



**CONVENIO ESPECÍFICO DE COLABORACIÓN ENTRE EL CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES CARLOS III (F.S.P.) Y LA FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE ANDALUCÍA ORIENTAL- ALEJANDRO OTERO - FIBAO**

En Madrid a 10 de diciembre de 2018

**De una parte;**

en calidad de Director Gerente y en nombre y representación del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (F.S.P.), en acrónimo y en adelante CNIC, con CIF G-82316753, clasificada como "Fundación Pública de carácter docente e investigación" con el número MAD-1-3-593 y domiciliada en Madrid, calle Melchor Fernández Almagro, 3, 28029 MADRID, y en nombre y representación de la misma, y en virtud de las atribuciones y facultades bastantes que tiene conferidas y otorgadas ante el Notario de Madrid el 14 de Diciembre de 2012, con el número de su protocolo 4.193.

**De otra parte:**

actuando en nombre y representación de la FUNDACION PÚBLICA ANDALUZA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE ANDALUCÍA ORIENTAL-Alejandro Otero - en adelante FIBAO, con domicilio en Avenida de las Fuerzas Armadas, 2 18014 Granada en su calidad de Presidente de la Fundación en virtud de las atribuciones que tiene conferidas por razón de su cargo a tenor de lo establecido en los Estatutos Fundacionales, cargo aceptado mediante escritura pública de poder otorgada ante el Notario de Granada, con 19 DE ENERO DE 2017 bajo el número de su protocolo 96.

FIBAO, que, según el acuerdo de colaboración firmado el 14 de Marzo de 2012 entre la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, la Universidad de Granada, el Servicio Andaluz de Salud y la Fundación Pública para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental - Alejandro Otero, confiere la personalidad jurídica al Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (en adelante ibs.GRANADA).

Por último, a los efectos de garantizar el conocimiento y aceptación del contenido del presente documento,

como Director Científico del ibs.GRANADA, según nombramiento del. Ratificado por el Consejo Rector de 14 de Mayo de 2018

Las partes se reconocen capacidad plena para suscribir este convenio y

## EXPONEN

I.- Que ambas instituciones tienen suscrito el *CONVENIO MARCO DE COLABORACIÓN ENTRE EL CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES Y LA FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE ANDALUCÍA ORIENTAL Y EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE GRANADA* de fecha de 03 de Abril 2018

II.- Que la cláusula segunda del citado convenio marco titulada “**Actividades de interés común inicial**”, establece que “Sin perjuicio de que la colaboración entre ambas entidades se amplíe a todos los campos de interés común, este se centrará inicialmente en las siguientes áreas: a) Participación conjunta en proyectos de investigación común, que incluyen proyectos de investigación clínica a través de hospitales y centros sanitarios entre el CNIC y FIBAO; b) Colaboración en programas de alta especialización de personal; c) Colaboración en el desarrollo conjunto de actividades científicas y de formación; d) Colaboración en el desarrollo conjunto de actividades de divulgación y prevención”.

En ejecución de todo ello, las partes, de mutua conformidad, convienen en suscribir este Convenio específico, que se regirá por las siguientes

## CLÁUSULAS

### Primera.- Objeto del Convenio.

El presente Convenio tiene por objeto el desarrollo de un proyecto de investigación traslacional de colaboración científica según se describe en el Anexo I. El proyecto se centra en el estudio de los mecanismos patogénicos por los que mutaciones en *FLNC* conducen al desarrollo de miocardiopatía, y más específicamente los mecanismos que implican un incremento del riesgo arrítmico en el fenotipo de miocardiopatía arritmogénica de predominio izquierdo. El convenio contempla el uso de nuevas estrategias experimentales y de análisis, combinadas con imágenes de alta resolución de cartografía óptica y estudio a nivel celular con técnica de ‘*patch-clamp*’.

Los Doctores \_\_\_\_\_ como investigadores de CNIC, y  
el \_\_\_\_\_ como investigador del Hospital Universitario Virgen de las

Nieves de Granada, dirigirán los trabajos entre ambas instituciones con los siguientes objetivos generales:

- (1) Identificar y caracterizar clínicamente (historia clínica, electrocardiografía, ecocardiografía, resonancia magnética), de entre una población de pacientes con miocardiopatía arritmogénica, sujetos portadores de variantes en FLNC tipo truncamiento o nonsense.
- (2) Identificar los mecanismos patogénicos celulares que subyacen al elevado riesgo arrítmico de los pacientes con variantes nonsense en FLNC en líneas de células madre pluripotentes humanas inducidas (iPS) hacia cardiomiocitos.
- (3) Poner de manifiesto la correlación de las características clínicas con los hallazgos funcionales identificados.

La dirección específica del proyecto de colaboración se vincula a cada uno de los investigadores de tal forma que:

- [redacted] será el coordinador de los siguientes objetivos específicos:
  - Evaluar la influencia de la fibrosis en el potencial arrítmico de la miocardiopatía arritmogénica asociada a variantes en el gen FLNC, en monocapas de células madre pluripotentes humanas inducidas (iPS) diferenciadas a cardiomiocitos.
- [redacted] será el coordinador de los siguientes objetivos específicos:
  - Evaluar la influencia de las variantes radicales en FLNC sobre la arquitectura y función celular: citoesqueleto, sarcómero, disco intercalar y núcleo celular en iPS diferenciadas a cardiomiocito.
  - Estudiar el potencial sustrato arrítmico de la enfermedad mediante el análisis de los cambios en la mecanotransducción, en las uniones intercelulares y las propiedades de los canales iónicos (sodio, potasio, calcio).
  - Identificar marcadores del desarrollo de la enfermedad así como de un incremento del riesgo arrítmico en monocapas de iPS diferenciadas a cardiomiocitos.
- [redacted] será el coordinador de los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollo de sistemas de transferencia basados en vectores 'piggybacks'.

- será el coordinador de los siguientes objetivos específicos:

- Identificación y caracterización clínica de pacientes enfermos y portadores de variantes nonsense en FLNC.

### **Segunda.- Dotación de equipos.**

El laboratorio de Desarrollo Avanzado sobre los Mecanismos y Terapia de las Arritmias, el laboratorio de Arritmias Cardíacas, y el laboratorio de Cardiomiopatías de Origen Genético de CNIC, cuentan con los equipos necesarios para realizar la actividad de investigación descrita en los objetivos específicos.

El grupo de investigación clínica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, dirigido por el \_\_\_\_\_ cuenta igualmente con la dotación material, técnica y numana para la ejecución de los objetivos específicos centrados en la parte clínica.

Este convenio no contempla el traslado de material entre instituciones para la ejecución del proyecto.

### **Tercera.- Entrada en vigor y duración.**

El presente convenio entra en vigor en la fecha de su firma y tendrá una duración de dos años, prorrogándose por periodos iguales si no media denuncia de las partes notificada a la otra con una antelación mínima de tres meses.

### **Cuarta. Régimen Jurídico.**

Cada parte mantiene la titularidad del equipamiento aportado para la ejecución del proyecto y su responsabilidad sobre el aseguramiento del mismo, así como sobre las garantías de seguridad para su utilización por parte del personal.

### **Quinta. Coordinación y contenido.**

Se designa a los *Investigadores* \_\_\_\_\_ por parte de CNIC, y \_\_\_\_\_ por parte del Hospital Virgen de las Nieves, como coordinadores globales de los trabajos de investigación contemplados en la cláusula primera de este convenio específico. Para cualquier incidencia en relación al material utilizado; se designa como responsable por parte de CNIC

a \_\_\_\_\_ en calidad de Director Gerente, y por parte de la FIBAO e ibs.GRANADA será \_\_\_\_\_ en calidad de Presidente, o en su lugar aquellas personas en quienes ambos pudieran delegar.

#### **Sexta. Lugar de ejecución de las investigaciones.**

Las investigaciones, estudios y funciones para los cuales está destinado el presente Convenio, se llevarán a cabo por Investigadores del grupo del laboratorio de Desarrollo Avanzado sobre Mecanismos y Terapias de las Arritmias, del grupo de Arritmias Cardíacas, y del grupo de Cardiomiopatías de Origen Genético, en la sede CNIC, con la colaboración de investigadores del grupo de \_\_\_\_\_ del Hospital Virgen de las Nieves en los aspectos clínicos, previamente acordados entre investigadores. El listado de personal investigador participante se incluye en el Anexo II.

#### **Séptima. Proyectos financiadores.**

Este convenio no incidirá en la ejecución de los proyectos en virtud de los cuales se obtuvo financiación para adquirir el material e infraestructuras necesarios para su desarrollo.

#### **Octava. Ausencia de prestaciones dinerarias.**

La celebración de este convenio no implica prestaciones dinerarias entre las partes. La coordinación, gestión y desarrollo del proyecto se llevará a cabo con fondos propios de los laboratorios de \_\_\_\_\_ (en el Hospital Virgen de las Nieves), \_\_\_\_\_ (en CNIC), \_\_\_\_\_ (en CNIC) y \_\_\_\_\_ (en CNIC) con reparto equitativo en función de la especialización de cada uno de los laboratorios en aspectos específicos del proyecto.

#### **Novena. Titularidad.**

El material instrumental e instalaciones de carácter inventariable que los investigadores obtengan en convocatorias de ayudas públicas o colaboraciones privadas tramitadas o gestionadas será, a todos los efectos, propiedad de la parte que los consiga desde el momento de su adquisición y, en consecuencia, inventariado física y contablemente a nombre de la misma de conformidad con la normativa interna de esta Institución, permaneciendo en su patrimonio tras la finalización de la vigencia del presente convenio.

Cada parte mantiene la titularidad del equipamiento aportado para la ejecución del proyecto y su responsabilidad sobre el aseguramiento del mismo, así como sobre las garantías de seguridad para su utilización por parte del personal.

## **Décima. Derechos de propiedad industrial e intelectual y publicaciones**

Los Conocimientos Previos y los Conocimientos Coetáneos, patentados o no, distintos a los derivados de la ejecución del Proyecto que sean aportados por cada una de las Partes, permanecerán bajo la titularidad de la Parte que los aporte.

Los Resultados del Proyecto serán propiedad de las Partes en régimen de cotitularidad, en función de la aportación de cada una de ellas, lo que será objeto de un Acuerdo de Cotitularidad específico realizado a tal efecto. En cualquier caso ninguna de las Partes cotitulares podrá ejercer su derecho de explotación de manera independiente sin el consentimiento expreso del resto de cotitulares.

En lo que respecta a los derechos inherentes a la autoría se otorgará el reconocimiento correspondiente a quien haya intervenido en la ejecución del Proyecto, que tendrá el derecho moral de autor en la medida y en el porcentaje que le corresponda.

Si como consecuencia de los trabajos desarrollados por el Investigador en el Centro, éste quisiese utilizarlos para su publicación, lectura en una tesis, o cualquier otra forma de difusión, deberá solicitar consentimiento expreso y por escrito a las Partes para la divulgación de los mismos.

En las publicaciones, se respetará siempre la mención a los autores del trabajo. En cualquiera de los casos de difusión de Resultados se hará siempre referencia especial a las Partes y Centros implicados en el desarrollo del Proyecto.

Las Partes respetarán las condiciones suscritas en este Acuerdo, en relación con el reparto de gastos generales de tramitación, solicitud y mantenimiento de cualquier título de Propiedad Industrial e Intelectual en aquellos países donde se realice de común acuerdo a nombre de los cotitulares. El reparto de gastos se realizará en base a los porcentajes participación en la invención pactada de conformidad con el presente Acuerdo.

Si una Parte propietaria de un Resultado decidiese no solicitar protección por cualquier título de Propiedad Intelectual o Industrial o no mantener dicha protección, podrá ofrecer la transferencia de estos derechos a la otra Parte comunicándolo con la suficiente antelación como para permitir la toma de decisiones. En este caso, la Parte interesada podrá obtener la titularidad del

derecho. Las Partes acordarán los términos de la misma en base a un estudio caso por caso.

#### **Decimoprimera. Confidencialidad.**

Ambas partes se comprometen a no revelar a ninguna persona o entidad, durante la vigencia del Convenio y después de su finalización, información alguna referente a los negocios, clientes, operaciones, instalaciones, cuentas o finanzas de ambas instituciones, ni a sus procedimientos, métodos, transacciones o cualquier otro aspecto relacionado con la actividad de dichas entidades que pueda conocer o haya conocido con motivo de este Convenio, y actuará con la mayor diligencia para evitar la publicación o revelación de cualquier información confidencial referente a esas materias.

#### **Decimosegunda. Extinción del Convenio.**

El presente Convenio se resolverá por cualquiera de las siguientes causas:

1. Mutuo consentimiento.
2. Desistimiento unilateral de cualquiera de las partes comunicado a la otra de forma fehaciente con 90 días de antelación.
3. Desaparición, destrucción u obsolescencia de los objetivos científicos objeto del mismo.
4. El incumplimiento por cualquiera de las partes de sus respectivas obligaciones, que dará derecho a la otra a resolver este Convenio sin necesidad de preaviso.

#### **Decimotercera. Comunicación y solución de conflictos.**

Cada parte, a través de sus coordinadores científicos, pondrá en conocimiento de la otra parte cualquier cambio, modificación o reestructuración de los experimentos necesarios para el proyecto de colaboración entre ambos grupos.

Ambas partes se comprometen a solventar de forma amistosa las diferencias que pudieran surgir en la interpretación o ejecución del Convenio.

#### **Décimocuarta. Protección de datos**

De conformidad con las disposiciones de la legislación vigente sobre protección de datos de carácter personal, las Partes se obligan, en relación con (i) los datos personales del resto de Partes o (ii) los datos a los cuales una de las Partes acceda por cuenta de otra Parte con motivo del Acuerdo a:

- a) Tratar los datos únicamente conforme las instrucciones de su titular;
- b) No aplicar o utilizar los datos para fines distintos de los que figuran en el presente Acuerdo;
- c) No comunicar estos datos a Terceros, ni tan solo para su conservación;
- d) Implementar las medidas de seguridad que reglamentariamente sean de aplicación, con el objeto de preservar la integridad, la confidencialidad y disponibilidad de los datos; y
- e) Destruir o devolver los datos a su titular, al igual que cualquier soporte o documento en el que pueda constar algún dato que haya sido objeto de tratamiento una vez finalizado el Acuerdo.
- f) A meros efectos aclaratorios, el Proyecto no supone en ningún caso el tratamiento de datos personales de pacientes o el acceso a los referidos datos por parte de la Compañía. En este sentido, el SAS será el único responsable del tratamiento de dichos datos personales y su anonimización, así como el titular de los ficheros de datos personales que puedan eventualmente originarse durante el Proyecto.

Y en prueba de conformidad con todo lo anterior, las partes suscriben este Convenio por duplicado, pero a un solo efecto, en lugar y fecha *ut supra*.

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (F.S.P.)

Fundación pública andaluza para la investigación biosanitaria de Andalucía Oriental -FIBAO.



Fdo.:  
Director Gerente

Fdo.:  
Presidente

Por el ibs.GRANADA

Fdo.:VºB'

Director Científico del ibs.GRANADA.

## ANEXO I. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

### **Título: Caracterización Funcional e Identificación de Mecanismos Arrítmicos en los Truncamientos de Filamina C (*FLNC*).**

#### INTRODUCCIÓN

El término cardiopatías familiares hace referencia a aquellas enfermedades cardiovasculares que pueden tener un comportamiento hereditario. Todas comparten una base genética, una difícil estratificación pronóstica y pueden debutar como muerte súbita. En base a sus características funcionales y morfológicas, se diferencian 5 fenotipos: miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada (MCD), miocardiopatía arritmogénica (MCA), miocardiopatía restrictiva y miocardiopatías inespecíficas (como la miocardiopatía no compactada).<sup>1</sup>

Una entidad de especial riesgo arrítmico es la MCA. Se define histológicamente por la sustitución progresiva del miocardio funcional por tejido fibroadiposo. Esto conduce al desarrollo de insuficiencia cardíaca, arritmias ventriculares y muerte súbita, especialmente en adultos jóvenes.<sup>2</sup>

Clásicamente se ha asociado con afectación predominante o exclusiva del ventrículo derecho, sin embargo, la generalización del uso de técnicas de imagen como la resonancia magnética cardíaca, y el creciente conocimiento de la correlación clínico-patológica en población enferma no seleccionada, han ampliado el espectro clínico de la enfermedad. Hoy sabemos que la afectación ventricular izquierda puede ser paralela o preceder a la afectación de ventrículo derecho.<sup>3</sup> En general, las formas de MCA de predominio izquierdo presentan una elevada inestabilidad eléctrica con volúmenes ventriculares y función sistólica normales, o ligeramente disminuidos.<sup>4</sup> Trabajos recientes en resonancia magnética también han demostrado la sustitución fibrosa en el miocardio ventricular izquierdo como un marcador precoz de la enfermedad.<sup>5</sup> Además,

estudios genotipo-fenotipo han comprobado una mayor gravedad, especialmente por causa arrítmica, en pacientes con afectación ventricular izquierda.<sup>6</sup>

Históricamente se entendió la enfermedad como una enfermedad “desmosomal”. Sin embargo, el estudio genético con las nuevas técnicas de secuenciación masiva o “*next generation sequencing (NGS)*”, ha ampliado el espectro genético de la enfermedad, habiendo hasta 11 genes descritos en relación con este trastorno.<sup>7</sup> Muchos de estos genes no codifican proteínas del complejo desmosomal y se han relacionado con otros fenotipos, fundamentalmente la MCD (*LMNA/C*, *PLN*, *TTN*, *DES*). Es notorio el reciente avance en el conocimiento de la implicación de genes relacionados con el mantenimiento de la integridad estructural y funcional del miocardiocito en el desarrollo de MCA. Muchos de estos genes codifican proteínas clave en mecanismos de señalización celular, en concreto, la mecanotransducción. Los desmosomas, canales iónicos (especialmente los de sodio) y otros complejos celulares con función estructural, actúan como un único macrocomplejo molecular y la pérdida de su integridad puede involucrar otras estructuras celulares.<sup>8,9</sup>

En línea con lo anteriormente expuesto, en los últimos años se ha descrito la participación de un nuevo gen en el espectro mutacional de la MCA, el gen *FLNC*. Este gen codifica la proteína gamma filamina, expresada principalmente en el tejido muscular y cuya función básica es la actuación como anclaje de las proteínas de membrana al citoesqueleto de filamentos de actina del miocardiocito y al disco intercalar. Previamente mutaciones en este gen se han relacionado con el desarrollo de miopatía esquelética miofibrilar<sup>10</sup> o miocardiopatía hipertrófica.<sup>11</sup> Sin embargo, mutaciones *nonsense* o tipo truncamiento han sido relacionadas con formas de miocardiopatía pura aislada. Estas variantes tipo truncamiento, han sido recientemente reconocidas como la etiología de muchos casos de MCD o MCA con genotipo previamente negativo. La sospecha y análisis de este gen debe ser sistemático en este grupo de pacientes. Su característica principal es su perfil arrítmico, presentando arritmias ventriculares frecuentes y alta tasa de muerte súbita familiar a edades precoces. Amén de un fenotipo de MCD/A con dilatación y disfunción sistólica leve de ventrículo

izquierdo y presencia de abundante fibrosis en el miocardio del ventrículo izquierdo.<sup>12</sup> Actualmente conocemos que la fibrosis es un marcador de riesgo relevante para el desarrollo de arritmias ventriculares y muerte súbita en miocardiopatía no isquémica.<sup>13</sup> A día de hoy son desconocidos los mecanismos patogénicos por los que mutaciones en *FLNC* conducen al desarrollo de miocardiopatía, y más específicamente los mecanismos que implican un incremento del riesgo arrítmico en el fenotipo de MCA de predominio izquierdo.

Por tanto, la hipótesis de este proyecto de investigación es que la grave alteración de los mecanismos de mecanotransducción, la disrupción de la conectividad intercelular y la alteración de las corrientes iónicas, fundamentalmente de sodio, afectan a la propagación del impulso eléctrico y potencial arrítmico en pacientes portadores de mutaciones tipo *nonsense* o truncamiento en el gen *FLNC*.

En esta reciente, y cada vez más identificada enfermedad (*LMNA/C*, *PLN*, *DES*, *TTN*) con fenotipo solapado de MCD/MCA de predominio izquierdo, existe la necesidad del conocimiento de los mecanismos celulares responsables de la elevada carga arrítmica que presenta, más allá de la disfunción ventricular izquierda. El uso de estudios funcionales con modelos animales y la posibilidad de su correlación clínica con población humana ayudará a descifrar los mecanismos patogénicos subyacentes relevantes que conducen al desarrollo de esta enfermedad y la identificación de potenciales dianas terapéuticas.

Los objetivos principales son:

- (1) Identificar y caracterizar clínicamente (historia clínica, electrocardiografía, ecocardiografía, resonancia magnética), de entre una población de pacientes con MCA, sujetos portadores de variantes en *FLNC* tipo truncamiento o *nonsense*.
- (2) Identificar los mecanismos patogénicos celulares que subyacen al elevado riesgo arrítmico de los pacientes con variantes *nonsense* en *FLNC* en líneas de células madre pluripotentes humanas inducidas (iPS) hacia cardiomiocitos.

- (3) Correlación de las características clínica con los hallazgos funcionales identificados.

Los objetivos específicos son:

- (1) Caracterizar clínicamente a los pacientes enfermos y portadores de variantes *nonsense* en *FLNC*.
- (2) Evaluar la influencia de las variantes radicales en *FLNC* sobre la arquitectura y función celular: citoesqueleto, sarcómero, disco intercalar y núcleo celular en iP diferenciadas a cardiomiocito.
- (3) Estudiar el potencial sustrato arrítmico de la enfermedad mediante el análisis de los cambios en la mecanotransducción, en las uniones intercelulares y las propiedades de los canales iónicos (sodio, potasio, calcio).
- (4) Identificar marcadores del desarrollo de la enfermedad así como de un incremento del riesgo arrítmico en monocapas de iPS diferenciadas a cardiomiocitos.
- (5) Evaluar la influencia de la fibrosis en el potencial arrítmico de la enfermedad en monocapas de iPS diferenciadas a cardiomiocitos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Desarrollo

1. Identificación de sujetos portadores de variantes patogénicas tipo truncamiento en *FLNC*:

En colaboración con la Unidad de Cardiopatías Familiares del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada, España), centro de referencia en este campo, se analizará la presencia de pacientes portadores de mutaciones tipo truncamiento en *FLNC*, de una base de más de 800 pacientes/anuales afectos de miocardiopatías hereditarias.

Se incluirán aquellos con diagnóstico clínico de MCD o MCA, según las guías de práctica clínica y documentos de consenso vigentes, y portadores de variantes *nonsense* en *FLNC* tras estudio genético con NGS.

Se excluirán los pacientes con otro fenotipo miocárdico o miocardiopatía indeterminadas, así como aquellos pacientes portadores de variantes que no sean tipo truncamiento en *FLNC* y aquellos portadores a la vez de variantes en genes relacionados con miocardiopatías previamente.

De los pacientes seleccionados se realizará una evaluación clínica exhaustiva:

- Historia clínica: sintomatología (disnea, dolor torácico, palpitaciones, síncope) y antecedentes familiares de muerte súbita o cardiopatía.
- Electrocardiografía: ritmo, segmento PR, presencia de bradiarritmias, morfología y duración de QRS, alteraciones de la repolarización.
- Ecocardiografía bidimensional y Resonancia Magnética Cardíaca: diámetros y volúmenes ventriculares, función sistólica biventricular, función diastólica y alteraciones segmentarias de la contractilidad miocárdica. Fibrosis miocárdica por retención patológica de gadolinio.
- Holter-ECG de 24h: presencia y porcentaje de extrasistolia ventricular, taquicardia ventricular, bradiarritmias.
- Test de laboratorio: hemograma, bioquímica incluyendo BNP (pg/ml), CPK (mg/dl) y hsTnI (ng/L).

2. Generación de una línea de células madre pluripotentes humanas inducidas (iPS) hacia cardiomiocitos procedente de fibroblastos de piel de pacientes portadores de una variante nonsense en *FLNC* identificada:

Para ello, se obtendrán biopsias de piel abdominal mediante la técnica habitual. Se trata de un procedimiento mínimamente invasivo que consiste en la extracción de una biopsia de piel (trozo o muestra de la piel destinado a la investigación con fines terapéuticos) de 5mm de profundidad y 8mm de diámetro de la zona abdominal. La extracción se

realizará en una sola ocasión, por el personal sanitario cualificado para dicha tarea. Este procedimiento está prácticamente exento de riesgos.

### PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE LA BIOPSIA.

Se realizará en las condiciones lo más asépticas posible y siempre tratando el tejido con el máximo cuidado. Los pasos a seguir serán, de forma resumida, los siguientes:

- Limpiar la piel a biopsiar con Clorhexidina
- Colocación de paño estéril

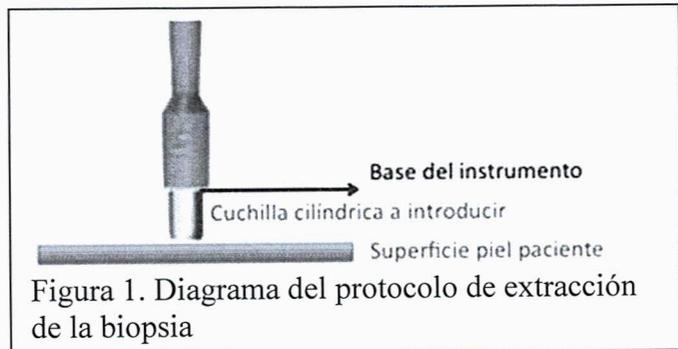


Figura 1. Diagrama del protocolo de extracción de la biopsia

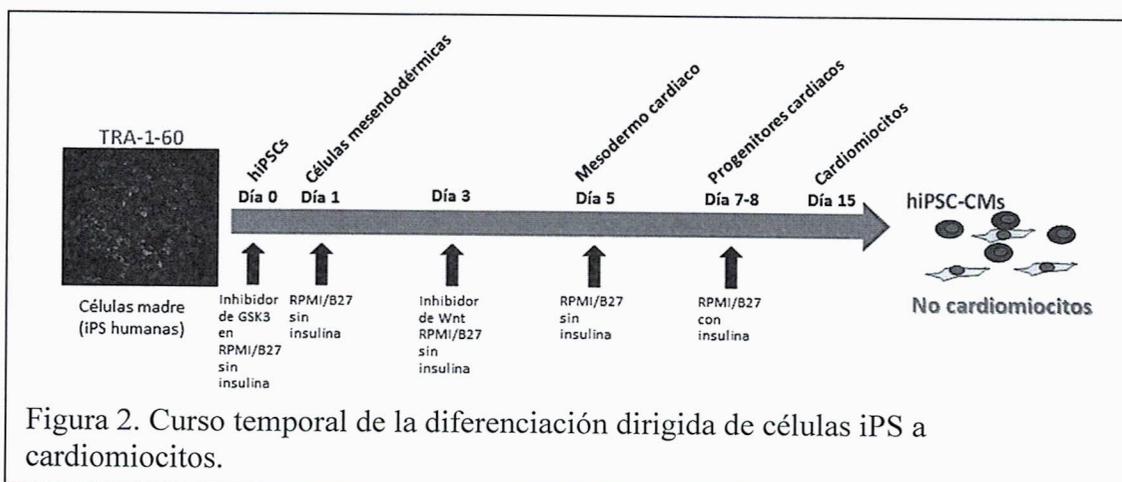
- Aplicación de anestésico local según criterio médico (mupivacaína 2%).
- Cortar el trozo de piel con un *biopsy punch* de 8 mm. Poner especial cuidado en no perder el tejido celular subcutáneo.
- Cerrar la herida del donante según criterio médico (sutura).
- Meter la muestra en tubo con medio de transporte para el envío al investigador.

### MÉTODOS RELATIVOS A LA OBTENCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE iPS

Derivación de Células iPS: El laboratorio del Dr. Jalife tiene experiencia en la generación de hiPSCs libres de vectores utilizando muchos enfoques,<sup>14-18</sup> incluido Sendai Virus,<sup>19</sup> vectores de reprogramación episomal<sup>20</sup> y reprogramación de ARN mensajero.<sup>21, 22</sup> Utilizaremos el enfoque de reprogramación del virus Sendai debido a su facilidad de uso y alta eficiencia. Brevemente, 3 virus Sendai separados (CytoTune®-iPS2.0) para expresar los factores de células madre pluripotentes Klf4, Oct4, Sox2 y c-Myc se usan para reprogramar los fibroblastos de la piel en iPSCs. Los fibroblastos se expanden hasta la confluencia ( $\sim 2 \times 10^5$  células) en placas de 6 pocillos y estos virus Sendai se aplican para iniciar la reprogramación. Los medios se cambian a diario y los cultivos de fibroblastos se controlan cada dos horas mediante microscopía de lapso de tiempo (Incucyte, Essen Bioscience, Ann Arbor, MI) para observar el proceso de reprogramación. Después de siete días, las células se tripsinizan y se someten a nuevas placas recubiertas de matrigel.<sup>23, 24</sup> Las colonias de iPSC

generalmente aparecen después de ~ 14 días y los clones se aíslan y pasan a placas nuevas para la expansión clonal. Se generan al menos 3 clones por línea celular de paciente y las células iPSC no clonales también se crioconservan para garantizar la banca de pasajes tempranos. Los iPSCs se mantienen usando marcado manual y selección en medios sin Xeno (iPS Brew, Miltenyi Biotec). Alternativamente, si el enfoque de reprogramación del virus Sendai (CytoTune®) no tiene éxito, utilizaremos otros enfoques libres de vectores, que incluyen la reprogramación de ARN mensajero o vectores de reprogramación episomal para generar cardiomiocitos. El proceso se completa en 28 días.

*Diferenciación a cardiomiocitos:* Para generar líneas de cardiomiocitos portadoras de la variante en *FLNC* utilizaremos un protocolo de diferenciación dirigida cardíaca a partir de una monocapa de células iPS.<sup>17</sup> El proceso es altamente eficiente, reproducible y produce rutinariamente ~ 60-70% de cTnT + cardiomiocitos en el día 15 del protocolo (figura 2).<sup>25, 26</sup> Además, en relación con este proyecto, hemos desarrollado nuevas técnicas de bioingeniería para cultivar, madurar y caracterizar el fenotipo del músculo cardíaco derivado de células madre humanas. El Laboratorio del Dr. Jalife fue el primero en publicar trabajos sobre la generación de monocapas cardíacas derivadas de células madre humanas altamente purificadas (1 cm de diámetro).<sup>14, 15</sup> Dichas monocapas son invaluable para estudiar los mecanismos de la arritmia en un sistema humano in vitro y ofrecen numerosas ventajas sobre los sistemas de células de roedores comúnmente utilizados.



Purificación de cardiomiocitos: Para purificar hiPSC-CM, utilizaremos un proceso llamado MACS que es altamente novedoso y clínicamente relevante.<sup>26,27</sup> Dicho proceso ha sido validado en el laboratorio de IP en colaboración con Miltenyi Biotec. MACS separa a la población de cardiomiocitos de la no miocítica por medio del uso de un anticuerpo marcado magnéticamente que atrapa a los no miocitos en la columna magnética mientras que los hiPSC-CM fluyen y se enriquecen (figura 3A). El nuevo enfoque MACS es una mejora

significativa sobre el uso de la expresión SIRPA2a para seleccionar positivamente para hiPSC-CM, que hemos utilizado previamente.<sup>15, 32</sup> Este nuevo enfoque nos permite separar y recaptar hiPSC-CM purificados mezclados con no-miocitos de forma cuantitativa (figura 3C-

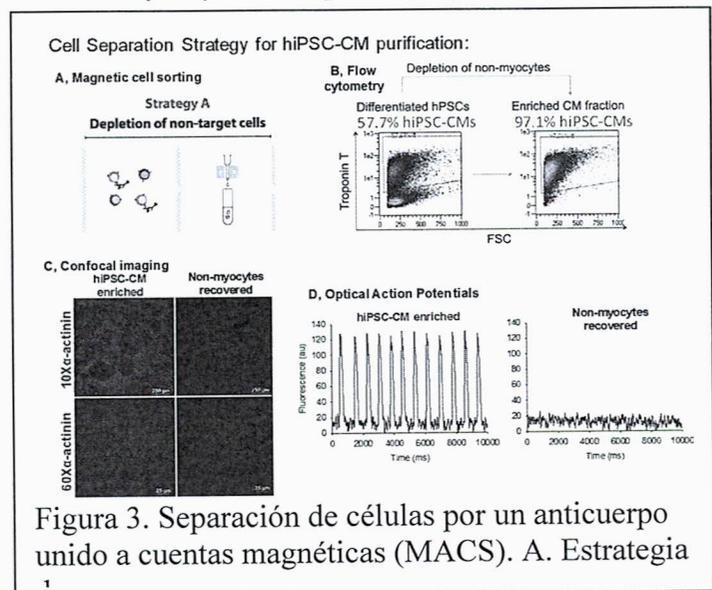
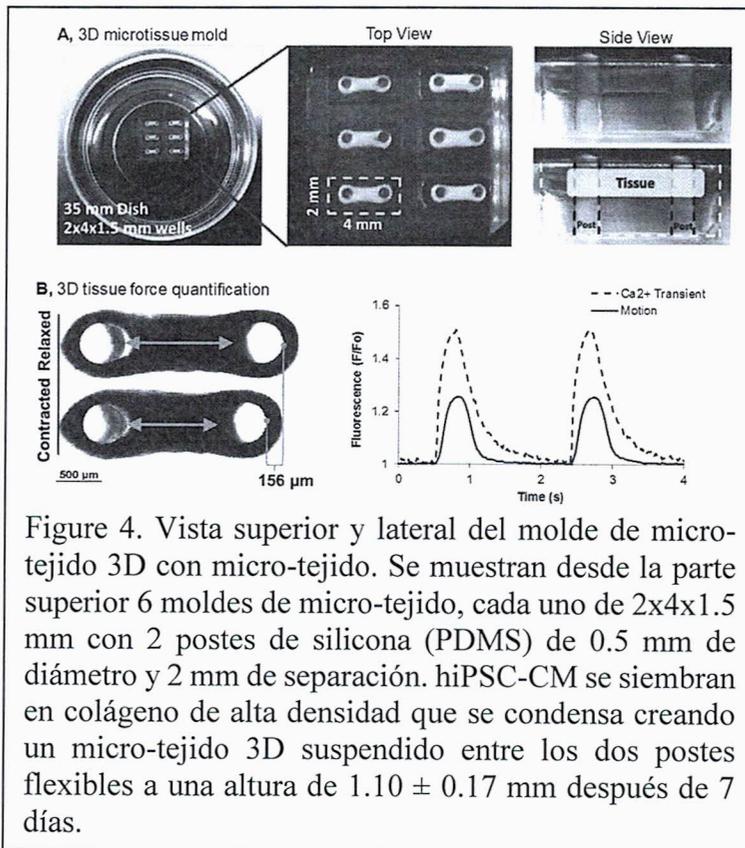


Figura 3. Separación de células por un anticuerpo unido a cuentas magnéticas (MACS). A. Estrategia

azul = DAPI, rojo =  $\alpha$ -actinina). Usando este enfoque de enriquecimiento, podemos aislar hiPSC-CM de una población de solo 57.7% de células cTnT + y obtener hiPSC-CM enriquecidos con 97.1% de pureza. Este enfoque nos permitirá determinar los números precisos y la identidad de las células que no son de cardiomiocitos y que son esenciales para la formación de monocapas y micro-tejidos tri-dimensionales (Figura 4).

La capacidad de utilizar cardiomiocitos derivados de iPSC humanos maduros (hiPSC-



CM) para estudiar las consecuencias arritmogénicas de las mutaciones de proteínas cardíacas heredables es un nuevo y relevante modelo para la investigación. También hemos generado una nueva plataforma de pruebas preclínicas que consta de micro-tejidos 3D formados por hiPSC-CM altamente enriquecidos y maduros cultivados dentro de un

molde flexible y sensible que permite una cuantificación precisa de la estructura y la función eléctrica y contráctil (Figura 4). La plataforma debería permitirnos desentrañar los mecanismos moleculares subyacentes a las consecuencias electromecánicas y arritmogénicas adversas de la mutación FLN.

En caso de imposibilidad para obtener líneas celulares de iPS, o que estas no alcancen el grado de madurez necesario para reproducir de forma fiable el comportamiento eléctrico del cardiomiocito humano, se generarán líneas celulares portadoras de la variante en *FLNC* en células iPS humanas SV10 empleando como vector de transferencia genética plásmidos basados en elementos transponibles **PiggyBack**.

Estas células iPS SV10 se han generado en CNIC usando Sendai virus como se ha descrito anteriormente. Estas células se han caracterizado tanto a nivel de capacidad pluripotente como de diferenciación cardíaca terminal.

## SISTEMAS DE TRANSFERENCIA BASADOS EN VECTORES PIGGYBACS

El sistema de PiggyBac (PB) deriva de células de insecto (*Trichoplusia ni*) y se desarrolló en cepas mutantes de baculovirus. En este sistema, el transgene de interés en este caso *FLNC*, se inserta entre repeticiones invertidas que se sitúan en los extremos del transposon. Estos elementos permiten la escisión e integración en el genoma huésped gracias a la actividad transposasa de una enzima PB específica que se introduce en otro vector por separado. El sistema de PB permite “cortar y pegar” un transgen de gran tamaño en el genomio con preferencia en sitios con una secuencia de nucleótidos TTAA. En el laboratorio del Dr Juan A Bernal en CNIC se han generado en los últimos dos años más de 10 líneas diferentes de células iPS que expresan genes mutantes de proteínas relacionadas con arritmias cardíacas. Este sistema tiene la gran ventaja de que comparten el control isotópico SV10, ya que se puede controlar el número de inserciones. Con nuestro protocolo el número medio de inserciones oscila entre 1 y 4 del transgen de interés (Figura 5) .

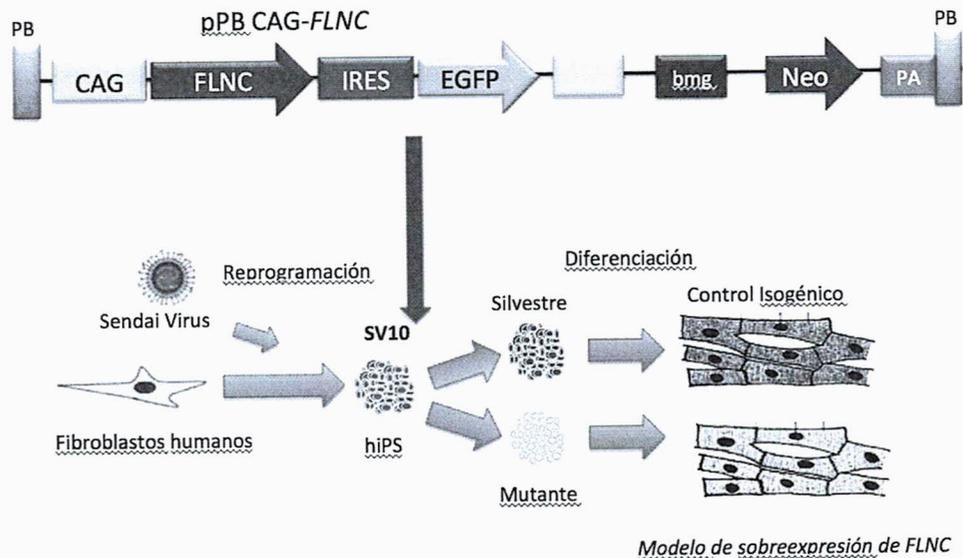


Figura 5. Vector de transferencia PB codifica para el gen de la *FLNC* bajo el control del promotor constitutivo CAG seguido por el gen de la proteína fluorescente EGFP después de una secuencia de traducción interna (IRES). Las secuencias invertidas

repetidas (PB) y la secuencia de poliadenilación también se indica. Tras esta secuencia se muestra un módulo de selección de resistencia a Neomicina que se usa para seleccionar clones positivos que expresan *FLNC*. En la parte inferior se muestra un diagrama de cómo se generan los cardiomiocitos que expresan *FLNC* y su control isogénico a partir de células iPS (SV10 derivadas de fibroblastos humanos).

### 3. Análisis Funcional (*ex vivo*)

Una vez se obtengan las líneas celulares de iPS humanas diferenciadas a cardiomiocitos (o bien iPS SV10) se realizarán una serie de técnicas de laboratorio normalmente empleadas en ciencias básicas de la arritmología:

- *Técnicas de Patch-Clamp*. El empleo de este recurso facilita el conocimiento de las propiedades de los canales iónicos cardíacos, pudiendo obtener información funcional relevante de los mismos. Esta técnica se realizará a nivel cardiomiocitos individuales derivados de iPS. Se evaluarán la corriente de sodio ( $I_{Na}$ ), corrientes de salida de potasio dependientes de voltaje ( $I_{to}$ ), corrientes rectificadoras tardías de salida de potasio ( $I_{Kur}$ ,  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$ ) y la corriente de entrada de calcio ( $I_{Ca-L}$ ), así como el potencial de acción en la célula completa.

- *Técnica de Mapeo Óptico*. El empleo de sistemas de mapeo óptico ofrecen una imagen bidimensional de la actividad eléctrica en la superficie cardíaca a medida que se propaga la onda de activación. Esto permite investigar potenciales factores que alteren la conducción eléctrica. Esta técnica se realizará sobre monocapas celulares de las líneas de iPS como se ha descrito en publicaciones anteriores.<sup>14, 15, 26, 28</sup>. Se utilizarán fluoróforos sensibles a voltaje y calcio para estudiar la propagación del frente de activación y el calcio citoplasmático.

- *Repercusión de la fibrosis miocárdica*: Estas líneas celulares de iPS se organizan en monocapas y en microtejidos tridimensionales. Sobre éstas, se realizarán técnicas de mapeo óptico para estudiar la propagación de la onda de activación, inicialmente en situaciones basales. Posteriormente, con el objetivo de ser lo más fieles posibles

a la patología in vivo, se introducirán fibroblastos para reflejar la fibrosis miocárdica identificable en las resonancias magnéticas de los sujetos participantes del estudio. La fibrosis miocárdica una característica casi constante de la enfermedad.

## BIBLIOGRAFIA

1. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kuhl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L and Keren A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2008;29:270-6.
2. Corrado D, Link MS and Calkins H. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2017;376:61-72.
3. Sen-Chowdhry S, Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sevdalis E and McKenna WJ. Clinical and genetic characterization of families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy provides novel insights into patterns of disease expression. *Circulation*. 2007;115:1710-20.
4. Sen-Chowdhry S, Syrris P, Prasad SK, Hughes SE, Merrifield R, Ward D, Pennell DJ and McKenna WJ. Left-dominant arrhythmogenic cardiomyopathy: an under-recognized clinical entity. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:2175-87.
5. Perazzolo Marra M, Rizzo S, Bauce B, De Lazzari M, Pilichou K, Corrado D, Thiene G, Iliceto S and Basso C. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Contribution of cardiac magnetic resonance imaging to the diagnosis. *Herz*. 2015;40:600-6.
6. Lopez-Ayala JM, Gomez-Milanes I, Sanchez Munoz JJ, Ruiz-Espejo F, Ortiz M, Gonzalez-Carrillo J, Lopez-Cuenca D, Oliva-Sandoval MJ, Monserrat L, Valdes M and Gimeno JR. Desmoplakin truncations and arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy: characterizing a phenotype. *Europace*. 2014;16:1838-46.
7. Pilichou K, Thiene G, Bauce B, Rigato I, Lazzarini E, Migliore F, Perazzolo Marra M, Rizzo S, Zorzi A, Daliento L, Corrado D and Basso C. Arrhythmogenic cardiomyopathy. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11:33.
8. Basso C, Corrado D, Bauce B and Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:1233-46.
9. Zhang Q, Deng C, Rao F, Modi RM, Zhu J, Liu X, Mai L, Tan H, Yu X, Lin Q, Xiao D, Kuang S and Wu S. Silencing of desmoplakin decreases connexin43/Nav1.5 expression and sodium current in HL1 cardiomyocytes. *Mol Med Rep*. 2013;8:780-6.
10. Kley RA, Hellenbroich Y, van der Ven PF, Furst DO, Huebner A, Bruchertseifer V, Peters SA, Heyer CM, Kirschner J, Schroder R, Fischer D, Muller K, Tolksdorf K, Eger K, Germing A, Brodherr T, Reum C, Walter MC, Lochmuller H, Ketelsen UP and Vorgerd

- M. Clinical and morphological phenotype of the filamin myopathy: a study of 31 German patients. *Brain*. 2007;130:3250-64.
11. Gomez J, Lorca R, Reguero JR, Moris C, Martin M, Tranche S, Alonso B, Iglesias S, Alvarez V, Diaz-Molina B, Avanzas P and Coto E. Screening of the Filamin C Gene in a Large Cohort of Hypertrophic Cardiomyopathy Patients. *Circ Cardiovasc Genet*. 2017;10.
  12. Ortiz-Genga MF, Cuenca S, Dal Ferro M, Zorio E, Salgado-Aranda R, Climent V, Padron-Barthe L, Duro-Aguado I, Jimenez-Jaimez J, Hidalgo-Olivares VM, Garcia-Campo E, Lanzillo C, Suarez-Mier MP, Yonath H, Marcos-Alonso S, Ochoa JP, Santome JL, Garcia-Giustiniani D, Rodriguez-Garrido JL, Dominguez F, Merlo M, Palomino J, Pena ML, Trujillo JP, Martin-Vila A, Stolfo D, Molina P, Lara-Pezzi E, Calvo-Iglesias FE, Nof E, Calo L, Barriales-Villa R, Gimeno-Blanes JR, Arad M, Garcia-Pavia P and Monserrat L. Truncating FLNC Mutations Are Associated With High-Risk Dilated and Arrhythmogenic Cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68:2440-2451.
  13. Halliday BP, Gulati A, Ali A, Guha K, Newsome S, Arzanauskaite M, Vassiliou VS, Lota A, Izgi C, Tayal U, Khalique Z, Stirrat C, Auger D, Pareek N, Ismail TF, Rosen SD, Vazir A, Alpendurada F, Gregson J, Frenneaux MP, Cowie MR, Cleland JGF, Cook SA, Pennell DJ and Prasad SK. Association Between Midwall Late Gadolinium Enhancement and Sudden Cardiac Death in Patients With Dilated Cardiomyopathy and Mild and Moderate Left Ventricular Systolic Dysfunction. *Circulation*. 2017;135:2106-2115.
  14. Herron TJ, Lee P and Jalife J. Optical imaging of voltage and calcium in cardiac cells & tissues. *Circ Res*. 2012;110:609-23.
  15. Lee P, Klos M, Bollensdorff C, Hou L, Ewart P, Kamp TJ, Zhang J, Bizy A, Guerrero-Serna G, Kohl P, Jalife J and Herron TJ. Simultaneous voltage and calcium mapping of genetically purified human induced pluripotent stem cell-derived cardiac myocyte monolayers. *Circ Res*. 2012;110:1556-63.
  16. Zhang J, Klos M, Wilson GF, Herman AM, Lian X, Raval KK, Barron MR, Hou L, Soerens AG, Yu J, Palecek SP, Lyons GE, Thomson JA, Herron TJ, Jalife J and Kamp TJ. Extracellular Matrix Promotes Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells: The Matrix Sandwich Method. *Circ Res*. 2012.
  17. Bizy A, Guerrero-Serna G, Hu B, Ponce-Balbuena D, Willis BC, Zarzoso M, Ramirez RJ, Sener MF, Mundada LV, Klos M, Devaney EJ, Vikstrom KL, Herron TJ and Jalife J. Myosin light chain 2-based selection of human iPSC-derived early ventricular cardiac myocytes. *Stem Cell Res*. 2013;11:1335-1347.
  18. Monteiro da Rocha A, Guerrero-Serna G, Helms A, Luzod C, Mironov S, Russell M, Jalife J, Day SM, Smith GD and Herron TJ. Deficient cMyBP-C protein expression during cardiomyocyte differentiation underlies human hypertrophic cardiomyopathy cellular phenotypes in disease specific human ES cell derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;99:197-206.
  19. Ban H, Nishishita N, Fusaki N, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, Takada N, Inoue M, Hasegawa M, Kawamata S and Nishikawa S-I. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108:14234-14239.

20. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II and Thomson JA. Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science*. 2009;324:797-801.
21. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh Y-H, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM and Rossi DJ. Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010;7:618-630.
22. Pandit SV, Warren M, Mironov S, Tolkacheva EG, Kalifa J, Berenfeld O and Jalife J. Mechanisms underlying the antifibrillatory action of hyperkalemia in Guinea pig hearts. *Biophys J*. 2010;98:2091-101.
23. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, Thomson JA and Kamp TJ. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res*. 2009;104:e30-41.
24. Zhao X, Chen H, Xiao D, Yang H, Itzhaki I, Qin X, Chour T, Aguirre A, Lehmann K, Kim Y, Shukla P, Holmstrom A, Zhang JZ, Zhuge Y, Ndoye BC, Zhao M, Neofytou E, Zimmermann WH, Jain M and Wu JC. Comparison of Non-human Primate versus Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Treatment of Myocardial Infarction. *Stem Cell Reports*. 2018;10:422-435.
25. Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, Raval KK, Zhang J, Kamp TJ and Palecek SP. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109:E1848-E1857.
26. da Rocha AM, Campbell K, Mironov S, Jiang J, Mundada L, Guerrero-Serna G, Jalife J and Herron TJ. hiPSC-CM Monolayer Maturation State Determines Drug Responsiveness in High Throughput Pro-Arrhythmia Screen. *Sci Rep*. 2017;7:13834.
27. Herron TJ, Rocha AMD, Campbell KF, Ponce-Balbuena D, Willis BC, Guerrero-Serna G, Liu Q, Klos M, Musa H, Zarzoso M, Bizy A, Furness J, Anumonwo J, Mironov S and Jalife J. Extracellular Matrix-Mediated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Monolayer Structure and Electrophysiological Function. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2016;9.
28. Herron TJ, Rocha AM, Campbell KF, Ponce-Balbuena D, Willis BC, Guerrero-Serna G, Liu Q, Klos M, Musa H, Zarzoso M, Bizy A, Furness J, Anumonwo J, Mironov S and Jalife J. Extracellular Matrix-Mediated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Monolayer Structure and Electrophysiological Function. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2016;9.

## ANEXO II.

Lista de investigadores participantes del grupo del 



Lista de investigadores participantes del grupo del 



Lista de investigadores participantes del grupo del 