Hacia un modelo corazón-en-chip vascularizado: primeros pasos para una barrera endotelial funcional

C. Gómez-Moreno[1,2], L. Paz-Artigas[1,3], H. Santander-Badules[2,4], L. Ordovás[2,4,5,6], J. Ciriza[1,3,7].

[1]Grupo TME Lab, Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.

[2]Grupo BSICoS, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IISA), Zaragoza, España.

[3]Grupo TME Lab, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IISA), Zaragoza, España.

[4]Grupo BSICoS, Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.

[5]Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID), Zaragoza, España.

[6]Grupo BSICoS, CIBER-BBN, Zaragoza, España.

[7]Grupo TME Lab, CIBER-BBN, Zaragoza, España.

carolina.gomez@unizar.es

Resumen

El cáncer y las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de mortalidad a nivel mundial, lo que pone en evidencia la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos. Entre otras razones, dicho progreso farmacológico se ve limitado por la carencia de modelos predictivos de la patología cardíaca humana. Este estudio sienta las bases para su desarrollo en forma de corazón-en-chip endotelizado, al esperarse que en la barrera endotelial se establezcan interacciones entre los tres principales tipos celulares cardíacos y mimetice el impedimento natural de la vasculatura sanguínea a la distribución de terapias, uno de los cuellos de botella más generalizados en los ensayos de nuevas terapias avanzadas.

1. Motivación

El cáncer y las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de muerte en el mundo, siendo responsables del 33 y 18% de las defunciones respectivamente [1]. A nivel nacional, y considerando solo las muertes naturales, las cifras ascienden a un 26% en ambos casos [2]. Además, entre los supervivientes del cáncer, la cardiotoxicidad inducida por quimioterapia es potencialmente letal y limita el potencial terapéutico de los agentes antineoplásicos [3]. Este contexto pone en evidencia la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos avanzados para las distintas afecciones cardiacas. Sin embargo, este progreso es limitado por diversos factores, entre los que destacamos la falta de modelos cardíacos humanizados predictivos por su contribución relevante en la alta tasa de fracasos farmacológicos.

Actualmente, en los ensayos preclínicos, se utilizan principalmente sistemas *in vitro* simples (bidimensionales) de células humanas y modelos animales, pero ambos presentan limitaciones ya que, por simplicidad o diferencias entre especies, su precisión es moderada. Por ello, el desarrollo de modelos biomiméticos cardiacos basados en células humanas constituye un área activa de investigación al aumentar la complejidad y minimizar diferencias entre especies [4,5].

En las últimas décadas la modelización *in vitro* del tejido cardiaco humano ha experimentado un gran crecimiento gracias a los avances en el desarrollo de tecnologías de células madre pluripotentes para la obtención de células cardiacas junto con las tecnologías de microfluídica y microfabricación. Esto abre la puerta a oportunidades sin precedentes para la recapitulación biomimética de las características de los tejidos humanos *in vitro.*

Algunas de las estrategias que abordan la integración de las tecnologías mencionadas para la modelización del tejido cardiaco humano son las basadas en la ingeniería de tejidos tridimensionales y los órganos-en-chip [6,7]. Uno de los últimos modelos tridimensionales descritos consiste en tejido cardiaco miniaturizado, autoorganizado y desarrollado mediante micro-bioingeniería, pero presenta limitaciones en cuanto a la monitorización precisa de la organización de los diferentes tipos celulares y la recreación de algunas patologías cardiacas como la isquemia [8].

Resulta evidente la necesidad de modelos cardiacos robustos que además presenten una barrera endotelial íntegra y funcional que imite el impedimento natural a la distribución de las terapias. Estas características los convierte en candidatos ideales para su traslación a la industria farmacéutica para los cribados de nuevos fármacos. Nuestro objetivo es dar los primeros pasos en el establecimiento de un corazón-en-chip (CeC) vascularizado diseñado para modelizar afecciones cardíacas humanas como la cardiotoxicidad inducida por quimioterapia o la isquemia.

2. Materiales y Métodos

2.1. Células cardiacas humanas

Se obtuvieron células humanas cardiacas de distintos linajes: cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas (iCM), fibroblastos cardíacos (FC) y células endoteliales de la arteria coronaria humanas primarias (hCAEC) (P10460, Innoprot). Estas se caracterizaron mediante citometría de flujo (Galios,

ISBN: 978-84-09-80259-3

Beckman Coulter) determinando la expresión de los marcadores linaje-específicos TNNT2 (anti-TNNT2 1,00 µg/mL, 565618, BD Biosciencies), CD90 (anti-CD90 1,25 µg/mL, 56-0909-42, Thermo Fisher Scientific) y CD31 (anti-CD31 2,50 µg/mL, 25-0311-81, Thermo Fisher Scientific) respectivamente.

2.2. Ensayos de viabilidad basados en la actividad metabólica

Las células endoteliales (CEs) se sembraron en monocapa a 20.000 células/cm^2 en medio P60104 (Innoprot) (medio basal de CEs) sobre pocillos previamente tratados con fibronectina humana (11533610, Fisher Scientific) a una concentración de 0,3 mg/mL e incubados a 37ºC 24 horas antes de la siembra. Los iCMs (2.000 células/µL) y FCs (5.000 células/µL) se embebieron en una matriz de colágeno tipo I (CLS354249-1EA, Merck Science) a concentración 2 mg/mL en medio RPMI (A28139434, Life Techonologies) suplementado con B27 1x (A28139434, Life Technologies) (medio basal de iCMs) y DMEM *low glocose* (11880-028, Gibco) con 0,5 ng/mL FGF- β (130-093-838, Miltenyi Biotec) y 2,5 mM glutamina (25030-24, Gibco) (medio basal de FCs), respectivamente. Al día siguiente (día 0 del ensayo de viabilidad), a todos los tipos celulares se les cambió su medio basal por distintos medios candidatos de co-cultivo: medio A (RPMI, B27 1x, 2% SFB), medio B (RPMI, B27 1x, 2% SFB, 5 ng/mL de FGF-β), medio C (RPMI, B27 1x, 2% SFB, 50 ng/mL VEGF (100-20-50UG, Life Technologies) y medio D (RPMI, B27 1x, 2% SFB, 5 ng/mL de FGF-β, 50 ng/mL VEGF). Las células se cultivaron durante 7 días más refrescando los medios periódicamente. A día 0 y 7, se realizó el ensayo de viabilidad con resazurina. En breve, las células se incubaron 2 horas a 37ºC en medio fresco con resazurina 44 mM (B21187.03, Life Techonologies). Posteriormente se cuantificó la fluorescencia de resorufina en el medio ($\lambda_{excitación}$= 560 nm y $\lambda_{emisión}$= 590 nm) utilizando el Multimode Microplate Reader BioTek Synergy H1 (Agilent) y se calculó el porcentaje de actividad metabólica a día 7 en cada medio con respecto a la del día 0. Se realizaron un mínimo de tres experimentos independientes para cada estudio con un mínimo de 4 replicados en cada uno.

2.3. Ensayos de permeabilidad de barrera

En insertos con poro de 0,4 µm (10482181, Fisher Scientific), previamente recubiertos con fibronectina humana, se sembraron 100.000 CEs/cm^2 en su medio basal. Tras 24 horas se cambió al medio de co-cultivo C. Tras 2 y 6 días se realizó el ensayo de permeabilidad utilizando un dextrano de 70 kDa marcado con TRITC (D1819, ThermoFisher) a una concentración de 0,1 mg/mL. Para ello se recogieron alícuotas de medio de la cámara inferior a las 2, 8 y 24 horas y se cuantificó la intensidad de fluorescencia del dextrano en el Multimode Microplate Reader BioTek Synergy H1 (Agilent) a $\lambda_{excitación}$= 544 nm, y $\lambda_{emisión}$= 585 nm. Se realizaron tres experimentos independientes para cada estudio con un mínimo de 3 replicados en cada uno. Para cada día del ensayo y tiempo estudiado se calculó la relación de fluorescencia respecto a la concentración máxima de la cámara superior.

2.4. Inmunofluorescencia

Se sembraron 100.000 células/cm^2 CEs en placas multipocillo (C18-1.5H, Cellvis) previamente recubiertas con fibronectina humana en el medio de co-cultivo C. Tras 1, 4 y 8 días desde la siembra se fijaron con para-formaldehído al 4% (sc-281692, Biogen Cientifica) y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-VE-Cadherina [1:200] (D87F2, Cell Signaling Technology) y anti-ZO-1 [1:200] (ZO1-1A12, ThermoFisher) a 4ºC durante la noche. Posteriormente, se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios anti-conejo IgG marcado con Alexa Fluor™ Plus 555 [1:500] (A32794, Thermo Fisher) y anti-ratón IgG marcado con Alexa Fluor™ Plus 647 [1:500] (A32787, Thermo Fisher). Finalmente se aplicó la tinción de contraste nuclear DAPI 1 mg/mL (ab228549, Abcam) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La adquisición de imágenes se realizó en el microscopio de fluorescencia (MICA WideFocal, Leica Microsystems). Las imágenes se analizaron con el software LAS X Life Science (Leica Microsystems).

2.5. Endotelización del chip

En primer lugar, se confinó un hidrogel de colágeno tipo I a la concentración de 2 mg/mL en la cámara central del dispositivo Be-Gradient Standard (Beonchip, Figura 3A). Posteriormente, se recubrió el canal lateral con fibronectina humana y se sembraron 200.000 CEs/plano del canal en su medio basal marcadas con 5 µg/mL de lectina WGA conjugada con CF®633 (29024-1, VWR) durante 2 horas en tres rondas consecutivas para cubrir los tres planos del canal respectivamente. Después de 24 horas, se añadió medio fresco suplementado con 0,1 mg/mL de dextrano 70 kDa marcado con TRITC a los canales laterales durante un lapso de 120 minutos. Los chips se observaron mediante microscopía confocal (Eclipse TE2000-S, Nikon) a lo largo del tiempo.

2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism 8. Para los datos del ensayo de viabilidad se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, seguida de comparaciones múltiples mediante la prueba de Dunn post hoc. Para los datos del ensayo de permeabilidad se utilizó el test ANOVA bifactorial y la prueba de Sidak para las comparaciones múltiples. En ambos ensayos el umbral mínimo de significación para todos los casos se estableció en $P<0.05$.

3. Resultados y Discusión

3.1. Determinación del medio de co-cultivo

El inmunofenotipado por citometría de flujo confirmó el fenotipo linaje-específico de los tres tipos celulares. Específicamente, más del 99% de la progenie derivada de iPSC humanas eran TNNT2$^+$, un 81% de los FCs eran CD90$^+$ y el 85% de células CEs eran CD31$^+$.

Uno de los pasos iniciales en el desarrollo del CeC es la elección de un medio de co-cultivo apropiado y definido para todos los tipos celulares del sistema [9]. Se definieron distintos medios de co-cultivo basados en la combinación

ISBN: 978-84-09-80259-3

de componentes de los medios de cada tipo celular individual (medios A-D). El estudio de viabilidad celular basado en la actividad metabólica indicó que los iCMs presentan un aumento significativo de actividad metabólica en los medios de cultivo B y D, con respecto a su medio basa, mientras que A y C la mantiene constante (Figura 1A). Los FCs mostraron un cambio significativo de actividad metabólica solo en el medio A comparado con su medio basal (Figura 1B). Las CEs disminuyeron su actividad metabólica con el tiempo en todos los medios de manera significativa con respecto a su medio basal (Figura 1C).

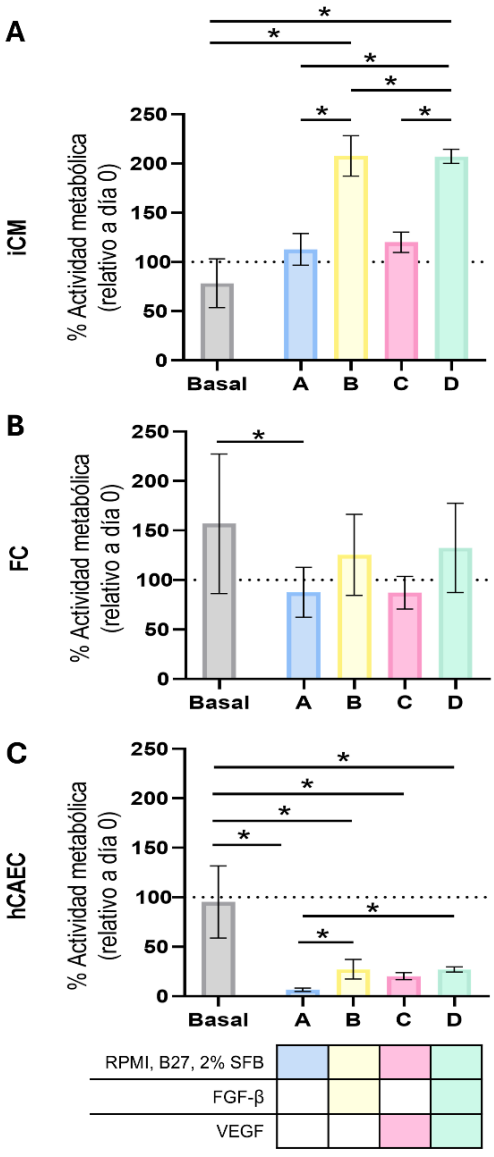


Figura 1. *Viabilidad de (A) iCMs, (B) FCs y* (C) *ECs tras 7 días en cultivo con sus respectivos medios de cultivo (Basal) y los medios de co-cultivo A, B, C y D. *: p<0,05.*

Aunque los efectos de FGF-β en los iCMs son complejos, se ha demostrado que promueve la viabilidad celular y en altos niveles da lugar a hipertrofia y fibrosis [10]. Los medios A y C, carentes de FGF-β, no inducen cambios metabólicos y/o proliferativos en los iCMs, lo que habilita su uso para el establecimiento de modelos de afecciones cardiacas, incluidos los de regeneración tisular. El medio C mantiene estables los cultivos de FCs en comparación con su medio basal, ajustándose también a este requerimiento. El resultado observado en las CEs en los medios A-D podría indicar una reducción de actividad metabólica sin aumento de la proliferación celular inducidos por su formulación más simple comparado con su medio basal (de composición desconocida). En conjunto, se definió finalmente el medio C como medio de co-cultivo de las tres líneas celulares.

3.2. Caracterización de la barrera funcional

Debido al descenso de viabilidad observado en el medio de co-cultivo C de las CEs con el tiempo, se comprobó su capacidad para formar y mantener una barrera endotelial funcional. En modelos estáticos con inserto, la barrera endotelial fue capaz de aumentar significativamente la impermeabilidad del dextrano de 70 kDa en diferentes puntos temporales (Figura 2A). Además, se comprobó la existencia de uniones adherentes y estrechas, más abundantes las primeras, entre las células endoteliales hasta 8 días (Figura 2B). Estas interacciones intercelulares son imprescindibles para sellar las células en una barrera funcional [11]. En conjunto se concluye que el medio C soporta el mantenimiento de una barrera endotelial funcional hasta 8 días.

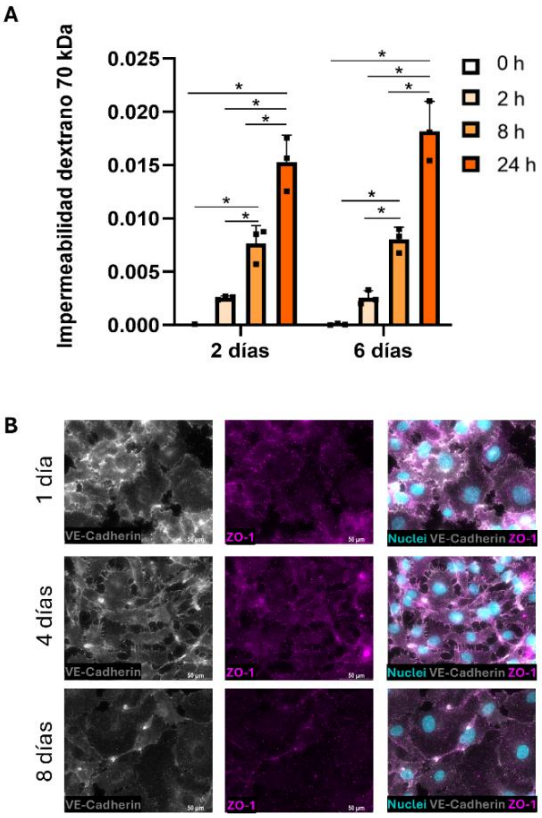


Figura 2*. (A) Caracterización del modelo estático de barrera de CEs con el medio C representado como el grado de impermeabilidad del dextrano de 70 kDa tras 2 y 6 días de cultivo. *p<0,05 (B) Imágenes representativas de la expresión de VE-Cadherina (uniones adherentes) y ZO-1 (uniones estrechas) a partir del cultivo de CEs en medio C obtenidas por inmunofluorescencia tras 1, 4 y 8 días desde la siembra.*

ISBN: 978-84-09-80259-3

3.3. Endotelización de los canales laterales

En paralelo a la identificación del medio de co-cultivo, se establecieron las condiciones de formación de la barrera endotelial en el sistema microfluídico (Figura 3A). Para ello se embebió en la cámara central un hidrogel de colágeno (similar al que albergará los iCMs y FCs en el sistema completo) y se aplicaron distintas condiciones de siembra de CEs hasta definir aquellas que dan una cobertura continua del canal (Figura 3B-C). Esta barrera endotelial muestra capacidad de exclusión del dextrano de 70 kDa durante 120 minutos, demostrando su integridad a corto plazo.

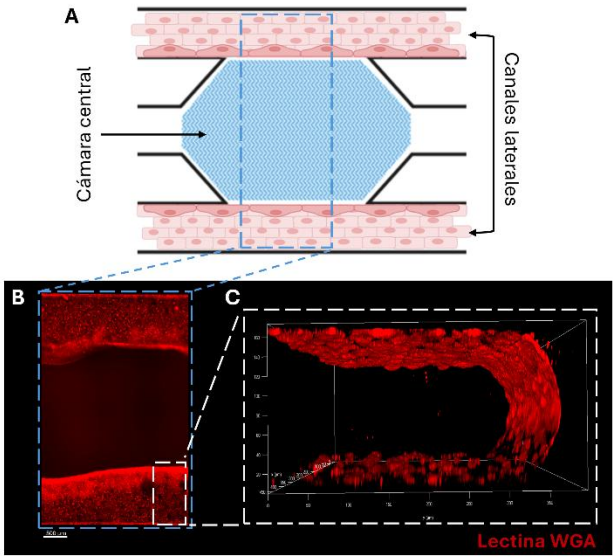


***Figura 3**. (A) Esquema del dispositivo microfluídico Be-Gradient Standard (Beonchip) con hidrogel de colágeno en la cámara central y CEs en los canales laterales. (B) Imagen de las CEs marcadas con WGA tras la incubación en los canales laterales del dispositivo tomada desde la parte superior del dispositivo a 10x aumentos. (C) Imagen lateral de los canales obtenida por apilamiento en Z a 25x aumentos.*

4. Conclusiones

En este estudio se ha establecido un medio de co-cultivo que soporta la formación de una barrera endotelial funcional en condiciones estáticas además de un procedimiento para endotelizar los canales laterales del dispositivo microfluídico. Estos datos proporcionan evidencia inicial de la capacidad para crear un corazón-en-chip con una barrera vascular funcional.

Agradecimientos

Este trabajo ha contado con el apoyo económico de la subvención PID2022-139859OB-I00 financiada por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y FEDER/UE. Carolina Gómez-Moreno fue financiada en 2024 con becas de prácticas para el desarrollo del Trabajo Fin de Máster del Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A) en colaboración con las Cátedras de Transformación Industrial y URBASER. En 2025 fue beneficiaria con una beca predoctoral del Gobierno de Aragón (CPB_27_24).

Los autores agradecen el apoyo ofrecido por los Servicios Científico Técnicos del Centro de Investigación Biomédica de Aragón del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS), en particular a los servicios de Separación celular y citometría y Proteómica, y a los Servicios de Apoyo a la Investigación del I3A-NANBIOSIS, en particular a la Unidad de Caracterización Tisular.

Referencias

[1]. World Heart Federation, About the World Heart Federation [Disponible en: https://world-heart-federation.org/about-whf/] (Consultada: 2024).

[2]. Instituto Nacional de Estadística (INE), Estadísticas de defunciones según causa de muerte [Disponible en: https://www.ine.es/dyngs/Prensa/pEDCM2023.htm#:~:text=En%20el%20a%C3%B1o%202023%20se%20produjeron%2017.737%20fallecimientos%20por%20causas,5%2C0%25%20menos] (Consultada: 2024).

[3]. S. E. Lipshultz et al., "Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia," J. Clin. Oncol., vol. 23, pp. 2629–2636, 2005.

[4]. A. Eder, I. Vollert, A. Hansen y T. Eschenhagen, "Human engineered heart tissue as a model system for drug testing," Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 96, pp. 214–224, 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.05.010.

[5]. L. Paz-Artigas, P. Montero-Calle, O. Iglesias-García, M. M. Mazo, I. Ochoa y J. Ciriza, "Enfoques actuales para la recreación del entorno isquémico cardiaco in vitro," Int. J. Pharm., vol. 632, 122589, 2023.

[6]. M. L. Rexius-Hall, N. N. Khalil, S. S. Escopete, X. Li, J. Hu, H. Yuan et al., "A myocardial infarct border-zone-on-a-chip demonstrates distinct regulation of cardiac tissue function by an oxygen gradient," Sci. Adv., vol. 8, no. 49, 2022.

[7]. J. Lee, S. Mehrotra, E. Zare-Eelanjegh, R. O. Rodrigues, A. Akbarinejad, D. Ge et al., "A Heart-Breast Cancer-on-a-Chip Platform for Disease Modeling and Monitoring of Cardiotoxicity Induced by Cancer Chemotherapy," Small, vol. 17, no. 15, 2021

[8]. C. Cofiño-Fabres, T. Boonen, J. M. Rivera-Arbeláez, M. Rijpkema, L. Blauw, P. C. N. Rensen, V. Schwach, M. C. Ribeiro y R. Passier, "Micro-Engineered Heart Tissues On-Chip with Heterotypic Cell Composition Display Self-Organization and Improved Cardiac Function," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 13, no. 18, art. e2303664, Jul. 2024, doi: 10.1002/adhm.202303664.

[9]. C. M. Leung, P. de Haan, K. Ronaldson-Bouchard, G.-A. Kim, J. Ko, H. S. Rho, Z. Chen, P. Habibovic, N. L. Jeon, S. Takayama, M. L. Shuler, G. Vunjak-Novakovic, O. Frey, E. Verpoorte y Y.-C. Toh, "A guide to the organ-on-a-chip," *Nat. Rev. Methods Primers*, vol. 2, no. 1, art. 33, 12 May 2022, doi: 10.1038/s43586-022-00118-6

[10]. Nobuyuki Itoh, Hiroya Ohta, Yoshiaki Nakayama y Morichika Konishi, "Roles of FGF Signals in Heart Development, Health, and Disease," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 4, art. 110, 18 Oct. 2016, doi: 10.3389/fcell.2016.00110

[11]. R. Bednarek, "In Vitro Methods for Measuring the Permeability of Cell Monolayers," *Methods Protoc.*, vol. 5, no. 1, art. 17, 9 Feb. 2022, doi: 10.3390/mps50100