina promoviendo su fosforilación, lo que conduce a la inactivación de la proteína. Como se ha mencionado previamente, la cofilina promueve la despolimerización de los filamentos de actina, teniendo un papel relevante en la dinámica del citoesqueleto. Las alteraciones de cofilina se han relacionado tanto con problemas cardíacos (Subramanian et al. 2015) como con la patología de la FRDA, donde se observó en modelos neuronales que existía una desregulación

en los niveles de cofilina activa (Muñoz-Lasso et al. 2020). De manera interesante, se encontró que el gen que codifica la isozima de ROCK cardíaca, *ROCK2*, también es diana de dos de los miARN sobreexpresados (miR-142-3p y miR-625-3p). Por su parte, *CFL2*, el gen que codifica la isoforma cardíaca de cofilina (cofilina-2), es diana del miR-142-3p, lo que apoya una posible alteración de esta ruta en los iPSC-CM de FRDA. De esta forma, posibles alteraciones en la expresión de *ARHGAP12*, *ROCK2* o *CFL2*, mediadas por la sobreexpresión de los miARN en los iPSC-CM de FRDA, podrían impactar directamente en la dinámica de la actina y en la contracción cardíaca.

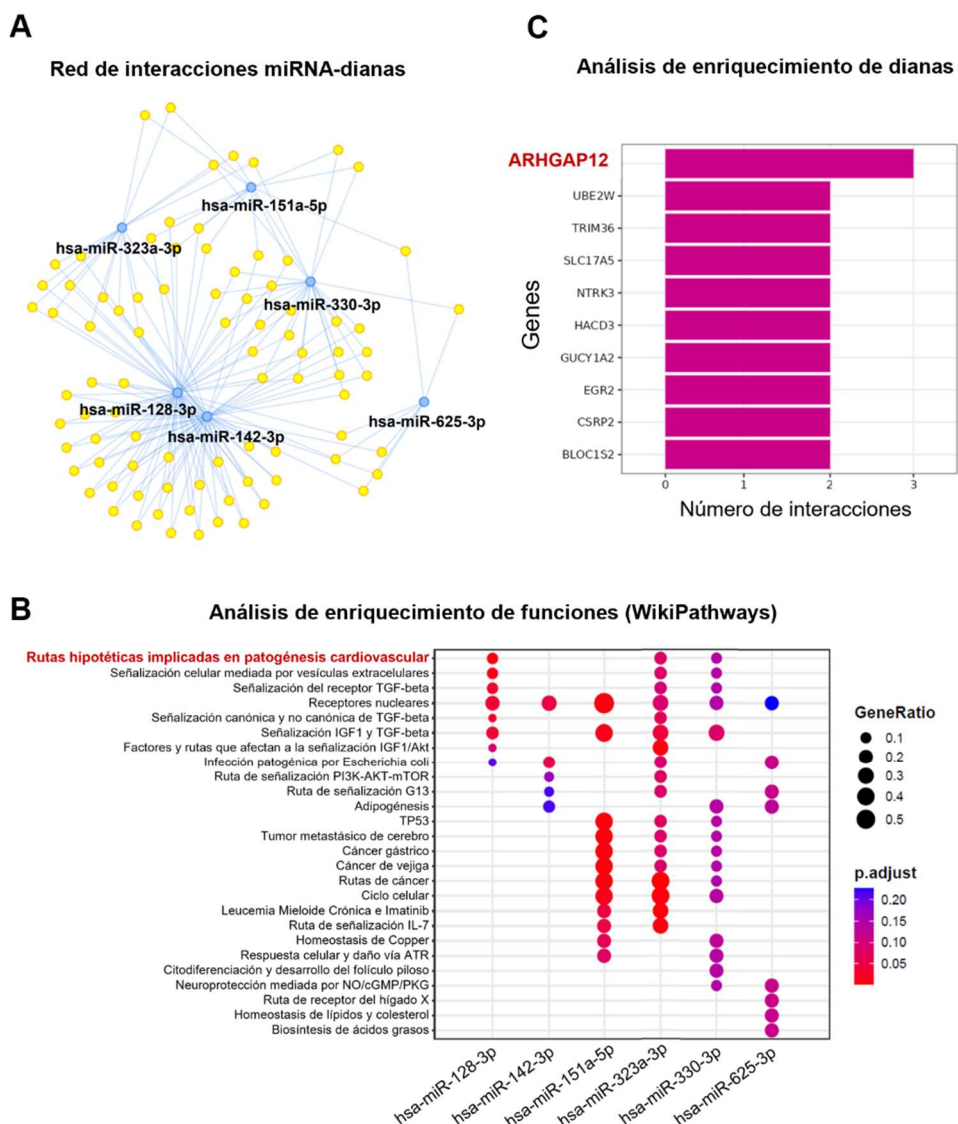


Figura 19 | Las dianas de los miARN sobreexpresados en la FRDA están relacionadas con la patogénesis cardiovascular. Análisis de enriquecimiento de dianas según la herramienta web MIENTURNET (*MicroRNA Enrichment TURned NETwork*). **A)** Representación en red de las interacciones miARN-dianas. Los puntos azules representan los miARN y los amarillos, sus genes diana. **B)** *Dot plot* del análisis de enriquecimiento de funciones de los genes diana según la base de datos *WikiPathways*. El eje Y representa las categorías de anotación (rutas biológicas) y en el eje X aparecen los miARN analizados. El color de los puntos representa los p-valor ajustados (*False Discovery Rate*, FDR), mientras que el tamaño de los puntos representa la ratio del gen (número de dianas de un miARN que están enriquecidas en esa función sobre el número total de interacciones de ese miARN). **C)** Tabla de resultados del análisis de enriquecimiento de dianas que muestra el número de interacciones para los genes diana. El gen ARHGAP12 es diana de 3 de los miARN analizados.

Para comprobar si la sobreexpresión de los miARN realmente tenía un efecto en la expresión de los genes diana de la ruta, se cuantificó la expresión del gen *CFL2*, diana del miR-142-3p. Los resultados mostraron que los iPSC-CM de la línea FRDA2 presentaban una reducción significativa en la expresión de *CFL2* con respecto a la línea control (**figura 20**), lo que sugiere una posible desregulación en la dinámica de la actina en los iPSC-CM de FRDA. En relación con la función del citoesqueleto, se encontró que miR-142-3p presentaba también como diana el gen *MYLK*, que codifica la quinasa de la cadena ligera de la miosina. Esta quinasa dependiente de Ca^{2+} participa en la contracción mediante la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina (Herring et al. 2006). En los iPSC-CM de FRDA se encontró una sobreexpresión significativa del gen *MYLK* con respecto a la línea control (**figura 20**), lo que podría afectar a la regulación de la contracción. De hecho, mutaciones en el gen que codifica la isoforma específica cardíaca de *MYLK*, *MYLK3*, se han asociado con cardiomiopatía dilatada (Tobita et al. 2017).

Por otra parte, se encontraron varias dianas implicadas en la homeostasis del calcio intracelular. Dada la importancia de este proceso para el acoplamiento excitación-contracción en el cardiomiocito, se decidió estudiar si su expresión estaba afectada en los iPSC-CM de FRDA. El miR-142-3p presenta como diana el gen *ATP2A2*, que codifica la bomba ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA2), que secuestra el Ca^{2+} dentro del retículo. Se observó

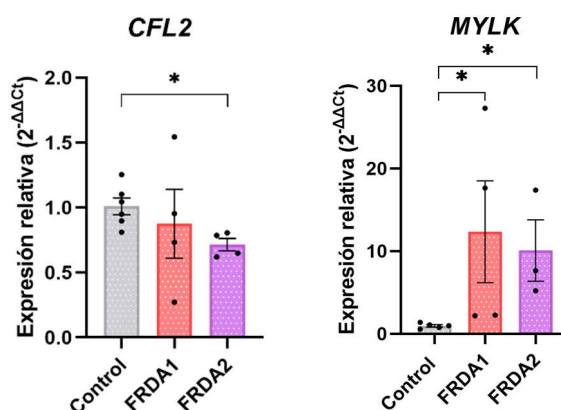


Figura 20 | Cuantificación de la expresión de los genes diana del miR-142-3p (*CFL2* y *MYLK*) en los iPSC-CM mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran como la media±SEM de los niveles de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de los miARN en los iPSC-CM de FRDA comparado con la línea control. Los resultados se normalizaron frente a la expresión del gen endógeno *GAPDH*. (N≥3 experimentos de diferenciación independientes; *p≤0,05).

una disminución en los niveles de expresión de *ATP2A2* en las líneas de FRDA (**figura 21**), lo que sugiere una alteración en la homeostasis del calcio. También se cuantificó la expresión de *CACNA1C* y *CALHM5*, ambos diana del miR-323a-3p, y de *CACNA1D*, diana del miR-142-3p. Por su parte, *CACNA1C* y *CACNA1D* codifican los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L $\text{Ca}_v1.2$ y $\text{Ca}_v1.3$, respectivamente. Estos canales están situados en la membrana del cardiomiocito y permiten la entrada de Ca^{2+} del exterior al interior celular (Shaw and Colecraft 2013). En los iPSC-CM de FRDA se observó una reducción en la expresión de *CACNA1C* y *CACNA1D*, aunque en el caso de *CACNA1C* no se alcanzó la significancia estadística (**figura 20**). La alteración en la expresión de estos canales puede afectar a la fuerza de contracción del iPSC-CM y causar arritmias cardíacas (Zaveri et al. 2023). Respecto al gen *CALHM5*, se demostró una sobreexpresión muy acusada del gen en la línea FRDA1. Este gen codifica un canal perteneciente a una familia de canales iónicos dependientes de voltaje, que se abren en respuesta a la despolarización o a una reducción en la concentración de Ca^{2+} extracelular, permitiendo la entrada de Ca^{2+} al citosol (Ma et al. 2016). Por tanto, los resultados obtenidos indican alteraciones en los niveles de expresión de genes relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} en los

RESULTADOS

iPSC-CM de FRDA, lo que sugiere que el flujo de Ca^{2+} intracelular, que es un proceso clave para el correcto funcionamiento de la contracción, puede estar afectado en los pacientes de FRDA.

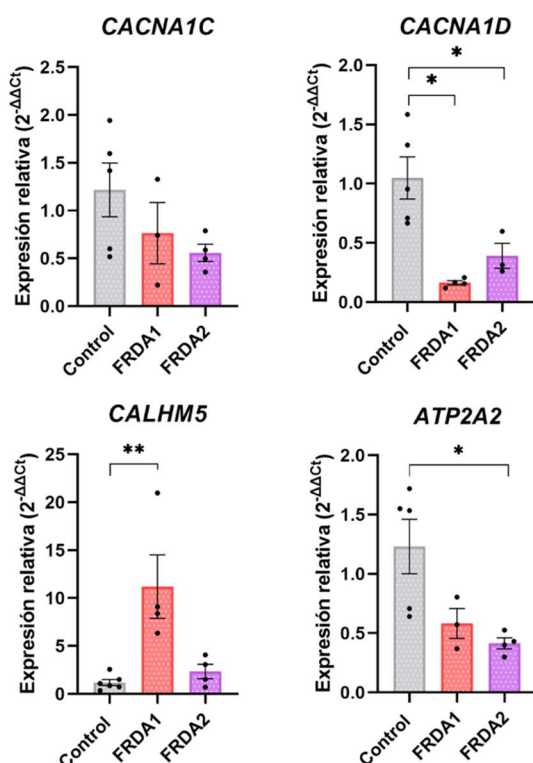


Figura 21 | Cuantificación de la expresión de genes diana del miR-323a-3p (*CALHM5*, *CACNA1C*) y del miR-142-3p (*CACNA1D*, *ATP2A2*) relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} en los iPSC-CM mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran como la media±SEM de los niveles de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de los miARN en los iPSC-CM de FRDA comparado con la línea control. Los resultados se normalizaron frente a la expresión del gen endógeno *GAPDH*. (N≥3 experimentos de diferenciación independientes; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

7 Los iPSC-CM de FRDA presentan alteraciones en el latido cardiaco

El latido cardiaco supone un indicador de la función cardiaca, de manera que la observación de alteraciones en el latido puede aportar información acerca de la patología subyacente. Como se ha comentado anteriormente, los iPSC-CM comienzan a latir espontáneamente en cultivo a partir del día 8 de diferenciación. A partir del día 12, se observó un latido generalizado. Para

comprobar si había diferencias en el latido de las líneas FRDA con respecto al control, se monitorizó el latido cardiaco desde el día 12 hasta el día 26 de la diferenciación usando el macro de *Imagej/Fiji Myocyter*. *Myocyter* es una herramienta de alta precisión que permite extraer multitud de parámetros que describen la contracción celular a partir de vídeos del cultivo (Grune et al. 2019). Se calcularon los siguientes parámetros: frecuencia cardiaca, tiempo de pico, tiempo de sístole, tiempo de diástole y amplitud del latido.

Como se observa en la **figura 22**, hasta el día 19 de diferenciación no se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros medidos. A partir del día 19 de diferenciación, la línea FRDA1 presenta una ralentización en la frecuencia cardiaca, que se corresponde con un incremento en el tiempo de sístole. Sin embargo, estas diferencias desaparecen hacia el final de la diferenciación, donde las frecuencias cardiacas se igualan, y se observa que la diástole es más rápida que en la línea control. Por su parte, la línea FRDA2 presenta una frecuencia cardiaca superior a la línea control a partir del día 19 y hasta el final del mantenimiento del cultivo. Esto se acompaña de una reducción en los tiempos de pico, sístole y diástole, aunque las diferencias no se mantienen hasta tiempo final, donde solo se observa el incremento en la frecuencia cardiaca. Respecto a la amplitud del latido, que supone una aproximación a la fuerza de contracción, la línea FRDA1 presenta una reducción con respecto al control, mientras que la amplitud de la línea FRDA2 es, generalmente, superior a la de la línea control, aunque las diferencias solo son significativas el día 23 de diferenciación. Por tanto, a pesar de que las dos líneas de la enfermedad difieren en su comportamiento, en ambas existen alteraciones en el latido de los iPSC-CM con respecto a la línea control. Estas alteraciones aparecen a partir del día 19 de diferenciación, lo que sugiere que el fenotipo de la enfermedad podría aparecer con la maduración de los iPSC-CM, que comienza el día 16, último día en el que no se observan diferencias entre líneas.

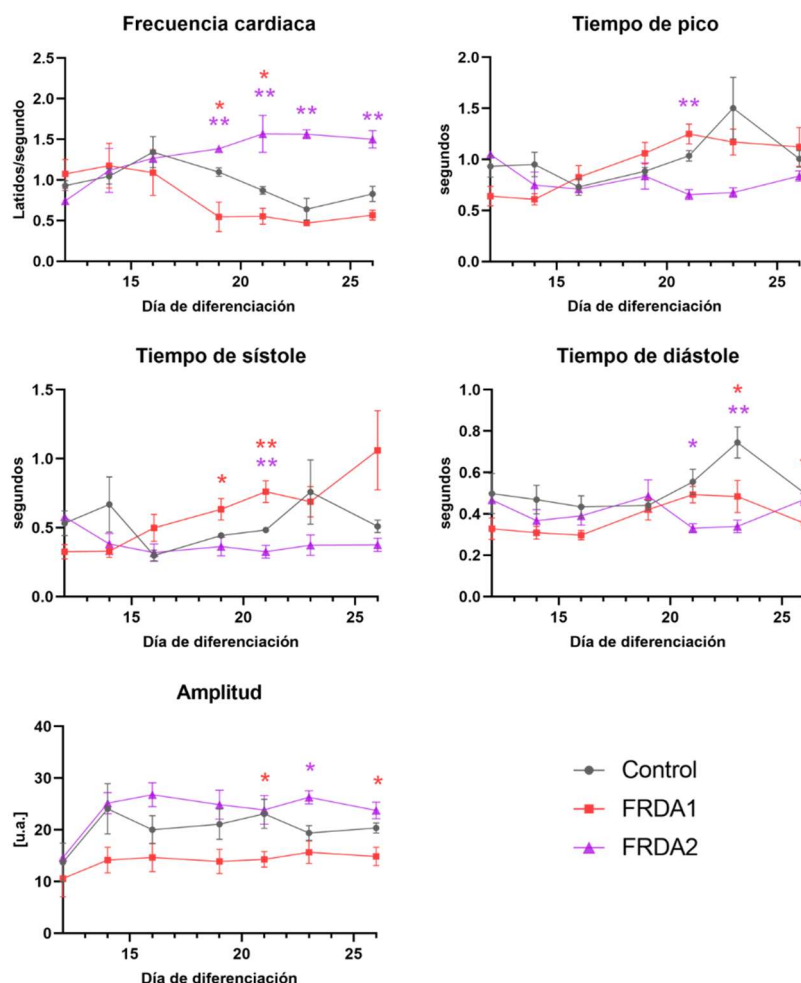


Figura 22 | Los iPSC-CM de FRDA muestran alteraciones en el latido cardiaco. Seguimiento y cuantificación de diferentes parámetros relativos al latido cardiaco durante la diferenciación y maduración de los iPSC-CM. Los resultados se expresan como la media±SEM. (n≥3 experimentos de diferenciación independientes; *p≤0,05; **p≤0,01 respecto a la línea control).

8 Los iPSC-CM de la FRDA manifiestan arritmias en la evaluación del potencial de acción

Para evaluar el mecanismo de las arritmias en esta enfermedad, se evaluó la actividad eléctrica de los iPSC-CM en cultivo, una vez finalizado el proceso de diferenciación, utilizando la sonda fluorescente FluoVolt™, que ha sido utilizada por más autores para medir el potencial de acción en CM derivados de

iPSC (Pioner et al. 2019). Tras incubar los iPSC-CM con la sonda, las células se estimularon a 1 Hz y se registró el potencial de acción de los iPSC-CM latiendo en cultivo mediante microscopía confocal. Los cambios en el potencial de membrana provocan cambios en la intensidad de fluorescencia de la sonda, en concreto, la fluorescencia aumenta con la despolarización y se reduce con la hiperpolarización de la célula (Miller et al. 2012). Un registro representativo de cada una de las tres líneas celulares se observa en la **figura 23**.

El potencial de acción de la línea control mantiene un ritmo constante en respuesta a la estimulación a una frecuencia de 1 Hz. Sin embargo, en las líneas de FRDA se observa la presencia de eventos proarrítmicos de tipo post-despolarización, es decir, de impulsos adicionales desencadenados por un potencial de acción inicial (Kistamás et al. 2020). En concreto, la mayoría de los eventos observados son alteraciones en la repolarización, produciéndose una nueva despolarización, generalmente de menor amplitud que la primera, antes de que los iPSC-CM regresen completamente a su estado de reposo. Esto se conoce como despolarización temprana o EAD (del inglés *Early AfterDepolarization*). Por su parte, la línea FRDA2 no mantiene el ritmo de la estimulación, sino que se observa un incremento en la frecuencia del potencial de acción o taquicardia. Se alternan periodos de potenciales de acción en tren, es decir, potenciales de acción rítmicos a una frecuencia alta, seguidos de una pérdida del ritmo.

Por tanto, ambas líneas de FRDA presentan alteraciones en el potencial de acción, por lo que se decidió estudiar el flujo de Ca^{2+} citosólico para comprobar si las arritmias estaban desencadenadas por alteraciones en la homeostasis de este ion.

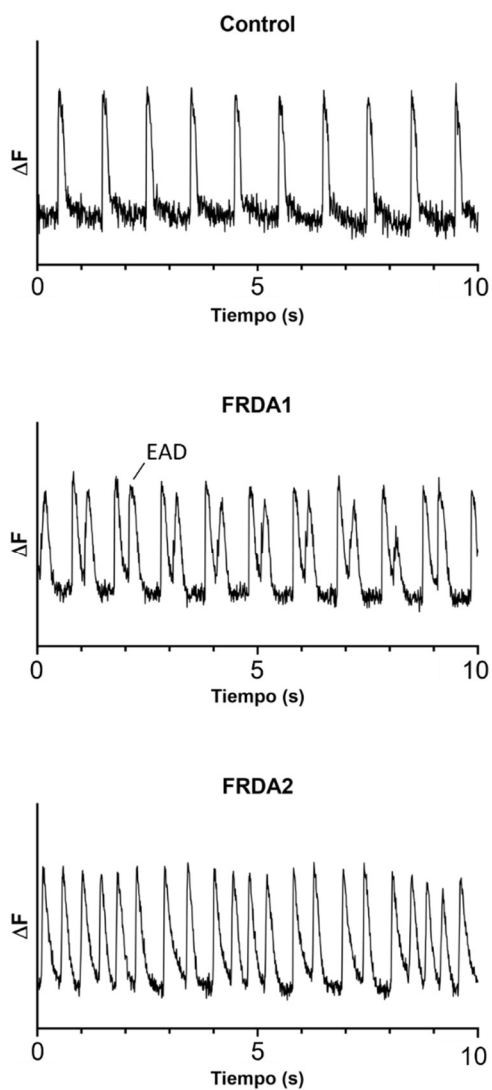


Figura 23 | Los iPSC-CM de FRDA muestran arritmias en la medida del potencial de acción. Registro representativo del potencial de acción de los CM estimulados a 1 Hz medido mediante la sonda fluorescente *Fluovolt*. En el registro se muestran los cambios en la intensidad de fluorescencia (ΔF , eje Y) con respecto al tiempo (s, eje X) para las tres líneas de estudio. El incremento de la fluorescencia refleja la despolarización de la membrana. EAD: *Early AfterDepolarization*.

9 Los iPSC-CM de FRDA presentan alteraciones en la homeostasis del calcio

Para evaluar la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, se utilizó la sonda fluorescente Calbryte™ 520 AM que, una vez dentro de la célula, incrementa su fluorescencia al unirse a Ca^{2+} , y que ha sido ampliamente utilizada para medir los flujos de Ca^{2+} en CM derivados de iPSC (Allan et al. 2023; Yin et al. 2021). Tras la incubación, se estimularon los iPSC-CM a 1 Hz y se registraron los flujos de Ca^{2+} intracelular mediante microscopía confocal. En la **figura 24**, se muestran ejemplos de los registros del escaneo lineal obtenidos, donde se representan los cambios en la fluorescencia, los cuales reflejan cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico, a lo largo del tiempo. Se aprecian alteraciones similares a las observadas en la medida del potencial de acción, es decir, eventos proarrítmicos en las líneas de FRDA, particularmente, despolarizaciones tempranas en la línea FRDA1, y taquicardia y pérdida del ritmo en la línea FRDA2. En concreto, se contabilizó un 48,3% de células con eventos proarrítmicos en la línea FRDA1 y un 80% en el caso de la línea FRDA2 (**figura 25**).

Para profundizar en el mecanismo subyacente a las arritmias, a partir de las imágenes del escaneo lineal obtenidas (**figura 24**), se analizaron los transitorios de Ca^{2+} , es decir, la secuencia de eventos de señalización que comprende desde la entrada de Ca^{2+} en la célula activada por la estimulación hasta la eliminación del Ca^{2+} , ya sea por reabsorción por el RS o por extrusión al exterior celular (Jing Li, Richmond, and Hong 2022). En la medida de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} (F/F_0), definida como el aumento en la concentración de Ca^{2+} que se produce tras cada estímulo en relación con los niveles basales o de reposo, se observó que las líneas de FRDA presentaban un incremento en la amplitud con respecto a la línea control (**figura 25**). Esto indica que existe o una mayor entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular a través de los canales de membrana y/o una mayor liberación de Ca^{2+} desde el RS.

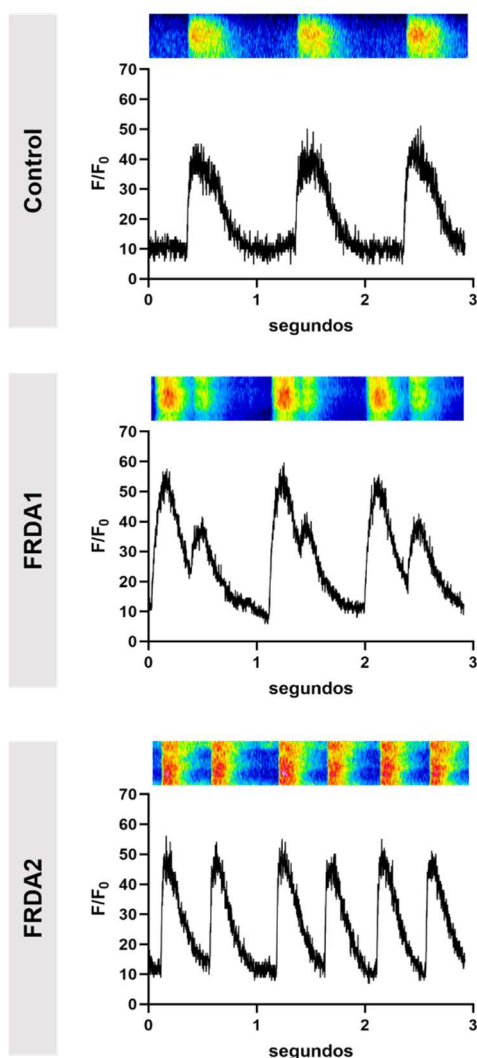


Figura 24 | Los iPSC-CM de FRDA muestran alteraciones en los transitorios de Ca^{2+} intracelular. Ejemplos representativos de imágenes de escaneo lineal de transitorios de Ca^{2+} tomadas mediante microscopía confocal donde se representa la amplitud del transitorio (F/F_0) frente al tiempo (segundos). Los iPSC-CM fueron estimulados a 1 Hz.

Además, para medir la velocidad de los flujos de Ca^{2+} se cuantificaron el tiempo que tardaba en alcanzarse el pico desde niveles basales (tiempo al pico) y el parámetro D50, que indica el tiempo en el cual la concentración de Ca^{2+} ha disminuido a la mitad del pico máximo (figura 26). Ambas líneas de FRDA presentan una reducción significativa en el tiempo al pico, lo que podría relacionarse con la taquicardia observada en la medida del potencial de acción, de manera que los flujos de Ca^{2+} se incrementarían al aumentar la frecuencia

de los potenciales de acción. Por otra parte, también se observó una reducción significativa en el parámetro D50 en ambas líneas de FRDA comparadas con el control, lo que indica que los procesos de recaptación por parte del RS, o de eliminación de Ca^{2+} al exterior celular son más rápidos. Esto podría deberse a una mayor actividad de la bomba SERCA y/o a una mayor actividad del transportador NCX, lo cual contribuiría a la rápida disminución de la concentración de Ca^{2+} .

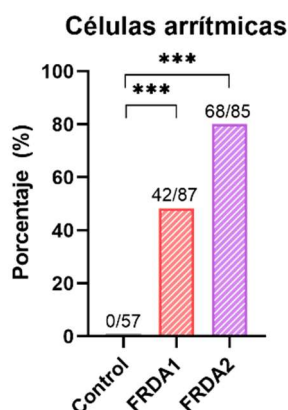


Figura 25 | Los iPSC-CM de FRDA presentan una mayor frecuencia de arritmias. Porcentaje de células con eventos proarrítmicos registrados. Encima de cada barra se muestra el número de células con eventos proarrítmicos respecto del número total de células analizadas (***) $p \leq 0,001$.

A continuación, se estimó la carga de Ca^{2+} del RS para comprobar si el incremento de amplitud del transitorio de Ca^{2+} observado en las líneas de FRDA se debía a un aumento en el contenido de Ca^{2+} del RS (**figura 27**). Para ello, se aplicó a los iPSC-CM estimulados a 1 Hz una solución de cafeína 10 mM. La cafeína provoca la apertura del RyR, manteniéndolo en un estado abierto, lo que permite que el RS se vacíe de su contenido en Ca^{2+} (Cheng, Lederer, and Cannell 1993). No se observaron diferencias significativas en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} evocado por la cafeína, lo que indica que no hay diferencias en la carga de Ca^{2+} del RS. Tampoco se observaron diferencias significativas en el porcentaje de liberación fraccionada, que se calculó dividiendo la amplitud del transitorio de Ca^{2+} provocado por la estimulación entre la amplitud del transitorio evocado por la cafeína, lo que indica que, respecto al contenido de

RESULTADOS

Ca^{2+} total del RS, no hay diferencias en la cantidad de Ca^{2+} que se libera tras cada estímulo.

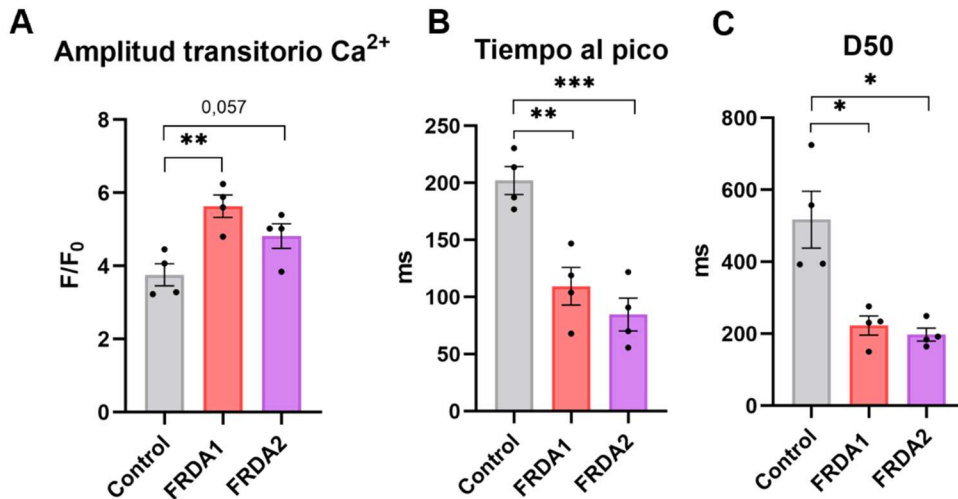


Figura 26 | Los iPSC-CM de FRDA muestran un incremento en la amplitud del transitorio y en la velocidad del flujo de Ca^{2+} intracelular. **A) Amplitud del transitorio de Ca^{2+} intracelular representado como el valor máximo de fluorescencia (F)/fluorescencia basal (F_0) en iPSC-CM estimulados a 1 Hz. **B)** Tiempo que tarda el transitorio de Ca^{2+} en alcanzar el pico máximo (ms). **C)** D50 o *time to half decay* (ms), que mide el tiempo que tardan en reducirse los niveles de Ca^{2+} en un 50% desde el pico. (N=4 experimentos de diferenciación independientes, n>60 células por grupo, *p≤0,05; **p≤0,01; *** p≤0,001).**

Por otra parte, en los transitorios de Ca^{2+} evocados por la cafeína, se midió la constante de tiempo de caída de Ca^{2+} (τ : Tau) (**figura 27**). En este contexto, dado que los canales RyR están abiertos por la aplicación de cafeína permitiendo la salida de Ca^{2+} del RS, la contribución de SERCA a la disminución de los niveles de Ca^{2+} intracelular puede despreciarse. De esta forma, la constante de tiempo de caída de Ca^{2+} tras la aplicación de cafeína aporta información sobre la extrusión de Ca^{2+} al exterior celular. Las líneas de FRDA presentan una reducción significativa de este parámetro con respecto a los iPSC-CM control, lo que indica que la extrusión de Ca^{2+} fuera de la célula, producida principalmente por NCX, es más rápida en los iPSC-CM deficientes en frataxina.

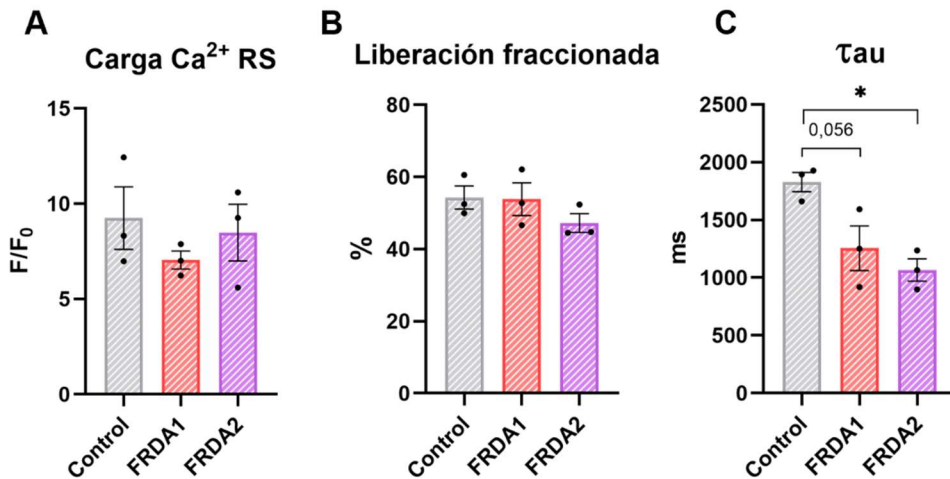


Figura 27 | Los iPSC-CM de FRDA no presentan diferencias con el control en la carga de Ca^{2+} del RS, aunque sí muestran un incremento en la actividad de NCX. A) Amplitud del transitorio de Ca^{2+} evocado por la rápida aplicación de cafeína (10 mmol/L) (F) durante la estimulación eléctrica a 1 Hz, normalizado a la fluorescencia en reposo (F_0). **B)** Liberación fraccionada, calculado como el pico F/F_0 evocado por la estimulación a 1 Hz normalizado por el pico F/F_0 evocado por la cafeína. **C)** Constante de tiempo de caída de Ca^{2+} (τ) (ms), obtenida ajustando la porción descendente del transitorio a una función exponencial simple (N=3 experimentos de diferenciación independientes, n>15 células, *p<0,05).

Por tanto, existe una alteración en la homeostasis del Ca^{2+} en los iPSC-CM de FRDA, que se caracteriza principalmente por un incremento en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} , que no se acompaña del aumento de Ca^{2+} almacenado en el RS; y una disminución tanto en el tiempo que se tarda en alcanzar en pico como en la recaptación y/o extrusión del Ca^{2+} .

10 Las mitocondrias de los iPSC-CM de FRDA muestran una morfología alargada y una pérdida de la estructura de las crestas mitocondriales

La producción de energía por la mitocondria es clave para el correcto funcionamiento de la contracción, dada la necesidad energética de este proceso celular. Además, debido a la relevancia de la mitocondria en la patología de la FRDA, se decidió comprobar el estado y la ultraestructura de las mitocondrias del modelo de iPSC-CM mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM). En primer lugar, se observó que los iPSC-CM de FRDA presentan una proliferación de mitocondrias que, en general, mostraban una morfología más alargada en comparación con las mitocondrias de la línea control (**figura 28**).

RESULTADOS

Para comprobarlo, se realizó un análisis morfométrico donde se cuantificó el área de las mitocondrias, la longitud y la circularidad (**figura 29**). Los resultados mostraron que las mitocondrias de los iPSC-CM de FRDA no presentan diferencias en el área con respecto a la línea control. Sin embargo, ambas líneas presentan un incremento en la longitud de las mitocondrias. Por su parte, en la cuantificación de la circularidad, que marca la esfericidad de las mitocondrias, se observó que las mitocondrias iPSC-CM de FRDA muestran una reducción de este parámetro con respecto al control. Circularidades cercanas a 1 indican una esfera perfecta, mientras que los valores más próximos a 0 indican mitocondrias más alargadas. Por tanto, las mitocondrias de los iPSC-CM de FRDA, aunque no muestran diferencias en el área, presentarían una longitud mayor y una menor circularidad, lo que indica una morfología más alargada. Los cambios en la morfología sugieren alteraciones en los procesos de fisión-fusión mitocondrial, en concreto, el incremento de la fusión mitocondrial podría tener como consecuencia un alargamiento de la morfología mitocondrial. En las líneas de FRDA se aprecia también una pérdida de la estructura de las crestas mitocondriales, que no aparecen tan definidas como en la línea control, lo que podría afectar a la producción de ATP, entre otros procesos metabólicos (Cogliati, Enriquez, and Scorrano 2016).

Por su parte, en la línea control se advierte la presencia de acúmulos electrodensos, que se corresponden con depósitos de Ca^{2+} mitocondrial. En contraste, la línea FRDA1 presenta un menor número de estos depósitos, mientras que en la línea FRDA2 se encuentran prácticamente ausentes. Estas observaciones podrían evidenciar alteraciones en la entrada de Ca^{2+} por parte de la mitocondria, lo que podría afectar a la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y al metabolismo mitocondrial. Además, en la mitocondria, el Ca^{2+} actúa como un segundo mensajero que permite acoplar la producción de ATP necesario para la contracción a la demanda energética del cardiomiocito (Dedkova and Blatter 2013), por lo que este proceso podría verse afectado ante un fallo en la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial. En la línea FRDA2 se observó la presencia de gotas lipídicas, que no estaban presentes en las otras líneas, sugiriendo

alteraciones en el metabolismo de los lípidos en la línea FRDA2.

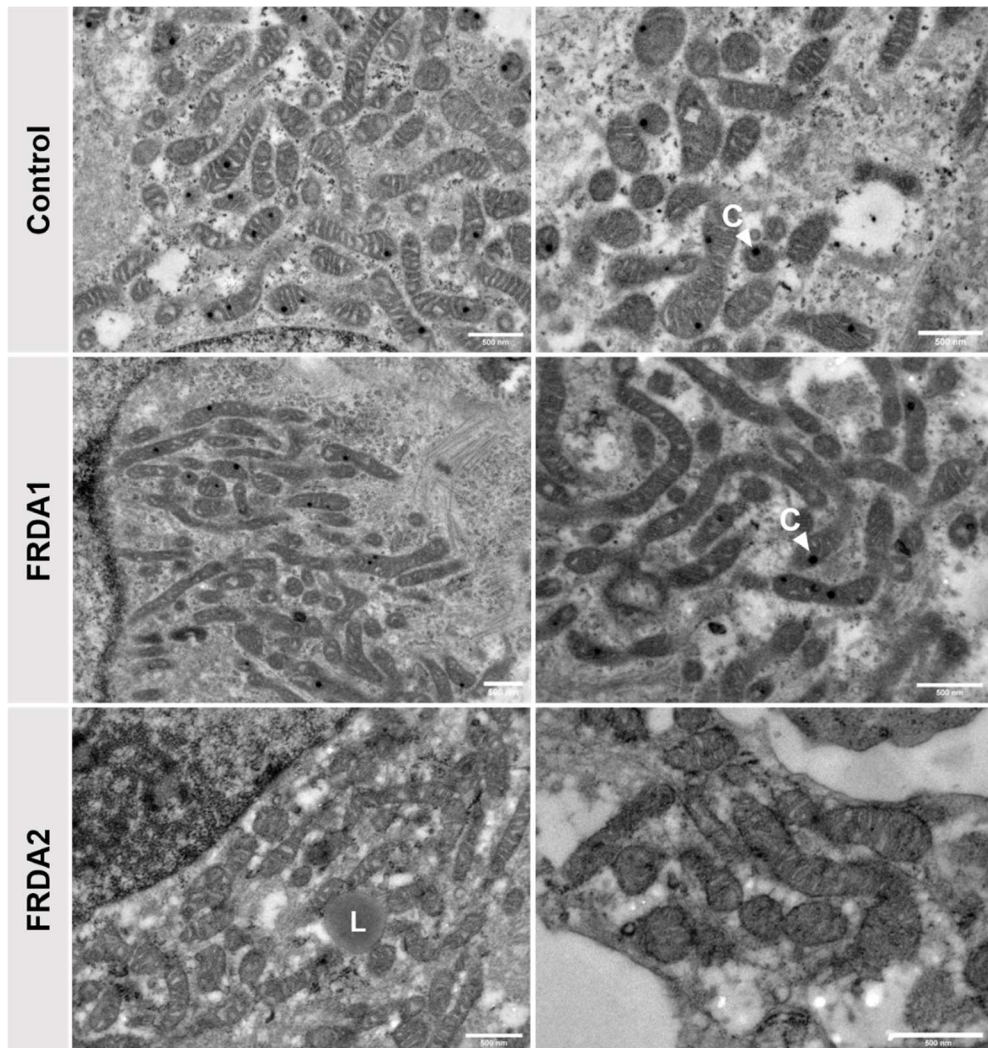


Figura 28 | Las mitocondrias de los iPSC-CM de FRDA presentan alteraciones en la morfología y una pérdida de la estructura de las crestas. Imágenes de la ultraestructura de los iPSC-CM tomadas mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM). Se observan depósitos de Ca^{2+} mitocondrial (C) en la línea control, que están prácticamente ausentes en los iPSC-CM de FRDA. La línea FRDA2 presenta acúmulos lipídicos (L). Barra de escala: 500 nm.

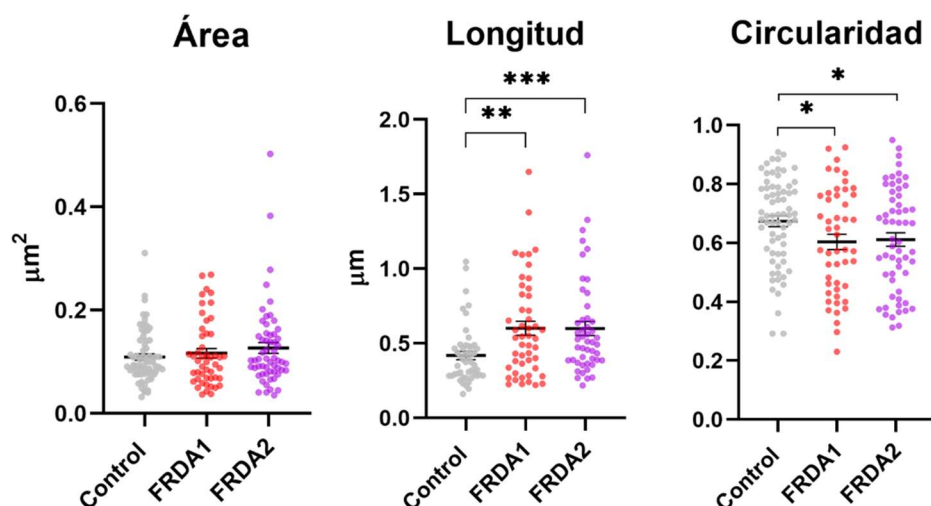


Figura 29 | Las mitocondrias de los iPSC-CM de FRDA presentan una morfología más alargada que el control, aunque no muestran diferencias en el área mitocondrial. Análisis morfométrico de las imágenes obtenidas en el TEM, donde se incluyen los resultados del área de las mitocondrias, la longitud y la circularidad (n=50 mitocondrias, * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

11 Los iPSC-CM de FRDA presentan anomalías en la estructura del sarcómero

La cardiomiopatía hipertrófica de la FRDA se ha asociado típicamente con la proliferación de mitocondrias anormales, más que con una alteración en las proteínas contráctiles. No obstante, considerando que la disfunción en la capacidad contráctil a menudo está vinculada a cambios homeostasis del Ca^{2+} intracelular (Knollmann and Roden 2008), los cuales se han evidenciado en este modelo, se planteó el estudio de la estructura del sarcómero, la unidad contráctil del cardiomiocito.

Para ello, se marcaron los iPSC-CM con un anticuerpo frente a la proteína α -actinina (tabla 5), que se localiza en la línea Z del sarcómero. Se observó que los CM de la línea FRDA2 presentaban una pérdida de la estructura del sarcómero (figura 30A), permaneciendo la estructura reconocible sólo en unos pocos filamentos, aunque esto no se observó en la línea FRDA1. Utilizando el

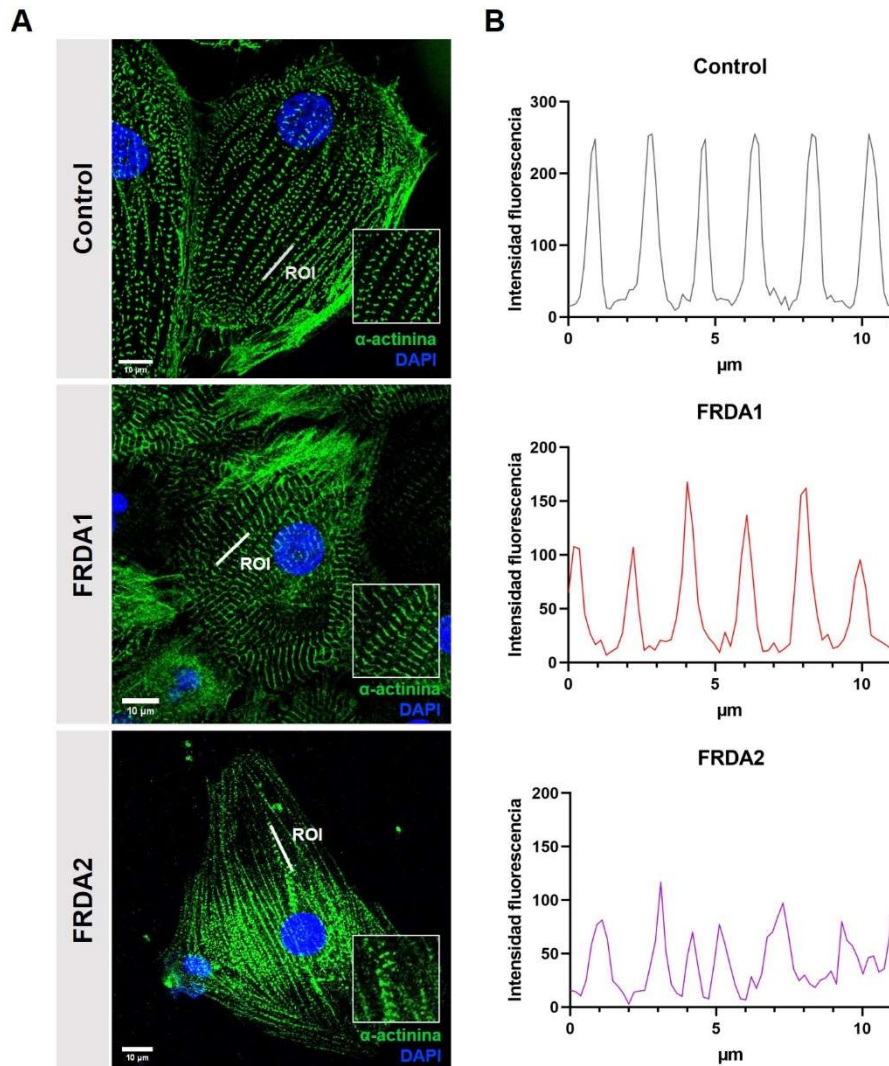


Figura 30 | Los iPSC-CM de la línea FRDA2 presentan una pérdida de la estructura del sarcómero. A) Inmunofluorescencia contra la proteína α -actinina (verde), que se localiza en la línea Z del sarcómero, marcando los límites entre unidades contráctiles. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). **B)** Gráficos representativos de la intensidad de fluorescencia (u.a.) del anticuerpo α -actinina a lo largo del ROI de 10 μ m que atraviesa el sarcómero de manera transversal, y que se indica en las figuras de la izquierda. La distancia entre dos picos consecutivos representa la longitud de un sarcómero. Barra de escala: 10 μ m.

RESULTADOS

inmunomarcaje de α -actinina, se cuantificó también la longitud del sarcómero como una medida indirecta de la contracción de los iPSC-CM. Lo primero que se observó fue que, tanto en la línea control como en la línea FRDA1, la longitud de los sarcómeros analizados era uniforme (**figura 30B**). Sin embargo, la línea FRDA2 presentaba una heterogeneidad en la longitud de los pocos sarcómeros que pudieron ser identificados, lo que indica que existe una alteración estructural en las unidades contráctiles de esta línea. Los resultados de la cuantificación mostraron que ambas líneas de iPSC-CM de la enfermedad presentaban una tendencia al acortamiento del sarcómero respecto a la línea control, aunque estas diferencias no eran significativas (**figura 31**). El acortamiento sarcomérico sugiere que los iPSC-CM de FRDA se encuentran en un estado más contraído que la línea control, lo que puede afectar a la correcta función contráctil.

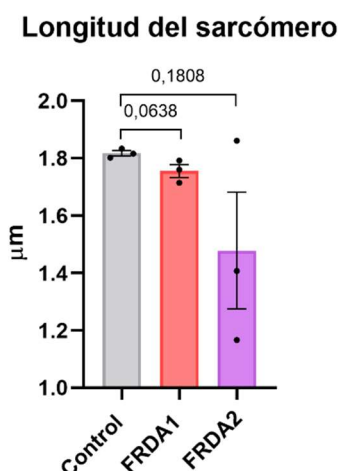


Figura 31 | Los iPSC-CM de FRDA muestran una tendencia al acortamiento del sarcómero. Cuantificación de la longitud del sarcómero a partir de los datos extraídos del inmunomarcaje con α -actinina. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SEM. En el gráfico aparece el p-valor de la comparativa de cada línea de FRDA respecto al control. (N=3 experimentos de diferenciación independientes, n=18 células por línea. En cada célula se analizaron 3 ROI de 10 μ m).

12 Cofilina-2 como biomarcador de alteraciones de afectación cardíaca en la FRDA

Como se ha comentado anteriormente, la cofilina 2 (CFL2) es una proteína del citoesqueleto encargada de despolimerizar filamentos de F-actina, entre otras funciones. Esta proteína se ha relacionado con la patología de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Huntington, y también está implicada en el desarrollo de cardiomiopatías (Subramanian et al. 2015). Además, su expresión se encuentra alterada en los iPSC-CM de FRDA (**figura 19**), por lo que se decidió medir los niveles de CFL2 en muestras de plasma de pacientes de FRDA. En concreto, se seleccionaron 15 pacientes con FRDA de diferentes edades, y 15 voluntarios sanos que fueron emparejados por raza, edad y sexo con los pacientes de FRDA del estudio. Los datos clínicos de los pacientes aparecen en la **tabla 3** de Materiales y Métodos. Tras la extracción de plasma y la medición de los niveles de CFL2 por ELISA, se analizaron los resultados.

El primer paso fue calcular la concentración de proteína de las muestras a partir de los resultados de la curva patrón. Sin embargo, se observó que la mayoría de las muestras, en concreto todas las muestras de controles y algunas de las muestras de pacientes, presentaban unos valores inferiores al punto más bajo de la curva, por lo que no pudieron obtenerse datos cuantitativos relativos a la concentración de proteína. Esto nos indicó que la concentración de CFL2 en plasma debe estar por debajo del rango del kit ELISA utilizado (15,625-1000pg/ml). Por ello, se decidió realizar los análisis con los datos crudos de absorbancia medida a 450 nm (OD450).

Por una parte, se observaron diferencias significativas en los niveles de CFL2 entre pacientes de FRDA y controles sanos. Concretamente, la CFL2 es más abundante en el plasma de los pacientes que en el de los controles. En la **figura 32A**, se muestran los resultados expresados como porcentaje de CFL2 frente al control. Para corroborarlo, se realizó un *Western blot* con plasma de 3 controles y 4 pacientes obteniéndose los mismos resultados (**figura 32B**)

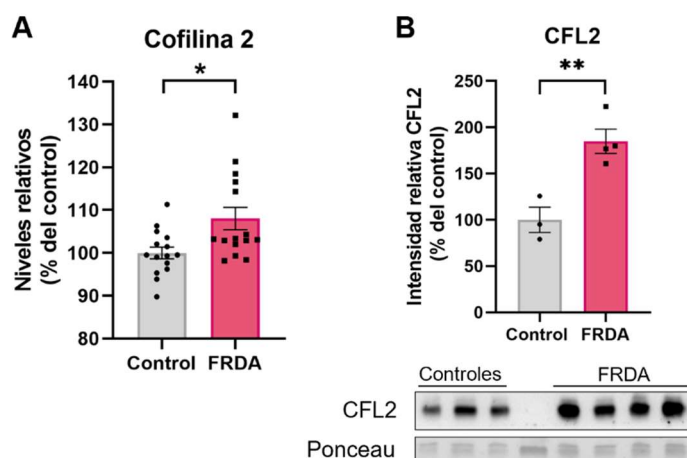


Figura 32 | La cofilina 2 (CFL2) es más abundante en el plasma de pacientes con FRDA que en el de controles sanos. Niveles relativos de cofilina 2 en plasma de pacientes con respecto a controles sanos medidos por ELISA (A) y por Western blot (B). Los resultados del Western blot se cuantificaron por densitometría. La intensidad de señal fue normalizada frente a la tinción de Ponceau. Los resultados se expresan como la media±SEM. Significancia: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

El siguiente paso fue comprobar si los niveles de CFL2 dependían de alguna de las características clínicas de los pacientes, recogidas por el Servicio de Neurología del Hospital La Fe de Valencia. Se realizó un test de correlación de *Pearson* entre la edad y la CFL2 y se observó que había una correlación negativa (r de *Pearson* = -0,549) significativa entre ambos parámetros. Es decir, a mayor edad de los pacientes, menor nivel de CFL2 en plasma. Estos resultados, no se observaron en los controles sanos, donde el coeficiente de correlación de *Pearson* era prácticamente 0 ($r = 0,014$). Para definir la relación entre la CFL2 y la edad en el caso de los pacientes de FRDA, se llevó a cabo una regresión lineal obteniéndose la ecuación que mejor describe la dispersión de los datos ($y = -0,0003006X + 0,08223$, $R^2 = 0,302$). Por tanto, los niveles de CFL2 en plasma disminuyen con la edad en el caso de pacientes con FRDA, pero no en el caso de los controles sanos (figura 33).

Por otra parte, se segregaron los pacientes según su sexo y si el tipo de herencia era considerado familiar, es decir, si se habían diagnosticado más

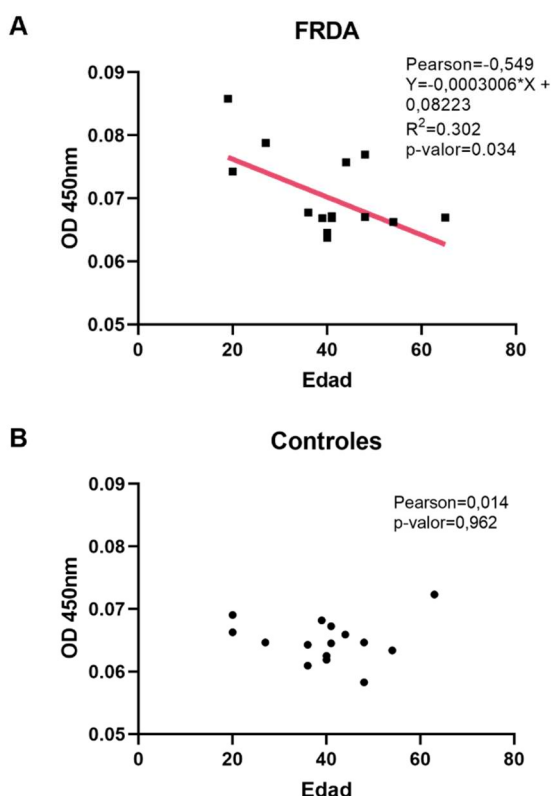


Figura 33 | Los niveles de CFL2 se correlacionan inversamente con la edad en el caso de los pacientes (A), pero no en el caso de los controles (B). Los niveles de CFL2 se muestran como la absorbancia medida a 450 nm. La correlación se estableció mediante el coeficiente de correlación de Pearson. **A)** Existe una tendencia descendente significativa que indica una asociación negativa entre la edad de los pacientes y los niveles de CFL2 en plasma. Coeficiente de correlación de Pearson (r)=-0549. $p\text{-valor}=0,034$ Se ajustó una regresión lineal a los datos, siendo la ecuación que mejor se ajusta a ellos: $y = -0,0003006X + 0,08223$, $R^2 = 0,3017$. **B)** Ausencia de correlación entre la edad de los pacientes y los niveles de proteína. $r = 0,014$, $p\text{-valor} = 0,9616$. Se consideraron significativas las correlaciones cuyo $p\text{-valor} \leq 0,05$.

casos de FRDA en la familia, o esporádico, y se observó si había diferencias en los niveles de CFL2 entre cada uno de los grupos (mujer vs hombre; familiar vs esporádico). En este caso, no se observaron diferencias significativas entre pacientes hombres y mujeres, ni tampoco entre los casos familiares comparados con los esporádicos, lo que indica que los niveles de CFL2 no dependen del sexo de los pacientes ni del tipo de herencia (figura 34).

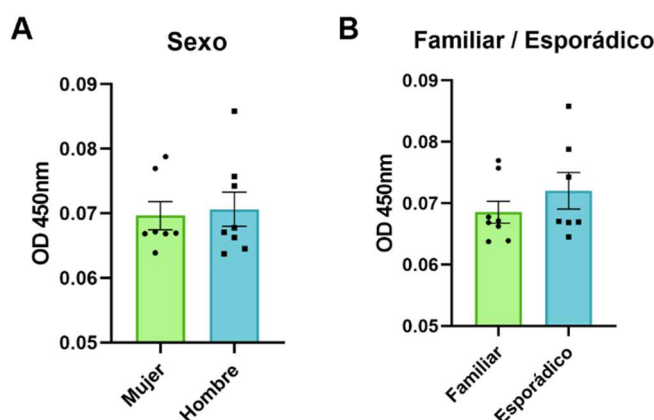


Figura 34 | Los niveles de CFL2 no dependen del sexo de los pacientes ni del tipo de herencia. A) Comparativa de los niveles de CFL2 (medidos como absorbancia a 450 nm) según el sexo de los pacientes (mujer vs hombre). **B)** Comparativa de los niveles de CFL2 según si la enfermedad fue considerada familiar o esporádica. No se observaron diferencias significativas en ninguna de las comparativas (p -valor $<0,05$). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM.

Se operó de la misma forma con las comorbilidades presentes en la FRDA de las que se tenían registros (cardiomiopatía hipertrófica, diabetes y escoliosis), segregando a los pacientes en función de si presentaban cada una de estas comorbilidades o no. No se observaron diferencias significativas en ninguna de las 3 comparativas, aunque en el caso de la cardiomiopatía hipertrófica se observó una tendencia al incremento en los niveles de CFL2 en el caso de los pacientes que presentaban esta condición con respecto a los que no (figura 35).

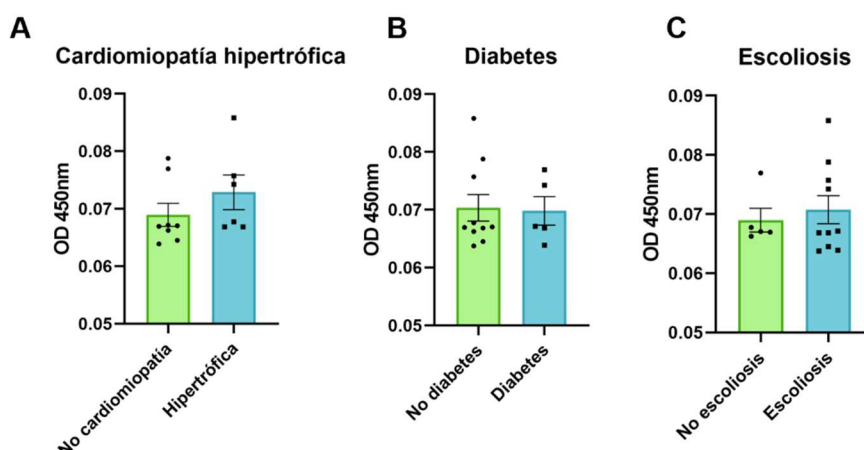


Figura 35 | Homogeneidad en los niveles de CFL2 según distintas comorbilidades (cardiopatía hipertrófica, diabetes y escoliosis). Comparativa de los niveles de CFL2 según si los pacientes padecían o no cardiopatía hipertrófica (A), diabetes (B), o escoliosis (C). No se observaron diferencias significativas en ninguna de las comparativas (p -valor $<0,05$). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM.

Entre los parámetros recogidos por el hospital, se contaba también con el dato de si los pacientes presentaban alteraciones en el ECG, en concreto, cambios en el segmento ST o en la onda T, por lo que se decidió, en función de los resultados obtenidos, comparar los niveles de CFL2 entre los pacientes que mostraban esta alteración y los que no presentaban cambios en el ECG (figura 36). En este caso, aunque el p -valor se encuentra rozando la significancia estadística ($p=0,07$), parece que existe una tendencia a un incremento en los niveles de CFL2 en los pacientes con ECG alterado respecto a los que no. Teniendo en cuenta este resultado, se realizó un análisis ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para examinar el potencial uso de CFL2 como biomarcador de alteraciones en el segmento ST/T del electrocardiograma en pacientes con FRDA. Para un valor óptimo de corte de OD450 superior a 0,0675, se obtuvo un área bajo la curva (AUC) de 0,79 y se calcularon los valores de sensibilidad y especificidad. La sensibilidad de la CFL2 como indicador de alteraciones en el ECG se encuentra en el 62,5%, lo que se considera aceptable, y la especificidad en el 100%, es decir, muy alta. Los resultados apuntan a la necesidad de incrementar el tamaño muestral si bien, teniendo en cuenta que el tamaño de muestra es pequeño y que la naturaleza de los datos (muestras

RESULTADOS

humanas) es variable, la CFL2 podría ser estudiado como un posible biomarcador de la cardiomiopatía subyacente a la FRDA.

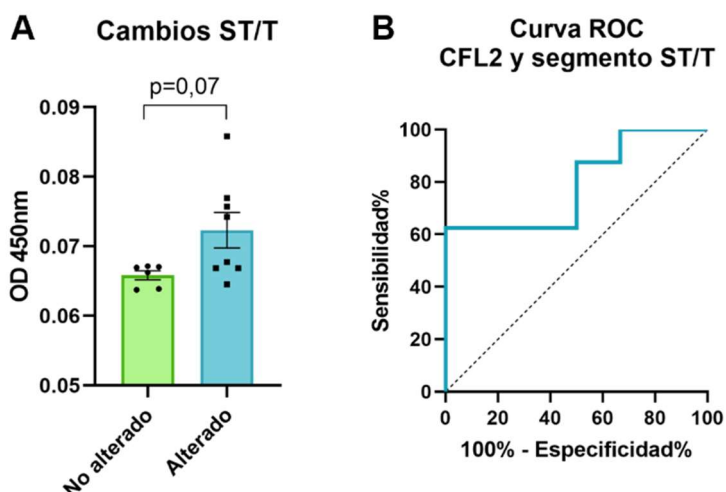
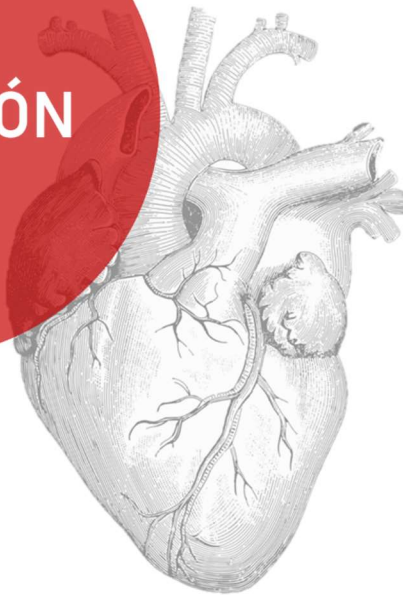


Figura 36 | Los niveles de CFL2 pueden indicar alteraciones en el segmento ST/T del electrocardiograma en pacientes con FRDA. A) Niveles de CFL2 en pacientes de FRDA sin alteraciones en el ECG comparado con aquellos con alteraciones en el segmento ST/T. No se observan diferencias significativas entre ambos grupos, aunque sí una tendencia al incremento de CFL2 en pacientes con alteraciones en el ECG. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. **B)** Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para examinar el potencial uso de CFL2 como indicador de alteraciones en el segmento ST/T. Valor de corte: 0,0675. Área bajo la curva: 0,79. Sensibilidad: 62,5%. Especificidad: 100%.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

El descubrimiento del defecto genético subyacente a la ataxia de Friedreich en 1996 (Campuzano et al. 1996) propició el desarrollo de modelos que permitieran el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la FRDA. Sin embargo, los modelos murinos no recapitulaban correctamente las características fenotípicas de la enfermedad. En 2011, Liu et al. desarrollaron por primera vez cardiomiocitos y neuronas derivados de iPSC de pacientes con FRDA (Liu et al. 2011). Desde entonces, se han realizado varios estudios basados en la caracterización de este modelo para comprender la fisiopatología de la FRDA y el papel de frataxina. No obstante, los estudios llevados a cabo en iPSC-CM son muy limitados en comparación con el estudio de los modelos neuronales, por lo que la patología cardíaca en la FRDA permanece poco estudiada, existiendo controversia sobre la afectación de procesos moleculares clave como la homeostasis del Ca^{2+} (Payne 2022). En este sentido, en el presente trabajo se han obtenido dos líneas de iPSC-CM derivados de iPSC de dos pacientes de FRDA con diferente nivel de afectación y se ha llevado a cabo, por primera vez, una profunda caracterización que incluye el estudio del latido cardíaco, el potencial de acción de los cardiomiocitos, el acoplamiento entre la excitación y la contracción, la unidad contráctil (sarcómero) y la estructura mitocondrial. El estudio de estos procesos ha permitido señalar fallos moleculares que se espera que aporten luz sobre la comprensión del mecanismo fisiopatológico global cardíaco. Además, se ha identificado la proteína cofilina-2 como biomarcador de alteraciones cardíacas en el electrocardiograma, lo cual podría contribuir al diagnóstico de la enfermedad.

1 Modelando cardiomiopatías con iPSC-CM

Los iPSC-CM son un modelo celular relativamente nuevo que fue descrito por primera vez en 2009 (J. Zhang et al. 2009). Desde entonces, se han utilizado iPSC-CM de pacientes para modelar multitud de cardiomiopatías *in vitro*, entre otras alteraciones cardíacas (Lan et al. 2013; Tanaka et al. 2024). Los protocolos de diferenciación pasan por la generación del mesodermo cardíaco y,

finalmente, de los cardiomiocitos a través de la adición de factores de señalización específicos en cada etapa, que simulan el desarrollo embrionario. Una de las principales limitaciones de los iPSC-CM es su relativa inmadurez, ya que su fisiología se asemeja más a la de cardiomiocitos fetales que a la de cardiomiocitos adultos (X. Yang, Pabon, and Murry 2014). De esta forma, los iPSC-CM presentan una menor organización del sarcómero, latido espontáneo, contractilidad reducida y un metabolismo basado principalmente en la glicólisis, en contraste con el metabolismo basado en la oxidación de ácidos grasos del corazón maduro (Guo and Pu 2020). Además, presentan una expresión reducida de proteínas implicadas en la homeostasis del Ca^{2+} , como SERCA2, RyR o fosfolambano, y una ausencia de túbulos T, lo que provoca que se incremente la distancia entre los canales de tipo L de la membrana y el RyR, resultando en una menor liberación de Ca^{2+} por parte del RS, lo que induce una mayor dependencia del flujo de Ca^{2+} que entra por los canales de tipo L para que se produzca la contracción. Adicionalmente, existe una falta de desarrollo de la ultraestructura y, con ello, de la relación entre RS y mitocondria, lo que resulta en un acoplamiento reducido entre la contracción y la producción de energía (X.-H. Zhang and Morad 2016).

En los últimos años, se han desarrollado diferentes estrategias para promover la maduración de los iPSC-CM, como el cultivo de los iPSC-CM a largo plazo, la maduración metabólica por adición de ácidos grasos al cultivo, la estimulación eléctrica, el cultivo en 3D o la maduración bioquímica. En este trabajo, se utilizaron dos estrategias dentro de la maduración bioquímica. Por una parte, la adición al medio de cultivo del compuesto Torin1 que, mediante la inhibición de la ruta mTOR, promueve la quiescencia de los iPSC-CM y su maduración. Se ha descrito que la maduración por Torin1 incrementa significativamente la expresión de proteínas del sarcómero y canales iónicos, además de incrementar la fuerza de contracción de los iPSC-CM y la ratio de consumo de oxígeno (Garbern et al. 2020). Por otra parte, para los estudios del potencial de acción y el Ca^{2+} intracelular se utilizó la maduración por adición de hormonas tiroideas (T3) y glucocorticoides (dexametasona), ya que en la

literatura es el método de maduración más empleado para estudios electrofisiológicos (L. Wang et al. 2021). Esto se debe a que el tratamiento con ambas hormonas resulta en un incremento de la fuerza contráctil, un aumento de expresión de proteínas implicadas en la homeostasis del Ca^{2+} , como SERCA2, fosfolambano y NCX, y un incremento en la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} , con una mayor contribución de la salida de Ca^{2+} del RS a los niveles de Ca^{2+} citosólico (Parikh et al. 2017; X. Yang et al. 2014).

No obstante, a pesar de los cambios producidos por el proceso de maduración, los iPSC-CM distan de exhibir todas las características de los cardiomiocitos adultos. Por citar un ejemplo, sigue sin conseguirse que presenten la estructura de los túbulos T que se observa en las células cardíacas maduras. Existe una serie de características distintivas que permiten comprobar la madurez de los iPSC-CM. Una de ellas es la expresión de *MYL2*, que codifica la cadena ligera reguladora de miosina 2, y que es un marcador de ventrículo maduro (Guo and Pu 2020). La expresión de *MYL2* en nuestro modelo confirma cierto grado de madurez de los iPSC-CM obtenidos, aunque es necesario profundizar más en este aspecto para conocer el nivel de madurez exacto del modelo. Este punto no es una cuestión trivial puesto que la interpretación de los resultados, que pueden ser posteriormente utilizados para el desarrollo de futuros fármacos, depende de la fisiología del modelo. Además, la FRDA es una enfermedad degenerativa cuyos síntomas aparecen en la infancia y se agravan progresivamente, por lo que el uso de cardiomiocitos inmaduros limita la capacidad del modelo de recapitular el fenotipo de la enfermedad (Maheshwari, Vilema-Enríquez, and Wade-Martins 2023). Un ejemplo de esto podría ser el experimento de monitorización del latido cardíaco, donde no se observaron diferencias entre las líneas de FRDA y la línea control en ninguno de los parámetros medidos hasta que no comenzó la maduración de los iPSC-CM (**figura 22**). Por tanto, es necesario continuar investigando para obtener iPSC-CM que reúnan las características de los cardiomiocitos adultos.

En la FRDA existe una asociación entre el tamaño de la expansión del

triplete GAA y la gravedad de la patología cardíaca, aunque el fenotipo puede ser variable incluso entre individuos con el mismo tamaño de expansión (Payne 2022; Rajagopalan et al. 2010). En nuestro caso, contábamos con dos líneas de iPSC procedentes de pacientes con diferente número de repeticiones del triplete. La línea FRDA1 contaba con 650 repeticiones en un alelo y 719 en el otro, mientras que la línea FRDA2 presentaba 870 repeticiones en un alelo y 1470 en el otro. Atendiéndose a los resultados, se puede observar que los iPSC-CM procedentes de la línea FRDA2, es decir, la que presenta un mayor tamaño de la expansión, presentan un fenotipo más acusado. Los iPSC-CM obtenidos a partir de esta línea muestran un mayor porcentaje de células arrítmicas (**figura 25**), una pérdida de la estructura del sarcómero (**figura 30**) y la aparición de gotas lipídicas en el análisis de la ultraestructura por TEM (**figura 28**), así como una ralentización en el crecimiento de las propias iPSC de partida, lo que concuerda con lo observado en otros modelos celulares procedentes de pacientes (Willers et al. 1991). Por otra parte, como control, se utilizaron células procedentes de una persona sana de similar edad y sexo a la de las pacientes de FRDA de las que se obtuvieron las líneas FRDA1 y FRDA2. Sin embargo, con el objetivo de eliminar la variabilidad inter-individuos y confirmar los resultados, resultaría conveniente desarrollar líneas isogénicas que puedan ser utilizadas como control. Esto puede conseguirse eliminando la expansión de las iPSC de FRDA mediante edición génica, de manera que se recuperen los niveles de expresión de frataxina.

2 Papel del Ca^{2+} en la disfunción cardíaca de la FRDA

La homeostasis del Ca^{2+} en el cardiomiocito se debe a la función combinada de las vías de entrada y salida de Ca^{2+} a través de la membrana, que son influenciadas por el potencial de membrana, y a la captación y liberación de Ca^{2+} dentro de la célula, principalmente por el RS. Cualquier cambio en el equilibrio del Ca^{2+} puede provocar importantes fallos en la contracción y relajación del corazón, lo que podría llevar al fallo cardíaco (Abeti et al. 2018). En este trabajo, se ha demostrado que existe una alteración en la homeostasis del Ca^{2+}

intracelular en los cardiomiocitos de FRDA. En primer lugar, se ha observado un incremento en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} intracelular en iPSC-CM estimulados a 1 Hz, lo que indica que se produce o bien una mayor entrada de Ca^{2+} al citosol por los canales dependientes de voltaje de la membrana y/o bien una mayor salida de Ca^{2+} desde el RS (**figura 26**). Para comprobar si existían diferencias en la carga de Ca^{2+} del RS, lo que podría suponer una mayor salida de Ca^{2+} al citosol desde este compartimento, se añadió a los iPSC-CM un rápido estímulo de cafeína. La cafeína provoca la apertura del RyR y el vaciado de Ca^{2+} del RS. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} evocado por la cafeína, ni tampoco en el porcentaje de liberación fraccionada, es decir, en la cantidad de Ca^{2+} que sale al citosol tras cada estímulo desde el RS respecto al contenido de Ca^{2+} total (**figura 27**), por lo que se concluyó que el incremento en la amplitud de Ca^{2+} intracelular observado en los iPSC-CM de FRDA estimulados a 1 Hz se debía a una mayor entrada de Ca^{2+} por los canales dependientes de voltaje de la membrana. En la bibliografía, se han descrito alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} en la FRDA, tanto en modelos neuronales (Mollá et al. 2017; Rodríguez et al. 2020) como en modelos cardiacos (Abeti et al. 2018; Crombie et al. 2017; Lee et al. 2016). Crombie et al. observaron en iPSC-CM derivados de pacientes de FRDA una menor amplitud de los transitorios de Ca^{2+} intracelular, acompañado de una reducción en el contenido de Ca^{2+} del retículo (Crombie et al. 2017). Estos resultados no concuerdan con lo observado en nuestro trabajo. Sin embargo, estos autores describieron que la nifedipina, un inhibidor de canales de Ca^{2+} de membrana dependientes de voltaje, conseguía revertir el fenotipo de los iPSC-CM, incluidas las arritmias observadas en el modelo. En ese contexto, era difícil explicar cómo bloquear la entrada de Ca^{2+} a la célula podía mejorar el fenotipo de unos iPSC-CM con niveles más bajos de Ca^{2+} citosólico que el control (Crombie et al. 2017). No obstante, atendiendo a nuestros resultados, los cuales apuntan al incremento de la entrada de Ca^{2+} por los canales que permiten la entrada de Ca^{2+} del exterior al interior celular como un posible mecanismo del fallo, parece coherente que la nifedipina actúe mejorando la homeostasis del Ca^{2+} y pueda

ser evaluada como un potencial agente terapéutico.

Entre las dianas de los miRNA sobreexpresados en los iPSC-CM de FRDA se encontraban *CACNA1C* y *CACNA1D* que codifican los canales de calcio de tipo L $\text{Ca}_v1.2$ y $\text{Ca}_v1.3$, respectivamente, mediando la entrada de Ca^{2+} en el cardiomiocito (**figura 21**). En los iPSC-CM de FRDA no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *CACNA1C*, aunque se observó una reducción en la expresión de *CACNA1D* en ambas líneas con respecto a la línea control. Sin embargo, se desconoce hasta qué punto la expresión de *CACNA1D* afecta a la entrada de Ca^{2+} en nuestro modelo, ya que la reducción en la expresión del gen no va acompañada de una disminución en la entrada de Ca^{2+} al interior celular (**figura 26**). Además, aunque *CACNA1C* se expresa de manera ubicua en todo el corazón, la expresión de *CACNA1D* se regula durante el desarrollo quedando limitada a la región supraventricular en el corazón adulto (Zaveri et al. 2023). La expresión de *CACNA1D* en el modelo de cardiomiocitos ventriculares podría deberse al fenotipo inmaduro de los mismos, lo que dificulta la comprensión del papel de este canal en la patogénesis de la enfermedad.

Por otra parte, se observó una sobreexpresión de *CALHM5*, que codifica el miembro 5 de la familia de moduladores de la homeostasis del Ca^{2+} , sobre todo, en los iPSC-CM procedentes de la línea FRDA1 (**figura 21**). La proteína codificada por *CALHM5* forma un poro en la membrana que permite el paso de iones Ca^{2+} al interior de la célula en respuesta a la despolarización y a bajas concentraciones de Ca^{2+} extracelular (Ma et al. 2016). La sobreexpresión de este canal podría provocar un incremento en la entrada de Ca^{2+} , pudiendo tener un papel en el aumento en la amplitud del transitorio evocado por la estimulación a 1 Hz, lo que supondría una posible explicación a los resultados obtenidos. Existe poca información sobre la función de esta proteína y menos aún sobre su papel en la patología cardíaca. Sin embargo, se ha mencionado que *CALHM5* podría ser una de las proteínas que media la hipertrofia cardíaca inducida por la sobrecarga de presión (Y. Zhang et al. 2021).

Por otra parte, la reducción del contenido de Ca^{2+} del retículo observada por

DISCUSIÓN

Crombie et al. fue confirmada también por Abeti et al. en una línea de cardiomiocitos HL-1 deficiente en frataxina, quienes sugirieron alteraciones en la función de la bomba SERCA2 como posible causa de la depleción del RS (Abeti et al. 2018). En nuestro modelo de iPSC-CM, se ha observado una reducción en la expresión del gen *ATP2A2*, que codifica SERCA2 (**figura 21**), lo que apoya que la reducción de SERCA2 podría estar implicada en las alteraciones de la homeostasis del Ca^{2+} . De hecho, recientemente, se ha descrito una reducción en la expresión de la proteína en muestras de ventrículo humano de pacientes con FRDA (Czornobil et al. 2023). Sin embargo, resulta difícil conciliar que, en nuestro modelo, la reducción en la expresión de ATP2A2 en las líneas de FRDA no suponga una disminución en la carga de Ca^{2+} del RS, estimada a partir de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} evocado por la cafeína (F/F_0). Una posible explicación es que los niveles basales de Ca^{2+} diastólico (F_0) sean diferentes entre líneas, lo que afectaría a la interpretación de los resultados. Al utilizar una sonda ratiométrica para llevar a cabo los experimentos, se mide el cambio en la concentración de Ca^{2+} intracelular, pero se desconocen los niveles de Ca^{2+} absolutos de la célula en reposo (F_0).

Por otro lado, se observó que el tiempo de caída de Ca^{2+} citosólico en los transitorios de FRDA era inferior al de los iPSC-CM control (**figura 26**). Esto implica que o bien la velocidad de recaptación del Ca^{2+} por el RS es superior y/o bien que la velocidad de extrusión al exterior celular es superior. Tras añadir el estímulo de cafeína a los iPSC-CM, se comprobó que seguía manteniéndose la caída del tiempo de Ca^{2+} citosólico en las líneas de FRDA (**figura 27**). En este contexto de adición de cafeína, el RS permanece abierto, por lo que no puede producirse la recaptación de Ca^{2+} por parte de este orgánulo. De esta forma, una reducción en el tiempo de caída de Ca^{2+} en los transitorios evocados por cafeína implican un incremento en la velocidad de extrusión de Ca^{2+} al exterior celular, lo que se produce, principalmente, por NCX. Este incremento en la actividad de NCX había sido hipotetizado por Abeti et al (Abeti et al. 2018). De hecho, el aumento de la actividad de NCX está asociado con la aparición de eventos proarrítmicos de tipo post-despolarización, es decir, de impulsos adicionales

que se desencadenan por un potencial de acción inicial (Kistamás et al. 2020; Varró et al. 2020). Estos eventos pueden clasificarse como tempranos (EAD, del inglés *Early AfterDepolarization*) si el nuevo potencial de acción interrumpe la repolarización, o tardíos (DAD, del inglés *Delayed AfterDepolarizations*) si ocurren durante la diástole después de que la repolarización se haya completado. En el estudio del potencial de acción, se observa que los eventos proarrítmicos de los iPSC-CM de FRDA son principalmente de tipo EAD (**figura 23**). Aunque el término “*early*” sugiere que las EAD deberían ocurrir temprano durante la repolarización, existe un tipo específico de EAD, llamadas de tipo 3, donde la nueva despolarización interrumpe la fase final de la repolarización, lo que se corresponde con lo observado en nuestros resultados. Este tipo de EAD comparte similitudes con las DAD (Kistamás et al. 2020). Como se ha mencionado anteriormente, el incremento de la actividad de NCX podría conducir a este tipo de arritmias. Durante la repolarización, por cada Ca^{2+} que sale de la célula por el NCX, entran a la célula 3 iones Na^+ . Esta acción genera una carga neta positiva en el interior de la célula. El incremento en la actividad de NCX conduce a una mayor salida de iones Ca^{2+} , lo que, a su vez puede facilitar que se produzca una nueva despolarización celular.

Por tanto, en el modelo de iPSC-CM de FRDA existe una disfunción en la homeostasis del Ca^{2+} , caracterizada, principalmente, por un incremento en los niveles de Ca^{2+} que entran a la célula tras cada estímulo y una extrusión acelerada del Ca^{2+} , lo que podría afectar a las propiedades electrofisiológicas del iPSC-CM desencadenando las arritmias y causando alteraciones en el latido.

3 Citoesqueleto y contracción en los iPSC-CM de FRDA

La estructura y longitud del sarcómero determinan la fuerza de contracción del cardiomiocito. En el caso de los iPSC-CM de la línea FRDA2 se aprecia una pérdida de la estructura de la unidad contráctil, quedando pocos sarcómeros identificables (**figura 30**). La disminución en el número de sarcómeros había sido descrita por otros autores en corazones de un modelo de ratón deficiente en frataxina (Hanson, 2019). Asimismo, al cuantificar la longitud del sarcómero,

DISCUSIÓN

se observó en ambas líneas una tendencia al acortamiento sarcomérico (**figura 31**). En la literatura se ha descrito que la longitud media de los sarcómeros de los iPSC-CM se sitúa en 1,84 μm (Lemcke et al. 2020), similar a la longitud de los sarcómeros de los iPSC-CM control de nuestro estudio (1,82 $\mu\text{m} \pm 0,009 \mu\text{m}$) y por encima de los iPSC-CM derivados de pacientes con FRDA (FRDA1: 1,76 $\mu\text{m} \pm 0,023 \mu\text{m}$; FRDA2: 1,478 $\mu\text{m} \pm 0,204 \mu\text{m}$). La disminución en la longitud del sarcómero supone un mayor solapamiento entre los filamentos de actina y miosina, lo que puede indicar un mayor estado de contracción de las fibras, aunque reducir la longitud del sarcómero por debajo de la longitud óptima puede limitar la capacidad de las fibras de generar la tensión máxima (Crocini and Gotthardt 2021). Por tanto, tanto la pérdida de la estructura del sarcómero como la reducción de su longitud podrían afectar a la capacidad de generar contracción.

Por su parte, la longitud del sarcómero también está relacionada con la afinidad de los miofilamentos al Ca^{2+} . A longitudes más largas del sarcómero, la titina ejerce fuerzas que reducen el espacio entre los filamentos de actina y miosina afectando a la unión del Ca^{2+} a los miofilamentos (Crocini and Gotthardt 2021). Las alteraciones en este proceso pueden estar implicadas en la patología cardíaca. De hecho, la cardiomiopatía hipertrófica se ha asociado con un incremento en la sensibilidad a los iones Ca^{2+} de los miofilamentos (Chung et al. 2016). Por tanto, resultaría interesante investigar si los cambios en la longitud del sarcómero en los iPSC-CM de FRDA evidencian alteraciones en la afinidad de los miofilamentos al Ca^{2+} como posible mecanismo patogénico. Además, en un paso más allá, podría estudiarse la relación de este proceso con las alteraciones en homeostasis del Ca^{2+} intracelular, ya que la célula, en un intento de compensar las variaciones en la afinidad del Ca^{2+} por los miofilamentos, podría regular la cantidad de Ca^{2+} para modular la contracción.

La estructura organizada del sarcómero depende del correcto ensamblaje de sus componentes durante el desarrollo y del posterior mantenimiento constante, debido a que su contracción continua está acompañada de un

elevado estrés mecánico, térmico y oxidativo, que predispone a las proteínas a un plegamiento incorrecto, dando lugar a un desorden estructural del sarcómero, que puede afectar a la función del corazón e inducir la patología cardíaca (Martin and Kirk 2020). Por tanto, la pérdida de la estructura del sarcómero observada en la línea FRDA2 puede deberse a alteraciones en alguna de las proteínas encargadas, o bien del ensamblaje, o bien del mantenimiento del sarcómero. En este sentido, la cofilina es una de las proteínas que se encarga de regular el mantenimiento de los filamentos delgados una vez formados. En concreto, la cofilina-2, que es la isoforma expresada en el músculo estriado, tanto esquelético como cardíaco, regula de manera dinámica la longitud de los filamentos de actina de los sarcómeros, uniéndose a ellos y promoviendo su desensamblaje, con lo que se liberan monómeros de actina que quedan libres para ensamblar nuevos filamentos (Kremneva et al. 2014). La reducción en los niveles de expresión de cofilina-2 se ha asociado con la afectación de la organización de los sarcómeros (Lin et al. 2021) y con miopatías (Agrawal et al. 2007; Ockeloen et al. 2012; Subramanian et al. 2015). En este trabajo, se observó que *CFL2*, el gen que codifica cofilina-2, era diana del miR-142-3p, que se encontraba sobreexpresado en ambas líneas de iPSC-CM de FRDA. Al cuantificar su expresión, se observó una disminución significativa en la expresión de *CFL2* en la línea FRDA2 (**figura 20**), siendo ésta la línea que presentaba una pérdida en la estructura del sarcómero. Además, *CFL2* se encuentra aguas abajo de la ruta regulada por *ARHGAP12* (Diring et al. 2019), el gen diana de tres de los miARN sobreexpresados en los iPSC-CM de FRDA (**figura 19**). La sobreexpresión de los miARN se esperaría que disminuyera la expresión del gen *ARHGAP12*, lo que podría activar la ruta Rho-ROCK-LIMK-CFL. Esta ruta desemboca en la fosforilación de cofilina provocando su inactivación, lo cual incrementa la estabilización de la F-actina (Deng et al. 2019; Kilian et al. 2021). Ya sea por una reducción en la expresión del gen *CFL2* o por un incremento de la forma inactiva, que habría que demostrar, cualquier alteración en la actividad de esta proteína impactaría en el proceso de la dinámica de la actina, afectando a la estructura del citoesqueleto. De hecho, ya

se ha demostrado en neuronas procedentes de DRG de un modelo de ratón deficiente en frataxina, que las alteraciones en los niveles de cofilina activa, es decir, no fosforilada, son responsables del incremento en la ratio entre F-actina y G-actina, provocando alteraciones en el cono de crecimiento neuronal (Muñoz-Lasso et al. 2020). Por otra parte, ARHGAP12, a través de Rho-ROCK, regula negativamente la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) (Deng et al. 2019). Una reducción en los niveles de ARHGAP12 incrementaría la fosforilación de MLC dejándola, en este caso, en su forma activa, lo cual supondría un aumento de la fosforilación de la miosina y, con ello, de la contractilidad. Con todo, ARHGAP12 podría ser un candidato interesante como mediador de las alteraciones en la estructura y función del citoesqueleto en la patología cardíaca en la FRDA. De hecho, esta ruta ha sido asociada con la patogénesis de la fibrosis y la hipertrofia cardíaca (Hartmann, Ridley, and Lutz 2015).

4 Función de frataxina en la patogénesis

Como se ha observado en el transcurso de esta tesis, son muchos los procesos moleculares y celulares alterados en la patología cardíaca de la FRDA, lo que complica conocer en su totalidad el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad. De hecho, existe una cuestión principal que permanece sin respuesta y es la función de la frataxina, lo que nos llevaría a poder explicar por qué su déficit afecta a tantos mecanismos celulares.

Por una parte, no resulta complicado ligar algunas de las alteraciones observadas a la función de frataxina como chaperona que permite el ensamblaje de centros Fe-S. La deficiencia de frataxina provoca el fallo en la formación de los centros Fe-S, que son necesarios para el correcto funcionamiento de multitud de enzimas de la cadena de transporte de electrones, de la enzima aconitasa y, como se ha descrito recientemente, para la formación de mitorribosomas (Ast et al. 2024). El fallo en estas funciones incrementa la susceptibilidad al estrés oxidativo en la FRDA que, además, está potenciado por la producción de ROS liderada por la acumulación de hierro. El

estrés oxidativo puede ser el causante de las alteraciones en las crestas mitocondriales observadas en el estudio de la ultraestructura mediante microscopía electrónica, que coincide con las alteraciones observadas por otros autores (Hick et al. 2013; Vyas et al. 2012). El fallo de las enzimas de la cadena de transporte de electrones y de la estructura de las crestas afectaría a la producción de energía necesaria para procesos que requieren ATP, como la homeostasis del Ca^{2+} o la contracción del cardiomiocito. La alteración en los procesos de fisión y fusión, que desemboca en una alteración morfológica de la mitocondria, y la proliferación mitocondrial podrían ser una consecuencia del intento de la célula por incrementar la capacidad mitocondrial y restaurar la bioenergética cardiaca, lo que ha sido hipotetizado por otros autores (Chiang et al. 2021).

El estrés oxidativo también puede afectar a la homeostasis del Ca^{2+} a través de la oxidación de los residuos de cisteína presentes en proteínas implicadas en el manejo del Ca^{2+} intracelular como RyR o SERCA2. En cardiomiocitos, se ha observado que la oxidación del RyR desencadena una ráfaga de eventos locales de liberación de Ca^{2+} desde el RS (*sparks*), que resultan en la inducción de arritmias (Prosser, Ward, and Lederer 2011). Además, se ha observado que la oxidación de los grupos tiol de SERCA2 impiden la unión del ATP a la bomba, disminuyendo su función. Asimismo, se ha descrito que el estrés oxidativo estimula la entrada de Ca^{2+} a través de canales de tipo L (Görlach et al. 2015), lo que podría explicar el incremento en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} observado en los iPSC-CM de FRDA. Por su parte, el estrés oxidativo también puede afectar a las proteínas contráctiles modificando su estructura, estabilidad o actividad. Por ejemplo, en cardiomiocitos, se ha asociado la adición de un grupo nitro (NO^-) a la α -actinina con cambios en la ultraestructura celular y defectos en la función contráctil (Borbély et al. 2005). Por tanto, teniendo en cuenta la bibliografía existente, parece plausible que algunas de las alteraciones observadas en la FRDA respondan a un incremento en el estrés oxidativo producido como consecuencia de la disminución de frataxina.

Por otra parte, la frataxina forma parte de las membranas del retículo asociadas a mitocondria (MAM). En otros modelos, se ha descrito que la ausencia de frataxina provoca una disminución en los contactos entre retículo y mitocondria, lo que limita la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria provocando un incorrecto tamponamiento del Ca^{2+} citosólico, lo cual podría revertirse tras el tratamiento con antioxidantes, sugiriendo también la participación del estrés oxidativo en este proceso (Rodríguez et al. 2020). Sin embargo, en el cardiomiocito, la capacidad de tamponar el Ca^{2+} por parte de la mitocondria es muy limitada, ya que se estima que la mitocondria toma menos del 1% del Ca^{2+} citosólico (Andrienko, Picht, and Bers 2009). No obstante, la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria desempeña una función fundamental al permitir acoplar la producción de ATP por parte de la mitocondria a las necesidades energéticas del momento, en lo que se conoce como acoplamiento metabolismo-contracción (Dedkova and Blatter 2013). Por ello, las alteraciones en el latido podrían también producirse por el desacoplamiento metabolismo-contracción mediado por la disminución en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria provocado por el déficit de frataxina.

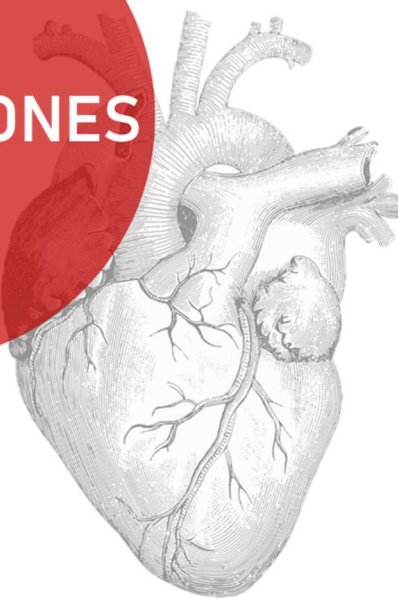
5 Cofilina-2 como biomarcador de cardiomiopatías

En esta tesis, se ha explorado el potencial uso de cofilina-2 como un biomarcador diagnóstico de la enfermedad o de alguna de sus comorbilidades. Los resultados mostraron que existe un incremento en los niveles de cofilina-2 en el plasma de pacientes de FRDA con respecto a los controles (**figura 32**) y que la cofilina-2 puede ser un biomarcador de alteraciones en el segmento ST/T del ECG con una especificidad muy alta (100%) y una sensibilidad aceptable (62,5%) (**figura 36**). Sin embargo, sería conveniente el análisis de las muestras mediante espectrometría de masas, en lugar del método actual mediante ELISA, dado que esto permitiría detectar concentraciones más bajas de proteína, pudiendo así calcular la concentración de cofilina-2 en sangre, y también ampliar el estudio a una cohorte más grande de pacientes.

Como se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado que la cofilina

contribuye a la neurodegeneración de la FRDA provocando alteraciones en el citoesqueleto (Muñoz-Lasso et al. 2020), además de estar implicada en otras enfermedades neurodegenerativas (Lapeña-Luzón et al. 2021) y cardíacas, donde podría estar formando parte de agregados proteicos que afectan a la contractilidad del cardiomiocito (Chatzifrangkeskou et al. 2018; Subramanian et al. 2015). En esta tesis, se ha descrito una reducción en los niveles de expresión del gen que codifica cofilina-2 en el modelo de iPSC-CM de FRDA (**figura 20**). Sin embargo, aunque parece existir una relación entre esta proteína y la patología cardíaca de la FRDA, queda mucho por descubrir acerca de su función en la patogénesis y en el motivo por el cual se incrementa su secreción al plasma en los pacientes. Una posible explicación puede derivarse de los resultados obtenidos, que muestran que los niveles de cofilina-2 disminuyen con la edad en los pacientes de FRDA, aunque esto no ocurre en el caso de los controles (**figura 33**). Esto nos lleva a pensar que la secreción de cofilina-2 al plasma podría ser la consecuencia de un mecanismo compensatorio en los pacientes que intentara contrarrestar los efectos del déficit de frataxina. Con la edad y el agravamiento de la patología, este mecanismo podría dejar de funcionar y, por tanto, cesaría la secreción de cofilina-2 a la sangre.

En conclusión, la identificación de cofilina-2 como un biomarcador de alteraciones en el segmento ST/T del electrocardiograma en pacientes con FRDA, supone una herramienta que podría contribuir al diagnóstico de la patología cardíaca en la FRDA. Dado que los síntomas cardíacos pueden aparecer tarde en la progresión de la cardiomiopatía y que existe una falta de seguimiento cardiológico debido a la ausencia de movilidad y la gravedad neurológica de los pacientes, la cofilina-2 podría apoyar el diagnóstico inicial de la cardiomiopatía permitiendo una detección temprana y una mayor precisión diagnóstica. Además, la implicación de la cofilina-2 en la cardiomiopatía podría abrir la puerta a nuevos estudios sobre el papel de esta proteína en el funcionamiento del corazón y su posible uso como biomarcador en otras patologías cardíacas.



CONCLUSIONS

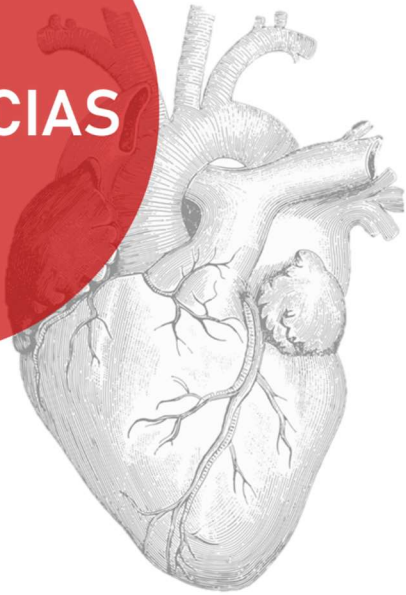
1. FRDA iPSC-derived cardiomyocytes show an overexpression of the miRNA signature (miR-151a-5p, miR-625-3p, miR-330-3p, miR-128-3p, miR-142-3p and miR-323a-3p) associated with FRDA pathology.
2. FRDA iPSC-CMs exhibit altered expression of the cytoskeleton-related target genes of miR-142-3p, *CFL2* and *MYLK*, and altered expression of the Ca²⁺ homeostasis-related target genes of miR-323a-3p, *CALHM5*, and miR-142-3p, *CACNA1D* and *ATP2A2*.
3. FRDA iPSC-CMs present modifications in heart rate and associated action potential, highlighting the presence of post-depolarization proarrhythmic events.
4. FRDA iPSC-CMs exhibit alterations in intracellular Ca²⁺ homeostasis characterized by increased Ca²⁺ influx into the cell and increased Ca²⁺ extrusion rate out of the cell.
5. FRDA iPSC-CMs from the patient with the larger expansion size show impairment in sarcomere structure, and both lines show a tendency towards shortening of the contractile unit.
6. Mitochondria in FRDA iPSC-CMs display elongated morphology and reduced circularity, suggesting alterations in mitochondrial fission-fusion processes and a loss of the mitochondrial cristae structure.
7. The iPSC-CM model reflects the characteristics of the cardiac pathology of FRDA, providing an *in vitro* tool for studying the underlying disease mechanisms.
8. Increased levels of cofilin-2 are associated with abnormalities in the ST/T segment of the electrocardiogram in FRDA patients, thus cofilin-2 is proposed as a possible biomarker for the diagnosis of cardiomyopathy in FRDA.

CONCLUSIONES

1. Los iPSC-CM de FRDA presentan una sobreexpresión de la firma de miARN (miR-151a-5p, miR-625-3p, miR-330-3p, miR-128-3p, miR-142-3p y miR-323a-3p) asociada con la patología de la FRDA.
2. Los iPSC-CM de FRDA presentan una alteración en la expresión de los genes diana del miR-142-3p, *CFL2* y *MYLK*, relacionados con el citoesqueleto, y en la expresión de los genes diana del miR-323a-3p, *CALHM5*, y del miR-142-3p, *CACNA1D* y *ATP2A2*, relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} .
3. Los iPSC-CM de FRDA muestran modificaciones del ritmo cardíaco y del potencial de acción asociado, destacando la presencia de eventos proarrítmicos postdespolarizantes.
4. Los iPSC-CM de FRDA exhiben alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular caracterizadas por un incremento en la entrada de Ca^{2+} al interior celular y una mayor velocidad de extrusión de Ca^{2+} al exterior.
5. Los iPSC-CM de FRDA procedentes del paciente que cuenta con un mayor tamaño de la expansión muestran un deterioro en la estructura del sarcómero, y ambas líneas procedentes de pacientes presentan una tendencia al acortamiento de la unidad contráctil.
6. Las mitocondrias de los iPSC-CM de FRDA presentan una morfología alargada y una menor circularidad, sugiriendo alteraciones en los procesos de fisión-fusión mitocondrial, y una pérdida de la estructura de las crestas.
7. El modelo de iPSC-CM refleja las características de la patología cardíaca de la FRDA, proporcionando una herramienta *in vitro* para el estudio de los mecanismos causantes de la enfermedad.
8. El incremento de los niveles de cofilina-2 se asocian con alteraciones en el segmento ST/T del electrocardiograma de pacientes de FRDA, por

lo que se propone a la cofilina-2 como un posible biomarcador para el diagnóstico de la cardiomiopatía en la FRDA.

REFERENCIAS



REFERENCIAS

- (FDA), U.S. Food and Drug Administration. 2023. "FDA Approves First Treatment for Friedreich's Ataxia." <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-first-treatment-friedreichs-ataxia> (October 24, 2023).
- Abeti, Rosella et al. 2018. "Calcium Deregulation: Novel Insights to Understand Friedreich's Ataxia Pathophysiology ." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2018.00264>.
- Ackerman, Michael J, and David E Clapham. 2004. "Chapter 18 - Excitability and Conduction." In *Molecular Basis of Cardiovascular Disease (2nd Edition)*, ed. KENNETH R B T - Molecular Basis of Cardiovascular Disease (Second Edition) CHIEN. Philadelphia: W.B. Saunders, 311-35. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780721694283500238>.
- Adamec, J et al. 2000. "Iron-Dependent Self-Assembly of Recombinant Yeast Frataxin: Implications for Friedreich Ataxia." *American journal of human genetics* 67(3): 549-62.
- Agrawal, Pankaj B et al. 2007. "Nemaline Myopathy with Minicores Caused by Mutation of the CFL2 Gene Encoding the Skeletal Muscle Actin-Binding Protein, Cofilin-2." *The American Journal of Human Genetics* 80(1): 162-67. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929707609306>.
- Al-Mahdawi, Sahar et al. 2008. "The Friedreich Ataxia GAA Repeat Expansion Mutation Induces Comparable Epigenetic Changes in Human and Transgenic Mouse Brain and Heart Tissues." *Human molecular genetics* 17(5): 735-46.
- Allan, Andrew et al. 2023. "High-Throughput Longitudinal Electrophysiology Screening of Mature Chamber-Specific HiPSC-CMs Using Optical Mapping." *iScience* 26(7): 107142.

- Aloria, Kerman, Brenda Schilke, Amy Andrew, and Elizabeth A Craig. 2004. "Iron-Induced Oligomerization of Yeast Frataxin Homologue Yfh1 Is Dispensable in Vivo." *EMBO reports* 5(11): 1096–1101.
- Andrienko, Tatyana N, Eckard Picht, and Donald M Bers. 2009. "Mitochondrial Free Calcium Regulation during Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release in Rat Cardiac Myocytes." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46(6): 1027–36.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022282809001382>.
- Anjomani Virmouni, Sara et al. 2015. "A Novel GAA-Repeat-Expansion-Based Mouse Model of Friedreich's Ataxia." *Disease Models & Mechanisms* 8(3): 225–35. <https://doi.org/10.1242/dmm.018952>.
- Anjomani Virmouni, Sara, Chiranjeevi Sandi, Sahar Al-Mahdawi, and Mark A Pook. 2014. "Cellular, Molecular and Functional Characterisation of YAC Transgenic Mouse Models of Friedreich Ataxia." *PLOS ONE* 9(9): e107416.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107416>.
- Anzovino, Amy et al. 2017. "Molecular Alterations in a Mouse Cardiac Model of Friedreich Ataxia: An Impaired Nrf2 Response Mediated via Upregulation of Keap1 and Activation of the Gsk3 β Axis." *The American Journal of Pathology* 187(12): 2858–75.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944017306314>.
- Ast, Tslil et al. 2019. "Hypoxia Rescues Frataxin Loss by Restoring Iron Sulfur Cluster Biogenesis." *Cell* 177(6): 1507–1521.e16.
- . 2024. "METTL17 Is an Fe-S Cluster Checkpoint for Mitochondrial Translation." *Molecular cell* 84(2): 359–374.e8.
- Babcock, M et al. 1997. "Regulation of Mitochondrial Iron Accumulation by Yfh1p, a Putative Homolog of Frataxin." *Science (New York, N.Y.)* 276(5319): 1709–12.
- Bers, Donald M. 2002. "Cardiac Excitation–Contraction Coupling." *Nature*

REFERENCIAS

- 415(6868): 198–205. <https://doi.org/10.1038/415198a>.
- . 2008. "Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes." *Annual review of physiology* 70: 23–49.
- Blair, Ian A et al. 2019. "The Current State of Biomarker Research for Friedreich's Ataxia: A Report from the 2018 FARA Biomarker Meeting." *Future science OA* 5(6): FS0398.
- Bolinches-Amorós, Arantxa et al. 2014. "Mitochondrial Dysfunction Induced by Frataxin Deficiency Is Associated with Cellular Senescence and Abnormal Calcium Metabolism." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 124. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00124/abstract> (June 19, 2019).
- Borbély, Attila et al. 2005. "Peroxynitrite-Induced Alpha-Actinin Nitration and Contractile Alterations in Isolated Human Myocardial Cells." *Cardiovascular research* 67(2): 225–33.
- Boyman, Liron et al. 2014. "Calcium Movement in Cardiac Mitochondria." *Biophysical journal* 107(6): 1289–1301.
- Bradley, J L et al. 2000. "Clinical, Biochemical and Molecular Genetic Correlations in Friedreich's Ataxia." *Human molecular genetics* 9(2): 275–82.
- Bridwell-Rabb, Jennifer et al. 2014. "Human Frataxin Activates Fe-S Cluster Biosynthesis by Facilitating Sulfur Transfer Chemistry." *Biochemistry* 53(30): 4904–13.
- Brown, Alexander F et al. 2021. "Friedreich's Ataxia Frequency in a Large Cohort of Genetically Undetermined Ataxia Patients." *Frontiers in neurology* 12: 736253.
- Campuzano, Victoria et al. 1996. "Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Lntronic GAA Triplet Repeat Expansion." *Science* 271: 1423–27.

- . 1997. "Frataxin Is Reduced in Friedreich Ataxia Patients and Is Associated with Mitochondrial Membranes." *Human Molecular Genetics* 6(11): 1771–80. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.11.1771>.
- Cao, Jessica L et al. 2019. "Role of Mitochondrial Ca(2+) Homeostasis in Cardiac Muscles." *Archives of biochemistry and biophysics* 663: 276–87.
- Castaldo, I et al. 2008. "DNA Methylation in Intron 1 of the Frataxin Gene Is Related to GAA Repeat Length and Age of Onset in Friedreich Ataxia Patients." *Journal of medical genetics* 45(12): 808–12.
- Cavadini, Patrizia, Heather A O'Neill, Oldrich Benada, and Grazia Isaya. 2002. "Assembly and Iron-Binding Properties of Human Frataxin, the Protein Deficient in Friedreich Ataxia." *Human Molecular Genetics* 11(3): 217–27. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.3.217>.
- Chatzifrangkeskou, Maria et al. 2018. "Cofilin-1 Phosphorylation Catalyzed by ERK1/2 Alters Cardiac Actin Dynamics in Dilated Cardiomyopathy Caused by Lamin A/C Gene Mutation." *Human molecular genetics* 27(17): 3060–78.
- Chen, Yuhao, and Xiaowei Wang. 2020. "MiRDB: An Online Database for Prediction of Functional MicroRNA Targets." *Nucleic acids research* 48(D1): D127–31.
- Cheng, H, W J Lederer, and M B Cannell. 1993. "Calcium Sparks: Elementary Events Underlying Excitation-Contraction Coupling in Heart Muscle." *Science (New York, N.Y.)* 262(5134): 740–44.
- Chiang, Shannon et al. 2021. "Mechanisms of Impaired Mitochondrial Homeostasis and NAD+ Metabolism in a Model of Mitochondrial Heart Disease Exhibiting Redox Active Iron Accumulation." *Redox Biology* 46: 102038. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221323172100197X>.
- Child, John S et al. 1986. "Cardiac Involvement in Friedreich's Ataxia: A Clinical Study of 75 Patients." *Journal of the American College of Cardiology* 7(6): 102038.

REFERENCIAS

- 1370–78.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109786801590>.
- Chung, Jae-Hoon et al. 2016. "Myofilament Calcium Sensitivity: Role in Regulation of In Vivo Cardiac Contraction and Relaxation." *Frontiers in physiology* 7: 562.
- Cogliati, Sara, Jose A. Enriquez, and Luca Scorrano. 2016. "Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality." *Trends in Biochemical Sciences* 41(3): 261–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.001>.
- Condò, Ivano et al. 2007. "In Vivo Maturation of Human Frataxin." *Human molecular genetics* 16(13): 1534–40.
- Cook, A, and P Giunti. 2017. "Friedreich's Ataxia: Clinical Features, Pathogenesis and Management." *British medical bulletin* 124(1): 19–30.
- Cossée, M et al. 1997. "Evolution of the Friedreich's Ataxia Trinucleotide Repeat Expansion: Founder Effect and Premutations." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(14): 7452–57. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9207112>.
- . 2000. "Inactivation of the Friedreich Ataxia Mouse Gene Leads to Early Embryonic Lethality without Iron Accumulation." *Human molecular genetics* 9(8): 1219–26.
- Cotticelli, M Grazia et al. 2019. "Ferroptosis as a Novel Therapeutic Target for Friedreich's Ataxia." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 369(1): 47–54.
- Crocini, Claudia, and Michael Gotthardt. 2021. "Cardiac Sarcomere Mechanics in Health and Disease." *Biophysical reviews* 13(5): 637–52.
- Crombie, Duncan E et al. 2017. "Friedreich's Ataxia Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Display Electrophysiological Abnormalities and Calcium Handling Deficiency." *Aging* 9(5): 1440–52.
- Czornobil, Roman et al. 2023. "The Cardiac Calcium Handling Machinery Is

- Remodeled in Friedreich's Ataxia." *bioRxiv*. 2023.11.09.566141.
<http://biorxiv.org/content/early/2023/11/13/2023.11.09.566141.abstract>.
- Dedkova, Elena N, and Lothar A Blatter. 2013. "Calcium Signaling in Cardiac Mitochondria." *Journal of molecular and cellular cardiology* 58: 125–33.
- Delatycki, M B et al. 1999. "Clinical and Genetic Study of Friedreich Ataxia in an Australian Population." *American journal of medical genetics* 87(2): 168–74.
- Delatycki, Martin B et al. 2005. "Surgery for Equinovarus Deformity in Friedreich's Ataxia Improves Mobility and Independence." *A Publication of The Association of Bone and Joint Surgeons® / CORR®* 430.
https://journals.lww.com/clinorthop/Fulltext/2005/01000/Surgery_for_Equinovarus_Deformity_in_Friedreich_s.18.aspx.
- Deng, Zhenhan et al. 2019. "RhoA/ROCK Pathway: Implication in Osteoarthritis and Therapeutic Targets." *American journal of translational research* 11(9): 5324–31.
- Diring, Jessica, Stéphane Mouilleron, Neil McDonald, and Richard Treisman. 2019. "RPEL-Family RhoGAPs Link Rac/Cdc42 GTP Loading to G-Actin Availability." *Nature Cell Biology* 21.
- Drago, Ilaria, Diego De Stefani, Rosario Rizzuto, and Tullio Pozzan. 2012. "Mitochondrial Ca²⁺ Uptake Contributes to Buffering Cytoplasmic Ca²⁺ Peaks in Cardiomyocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(32): 12986–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210718109>.
- Duchen, M R. 2000. "Mitochondria and Calcium: From Cell Signalling to Cell Death." *The Journal of physiology* 529 Pt 1(Pt 1): 57–68.
- Durr, A et al. 1996. "Clinical and Genetic Abnormalities in Patients with Friedreich's Ataxia." *The New England journal of medicine* 335(16): 1169–75.
- Dürr, Alexandra et al. 1996. "Clinical and Genetic Abnormalities in Patients with Friedreich's Ataxia." *New England Journal of Medicine* 335(16): 1169–75.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199610173351601>.

REFERENCIAS

- Eisner, David A, Jessica L Caldwell, Kornél Kistamás, and Andrew W Trafford. 2017. "Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart." *Circulation research* 121(2): 181–95.
- Emond, M, G Lepage, M Vanasse, and M Pandolfo. 2000. "Increased Levels of Plasma Malondialdehyde in Friedreich Ataxia." *Neurology* 55(11): 1752–53.
- Evans-Galea, Marguerite V et al. 2012. "FXN Methylation Predicts Expression and Clinical Outcome in Friedreich Ataxia." *Annals of neurology* 71(4): 487–97.
- Filla, A et al. 1996. "The Relationship between Trinucleotide (GAA) Repeat Length and Clinical Features in Friedreich Ataxia." *American journal of human genetics* 59(3): 554–60. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8751856>.
- Fortuna, Filippo et al. 2009. "Visual System Involvement in Patients with Friedreich's Ataxia." *Brain: a journal of neurology* 132(Pt 1): 116–23.
- Foury, F, and O Cazzalini. 1997. "Deletion of the Yeast Homologue of the Human Gene Associated with Friedreich's Ataxia Elicits Iron Accumulation in Mitochondria." *FEBS letters* 411(2–3): 373–77.
- Fox, Nicholas G et al. 2015. "Frataxin Accelerates [2Fe-2S] Cluster Formation on the Human Fe-S Assembly Complex." *Biochemistry* 54(25): 3880–89.
- Friedman, Lisa S et al. 2013. "Elevation of Serum Cardiac Troponin I in a Cross-Sectional Cohort of Asymptomatic Subjects with Friedreich Ataxia." *International journal of cardiology* 167(4): 1622–24.
- Friedreich, N. 1863. "Ueber Degenerative Atrophie Der Spinalen Hinterstränge (Sobre La Atrofia Degenerativa de Las Columnas Dorsales Espinales)." *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 26: 433–59.
- . 1876. "Ueber Ataxie Mit Besonderer Berücksichtigung Der Hereditären Formen (Sobre La Ataxia Con Especial Consideración de Las Formas Hereditarias)." 68: 145–245.
- Fusaki, Noemi et al. 2009. "Efficient Induction of Transgene-Free Human Pluripotent Stem Cells Using a Vector Based on Sendai Virus, an RNA Virus

- That Does Not Integrate into the Host Genome." *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 85(8): 348–62.
- Galea, Charles A et al. 2016. "Compound Heterozygous FXN Mutations and Clinical Outcome in Friedreich Ataxia." *Annals of neurology* 79(3): 485–95.
- Garbern, Jessica C et al. 2020. "Inhibition of MTOR Signaling Enhances Maturation of Cardiomyocytes Derived From Human-Induced Pluripotent Stem Cells via P53-Induced Quiescence." *Circulation* 141(4): 285–300.
- Geoffroy, G et al. 1976. "Clinical Description and Roentgenologic Evaluation of Patients with Friedreich's Ataxia." *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* 3(4): 279–86.
- Gibson, T J et al. 1996. "Friedreich's Ataxia Protein: Phylogenetic Evidence for Mitochondrial Dysfunction." *Trends in neurosciences* 19(11): 465–68.
- Gilbert, Guillaume et al. 2020. "Calcium Signaling in Cardiomyocyte Function." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 12(3).
- Görlach, Agnes, Katharina Bertram, Sona Hudecova, and Olga Krizanov. 2015. "Calcium and ROS: A Mutual Interplay." *Redox biology* 6: 260–71.
- Grimm, Michael, and Joan Heller Brown. 2010. "β-Adrenergic Receptor Signaling in the Heart: Role of CaMKII." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48(2): 322–30.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022282809004581>.
- Grune, Tilman et al. 2019. "The 'MYOCYTER' – Convert Cellular and Cardiac Contractions into Numbers with ImageJ." *Scientific Reports* 9(1): 15112.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51676-x>.
- Guo, Yuxuan, and William T Pu. 2020. "Cardiomyocyte Maturation." *Circulation Research* 126(8): 1086–1106. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315862>.
- Hanson, E et al. 2019. "Heart Disease in Friedreich's Ataxia." *World Journal of Cardiology* 11(1): 1–12.
- HARDING, A E. 1981. "FRIEDREICH'S ATAXIA: A CLINICAL AND GENETIC STUDY

REFERENCIAS

- OF 90 FAMILIES WITH AN ANALYSIS OF EARLY DIAGNOSTIC CRITERIA AND INTRAFAMILIAL CLUSTERING OF CLINICAL FEATURES." *Brain* 104(3): 589–620. <https://doi.org/10.1093/brain/104.3.589>.
- Hartmann, Svenja, Anne J Ridley, and Susanne Lutz. 2015. "The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease." *Frontiers in pharmacology* 6: 276.
- Herman, David et al. 2006. "Histone Deacetylase Inhibitors Reverse Gene Silencing in Friedreich's Ataxia." *Nature chemical biology* 2(10): 551–58.
- Herring, B Paul et al. 2006. "Regulation of Myosin Light Chain Kinase and Telokin Expression in Smooth Muscle Tissues." *American journal of physiology. Cell physiology* 291(5): C817–27.
- Hewer, R. 1969. "The Heart in Friedreich's Ataxia." *British Heart Journal* 31(1): 5 LP – 14. <http://heart.bmj.com/content/31/1/5.abstract>.
- Hick, Aurore et al. 2013. "Neurons and Cardiomyocytes Derived from Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Mitochondrial Defects in Friedreich's Ataxia." *Disease models & mechanisms* 6(3): 608–21.
- Holtzinger, Audrey, Gabriel E Rosenfeld, and Todd Evans. 2010. "Gata4 Directs Development of Cardiac-Inducing Endoderm from ES Cells." *Developmental Biology* 337(1): 63–73. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160609012469>.
- Huang, Michael Li-Hsuan et al. 2013. "Molecular and Functional Alterations in a Mouse Cardiac Model of Friedreich Ataxia: Activation of the Integrated Stress Response, EIF2 α Phosphorylation, and the Induction of Downstream Targets." *The American Journal of Pathology* 183(3): 745–57. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944013004550>.
- Johnson, Deborah C, Dennis R Dean, Archer D Smith, and Michael K Johnson. 2005. "Structure, Function, and Formation of Biological Iron-Sulfur Clusters." *Annual review of biochemistry* 74: 247–81.

- Katz, A M. 1990. "Interplay between Inotropic and Lusitropic Effects of Cyclic Adenosine Monophosphate on the Myocardial Cell." *Circulation* 82(2 Suppl): 17-11.
- Keage, Megan J et al. 2017. "Dysphagia in Friedreich Ataxia." *Dysphagia* 32(5): 626-35. <https://doi.org/10.1007/s00455-017-9804-4>.
- Kilian, Lucia Sophie, Jakob Voran, Derk Frank, and Ashraf Yusuf Rangrez. 2021. "RhoA: A Dubious Molecule in Cardiac Pathophysiology." *Journal of Biomedical Science* 28(1): 33. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00730-w>.
- Kistamás, Kornél et al. 2020. "Calcium Handling Defects and Cardiac Arrhythmia Syndromes." *Frontiers in pharmacology*11: 72.
- Klabunde, Richard E. 2011a. "Chapter 1. Introduction to the Cardiovascular System." In *Cardiovascular Physiology Concepts - 2nd Ed.*, Wolters Kluwer, 1-8.
- . 2011b. "Chapter 2. Electrical Activity of the Heart." In *Cardiovascular Physiology Concepts - 2nd Ed.*, Wolters Kluwer, 9-40.
- . 2011c. "Chapter 3. Cellular Structure and Function." In *Cardiovascular Physiology Concepts - 2nd Ed.*, Wolters Kluwer, 41-59.
- Knollmann, Björn C, and Dan M Roden. 2008. "A Genetic Framework for Improving Arrhythmia Therapy." *Nature* 451(7181): 929-36.
- Koeppen, A.H., A.N. Davis, and J.A. Morral. 2011. "The Cerebellar Component of Friedreich ' s Ataxia." *Acta Neuropathologica*: 323-30.
- Koeppen, Arnulf H et al. 2009. "The Dorsal Root Ganglion in Friedreich's Ataxia." *Acta neuropathologica* 118(6): 763-76.
- . 2011. "Friedreich's Ataxia: Pathology, Pathogenesis, and Molecular Genetics." *Journal of the neurological sciences* 303(1-2): 1-12.
- . 2015. "The Pathogenesis of Cardiomyopathy in Friedreich Ataxia." *PLoS ONE*: 1-16.

REFERENCIAS

- . 2016. "The Significance of Intercalated Discs in the Pathogenesis of Friedreich Cardiomyopathy." *Journal of the neurological sciences* 367: 171–76.
- . 2021. "Friedreich Cardiomyopathy Is a Desminopathy." *Free neuropathology* 2.
- Koeppen, Arnulf H, and Joseph E Mazurkiewicz. 2013. "Friedreich Ataxia: Neuropathology Revised." 72(2): 78–90.
- Kolwicz, Stephen C Jr, Suneet Purohit, and Rong Tian. 2013. "Cardiac Metabolism and Its Interactions with Contraction, Growth, and Survival of Cardiomyocytes." *Circulation research* 113(5): 603–16.
- Koutnikova, H et al. 1997. "Studies of Human, Mouse and Yeast Homologues Indicate a Mitochondrial Function for Frataxin." *Nature genetics* 16(4): 345–51.
- Kremneva, Elena et al. 2014. "Cofilin-2 Controls Actin Filament Length in Muscle Sarcomeres." *Developmental Cell* 31(2): 215–26.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2014.09.002>.
- Lan, Feng et al. 2013. "Abnormal Calcium Handling Properties Underlie Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Pathology in Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* 12(1): 101–13.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.010>.
- Lange, Stephan, Nikos Pinotsis, Irina Agarkova, and Elisabeth Ehler. 2020. "The M-Band: The Underestimated Part of the Sarcomere." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1867(3): 118440.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488918303422>.
- Lapeña-Luzón, Tamara et al. 2021. "Cofilin and Neurodegeneration: New Functions for an Old but Gold Protein." *Brain sciences* 11(7).
- Lee, Yee-Ki et al. 2016. "Efficient Attenuation of Friedreich's Ataxia (FRDA) Cardiomyopathy by Modulation of Iron Homeostasis-Human Induced

- Pluripotent Stem Cell (HiPSC) as a Drug Screening Platform for FRDA." *International Journal of Cardiology* 203: 964–71. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167527315309104>.
- Lees, Jarmon G et al. 2022. "Cellular Pathophysiology of Friedreich's Ataxia Cardiomyopathy." *International Journal of Cardiology* 346: 71–78. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167527321018507>.
- Lemcke, Heiko et al. 2020. "Quantitative Evaluation of the Sarcomere Network of Human HiPSC-Derived Cardiomyocytes Using Single-Molecule Localization Microscopy." *International journal of molecular sciences* 21(8).
- Lesuisse, Emmanuel et al. 2003. "Iron Use for Haeme Synthesis Is under Control of the Yeast Frataxin Homologue (Yfh1)." *Human molecular genetics* 12(8): 879–89.
- Levi, Sonia et al. 2001. "A Human Mitochondrial Ferritin Encoded by an Intronless Gene *." *Journal of Biological Chemistry* 276(27): 24437–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100141200>.
- Levick, J.R. 1991. "Chapter 3. Cardiac Excitation and Contraction." In *An Introduction to Cardiovascular Physiology*, Butterworth & Co, 23–45.
- Li, Jing, Bradley Richmond, and TingTing Hong. 2022. "Organization of Ca(2+) Signaling Microdomains in Cardiac Myocytes." In *Cardiovascular Signaling in Health and Disease*, eds. Narasimham L Parinandi and Thomas J Hund. Cham (CH), 39–66.
- Li, Jixue et al. 2019. "Excision of the Expanded GAA Repeats Corrects Cardiomyopathy Phenotypes of iPSC-Derived Friedreich's Ataxia Cardiomyocytes." *Stem cell research* 40: 101529.
- Licursi, Valerio, Federica Conte, Giulia Fiscon, and Paola Paci. 2019. "MIENTURNET: An Interactive Web Tool for MicroRNA-Target Enrichment and Network-Based Analysis." *BMC bioinformatics* 20(1): 545.
- Lin, Yu-Sheng et al. 2021. "Sarcomeres Morphology and Z-Line Arrangement

REFERENCIAS

- Disarray Induced by Ventricular Premature Contractions through the Rac2/Cofilin Pathway." *International journal of molecular sciences* 22(20).
- Liu, Jun et al. 2011. "Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Friedreich Ataxia Patients." *Stem cell reviews and reports* 7(3): 703–13.
- Lo, Cecilia W. 2000. "Role of Gap Junctions in Cardiac Conduction and Development ." *Circulation Research* 87(5): 346–48. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.5.346>.
- Lodi, Raffaele et al. 2001. "Cardiac Energetics Are Abnormal in Friedreich Ataxia Patients in the Absence of Cardiac Dysfunction and Hypertrophy: An in Vivo 31P Magnetic Resonance Spectroscopy Study." *Cardiovascular Research* 52(1): 111–19. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00357-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00357-1).
- Long, Ashlee et al. 2017. "Somatic Instability of the Expanded GAA Repeats in Friedreich's Ataxia." *PloS one* 12(12): e0189990.
- Lynch, David R., Kim Schadt, et al. 2021. "Friedreich Ataxia: Multidisciplinary Clinical Care." *Journal of Multidisciplinary Healthcare* 14(June): 1645–58.
- Lynch, David R, Melanie P Chin, et al. 2021. "Safety and Efficacy of Omaveloxolone in Friedreich Ataxia (MOXle Study)." *Annals of neurology* 89(2): 212–25.
- Lynch, David R et al. 2023. "Efficacy of Omaveloxolone in Friedreich's Ataxia: Delayed-Start Analysis of the MOXle Extension." *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 38(2): 313–20.
- Ma, Zhongming, Jessica E Tanis, Akiyuki Taruno, and J Kevin Foskett. 2016. "Calcium Homeostasis Modulator (CALHM) Ion Channels." *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 468(3): 395–403.
- Maheshwari, Saumya, Gabriela Vilema-Enríquez, and Richard Wade-Martins. 2023. "Patient-Derived iPSC Models of Friedreich Ataxia: A New Frontier for Understanding Disease Mechanisms and Therapeutic Application." *Translational Neurodegeneration* 12(1): 45. <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00376-8>.

- Mariotti, C et al. 2003. "Idebenone Treatment in Friedreich Patients: One-Year-Long Randomized Placebo-Controlled Trial." *Neurology* 60(10): 1676–79.
- Martin, Thomas G, and Jonathan A Kirk. 2020. "Under Construction: The Dynamic Assembly, Maintenance, and Degradation of the Cardiac Sarcomere." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 148: 89–102. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022282820302716>.
- Mazzara, Pietro Giuseppe et al. 2020. "Fratxin Gene Editing Rescues Friedreich's Ataxia Pathology in Dorsal Root Ganglia Organoid-Derived Sensory Neurons." *Nature communications* 11(1): 4178.
- McCabe, D J H et al. 2000. "Typical Friedreich's Ataxia without GAA Expansions and GAA Expansions without Typical Friedreich's Ataxia." *Journal of Neurology* 247(5): 346–55. <https://doi.org/10.1007/s004150050601>.
- McMackin, Marissa Z, Chelsea K Henderson, and Gino A Cortopassi. 2017. "Neurobehavioral Deficits in the KIKO Mouse Model of Friedreich's Ataxia." *Behavioural Brain Research* 316: 183–88. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016643281630571X>.
- Meneghini, R. 1997. "Iron Homeostasis, Oxidative Stress, and DNA Damage." *Free radical biology & medicine* 23(5): 783–92.
- Michael, Susan et al. 2006. "Iron and Iron-Responsive Proteins in the Cardiomyopathy of Friedreich's Ataxia." *The Cerebellum* 5(4): 257–67. <https://doi.org/10.1080/14734220600913246>.
- Miller, Evan W et al. 2012. "Optically Monitoring Voltage in Neurons by Photo-Induced Electron Transfer through Molecular Wires." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(6): 2114–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120694109>.
- Mincheva-Tasheva, Stefka, Elia Obis, Jordi Tamarit, and Joaquim Ros. 2014. "Apoptotic Cell Death and Altered Calcium Homeostasis Caused by Frataxin Depletion in Dorsal Root Ganglia Neurons Can Be Prevented by BH4

REFERENCIAS

- Domain of Bcl-XL Protein." *Human molecular genetics* 23(7): 1829–41.
- Mollá, Belén et al. 2017. "Reversible Axonal Dystrophy by Calcium Modulation in Frataxin-Deficient Sensory Neurons of YG8R Mice." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10(August): 1–15.
- Muñoz-Lasso, Diana C et al. 2020. "Cofilin Dysregulation Alters Actin Turnover in Frataxin-Deficient Neurons." *Scientific Reports* 10(1): 5207. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62050-7>.
- Musco, Giovanna et al. 2000. "Towards a Structural Understanding of Friedreich's Ataxia: The Solution Structure of Frataxin." *Structure* 8(7): 695–707. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212600001581>.
- Navarro, Juan A et al. 2010. "Altered Lipid Metabolism in a Drosophila Model of Friedreich's Ataxia." *Human molecular genetics* 19(14): 2828–40.
- Niture, S.K., Khatri, R. and Jaiswal, A.K. 2013. "Regulation of Nrf2—An Update." *Free Radical Biology and Medicine* 66: 36–44.
- Ockeloen, C W et al. 2012. "Congenital Myopathy Caused by a Novel Missense Mutation in the CFL2 Gene." *Neuromuscular Disorders* 22(7): 632–39. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960896612001010>.
- Pandolfo, M. 2001. "Molecular Basis of Friedreich Ataxia." *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 16(5): 815–21.
- Pandolfo, Massimo, and Annalisa Pastore. 2009. "The Pathogenesis of Friedreich Ataxia and the Structure and Function of Frataxin." : 9–17.
- Parikh, Shan S et al. 2017. "Thyroid and Glucocorticoid Hormones Promote Functional T-Tubule Development in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." *Circulation research* 121(12): 1323–30.
- Park, Sangkyu, Daehwan Kim, Yeon-Gil Jung, and Sangho Roh. 2015. "Thiazovivin, a Rho Kinase Inhibitor, Improves Stemness Maintenance of Embryo-Derived Stem-like Cells under Chemically Defined Culture

- Conditions in Cattle." *Animal reproduction science* 161: 47–57.
- Pastore, Annalisa et al. 2003. "Actin Glutathionylation Increases in Fibroblasts of Patients with Friedreich's Ataxia: A Potential Role in the Pathogenesis of the Disease." *The Journal of biological chemistry* 278(43): 42588–95.
- Pastore, Annalisa, and Helene Puccio. 2013. "Frataxin: A Protein in Search for a Function." *Journal of neurochemistry* 126 Suppl: 43–52.
- Paupe, Vincent et al. 2009. "Impaired Nuclear Nrf2 Translocation Undermines the Oxidative Stress Response in Friedreich Ataxia." *PloS one* 4(1): e4253.
- Payne, R Mark. 2022. "Cardiovascular Research in Friedreich Ataxia: Unmet Needs and Opportunities." *JACC: Basic to Translational Science* 7(12): 1267–83.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452302X22001425>.
- Pérez-Luz, S et al. 2015. "Delivery of the 135 Kb Human Frataxin Genomic DNA Locus Gives Rise to Different Frataxin Isoforms." *Genomics* 106(2): 76–82.
- Pinnell, Jeremy, Simon Turner, and Simon Howell. 2007. "Cardiac Muscle Physiology." *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 7(3): 85–88. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkm013>.
- Pioner, Josè M et al. 2019. "Optical Investigation of Action Potential and Calcium Handling Maturation of HiPSC-Cardiomyocytes on Biomimetic Substrates." *International Journal of Molecular Sciences* 20(15).
- Prosser, Benjamin L, Christopher W Ward, and W J Lederer. 2011. "X-ROS Signaling: Rapid Mechano-Chemo Transduction in Heart." *Science (New York, N.Y.)* 333(6048): 1440–45.
- Puccio, Hélène et al. 2001. "Mouse Models for Friedreich Ataxia Exhibit Cardiomyopathy, Sensory Nerve Defect and Fe-S Enzyme Deficiency Followed by Intramitochondrial Iron Deposits." *Nature Genetics* 27(2): 181–86. <https://doi.org/10.1038/84818>.
- Rai, Myriam et al. 2008. "HDAC Inhibitors Correct Frataxin Deficiency in a

REFERENCIAS

- Friedreich Ataxia Mouse Model." *PloS one* 3(4): e1958.
- Rajagopalan, Bheeshma et al. 2010. "Analysis of the Factors Influencing the Cardiac Phenotype in Friedreich's Ataxia." *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 25(7): 846–52.
- Raman, Subha V et al. 2011. "Impaired Myocardial Perfusion Reserve and Fibrosis in Friedreich Ataxia: A Mitochondrial Cardiomyopathy with Metabolic Syndrome." *European heart journal* 32(5): 561–67.
- Ramirez, R Liane et al. 2012. "Relation of Cytosolic Iron Excess to Cardiomyopathy of Friedreich's Ataxia." *The American journal of cardiology* 110(12): 1820–27.
- Rance, Gary et al. 2008. "Speech Perception Ability in Individuals with Friedreich Ataxia." *Brain* 131(8): 2002–12. <https://doi.org/10.1093/brain/awn104>.
- Reetz, Kathrin et al. 2018. "Nonataxia Symptoms in Friedreich Ataxia." *Neurology* 91(10): e917 LP–e930. <http://n.neurology.org/content/91/10/e917.abstract>.
- Regner, Sean R et al. 2012. "Analysis of Echocardiograms in a Large Heterogeneous Cohort of Patients With Friedreich Ataxia." *American Journal of Cardiology* 109(3): 401–5. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.09.025>.
- Rodríguez, Laura R et al. 2020. "Oxidative Stress Modulates Rearrangement of Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contacts and Calcium Dysregulation in a Friedreich's Ataxia Model." *Redox Biology* 37: 101762. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231720309678>.
- Rodríguez, Laura R et al. 2022. "Therapeutic Strategies Targeting Mitochondrial Calcium Signaling: A New Hope for Neurological Diseases?" *Antioxidants* 11(1).
- La Rosa, Piergiorgio et al. 2020. "Ferroptosis in Friedreich's Ataxia: A Metal-Induced Neurodegenerative Disease." *Biomolecules* 10(11).
- Rotig, A et al. 1997. "Aconitase and Mitochondrial Iron-Sulphur Protein

- Deficiency in Friedreich Ataxia." *Nature genetics* 17(2): 215–17.
- Sakamoto, Naoaki et al. 1999. "Sticky DNA: Self-Association Properties of Long GAA·TTC Repeats in R·R·Y Triplex Structures from Friedreich's Ataxia." *Molecular Cell* 3(4): 465–75. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80474-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80474-8).
- Salami, Christiana O et al. 2020. "Stress-Induced Mouse Model of the Cardiac Manifestations of Friedreich's Ataxia Corrected by AAV-Mediated Gene Therapy." *Human Gene Therapy* 31(15–16): 819–27. <https://doi.org/10.1089/hum.2019.363>.
- Sanchez-Casis, G, M Cote, and A Barbeau. 1976. "Pathology of the Heart in Friedreich's Ataxia: Review of the Literature and Report of One Case." *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* 3(4): 349–54.
- Schiavi, Alfonso et al. 2013. "Autophagy Induction Extends Lifespan and Reduces Lipid Content in Response to Frataxin Silencing in *C. Elegans*." *Experimental gerontology* 48(2): 191–201.
- Schmucker, Stéphane et al. 2008. "The in Vivo Mitochondrial Two-Step Maturation of Human Frataxin." *Human molecular genetics* 17(22): 3521–31.
- Schulz, J B et al. 2000. "Oxidative Stress in Patients with Friedreich Ataxia." *Neurology* 55(11): 1719–21.
- Seco-Cervera, M et al. 2017. "Circulating MiR-323-3p Is a Biomarker for Cardiomyopathy and an Indicator of Phenotypic Variability in Friedreich's Ataxia Patients." *Scientific Reports* 7(1): 5237. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04996-9>.
- Seznec, Hervé et al. 2005. "Friedreich Ataxia: The Oxidative Stress Paradox." *Human Molecular Genetics* 14(4): 463–74. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi042>.
- Shan, Yuxi et al. 2013. "Frataxin Deficiency Leads to Defects in Expression of

REFERENCIAS

- Antioxidants and Nrf2 Expression in Dorsal Root Ganglia of the Friedreich's Ataxia YG8R Mouse Model." *Antioxidants & redox signaling* 19(13): 1481–93.
- Shaw, Robin M, and Henry M Colecraft. 2013. "L-Type Calcium Channel Targeting and Local Signalling in Cardiac Myocytes." *Cardiovascular research* 98(2): 177–86.
- Shimokawa, Hiroaki, Shinichiro Sunamura, and Kimio Satoh. 2016. "RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System." *Circulation Research* 118(2): 352–66. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306532>.
- Solaro, R J, and H M Rarick. 1998. "Troponin and Tropomyosin: Proteins That Switch on and Tune in the Activity of Cardiac Myofilaments." *Circulation research* 83(5): 471–80.
- Subramanian, Khaushik et al. 2015. "Cofilin-2 Phosphorylation and Sequestration in Myocardial Aggregates: Novel Pathogenetic Mechanisms for Idiopathic Dilated Cardiomyopathy." *Journal of the American College of Cardiology* 65(12): 1199–1214.
- Sullivan, Patrick G, C William Balke, and Karyn A Esser. 2006. "Mitochondrial Buffering of Calcium in the Heart." *Circulation Research* 99(2): 109–10. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000234949.61052.9f>.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell* 126(4): 663–76.
- Tanaka, Atsushi et al. 2024. "Endothelin-1 Induces Myofibrillar Disarray and Contractile Vector Variability in Hypertrophic Cardiomyopathy-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." *Journal of the American Heart Association* 3(6): e001263. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001263>.
- THORÉN, CLAES. 1962. "Diabetes Mellitus in Friedreich's Ataxia." *Acta Paediatrica* 51(S135): 239–47. <https://doi.org/10.1111/j.1651->

2227.1962.tb08680.x.

- Tobita, Takashige et al. 2017. "Identification of MYLK3 Mutations in Familial Dilated Cardiomyopathy." *Scientific Reports* 7(1): 17495. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17769-1>.
- Tsai, Chi-Lin, and David P Barondeau. 2010. "Human Frataxin Is an Allosteric Switch That Activates the Fe-S Cluster Biosynthetic Complex." *Biochemistry* 49(43): 9132–39.
- Tsou, Amy Y et al. 2011. "Mortality in Friedreich Ataxia." *Journal of the neurological sciences* 307(1–2): 46–49.
- Uhlén, Mathias et al. 2015. "Proteomics. Tissue-Based Map of the Human Proteome." *Science (New York, N.Y.)* 347(6220): 1260419.
- Vankan, Pierre. 2013. "Prevalence Gradients of Friedreich's Ataxia and R1b Haplotype in Europe Co-Localize, Suggesting a Common Palaeolithic Origin in the Franco-Cantabrian Ice Age Refuge." *Journal of neurochemistry* 126 Suppl: 11–20.
- Varró, András et al. 2020. "Cardiac Transmembrane Ion Channels and Action Potentials: Cellular Physiology and Arrhythmogenic Behavior." *Physiological Reviews* 101(3): 1083–1176. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2019>.
- Vyas, Piyush M et al. 2012. "A TAT-Frataxin Fusion Protein Increases Lifespan and Cardiac Function in a Conditional Friedreich's Ataxia Mouse Model." *Human molecular genetics* 21(6): 1230–47.
- Wang, Kexin et al. 2018. "Mitochondria Regulate Cardiac Contraction through ATP-Dependent and Independent Mechanisms." *Free radical research* 52(11–12): 1256–65.
- Wang, Lili et al. 2021. "Triiodothyronine and Dexamethasone Alter Potassium Channel Expression and Promote Electrophysiological Maturation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." *Journal*

REFERENCIAS

- of molecular and cellular cardiology* 161: 130–38.
- Weidemann, Frank et al. 2015. “[Heart involvement in Friedreich’s ataxia].” *Herz* 40 Suppl 1: 85–90.
- Weidemann, Frank et al. 2015. “The Cardiomyopathy in Friedreich’s Ataxia; New Biomarker for Staging Cardiac Involvement.” *International Journal of Cardiology* 194: 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.05.074>.
- Whitnall, Megan et al. 2008. “The MCK Mouse Heart Model of Friedreich’s Ataxia: Alterations in Iron-Regulated Proteins and Cardiac Hypertrophy Are Limited by Iron Chelation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(28): 9757–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804261105>.
- Willers, I, A Koeppen, S Singh, and H W Goedde. 1991. “Growth Studies on Fibroblasts of Patients with Autosomal Recessive Friedreich’s Ataxia.” *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 59(5): 357–60.
- Wilson, R B, and D M Roof. 1997. “Respiratory Deficiency Due to Loss of Mitochondrial DNA in Yeast Lacking the Frataxin Homologue.” *Nature genetics* 16(4): 352–57.
- Wong, Andy On-Tik et al. 1999. “The Friedreich’s Ataxia Mutation Confers Cellular Sensitivity to Oxidant Stress Which Is Rescued by Chelators of Iron and Calcium and Inhibitors of Apoptosis.” *Human molecular genetics* 8(3): 425–30.
- Wong, Andy On-Tik et al. 2019. “Correlation between Frataxin Expression and Contractility Revealed by in Vitro Friedreich’s Ataxia Cardiac Tissue Models Engineered from Human Pluripotent Stem Cells.” *Stem Cell Research & Therapy* 10(1): 203. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1305-y>.
- Worth, Andrew J et al. 2015. “Stable Isotopes and LC-MS for Monitoring Metabolic Disturbances in Friedreich’s Ataxia Platelets.” *Bioanalysis* 7(15): 1843–55.

- Xia, Haiyan et al. 2012. "Novel Frataxin Isoforms May Contribute to the Pathological Mechanism of Friedreich Ataxia." *PLOS ONE* 7(10): e47847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047847>.
- Yang, Wenli et al. 2008. "IPSC Reprogramming from Human Peripheral Blood Using Sendai Virus Mediated Gene Transfer." In Cambridge (MA).
- Yang, Xiulan et al. 2014. "Tri-Iodo-L-Thyronine Promotes the Maturation of Human Cardiomyocytes-Derived from Induced Pluripotent Stem Cells." *Journal of molecular and cellular cardiology* 72: 296-304.
- Yang, Xiulan, Lil Pabon, and Charles E Murry. 2014. "Engineering Adolescence: Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." *Circulation Research* 114(3): 511-23. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300558>.
- Yin, Liheng et al. 2021. "Impaired Binding to Junctophilin-2 and Nanostructural Alteration in CPVT Mutation." *Circulation Research* 129(3): e35-52. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319094>.
- Zaveri, Sahil et al. 2023. "Pathophysiology of Ca(v)1.3 L-Type Calcium Channels in the Heart." *Frontiers in physiology* 14: 1144069.
- Zhang, Jianhua et al. 2009. "Functional Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Circulation research* 104(4): e30-41.
- Zhang, Xiao-Hua, and Martin Morad. 2016. "Calcium Signaling in Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Evidence from Normal Subjects and CPVT Afflicted Patients." *Cell calcium* 59(2-3): 98-107.
- Zhang, Yuhao et al. 2021. "Piezo1-Mediated Mechanotransduction Promotes Cardiac Hypertrophy by Impairing Calcium Homeostasis to Activate Calpain/Calcineurin Signaling." *Hypertension* 78(3): 647-60. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17177>.
- Zuppinger, Christian et al. 2017. "Characterization of Cytoskeleton Features and Maturation Status of Cultured Human IPSC-Derived Cardiomyocytes."

REFERENCIAS

European journal of histochemistry: EJH 61(2): 2763.

ABREVIATURAS**ADF:** *Actin-Depolymerizing Factor***ARE:** *Antioxidant Response Element***AUC:** Área bajo la curva**Ca²⁺:** Calcio**CAMKII:** Ca²⁺/calmodulina proteína quinasa II**Ca_v1:** Canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje de tipo L**CFL:** Cofilina**CFL2:** Cofilina-2**cTnT:** Troponina T cardíaca**DAD:** *Delayed Afterdepolarization***Dex:** Dexametasona**D-PBS:** *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline***DRG:** *Dorsal Root Ganglion***EAD:** *Early AfterDepolarization***ECG:** Electrocardiograma**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas**F-actina:** Actina filamentosa**FDA:** *Food and Drug Administration***FRDA:** Ataxia de Friedreich**FXN:** Frataxina**G-actina:** Actina globular**iPSC:** *Induced Pluripotent Stem Cell***iPSC-CM:** *Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes***ISC:** *Iron Sulfur Clusters***LIMK:** Lim quinasa**LS:** Longitud del sarcómero**MAM:** *Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial associated Membranes***MCK:** *Muscle Creatine Kinase***MCU:** *Mitochondrial Calcium Uniporter***MIENTURNET:** *MicroRNA Enrichment TURned NETwork***MLC:** Cadena ligera de miosina**MLC2v:** Isoforma ventricular de la cadena ligera reguladora de miosina 2**NAV:** Nodo auriculoventricular**NCX:** Intercambiador de Na⁺/Ca²⁺**NRF2:** *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2***NSA:** Nodo sinoauricular**PA:** Potencial de acción**PET:** Transferencia de electrones fotoinducida**PGC-1 α /PPAR γ :** *Peroxisome Proliferator-Activated Co-Activator 1- α / Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma***PIINP:** Propéptido N-terminal del Procolágeno III**PKA:** Proteína quinasa A**PLIN5:** Perilipina 5**PLN:** Fosfolambano**qPCR:** PCR cuantitativa**RE:** Retículo endoplásmico**ROC:** *Receiver Operating characteristic Curve***ROCK:** Quinasa asociada a Rho**ROCKi:** *Rho kinase inhibitor***ROI:** *Region Of Interest***ROS:** *Reactive Oxygen Species***RS:** Retículo Sarcoplásmico

ABREVIATURAS

RyR: Receptor de Rianodina

SERCA2: ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico

T3: Triyodotironina

TEM: Microscopía de Transmisión de Electrones

α -SMA: α -actina del músculo liso

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de los miocitos cardíacos	3
Figura 2 Función de la cofilina-2.	4
Figura 3 Acoplamiento excitación-contracción en el cardiomiocito	7
Figura 4 Funciones de la frataxina en la mitocondria e implicaciones en la FRDA..	17
Figura 5 Características clínicas de la FRDA	23
Figura 6 Patología cardíaca en la FRDA	32
Figura 7 Protocolo de diferenciación a cardiomiocitos ventriculares a partir de iPSC y maduración.....	52
Figura 8 Análisis del latido cardíaco	61
Figura 9 Principio de detección de voltaje mediante sensores fluorescentes basados en la transferencia de electrones fotoinducida (PET)	63
Figura 10 Análisis de un transitorio de Ca^{2+}	66
Figura 11 Análisis de la longitud del sarcómero.....	68
Figura 12 Crecimiento de las líneas de iPSC en cultivo	75
Figura 13 Las iPSC expresan marcadores de pluripotencia	76
Figura 14 Seguimiento del proceso de diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos.....	78
Figura 15 Confirmación de la expresión de marcadores cardíacos mediante RT-qPCR y citometría de flujo	80
Figura 16 Confirmación de la expresión de marcadores cardíacos en los iPSC-CM mediante inmunofluorescencia	81
Figura 17 Las líneas de iPSC de pacientes con FRDA y los cardiomiocitos derivados de ellas mantienen la reducción en la expresión de frataxina	83
Figura 18 Los iPSC-CM de FRDA presentan una sobreexpresión de una firma de miARN identificados como biomarcadores de FRDA.....	84
Figura 19 Las dianas de los miARN sobreexpresados en la FRDA están relacionadas con la patogénesis cardiovascular.....	86
Figura 20 Cuantificación de la expresión de los genes diana miR-142-3p (<i>CFL2</i> y <i>MYLK</i>) en los iPSC-CM mediante RT-qPCR	88

Figura 21 Cuantificación de la expresión de los genes diana del miR-323-a-3p (<i>CALHM5</i> , <i>CACNA1C</i>) y del miR-142-3p (<i>CACNA1D</i> , <i>ATP2A2</i>) relacionados con la homeostasis del Ca ²⁺ en los iPSC-CM mediante RT-qPCR.....	89
Figura 22 Los iPSC-CM de FRDA muestran alteraciones en el latido cardíaco.....	91
Figura 23 Los iPSC-CM de FRDA muestran arritmias en la medida del potencial de acción.....	93
Figura 24 Los iPSC-CM de FRDA muestran alteraciones en los transitorios de Ca ²⁺ intracelular	95
Figura 25 Los iPSC-CM de FRDA presentan una mayor frecuencia de arritmias	96
Figura 26 Los iPSC-CM de FRDA muestran un incremento en la amplitud del transitorio y en la velocidad del flujo de Ca ²⁺ intracelular	97
Figura 27 Los iPSC-CM de FRDA no presentan diferencias con el control en la carga de Ca ²⁺ del RS, aunque muestran un incremento en la actividad de NCX	98
Figura 28 Las mitocondrias de los iPSC-CM de FRDA presentan alteraciones en la morfología y una pérdida de la estructura de las crestas.....	100
Figura 29 Las mitocondrias de los iPSC-CM de FRDA presentan una morfología más alargada que el control, aunque no muestran diferencias en el área mitocondrial.....	101
Figura 30 Los iPSC-CM de la línea FRDA2 presentan una pérdida de la estructura del sarcómero	102
Figura 31 Los iPSC-CM de FRDA muestran una tendencia al acortamiento del sarcómero.....	103
Figura 32 La cofilina 2 (CFL2) es más abundante en el plasma de pacientes con FRDA que en el de los controles sanos.....	105
Figura 33 Los niveles de CFL2 se correlacionan inversamente con la edad en el caso de los pacientes, pero no en el caso de los controles.....	106
Figura 34 Los niveles de CFL2 no dependen del sexo de los pacientes ni del tipo de herencia.....	107
Figura 35 Homogeneidad en los niveles de CFL2 según distintas comorbilidades (cardiomiopatía hipertrófica, diabetes y escoliosis)	108

Figura 36 Los niveles de CFL2 pueden indicar alteraciones en el segmento ST/T del electrocardiograma en pacientes con FRDA.....	109
--	------------

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 | Estudios basados en cardiomiocitos derivados de iPSC para el estudio de la patología de la FRDA..... 35

Tabla 2 | Características principales de las líneas celulares iPSC empleadas. 44

Tabla 3 | Características clínicas de los pacientes de FRDA cuyo plasma fue utilizado para el estudio 44

Tabla 4 | Anticuerpos primarios utilizados 45

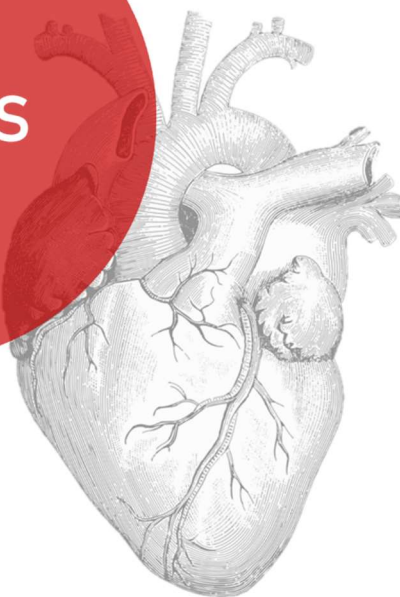
Tabla 5 | Anticuerpos secundarios utilizados 46

Tabla 6 | Secuencia de los cebadores de PCR utilizados 46

Tabla 7 | Datos de los miARN cuantificados en el modelo de iPSC-CM 58

Tabla 8 | Composición de la solución de Tyrode..... 64

ANEXOS



ANEXOS

ANEXOS I. Análisis estadístico

Caracterización iPSC e iPSC-CM							
<i>POU5F1</i>		iPSC Control	CM Control	iPSC FRDA1	CM FRDA1	iPSC FRDA2	CM FRDA2
	media	1,003	0,1302	0,9906	0,1547	1,004	0,08559
	SEM	0,01836	0,02251	0,03187	0,01363	0,02029	0,03195
	n	4	7	3	2	3	4
	p-valor		<0,0001		0,0003		<0,0001
	significancia		***		***		***
<i>NANOG</i>		iPSC Control	CM Control	iPSC FRDA1	CM FRDA1	iPSC FRDA2	CM FRDA2
	media	1,003	0,3697	1,057	0,2193	1,004	0,3715
	SEM	0,01337	0,09663	0,04844	0,08715	0,03894	0,1232
	n	4	7	3	3	3	4
	p-valor		0,0009		0,0011		0,0082
	significancia		***		**		**
<i>TNNI2</i>		iPSC Control	CM Control	iPSC FRDA1	CM FRDA1	iPSC FRDA2	CM FRDA2
	media	1,032	890,7	0,9391	542,8	1,004	653,7
	SEM	0,06446	227,5	0,03386	169,4	0,07972	231,3
	n	4	7	3	3	3	4
	p-valor		0,0179		0,0329		0,0477
	significancia		*		*		*

<i>ACTA2</i>		iPSC Control	CM Control	iPSC FRDA1	CM FRDA1	iPSC FRDA2	CM FRDA2
	media	1	437	0,9615	312,1	0,9933	396,4
	SEM	0,004907	92,3	0,0323	34,8	0,06154	19,15
	n	3	5	3	3	3	3
	p-valor		0,0122		0,0009		<0,0001
	significancia		*		***		***
<i>MYL2</i>		iPSC Control	CM Control	iPSC FRDA1	CM FRDA1	iPSC FRDA2	CM FRDA2
	media	1	23,62	1,074	55,49	0,9833	14,78
	SEM	0,05443	10,84	0,0536	21,34	0,02351	2,794
	n	3	5	3	3	3	3
	p-valor		0,0357		0,0633		0,1728
	significancia		*		n.s.		n.s.
<i>FXN</i>		iPSC Control	iPSC FRDA1	iPSC FRDA2	CM Control	CM FRDA1	CM FRDA2
	media	1,003	0,3883	0,1965	1,002	0,4363	0,316
	SEM	0,01194	0,03952	0,02421	0,01816	0,09688	0,0746
	n	4	2	3	6	3	4
	p-valor		<0,0001	<0,0001		<0,0001	<0,0001
	significancia		***	***		****	****

miARN							
miR-128-3p	Control	FRDA1	FRDA2	miR-330-3p	Control	FRDA1	FRDA2
media	1	1,919	1,375	media	1	1,191	2,073
SEM	0,0791	0,2267	0,3061	SEM	0,07158	0,135	0,4261
n	7	3	3	n	7	4	4
p-valor		0,0167	0,0333	p-valor		0,1994	0,0061
significancia		*	*	significancia		ns	**
miR-625-3p	Control	FRDA1	FRDA2	miR-323a-3p	Control	FRDA1	FRDA2
media	1	1,705	3,739	media	1	11,72	4,794
SEM	0,07064	0,1514	0,6889	SEM	0,1281	4,648	1,567
n	6	4	4	n	7	4	4
p-valor		0,0015	0,0095	p-valor		0,0061	0,0061
significancia		**	**	significancia		**	**
miR-151-5p	Control	FRDA1	FRDA2	miR-142-3p	Control	FRDA1	FRDA2
media	1	1,221	2,112	media	1	11,72	4,794
SEM	0,1003	0,1478	0,2885	SEM	0,1281	4,648	1,567
n	7	4	4	n	7	4	4
p-valor		0,2339	0,0016	p-valor		0,0061	0,0061
significancia		ns	**	significancia		**	**

Dianas miARN							
<i>CFL2</i>	Control	FRDA1	FRDA2	<i>MYLK</i>	Control	FRDA1	FRDA2
media	1,010	0,8758	0,7153	media	0,9620	12,34	10,08
SEM	0,06462	0,2644	0,04717	SEM	0,1404	6,163	3,722
n	6	4	4	n	5	4	3
p-valor		0,6095	0,0107	p-valor		0,0159	0,0357
significancia		ns	*	significancia		*	*
<i>CACNA1C</i>	Control	FRDA1	FRDA2	<i>CACNA1D</i>	Control	FRDA1	FRDA2
media	1,215	0,7643	0,558	media	1,048	0,1630	0,3907
SEM	0,281	0,32	0,09057	SEM	0,1780	0,01814	0,1048
n	5	3	4	n	5	4	3
p-valor		0,3467	0,0855	p-valor		0,0159	0,0357
significancia		ns	ns	significancia		*	*
<i>ATP2A2</i>	Control	FRDA1	FRDA2	<i>CALHM5</i>	Control	FRDA1	FRDA2
media	1,230	0,5817	0,4138	media	1,192	11,2	2,345
SEM	0,2298	0,1257	0,04634	SEM	0,3153	3,31	0,7586
n	5	3	4	n	5	3	4
p-valor		0,089	0,0174	p-valor		0,0095	0,1466
significancia		ns	*	significancia		**	ns

Latido													
Frecuencia	Control			FRDA1					FRDA2				
	media	SEM	n	media	SEM	n	p-valor	significancia	media	SEM	n	p-valor	significancia
d12	0,9308	0,0618	3	1,0747	0,1808	3	0,4933		0,7424	0,0000	1		

d14	1,0449	0,0958	5	1,1756	0,2750	4	0,6370		1,1181	0,2702	3	0,7663	
d16	1,3434	0,1929	5	1,0896	0,2824	4	0,4680		1,2667	0,0524	3	0,7779	
d19	1,0977	0,0532	5	0,5472	0,1817	4	0,0145	*	1,3852	0,0264	3	0,0079	**
d21	0,8709	0,0461	5	0,5537	0,0985	4	0,0164	*	1,5683	0,2270	3	0,0076	**
d23	0,6401	0,1334	4	0,4708	0,0303	4	0,2621		1,5628	0,0553	3	0,0025	**
d26	0,8273	0,0955	5	0,5678	0,0603	4	0,0683		1,5007	0,1059	3	0,0040	**
Amplitud	Control			FRDA1					FRDA2				
	media	SEM	n	media	SEM	n	p-valor	significancia	media	SEM	n	p-valor	significancia
d12	13,7278	3,7276	3	10,5748	3,5297	3	0,5723		14,6641	0,0000	1		
d14	24,0504	4,8639	5	14,1368	2,4844	4	0,1386		25,1531	2,0503	3	0,8738	
d16	20,0056	2,7044	5	14,6641	2,7395	4	0,2129		26,7912	2,3204	3	0,1394	
d19	21,0887	2,9462	5	13,8920	2,3518	4	0,1096		24,8633	2,8282	3	0,4277	
d21	23,0916	2,7946	5	14,2682	1,5154	4	0,0372	*	23,8539	2,7792	3	0,8633	
d23	19,3896	1,4496	4	15,6441	2,1571	4	0,1996		26,2864	1,2674	3	0,0188	*
d26	20,3513	0,9635	5	14,8548	1,7855	4	0,0238	*	23,7376	1,6205	3	0,1006	
Tiempo de pico	Control			FRDA1					FRDA1				
	media	SEM	n	media	SEM	n	p-valor	significancia	media	SEM	n	p-valor	significancia
d12	0,9330	0,1066	3	0,6402	0,0957	3	0,1105		1,0495	0,0000	1		
d14	0,9503	0,1209	5	0,6089	0,0545	4	0,0511		0,7489	0,1267	3	0,3204	
d16	0,7312	0,0821	5	0,8264	0,1135	4	0,5079		0,7095	0,0243	3	0,8509	
d19	0,8845	0,0369	5	1,0608	0,1056	4	0,1268		0,8376	0,1277	3	0,6721	
d21	1,0356	0,0511	5	1,2497	0,0968	4	0,0760		0,6561	0,0483	3	0,0026	*
d23	1,5032	0,3031	4	1,1712	0,1279	4	0,3519		0,6764	0,0475	3	0,0705	
d26	1,0058	0,0823	5	1,1226	0,1903	4	0,5609		0,8370	0,0511	3	0,1955	

Tiempo de sístole	Control			FRDA1					FRDA2				
	media	SEM	n	media	SEM	n	p-valor	significancia	media	SEM	n	p-valor	significancia
d12	0,5321	0,0892	3	0,3261	0,0516	3	0,1162		0,5787	0,0000	1		
d14	0,6687	0,2006	5	0,3295	0,0452	4	0,1851		0,3818	0,0760	3	0,3339	
d16	0,2978	0,0393	5	0,4981	0,0973	4	0,0762		0,3197	0,0623	3	0,7633	
d19	0,4437	0,0215	5	0,6335	0,0779	4	0,0347	*	0,3631	0,0675	3	0,2076	
d21	0,4835	0,0147	5	0,7604	0,0794	4	0,0062	**	0,3259	0,0460	3	0,0067	**
d23	0,7584	0,2322	4	0,6880	0,1099	4	0,7931		0,3732	0,0738	3	0,2296	
d26	0,5096	0,0454	5	1,0606	0,2867	4	0,0692		0,3754	0,0483	3	0,1038	
Tiempo de diástole	Control			FRDA1					FRDA2				
	media	SEM	n	media	SEM	n	p-valor	significancia	media	SEM	n	p-valor	significancia
d12	0,4980	0,0970	3	0,3283	0,0517	3	0,1975		0,4668	0,0000	1		
d14	0,4688	0,0696	5	0,3089	0,0306	4	0,0967		0,3671	0,0534	3	0,3515	
d16	0,4337	0,0536	5	0,2969	0,0223	4	0,0695		0,3901	0,0449	3	0,5997	
d19	0,4408	0,0222	5	0,4207	0,0506	4	0,7056		0,4866	0,0784	3	0,5042	
d21	0,5543	0,0609	5	0,4930	0,0397	4	0,4541		0,3302	0,0216	3	0,0352	
d23	0,7447	0,0752	4	0,4839	0,0773	4	0,0520		0,3398	0,0301	3	0,0072	**
d26	0,5005	0,0408	5	0,3544	0,0262	4	0,0255	*	0,4699	0,0288	3	0,6180	

Transitorios Ca ²⁺								
Amplitud transitorio (F/F0)	Control	FRDA1	FRDA2	Carga Ca ²⁺ RS (F/F0)		Control	FRDA1	FRDA2
media	3,76	5,635	4,82	media		9,242	7,043	8,481
SEM	0,3013	0,3061	0,3373	SEM		1,642	0,4741	1,492

n	4	4	4	n	3	3	3
p-valor		0,0047	0,0574	p-valor		0,35	0,8232
significancia		**	*	significancia		ns	ns
Tiempo al pico (ms)	Control	FRDA1	FRDA2	Tau cafeína (ms)	Control	FRDA1	FRDA2
media	202,2	109,6	84,71	media	1828	1255	1066
SEM	12,22	16,45	14,36	SEM	83,85	194,2	97,45
n	4	4	4	n	3	3	3
p-valor		0,004	0,0008	p-valor		0,0569	0,0388
significancia		**	***	significancia		ns	*
D50 (ms)	Control	FRDA1	FRDA2	Liberación fraccionada (%)	Control	FRDA1	FRDA2
media	517,6	223	197,7	media	54,33	53,84	47,21
SEM	79,09	26,39	18,15	SEM	3,194	4,505	2,588
n	4	4	4	n	3	3	3
p-valor		0,0123	0,0286	p-valor		0,9935	0,1939
significancia		*	*	significancia		ns	ns

Ultraestructura mitocondrias									
	Longitud mitocondria			Circularidad			Área mitocondria		
	Control	FRDA1	FRDA2	Control	FRDA1	FRDA2	Control	FRDA1	FRDA2
media	0,4188	0,6007	0,5989	0,6739	0,6040	0,6114	0,1092	0,1166	0,1269
SEM	0,02769	0,04717	0,04673	0,01813	0,02580	0,02310	0,05029	0,06363	0,08002
n	49	49	48	68	49	58	68	49	58
p-valor		0,0046	0,0005		0,0315	0,0492		0,8483	0,3270
significancia		**	***		*	*		n.s.	n.s.

Estructura sarcómero			
Longitud sarcómero	Control	FRDA1	FRDA2
media	1,817	1,755	1,478
SEM	0,009282	0,02255	0,2038
n	3	3	3
p-valor		0,0638	0,1808
significancia		n.s.	n.s.

CFL2 como biomarcador					
ELISA	Control	FRDA	Western blot	Control	FRDA
media	100	108	media	100	185
SEM	1,378	2,597	SEM	13,71	13,16
n	15	15	n	3	4
p-valor		0,0191	p-valor		0,0071
significancia		*	significancia		**
Edad y OD	Control	FRDA	Herencia	Familiar	Esporádico
r Pearson	0,014	-0,5493	media	0,06854	0,07203
Ecuación			SEM	0,001778	0,002986
R2		0,3017	n	8	7
p-valor	0,962	0,0339	p-valor		0,414
			significancia		n.s

Sexo	Mujer	Hombre	Diabetes	No diabetes	Diabetes
media	0,06964	0,07063	media	0,07034	0,06982
SEM	0,002178	0,002653	SEM	0,002297	0,002464
n	7	8	n	10	5
p-valor		>0,9999	p-valor		0,9764
significancia		n.s	significancia		n.s
Cardiomiopatía	No cardiomiopatía	Hipertrófica	Escoliosis	No escoliosis	Diabetes
media	0,06894	0,07287	media	0,06899	0,07076
SEM	0,002002	0,003032	SEM	0,002004	0,002372
n	8	6	n	5	10
p-valor		0,3273	p-valor		0,8365
significancia		n.s	significancia		n.s
Cambios ST/T	No alterado	Alterado	ROC curve cambios ST/T		
media	0,06584	0,07233	Area		0,7917
SEM	0,000651	0,002536	Error estándar		0,1246
n	6	8	95% intervalo confianza		0,5475 - 1,000
p-valor		0,0753	p-valor		0,0707
significancia		n.s	Punto de corte		0,06745
			Sensibilidad		63%
			Especificidad		100%