

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Fisiología y Farmacología**

---



**UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA**

**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE  
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES OBTENIDAS DE TEJIDO ADIPOSO  
EN EL TRATAMIENTO DEL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO EN  
MODELO PORCINO**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por M<sup>a</sup> Remedios Guadalupe Gómez  
Mauricio para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

**D<sup>a</sup> MARÍA JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada “CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES OBTENIDAS DE TEJIDO ADIPOSO EN EL TRATAMIENTO DEL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO EN MODELO PORCINO” presentada por M<sup>a</sup> Remedios Guadalupe Gómez Mauricio para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los Drs. Francisco Miguel Sánchez Margallo, Antonio Bernad Miana y M<sup>a</sup> Fernanda Martín Cancho.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 19 de Octubre de 2012.

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Jesús Monte Río

Fdo. M<sup>a</sup> Remedios Guadalupe Gómez Mauricio

La Memoria con título "CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES OBTENIDAS DE TEJIDO ADIPOSO EN EL TRATAMIENTO DEL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO EN MODELO PORCINO" ha sido realizada por M<sup>a</sup> Remedios Guadalupe Gómez Mauricio para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Bajo la dirección del Dr. Francisco Miguel Sánchez Margallo, el Dr. Antonio Bernad Miana y la Dra. M<sup>a</sup> Fernanda Martín Cancho y la tutela de la Dra. Asunción Morán Benito, el trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en la Unidad de Terapia Celular del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (CCMIJU) y el Departamento de Cardiología Regenerativa del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC-ISCIII).

Para que conste a todos los efectos que este trabajo reúne la calidad científica que exige una Tesis Doctoral, firman la presente certificación:

Fdo. Dra. Asunción Morán Benito

Los directores de Tesis:

Fdo. Dr. Francisco Miguel  
Sánchez Margallo

Fdo. Dr. Antonio  
Bernad Miana

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Fernanda  
Martín Cancho

En Salamanca a 19 de Octubre de 2012.



Centro de Cirugía de Mínima Invasión  
Jesús Usón (CCMIJU)



Centro Nacional de Investigaciones  
Cardiovasculares (CNIC)

## Agradecimientos

*“Nunca desistas de un sueño. Sólo trata de ver las señales que te lleven a él”*, escribió Paulo Coelho en uno de sus libros. Uno de los míos, desde que tengo uso de razón, era dedicarme a la ciencia. Siempre he admirado a todos aquellos que, con su trabajo y esfuerzo, han dedicado su vida a mejorar de alguna manera la de los demás. De algún modo puedo decir que, con este trabajo, parte de ese sueño se ha visto realizado, y todo ello ha sido gracias a la implicación y el trabajo de muchas personas, sin las cuales habría sido imposible. A lo largo de estos años, he tenido la suerte de conocer a multitud de profesionales, con muchos de los cuales guardo una gran amistad y afecto. Por todo ello me gustaría agradecer a todos aquellos que, directa o indirectamente, han contribuido en la realización de esta Tesis. Muchas han sido las veces que he pensado en el momento de tener que escribir estas líneas. Ese momento ha llegado, y que difícil expresar en pocas palabras los sentimientos acontecidos en todo este tiempo.

En primer lugar me gustaría dar la gracias a los directores de este trabajo, el Dr. Francisco Miguel Sánchez Margallo, por apostar por este proyecto desde el principio, a pesar de todas las dificultades que han ido surgiendo y los riesgos que suponía. Por confiar en mí para iniciarlo y el esfuerzo realizado para conciliar dos conceptos de investigación tan diferentes (tarea nada fácil), que tanto me han enriquecido profesionalmente. Gracias por animarme a seguir adelante en todo momento.

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Antonio Bernad Miana, a quien admiro como científico y aprecio como persona, por su enorme integridad y calidad humana y su rigor científico. Gracias por permitirme formar parte de tu grupo, donde me he sentido una más, por todo el tiempo que has dedicado a este trabajo y abrirme, además, las puertas de tu casa. No sabes lo mucho que me has aportado y el orgullo que siento de haber podido trabajar contigo.

No tengo palabras para agradecer a la Dra. M<sup>a</sup> Fernanda Martín Cancho, a quien respeto por su labor profesional. Por su apoyo moral, el más valioso de todos y sobre todo por su amistad, el mayor de los tesoros. A quien debo tanto, no sólo laboralmente, sino en mayor parte a nivel personal. Por su implicación en cada momento y sus consejos diarios. Tengo que darte las gracias por los incontables detalles que nunca pasaron desapercibidos, pero principalmente tengo que agradecerle tu prioridad para guardar y cuidar nuestra amistad.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. Jesús Usón, a quien admiro por su enorme capacidad de trabajo y su ilusión permanente. Gracias por permitirme formar parte de su sueño (ahora también el mío), por enseñarme tantas cosas y demostrármelo con su ejemplo.

Agradezco al Colegio Oficial de Farmacéuticos de Cáceres, en especial a su presidente D. Pedro Claros y toda la Junta de Gobierno, la beca de investigación concedida, con la cual he logrado realizar este trabajo de Tesis, sin olvidarme de todo el apoyo recibido a lo largo de todo este tiempo.

También quisiera darle las gracias al Departamento de Farmacología de la Universidad de Salamanca, por permitirme presentar la Tesis, en especial a la Dra. Asunción Morán Benito, por estar siempre disponible para todo lo que he necesitado en la distancia. ¡Gracias por todo Choni!.



Debido a las características de este trabajo, he tenido la oportunidad de poder trabajar con la mayor parte de las Unidades y Servicios que constituyen el CCMIJU. Me gustaría mostrar mi agradecimiento a todo el personal que lo integra, en especial a todos aquellos que se han visto implicados en el desarrollo de esta Tesis en algún momento y han contribuido para que este trabajo saliera adelante; a Bere, por su dedicación, su excelente trabajo y colaboración indispensable; a Juan, por los estudios de RMN y tener siempre una palabra agradable; a Claudia por su implicación desde que llegó; a los anestesiistas y técnicos de quirófano que participaron en alguna de las muchas intervenciones. A María y Julia por esas maravillosas ilustraciones. Gracias a mis compañeros del laboratorio de Terapia Celular, de Farmacia y Reproducción Asistida, que poco a poco han ido llenando la planta baja, que inicialmente estaba tan solitaria. En especial a Javi, gracias por tu inmensa paciencia...si no llegas a venir, no me pongo a escribir!!; a Vero, sin cuya ayuda habría sido imposible, tu colaboración ha sido esencial; a Jose, por los buenos momentos y todo lo que me has hecho reír; a Diego, porque si eres grande como profesional y compañero, aun lo eres más como persona y amigo, gracias por todas esas conversaciones que tanto me han aportado. También quisiera agradecer a Elena, María y Alex, aquellos ratos inolvidables de los primeros años. Finalmente, no puede faltar mi enorme agradecimiento a Idoia, Nico y Javi (los "ccmigos"), quienes han sabido ganarse todo mi cariño y mi entera confianza. Gracias por vuestra amistad sincera y el buen humor que me alegra los días, dentro y fuera del trabajo. También a Marisa y Jesús a los que también tengo presentes. Tengo que dar las gracias también a Marta, que me aportó tanto en el escaso tiempo en el que coincidimos. Finalmente quisiera hacer extensible mi agradecimiento a todas y cada una de las personas que integran el CCMIJU y que, aunque no nombro en estas líneas, me consta que se alegran enormemente por la culminación de esta Tesis, a todos ellos, muchísimas gracias.

Agradezco a todo el equipo del CNIC la colaboración prestada, sobre todo a las Unidades de Genómica, Celómica, Microscopía y Vectores Virales, que tanto me ayudaron para el desarrollo de muchos experimentos. Al Departamento de Cardiología Regenerativa, en especial a las personas del grupo de Antonio con las que coincidí en alguna de mis estancias (Carmen Albo, María, Juancho, Candelas, Marta Ramón, Enrique Samper, Manuel, Kausalia, José Luis, Susana, David Horna, etc...), por su disponibilidad constante ante cualquier duda y todo lo que aprendí en aquellos los seminarios, ha sido un verdadero placer trabajar con vosotros. Pero sobre todo me gustaría hacer una mención especial a mis "chicos" (Isa, Alberto, Vane, Nines, Íñigo, Paco, Bea, Aida), por vuestra ayuda constante en el laboratorio y todo lo que he aprendido a vuestro lado, me habéis hecho disfrutar muchísimo de cada minuto en el CNIC. Gracias por todos esos momentos, dentro y fuera del trabajo, los descansos del café y las comidas donde nos hemos divertido tanto, las cañas de los jueves o esas escapadas de fin de semana.

Quisiera dar las gracias al Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia del País Vasco (UPV-EHU), por la elaboración de las microcápsulas y la encapsulación celular.

Tengo que agradecer al equipo de CTX, en especial a Itziar y Luis, la confianza depositada en mí, y aunque no la merezco, no imagináis lo mucho que la estimo. Estoy convencida que, con el trabajo de todos, el "CARE-MI" será todo un éxito.

Al Dr. Enrique Roche, por acogerme en su laboratorio durante el primer año y a todo su equipo de "Vinalopó". A Lucrecia, Nex, Maribel, Encarna, Bea y David, sois el fiel reflejo del trabajo en equipo. Me lo enseñasteis todo cuando yo sólo sabía de carbonos e hidrógenos, siempre habéis sido mi referente y a

quienes podía acudir en cualquier momento...no se que habría hecho en los comienzos sin vuestra ayuda...¡¡Espero esa visita!!.

Gracias a las “niñas del Sant Pau”, a las que me une un profundo afecto; a Carol, por esa accidentada pero divertida temporada navideña con nosotros; a Cris, por el trabajo y los fantásticos momentos compartidos en Madrid. Resulta muy fácil trabajar con vosotras.

A mi querido Departamento de Química Farmacéutica, con los que comencé esta andadura profesional y a quienes debo mi pasión por la ciencia.

A mis “vecinos” y amigos en Madrid, Mayte, Carlos y Sandra, por sacarme de más de un apuro, por el ánimo recibido al volver a casa tras los días duros, por esas salidas en el barrio o las largas conversaciones “en algún lugar del edificio”.

No puedo olvidarme de mis niñas de Salamanca (Conchi, Eu, Sara, Amelia y Susana), por la serenidad que me transmiten, por estar siempre y porque ocupan un lugar muy importante en mi vida. A Olalla, por ser tan valiente y hacerme sentir tan especial, mucho ánimo ¡tu puedes con todo!. A Maru, Carmen y María por todas las sonrisas que me regalan. A Irene y Mayte Zazo, ánimo a ambas, ¡sois muy fuertes!. También a Tito y las niñas del internado, por permanecer y por todos los gratos recuerdos. No sabéis lo mucho que extraño aquellos años...a veces la nostalgia es demasiado grande. A pesar del tiempo y la distancia, todos estáis muy presentes, ¡os quiero y añoro muchísimo!.

Quiero agradecer de una forma muy especial a mis amigos de siempre (Fran, Gema, Paco “Caliao”, Gloria, Rober, Fátima, Ramón, Marta, Javi, Mayte, Paco “Chío”, Almu, Alfonso, Elena, Manoli, Alejandro, Rita, Caroli, Ana, Pablo y mis “compadres” Pedro Ángel y Ana), quienes, ajenos al mundo de la ciencia, han sabido darme todo el cariño y el apoyo que necesitaba en los instantes más complicados. Gracias por los inolvidables momentos que hemos compartido, por vuestra amistad demostrada año tras año y por todas las cosas increíbles que aún nos quedan por vivir. Sin olvidarme por supuesto, de la segunda generación (que viene pisando fuerte), mis “sobris” que me alegran los días, y con su inocencia consiguen que las preocupaciones parezcan mucho más pequeñas.

A mi familia, mis tías y primos, por sus consejos y su ayuda siempre que lo he necesitado. Por comprender mis agobios y confiar siempre en mí. Quiero dedicar también esta Tesis a los que ya no están; mis abuelos, los cuales fueron un ejemplo a seguir, y en especial a Marichús, que se fue demasiado pronto. Vuestro recuerdo está presente cada día en mi corazón dándome fuerzas para seguir caminando, os echo de menos.

Para finalizar, quisiera dedicar este trabajo a las personas más importantes de mi vida, las cuales han sabido justificar mis largas ausencias en momentos realmente importantes y me han apoyado en todas y cada una de mis decisiones. A mi hermana, la persona más generosa que conozco. Gracias por estar siempre cuando yo no pude, por ser mi mejor amiga y por quererme tanto. También a Fer, cuida mucho de mi niña, es muy especial. A mi padre, porque llena mi alma con cada mirada. Gracias por todos los principios que me has inculcado, por enseñarme valores tan importantes como la honradez, la honestidad y la lealtad. A mi madre, porque calma mi corazón con sus palabras. Por ser un ejemplo de

trabajo constante y perseverancia. Gracias por todo tu amor y tu entrega, por ser mi refugio y mi amparo.  
Sin vosotros, nada tendría sentido.

*“Sólo se ve bien con el corazón; lo esencial es invisible para los ojos”.*  
*Antoine de Saint-Exupery (1900-1944), El Principito.*

*A mi padre,  
a mi madre,  
a mi hermana.*

*Con todo el corazón.*

## **Abreviaturas**



**Abreviaturas:**

AAS: Ácido Acetil Salicílico	CaCl <sub>2</sub> : Cloruro de calcio
AA2P: Ascorbato-2-fosfato	CAM: Concentración alveolar mínima
Abs: Absorbancia	CARE-MI: Iniciativa Multidisciplinar Europea para la Reparación Cardíaca (del inglés, <i>Cardio Repair European Multidisciplinary Initiative</i> )
Ac: Anticuerpo	CAT: Catalasa
ACAN: <i>Agreccan</i>	CC: Cardiopatías congénitas
ACTB: Actina beta, (del inglés, <i>beta actin</i> )	CD: Marcadores de Superficie o Grupos de Diferenciación (del inglés, <i>Clusters of Differentiation</i> )
ACTC1: <i>Actin Alpha Cardiac Muscle 1</i>	CE: Coeficiente de extinción
ACTP: Angioplastia transluminal percutánea	G-CFS: Factor de estimulación de colonias de granulocitos (del inglés, <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i> )
ACT4: <i>Vascular smooth muscle alpha-actin</i>	c-Kit: <i>Proto-oncogene c-Kit or Kit Tyrosine-protein kinase</i>
ACX: Acetil.CoA oxidasa	CKMB: Creatina Kinasa Miocárdica
AD: Aurícula derecha	C.N.: Código Nacional
ADP: Adenosin difosfato	Col1A1: Colágeno 1 alfa 1
AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios	Col2A1: Colágeno 2 alfa 1
AI: Aurícula izquierda	c-Met: receptor proto-oncogénico de HGF (del inglés, <i>Met proto-oncogene</i> )
Ang: Angiopoyetina	Ct: <i>Cycle Threshold</i>
APA: Alginato-Poli-L-lisina-Alginato	CTGF: Factor de crecimiento del tejido conectivo (del inglés, <i>Connective Tissue Growth Factor</i> )
aprox.: Aproximadamente	DC: Células dendríticas (del inglés, <i>Dendritic Cell</i> )
ARA II: Antagonistas de receptores de angiotensina	CDC: Células derivadas de cardiosferas (del inglés, <i>Cardiosphere-Derived Cells</i> )
Arg: Arginina	CO: Monóxido de carbono
ASC: Células madre adultas (del inglés, <i>Adult Stem Cells</i> )	CO <sub>2</sub> : Dióxido de carbono
A2B5: <i>Glycosphingolipid c-Series gangliosides</i>	CPC: Células progenitoras cardíacas (del inglés, <i>Cardiac Progenitor Cell</i> )
Bcl-xL: <i>Apoptosis regulator Bcl-x (B-cell leukemia/lymphoma)</i>	CSC: Células madre cardíacas (del inglés, <i>Cardiac Stem Cells</i> )
BGLAP: <i>Bone gamma-carboxylglutamate protein</i>	Cy3: <i>Cyanin 3 fluorophore</i>
BHK: Fibroblastos de riñón de hámster joven (del inglés, <i>Baby Hamster kidney</i> )	c-Myc: v-myc mielocitomatosis viral oncogene homolog
BIS: Índice bispectral (del inglés, <i>Bispectral Index</i> )	DAB: 3,3'-diaminobencidina
BMP: Proteínas morfogenéticas de hueso (del inglés, <i>Bone Morphogenetic Protein</i> )	DAPI: Diclorhidrato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (del inglés, <i>4', 6-diamidino-2-phenylindole</i> )
BLAST: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	
bp: Pares de bases (del inglés, <i>Base Pairs</i> )	
BSA: Albúmina sérica bovina (del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i> )	

## Abreviaturas

DEPC: Di-etil pirocarbonato

DIC: Contraste de interferencia diferencial (del inglés, *Differential Interference Contrast*)

DMEM: Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés, *Dubelco's Modified Eagle Medium*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico (del inglés, *Deoxyribonucleic Acid*)

cDNA: DNA complementario: copia de mRNA

dNTP: Desoxirribonucleósido trifosfato

DPP: Decapentaplégico

DPSC: Células madre de la pulpa dental (del inglés, *Dental Pulp Stem Cells*)

ECC: Células madre de carcinoma embrionario (del inglés, *Embryonal Carcinoma Cells*)

ECG: Electrocardiograma

EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético (del inglés, *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

EG: Secuencias Eco de Gradiente

EGC: Células madre germinales (del inglés, *Embryonic Germ Cells*)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *Epidermal Growth Factor*)

HB-EGF: Factor de crecimiento de unión a la heparina semejante a EGF (del inglés, *Heparin Binding EGF-like Growth Factor*)

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

EPC: Células progenitoras endoteliales (del inglés, *Endothelial Progenitor Cells*)

EGTA: Ácido etilenglicol tetraacético (del inglés, *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*)

EMA: Agencia Europea de Medicamentos (del inglés, *European Medicines Agency*)

Eph: Efrinas

ESC: Células madre embrionarias (del inglés, *Embryonic Stem Cells*)

ESI: Soluciones endocárdicas (del inglés, *Endocardial Solutions*)

EtOH: Etanol

FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting*

Fas: *CD95; cell death receptor*

FBS: Suero Fetal Bovino (del inglés, *Fetal Bovine Serum*)

FC: Frecuencia Cardíaca

FD: Factor de dilución

FDA: *Food and Drugs Administration*

FE: Fracción de eyección

Fe: Hierro

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Óxido férrico

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: Óxido ferroso

Fe<sub>7</sub>C<sub>18</sub>N<sub>18</sub> K<sub>x</sub>: Ferrocianuro potásico

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés, *Fibroblast Growth Factor*)

FGFR2: Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés, *Fibroblast Growth Factor receptor 2*)

FITC: Fluoresceína-5-isocianato

FISH: Hibridación fluorescente *in situ* (del inglés, *Fluorescence in situ Hybridization*)

Q-FISH: Hibridación fluorescente *in situ* cuantitativa (del inglés, *Quantitative Fluorescence in situ Hybridization*)

FL1: Canal 1 de fluorescencia

FLK: *Kinase insert domain protein receptor (KDR)*

FLT1: *FMS related tyrosine kinase 1*

GA: Medida (del inglés, *Gauge*)

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GATA-4: *Gata binding protein 4*

GC: Gasto Cardíaco

GDF: Factor de crecimiento y diferenciación (del inglés, *Growth Differentiation Factor*)

GDNF: Factor de crecimiento derivado de la glía (del inglés, *Glía Derived Growth Factor*)

GF: Factor de crecimiento (del inglés, *Growth Factor*)

GFP: Proteína verde fluorescente (del inglés, *Green Fluorescent Protein*)

eGFP ó EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*

GFP+: células positivas para GFP



GH: Hormona del crecimiento (del inglés, <i>Growth Hormone</i> )	IGF1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (del inglés, <i>Insulin Growth Factor type 1</i> )
Glut: Glutamina	IGF1R: receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (del inglés, <i>Insulin Growth Factor 1 receptor</i> )
L-Glut: L-Glutamina ó Levo-Glutamina	IGF2: Factor de crecimiento insulínico tipo 2 (del inglés, <i>Insulin Growth Factor type 2</i> )
Gly 67: Glicina 67	IGFBP: Proteínas de unión a IGF 2 (del inglés, <i>Insulin Growth Factor Binding Protein</i> )
GUSB: <i>Glucoronidase beta</i>	IGFD: Deficiencia primaria de IGF severa (del inglés, <i>Insulin Growth Factor Deficiency</i> )
H/E: Hematoxilina/Eosina	IgG: Inmunoglobulina G
H <sub>2</sub> O: Agua	IHQ: Inmunohistoquímica
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : Agua oxigenada	IL6: Interleuquina 6
HCl: Ácido clorhídrico	IM: Administración intramiocárdica
HEK293T: Línea celular de riñón embrionario humano (del inglés, <i>Human Embryonic Kidney</i> )	IMF: Índice Medio de Fluorescencia
HGF: Factor de crecimiento hepático (del inglés, <i>Hepatocyte Growth Factor</i> )	iPS: Células pluripotentes inducidas (del inglés, <i>Induced Pluripotent Stem</i> )
HGFL: Factor de crecimiento hepático (del inglés, <i>Hepatocyte Growth Factor-like</i> )	IR: Receptor de insulina (del inglés, <i>Insulin Receptor</i> )
HGFR: Receptor de HGF (del inglés, <i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i> )	IRES: <i>Internal Ribosome Entry Site</i>
HLA: Antígeno leucocitario humano (del inglés, <i>Human Leukocyte Antigen</i> )	ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular (del inglés, <i>Internacional Society Cellular Therapy</i> )
HNF: Heparina no fraccionada	Isl-1 (Islet-1): <i>ISL LIM homeobox 1</i>
HRP: <i>Horseradish peroxidase</i>	Isot.: Isotipo
HSC: Células madre hematopoyéticas (del inglés, <i>Hematopoietic Stem Cells</i> )	IV: Administración o vía intravenosa
IAM: Infarto agudo de miocardio	KCl: Cloruro potásico
IBMX: 3-Isobutil-1-metilxantina.	KDa: Kilodaltons
IC: Insuficiencia Cardíaca	KGF: Factor de crecimiento queratinocítico (del inglés, <i>Keratinocytes Growth Factor</i> )
ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular (del inglés, <i>Intercellular Adhesión Molecule 1</i> )	KIT: <i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
ICM: Masa celular interna (del inglés, <i>Inner Cell Mass</i> )	Klf4: <i>Kruppel-like Factor 4</i>
ICP: Intervención Coronaria Percutánea	Lin28: <i>Lin-28 homolog A</i>
ICQ: Inmunocitoquímica	LPL: Lipoproteína lipasa (del inglés, <i>Lipoprotein Lipase</i> )
IDO: Indolamina-2,3-dioxigenasa	LVG: Alginato de bajo peso molecular y alto contenido en ácido glucurónico
IECAs: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina	MCP-1: Factor quimiotáctico de monocitos (péptido-1)
IFN $\gamma$ : interferón gamma	MEA: <i>Multi-electrode Array</i>
IGF: Factor de crecimiento insulínico (del inglés, <i>Insulin Growth Factor</i> )	

## Abreviaturas

MEF2C: *Myocyte Enhancer Factor 2c*

MEK1/2: *Downstream of raf1*

MET: *Met portooncongen*

MeOH: Metanol

MHC  $\beta$ : Cadena pesada beta de miosina

MIS: Sustancia inhibidora de Müller

MLC1V: *Myosin Light chain 3, alcali ventricular skeletal slow*

MLC2V: *Myosin Light chain 2V*

MOI: *Multiplicity Of Infection*

MPC: Células progenitoras mesenquimales (del inglés *Mesenchymal Progenitors Cells*)

MPEG-PCL-MPEG: *Poly(ethylenenglycol)-b-polycaprolactone-(dodecanedioic acid)-polycaprolactone-poly(ethylene glycol)*

MPO: *Myeloperoxidase*

MSC: Células madre mesenquimales (del inglés, *Mesenchymal Stem Cells*)

BM-MS: Células madre mesenquimales de médula ósea (del inglés, *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*)

MYH6: *Myosin heavy chain 6 cardiac muscle alpha*

MYH7: *Myosin heavy chain 7 cardiac muscle beta*

Myo: Mioglobina

Myocd: Miocardina

MyoFB: Miofibroblastos

M6P/IGF1R: Receptor de la manosa-6-fosfato/IGF1R

Nanog: *Nanog homeobox*

N<sub>2</sub>: Nitrógeno

NaCl: Cloruro sódico

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica (del inglés, *National Center for Biotechnology Information*)

NE: Norepinefrina

NK: Célula asesina natural (del inglés, *Natural Killer*)

NKx2.5: *NK2 transcription factor related, locus 5*

NP-40: *nonyl phenoxipolyethoxyethanol 40*

NPC: Células progenitoras neurales (del Inglés, *Neural Progenitor Cells*)

O<sub>2</sub>: Oxígeno

OCT: *Optimal Cutting Temperature*

Oct4: *Octamer binding protein-4*

O/N: Durante toda la noche (del inglés, *Over Night*)

P: Pase

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, *Phosphate Buffered Saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *Polimerase Chain Reaction*)

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción reversa (del inglés, *Reverse Transcriptase PCR*)

Q-RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa tras transcripción reversa (del inglés, *Quantitative Reverse Transcriptase PCR*)

PD: Tiempo de duplicación (del inglés *Population Doubling*)

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés, *Platelet-derived Growth Factor*)

PET/CT: Tomografía por emisión de positrones-Tomografía Computerizada (del inglés, *Positron Emission Tomography-Computed Tomography*)

PFA: Paraformaldehído

PGE2: Prostaglandina E2

PIGF: Factor de crecimiento plaquetario

PLA: Células de lipoaspirados procesados (del inglés *Processed Lipoaspirate*)

PLL: Poli-L-Lisina

PNA: *Peptide Nucleic Acid*

PPAR $\gamma$ : Receptor y activado por proliferadores peroxisomales (del inglés, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*)

P/S: Penicilina/Estreptomina

PVDF: *Polyvinylidene Fluoride*

r: *Ratio* (para determinar la pureza de las muestras analizadas)

RFP: Proteína Fluorescente Roja (del inglés, *Red Fluorecent Protein*)

RIPA: *Radioimmunoprecipitation buffer*

RMN: Resonancia Magnética Nuclear	t: Tiempo
RNA: Ácido ribonucleico (del inglés, <i>Ribonucleic Acid</i> )	T0: Tiempo 0
miRNA: Micro RNA	Tn: Tiempo n, seguimiento n
rRNA: RNA ribosomal	Tª: Temperatura
mRNA: RNA mensajero	Ta: Temperatura de <i>annealing</i> o hibridación
RT: Retrotranscripción	Ta- 201: Talio 201
Runx2: <i>Runt-related transcription factor 2, transcript variant 2</i>	TAE: <i>Tris.acetate-EDTA</i>
SC: Células madre o troncales (del inglés, <i>Stem Cells</i> )	TAC: Tomografía Axial Computerizada
Sca-1: <i>Stem Cells Antigen-1</i>	Tc-99: Tecnecio 99
SCF: Factor de crecimiento para mastocitos o Factor de crecimiento para stem cells (del inglés, <i>Stem Cell Factor</i> )	TEK: <i>Tyrosine kinase endothelial</i>
SD: Desviación estándar	TERT: gen de la telomerasa (del inglés, <i>Telomerase reverse transcriptase</i> )
SDF-1: <i>Stromal cell Derived Factor-1</i>	TGFα: Factor de crecimiento transformante alfa (del inglés, <i>Transforming Growth Factor alpha</i> )
SDS: Dodecilsulfato sódico (del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )	TGFβ: Factor de crecimiento transformante beta (del inglés, <i>Transforming Growth Factor beta</i> )
Ser 65: Serina 65	Tie 1: <i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
SF: <i>Scatter Factor</i>	TK: Tirosín Kinasa
SFA: Stent recubierto o farmacoactivo	Tm: Temperatura de <i>melting</i> o fusión
SIA: Septo interauricular	Tnl: Troponina I
SIV: Septo interventricular.	TNNC1: <i>Troponin c, cardiac</i>
SLAI: <i>Major histocompatibility complex class I</i>	TNNI3: <i>Troponin I, type 3, cardiac</i>
SLAII: <i>Major histocompatibility complex class II</i>	TnT: Troponina T
Smad: Proteína homóloga del dominio MAD de <i>Drosophila</i>	TRAP: Protocolo de amplificación telomérica por repetición o ensayo de actividad telomerasa (del inglés, <i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i> )
SOD1: <i>Cu/Zn- superoxide dismutase</i>	TSC: Células madre procedentes de trofoblasto (del inglés, <i>Trophoblast Stem Cells</i> )
SOD2: <i>Mn- superoxide dismutase</i>	Tween 20: <i>Polysorbate 20</i>
Sox2: <i>SRY (sex determining region Y)-box containing gene 2</i>	Tyr 66: Tirosina 66
Sox9: <i>SRY (sex determining region Y)-box containing gene 9</i>	Val: Valina
SPECT: Tomografía computerizada por emisión de fotones individuales (del inglés, <i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i> )	VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular
SPIO: Partículas superparamagnéticas de óxido de hierro (del inglés, <i>Superparamagnetic Iron Oxide</i> )	VD: ventrículo derecho
SSEA-1: <i>Stage Specific Embryonic Antigen 1</i>	VDF: Volumen Diastólico Final
	Ve-Cad: <i>cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular endothelium)</i>
	VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )

## Abreviaturas

VEGFA: Factor de crecimiento del endotelio vascular A (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor A*)

EG-VEGF: Factor de crecimiento endotelial derivado de glándulas endocrinas

VI: ventrículo izquierdo.

VO: Vía oral

VS: Volumen Sistólico

VSF: Volumen Sistólico Final

vs: *versus*

v/v: Volumen/volumen

YFP: Proteína amarilla fluorescente (del inglés, *Yellow Fluorescent Protein*)

2n: Dotación cromosómica diploide

36B4Ribo: *Ribosomal phosphoprotein large PO subunit*

+: Control positivo

-: Control negativo

### Otras:

h-: obtenidas de especie humana (*Homo Sapiens*)

m-: obtenidas de especie murina (*Mus Musculus*)

p-: obtenidas de especie porcina (*Sus Scrofa*)

a-: obtenidas de tejido adiposo (del inglés, *Adipose*)

bm-: obtenidas de médula ósea (del inglés, *Bone Marrow*).

$\alpha$ : anti (contra un anticuerpo)

©: Copyright

®: Marca registrada

<sup>TM</sup>: *Trademark*

### Unidades:

°C: grado centígrado

in: *inches*

min.: minuto

seg.: segundo

h: hora

ng: nanogramo

$\mu$ g: microgramo

mg: miligramo

g: gramo

kg: kilogramo

$\mu$ l: microlitro

ml: mililitro

L: litro

nm: nanometro

$\mu$ m: micrometro

mm: milímetro

cm: centímetro

nM: nanomolar

$\mu$ M: micromolar

mM: milimolar

M: molar

U: unidades

L/min: Litro por minuto

latido/min o (lpm): Latido por minuto

ml/latido: mililitro en cada latido

T: tesla

## Índice



<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>Índice</b> .....	9
<b>Introducción</b> .....	17
<b>1. Sistema cardiovascular. El corazón</b> .....	19
<b>1.1. Anatomía y fisiología del corazón</b> .....	19
1.1.1. Anatomía del corazón.....	19
1.1.2. Fisiología del corazón.....	21
<b>1.2. Fisiopatología del corazón. Enfermedades cardiovasculares</b> .....	22
1.2.1. El infarto agudo de miocardio (IAM).....	23
1.2.2. Técnicas de diagnóstico en el IAM y de las lesiones isquémicas miocárdicas.....	23
1.2.3. Situación actual en el tratamiento del IAM.....	24
<b>2. Terapia celular en el IAM</b> .....	26
<b>2.1. Terapia celular y células madre</b> .....	26
2.1.1. Células madre embrionarias (ESC) y células madre adultas (ASC).....	30
2.1.2. Aplicaciones clínicas y expectativas de la terapia celular y las células madre.....	34
<b>2.2. Las células madre mesenquimales (MSC)</b> .....	35
<b>2.3. Empleo de MSC procedentes de tejido adiposo en el tratamiento del IAM: situación actual del tema</b> .....	40
<b>2.4. Dificultades e inconvenientes de este tipo de terapias</b> .....	44
<b>3. IAM en la especie porcina como modelo experimental preclínico</b> ...47	
<b>4. Uso de factores de crecimiento como refuerzo en terapia celular</b> ..50	
4.1. Aspectos básicos y potencial terapéutico.....	50
4.2. Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1).....	51
4.3. Factor de crecimiento hepático (HGF).....	53
<b>Hipótesis de trabajo</b> .....	57
<b>Objetivos</b> .....	61
<b>Materiales y métodos</b> .....	65
<b>1. Modelos animales</b> .....	67
<b>2. Tipos y líneas celulares</b> .....	67
<b>3. Obtención de células madre adultas mesenquimales de tejido adiposo porcino (paMSC)</b> .....	68
<b>4. Técnicas de cultivo celular</b> .....	70
4.1. Cultivo y expansión celular.....	70

<b>4.2. Procedimientos de congelación/descongelación</b> .....	71
<b>4.3. Recuentos celulares y estudios de viabilidad</b> .....	72
4.3.1. Estudio del contenido de células viables en microcápsulas (Método del CCK-8).....	72
4.3.2. Estudio de la influencia del marcaje con Endorem® en la viabilidad celular.....	73
a) Estudio de viabilidad con CCK-8.....	73
b) Estudio de viabilidad con azul de tripán.....	73
<b>4.4. Caracterización celular</b> .....	75
4.4.1. Evaluación morfológica.....	75
4.4.2. Curvas de crecimiento.....	75
4.4.3. Protocolos de diferenciación.....	77
<b>5. Técnicas de biología molecular</b> .....	78
<b>5.1. Caracterización molecular</b> .....	78
5.1.1. Análisis de expresión génica de las paMSC.....	78
<b>5.2. Técnicas experimentales</b> .....	79
5.2.1. Diseño de <i>primers</i> ó cebadores.....	79
5.2.2. Validación de <i>primers</i> ó cebadores.....	81
5.2.3. Extracción de RNA total.....	82
5.2.4. Medida de la concentración de RNA total.....	82
5.2.5. Retrotranscripción de los mRNA ó síntesis de cDNA.....	83
5.2.6. RT-PCR convencional.....	83
5.2.7. Q-RT-PCR.....	84
5.2.8. Western-blot.....	86
5.2.9. Cariotipado/FISH.....	87
a) Fijación de células y parada en mitosis.....	87
b) Hibridación de las metafases (FISH telomérico).....	88
c) Captura de imágenes.....	88
<b>6. Marcajes, tinciones celulares e inmunocitoquímicas</b> .....	88
<b>6.1. Tipos de marcaje celular</b> .....	88
6.1.1. Marcaje con Endorem®.....	88
6.1.2. Marcaje con proteínas fluorescentes.....	88
<b>6.2. Tinciones celulares</b> .....	89
6.2.1. Tinción con azul de Prusia. Validación de los marcajes con Endorem®.....	89
6.2.2. Tinción con Oil Red O.....	89
6.2.3. Tinción con Alcian blue 8GX.....	89
6.2.4. Tinción con Alizarin Red S.....	90
<b>6.3. Inmunocitoquímica/Inmunofluorescencia</b> .....	90
6.3.1. Inmunocitoquímica (pre y post sorting).....	90



6.3.2. Inmunofluorescencia con anticuerpos de citometría.....	90
<b>7. Manipulaciones genéticas.....</b>	<b>91</b>
7.1. Transducción de paMSC con la proteína fluorescente verde (GFP).....	92
7.2. Inmortalización con h-TERT.....	92
7.2.1. Ensayo TRAP ( <i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i> ).....	93
7.3. Introducción de cDNA seleccionados (HGF/IGF1).....	94
<b>8. Citometría de flujo.....</b>	<b>95</b>
8.1. Análisis de marcadores de superficie (fenotipo).....	95
8.2. Separación celular o “ <i>sorting</i> ”.....	96
<b>9. Microencapsulación celular.....</b>	<b>97</b>
9.1. Estudio preliminar con fibroblastos.....	97
9.1.1. Elaboración de las microcápsulas con y sin Endorem®.....	97
9.1.2. Caracterización morfológica de las microcápsulas.....	99
9.2. Encapsulación de paMSC.....	99
<b>10. Procedimientos quirúrgicos.....</b>	<b>100</b>
10.1. Tratamiento farmacológico.....	100
10.1.1. Tratamiento antiarrítmico.....	100
10.1.2. Tratamiento antiagregante plaquetario.....	101
10.1.3. Protección gástrica.....	101
10.1.4. Tratamiento antibiótico.....	101
10.1.5. Tratamiento analgésico.....	101
10.2. Protocolo anestésico.....	101
10.3. Extracción de la grasa abdominal.....	102
10.4. Obtención de tejidos para controles iniciales.....	102
10.5. Creación del modelo de infarto.....	102
10.6. Trasplante celular.....	103
<b>11. Grupos de estudio.....</b>	<b>104</b>
11.1. Grupo Control.....	107
11.2. Grupo 1. Animales a los que se les administró, como tratamiento, células paMSC encapsuladas (microcápsulas APA marcadas con Endorem®).....	107
11.3. Grupo 2. Animales a los que se les administraron células paMSC-GFP+ marcadas con Endorem®.....	108
11.4. Grupo 3. Animales a los que se les administraron células paMSC-GFP+.....	108
11.5. Grupo 4. Animales a los que se les administró, como tratamiento, células paMSC que sobreexpresan los factores de crecimiento IGF1 y HGF.....	108

<b>12. Técnicas de diagnóstico</b> .....	109
<b>12.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)</b> .....	109
12.1.1. Selección de imágenes.....	110
12.1.2. Análisis de los parámetros funcionales.....	111
<b>12.2. Determinaciones analíticas</b> .....	111
<b>13. Eutanasia, necropsia y toma de muestras</b> .....	112
<b>14. Histología</b> .....	115
<b>14.1. Tricrómico de Masson</b> .....	116
<b>14.2. Hematoxilina/Eosina (H/E)</b> .....	117
14.2.1. Tinción .....	117
14.2.2. Análisis histomorfológico .....	118
<b>14.3. Azul de Prusia</b> .....	118
<b>14.4. Inmunohistoquímicas</b> .....	119
14.4.1. Inmunoreacción con DAB para el estudio de la expresión de IGF1.....	119
14.4.2. Búsqueda de paMSC marcadas con la proteína fluorescente verde (GFP) en tejido cardíaco.....	119
<b>15. Análisis estadístico</b> .....	121
<b>Resultados</b> .....	123
<b>1. Aislamientos, cultivo y expansión celular</b> .....	125
<b>2. Caracterización de las paMSC</b> .....	127
<b>2.1. Caracterización celular</b> .....	128
2.1.1. Evaluación morfológica.....	128
2.1.2. Estudio del crecimiento celular: curvas de crecimiento.....	128
2.1.3. Inmunocitoquímica/Inmunofluorescencia.....	131
2.1.4. Análisis inmunofenotípico.....	132
2.1.5. Determinación de la multipotencialidad de las paMSC (capacidad de diferenciación).....	133
<b>2.2. Caracterización molecular</b> .....	135
2.2.1. Análisis de expresión génica de las paMSC.....	135
2.2.2. Análisis de expresión génica en los estudios de diferenciación de las paMSC.....	138
2.2.3. Estudio de la estabilidad genética de las paMSC en cultivo.....	140
<b>3. Marcaje de las células paMSC</b> .....	141
<b>3.1. Marcaje con el complejo Endorem®</b> .....	141
<b>3.2. Marcaje con proteínas fluorescentes</b> .....	143
3.2.1. GFP+ Hoechst/DAPI.....	143
3.2.2. GFP+ Endorem®.....	144

<b>4. Manipulaciones genéticas de paMSC</b> .....	144
4.1. Transducción mediante vectores lentivirales de la proteína fluorescente verde (GFP).....	144
4.2. Transducción de las paMSC con un vector portador del gen de la telomerasa humana (hTERT).....	146
4.3. Obtención de paMSC que sobreexpresan las proteínas IGF1 y HGF.....	146
4.3.1. Proceso de transducción celular.....	147
4.3.2. Análisis inmunocitoquímico.....	149
4.3.3. Proceso de separación celular o “ <i>sorting</i> ”.....	151
<b>5. Microencapsulación celular</b> .....	153
5.1. Estudio preliminar <i>in vitro</i> .....	153
5.2. Encapsulación de las paMSC.....	154
<b>6. Validación de tratamientos específicos con paMSC</b> .....	155
6.1. Tratamiento de paMSC encapsuladas (microcápsulas APA marcadas con Endorem®), administrado al grupo de estudio 1.....	155
6.2. Tratamiento de paMSC-GFP+ marcadas con Endorem®, administrado al grupo de estudio 2.....	156
6.3. Tratamiento de paMSC que sobreexpresan los factores de crecimiento IGF1 y HGF, administrado al grupo de estudio 4.....	157
<b>7. Trasplante y evaluación funcional del potencial terapéutico de células paMSC alogénicas en el modelo de infarto agudo de miocardio porcino</b> .....	158
7.1. Desarrollo y producción del infarto de miocardio.....	158
7.2. Trasplante celular.....	161
7.3. Validación de los lotes de paMSC utilizados en los estudios <i>in vivo</i> .....	162
7.3.1. Estudio de la influencia del marcaje con Endorem® en la viabilidad celular.....	162
a) Estudio de viabilidad con CCK-8.....	162
b) Estudio de viabilidad con azul de tripán.....	163
7.3.2. Análisis molecular de las células utilizadas en los distintos grupos de tratamiento.....	165
7.3.3. Estudios realizados en las células empleadas en el grupo de tratamiento 4 (paMSC IGF1-eGFP/HGF-mCherry).....	166
a) Estudio inmunocitoquímico de las paMSC transducidas, utilizadas en el grupo 4.....	166
b) Análisis molecular de las paMSC transducidas, utilizadas en el grupo 4.....	169
7.4. Análisis tras las intervenciones terapéuticas.....	170
7.4.1. Análisis tras el trasplante: seguimientos <i>in vivo</i> .....	170

a) Estudio de localización celular. Seguimiento por RMN.....	170
b) Estudio de la evolución del IAM durante el tiempo de seguimiento.....	171
b.1) Estudios por RMN.....	171
b.2) Determinaciones analíticas.....	180
7.4.2. Análisis tras el trasplante: estudios tras la eutanasia.....	184
a) Estudio macroscópico y valoración general tras la eutanasia.....	184
b) Valoración histológica del tejido cardíaco.....	185
b.1) Tricrómico de Masson.....	185
b.2) Hematoxilina/Eosina.....	186
b.3) Azul de Prusia.....	194
c) Estudios inmunohistoquímicos del tejido cardíaco.....	195
d) Análisis molecular del tejido cardíaco.....	199
<b>Discusión.....</b>	<b>201</b>
<b>1. El cerdo como animal grande predilecto para estudios preclínicos.....</b>	<b>203</b>
<b>2. El modelo porcino en el ámbito de la terapia celular.....</b>	<b>205</b>
<b>2.1. Factores moleculares implicados en la cardiogénesis.....</b>	<b>206</b>
<b>2.2. Evolución del uso del modelo porcino en la terapia celular     y sus aplicaciones.....</b>	<b>208</b>
<b>2.3. Desarrollos tecnológicos específicos.....</b>	<b>210</b>
2.3.1. Técnicas de imagen para el diagnóstico y seguimiento <i>in vivo</i> en estudios preclínicos.....	210
2.3.2. Combinación con biomatrices.....	214
<b>3. Terapia celular con MSC de origen porcino.....</b>	<b>215</b>
<b>3.1. Las MSC porcinas en relación con las humanas y murinas.....</b>	<b>215</b>
<b>3.2. Importancia de los estudios preclínicos con MSC.....</b>	<b>217</b>
<b>3.3. Las MSC como tratamiento en enfermedades cardiovasculares.....</b>	<b>219</b>
<b>3.4. IGF1 y HGF en terapia cardiovascular.....</b>	<b>220</b>
<b>3.5. Las MSC frente a nuevas opciones de terapia celular.....</b>	<b>223</b>
<b>4. Valoración general y planteamientos futuros.....</b>	<b>225</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>229</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>233</b>
<b>Publicaciones, participación en proyectos, aportaciones a congresos y otros méritos.....</b>	<b>265</b>

# Introducción



## 1. Sistema cardiovascular. El corazón

El sistema cardiovascular es uno de los principales del cuerpo humano, conformado por una compleja red de vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) y el corazón. Su función principal es la de llevar la sangre a todos los rincones del cuerpo, suministrando los nutrientes y el oxígeno (O<sub>2</sub>) a cada célula, recogiendo los productos de deshecho y el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) producido por las mismas. Este proceso de flujo unidireccional de sangre se denomina circulación, siendo las arterias las responsables de transportar la sangre rica en O<sub>2</sub> a todos los órganos, tejidos y células del organismo mientras que las venas transportan sangre pobre en oxígeno de vuelta al corazón. El corazón por su parte, es un músculo cuya contracción actúa como una bomba que impulsa la sangre hacia éstos órganos, tejidos y células. Se ha estimado que el corazón late más de 2.000 millones de veces durante la vida.

Hay dos circuitos sanguíneos:

- Circulación menor o pulmonar. La sangre sale del corazón por la arteria pulmonar, llega a los pulmones, deja el CO<sub>2</sub> y recoge el O<sub>2</sub> volviendo al corazón por las venas pulmonares.
- Circulación mayor o sistémica. La sangre sale del corazón por la arteria aorta y llega a todas las partes del cuerpo transportando nutrientes y O<sub>2</sub>, recogiendo productos de deshecho y CO<sub>2</sub>. Finalmente, retorna al corazón por las venas cavas superiores e inferiores.

Este sistema es, por tanto, el responsable de la homeostasis del organismo manteniendo las condiciones estáticas, o constantes, en el medio interno. El término de homeostasis (constancia del medio interior), fue aplicado por Walter B. Cannon en 1929 para hacer referencia al concepto de medio interno, introducido por el fisiólogo francés Claude Bernard alrededor de 1860. Las células son capaces de crecer y llevar a cabo sus funciones especiales en función de la disponibilidad, en este medio interno, de concentraciones adecuadas de oxígeno, glucosa, distintos iones, aminoácidos, sustancias grasas y otros componentes. El bienestar de las células individuales por lo tanto, depende en gran medida de los mecanismos homeostáticos que regulan la composición del líquido intersticial (Guyton AC, 2000), (Mohrman DE, 2010).

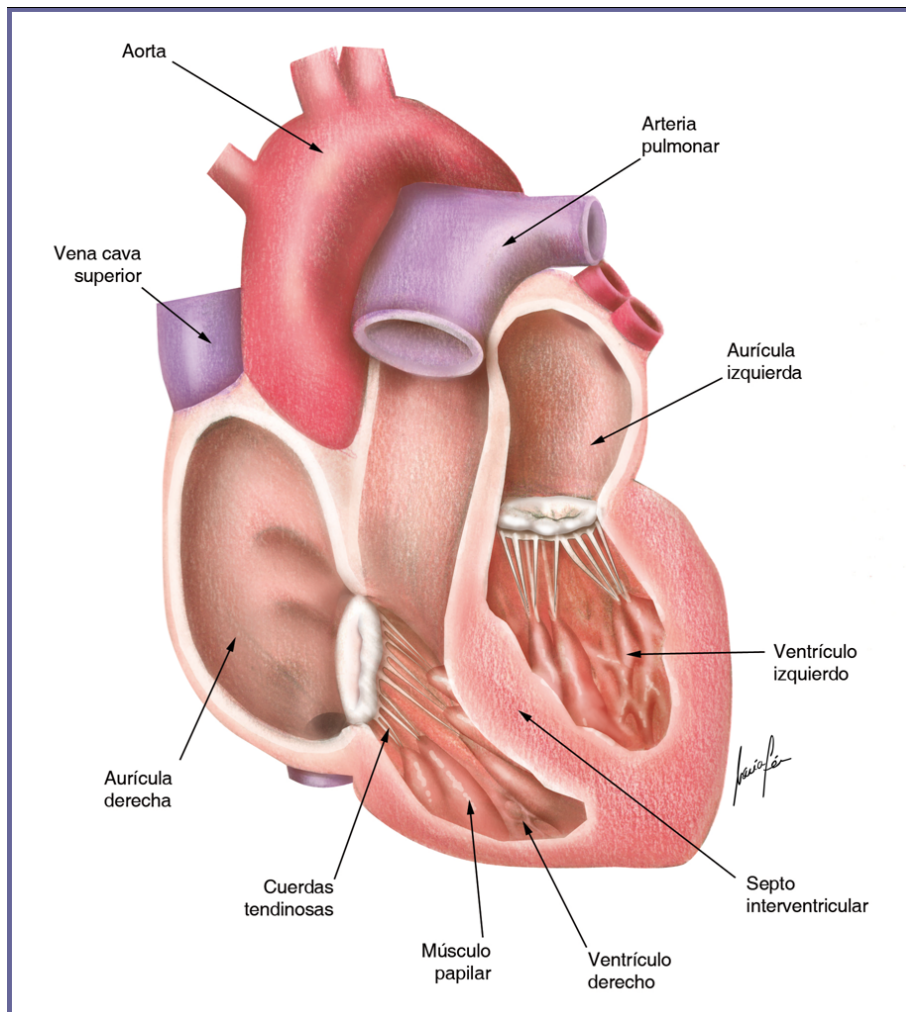
### 1.1. Anatomía y fisiología del corazón

#### 1.1.1. Anatomía del corazón

El corazón es el órgano principal del sistema circulatorio, y es un órgano musculoso hueco situado en el mediastino anterior y rodeado por una membrana fibrosa gruesa llamada pericardio. Está formado por cuatro cavidades (las superiores llamadas aurículas, derecha e izquierda, y en la parte inferior el ventrículo derecho y el ventrículo izquierdo). Las aurículas están separadas entre sí por el septo inter-auricular y los ventrículos por el septo inter-

## Introducción

ventricular. Las válvulas aurículo-ventriculares (la tricúspide o aurículo-ventricular derecha y la mitral o aurículo-ventricular izquierda) ponen en comunicación aurículas y ventrículos (Mohrman DE, 2010). Estas válvulas están formadas por diferentes estructuras: anillo, valvas o velos y cuerdas tendinosas, que terminan en los músculos papilares, permitiendo la sujeción de los velos en los ventrículos (Esquema 1). Por otra parte, las válvulas sigmoideas están situadas entre los ventrículos y las arterias de salida (válvulas aórtica y pulmonar). La válvula aórtica separa el ventrículo izquierdo de la arteria aorta, y la válvula pulmonar el ventrículo derecho de la arteria pulmonar.



**Esquema 1.** Anatomía del corazón.

Las dos arterias coronarias principales, derecha e izquierda, nacen en la parte más proximal de la aorta ascendente. Tienen un trayecto epicárdico, dividiéndose en ramas principales, que a su vez dan lugar a las arterias intramiocárdicas. Se habla de dominancia derecha o izquierda en función de cual de origen a la arteria descendente posterior, que en la mayor parte de los casos suele ser la derecha.



- *Arteria coronaria izquierda*. Se denomina tronco común al segmento inicial el cual, tras un corto recorrido, se divide en arterias descendentes anteriores y circunfleja (en ocasiones da origen a una tercera rama que cruza oblicuamente el ventrículo izquierdo y que se denomina arteria intermedia o ramo mediano).
- *Arteria descendente anterior*. Es la continuación directa del tronco coronario izquierdo extendiéndose por el surco interventricular anterior. Sus ramas principales son las arterias diagonales, que se distribuyen por la pared libre ventricular y las arterias septales, las cuales perforan el septo. Esta es la arteria que irriga la mayor parte del ventrículo.
- *Arteria circunfleja*. Irriga la pared lateral del ventrículo izquierdo y parte de la aurícula izquierda. En un 20% da origen a la arteria descendente posterior, dando flujo a la cara posterior del ventrículo izquierdo, parte del tabique interventricular y, en algunos casos ambos nodos y casi la totalidad de las aurículas.
- *Arteria coronaria derecha*. Nace en el seno coronario derecho. En el 80% de los casos da origen a la arteria descendente posterior. En el 60% da la arteria del nodo sinusal y en el 90% la del nodo aurículo-ventricular. Irriga la mayor parte de las cavidades derechas y, según la dominancia, el tabique interventricular posterior, cara posterior de la aurícula y ventrículo izquierdo.

A nivel venoso, el corazón presenta las *venas de Tebesio*, (drenan sangre directamente a la cavidad cardíaca), las *venas anteriores del ventrículo derecho* (se dirigen hacia la aurícula derecha), y las *venas tributarias del seno coronario* (por el surco aurículo-ventricular posterior hasta la aurícula derecha).

Por otro lado, el corazón está estructurado en tres capas bien diferenciadas, de dentro a fuera, primero se encuentra el *endocardio* (una membrana serosa de endotelio y tejido conectivo que reviste la parte interna del corazón y con la cual entra en contacto la sangre). El músculo cardíaco o *miocardio*, encargado de impulsar la sangre por el cuerpo mediante su contracción. Finalmente, el *pericardio* está formado por una membrana fibroserosa de dos capas, el visceral seroso o epicardio y el fibroso o parietal, que envuelve al corazón y a los grandes vasos, para separarlos del resto de estructuras cercanas (Guyton AC, 2000).

### 1.1.2. Fisiología del corazón

El corazón funciona en realidad como dos bombas separadas, una derecha que impulsa la sangre por los pulmones, y una izquierda que la impulsa hacia los órganos periféricos. Son varios los mecanismos que transmiten los potenciales de acción por todo el músculo para producir el latido cardíaco rítmico. Existen tres tipos de músculo cardíaco: el músculo auricular, el músculo ventricular y las fibras musculares excitadoras y de conducción especializadas. Las dos primeras se contraen de manera similar al músculo estriado mientras que las fibras excitadoras de conducción especializadas, aunque más débil, ofrecen un sistema excitador al corazón y un sistema transmisor para la conducción rápida de la señal excitadora cardíaca por

todo el órgano. El periodo existente entre el comienzo de un latido hasta el siguiente se conoce como *ciclo cardíaco* y se inicia por la generación espontánea de un potencial de acción en el nódulo aurículo-ventricular. Este potencial de acción viaja por ambas aurículas y a través del haz aurículo-ventricular hacia los ventrículos. Debido a la disposición del sistema de conducción, desde las aurículas a los ventrículos, se produce un retraso entre el paso del impulso cardíaco a través de las aurículas que permite que éstas se contraigan antes que los ventrículos (provocando que la sangre pase a los ventrículos antes de producirse la contracción ventricular enérgica que distribuirá la sangre a los órganos periféricos). El ciclo cardíaco comprende un periodo de relajación denominado diástole, durante el cual el corazón se llena de sangre, seguido de un periodo de contracción denominado sístole (Guyton AC, 2000).

Los parámetros básicos que determinan la funcionalidad cardíaca son los siguientes:

- *Fracción de eyección (FE)*. Es el parámetro más importante utilizado como medida clínica del funcionamiento del corazón. Se define como el cociente entre el volumen sistólico (VS) y el volumen diastólico final (VDF).

$$FE = (VS/VDF) \times 100$$

Las estimaciones del volumen diastólico final (en el momento de iniciarse la contracción) y del volumen residual (o volumen de fin de sístole) pueden obtenerse mediante diversas técnicas de imagen.

- *Gasto cardíaco (GC)*. Son los litros de sangre que bombea cada uno de los ventrículos por minuto. Se calcula como el producto de la frecuencia cardíaca (FC) y el volumen sistólico (VS).

$$GC = FC \times VS$$

- *Volumen sistólico (VS) o volumen de eyección sistólico*. Es el volumen de sangre expulsado por el ventrículo en un latido o, dicho de otra manera, el volumen que el corazón expulsa hacia la aorta durante el periodo de contracción o sístole (*VDF: Volumen diastólico final; VSF: volumen sistólico final*).

$$VS = VDF - VSF$$

- *Frecuencia cardíaca (FC)*. Se define como el número de veces que el corazón se contrae en un minuto. Se expresa en latidos por minuto (lpm) y también es conocido como "*pulsaciones por minuto*" (Mohrman DE, 2010).

## 1.2. Fisiopatología del corazón. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares constituyen uno de los problemas de salud más importantes en los países desarrollados. Aunque el riesgo de morir por estas enfermedades ha disminuido en los últimos años, constituyen la primera causa de muerte en España, siendo el infarto agudo de miocardio (IAM) la más frecuente de todas ellas (MINISTERIO DE SANIDAD Y POLÍTICA SOCIAL. 2009), (Villar F, 2007). Se calcula que en 2030 morirán cerca de 23.6 millones de personas en el mundo, principalmente por cardiopatías y accidentes

cerebrovasculares, y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte en las próximas décadas.

### 1.2.1. El infarto agudo de miocardio (IAM)

De todas las patologías cardíacas, la cardiopatía isquémica es la más frecuente y se produce cuando existe un desequilibrio entre el aporte y la demanda de O<sub>2</sub> del miocardio. La causa más frecuente es la aterosclerosis coronaria, aunque puede aparecer por otras como un aumento en las necesidades de O<sub>2</sub> (hipertrofia ventricular), alteraciones en la microcirculación coronaria (síndrome X), alteraciones en el transporte de O<sub>2</sub> por la sangre (anemia, elevación de la carboxihemoglobina), estenosis u oclusión de las arterias coronarias (embolismo, arteritis, aortitis luética, etc.) o por anomalías congénitas de las arterias coronarias. La arteria más afectada por la aterosclerosis es la aorta aunque en las arterias coronarias la localización más frecuente es el tercio proximal de las arterias circunfleja y descendente anterior.

El IAM se produce por la rotura de una placa inestable, rica en lípidos, con formación secundaria de trombo que ocluye total o parcialmente la luz de la arteria coronaria, provocando un déficit de riego distal. Esta es la forma más frecuente aunque puede ser producido por otras causas como embolia o disección coronaria, vasoespasmos, iatrogenia (cirugía, intervencionismo percutáneo, etc.) e incluso causas extracardíacas que disminuyan el flujo coronario y favorezcan la trombosis (estados de hipercoagulabilidad, anemia de células falciformes, inhalación de monóxido de carbono, etc.).

Si la falta de riego dura lo suficiente, puede iniciarse un proceso denominado *cascada isquémica*, donde las células cardíacas mueren, principalmente por necrosis. Esta muerte celular, donde la apoptosis desempeña un papel importante en el daño tisular después de un IAM (Krijnen PA, 2002), provoca una cicatriz de colágeno que daña la estructura cardíaca. Este tejido fibrótico genera la aparición de trastornos del ritmo cardíaco que puede llegar a producir un aneurisma ventricular, provocando la muerte frecuentemente. En los casos en los que el IAM no resulta mortal, es habitual que los enfermos acaben desarrollando insuficiencia cardíaca (IC), como causa subyacente de la isquemia. En la IC el corazón no expulsa la sangre suficiente para los requerimientos metabólicos de los tejidos, o sólo es capaz de hacerlo sufriendo una sobrecarga de presión que acabará haciéndolo insuficiente. Esta patología, cada vez más abundante ante la eficacia de los rápidos tratamientos iniciales del IAM, debe considerarse una enfermedad sistémica en la que se ponen en marcha diferentes sistemas de compensación que contribuyen al cuadro clínico.

### 1.2.2. Técnicas de diagnóstico en el IAM y de las lesiones isquémicas miocárdicas

La determinación de los signos y síntomas en la identificación de un IAM es esencial; sin embargo, para un buen diagnóstico en los primeros momentos del IAM, son fundamentales

diferentes pruebas diagnósticas para asegurar la correcta evolución de la enfermedad. Las principales técnicas diagnósticas utilizadas en clínica son las siguientes:

- *Electrocardiograma (ECG)*. Es fundamental y se ha de realizar en el menor tiempo posible ante la sospecha de sufrir un IAM.
- *Determinaciones analíticas*. Se analizan principalmente las enzimas cardíacas troponina I (TnI) y creatina kinasa miocárdica (CKMB).
- *Técnicas de imagen*. Las más utilizadas son el *ecocardiograma*, la *gammagrafía con Ta-201*, el *pirofosfato con Tc-99* y la *ventriculografía isotópica*.

Para la detección de las lesiones isquémicas producidas por el IAM se utilizan, habitualmente, varias técnicas como la *ergometría*, la *gammagrafía de perfusión miocárdica con isótopos*, el *ecocardiograma de estrés*, la *angiografía isotópica con Tecnecio-99*, el *TAC multicorte* y la *coronariografía*. Ésta última es la que más información aporta sobre las lesiones coronarias y su localización, forma y tamaño. Se trata de una prueba no invasiva en la que, mediante la inyección de un líquido de contraste en las arterias coronarias, se delimita la anatomía y las lesiones ateroscleróticas de las mismas.

Otra técnica diagnóstica muy útil en ambos casos, tanto para el diagnóstico del IAM como para la valoración de las lesiones miocárdicas, es la *resonancia magnética nuclear (RMN)*. Ésta es una técnica de diagnóstico por imagen donde es posible realizar evaluaciones morfológicas del corazón y permite obtener información funcional del ciclo cardíaco. Además, la RMN puede compararse de forma óptima con otros métodos no invasivos (Nagel E, 1999), (Schwitter J, 2008), (Lee DC, 2004), (Schwitter J, 2001). Durante los últimos años esta técnica ha evolucionado mucho, mejorando los agentes de contraste, la adquisición de secuencias así como los programas informáticos y metodologías para su posterior procesamiento y análisis. Este perfeccionamiento en la técnica, pretende optimizar el diagnóstico y comprender mejor la fisiopatología de estas enfermedades, para así avanzar en el manejo y tratamiento de las mismas (Wieben O, 2008).

### 1.2.3. Situación actual en el tratamiento del IAM

En el tratamiento de un IAM hay que tener en cuenta la fase de la enfermedad en la que se encuentra el paciente. Una intervención rápida en los momentos iniciales, puede salvar la vida del paciente aumentando su esperanza y calidad de vida (Boersma E, 1996), (Bruyninckx R, 2008).

#### *Tratamiento en la fase aguda*

En estos primeros momentos, y una vez confirmada la patología por los métodos diagnósticos habituales, el tratamiento se centra en aliviar el dolor, disnea y la ansiedad mediante la administración de opiáceos, aumentar la saturación de O<sub>2</sub>, administración de

antiagregante y controlar las arritmias iniciales. Para ello es necesario que el paciente esté controlado en un entorno hospitalario donde sea posible la monitorización continua de ECG, el tratamiento de la fibrilación ventricular con desfibriladores y la reperfusión precoz. La restauración del flujo coronario es fundamental en el tratamiento inicial del IAM (en las primeras 12 horas del inicio de los síntomas).

#### *Terapia de reperfusión*

La terapia de reperfusión puede ser farmacológica o mediante angioplastia coronaria. En el primer caso se realiza mediante la infusión intravenosa de los llamados agentes *trombolíticos* o *fibrinolíticos* (de primera, segunda y tercera generación), a ser posible durante las 12 primeras horas (Steg PG, 2003). Cuando los fibrinolíticos estén contraindicados o exista alguna imposibilidad para su empleo, así como para casos de shock cardiogénico (Kastrati A, 2004), la alternativa utilizada es la *angioplastia coronaria* que consiste en un angiograma inicial para localizar el vaso infartado, seguido por una angioplastia con balón del segmento trombosado. Se trata de un procedimiento endovascular que, mediante catéteres, dilatación por medio de balones o implantación de stents, busca restaurar el flujo coronario en la zona afectada. El *stent*, o *endoprótesis vascular*, es un pequeño dispositivo metálico que mantiene abierta la luz vascular mediante el andamiaje del vaso evitando la re-estenosis de la angioplastia con balón. La aparición de los *stents recubiertos* o *farmacoactivos (SFA)*, en cardiología intervencionista ha supuesto un enorme avance en el tratamiento de los pacientes con cardiopatía isquémica. Los SFA incorporan a sus dispositivos otros dos componentes: los fármacos antiproliferativos y el sistema de transporte/difusión a la pared arterial de los fármacos. Aunque durante la última década se han utilizado infinidad de fármacos antiinflamatorios, inmunodepresores y antiproliferativos, las rapamicinas y los taxanos son los que han demostrado un mayor beneficio clínico y son los fármacos predominantes en los actuales SFA (Serra-Peñaranda A, 2007).

#### *Tratamiento farmacológico*

-*Tratamiento antiagregante*. Ácido acetilsalicílico (AAS), tienopiridinas (Mehta SR, 2003), (Bhatt DL, 2006) e inhibidores del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa (Smith SC, 2005).

-*Tratamiento anticoagulante*. La heparina no fraccionada (HNF) es el tratamiento anticoagulante estándar durante los procedimientos de ICP (Van de Werf F, 2009).

-*Nitratos*. Administrados en forma de comprimidos sublinguales al inicio del dolor precordial.

-*Betabloqueantes ( $\beta$ -bloqueantes)*. Se clasifican en no selectivos (alprenolol, nadolol, carteolol, propanolol, etc.),  $\beta$ 1-selectivos (acebutolol, atenolol, bisoprolol, metoprolol, etc.) y bloqueadores  $\beta$ 1 + agonistas  $\alpha$ 1-adrenérgicos (carvedilol y labetalol).

- *Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs)*. Los fármacos más utilizados de este grupo son el captopril, enalapril, ramipril y lisinopril.

- *Antagonistas de receptores de angiotensina (ARA II)*. Los más utilizados son el valsartán, telmisartán, candesartán, etc.

### *Tratamiento en prevención secundaria*

Los pacientes que han superado un IAM, se convierten en pacientes crónicos que tienden a desarrollar frecuentemente una IC, con el riesgo de sufrir nuevos eventos y una muerte prematura. Por esto, es necesario controlar los factores de riesgo cardiovascular y promover los hábitos de vida saludables. Además, estos pacientes han de mantener un tratamiento farmacológico cuyo manejo se basa en la utilización de antiagregantes, anticoagulantes orales,  $\beta$ -bloqueantes, antagonistas del calcio, IECAs, nitroglicerina, estatinas, inhibidores de la absorción del colesterol y bloqueantes de receptores de aldosterona.

### *Tratamiento extremo*

En los casos donde la IC o la cardiopatía isquémica son muy severas y los tratamientos terapéuticos habituales no son suficientes, la alternativa es el trasplante del corazón. Para llevar a cabo el trasplante, se toma el corazón de un donante y, mediante un aloinjerto, se implanta en el paciente. Sin embargo, los trasplantes están limitados por la escasez de órganos y las complicaciones inherentes a la terapia inmunosupresora crónica para evitar los frecuentes riesgos de rechazo que ocurren tras este tipo de intervenciones.

## 2. Terapia celular en el IAM

A pesar de la eficacia de los tratamientos actuales (revascularización miocárdica y fármacos) (Paul A, 2010), que han conseguido reducciones significativas en la morbilidad a corto plazo y la mortalidad de los pacientes con IAM (Antman EM, 2004), (Baigent C, 2002), (Freemantle N, 1999), (Afilalo J, 2007), (Franzosi MG, 1998), éstos no son suficientes para evitar la degeneración cardíaca debida al daño masivo ocurrido en el tejido tras un IAM. Hasta la fecha, la técnica para reparar y regenerar los tejidos es el trasplante, que no está exento de complicaciones y limitaciones importantes, tales como la escasez de donantes y la posibilidad de rechazo. Todo esto ha provocado la búsqueda de alternativas terapéuticas de las cuales la que más expectativas ha despertado en los últimos años ha sido la terapia celular o medicina regenerativa, basada en el uso terapéutico de células madre (De Pablo Dávila F, 2009), (Winslow T, 2006), (Audet J, 2009).

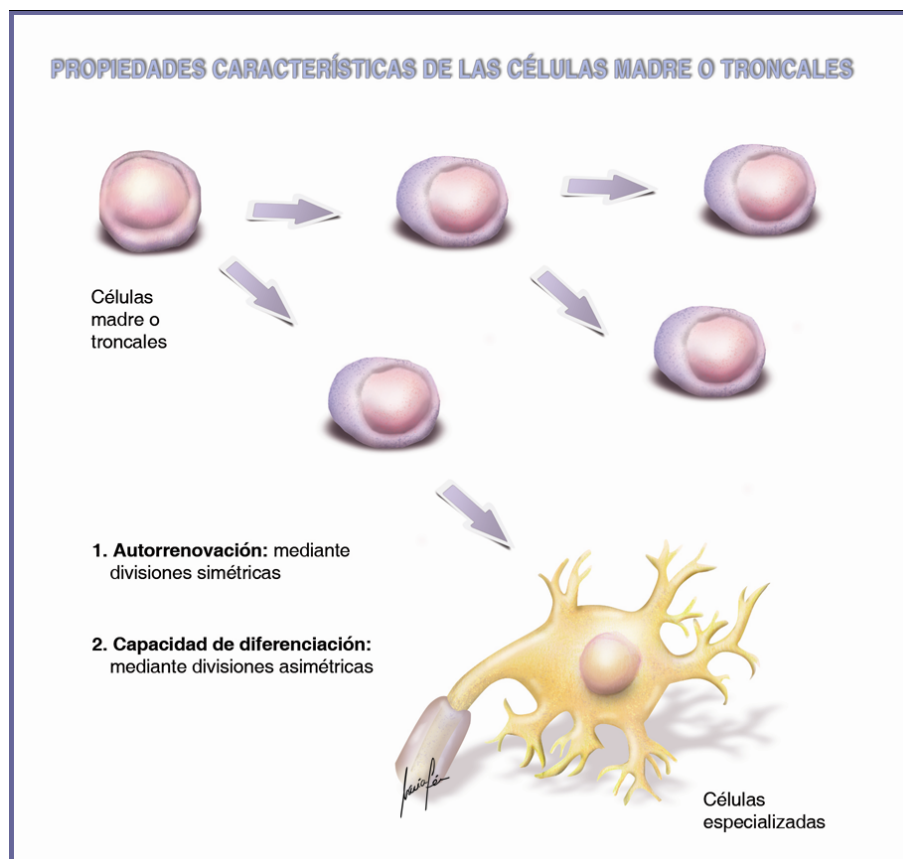
### 2.1. Terapia celular y células madre

La terapia celular podría definirse como el conjunto de estrategias que emplean células vivas como elementos terapéuticos y cuyo objetivo principal es el de reparar, reemplazar o recuperar la función biológica de un tejido u órgano dañado. Se basa en utilizar como terapia las conocidas como células madre o troncales (SC, en inglés *Stem Cells*). Además, el empleo de este tipo de células, no sólo en terapia celular sino en combinación con la terapia génica y la bioingeniería de tejidos es lo que hoy conocemos como medicina regenerativa o reparativa.

Aunque los inicios reales de la terapia celular podrían situarse en el siglo XVII, con los estudios de R. Lower y J.B. Denis, y el origen del concepto de célula troncal a principios del

siglo pasado (De Pablo Dávila F, 2009), es en 1957 cuando con los estudios iniciales de E.D. Thomas terminan con los trasplantes de médula ósea como opción terapéutica en el tratamiento de la leucemia (Thomas ED, 1957). Todo esto le valió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1990. A pesar de esto, el término “célula madre” se remonta a las últimas décadas y desde entonces el aumento de la investigación en este tema ha sido exponencial, ayudado también por la repercusión social que ha supuesto.

Las células madre o troncales tienen una serie de propiedades que las distinguen del resto y que están haciendo que, en los últimos años, hayan adquirido una gran importancia tanto en investigación como en clínica, dentro del ámbito de la Biomedicina y en muchos de los campos de Ciencias de la Salud. Estas características son, por un lado su capacidad de autorrenovación, que llevan a cabo mediante divisiones simétricas, y por otro, su capacidad para diferenciarse a otros tipos celulares bajo condiciones de cultivo adecuadas, mediante divisiones asimétricas (Gadue P, 2005), como se muestra en el Esquema 2.



**Esquema 2.** Esquema de las características principales de las células madre o troncales.

La clasificación de este tipo de células se ha realizado atendiendo a dos criterios, por un lado su potencial de diferenciación y por otro teniendo en cuenta su origen (Esquema 3).

Así, en función del potencial de diferenciación, las células madre se clasifican en:



## Introducción

- *Totipotenciales*. Capaces de diferenciarse a cualquier tipo celular, incluyendo el trofoblasto que dará lugar a la placenta, los tejidos extraembrionarios y el cordón umbilical. Sólo están presentes en el embrión durante los primeros estadios de división, hasta la etapa de 8-16 células. En estas células la capacidad de diferenciación es limitada ya que al llegar al estado de blastocisto ya se han diferenciado estando por tanto comprometidas, por lo que no es del todo correcto hablar de células madre totipotentes.
- *Pluripotenciales*. Son aquellas que pueden dar lugar a las células procedentes de las tres capas embrionarias, incluyendo la línea germinal (óvulos y espermatozoides).
- *Multipotenciales*. Las células multipotentes derivan a las células de una de las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo o endodermo) pudiendo dar lugar a los tipos celulares de un órgano o tejido.
- *Unipotenciales*. Las células unipotentes son líneas celulares que están bastante comprometidas y que se diferencian en un único tipo celular.

Por otra parte, teniendo en cuenta el origen de las células madre se pueden clasificar en:

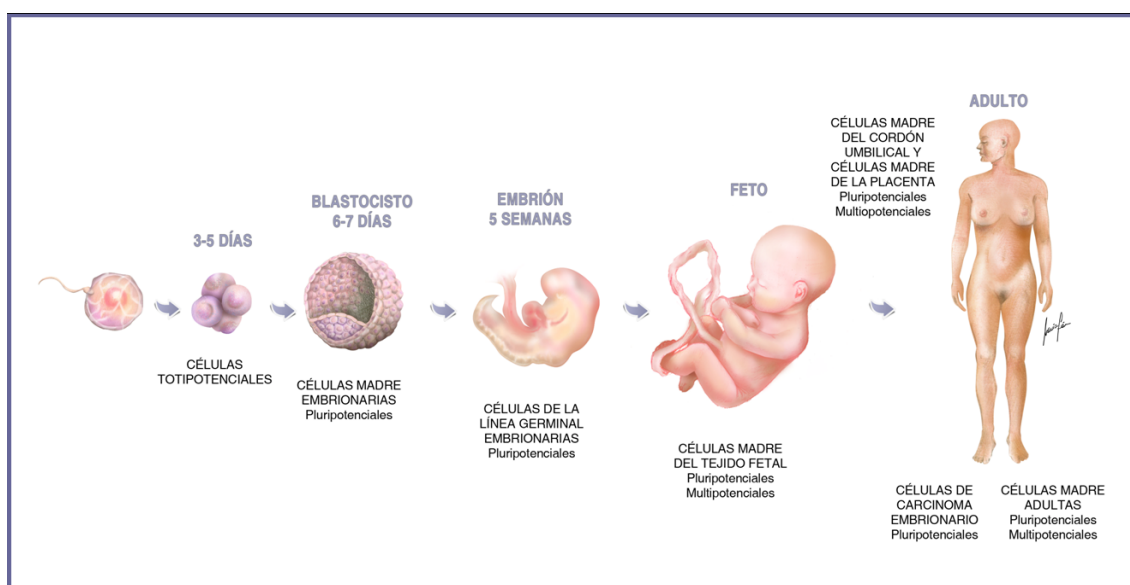
- *Células madre embrionarias (ESC)*. Proceden de embriones antes de su implantación en el útero. En este estadio el embrión se denomina blastocisto, donde se diferencian dos tipos de células, unas son las que se encuentran en la masa celular interna (o ICM, del inglés *Inner Cell Mass*), darán lugar a las tres capas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo) y en consecuencia todos los tejidos del organismo adulto, pero no a la placenta. Las otras son las células del trofoblasto, que se encuentran en el exterior y rodeando a las células de la ICM, dando lugar a las estructuras maternas que soportan el embarazo (Hanna JH, 2010), (Jaenisch R, 2008).
- *Células madre germinales (EGC)*. Derivan de las células germinales primordiales, las cuales son las precursoras de los gametos maduros. Las primeras células de este tipo de origen humano fueron aisladas en 1998 por Shambloott y sus colaboradores y proceden de las futuras gónadas que se están desarrollando en un embrión entre las semanas cinco y nueve del desarrollo (Shambloott MJ, 1998).
- *Células madre procedentes de carcinoma (ECC)*. Son las células indiferenciadas que se encuentran en los teratocarcinomas (tumores de la línea germinal). Con el aislamiento de las primeras ECC en 1970 se sentaron las bases de las dos propiedades básicas de las células madre y fueron las primeras identificadas como tales (Kahn BW, 1970).



- *Células madre procedentes del trofoblasto (TSC)*. Se obtienen de la capa exterior de células que rodea al blastocisto. También se pueden obtener del tejido ectodérmico extraembrionario y del ectodermo coriónico, presentando todas ellas las mismas características, aunque sean de distintos periodos del desarrollo embrionario. Estas células sólo darán lugar a linajes celulares procedentes del trofoblasto (cordón umbilical y placenta) y nunca a tejidos procedentes del embrión o de cualquier otro tipo de tejido extraembrionario.

- *Células madre del cordón umbilical y de la placenta*. En los últimos años han adquirido un gran interés por ser fácilmente accesibles (se obtienen en el momento del parto a partir de los tejidos fetales que normalmente son desechados) y por tener unas propiedades que las hace muy atractivas (Ilancheran S, 2009), (Rus Ciucă D, 2011).

- *Células madre procedentes de tejidos fetales y adultos de diferentes orígenes*. Se obtienen de tejidos adultos y su función es reemplazar aquellas células que han sido dañadas, bien por lesión o por alguna enfermedad. Se cree que se localizan en un entorno tisular denominado nicho celular, el cual controla su proliferación y capacidad de diferenciación (Moore KA, 2006). Aunque su plasticidad es limitada, en los últimos años se ha demostrado que presentan una capacidad de crecimiento y diferenciación mayor de lo que se pensaba.



**Esquema 3.** Tipos de células madre según su origen, así como el potencial diferenciador de cada una de ellas.

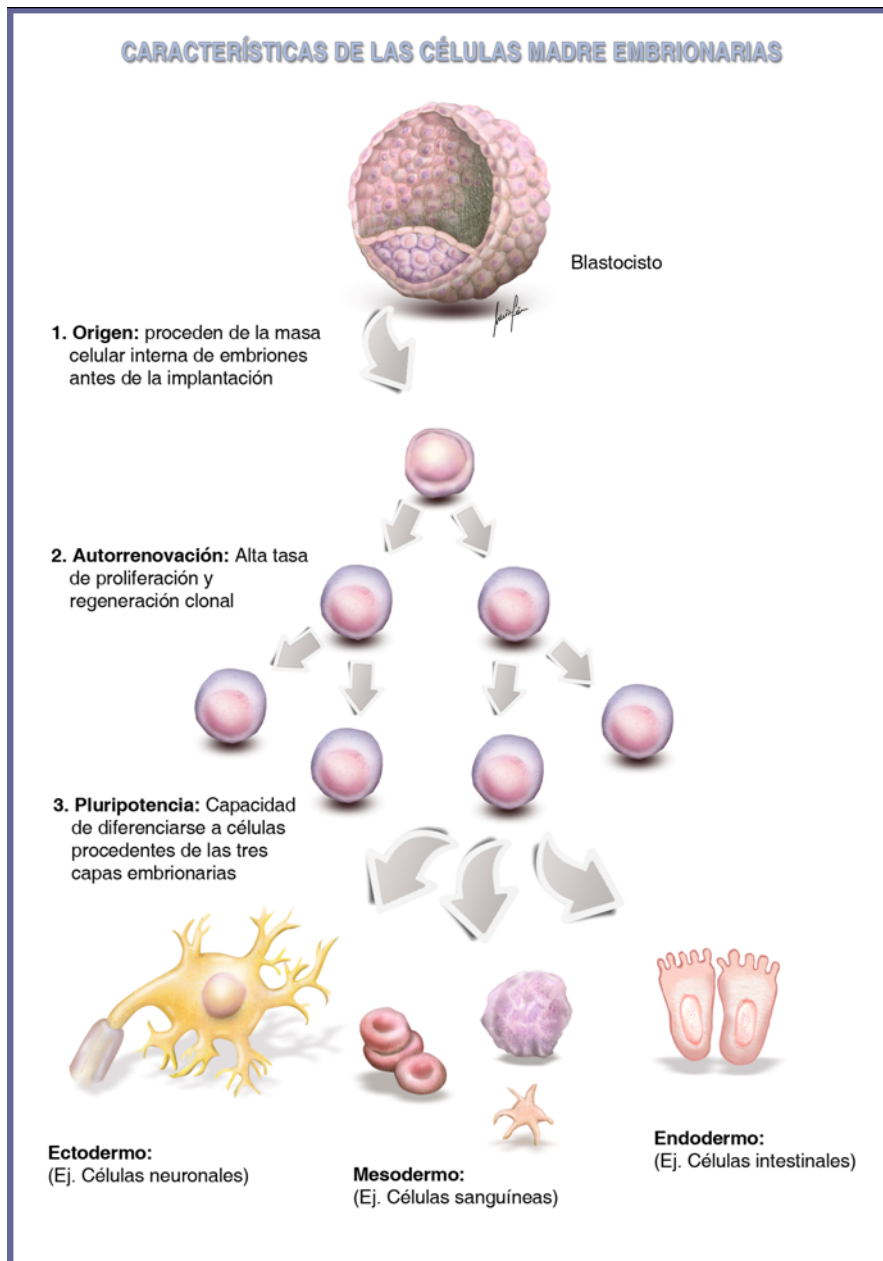
A pesar de esto, la clasificación más comúnmente utilizada simplifica a dos los grupos principales: las células madre embrionarias o ESC (del inglés *Embryonic Stem Cells*), que derivan de la ICM del blastocisto, y las células madre adultas o ASC (del inglés *Adult Stem Cells*), específicas de un órgano o tejido.

### **2.1.1. Células madre embrionarias (ESC) y células madre adultas (ASC)**

Las ESC son células pluripotenciales que se encuentran en la masa celular interna del embrión en estado de blastocisto (Esquema 4). Las técnicas que permiten la obtención directa de este tipo de células son, la utilización de embriones crioconservados o a partir de blastómeros individuales, aunque ambas técnicas están sujetas a legislación y a un control estricto en el caso de la especie humana por las repercusiones éticas que éstas conllevan.

- *Utilización de embriones crioconservados.* En un tratamiento de fecundación in vitro se fecunda un óvulo con un espermatozoide, bien mediante técnicas clásicas de inseminación artificial colocando juntos los ovocitos con los espermatozoides previamente tratados y seleccionados, o bien mediante una técnica más novedosa conocida como microinyección intracitoplasmática, mediante un proceso de micromanipulación, ([www.ccmijesususon.com](http://www.ccmijesususon.com)), ([www.iera.es](http://www.iera.es)), ([www.ivi.es](http://www.ivi.es)). Una vez fecundado el óvulo se constituye el cigoto que, tras sucesivas divisiones, dará lugar al blastocisto, en cuya ICM se encuentran estas células. Los blastocistos pueden conservarse criopreservados hasta un máximo de cinco años (R.D. 413/1996, de 1 de marzo). De la ICM de los blastocistos de estos embriones pueden obtenerse las ESC que posteriormente pasan a ser cultivadas en el laboratorio. Los embriones que se utilizan, son embriones sobrantes de tratamientos de reproducción humana asistida y a su donación le precede el consentimiento informado por escrito de los donantes (Ley 14/2006, de 26 de mayo).

- *Obtención de ESC a partir de blastómeros individuales.* Para evitar la destrucción del embrión, Klimanskaya y sus colaboradores describieron en 2006 una nueva técnica para obtener ESC, primero en ratones y posteriormente en humanos (Klimanskaya I, 2006). Para ello se utilizaron inicialmente óvulos fertilizados de ratones, a los que se les permitió desarrollarse hasta un estadio en el que se contienen entre 8 y 10 células. Una de estas células fue extraída y cultivada mostrando las características de las ESC, con un cariotipo normal y expresando marcadores de pluripotencialidad. Por otra parte, el embrión con 7 células es viable pudiendo ser implantado y seguir su desarrollo normal (Ruiz G, 2008).



**Esquema 4.** Características y propiedades de las células madre embrionarias (ESC).

El potencial de diferenciación de las ESC humanas ha sido analizado tanto *in vivo* (mediante su inyección en ratones inmunodeprimidos y analizando los teratomas formados) como *in vitro* (cultivándolas en suspensión dando lugar a los conocidos *cuerpos embrionarios*). A pesar de la capacidad de diferenciación de las ESC murinas, todo el potencial de las humanas aun está por determinar. En la Tabla 1 se muestran algunos tipos celulares derivados de las ESC humanas y el origen embrionario del que proceden (Athala A, 2008).

Origen embrionario	Células derivadas
<b>Ectodermo</b>	<b>Neuroprogenitores</b>
<b>Mesodermo</b>	<b>Cardiomiocitos, progenitores hematopoyéticos, leucocitos, células endoteliales,</b>
<b>Endodermo</b>	<b>Células insulín positivas, células similares a hepatocitos</b>

**Tabla 1.** Células diferenciadas derivadas de ESC humanas.

Las ASC por su parte, se obtienen de órganos o tejidos adultos, los cuales poseen la capacidad de dar lugar a células diferenciadas del tejido en el que se encuentran. Podrían considerarse por tanto, como reservorios naturales de células de repuesto, disponibles para cuando se produce algún daño en el tejido. Han sido localizadas en la mayoría de tejidos incluyendo hematopoyético, gastrointestinal, epidérmico, neuronal, músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, páncreas y pulmón (Prosper F, 2003). Se consideran multipotentes, aunque hay estudios que defienden su capacidad para diferenciarse a tipos celulares de capas embrionarias diferentes. A su capacidad de diferenciación se la conoce como plasticidad y se han valorado varios mecanismos para explicar este fenómeno como la transdiferenciación o la fusión celular. Así, aunque estas células pueden obtenerse de la mayor parte de los tejidos, sólo algunos subgrupos de ASC presentan las características apropiadas de aislamiento, disponibilidad y potencia que hacen de ellas las más probables a contribuir en medicina regenerativa. Estas células madre, y los linajes fenotípicos que se ha demostrado que generan, se muestran en la Tabla 2 (Athala A, 2008).

Tejido de origen	Tipo celular	Células derivadas
<b>Sangre</b>	<b>HSC</b>	<b>Células sanguíneas</b>
	<b>EPC</b>	<b>Células endoteliales</b>
<b>Médula ósea</b>	<b>HSC</b>	<b>Hepatocitos, células sanguíneas</b>
	<b>EPC</b>	<b>Células endoteliales</b>
	<b>MSC</b>	<b>Adipocitos, cardiomiocitos, condrocitos, células endoteliales, neuronas, osteocitos, células del timo</b>
<b>Grasa</b>	<b>PLA</b>	<b>Adipocitos, condrocitos, miocitos, progenitores neurales, osteocitos</b>
<b>Sangre de cordón umbilical</b>	<b>HSC</b>	<b>Células sanguíneas</b>
	<b>MPC</b>	<b>Adipocitos, células endoteliales, células sanguíneas, osteoblastos</b>

**Tabla 2.** Células diferenciadas derivadas de ASC humanas.

Al observar las ventajas e inconvenientes que tienen las ESC y las ASC, hay que centrarse en una serie de cuestiones para valorarlas como posibles futuros agentes

terapéuticos. Por un lado las ESC presentan una capacidad de expansión y de diferenciación superior a las ASC, sin embargo necesitan de terapias inmunosupresoras y muestran un alto riesgo de producir teratocarcinomas (problemas menos probables en estas últimas). Por otra parte, el hecho de que las ASC se obtengan de individuos adultos, no plantea las objeciones éticas y legales de las ESC. Todo esto ha favorecido que sean las ASC las candidatas idóneas para su uso en clínica, de hecho son muchos los ensayos clínicos que se están llevando a cabo con estas células. Sin embargo, únicamente están registrados 23 ensayos clínicos con ESC, en la base de datos del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (*ClinicalTrials.gov*) por parte de las autoridades competentes, casi todos relacionados con estudios de fertilidad.

Por otra parte, es necesario conocer una serie de conceptos y/o técnicas, muy útiles en la investigación en este campo científico, para comprender los procesos biológicos y moleculares que tienen lugar en estas células.

- *Transferencia nuclear*. Consiste en la extracción del núcleo de un óvulo no fertilizado y su sustitución por un núcleo procedente de una célula somática de un individuo adulto (Wilmut I, 2006). El núcleo adulto, al encontrarse en un entorno adecuado, es capaz de experimentar un proceso de reprogramación. El objetivo de esta técnica es producir una célula pluripotencial que posea la dotación genética del donante, evitando así los problemas de rechazo inmunológico que presentan las ESC. Hasta la fecha sólo se ha realizado en animales por los problemas técnicos y éticos que plantea.

- *Partenogénesis*. Se trata de una modalidad reproductiva mediante la cual un óvulo puede convertirse en embrión sin necesidad de ser fecundado por un espermatozoide. Es frecuente en muchos organismos, aunque no de manera natural en mamíferos donde puede ser inducida con métodos físicos o químicos *in vitro*. De este modo se obtiene una masa celular llamada partenote de donde se pueden aislar células pluripotentes que serían trasplantadas en las donantes de óvulos activados, reduciendo así los problemas de rechazo inmune. En 2007 se aislaron de modelos murinos células histocompatibles procedentes de embriones desarrollados con esta técnica, utilizando la citocalasina (Kim K, 2007).

- *Fusión celular*. Es un fenómeno biológico por el cual dos células son capaces de fundir sus membranas para dar una única célula con un solo núcleo, mediante su exposición a agentes químicos como el polietilenglicol. Es de gran interés ya que representa una visión alternativa al fenómeno de plasticidad de células madre adultas. En los últimos años, son muchos los científicos que responsabilizan a este fenómeno, de la capacidad de diferenciación de las ASC a otros tipos celulares (Alvarez-Dolado M, 2003).

- *Transdiferenciación*. Es la capacidad que tienen las ASC, en presencia de factores adecuados, de diferenciación directa en células de linajes embrionarios diferentes al linaje del

que provienen. Este fenómeno ha sido calificado como versatilidad de las ASC, tomando en cuenta su plasticidad para formar otros linajes celulares. Es posible que pueda ocurrir a través de un proceso de desdiferenciación y rediferenciación y ha sido analizado sobre todo en las MSC (del inglés *Mesenchymal Stem Cells*), para justificar su plasticidad (Phinney DG, 2007).

- *Reprogramación celular*. Consiste en un proceso mediante el cual, a partir de ASC se consigue obtener la capacidad de diferenciación de las ESC mediante el uso de factores de transcripción específicos de pluripotencialidad. En 2007 se publicó el trabajo de un grupo de la Universidad de Kioto (Japón), dirigido por S. Yamanaka donde describen la obtención de células pluripotentes inducidas o iPS (del inglés *Induced Pluripotent Stem*) a partir de fibroblastos dérmicos humanos (Takahashi K, 2007). Para ello utilizaron los mismos factores que un año antes habían utilizado en ratón: Sox2, Klf4, Oct4 y c-Myc (Takahashi K, 2006). Las células iPS humanas obtenidas presentaron la capacidad para diferenciarse a linajes tisulares procedentes de todas las capas embrionarias y para originar teratomas siendo equivalentes a las ESC. Por otra parte y paralelos en el tiempo, J.A. Thomson y sus colaboradores del Centro Genómico de Wisconsin (EE.UU.), presentaron resultados similares obteniendo iPS humanas obtenidas de fibroblastos fetales aunque utilizando los factores Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 (este último sustituyendo a c-Myc con la intención de reducir el potencial tumorigénico) (Yu J, 2007). Un año más tarde J.C. Izpisua describe la rápida generación de células iPS a partir de queratinocitos humanos (Aasen T, 2008). A partir de aquí los estudios realizados con estas células aumentan día a día, que han hecho de ellas una herramienta única para el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a multitud de enfermedades, por la obtención de líneas celulares específicas obtenidas de sus pacientes. Además, las iPS tienden a ser utilizadas como banco de pruebas de nuevos fármacos o para futuras correcciones de defectos genéticos previas al tratamiento de pacientes con sus propias células (De Pablo Dávila F, 2009).

### 2.1.2. Aplicaciones clínicas y expectativas de la terapia celular y las células madre

En este sentido, son muchas las posibles aplicaciones clínicas que se les han atribuido durante estos últimos años y los ensayos clínicos que se han iniciado ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). De este modo, el empleo de células madre en terapia celular está siendo objeto de estudio en multitud de áreas de la medicina. Tal es el caso de la endocrinología, oftalmología, dermatología, traumatología, las enfermedades neurológicas, musculares, hepáticas o renales. Además, el descubrimiento de las propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de alguna de estas células madre ha propiciado que algunas investigaciones se centren en enfermedades del sistema hematopoyético (anemia, leucemia, etc.) o en aquellas en las que se ve afectado el sistema inmune (lupus eritematoso, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, etc.).

Pero el área donde probablemente más estudios clínicos se están llevando a cabo actualmente, es en las cardiopatías isquémicas. Los tipos celulares empleados en estos

estudios han ido desde el empleo de mioblastos, hasta las más estudiadas últimamente, las llamadas células cardíacas residentes o CSC (del inglés *Cardiac Stem Cells*), pasando por células endoteliales, células madre hematopoyéticas, mesenquimales de médula ósea o tejido adiposo entre otras. Aunque en la mayor parte de los casos, los ensayos clínicos realizados hasta el momento han sido llevados a cabo con poblaciones heterogéneas, lo que ha limitado la obtención de conclusiones concretas por parte de la comunidad científica (Prosper F, 2006).

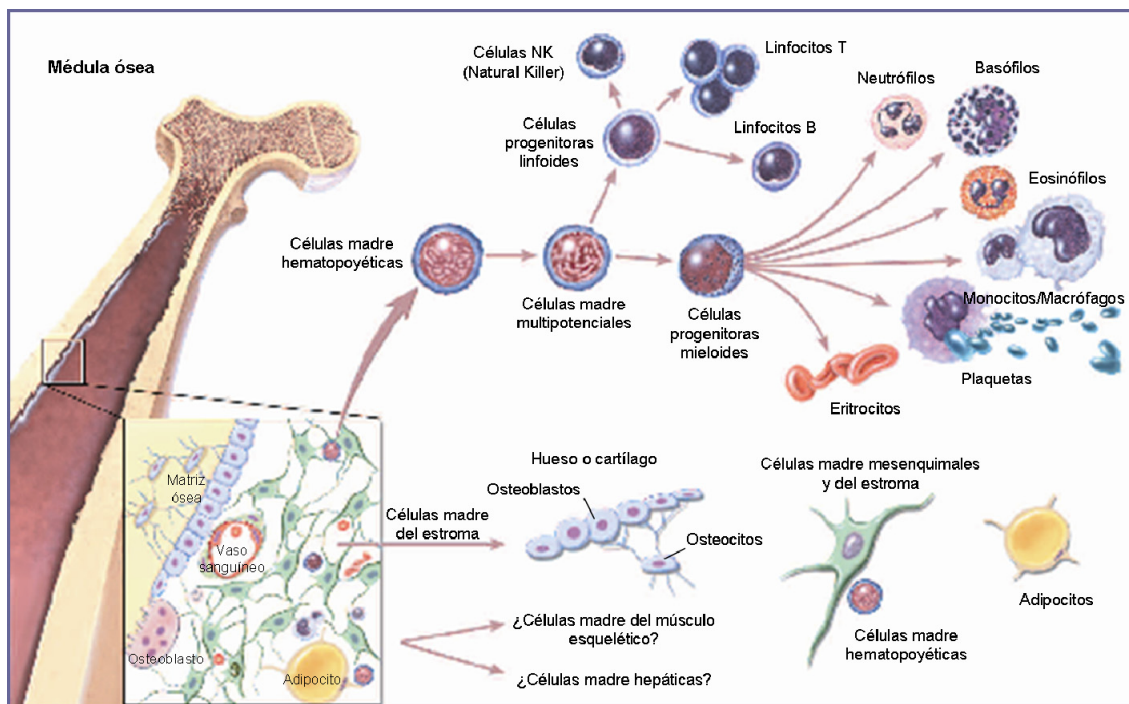
Sin embargo, estos ensayos clínicos no han conseguido en todos los casos reproducir los buenos resultados obtenidos inicialmente a nivel experimental. Antes de continuar las investigaciones en pacientes, la comunidad científica se ha planteado un paso atrás, reconociendo la necesidad de llevar a cabo más estudios experimentales para dar respuesta a diferentes incógnitas que pueden ser responsables del “fracaso” de esta prometedora terapéutica debido al escaso conocimiento de su biología.

## 2.2. Las células madre mesenquimales (MSC)

Tal y como se ha expuesto anteriormente, las ASC presentan una serie de ventajas sobre las ESC para ser consideradas como futuros agentes terapéuticos. De todas ellas, las células madre más utilizadas y estudiadas hasta ahora, han sido las obtenidas de la médula ósea.

La médula ósea contiene una población de células heterogénea que incluye HSC (del inglés *Hematopoietic Stem Cells*), macrófagos, eritrocitos, fibroblastos, adipocitos, y células endoteliales. Además de estos tipos celulares, en la médula ósea se encuentra una subpoblación de células madre no hematopoyéticas que presenta un potencial de diferenciación significativo (Deans RJ, 2000), (Bianco P, 2000). Éstas son conocidas comúnmente como células madre mesenquimales o células mesenquimales del estroma (MSC), como se muestra en el Esquema 5. Las MSC son células primitivas originarias de la capa embrionaria mesodérmica y que fueron descritas para dar origen al tejido conectivo, músculo esquelético y células del sistema vascular (Salem HK, 2010).





**Esquema 5.** Células presentes en la médula ósea. (Adaptado de Regenerative Medicine, National Institutes of Health (2006)).

De este modo, las MSC se identificaron por primera vez a mediados de los años 60 por Friedenstein y sus colaboradores en un modelo de rata donde se observó la capacidad de formar hueso a partir de una población de progenitores de médula ósea (Friedenstein AJ, 1966) y actualmente son nombradas como tal por su origen embrionario, al derivar de la capa mesodérmica del embrión.

Para determinar la identidad de las MSC han de tenerse en cuenta los criterios propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, *Internacional Society Cellular Therapy*) en el año 2006, para definir las MSC (Dominici M, 2006): primero, éstas células deben ser adherentes en cultivo; segundo, expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y tercero, deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones adecuadas en cultivo. Este tipo de células presentan una morfología fusiforme similar a la de los fibroblastos y pueden ser cultivadas manteniendo un cariotipo y una actividad telomerasa normal. Sin embargo si estos cultivos se mantienen durante largos periodos de tiempo pueden llegar a observarse signos de lo que se conoce como *senescencia replicativa* pudiendo afectar su capacidad de diferenciación (Digirolamo CM, 1999).

Las MSC son, por tanto, células multipotentes capaces de diferenciarse a otras de origen mesodérmico y, en condiciones adecuadas a células de otros orígenes. Así, los resultados iniciales *in vitro* dieron paso a multitud de estudios *in vivo* que apuntaban la capacidad de las



MSC para diferenciarse en músculo (Wakitani S, 1995), precursores neuronales (Woodbury D, 2000), cardiomiocitos (Kopen GC, 1999), (Toma C, 2002), (Kawada H, 2004), (Pittenger MF, 2004) y otra gran variedad de tipos celulares (Pereira RF, 1998), (Liechty KW, 2000), (Oswald J, 2004). Además, este tipo de células demostraron proporcionar las citoquinas y factores de crecimiento de soporte que favorecían la proliferación y expansión de las células madre (Majumdar MK, 2000), (Haynesworth SE, 1996), (Cheng L, 2000), (Cheng L, 2003). Se comenzaron a estudiar las posibilidades de estas células de reparar o regenerar huesos (Noel D, 2002), (Bruder SP, 1998), (De Kok IJ, 2003), (Gao J, 2001), cartílagos (Wakitani S, 1994), tendones (Awad HA, 2003), tejido cardíaco (Pittenger MF, 2004), (Tomita S, 1999), (Shake JG, 2002), etc. Otro de los aspectos más destacados y más difíciles de entender es la capacidad de estas células a migrar a las zonas dañadas (Pittenger MF, 2004), (Bittira B, 2003), (Mackenzie TC, 2001), (Wu GD, 2003). De hecho, el uso de las MSC para aplicaciones terapéuticas ha sido reclamado por su supuesta capacidad inherente a migrar a las zonas de inflamación tras una lesión tisular cuando son inyectadas vía intravenosa. Este fenómeno se conoce como “*homing*” y esencialmente es el proceso mediante el cual las células migran y se injertan en el tejido donde ejercen sus efectos funcionales y de protección. Este efecto de las MSC implica que las presuntas complicaciones asociadas con la administración intramuscular o en lugares específicos de las células madre, tales como la osificación (Breitbach M, 2007) es evitable y es posible una administración sistémica intravenosa para la administración de dosis múltiples. Esta capacidad migratoria de las células trasplantadas, podría estar relacionada con factores de crecimiento naturales, tal como el factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*).

A lo largo de todos estos estudios, se ha observado que los trasplantes alogénicos de las MSC son detectables durante largos periodos de tiempo indicando así la ausencia de reconocimiento inmunológico por parte del receptor. Así, uno de los aspectos más estudiados últimamente son las propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de estas células. Las MSC expresan niveles intermedios del antígeno leucocitario humano (moléculas del complejo de histocompatibilidad clase I ó HLA clase I) mientras que no expresan las de clase II. Además, no expresan moléculas co-estimuladoras B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), y CD40 (Di Nicola M, 2002), (Majumdar MK, 2003), (Tse WT, 2003) e inhiben la proliferación de linfocitos T y células NK, al contrario de lo que ocurre con las células T reguladoras donde ejercen un efecto estimulador (Aggarwal S, 2005), pudiendo actuar sobre la actividad inmunológica de otras poblaciones (Nauta AJ, 2006). Los mecanismos que explican estos procesos no están muy claros a día de hoy aunque se ha visto la implicación de factores de crecimiento como TGF $\beta$ 1 (factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1) y HGF (factor de crecimiento hepático) o la PGE2 (prostaglandina E2), el IFN- $\gamma$  (interferón- $\gamma$ ) y laIDO (indolamina-2,3-dioxigenasa). Esta actividad inmunomoduladora se ha observado en MSC de diferente origen, tanto en las obtenidas de médula ósea como en las de tejido adiposo (Puissant B, 2005).

Actualmente, y aunque fueron identificadas en la médula ósea, las MSC pueden obtenerse de una gran variedad de tejidos como tejido adiposo, hígado, músculo, líquido amniótico, sangre periférica, hígado fetal, pulmón, placenta, cordón umbilical o de la pulpa dental (Bianco P, 2000), (Beyer Nardi N, 2006), (Prockop DJ, 1997), (Sethe S, 2006). Todas ellas han sido comparadas entre si en diversos estudios, analizándose su fenotipo, capacidad de diferenciación *in vitro*, características inmunológicas, etc, confirmándose que cumplen con los criterios establecidos por la ISCT (Kern S, 2006), (Chamberlain G, 2007). Las de tejido adiposo son las que últimamente están siendo más utilizadas y estudiadas dada la facilidad para su obtención (lipoaspirados) en grandes cantidades y con procedimientos poco agresivos.

A pesar de todos los ensayos clínicos que se han llevado a cabo utilizando MSC, éstas siguen siendo objeto de estudio en diversos modelos animales con el fin de conocer mejor los mecanismos responsables de su comportamiento y mejorar las futuras estrategias terapéuticas para su uso en diversas patologías. Así Mizuno H., en la revisión que hace en 2009, presenta un estudio comparativo de MSC de tejido adiposo obtenidas de especies tan variadas como el ratón, el conejo, el perro, el cerdo y el humano (Mizuno H, 2009). Otros estudios de proliferación celular en ratones han demostrado disminuir los tiempos de duplicación, produciéndose un considerable aumento en su crecimiento, cuando las MSC eran sometidas a condiciones del 3% de O<sub>2</sub>, observándose también este fenómeno en poblaciones humanas de este tipo. Además, aunque las condiciones de cultivo habituales para este tipo de células se realizan al 20% de O<sub>2</sub>, estudios recientes han permitido mejorar la bioseguridad en cultivo de las hMSC en estas condiciones. En este sentido, J.C. Estrada y sus colaboradores demostraron que el cultivo de hMSC a concentraciones fisiológicas (3% de O<sub>2</sub>) aumentaba significativamente su vida media, limitando el estrés oxidativo, el daño en el DNA celular, el acortamiento de los telómeros y las aberraciones cromosómicas. Sus observaciones indicaban que las vías bioenergéticas están relacionadas con el control de la vida media de los cultivos y ejercen una influencia decisiva en la estabilidad genética de cultivos primarios de células madre de origen humano (Estrada JC, 2011). Asimismo, estudios realizados con MSC de ratón han demostrado que éste podría ser un método útil para mejorar el potencial angiogénico de estas células (Kubo M, 2012).

Por otra parte, en el último año se ha llevado a cabo un estudio para evaluar la reconstrucción traqueal con el trasplante de MSC autólogas en monocapa en la submucosa del intestino delgado utilizando un modelo de conejo. Los resultados demostraron una mortalidad y morbilidad mínima en conejos con defectos en la traquea a los que se les realizó la reconstrucción con este procedimiento (Du XF, 2011). En este mismo modelo experimental, se han realizado estudios para mejorar la reparación renal en un modelo *in vivo* de lesión por isquemia-reperfusión. Utilizaron para ello MSC que expresaban la proteína morfogenética ósea humana-7 o BMP-7 (del inglés *Bone Morphogenic Protein-7*) combinando así la terapia celular y la génica en un modelo de conejo, obteniendo mejoras en la función renal (Zhen-Qiang F,

2011). Estudios recientes utilizan las MSC en modelos caninos para diversos estudios como establecer nuevas vías de conducción eléctrica mediante anastomosis de la aurícula derecha y el ventrículo derecho (Hou YB, 2011), mejorar la osteoartritis crónica de las articulaciones húmero-radial (Guercio A, 2012) o en la distrofia muscular de Duchenne (Nitahara-Kasahara Y, 2012).

Un modelo experimental que está siendo bastante utilizado en los últimos años por su similitud fisiológica y funcional con el modelo humano, especialmente a nivel cardiovascular, es el modelo porcino. La primera vez que se aislaron células MSC de este modelo animal fue en 1970 por A.J. Friedenstein, aunque en aquel momento no se le dio tanta importancia al modelo experimental como a la plasticidad que presentaban las células que estaba estudiando. Hoy en día el modelo animal a elegir, a la hora de estudiar estas células en estudios preclínicos de cualquier patología, es fundamental ya que sabemos que el comportamiento fisiopatológico es determinante para poder extrapolar resultados al modelo humano.

Las MSC porcinas han sido aisladas con protocolos específicos (Qu CQ, 2007) o modificados de los establecidos para otros modelos como el murino o el humano (Zuk PA, 2002), (Mitchell JB, 2006), y se han llegado a obtener del líquido amniótico (Chen J, 2011) o del páncreas fetal (Cao H, 2011). En los últimos años se han comenzado a analizar en profundidad con algunos estudios de caracterización, se las ha modificado genéticamente e incluso se han utilizado en reprogramación nuclear (Bosch P, 2006). Además se han llevado a cabo protocolos de inmortalización y diferenciación cardíaca (Moscoso I, 2005).

Teniendo en cuenta la capacidad de autorrenovarse y que se trata de células madre adultas, a lo largo del tiempo, su cultivo *in vitro* puede originar degeneración cromosómica (García-Olmo D, 2008), por lo que es necesario realizar estudios de su estabilidad genética durante el tiempo que permanecen en cultivo.

El cariotipo de una célula es un esquema de los cromosomas ordenados de acuerdo a su morfología (metacéntricos, submetacéntricos, telocéntricos, subtelocéntricos y acrocéntricos) y tamaño, que están caracterizados y representan a todos los individuos de una especie. El cariotipo es característico de cada especie, al igual que el número de cromosomas; Los cromosomas del cerdo ya fueron estudiados a principios del siglo pasado. El número correcto de cromosomas de 38 ya fue descrito en 1931, pero no se estableció hasta comienzos de los años cincuenta. Sin embargo, los estudios cromosómicos más precisos se llevaron a cabo cuando se introdujeron las técnicas de cultivo de tejidos (Gustavsson I, 1988). Así, el cariotipo de las células porcinas están formadas por 38 cromosomas (19 pares diploides  $2n$ : 18 pares autosómicos o somáticos (cualquier cromosoma que no sea sexual), y un par sexual (macho: XY; hembra: XX)) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=sus%20scrofa>).

### 2.3. Empleo de MSC procedentes de tejido adiposo en el tratamiento del IAM: situación actual del tema

Aunque la evaluación de las células madre como herramienta terapéutica en el tratamiento de la cardiopatía isquémica es reciente, los resultados iniciales aunque pobres son prometedores. Estos estudios tratan de minimizar la evolución del tejido dañado durante el IAM y la reparación de las estructuras cardíacas afectadas tras este proceso. La capacidad neoangiogénica, así como la mejora de la función cardíaca producida por el trasplante de células madre adultas en el corazón han sido demostradas en modelos murinos (Orlic D, 2001. A), (Orlic D, 2001. B), (Botta R, 2004).

Las opciones actuales de tratamiento para el IAM y la posterior IC incluyen el tratamiento médico, el trasplante cardíaco, los dispositivos mecánicos de ayuda circulatoria ventricular izquierda y otros intentos experimentales, que tienen en todos los casos limitaciones específicas. Por ello, la terapia celular, considerada como la “Medicina del Futuro”, se presenta como una estrategia terapéutica alternativa cuyo objetivo principal es conseguir una reparación y/o un retraso en la evolución del daño producido tras el accidente isquémico.

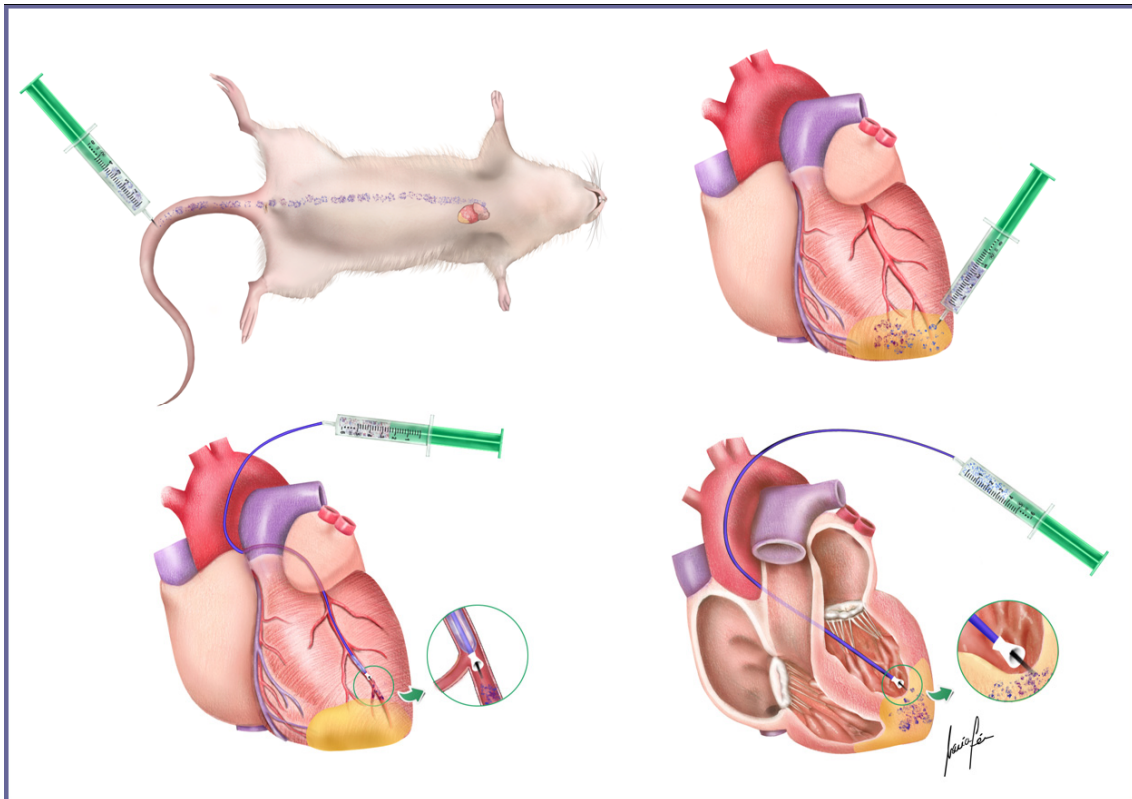
Sin nombrar los trasplantes de médula ósea, puede decirse que la terapia celular comenzó en este campo de la medicina y los buenos resultados iniciales dieron lugar al inicio de numerosos ensayos en pacientes. Aunque estos ensayos se precipitaron en el tiempo, en este momento se han adquirido los conocimientos suficientes, tras numerosos estudios preclínicos y experimentales, para confirmar la seguridad de estos ensayos (sobre todo por el hecho de utilizar en ellos células autólogas del propio paciente). Como resultado de esto, a día de hoy se están llevando a cabo cerca de los 1000 ensayos clínicos en enfermedades cardiovasculares, de los cuales más del centenar son específicamente en IAM. Aunque la mayor parte de estos ensayos se están realizando con células mesenquimales de médula ósea (BM-MSC), alguno de ellos utiliza MSC obtenidas de tejido adiposo e incluso de cordón umbilical ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

La Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS), ante la demanda de solicitudes de ensayos clínicos con este tipo de terapias, ha considerado necesaria la creación de un departamento (Terapias Avanzadas), dentro de su institución, que regule y controle estos ensayos tras considerar a estos agentes biológicos implicados como “medicamentos vivos”. Los medicamentos de terapias avanzadas son medicamentos de uso humano basados en genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería tisular) e incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico. Constituyen nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuirá a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces.

Uno de los ensayos clínicos que se están llevando a cabo en nuestro país es el conocido con el nombre de “APOLLO” y cuyo nombre oficial con el que está registrado en la base de datos del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos es “*Randomized Clinical Trial of Adipose-Derived Stem Cells in the Treatment of Pts With ST-elevation Myocardial Infarction-The APOLLO Trial*”. En este ensayo, participa el Hospital General Universitario Gregorio Marañón en colaboración con un grupo del Centro Médico Universitario de Rotterdam. Además de este ensayo, en fase I, existe otro, también coordinado por el grupo del Dr. Francisco Fernández Avilés (Jefe de Servicio de Cardiología del Hospital), en colaboración con el Hospital Universitario de Valladolid. Éste último, aunque utilizando células progenitoras hematopoyéticas, se encuentra en la fase II del estudio y es conocido con el nombre de “*TECAM2: Trial of Hematopoietic Stem Cells in Acute Myocardial Infarction*”. Las vías de administración en ambos estudios son diferentes, en este último caso la administración del tratamiento se realiza mediante trasplante intracoronario. En el ensayo “APOLLO” se utiliza un dispositivo denominado NOGA™ que permite la administración transendocárdica de estos tratamientos.

La vía transendocárdica es una nueva modalidad de administración emergente en los últimos años, con una serie de ventajas frente la infusión intracoronaria, donde las células pueden ser inyectadas directamente en el borde de la zona de infarto utilizando técnicas mínimamente invasivas. En esta vía de administración es necesario un sistema de mapeo cardíaco para localizar el daño en el miocardio y para poder inyectar los tratamientos alrededor de las zonas de infarto. Los sistemas de mapeo de contacto electrofisiológico (NOGA™) así como los de sin contacto electrofisiológico (Ben-Haim SA, 1996), (Gepstein L, 1997), (Schalij MJ, 1998), (Gornick CC, 1999) han sido evaluados y validados a lo largo de la última década. Este último, es un sistema de Soluciones Endocárdicas o ESI™ (del inglés *Endocardial Solutions*) y se trata de un sistema de mapeo sin contacto que utiliza catéteres basados en una matriz multielectrodo sin contacto o MEA (del inglés *Multi-electrode Array*), localizado dentro de las cavidades cardíacas para detectar el potencial endocárdico de campo lejano.

El sistema NOGA™ se basa en unos parches que se colocan en el cuerpo y que actúan como electrodos con el que pueden navegar catéteres electrofisiológicos en el interior de las cámaras cardíacas (Paul T, 2001). El mapeo endocárdico con NOGA™, para las inyecciones intraendocárdicas manuales, está más establecido para el trasplante de células madre y ha sido utilizado en humanos (Gyongyosi M, 2005), (Wolf T, 2001), (Kornowski R, 1998), (Smits PC, 2003) y en ensayos clínicos en curso (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NOGA+and+stem+cells>). En el Esquema 6 se indican las vías de administración celular más utilizadas en los estudios con estas terapias.



**Esquema 6.** Vías de administración celular utilizados en estudios preclínicos y ensayos clínicos. A: Administración mediante infusión intravenosa. B: Administración mediante inyección transepicárdica o administración intramiocárdica. C: Administración mediante infusión intracoronaria. D: Administración mediante inyección transendocárdica.

Por otra parte, varios factores de crecimiento también están siendo utilizados en terapia celular cardiovascular por su implicación en la reparación del miocardio (Leri A, 2007). Concretamente, los factores de crecimiento IGF1 y HGF han demostrado ser un refuerzo a tener en cuenta en este tipo de terapias y están siendo evaluados mediante su administración como tratamiento del IAM en modelos porcinos (Ellison GM, 2011). Estos modelos experimentales son además los más utilizados en los últimos tiempos para los estudios preclínicos en las patologías cardíacas, por su similitud al modelo humano. De este modo, células mesenquimales obtenidas de este modelo porcino han conseguido ser inmortalizadas y diferenciarse a células que expresan marcadores fenotípicos cardíacos al ser estimuladas con 5-azacitidina (Moscoso I, 2011).

Además, el concepto de que el corazón es un órgano postmitótico incapaz de autorrenovarse ha cambiado en los últimos años. Existen estudios de que algunos cardiomiocitos pueden ser capaces de volver a entrar en el ciclo celular y provocar una limitada regeneración de células madre residentes y circulantes (Nadal-Ginard B, 2003). Así, en 2001 se sugirió que los cardiomiocitos eran capaces de entrar de nuevo en ciclo celular (Beltrami BA, 2001) y dos años más tarde el mismo grupo señaló la posible existencia de una población de células progenitoras en el corazón adulto de roedores y estudiaba además, el potencial de



regeneración de estas células en modelos animales de IAM (Beltrami BA, 2003). A esta población se la conoce como células progenitoras cardíacas, CPC o CSC (del inglés *Cardiac Stem Cells*) y están siendo objeto de estudio en los últimos años como alternativa a los tipos celulares utilizados hasta ahora. El proyecto conocido por el acrónimo CARE-MI (del inglés "*Cardio Repair European Multidisciplinary Initiative*"), intenta profundizar en el análisis de la biología de este tipo celular que servirá de base para el desarrollo de futuras terapias, y cuyo objetivo último consiste en optimizar protocolos clínicos que demuestren la eficacia y seguridad de las CSC. Este proyecto, perteneciente a la convocatoria de "*Salud*" del FP7 (del inglés "*Seventh Framework Programme*") se inició en 2010 y es coordinado por el Dr. Antonio Bernad, del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC). Además, cuenta con la participación de varios grupos y empresas europeas entre los que se encuentra el CCMIJU.

Otra estrategia utilizada en este tipo de terapias combina la terapia celular con la génica para mejorar la eficacia de la primera. En este sentido se han realizado estudios utilizando diversas poblaciones, un ejemplo es el realizado con CSC y progenitores de cardiomiocitos donde se ha recurrido a la ingeniería genética, utilizando el promotor  $\alpha$ MHC, para mejorar la eficacia de la terapia cardiovascular (Bailey B, 2009). En otros casos se están empleando microRNA específicos, como el miR-1, miR-133 o miR-335 con el fin de valorar su influencia en posibles terapias futuras (Carè A, 2007), (Ikeda H, 2009), (Tomé M, 2011).

Con el objeto de asemejar los estudios preclínicos a lo que acontece en los pacientes, cada vez se utilizan más las técnicas de diagnóstico por imagen como la RMN, para el análisis de los parámetros que determinan la funcionalidad cardíaca en modelos experimentales. Además, si se tiene en cuenta el empleo del modelo porcino como el más parecido al humano, es imprescindible esta técnica para poder llevar a cabo la evolución de la patología a nivel experimental (Barnett BP, 2007), (Roncalli J, 2011), (Perin EC, 2011), (Ellison GM, 2011). Una de las ventajas de este tipo de técnicas es que, mediante un marcaje adecuado de las células con diversos tipos de partículas superparamagnéticas de óxido de hierro o SPIO (del inglés *SuperParamagnetic Iron Oxide*), se puede realizar un seguimiento *in vivo* de las mismas mientras se estudian los parámetros funcionales de la patología cardíaca (Henning TD, 2011), (Peng C, 2011), (Syková E, 2011), (Li TS, 2011). Además, se ha demostrado que el marcaje con SPIO y la proteína GFP, para completar los estudios una vez finalizados los seguimientos *in vivo*, son compatibles y las células marcadas de ambas formas pueden ser identificadas por RMN con secuencias adecuadas (Tang KX, 2011).

Otro enfoque es el desarrollo de un tejido funcional mediante bioingeniería. En este sentido, la mayoría de los estudios se basan en el empleo de un soporte artificial conocido como "scaffold" (colágeno, fibrina, gelatina, colágeno, alginato, etc.), que se siembra con células y se cultiva en el laboratorio como parche cardíaco (Li RK, 1999), (Leor J, 2000),

(Zimmermann WH, 2003), (Zimmermann WH, 2004), (Zimmermann WH, 2006). En este sentido, el grupo del Dr. Antoni Bayés-Genis ha utilizado colgajos de grasa vascularizada del pericardio como parches cardíacos, observando efectos beneficiosos sobre la función del ventrículo izquierdo, limitando el remodelado miocárdico y reduciendo el área de infarto tras un modelo porcino de IAM mediante ligadura de la arteria coronaria (Gálvez-Montón C, 2011a), (Gálvez-Montón C, 2011b). Además, cabe destacar la propuesta de la Dra. D. Taylor que incluye la bioingeniería del órgano completo, mediante la perfusión de estructuras de sostén previamente descelerizadas que podría generar soportes para una bioingeniería compleja de todo el órgano (Ott HC, 2008).

### 2.4. Dificultades e inconvenientes de este tipo de terapias

A pesar de los múltiples estudios experimentales y clínicos realizados durante los últimos años, seguimos sin tener respuesta a muchas preguntas que pueden contribuir a establecer la terapia celular como un tratamiento eficaz en patologías como el IAM. Las células madre mesenquimales (MSC) tienen un gran interés en medicina regenerativa. Sin embargo, a pesar de su gran potencial terapéutico, su uso clínico aún permanece seriamente limitado en la práctica, fundamentalmente debido al relativamente escaso conocimiento de su biología.

Los efectos adversos y la seguridad del enfermo son los aspectos fundamentales a tener en cuenta ante la posibilidad de plantear un ensayo clínico con este tipo de terapias. En los distintos estudios clínicos de regeneración cardíaca publicados hasta el momento, en general, la incidencia de efectos adversos descritos ha sido limitada. El trasplante de mioblastos esqueléticos en pacientes con infarto crónico se asoció a una mayor incidencia de arritmias cardíacas (Menasche P, 2003) y el empleo de HSC mediante administración intracoronaria a una mayor tasa de re-estenosis en los *stent* (Kang HJ, 2004). Un aspecto importante a la hora de valorar los resultados obtenidos, es la enorme variabilidad observada en cuanto al efecto en la función cardíaca en los distintos estudios. Respecto a esto hay que tener en cuenta la cantidad de variables que sin duda pueden influir, pero que aún se desconoce en qué medida lo hacen. Tal es el caso del tipo de población celular más apropiado capaz de contribuir a la regeneración miocárdica. De hecho los ensayos clínicos que se están llevando a cabo, no sólo presentan orígenes diversos (BM-MSC, HSC, MSC de tejido adiposo, de cordón umbilical, etc.), sino que en la mayoría de los casos se emplean poblaciones heterogéneas poco seleccionadas, debido a las limitaciones que requieren estos estudios en cuanto a manipulación del tratamiento. Estas limitaciones vienen dadas por las agencias reguladoras que exigen una manipulación mínima de los “productos de ensayo” y requieren un control exhaustivo de todos los procesos o modificaciones a los que puedan estar sometidos. Por otra parte, tampoco hay unanimidad respecto a la vía de administración idónea o la dosis mínima necesaria para obtener un efecto terapéutico claro. Y aunque cada día se conoce más sobre la biología de estas células, tampoco se conocen los mecanismos implicados en la mejoría de los parámetros funcionales, que en muchos casos se han obtenido. En relación a esto, mucho se



ha hipotetizado sobre los mecanismos implicados en esta mejoría, desde la transdiferenciación, la fusión celular e incluso, lo que se piensa más acertado, un efecto paracrino producido por el trasplante de estas células o por las diversas sustancias que éstas secretan (factores de crecimiento, citoquinas, etc.).

Además, los estudios realizados utilizando células madre en regeneración cardíaca han puesto de manifiesto que uno de los principales problemas es que un bajo porcentaje de las células administradas permanecen en el corazón. Algunos lugares donde se cree que pueden localizarse, son órganos como el pulmón, los ganglios mediastínicos o el bazo. Con las nuevas técnicas de imagen como la RMN, no solo es posible estudiar la evolución de la patología mediante el análisis de los parámetros funcionales del corazón. Además, con las secuencias de imagen adecuadas y un correcto marcaje de las células, es posible localizar los tratamientos trasplantados a lo largo de los seguimientos *in vivo*, sin necesidad de esperar a la eutanasia del animal y realizar la toma de muestras correspondiente. El marcaje celular directo es el mejor método para visualizar las células trasplantadas en sujetos vivos. Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIO) han sido ampliamente utilizadas para marcar y localizar las células *in vivo* mediante RMN (Budde MD, 2009), (Kraitchman DL, 2003), (Kim YJ, 2009). Estos cristales de óxido de hierro (en general, magnetita  $Fe_3O_4$ , o su forma oxidada, maghemita  $\gamma-Fe_2O_3$ ) tienen un diámetro de aproximadamente 10nm. Estas nanopartículas presentan muchas ventajas en su aplicación como agentes de contraste. Se componen de miles de iones de hierro y se comportan como pequeños imanes locales reduciendo el tiempo de relajación de T2 y T2\*, debido a la inducción de fuertes no homogeneidades del campo magnético creando un artefacto en la imagen. Su composición es compatible con la degradación bioquímica natural, pasando a las vías metabólicas del hierro. En los análisis *ex vivo*, estas partículas son fácilmente detectables mediante microscopía electrónica o histología (Smimov P, 2009).

Otro de los problemas encontrados para la interpretación de los resultados radica en la dificultad de confirmar el correcto anidamiento de las células a nivel miocárdico, así como el de la posible destrucción temprana de las células que sí se retienen a nivel cardíaco. El corazón está constantemente contrayéndose, contribuyendo a la pérdida mecánica y eliminando las células del miocardio cuando su administración se realiza mediante inyecciones intramiocárdicas. Así, una gran cantidad de células se pierde durante los primeros minutos de la inyección (Suzuki K, 2004), (Muller-Ehmsen J, 2002), (Yasuda T, 2005), (Teng CJ, 2006). Asimismo, hay grupos que afirman que no más del 0,1-15% son retenidas dentro del miocardio (Mazo M, 2011), (Paul A, 2009). Se están estudiando varias estrategias para evitar esta pérdida masiva de células, mejorar la retención y la supervivencia celular así como localizar y hacer un correcto seguimiento de las células trasplantadas.

En este sentido, la encapsulación de las células madre puede ayudar a aumentar su retención en el tejido cardíaco, y promover la liberación local y continua de proteínas y factores de crecimiento que éstas secretan. La encapsulación celular se basa en la inmovilización de las células dentro de una matriz polimérica rodeada por una membrana semipermeable y diseñada para proteger, tanto de la tensión mecánica como de la respuesta inmune, manteniendo también el microambiente de las células en su interior. Las células liberan los productos terapéuticos de una manera controlada y sostenida, y las membranas que rodean las microcápsulas son susceptibles de difundir los nutrientes y moléculas, como el oxígeno y factores de crecimiento, esenciales para la supervivencia celular (Murua A, 2011), (Santos E, 2012), (Dubrot J, 2010). Además ha de ser posible la eliminación de las secreciones celulares y productos catabólicos mientras se mantienen todos los componentes de alto peso molecular del sistema inmune como las inmunoglobulinas y células inmunes (Hernandez RM, 2010), (Uludag H, 2000). En un estudio reciente se observó que el uso de células madre incluidas en microcápsulas de alginato de poli-L-lisina ó APA (del inglés *Alginate-Poly-L-lysine-Alginate*) aumenta significativamente la cantidad de microcápsulas retenidas en el corazón de rata (Al Kindi AH, 2010).

Por otra parte, hasta ahora los modelos animales pequeños, especialmente los ratones, han dado una visión significativa de las bases moleculares y celulares de la biología cardiovascular. Sin embargo, existen diferencias importantes respecto a las características cardiovasculares cuando los comparamos con los humanos. Por lo tanto, son esenciales modelos grandes, cuya fisiología, función y anatomía se aproximen a los humanos, para poder llevar a cabo, en terapias e intervenciones clínicas, los descubrimientos realizados en modelos murinos (Suzuki Y, 2011). Además, no existen en realidad modelos patológicos que recreen totalmente la patología de los pacientes, no sólo por la anatomía y fisiología en cuestión, también influyen factores individuales de la propia patología así como el hecho de que se trata de enfermedades que se desarrollan en los individuos tras largos periodos de tiempo. Por ejemplo, en la mayor parte de los casos, los pacientes sufren un IAM tras el desprendimiento y posterior tromboembolismo de la placa de ateroma, la cual aparece después de muchos años y en el que influyen multitud de factores de riesgo (genéticos, nutricionales, hábitos de vida, etc).

Otro de los problemas que plantean los estudios que se están realizando a nivel preclínico, sobre todo con modelos de animales grandes, es que los seguimientos se realizan durante periodos de tiempo relativamente cortos (1-6 meses). Estos periodos de seguimiento no son suficientes para valorar la evolución de una patología cuyos efectos a largo plazo tienen como consecuencia la cronificación de la misma con el resultado de una insuficiencia cardíaca de por vida.

### 3. IAM en la especie porcina como modelo experimental preclínico

Las terapias para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, en especial en el IAM, han avanzado mucho en las últimas dos décadas. En las estrategias terapéuticas para mejorar la salud humana, los descubrimientos científicos y las nuevas tecnologías deben traducirse en aplicaciones prácticas. Estos avances suelen comenzar con la investigación básica para pasar después al ámbito clínico. El desarrollo de las nuevas tecnologías conlleva una serie de estudios preclínicos con modelos experimentales en animales. Aunque ningún modelo animal puede replicar totalmente las condiciones patológicas humanas, los modelos animales son la clave para la evaluación de los mecanismos de una enfermedad y testar técnicas de diagnóstico o intervenciones.

Las primeras investigaciones en 2001, documentando la regeneración tras un IAM en ratones y utilizando MSC obtenidas de médula ósea, provocaron un gran interés científico y clínico. Sorprendentemente, 6 meses después de ser publicados estos estudios en modelos murinos se presentaron los primeros resultados de un ensayo clínico no randomizado, en fase I, de trasplante miocárdico de BM-MSC y cuyos resultados informaron de una modesta mejora en la FE de los pacientes sometidos al ensayo. Estos resultados derivaron en la puesta en marcha de numerosos ensayos clínicos (Janssens S, 2006), (Lunde K, 2006), (Schachinger V, 2006), que utilizaban estas células en el miocardio sin haber validado dichos resultados en modelos animales adecuados y provocando una gran controversia en la comunidad científica (Nadal-Ginard B. y Fuster V, 2007). Los buenos resultados observados en el laboratorio, utilizando determinados tipos de células madre, aún no se han obtenido en humanos de forma clara, por lo que es necesario establecer un modelo experimental adecuado que se estandarice de forma previa y se haga necesario ante el planteamiento de cualquier ensayo clínico. Para avanzar, es necesario obtener mucha más información de los modelos experimentales adecuados con el fin de resolver muchas incógnitas, como establecer una relación dosis/efecto o la vía de administración más adecuada. De esta manera, también se podrán estudiar y analizar los mecanismos celulares y moleculares implicados en la regeneración cardíaca necesarios tras un ensayo de este tipo, antes de establecer conclusiones precipitadas. Todo esto hace que se plantee la necesidad de realizar estudios previos y rigurosos en un modelo experimental más apropiado. La similitud anatómica y fisiológica entre el humano y el modelo porcino en este tipo de patologías (Hughes GC, 2003) hacen imprescindible estudios comparativos que nos permitan sacar conclusiones más precisas.

En el IAM, los modelos murinos han aportado importantes conocimientos sobre la fisiopatología cardíaca. Sin embargo, los corazones de los roedores y los humanos difieren en su arquitectura, en la frecuencia cardíaca, el consumo de oxígeno, contractilidad, expresión de proteínas, e incluso en las poblaciones de células madre que tienen, existiendo una evidente necesidad de modelos de esta patología en animales grandes. Los primeros modelos animales

de gran tamaño estudiados en esta patología fueron los perros, donde se han desarrollado modelos de infarto y microembolización de la arteria coronaria (Lavine SJ, 2006). Sin embargo, el modelo preferido en experimentación preclínica en lesiones cardíacas es el modelo porcino, porque la circulación colateral coronaria y la anatomía arterial de este modelo y el del humano son muy similares así como la similitud en el tamaño de un IAM (Kim WG, 2003).

El cerdo ha servido, durante décadas, como modelo biomédico y diversos autores han descrito tales modelos con más detalle (Schook L, 2005), (Schook LB, 2004), (Vodicka P, 2005), (Ibrahim Z, 2006). Además, todos los aspectos de la función reproductiva han sido estudiados en el cerdo, desde conceptos básicos como el desarrollo del embrión (Sun QY, 2003), (Rohrer GA, 2006), (Tayade C, 2006) o el impacto de la transgénesis en la función y calidad espermática (Gerrits RJ, 2005), (Prather RS, 2007), (Strzezek J, 2005), (Lavitrano M, 2006). Mayores esfuerzos en genómica y mapeo transcripcional en este modelo (Green JA, 2006), (Gerrits RJ, 2005) revelarán importantes mecanismos reguladores de la función reproductiva. Pero algunos de los mejores ejemplos del impacto de la especie porcina como modelo experimental preclínico se encuentran con la aterosclerosis y en los avances para el tratamiento del IAM o en ingeniería de tejidos en los vasos sanguíneos. Por otra parte, la genómica aportará en profundidad las herramientas analíticas para investigar estos modelos en detalle (Lunney JK, 2007).

Aunque existen varios modelos de IAM en esta especie, uno de los más utilizados es el de la oclusión con balón de la arteria coronaria descendente anterior (Suzuki Y, 2008). Para inducir la isquemia miocárdica, aunque la arteria coronaria descendente izquierda se utiliza más frecuentemente para producir isquemia miocárdica regional, se ha utilizado también la oclusión en la coronaria izquierda circunfleja. También se han llevado a cabo estudios en abierto mediante toracotomía (Litvak J, 1957), (Fozzard HA, 1975) que permite un fácil acceso al corazón y un control visual directo que permite valorar el éxito de la oclusión de la arteria coronaria y mediante técnicas de ultrasonidos permite medir el rendimiento contráctil local, los parámetros metabólicos y el flujo coronario (Schwarz ER, 1997), (Schwarz ER, 1998), (Schwarz ER, 1999). Sin embargo, las desventajas de la toracotomía son las derivadas de tener que abrir el tórax y el pericardio de las cuales se sospecha que influyen en el patrón del remodelado del ventrículo izquierdo en modelos crónicos (Kraitchman DL, 2000), (Edwards R, 2002). Para eliminar estos inconvenientes varios grupos han utilizado técnicas endoluminales basadas en catéteres. El cateterismo cardíaco y las intervenciones coronarias en modelos porcinos y en la especie humana son similares en muchos aspectos. A través del uso de una técnica mediante la oclusión con balón de la arteria coronaria, tanto la ubicación como la duración de la oclusión, están bien controladas. Una de las dificultades encontradas al utilizar el modelo porcino de IAM es la predisposición a sufrir arritmogénesis refractaria. Se sabe que hay una elevada incidencia de fibrilación ventricular o taquicardia ventricular después de la inducción del infarto, así como una mayor mortalidad relacionada con las complicaciones del mismo. Todos los episodios de

fibrilación ventricular se producen en los primeros 20-30 minutos tras la inducción del IAM o en los 10 minutos después de la reperfusión (Suzuki Y, 2008). Para obviar estos problemas se pueden llevar a cabo diversos métodos como el manejo ventilatorio, la suplementación con electrolitos o la administración de antiarrítmicos.

La similitud, en el tamaño y la fisiología, entre los cerdos y los humanos supone ventajas importantes del modelo porcino sobre otras especies. Por otra parte, los métodos requieren un equipo especializado, instalaciones quirúrgicas adecuadas y personal cualificado, lo que limita el número de laboratorios capaces de realizar estos estudios. En estos casos, el conejo podría ser una opción ante la falta de recursos para utilizar modelos porcinos, donde se puede obtener un modelo de esta patología mediante oclusión de la arteria coronaria (González GE, 2009). Sin embargo, la principal limitación que presenta el conejo es que no cuenta con roturas de la placa de ateroma mientras que en los seres humanos la rotura de la placa y la posterior trombosis son las principales causas del IAM. Otra manera de conseguir esta patología es mediante una sobrecarga de presión del ventrículo izquierdo, inducido por la obstrucción de la aorta transversal en ratones (Rockman HA, 1994) o la banda aórtica en ratas y conejos. La hipertrofia del ventrículo izquierdo puede reproducirse mediante estimulación ventricular en perros (Takeuchi K, 1998), (Van Oosterhout MFM, 2001), (Schunkert H, 1990), estenosis valvular en conejos (Busseuil D, 2008) y obstrucción renal o estenosis aórtica en ratas, hamsters, ratones, conejos y perros (Shimizu M, 2006), (Koide M, 2000). Además, otro modelo patológico es la miocardiopatía dilatada que se obtiene en conejos y cerdos mediante la inducción de taquicardia crónica con un marcapasos (Spinale FG, 1998), (Eble DM, 1998). Durante unos años se utilizaron constrictores ameroides, generalmente utilizados para corregir el shunt portosistémico en la práctica clínica veterinaria, para obtener esta patología cardíaca mediante la oclusión progresiva de las arterias coronarias. Este dispositivo consiste en un anillo con una capa exterior de acero inoxidable y una interna higroscópica para la absorción de fluidos. La capa interna se hincha al absorber el fluido corporal, produciendo una expansión concéntrica hacia adentro provocando así la estenosis del vaso (Fu M, 2011). Esta metodología para conseguir una isquemia miocárdica ha sido utilizada en modelos de animal grande como el perro (Peters KG, 1989), (Sellke FW, 1990), (Rapps JA, 1997), el cerdo (Sellke F, 1992), (Mack CA, 1998), incluso en especies como "*Göttingen Minipig*" (Fu M, 2011). Finalmente, también se han obtenido estas patologías con modelos murinos transgénicos que presentaban mutaciones que predisponen a la miocardiopatía dilatada, los cuales han resultado muy útiles (Toko H, 2010).

Debido al tamaño y similitud fisiológica de la especie porcina y la humana, la primera se ha convertido en un modelo de elección para la ingeniería de tejidos (Moroni L, 2006) y los estudios de imagen. Así, la RMN se presenta como la técnica no invasiva más apropiada y novedosa en este modelo experimental que permite evaluar, tanto la localización y seguimiento in vivo de las células trasplantadas como el efecto terapéutico de las mismas gracias al estudio

de los parámetros que determinan la funcionalidad cardíaca (Ye Y, 2008), (Kraitchman DL, 2008).

## **4. Uso de factores de crecimiento como refuerzo en terapia celular**

### **4.1. Aspectos básicos y potencial terapéutico**

Los factores de crecimiento (o GF, del inglés *Growth Factor*) constituyen un grupo de macromoléculas polipeptídicas que presentan una serie de acciones específicas y potentes sobre la regulación de la proliferación, muerte, motilidad y diferenciación celular. Su mecanismo de acción más frecuente es paracrino o autocrino (aunque ocasionalmente es endocrino). Constituyen los primeros mensajeros que se unen a receptores glicoprotéicos de membrana para iniciar la transducción de una señal. Por lo general, los receptores de estos GF son enzimas que catalizan la fosforilación de las proteínas en tirosina, conocidas también como tirosin-kinasas (TK). Estas TK inician reacciones en cascada que terminan con la fosforilación de proteínas como las quinasas del grupo MAP, que a su vez fosforilan factores de transcripción y cuya activación determina que se modifique la expresión de ciertos genes (Barbeito CG, 2005).

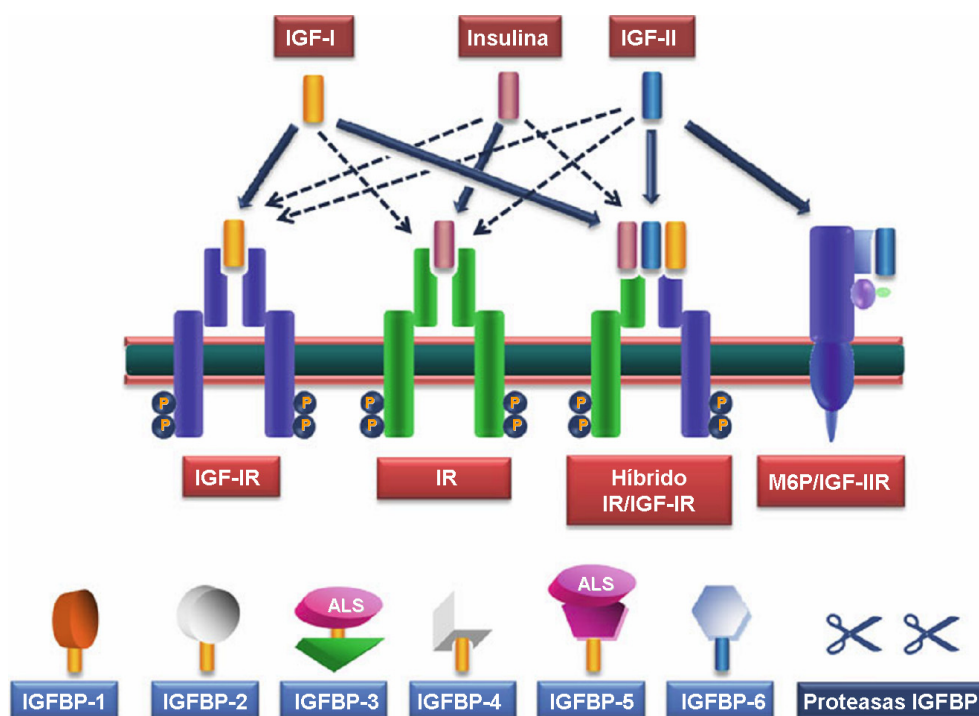
Existen numerosas familias de GF que en los últimos años han demostrado estar relacionados con la regulación del crecimiento tisular. Hasta el momento, la utilidad principal de estos factores de crecimiento y de sus receptores ha sido en el diagnóstico de tejidos tumorales, como marcadores en inmunohistoquímica. Los GF presentan acciones múltiples, por ejemplo el TGF $\beta$  que puede ser mitógeno para los fibroblastos, es el inhibidor más potente de la proliferación epitelial. Incluso factores como EGF, con una importante actividad estimulante sobre la proliferación de numerosas poblaciones celulares, pueden ser inhibidores de la misma si se modifican las condiciones experimentales. Aunque los GF se asocian con frecuencia a mecanismos locales de transmisión de mensajes celulares, algunos de ellos son transportados por sangre. Así, los IGF, PDGF y TGF $\beta$  presentan formas latentes que se unen a algunas proteínas séricas y a los gránulos plaquetarios. Otros como los FGF interactúan con componentes de la matriz, favoreciendo la creación de un microambiente especial para ejercer su acción (Dickson RB, 1995), (Massaguè J, 1990), (Massaguè J, 1998). Por esto, los GF no se limitan a la regulación de la proliferación celular, algunos de ellos modifican la motilidad, la proliferación y la muerte celular (Cross M, 1991).

Así, un ejemplo es el caso de estudios llevados a cabo en úlceras donde se ha visto la implicación de diversos GF que intervienen en el proceso de cicatrización. De hecho, ya se han probado tratamientos como la utilización de plasma rico en factores de crecimiento (Lacci KM, 2010), (Scimeca CL, 2010) y algunos de ellos están siendo utilizados de forma tópica en el tratamiento de estas úlceras crónicas. Tal es el caso del VEGF, bFGF, EGF y PDGF (estos dos

últimos ya comercializados con los nombres de Easyef® y Regranex®, respectivamente) (Ehrlich HP, 2002), (Galiano RD, 2004), (Ubbink DT, 2008), (Tuyet HL, 2009), (Hunter S, 2010).

#### 4.2. Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1)

El factor de crecimiento insulínico tipo 1 (o IGF1, del inglés *Insulin-like Growth Factor type 1*) pertenece a la que se conoce como Familia o Sistema IGF, la constituyen una familia de péptidos que intervienen en el crecimiento de los mamíferos, en el desarrollo y metabolismo, así como en procesos celulares como la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación celular. Esta familia incluye los ligandos, receptores, proteínas de unión y proteasas que se muestran en el Esquema 7.



**Esquema 7.** Sistema IGF. El sistema IGF comprende los ligandos (IGF-I, insulina e IGF-II), sus receptores (el receptor de IGF-I, IGF-IR; el receptor de insulina, IR; el híbrido IR/IGF-IR y el receptor de la manosa-6-fosfato/IGF-II, M6P/IGF-IIR), seis proteínas de unión a IGF (IGFBP) y sus proteasas. Las flechas indican la alta (sólidas) y baja (de puntos) afinidad de unión al ligando. ALS (del inglés *Acid Labile Subunit*) es la subunidad ácido lábil. (Modificado de Annunziata M, 2011).

En 1972, se designó como “somatomedinas” a unas sustancias que se encontraban en el suero y que actuaban como mediadoras de la somatotropina (también conocida hormona del crecimiento) o GH (del inglés *Growth Hormone*) (Daughaday WH, 1972). Mientras tanto, un nuevo factor con efectos similares a la insulina se identificó en el suero humano y cuya actividad no se suprimía con anticuerpos anti-insulina (Froesch ER, 1963). Este factor similar a la insulina presentaba efectos que promovían el crecimiento (Blundell TL, 1978), y más tarde, se purificaron los factores de crecimiento IGF1 e IGF2 (a los que se nombró como “*insulin-like*”



por su gran homología estructural y funcional con la insulina). La mayor parte del IGF1 que se encuentra en la circulación es producida por el hígado. La regulación de la producción hepática de IGF1 es compleja y la GH juega un papel importante en la regulación al alza de su expresión génica. Así el IGF1 se origina en el hígado y es transportado mediante mecanismos endocrinos a los lugares donde actúa. Hoy se sabe que además, se sintetiza también en otros órganos (placenta, corazón, riñón, páncreas, bazo, intestino delgado, testículos, ovarios, intestino grueso, cerebro, médula ósea e hipófisis) donde ejerce su efecto de forma autocrina o paracrina. El gen del IGF1 en humanos se localiza en el brazo largo del cromosoma 12, cuya molécula tiene un tamaño de 7,5 kDa de 70 aminoácidos. Su unión es mediada por la unión a su receptor específico IGF1R, también se une al receptor de la insulina o IR aunque con menor afinidad. Sus proteínas de unión o IGFBP están presentes en la circulación y, junto a los fluidos extravasculares, prolongan la vida media de estos factores y modulan su biodisponibilidad y su actividad. Pero estas IGFBP, a la vez que pueden aumentar la activación del receptor para IGF1 (IGF1R) y aumentar la vida media de los IGF, también pueden reducirla mediante la inhibición competitiva por la unión de IGF a sus receptores. La competencia de las IGFBP y los IGF1R por su unión a los IGF presentes en los tejidos, es un proceso dinámico, ya que la afinidad de las IGFBP puede alterarse con procesos de fosforilación, proteólisis parcial o por su unión a la superficie celular o a la matriz extracelular (Le Roith D, 2003). Además, las IGFBP están reguladas también por la acción de las proteasas, que aumentan o disminuyen su biodisponibilidad, aumentando así la complejidad del sistema IGF.

El IGF1 es un mediador fundamental de los efectos de la GH la cual es producida en la adenohipófisis y liberada al torrente sanguíneo, para luego estimular al hígado a producir IGF1. El IGF1 juega un papel fundamental en la regulación del crecimiento, proliferación y supervivencia celular afectando a los órganos cercanos. Así, se han descrito enfermedades por fallos en la producción o respuesta al IGF1, que resultan en una alteración específica del crecimiento. Uno de estos trastornos, el síndrome de Laron, no responde al tratamiento con GH debido a una falta de receptores de esta hormona. La FDA ha agrupado estas enfermedades en un trastorno llamado deficiencia primaria de IGF (IGFD) severa, donde incluye pacientes con mutaciones en el receptor de GH, mutaciones post-receptor o mutaciones de IGF. Además, aberraciones en el sistema IGF están asociadas con varias patologías incluyendo el cáncer (Smith GD, 2000), (Pavelic J, 2007), (Annunziata M, 2011). Por otra parte, se ha observado un aumento de sus niveles durante la fase de inflamación en la cicatrización, además de inducir la proliferación de fibroblastos durante esta misma fase (Phan TT, 2003). En los problemas asociados a la diabetes (como es el caso de de las retinopatías y úlceras diabéticas) podría jugar un papel fundamental al tratarse de un *factor de crecimiento "insulínico"*, cuyo nombre se le fue dado precisamente por su gran homología a la insulina y porque sus efectos en células y tejidos en crecimiento predominan sobre sus efectos en el metabolismo (Daughaday WH, 1987). Contribuye a la homeostasis de la glucosa (Clemmons DR, 2006), (Yuen KC, 2007) y niveles bajos de IGF1 están asociados con la resistencia a la



insulina, como en individuos con deleciones en el gen de IGF1 (Camacho-Hubner C, 2002). Tal es el caso, que tratamientos con IGF1 recombinante o con el complejo IGF1/IGFBP-3 en pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2, han demostrado mejorar su sensibilidad a la insulina y su homeostasis de glucosa (Clemmons DR, 2000), (Clemmons DR, 2005), (Cusi K, 2000), (Saukkonen T, 2006). Además, el IGF1 es un factor trófico y de supervivencia para células neuronales (Torres-Aleman I, 2010), y puede ejercer un efecto neuroprotector en patologías como la enfermedad de Huntington (Humbert S, 2002) y el Alzheimer (Carro E, 2002), estando implicado en la plasticidad neuronal y en las funciones cognitivas (Aleman A, 1999), (Llorens-Martin M, 2009).

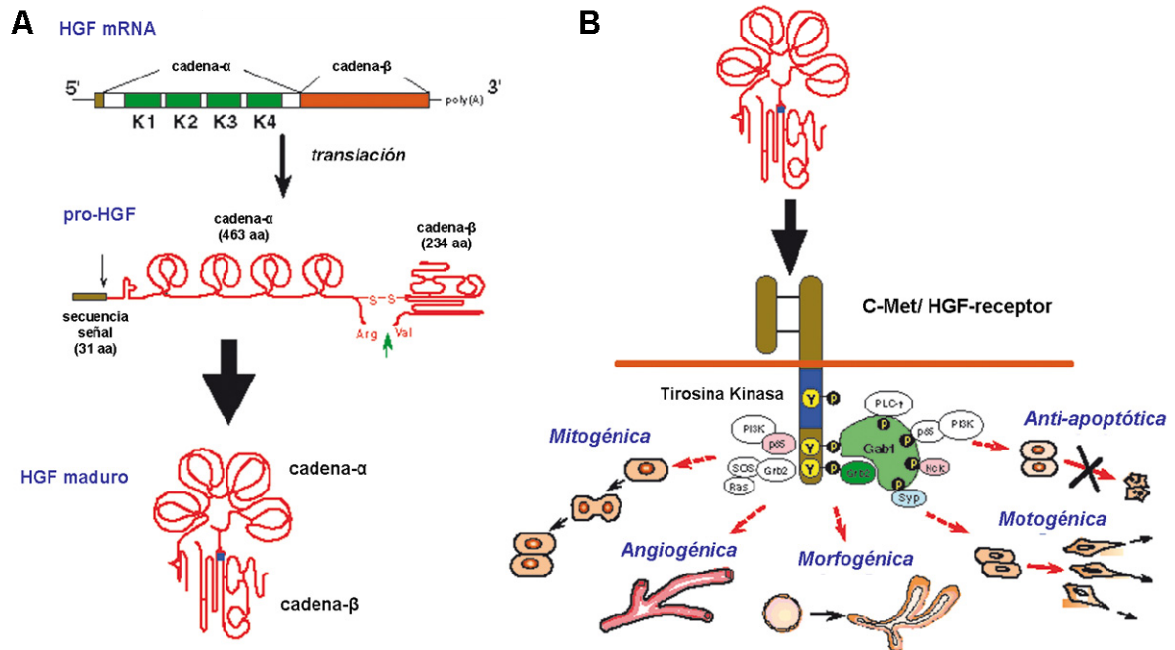
Finalmente, los factores IGF presentan también una función protectora sobre el corazón. De hecho, niveles séricos disminuidos de IGF1 están asociados a un aumento en el riesgo de sufrir cardiopatía isquémica y accidentes cerebrovasculares. Tanto estudios *in vitro* como *in vivo* han demostrado que el IGF1 tiene potentes efectos cardioprotectores (Li B, 1999), (Welch S, 2002), (Colao A, 2008), (Suleiman MS, 2007). Es también un factor mitógeno y antiapoptótico en células vasculares, incluyendo las células endoteliales y del músculo liso (Arnqvist HJ, 2008) además de ejercer funciones reguladoras en el sistema inmune (Smith TJ, 2010). En resumen, se puede decir que el IGF1 parece tener importantes efectos ateroprotectores (Higashi Y, 2010). A nivel celular, tras sus efectos proliferativos puede inducir diferenciación, así por ejemplo tras estimular la proliferación de mioblastos puede, en condiciones adecuadas promover su diferenciación a miocitos (Clemmons DR, 2009).

### 4.3. Factor de crecimiento hepático (HGF)

En 1983, se demostró que los hepatocitos de rata en cultivos primarios podían proliferar a una baja densidad celular en un medio que contenía insulina y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Nakamura T, 1983), proporcionando así una herramienta experimental que buscaba factores hepatotróficos que explicaran los fenómenos de regeneración hepática tras una hepatectomía. En esta misma década se aislaron una serie de sustancias de acciones muy diversas entre las que se encontraban la hepatopoyetina A, el factor *scatter*, el factor citotóxico tumoral y el factor mitógeno epitelial derivado de fibroblastos. Posteriormente se demostró que todas ellas eran en realidad un único factor de localización y acciones múltiples, al que se le denominó HGF (del inglés *Hepatocyte Growth Factor*) (Konishi T, 1991), (Furlong RA, 1991). La molécula del HGF, de 100 KDa, es más pesada que la de otros GF. El HGF es una molécula dimérica y está constituida por dos cadenas polipeptídicas de 463 y 234 aminoácidos (cadena o subunidad- $\alpha$  y cadena o subunidad- $\beta$  respectivamente), que poseen más homología con ciertas proteasas que con otros GF. El HGF es producido y secretado como pro-HGF por las células del estroma, como fibroblastos, macrófagos, células mesangiales del riñón y otras. El pro-HGF secretado se escinde entre la Arginina 494 y la Valina 495 por activadores del HGF, tales como el activador del plasminógeno tipo uroquinasa o serin-proteasas. El receptor HGFR, es una TK, producto del protooncogén c-Met. La unión del HGF y c-Met induce la fosforilación de

## Introducción

los carbonos terminales de los residuos de tirosina de la TK provocando múltiples actividades biológicas en una gran variedad de células. Entre las actividades biológicas que se producen por esta unión se incluyen actividades mitogénicas, motogénicas y morfogénicas (Nakamura T, 1991), (Matsumoto K, 1992), (Birchmeier C, 1998). Además, presentan otras propiedades como la angiogénica o anti-apoptótica, relacionadas con la reparación de órganos dañados en diversas patologías (Esquema 8).



**Esquema 8.** Estructura y función biológica del HGF. En el panel A se muestra el proceso de producción y activación del HGF. En el panel B se resumen las múltiples acciones biológicas del HGF mediadas a través de su unión con su receptor c-Met/HGF-receptor. (Modificado de Nakamura T, 2010).

Las tres primeras actividades, mitogénesis, motogénesis y morfogénesis, son esenciales en la organogénesis. El HGF se identificó inicialmente como un mitógeno de hepatocitos (Nakamura T, 1984) y SF/HGF se describió como un motogen de células epiteliales (Stoker M, 1987). Finalmente, en 1991 se utilizaron medios condicionados con derivados de fibroblastos para inducir la formación de túbulos con células epiteliales en geles de colágeno, actividad que se suprimió por IgG anti-HGF, pero que identificó al HGF como morfógeno (Montesano R, 1991).

Por otro lado, la regeneración hepática está regulada por diversos mecanismos moleculares secuenciales relacionados con la función del sistema HGF/c-Met. Tal es el caso del papel fundamental que juega en la regeneración del hígado tras una hepatectomía del 70% o en la hepatitis aguda. El HGF se acumula mayormente en los órganos dañados (Tajima H, 1992) por lo que, en el caso de existir niveles elevados de HGF en plasma, los órganos sanos escapan de la activación del sistema HGF/c-Met, probablemente porque no hay necesidad de

reparar tejidos, aunque las bases moleculares de este fenómeno no están claras. Varios estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que el HGF presenta efectos regenerativos en el epitelio del riñón, del pulmón y otros tejidos (Nakamura T, 1991), (Matsumoto K, 1992), (Mizuno S, 2007), (Mizuno S, 2008). De hecho, en pacientes con órganos dañados los niveles plasmáticos de este factor se encuentran elevados (Funakoshi H, 2003).

La apoptosis es una de las principales causas patógenas de las lesiones en los órganos. En relación a esto, el HGF bloquea las señales de apoptosis mediante la inhibición de la actividad de la caspasa-3 o por la inducción de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-xL (Kosai K, 1998), (Yamamoto K, 2001). Además inhibe las señales de apoptosis mediadas por Fas mediante el secuestro de células de superficie de Fas y c-Met (Wang X, 2002). Estos efectos de HGF protegen el epitelio, las neuronas y los cardiomiocitos durante las lesiones en los diversos órganos. El HGF tiene una función anti-fibrogénica muy importante actuando de diferentes formas y contribuyendo de una manera crucial en la resolución de la fibrosis. Por un lado se ha demostrado que inhibe la producción de TGF- $\beta$  en cultivos de miofibroblastos (Nakamura T, 2005), (Mizuno S, 2004), el cual es fundamental en la fibrosis de los tejidos, al convertir los fibroblastos en miofibroblastos (MyoFB), además de reducir su receptor (Yang J, 2002) e inducir la producción de decorina (Kobayashi E, 2003), un inhibidor de TGF- $\beta$ . Otra de las vías por la que actúa como antifibrogénico es inhibiendo la función de otras citoquinas fibrogénicas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas o PDGF, el factor de crecimiento del tejido conectivo o CTGF y el factor quimiotáctico de monocitos (péptido-1) o MCP-1.

El HGF ejerce una acción antiinflamatoria sobre las células inmunes inhibiendo la infiltración de neutrófilos mediante la regulación a la baja de moléculas de adhesión (como ICAM-1/E-selectina) en la superficie de células endoteliales (Mizuno S, 2005). Actúa directamente sobre los eosinófilos inhibiendo su migración a través de la baja regulación de mediadores inflamatorios durante las inflamaciones alérgicas y suprime la producción de citoquinas proinflamatorias reclutando reguladores antiinflamatorios (Ito W, 2005). Además, estimula la diferenciación de los macrófagos a células dendríticas inmunosupresoras (DC) (Rutella S, 2006) que facilitan la inducción de la regulación de linfocitos-T.

En patologías isquémicas como el IAM, la hipoxia provoca la apoptosis de células endoteliales, mientras que la disminución de los vasos de la zona aceleran aun más la disfunción de los órganos en proceso de isquemia. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que el HGF es un factor angiogénico (Nakamura Y, 1996) junto con otros como el VEGF o el FGF. La angiogénesis producida por el HGF produce una mejora en la hipoxia de estos tejidos (Morishita R, 1999) y, a diferencia del resto de factores, presenta otras ventajas como su efecto antitrombótico (Birukova AA, 2007). El VEGF produce una mejora en la permeabilidad endotelial y el edema mientras que el HGF inhibe esta permeabilidad endotelial (Mizuno S,

## *Introducción*

2005), (Birukova AA, 2007). En contraste con el FGF, con efectos fibróticos, el HGF es antifibrótico. Todos estos beneficios dan lugar a lo que se llama “*angiogénesis terapéutica*”, incluso en condiciones de hipoxia.

**Hipótesis de trabajo**



Los medicamentos de terapias avanzadas (terapia celular, génica y bioingeniería de tejidos) constituyen una innovación con grandes posibilidades en el tratamiento del paciente con IAM. Dada la facilidad para su obtención en grandes cantidades y con procedimientos poco agresivos, las MSC obtenidas de tejido adiposo son consideradas un importante recurso a tener en cuenta en medicina regenerativa. Asimismo, el estudio de estas células en un modelo patológico porcino, es una necesidad para validar este nuevo concepto de reparación miocárdica en un entorno preclínico adecuado, antes de ser utilizado en la especie humana. Nuestra hipótesis plantea la posibilidad de combinar diferentes estrategias terapéuticas, utilizando este tipo de células madre, que mejoren el tratamiento de la cardiopatía isquémica. Por un lado, la inmovilización de las MSC en microcápsulas de alginato aumentaría la retención de estas células en el miocardio mejorando así su efectividad. Además, el uso de MSC modificadas genéticamente que sobreexpresan los factores de crecimiento IGF1 o HGF, y utilizarlas de forma conjunta puede tener un efecto beneficioso en el tratamiento de esta patología. Finalmente, un correcto marcaje de estas células y su seguimiento *in vivo*, mediante imágenes de RMN, pueden optimizar la valoración de la eficacia de estos tratamientos y su evolución.





## Objetivos



En base a la hipótesis anteriormente descrita se plantean los siguientes objetivos:

1. Establecer las condiciones óptimas para un diseño experimental preclínico en un modelo endovascular de infarto agudo de miocardio semejante al humano con el fin de extrapolar los resultados y mejorar la interpretación de los mismos.
2. Optimización de las condiciones de obtención y expansión *in vitro* de las células madre mesenquimales porcinas obtenidas de tejido adiposo (paMSC).
3. Caracterización celular y molecular de las paMSC para poder realizar estudios comparativos con las obtenidas hasta el momento de otras especies y orígenes.
4. Validación de un método de marcaje celular para su posterior seguimiento *in vivo* mediante técnicas de imagen por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
5. Evaluación de un sistema de administración alternativo que mejore el trasplante y anidamiento celular, utilizando cápsulas de alginato como forma farmacéutica en este tipo de tratamientos.
6. Estudio de la influencia de la sobreexpresión en paMSC de factores de crecimiento seleccionados (IGF1 y HGF) a nivel celular y funcional.
7. Análisis de los parámetros que determinan la funcionalidad cardíaca, tras el trasplante alogénico de paMSC como tratamiento terapéutico en cardiopatía isquémica, utilizando técnicas de imagen por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
8. Valoración de la seguridad del procedimiento y la eficacia terapéutica de los distintos grupos de tratamiento analizados en el estudio.



## **Materiales y métodos**



La fase experimental de este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la colaboración existente entre dos instituciones, el Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón* (CCMIJU), el cual está acreditado como Centro Usuario de Animales de Experimentación (CC-001) por la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de la Junta de Extremadura, y el Departamento de Cardiología Regenerativa del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC). Además, en la realización de algunos experimentos, han participado otras instituciones y grupos de investigación como el Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica (Facultad de Farmacia) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) y la empresa Coretherapix (CTX).

El proyecto fue aprobado por parte del comité de ética de experimentación animal del CCMIJU y se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente legislación:

- Ley 14072007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. BOE159; 04-07-2007.
- Directiva 86/609/CEE del consejo de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. DOL358; 18-12-1986.
- Ley del 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación transporte, experimentación y sacrificio. BOE268; 08-11-2007.
- Real Decreto 1201/2005, del 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE252; 21-10-2005.

## 1. Modelos animales

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado 38 animales de la especie porcina (*Sus Scrofa Domestica*), y raza *Large White*, con un peso medio de  $38.95 \pm 9.72$ , con edades entre 3 y 4 meses de vida, hembras y sanas. Todos los animales fueron criados en al misma granja de cerdos seleccionados y alimentados con dieta estándar peletizada, bajo las mismas condiciones veterinarias y zootécnicas. Los animales se trasladaron al animalario del Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón* (CCMIJU), manteniéndose en aislamiento como cuarentena durante el periodo de 15-20 días con el fin de que los animales se aclimatasen a su nuevo ambiente y régimen nutricional (estándar peletizada). Durante este tiempo, los animales se mantuvieron en condiciones estándar (condiciones controladas de temperatura y humedad 20-24°C, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, agua *ad libitum* y comida controlada en función de las características fisiológicas del animal). Los animales han sido sometidos a la supervisión veterinaria diaria.

## 2. Tipos y líneas celulares

- **paMSC.** Las subpoblaciones de células madre mesenquimales adultas utilizadas fueron aisladas de biopsias de tejido adiposo de 9 animales de la especie porcina y raza *Large White*.

- **haMSC.** Los aislados de células madre mesenquimales adultas procedentes de tejido adiposo humano (haMSC34 y haMSC40) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Cardiología Regenerativa del CNIC. Se utilizaron en los estudios comparados de cariotipo y de manipulaciones genéticas con el gen de la telomerasa humana (hTERT), respectivamente, entre haMSC y paMSC.

- **pCSC.** La línea de células madre adultas cardíacas fue proporcionada por la empresa Coretherapix-Inbiomed (CTX-IbM). Estas células se utilizaron en los estudios fenotípicos comparados entre pCSC y paMSC.

- **Fibroblastos BHK (Baby Hamster kidney).** Utilizada por el laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia UPV/EHU para los estudios preliminares de microencapsulación. Esta línea celular les fue suministrada por el Departamento de Cirugía Neurológica de la Universidad de Okayama (Japón).

- **HEK293T (Human Embryonic Kidney).** Utilizada por el Departamento de Vectores Virales y Cardiología Regenerativa para la obtención de los vectores virales utilizados en la transducción de las paMSC.

### **3. Obtención de células madre adultas mesenquimales de tejido adiposo porcino (paMSC)**

El aislamiento de MSC de tejido adiposo de cerdo se llevó a cabo según modificaciones de protocolos de aislamiento de MSC en humanos (Zuk PA, 2001), (Mitchell JB, 2006) y en especie porcina (Qu CQ, 2007). En el quirófano, bajo anestesia general y con el animal en decúbito dorsal, se realizó una incisión en la línea media abdominal y se extrajo grasa abdominal. La grasa se introdujo en un recipiente estéril, para evitar contaminaciones, y en condiciones de frío para mantener las propiedades de la grasa y evitar en la medida de lo posible la muerte celular.

En estas condiciones de frío y esterilidad se trasladó la grasa obtenida al laboratorio para allí ser procesada a la mayor brevedad posible. El procesamiento se realizó durante la primera hora tras la extracción, ya que transcurrido ese tiempo las propiedades del tejido adiposo comienzan a variar.

Una vez en el laboratorio y teniendo preparado todo el material necesario, se procesó la grasa en las salas de cultivo, dentro de la campana de seguridad biológica. Después de lavarla varias veces con una solución de tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*), el tejido adiposo extraído fue sometido a digestión enzimática con colagenasa V (Sigma, concentración final 0.075%) durante 60 minutos a 37 °C. Posteriormente se clarificó mediante



centrifugación a 450xg durante 10 minutos, y el pellet, tras resuspenderlo, se filtró mediante un filtro de nylon de 70µm. La suspensión se dispersó bien y se sembró entonces en medio de cultivo DMEM bajo en glucosa (1000mg/L), con 10% FBS (Lonza, Cat. N° DE14-801F) a una densidad aproximada de  $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Las células se cultivaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, y aquellas células no adherentes fueron eliminadas en los diferentes cambios de medio (3-4 días). A lo largo de los 8-10 días primeros tras el aislamiento, los cultivos se mantuvieron con 0.1% de Fungizona/Anfotericina B (Gibco-Invitrogen, Cat n° 15290-018. Stock 250Ug/ml) para evitar las posibles contaminaciones propias de los aislamientos primarios.

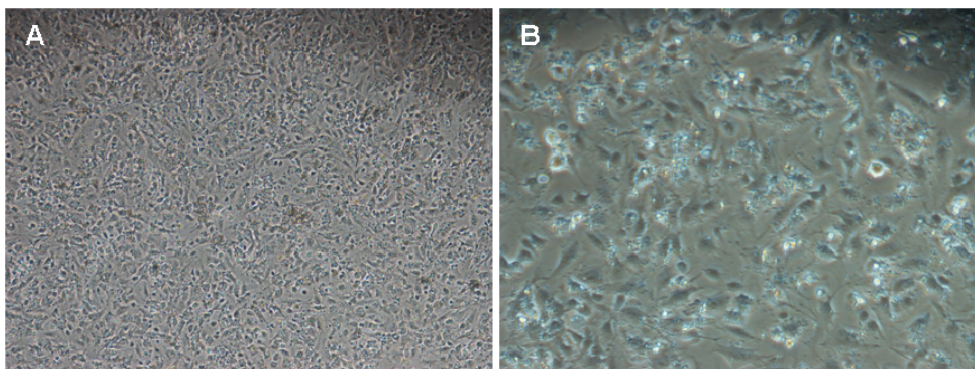
A lo largo del desarrollo de esta tesis se realizaron diferentes biopsias de tejido adiposo subcutáneo de cerdo, con el objetivo de realizar y poner a punto las extracciones y aislamientos de las células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo porcino (paMSC), que posteriormente se utilizarían para los estudios de caracterización y los alotrasplantes.

A las células obtenidas de cada uno de los aislamientos se les consideró una subpoblación diferente asignándoles el número correspondiente al aislamiento del que procedían. En la Tabla 3 se muestra un resumen de los aislamientos realizados y los recuentos iniciales que se llevaron a cabo en el proceso de purificación de las distintas subpoblaciones celulares.

Subpoblación de paMSC	Peso grasa (g)	Recuento en aislamiento T0 (n° de células)	Recuento del 1° pase (n° de células)	Tiempo del 1° pase
paMSC02	8.29	22.480.000	x (contaminación) hong.	x
paMSC03	4.8	2.720.000	1.000.000	144 horas (6 días)
paMSC04	10.43	6.420.000	1.200.000	48 horas
paMSC08	6.82	26.440.000	7.300.000	48 horas
paMSC09	13.06	x	502.500	72 horas (3 días)
paMSC10	22.41	80.780.000	17.300.000	120 horas (5 días)
paMSC11	1.9	600.000	825.000	288 horas (12 días)
paMSC12	2.2	600.000	1.080.750	288 horas (12 días)
paMSC13	1.87	x	1.480.000	120 horas (5 días)

**Tabla 3.** Subpoblaciones celulares de paMSC obtenidas en los distintos procesos de extracción, aislamiento y purificación llevados a cabo. X: Recuentos no realizados por la dificultad en el proceso.

Los rendimientos se realizaron tomando como referencia los recuentos en pase 1, dada la dificultad de recuento en el momento del aislamiento por la presencia de otros tipos celulares (glóbulos rojos, preadipocitos, etc.) y restos de tejido adiposo (Imagen 1), así como los problemas de contaminación que impidieron continuar con alguna de las subpoblaciones.



**Imagen 1.** Imágenes de células paMSC08 tras su aislamiento de tejido adiposo subcutáneo a las 24 horas de ponerlas en cultivo; microfotografías a 10x (A) y 20x (B).

Las subpoblaciones que finalmente se utilizaron para el desarrollo de todos los estudios fueron las identificadas con la nomenclatura paMSC04, paMSC08, paMSC10, paMSC11, paMSC12 y paMSC13.

Antes de la realización y desarrollo de cualquier experimento o estudio se consideró importante realizar un análisis para comprobar que los cultivos obtenidos estaban libres de micoplasma. Para ello se utilizó el kit comercial GEN-PROBE® MYCOPLASMA TISSUE CULTURE NI (MTC-NI) RAPID DETECTION SYSTEM. La detección se realiza mediante la hibridación de ácidos nucleicos y el RNA ribosomal (rRNA) (Weisburg WG, 1989).

## **4. Técnicas de cultivo celular**

### **4.1. Cultivo y expansión celular**

Dada la capacidad de autorrenovación de este tipo de células, una vez aisladas, las paMSC se mantuvieron mediante técnicas de cultivo celular donde se sembraron en medio de cultivo DMEM bajo en glucosa (Cat. nº D5546, Sigma-Aldrich), con suero fetal bovino (FBS) (Suero Fetal Bovino, del inglés *Fetal Bovine Serum*, cat. DE14-801F, Lonza) manteniéndose en unas condiciones de 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 20% de O<sub>2</sub> en incubador Heracell 150. En la mayor parte de los casos, la densidad de siembra en los cultivos fue de 5000 células/cm<sup>2</sup> y se utilizaron botellas de cultivo de 75cm<sup>2</sup> o placas de 100mm de diámetro. Todo ello, tanto la densidad como el recipiente de siembra, dependiendo del experimento realizado (en otras ocasiones se emplearon placas multipocillo de 6 y 24 pocillos). Para el mantenimiento de los cultivos, se realizaban cambios de medio dos veces por semana hasta llegar a una confluencia del 80-90%. Después, las células se levantaban de los soportes de cultivos por tripsinización y se resembraban de nuevo tras su recuento.

En el proceso de tripsinización, primero se elimina el medio de cultivo y se realizan un par de lavados con PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*), con el fin de eliminar el FBS que pudiera quedar y entorpeciera el proceso. Posteriormente, se añade una cantidad de tripsina (Tripsina-EDTA 0.05%, GIBCO) de modo que la superficie del soporte de cultivo se

cubra totalmente (todo ello en función de la superficie donde tuviéramos sembradas las paMSC). En general, para los soportes usuales de mantenimiento de cultivo, con un volumen de 1-2 ml de tripsina es suficiente. Los cultivos con la tripsina se incuban de 3 a 5 minutos a 37°C hasta observar al microscopio que las células se han levantado de los soportes y se encuentran en suspensión. En ese momento se para la reacción de tripsinización con un volumen de medio de cultivo con FBS. El volumen de medio a añadir para parar dicha reacción es dependiente de la tripsina añadida (1.5 ó 2 veces la cantidad de tripsina utilizada). Posteriormente se pasan a tubos de 15 ó 50ml (Falcon) para ser centrifugados (450xg) durante 5 minutos, se elimina el medio y el *pellet* de células es resuspendido en un volumen de medio para volver a ser resembradas. Cada tripsinización corresponde a 1 pase.

Una vez establecidas las condiciones de siembra, se iniciaron los procesos de expansión celular para obtener el número adecuado de paMSC con el que realizar los estudios iniciales de caracterización. De este modo, después de 7 días tras los aislamientos, cuando las colonias de paMSC fueron aparentes o alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 80%, las células se tripsinizaron (Tripsina-EDTA 0.05%, GIBCO) y resembraron para su expansión a una densidad de 5000 células/cm<sup>2</sup>. La expansión de las células se llevó a cabo mediante sucesivas tripsinizaciones una vez a la semana. Para este proceso de expansión, se utilizaron frascos de cultivos de 175cm<sup>2</sup> (utilizando una media de 30 semanales, donde las células de 25 de ellos eran congelados y expandidas las de los 5 restantes). La expansión se produjo hasta obtener la dosis adecuada en cada uno de los grupos por un lado y para tener un banco celular con el que poder realizar trabajos posteriores por otro.

#### **4.2. Procedimientos de congelación/descongelación**

Para la conservación y almacenamiento de las células hasta ser utilizadas (bien en los trasplantes o para experimentos concretos a diferentes pases de cultivo), se congelaron utilizando como medio de congelación un 90% de suero fetal bovino (FBS) y un 10% de DMSO (Cat. nº D8418, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). En cada criovial (Cat. nº 375418, Cryotube™ Vials, Nunc™, Denmark) se congelaron 2-3 millones de paMSC, después de hacer un recuento celular previo.

La congelación se produce de forma lenta, inicialmente guardando los viales a -80°C en un recipiente llamado "Mr. Frosty" (Cat. nº 5100-0001, Nalgene, Rochester, NY, USA) durante 24 horas. Este recipiente contiene en su interior un volumen de 250 ml de isopropanol que evita el descenso rápido de la temperatura. Transcurrido este tiempo, los crioviales se guardaron en N<sub>2</sub> líquido donde permanecieron hasta ser utilizados.

El DMSO contenido en el medio de congelación resulta muy tóxico para las células a temperatura ambiente, por este motivo, y al contrario de lo que ocurre en la congelación, el proceso de descongelación se realiza de forma rápida. Así, tras extraer los viales que

contienen las paMSC del N<sub>2</sub> líquido, pasan directamente a un volumen de medio de cultivo previamente atemperado a 37°C. Posteriormente son centrifugadas para eliminar el medio en el que se encuentran (que contiene el medio de congelación), resuspendidas en un volumen de medio de cultivo (en función de los crioviales descongelados), para después ser sembradas y puestas de nuevo en cultivo.

### 4.3. Recuentos celulares y estudios de viabilidad

Para realizar los recuentos celulares de los cultivos así como para determinar la viabilidad celular de los mismos se realizó, de forma general, mediante el método de exclusión con azul de tripán. En este método se mezclan 20µl de la suspensión celular y 20µl de una solución del colorante vital azul de tripán al 0.4% en PBS (Cat. nº 15250-061. Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). De dicha mezcla se toman 20µl que se cargan en una cámara de Neubauer donde se realizan los recuentos. Las células teñidas de azul son excluidas (este colorante tiñe de este color a las células muertas) considerando como viables las células no teñidas.

Así, en la muestra inicial, el número de células por unidad de volumen, se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Nº de células/ml} = N \times \text{dilución} \times 10.000$$

Donde N es el número de células por cuadrante en la cámara de Neubauer (valor promedio de las células contadas en cada cuadrante). La dilución siempre es 2 (ya que la relación en mezcla entre suspensión celular y azul tripán es 1:1).

#### 4.3.1 Estudio del contenido de células viables en microcápsulas (Método del CCK-8)

Para determinar el contenido de células viables, una vez encapsuladas, se llevó a cabo un ensayo preliminar con fibroblastos BHK y posteriormente otro con las paMSC mediante el método del CCK-8 (*Cell Counting Kit-8*). Se trata de un ensayo colorimétrico en el que se mide la cantidad de formazán que se forma por las deshidrogenasas de las células al añadir el reactivo y esta cantidad de formazán que se forma es directamente proporcional al número de células vivas. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos que contenían 40 microcápsulas por pocillo y a los que se les añadieron 10µl del reactivo CCK-8 (Sigma, St Louis, MO). Ambos ensayos se realizaron midiendo la absorbancia a 560nm (utilizando como referencia la  $\lambda$  a 690nm) en un lector de placas (Multiskan EX Labsystems) de forma semanal y hasta el día 42. Para ello se pusieron en cultivo, por un lado las microcápsulas y por otro las mismas marcadas con el complejo Endorem® (magnetocápsulas). Se pusieron en cultivo tantos pocillos como mediciones totales se realizaron y se midió la absorbancia correspondiente al día de medición (el resto se dejó en cultivo hasta el día de medida de absorbancia). En el ensayo preliminar con los fibroblastos se realizaron 7 medidas correspondientes a los días 1, 7, 14, 21, 28, 35 y 42

mientras que en el ensayo realizado con las paMSC el estudio *in vitro* se realizó durante 21 días.

#### 4.3.2 Estudio de la influencia del marcaje con Endorem® en la viabilidad celular

En este estudio se utilizaron dos métodos diferentes, por un lado el método del CCK-8 (para comparar los resultados con los obtenidos con las microcápsulas) y mediante exclusión con azul de tripán, para validar la metodología anterior. En ambos casos se utilizaron las mismas subpoblaciones empleadas en los trasplantes. De este modo, se compararon por un lado las células inyectadas en los grupos 2 y 3 (paMSC+GFP+Endorem® y paMSC+GFP) de la subpoblación obtenida del cuarto aislamiento (paMSC04) y por otro las obtenidas en el aislamiento 11 (paMSC11), que fueron las utilizadas en las microencapsulaciones. En éste último caso se compararon también las marcadas frente a no marcadas con este complejo de hierro. En todos los casos las células utilizadas se encontraban en el mismo pase que el que se emplearon en los diferentes tratamientos. Las paMSC se sembraron a una densidad de 1500 células/cm<sup>2</sup>, unas 3000 células en cada pocillo (mismas células que en el estudio con microcápsulas) para eliminar el mayor número de variables. Se utilizaron tantas placas (de 24 pocillos) como días de seguimiento. En cada una de ellas se sembraron los pocillos, tanto para su medición con el CCK-8 como para su medición por exclusión con azul de tripán, (en ambos casos por triplicado) y para cada una de las líneas celulares estudiadas. Al igual que en el caso de las microcápsulas, se realizaron las mediciones correspondientes a cada día, dejando el resto en cultivo hasta el día de su medida. En ese tiempo, las paMSC no se tripsinizaron con la intención de simular, en la medida de lo posible, las condiciones en el interior de las microcápsulas. Las mediciones, con ambos métodos, se realizaron semanalmente.

##### **a) Estudio de viabilidad con CCK-8**

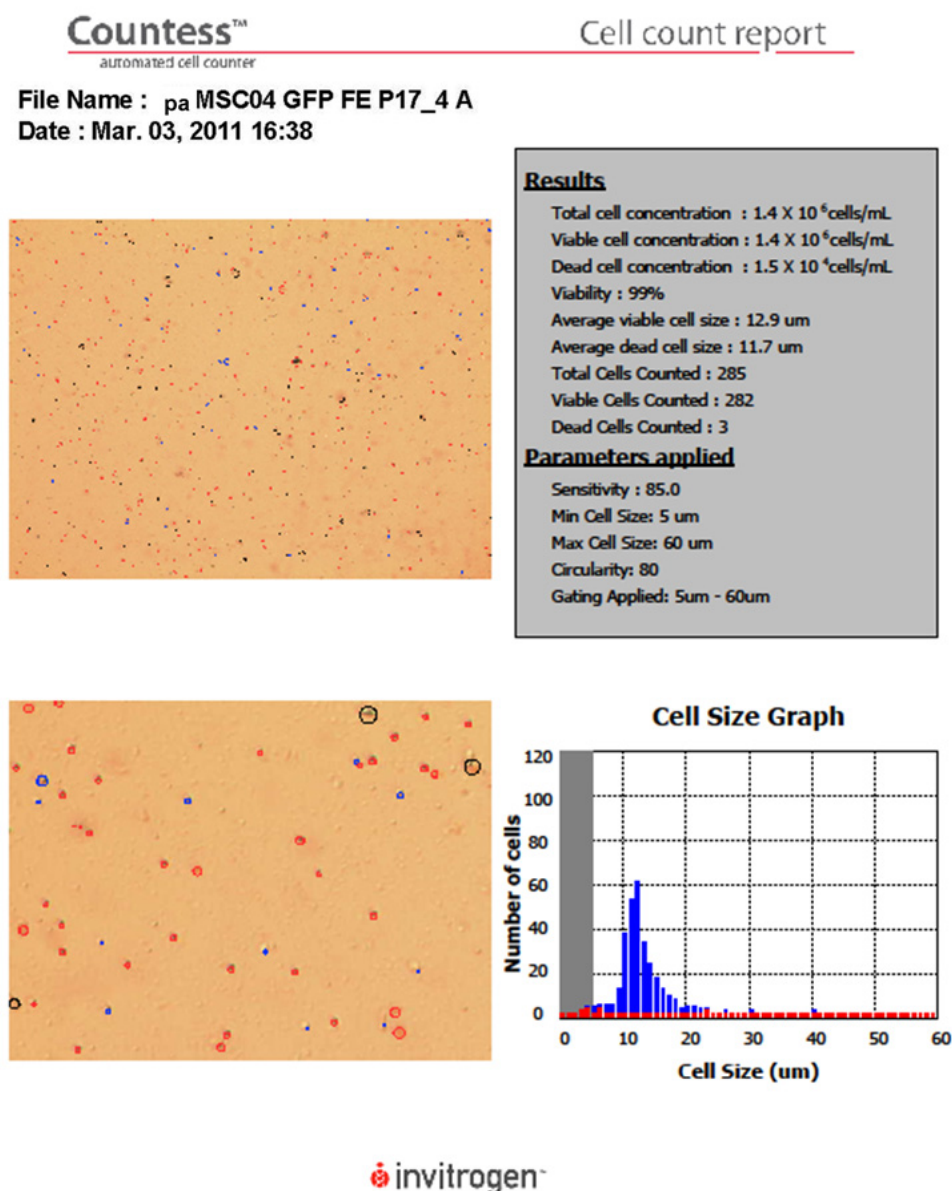
Para el desarrollo de este método se utilizó el kit comercial *Cell Counting Kit-8* (Cat. 96992, Sigma-Aldrich) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó un lector de placas (Take3, SynergyMX de BIOTEK), en el que se tomaron los valores de absorbancia (450nm). Las medidas de absorbancia de cada pocillo, se realizaron por duplicado, tomando la media de los valores obtenidos. Dichas medidas se tomaron antes y después de utilizar el detergente SDS1% de los tres pocillos sembrados para cada tipo celular. En todos los casos se extrapolaron los resultados a un número de células determinado en función de sus rectas de calibrado correspondientes (datos no mostrados). Se realizaron tantas rectas de calibrado como tipos celulares se analizaron, eliminando siempre la absorbancia producida por el medio de cultivo.

##### **b) Estudio de viabilidad con azul de tripán**

Para validar los resultados obtenidos con el CCK-8, se realizaron recuentos celulares directos mediante el método de exclusión con azul de tripán. Para ello, se analizaron tanto el número total de células presentes en los pocillos como las células viables y a partir de estos



datos se pudo obtener el % de viabilidad. De cada tipo celular se sembraron tres pocillos haciendo, de cada uno de ellos, los recuentos por duplicado. Dado el número tan elevado de recuentos, se utilizó en este caso un contador de células automático Countess™ (Invitrogen) en lugar de la cámara de Neubauer. Los datos obtenidos en cada recuento vienen dados por el Countess™ con informes similares al que se muestra en la Imagen 2:

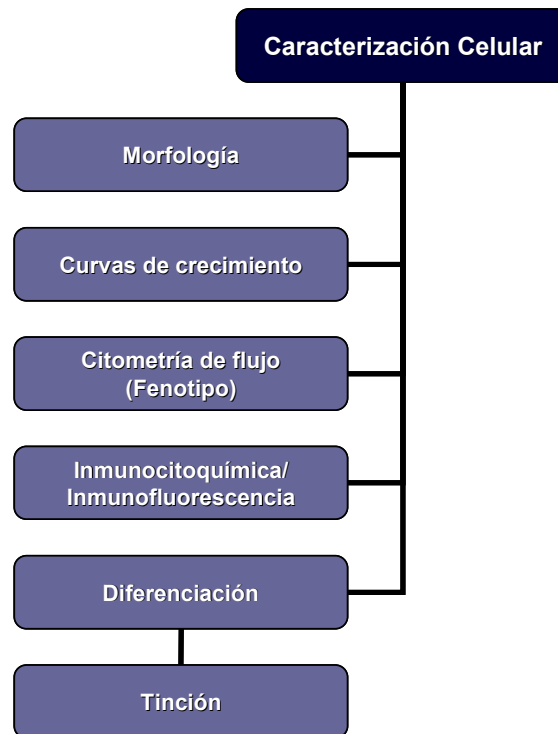


**Imagen 2.** Informe obtenido en cada uno de los recuentos de las paMSC con el contador de células Countess® para los estudios de viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul de tripán.

Estos informes están formados por una imagen representativa de las células a contar, un cuadro resumen con los resultados obtenidos de cada recuento (donde se analizan distintos parámetros como las células contadas, las concentraciones por unidad de volumen y los tamaños celulares, tanto de células totales, viables y no viables). También se muestra un gráfico representativo de las células viables (en azul) respecto a las no viables (en rojo) teniendo en cuenta el tamaño celular de cada una de ellas.

#### 4.4. Caracterización celular

Todos los experimentos realizados para la caracterización de las paMSC porcinas procedentes de tejido adiposo (Esquema 9) se han llevado a cabo en al menos cuatro subpoblaciones celulares, esto es, en paMSC aisladas de distintos animales. Además se han utilizado células en pases tempranos, pases de 2 a 5.



**Esquema 9.** Metodología llevada a cabo para la caracterización celular de las células madre adultas estudiadas (paMSC).

Para determinar la identidad de las paMSC utilizadas se tuvieron en cuenta los criterios propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, Internacional Society Cellular Therapy) en el año 2006.

##### 4.4.1. Evaluación morfológica

La evaluación morfológica de las células se realizó mediante observación directa con microscopio NIKON Eclipse TE-2000-S y registro fotográfico con cámara digital NIKON DS-Fi1. Para el análisis de dichos registros se utilizó el software de adquisición y análisis de imágenes *NIS-Elements* (versión 2.33, NIKON).

##### 4.4.2. Curvas de crecimiento

Tal y como se explica en el punto 4.1 de este apartado, las células se cultivaron a unas condiciones de 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> con un medio de cultivo bajo en glucosa DMEM, con 10% FBS,

## *Materiales y métodos*

1% de P/S (Cat. nº DE17-602E, Biowittaker, Lonza) y 1% de L-Glutamina (Cat. nº BE17-605E, Lonza), procurando mantener una confluencia de aproximadamente el 80%.

Para estudiar el comportamiento de las paMSC respecto a su crecimiento, en función de su confluencia, se sembraron las células en placas de 6 pocillos a distintas concentraciones (1000 células/cm<sup>2</sup>, 2500 células/cm<sup>2</sup> y 5000 células/cm<sup>2</sup>) y por duplicado. Se sembraron tantas placas como recuentos se hicieron a varios tiempos (a día 0, día 3, día 5, día 7, día 10, día 12, día 14 y día 17) con el fin de dejar los cultivos en crecimiento hasta el momento del recuento, evitando así las tripsinizaciones y que dicho proceso interfiriera en el crecimiento natural de los cultivos. Se obtuvieron los datos del número total de células a cada una de las concentraciones (con las medias de cada uno de los recuentos) y se calcularon las células/cm<sup>2</sup> con el paso del tiempo.

Los estudios de crecimiento celular (n=4) se llevaron a cabo con 4 subpoblaciones diferentes. El cultivo de las células se mantuvo a lo largo del tiempo mediante sucesivas tripsinizaciones (Trypsina-EDTA 0.05%, GIBCO) una vez a la semana. Cada tripsinización corresponde a 1 pase y posteriormente se resembraron para su expansión. La densidad a la que se sembraron para realizar las curvas de crecimiento fue de 5000 células/cm<sup>2</sup>, una vez analizado que bajo estas condiciones obteníamos un gran número de paMSC en poco tiempo. En cada subpoblación los recuentos se hicieron por duplicado y se analizó el número de células totales acumulado (al estimar el número de células/cm<sup>2</sup> de cada recuento). Los resultados se obtuvieron calculando el valor promedio de los obtenidos con cada una de las subpoblaciones estudiadas. Las curvas de crecimiento se mantuvieron durante más de 35 semanas en cultivo.

Estudios en ratón y en humanos han demostrado que variando el porcentaje de O<sub>2</sub> de los cultivos de estas células, disminuyéndolo hasta un 3% y ajustándolo así a las condiciones fisiológicas reales, el crecimiento celular aumenta significativamente por lo que se decidió estudiar este comportamiento en las paMSC de la especie porcina para comprobar si ocurría lo mismo. En los estudios comparativos de crecimiento celular variando las condiciones de O<sub>2</sub>, se analizaron las subpoblaciones paMSC04 y paMSC10 inicialmente y sobre la paMSC10 y paMSC11 meses más tarde, al repetir el experimento con un mayor número de pases. En el primer caso los cultivos se mantuvieron durante 7 pases y se estudió la tendencia en el crecimiento bajo ambas condiciones (20% de O<sub>2</sub> y 3% de O<sub>2</sub>), realizando siempre los recuentos de forma paralela en el tiempo. En el estudio realizado meses más tarde se analizaron las subpoblaciones paMSC10 y paMSC11 manteniendo los cultivos durante 15 pases, estudiando la tendencia en el crecimiento bajo ambas condiciones de O<sub>2</sub> y realizando siempre los recuentos de forma paralela en el tiempo.



En este estudio se analizó otro de los parámetros indicativos y determinantes en los estudios de crecimiento celular, este parámetro es el PD (del inglés *Population Doubling*) ó tiempo de duplicación. Nos indica el número de veces que las células se duplican en cada uno de los pases y se calcula con la siguiente fórmula:

$$PD = \frac{\log_{10}(N^{\circ}final) - \log_{10}(N^{\circ}inicial)}{\log_{10} 2}$$

Donde  $N^{\circ} inicial$  es el número de células que se sembraron y  $N^{\circ} final$  el número que se contaron antes de realizar el pase siguiente. En todos los casos los recuentos se realizaron con dos subpoblaciones celulares (paMSC10 y paMSC11). De cada una de las subpoblaciones se hicieron dos siembras y de cada una de ellas dos recuentos (n=4).

#### 4.4.3. Protocolos de diferenciación

Las paMSC en pase 2-3, se sometieron a distintos protocolos de diferenciación celular con el fin de derivarlas hacia los linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico. Para ello se cultivaron en placas de 12 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. El medio de cultivo basal se reemplazó entonces por un medio de cultivo idéntico en el que se incluyó el inductor de diferenciación adecuado (Tabla 4): Dexametasona 1 $\mu$ M, 3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0.5mM, Indometacina 0.1mM, para diferenciación adipogénica; Dexametasona 0.1 $\mu$ M, Ascorbato-2-fosfato (AA2P) 50 $\mu$ g/ml, Piruvato sódico 100 $\mu$ g/ml y TGF $\beta$ 1 10ng/ml para la diferenciación condrogénica; y Dexametasona 0.1 $\mu$ M, AA2P 0.2mM y  $\beta$ -Glicerofosfato 10mM en el caso de la diferenciación osteogénica. Se realizaron al menos tres experimentos diferentes para cada linaje de diferenciación.

Los cultivos se mantuvieron durante tres semanas manteniendo siempre sus cultivos controles (con medio de cultivo habitual) de forma paralela. Una vez finalizados los protocolos se comprobaron las diferentes inducciones mediante sus tinciones correspondientes.

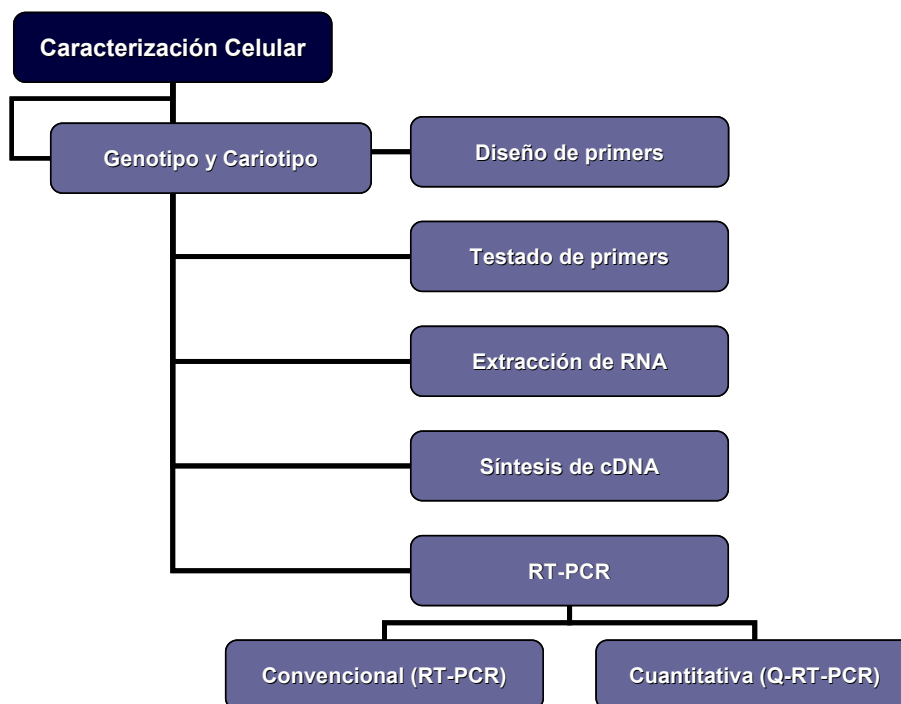
Reactivo	Casa comercial (Referencia)	Medio habitual de cultivo	Medio de diferenciación adipogénico	Medio de diferenciación condrogénico	Medio de diferenciación osteogénico
DMEM	Sigma-Aldrich (D5546)	1x	1x	1x	1x
FBS	Lonza Biowittaker (DE14-801F)	10%	10%	10%	10%
P/S	Lonza Biowittaker (DE17-802E)	1%	1%	1%	1%
L-Glut	Lonza Biowittaker (BE17-805E)	1%	1%	-	1%
Dexametasona	Sigma (D4902)	-	1 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M
IBMX	Sigma (17018)	-	500 $\mu$ M	-	-
Indometacina	Sigma (17378)	-	100 $\mu$ M	-	-
AA2P	Sigma (49752)	-	-	50 $\mu$ g/ml	200 $\mu$ M
Piruvato sódico	Sigma (P4565)	-	-	100 $\mu$ g/ml	-
TGF $\beta$ 1	PeproTech (100-21) EC, London	-	-	10 ng/ml	-
$\beta$ - Glicerofosfato	Sigma (G9891)	-	-	-	10mM

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo utilizados con paMSC.

## 5. Técnicas de biología molecular

### 5.1. Caracterización molecular

El conocimiento de los genes implicados en replicación y diferenciación celular, como su regulación transcripcional y epigenética son fundamentales para seguir avanzando en el conocimiento de este tipo de células. En el Esquema 10 se muestra la metodología a seguir que se ha llevado a cabo para el estudio molecular de las células estudiadas.

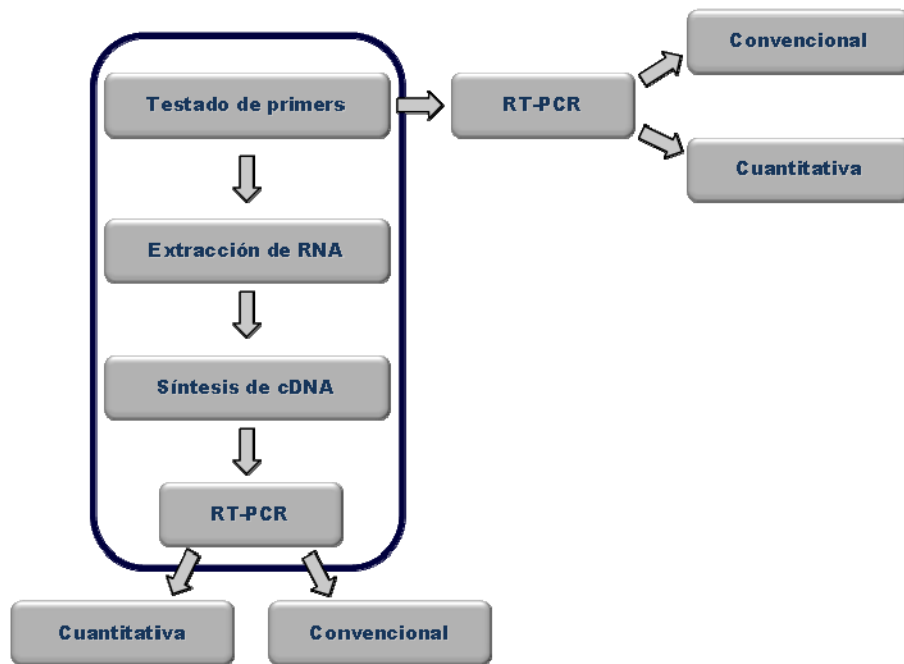


**Esquema 10.** Metodología llevada a cabo para la caracterización molecular de las células madre adultas estudiadas.

#### 5.1.1. Análisis de expresión génica de las paMSC

Del mismo modo que en el caso de la caracterización celular, cuatro subpoblaciones de las células paMSC fueron analizadas en sus pases tempranos (Pase 3) para un estudio molecular con los genes objeto de estudio.

Por un lado se cuantificó la expresión de los *primers* o cebadores diseñados para esta tesis mediante Q-RT-PCR en las subpoblaciones celulares estudiadas (paMSC), por otro se estudiaron las variaciones de marcadores específicos de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica para analizar la multipotencia de las paMSC, observada *in vitro* y confirmada con sus tinciones correspondientes. En todos los casos se siguieron los pasos indicados en el Esquema 11.



**Esquema 11.** Resumen de los pasos a seguir para realizar un análisis de los genes que se expresan en las líneas celulares estudiadas así como las variaciones de los mismos en los procesos de diferenciación celular.

Para ello se emplearon todos los cebadores previamente diseñados y testados. Se calculó la media de los resultados obtenidos y se realizó una escala de colores asignando un color diferente a un rango de valores.

Por otra parte, se estudiaron también las diferencias producidas en los niveles de expresión génica de las paMSC ( $n=2$ ) crecidas en paralelo y sometidas a diferentes condiciones de  $O_2$  en su crecimiento (20% de  $O_2$  vs 3% de  $O_2$ ). En estos estudios se analizaron los niveles de expresión, tanto en pases iniciales (P3) como en pases más avanzados (P16).

## 5.2. Técnicas experimentales

### 5.2.1. Diseño de *primers* o cebadores

La búsqueda de las secuencias y el diseño de cada uno de los cebadores se realizó a través de la base de datos y el programa de diseño de *primers* de la Web del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), en su apartado de “Nucleótidos”.

Los *primers* o cebadores fueron enviados como liofilizados por la empresa fabricante (Invitrogen), se resuspendieron en  $H_2O$  MilliQ y se guardaron a  $-20^\circ C$  en alícuotas a  $10\mu M$ . Los cebadores diseñados para el desarrollo de esta Tesis, así como para trabajos posteriores, se muestran en la tabla Tabla 5:

Gen	Sentido (5'- 3')	Antisentido (5'- 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicón (pb)	Número de Acceso (NCBI)
ACAN	ATCAGTGGGAAACATCTGG	CACTAAGCTCGGTACACCA	60.08/59.90	147	XM_001925365.1
ACTB	TGCGCAGAAAATGAGATGAG	CACCTTCACCGTCCAGTTT	60.10/60.01	135	AY550069.1
ACTC1	CTTCCAACCCACCCTTCTTT	GTTGCAAGTCTCGGTCTGGT	60.33/60.16	119	XM_001924496.1
ACT4	GGGAATGGGACAAAAGACA	CATCCCAGTTGGTGATGATG	59.77/59.76	131	XM_001925828.1
BGLAP	GCCCCTCACACTGCTTGCCC	TCGGTGCCTCCTGCTTGGGA	60.25/59.82	127	NM_001164004.1
BMP2	TGCGCAGCTCCACCACGAA	CCTGTGTCTGCTCCGAAAGACCT	59.56/60.17	149	EU854587.1
BMP6	GGCGGTGACGGCTGCAGAAT	CACACGACGGGTGTCCAA	60.04/59.91	149	EU693015.1
CAT	CTTGGAACATTGTACCCGCT	AGATGACCCGCAATGTTCTC	59.99/60.08	146	NM_214301
Cherry	CCCCGTAATGCAGAAGAAGA	TTGACCTCAGCGTCGTAGTG	*	*	*
Col1A1	AAGACATCCCACCAGTCACC	CAGTTCCTGATTTTCGTCGCA	59.82/59.99	144	AF201723
Col2A1	TGAAAAAGGTGCTCCTGGAC	CTTTTCATCGAATCTCCCA	60.23/60.15	148	XM_001925959.1
FGFR2	AAACACGTGAAAAGAACGG	TCACATTGAACAGAGCCAGC	60.01/59.99	118	NM_001099924.1
FLK 1	CAAACTGTCGTGATCCATGTC	TTCTGTTACCATCAGGAACAAACCT	*	100	DQ400921.1
FLT 1	GTGAAGCATCGAAAACAGCA	TAGCGGGCAGATTTCTCAGT	60.00/59.98	137	XM_001925740.1
GAPDH	TGGAAGGACTCATGACCACA	AGCACCAGTAGAAGCAGGGA	60.09/60.01	127	AF017079.1
GATA 4	AATGCCTGTGGCCTTACAT	ACCTGCTGACGCTTTCGATT	59.58/59.87	122	NM_214293
GFP	CCACATGAAGCAGCACGAC	GTGCTCAGGTAGTGTTG	*	*	*
GUSB	CCCCAGCGATGGACCCAGGA	TCGGCCTCGAAGGGGAGGTG	59.97/59.97	134	NM_001123121.1
Glut 1	CTTCACTGTCGTGTCGCTGT	GCTCAGGTAGGACATCCAGG	60.10/59.68	148	EU012358.1
Glut 2	AGACACGTTTTGGGTGTTCC	GGCTAGCAGATGCCGTAGTC	59.87/60.01	148	NM_001097417
HGFL	GGGGACGATACTGTCCTGAA	GTCCCTCAGTGACATCTCA	59.93/59.83	109	XM_001924610.1
IGF1	GACGCTCTTACGTTCTGTG	CTCCAGCCTCCTCAGATCAC	59.62/59.94	140	NM_214256.1
IGF2	TCAGGCTAGTCTCTCTCGG	TTGAGGGTTCATTTTGG	59.70/59.77	140	NM_213883.2
IGF1R	CAGTCTAGCACCCTCAAGC	GTCTTCGGCCACCATACAGT	60.01/60.00	133	NM_214172.1
KIT	GGCATCAGGGTGACTTCAAT	GGTGGTTGTGACATTTGCAG	59.93/60.01	127	NM_001044525.1
LPL	ACCTCTGGGATACAGCCTT	GGCTTGGAGCTTCTGCATAC	59.96/59.98	128	NM_214286.1
MEF2C	TGATCAGCAGGCAAAGATTG	AGTGAGCTGACAGGGTTGCT	59.95/60.06	111	NM_001044540.1
MET	CCCAATTTCTGACTGAGGGA	TAGGACCACAGTGGAGACC	60.04/59.96	106	NM_001038008.1
MLC2V	GAAACTTAAGGGGGCAGACC	CCTCCTTGGAAAACCTCTCC	59.94/60.04	136	NM_213791.1
MPO	CCAGTCTAGCTCTGCTGCT	ATTTGGTTCTGGCGATTACAG	59.91/60.07	126	AF208527.1
MYH7	ATTGCCGCCATTGGGGACCG	GCCAAAGGCCCTCAGGGCAG	60.04/59.97	101	NM_213855.1
Myocd	TCCGAGAAGGACAAGATGCT	GGACAGGTGCCTCTTCTG	59.95/59.99	130	NM_213745.1
Nkx2.5	CTTCTACCCGCGTGCCTAT	CCTCTGGCTTCCAGCTC	60.00/60.00	107	XM_003134041.1
PPAR $\gamma$	ATTTACACCATGCTGGCCTC	GGGCTCCATAAAGTCACCAA	59.96/59.93	122	NM_214379.1
Runx 2	TACTTACACCCCGCCAGTC	TATGGAGTGTCTGGTCTG	59.99/60.01	138	XM_001924443.1
SOD1	TCCATGTCCATCAGTTTGGGA	AGTCACATTGCCAGGTCTC	59.89/60.12	130	AF396674.1
SOD2	CTTCGCTTCTCCTCGTTG	AAACCTATGTGGGTTGCTCG	59.98/59.99	148	XM_001926440.1
Sox 9	GAAGGAGAGCGAAGAGGACA	GCTTATCTTGCTCGAACC	59.68/59.98	124	NM_213843.1
TEK	GATTGTCCCAGGTC AAGAA	CCATAGGACCATACGTCGCT	60.05/59.98	123	XM_001926034.1
TGF $\alpha$	GGTCCCCTCGGCTGGACAGT	GCAGCTATGGCGGGTCTGC	59.90/60.18	111	NM_214251
TGF $\beta$	TAAACGGGTTCAATTCTGGC	TAGTTGGTATCCAGGGCTCG	59.94/60.09	144	NM_214015.1
Tie 1	AAGTTCTGTGCAAAATTGGGG	GCAGAAAATCGAGCAGGTTT	59.97/59.96	122	AJ867846.1
TNNC1	TGATTGACGAGGTGGATGAA	GTCAAACATGCGGAAGAGGT	60.05/60.12	136	NM_001130243.1
TNNI3	ATGCCCGCTGGACAAGGTG	CGCAGGGTGGGCCGCTTAAA	59.97/59.97	132	NM_001098599.1
VE-Cad	CGTGGTGGAACAACAAGATG	TGTGTACCTGGTCTGGGTGA	60.00/60.00	117	NM_001001649.2
VEGFA	ATCTTCAAGCCGCTCCTGTGT	TCTCTCCTATGTGCTGGCCT	59.73/59.97	144	NM_214084
36B4Ribo	TCATCCAGCAGGTGTTTGAC	CAGACATACGCTGGCAACAT	59.68/59.75	118	NM_001098598.1

**Tabla 5.** Secuencias de los cebadores diseñados para el desarrollo de este trabajo. Las características de cada uno de ellos, el tamaño de la secuencia amplificada y la referencia de sus genes en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Los cebadores señalados con \* fueron obtenidos de otras fuentes.

En todos los casos se diseñaron cebadores con un tamaño de amplicón de entre 100 y 150 pares de bases con la intención que todos ellos pudieran utilizarse tanto en RT-PCR convencional como en Q-RT-PCR.

Por otra parte, para la caracterización molecular de las células derivadas hacia los linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico se utilizaron los *primers* o cebadores que se muestran en la Tabla 6, para su análisis por RT-PCR convencional:

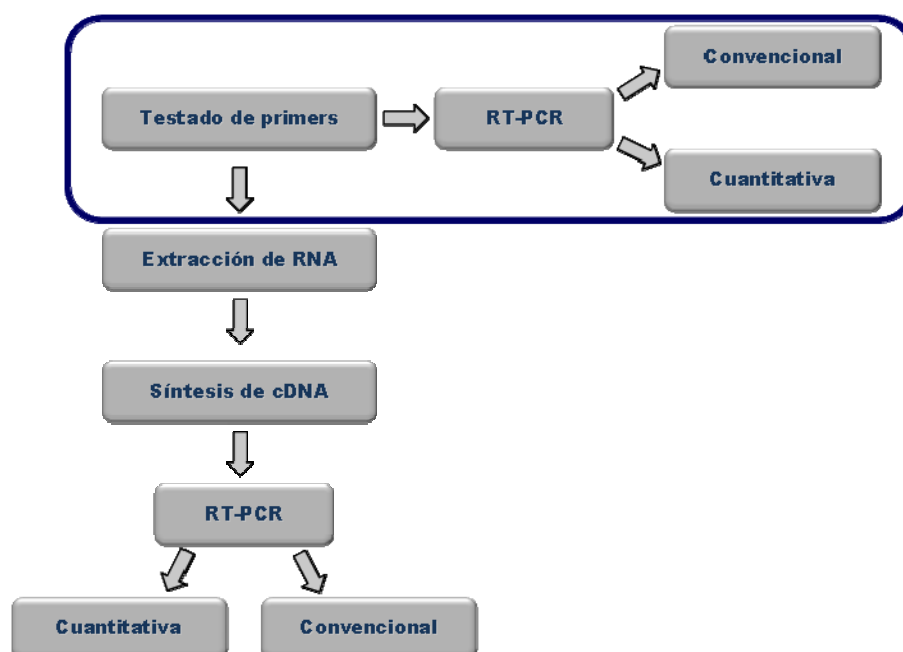
Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')	Tªa (°C)	NºCiclos	Amplicón (pb)	Número de Acceso (NCBI)
ACTB	TGGGCAGAAAATGAGATGAG	CACCTTCACCGTTCCAGTTT	55	40	135	AY550069.1
LPL	ACCTCCTGGGATACAGCCTT	GGCTTGGAGCTTCTGCATAC	55	40	128	NM_214286.1
PPAR $\gamma$	ATTACACCATGCTGGCCTC	GGGCTCCATAAAGTCACCAA	55	40	122	NM_214379.1
Col2A1	TGAAAAGGTGCTCCTGGAC	CCTTCTCATCGAATCCTCCA	55	40	148	XM_001925959.1
ACAN	ATCAGTGGGAAACATCTGG	CACTAAGCTCGGTCACACCA	55	40	147	XM_001925365.1
Sox-9	GAAGGAGAGCGAAGAGGACA	GCTTATTCTTGCTCGAACCG	55	40	124	NM_213843.1
Col1A1	AAGACATCCCACCAAGTCACC	CAGTTCTTGATTCGTCGCA	55	40	144	AF201723
Runx-2	TTACTTACACCCCGCCAGTC	TATGGAGTGCTGCTGCTGCTG	56	40	138	XM_001924443.1
BGLAP	GCCCTCACACTGCTTGCCC	TCGGTGCCTCCTGCTTGA	55	35	127	NM_001164004.1

**Tabla 6.** Secuencias de los cebadores estudiados en los experimentos de diferenciación, las condiciones de RT-PCR, el tamaño de la secuencia amplificada y la referencia de sus genes en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

### 5.2.2. Validación de primers o cebadores

Con el objeto de comprobar que los cebadores diseñados amplifican en las secuencias correctas y con el tamaño adecuado se hizo un “BLAST” a través de la página del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), concretamente con el programa “*nucleotide blast*” [dirección de la página: [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)]. Posteriormente, se siguió la metodología que se presenta en el Esquema 12, con el fin de confirmar la especificidad del producto de amplificación así como el tamaño del mismo.

Mediante electroforesis en gel de agarosa se observa una única señal correspondiente a los productos de amplificación por RT-PCR convencional con el tamaño que corresponde a cada producto al visualizar dichas señales con un marcador de peso molecular. En el caso de los productos de Q-RT-PCR la especificidad se comprobó al observar también una única señal en cada caso en las curvas de disociación de cada uno de los productos de amplificación.



**Esquema 12.** Metodología seguida para comprobar la especificidad y el tamaño de los productos de amplificación para un testado correcto de los cebadores diseñados.

### 5.2.3. Extracción de RNA total

El RNA total de las células analizadas, así como del tejido cardíaco tomado tras las eutanasias, se obtuvo mediante el reactivo TRI REAGEN (Sigma-Aldrich, T9424) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 5.2.4. Medida de la concentración de RNA total

Para medir la concentración de RNA total se utilizaron tres metodologías diferentes (siempre en frío con el fin de evitar su degradación) en función de las circunstancias:

#### *a) Mediante lectura de absorbancia con espectrofotómetro*

Por un lado se utilizó un espectrofotómetro (UV-MINI-1240 Espectrofotómetro 230 V, CE) donde se realizaron tres medidas con luz UV y en cubeta de cuarzo (10MM, 100.600QG). Se tomaron medidas de absorbancia a tres longitudes de onda (260nm, 280nm y 320nm). La concentración de RNA total se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$[\text{RNA total}] = \text{FD} \times \text{Abs}_{(260\text{nm})} \times \text{CE}$$

Donde FD es el factor de dilución aplicado (que en nuestro caso siempre fue 200), utilizando H<sub>2</sub>O DEPC 0.1% (Cat. nº 46-2224, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) libre de RNAsas. Abs<sub>(260nm)</sub> es el valor de absorbancia medido a una  $\lambda$  de 260nm. CE es el coeficiente de extinción, valor de una unidad de absorbancia, en el caso del RNA corresponde a 40 (el valor de una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 40µg/ml de RNA). La pureza de las muestras analizadas se obtuvo con el *Ratio* (r) y se calculó de la siguiente manera:

$$r = (\text{abs } 260 - \text{abs } 320) / (\text{abs } 280 - \text{abs } 320)$$

Se consideraron óptimas todas las muestras cuyo ratio se encontraba entre los valores de 1.5 y 2.

#### *b) Lecturas de la concentración de RNA total mediante el equipo Nanodrop® (Thermo Scientific, Ref: ND-1000)*

#### *c) Lecturas de la concentración de RNA total mediante el lector de placas (Take3, SynergyMX de BIOTEK)*

El fundamento para la obtención de la concentración de RNA total con los equipos indicados en *b)* y *c)* es el mismo que para el apartado *a)* aunque en ambos casos, los equipos indicados tienen programas específicos de medida de ácidos nucleicos que permiten calcular directamente la concentración y la pureza de las muestras.

### 5.2.5. Retrotranscripción de los mRNA o síntesis de cDNA

A partir de 1µg de mRNA se realizó la síntesis del cDNA (DNA complementario) utilizando el kit comercial *SuperScript® III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, 18080044) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 5.2.6. RT-PCR convencional

Para la amplificación de los cDNA se utilizó el kit comercial *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Cat nº 10966-026, Invitrogen) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se emplearon entre 5 y 25ng de cDNA y los oligos correspondientes a 0.5µM. El protocolo de amplificación se recoge en la Tabla 7, donde varía la temperatura de hibridación (Ta) y el número de ciclos en función de cada cebador.

Pasos	Fases	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	Iniciación	94°C	2 min	1
2	Desnaturalización	94°C	30 seg	n
	Alineamiento	Ta°C	30 seg	
	Extensión	72°C	1 min	
3	Conservación	4°C	∞	-

Tabla 7. Protocolo de amplificación para RT-PCR convencional.

Para la amplificación se utilizó un termociclador PXE 0.2 (Thermo Electron Corporation) y los productos obtenidos se analizaron en gel de agarosa D2 (Cat. 8038, Laboratorios CONDA, Madrid, Spain) al 1.6% en el tampón TAE 1X (PH: 8.5) visualizándose por exposición a la luz ultravioleta en el transiluminador G:BOX HR (Syngene) con el software de adquisición de imágenes GeneSnap y el de análisis GeneTools. Para confirmar el tamaño del amplicón se utilizó un marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Cat. nº 15628-019, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y como control de gen endógeno se utilizó, de manera general, la expresión de la ACTB. Este tipo de genes de referencia, también llamados “*housekeeping*” son un grupo de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células. Por otro lado, dado que las células mesenquimales expresan la mayor parte de los genes objeto de estudio, se analizó la diferencia en la intensidad de fluorescencia que se obtuvo en cada caso.

En el análisis de expresión génica en los estudios de diferenciación de las paMSC se tomaron como controles positivos los tejidos ya maduros de un modelo porcino (tejido adiposo subcutáneo para la diferenciación adipogénica, cartílago para la condrogénica y hueso para la osteogénica). Como controles negativos se utilizaron los cultivos de nuestras células crecidas con su medio habitual y como muestras problema las resultantes de los cultivos crecidos con

los medios de diferenciación correspondientes en cada caso. Finalmente, el patrón de expresión se obtuvo mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos resultantes de la amplificación por RT-PCR. En todos los experimentos se incluyó un gen de referencia (ACTB) para poder normalizar los resultados respecto a su expresión.

De forma paralela a los estudios inmunohitoquímicos se realizó el análisis molecular del tejido cardíaco con el fin de identificar células GFP positivas en las muestras de tejido tomadas tras la eutanasia de los animales objeto de estudio. Los grupos analizados fueron aquellos donde se emplearon como tratamiento células marcadas con esta proteína. Se seleccionaron como muestras de estudio las nombradas como *Corazón 2*, donde se buscaron señales positivas para el gen que codifica la GFP. Como controles positivos se utilizaron las células utilizadas como tratamiento en cada grupo de estudio y como control negativo las mismas células sin marcar. Por otra parte, en este estudio también se empleó la ACTB como control endógeno.

**5.2.7. Q-RT-PCR**

El análisis cuantitativo de la expresión génica de los oligos indicados en la Tabla 5, se llevó a cabo en el equipo de Q-RT-PCR *Mastercycler® ep realplex* (Eppendorf) con el kit comercial *Power SyBR-Green Master Mix* (Applied Biosystems, 4367659) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada uno de los experimentos se analizaron 10ng de cDNA utilizando 0.5µM de los oligos (tanto del sentido como del antisentido). El programa de temperaturas para la amplificación de todas las secuencias se describe en la Tabla 8:

Pasos	Fases	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
1	Iniciación	95°C	10 min	1
2	Desnaturalización	95°C	15 seg	40
	Alineamiento/Extensión	60°C	1 min	
3	Curva de Melting	95°C	15 seg	1
		95°C	15 seg	
		95°C	15 seg	
4	Conservación	4°C	∞	-

**Tabla 8.** Protocolo de amplificación para Q-RT-PCR.

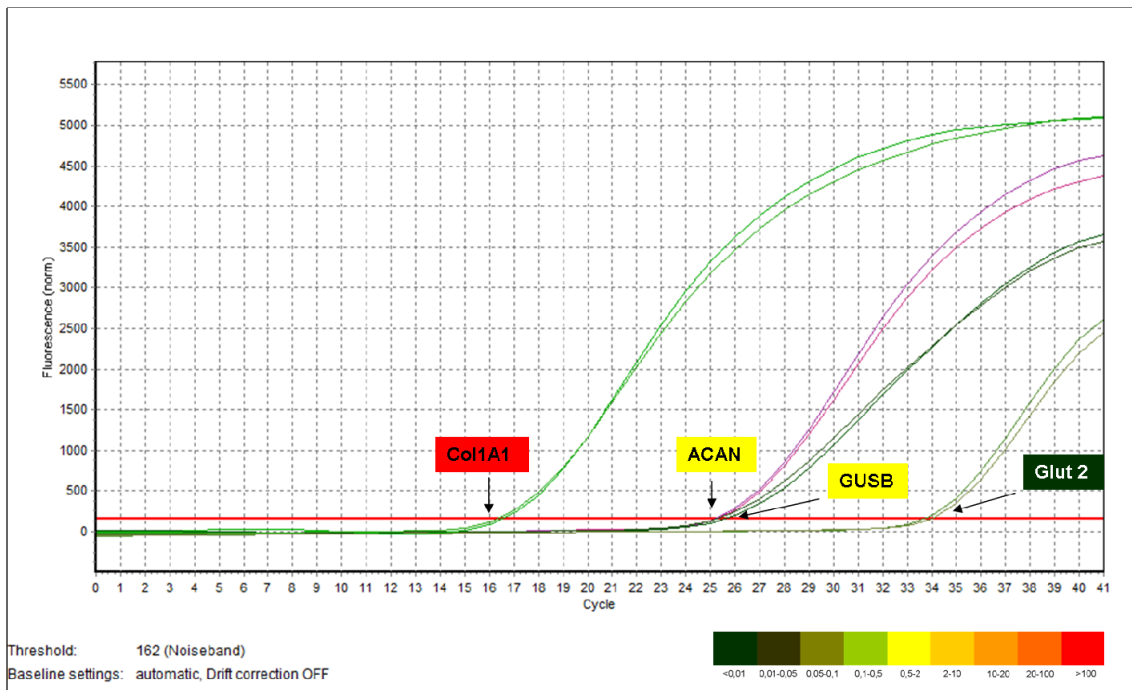
En la caracterización molecular, la cantidad relativa de mRNA se calculó como  $2^{(-\Delta Ct)}$  donde  $\Delta Ct$  es el valor normalizado respecto al gen endógeno de referencia GUSB.

Para ello se emplearon todos los cebadores previamente diseñados y testados. Entre los genes objeto de estudio se analizaron varios endógenos para ver cuál era el más adecuado (ACTB, 36B4Ribo, GAPDH, GUSB), factores de crecimiento y sus receptores (IGF1 IGF1R,



IGF2 HGFL, VEGF, FLK1 TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , FGFR2, MET, etc). También se analizaron otros implicados en los procesos de estrés oxidativo como SOD1, SOD2, CAT o MPO, así como los relacionados con los procesos de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica.

Se calculó la media de los resultados obtenidos y se realizó una escala de colores asignando un color diferente a un rango de valores. En el Esquema 13 se aprecian algunos ejemplos de las curvas de amplificación obtenidas mediante Q-RT-PCR. En este esquema se muestran algunos de los genes estudiados, entre ellos el endógeno de referencia (GUSB) con respecto al cual se normalizaron las muestras (valor 1: amarillo en la escala de colores). También se representan las curvas de amplificación de Col1A1, cuya expresión relativa respecto al endógeno viene expresada por el color rojo en la escala de colores, El ACAN que coincide en su expresión relativa con valores similares al GUSB (amarillo) o Glut 2 con expresión relativa correspondiente a los valores mínimos. La expresión relativa de cada uno de los genes estudiados viene determinada por su Ct que corresponde al punto de corte de su curva de amplificación con la línea umbral establecida por el equipo de Q-RT-PCR.



**Esquema 13.** Ejemplo de curvas de amplificación mediante Q-RT-PCR. En la figura se presenta la correspondencia entre los valores relativos indicados como escala de colores (se ha puesto un ejemplo de expresión relativa mínima en verde, otro de intermedia en amarillo y otro de expresión relativa respecto al endógeno elevada en rojo).

Las variaciones de marcadores específicos de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica para analizar la multipotencia de las paMSC así como los estudios comparativos del crecimiento celular al variar las condiciones de O<sub>2</sub> en los cultivos, se analizaron calculando la cantidad relativa de mRNA como  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  donde  $\Delta\Delta Ct$  es el valor normalizado respecto a una muestra control (Livak KJ, 2001). En el primer caso, se analizaron las muestras (n=2)

## **Materiales y métodos**

respecto a dos genes endógenos ACTB y 36B4Ribo, normalizando los resultados respecto a los cultivos a los que no se les indujo ningún tipo de diferenciación (cultivos crecidos con el medio en su crecimiento habitual). En el segundo, como control se utilizó la expresión del gen endógeno GUSB y en todos los casos los valores se normalizaron respecto a los cultivos sometidos a un 20% de O<sub>2</sub> en su crecimiento.

Con el fin de evaluar las posibles diferencias a nivel molecular de los tratamientos administrados, se realizó un estudio del patrón de expresión de las distintas paMSC empleadas en los distintos grupos de tratamiento. Para ello se analizaron los resultados de Q-RT-PCR realizados a cada una de ellas en pases similares a los utilizados en los trasplantes. Los resultados se muestran como una tabla de colores en función del nivel de expresión de cada uno de los genes estudiados. Los genes analizados fueron los mismos que los utilizados para la caracterización molecular y del mismo modo, la cantidad relativa de mRNA se calculó como  $2^{-(\Delta Ct)}$  donde  $\Delta Ct$  es el valor normalizado respecto al gen endógeno de referencia GUSB. Finalmente, para valorar la potencial influencia de la sobreexpresión de IGF1 y HGF en las células transducidas con vectores lentivirales, se analizó la expresión de marcadores específicos utilizados en la caracterización molecular (IGF1, IGF1R, eGFP, HGF, C-MET y mCherry) y se comparó con el patrón de expresión obtenido en las diferentes líneas utilizadas en esta Tesis.

### **5.2.8. Western-blot**

Con el objetivo de comparar la expresión de proteínas funcionales y confirmar la sobreexpresión de IGF1 y HGF en las células transducidas paMSC-IGF1-eGFP y paMSC-HGF-Cherry, respectivamente, se analizaron sus extractos mediante western blot utilizando los mismos anticuerpos que en los estudios inmunocitoquímicos y como control la expresión de  $\alpha$ -tubulina.

Para el aislamiento de proteína 30 $\mu$ g, las células se disgregaron con *RIPA* (150mM NaCl, 1%NP-40, 0.5% de desoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 50mM Tris, pH 8.0) e inhibidores de proteasa (Complete, Roche, 1169749800), y se incubaron durante 30 minutos-1 hora en hielo. Posteriormente, se centrifugó para descartar los restos celulares. Para determinar la concentración proteica de cada muestra, se midió la absorbancia del sobrenadante con el kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad, 500-0114), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las proteínas se desnaturalizaron de manera estándar.

Así, las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (al 12% en el análisis de IGF1 y 10% en HGF) y se transfirieron a una membrana de PVDF (iBlot® Get Transfer Stacks PVDF Regular, Cat. nº IB4010-01, Invitrogen). Dicha transferencia (semihúmeda) se realizó en el dispositivo de transferencia en seco *iBlot®* (Invitrogen). La membrana transferida se bloqueó en PBS con 5% de leche en polvo durante una hora, y

posteriormente se incubó con el anticuerpo primario (diluido en PBS con 0.1% de Tween 20 y 5% de leche en polvo) a 4°C toda la noche. Al día siguiente se lavó en PBS con 0.1% de Tween 20 y después se incubó durante 45 minutos con el anticuerpo secundario correspondiente (diluido en PBS con 0.1% de Tween 20). Pasado este tiempo, se lavó la membrana y seguidamente se incubó el kit para detección de HRP SuperSignal® West Pico Trial (Cat. n° 34079, Thermo Scientific) para permitir su revelado en el equipo de quimioluminiscencia LAS3000.

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- HGF (Cat. n° sc-7949 (H-145), Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a 1/100 toda la noche.
- IGF1 (Cat. n° sc-9013 (H-70), Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a 1/100 durante 1 hora.
- $\alpha$ -Tubulina (Cat. n° CP06, Calbiotech) a 1/1000 durante 1 hora.
- Goat-anti-mouse-HRP (Cat. n° P0447, DAKO) a 1/2000 durante 45 minutos.
- Goat-anti-rabbit-HRP (cat. n° P0448, DAKO) a 1/2000 durante 45 minutos.

#### **5.2.9. Cariotipado/FISH**

En el transcurso de esta Tesis únicamente se han realizado las preparaciones de metafases, las hibridaciones y las capturas de imágenes de las muestras que posteriormente serán analizadas mediante la identificación de aberraciones (estructurales) cromosómicas.

##### **a) Fijación de células y parada en mitosis**

Con el fin de obtener la parada del ciclo celular y la extensión de las mismas en metafase para la tinción de cromosomas, las paMSC objeto de estudio se sembraron en placas P-100 hasta obtener un número adecuado con las que trabajar sin llegar a una confluencia excesiva. Se añadieron 10 $\mu$ g/mL de colcemida 0.1 $\mu$ M (Cat. D1925, Sigma-Aldrich) y se esperó durante 6 horas para que la colcemida actuara en los microtúbulos e impidiera su polimerización. Transcurrido ese tiempo, se tripsinizaron los cultivos mediante el protocolo convencional desactivándose con el medio de cultivo original (ya que las células, al entrar en metafase se levantan de la matriz) con el fin de recuperar la mayoría de las células en división. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante tras centrifugación a 450xg durante 5 minutos, dejando 1ml en el que se resuspende el pellet con los dedos para no dañar las células. Se añadieron 10ml de 0.56% KCl previamente atemperado a 37°C (solución hipotónica que provoca la entrada de H<sub>2</sub>O en las células rompiendo la membrana). Se mantuvieron incubando durante 20 minutos a esta temperatura. Se volvieron a centrifugar quedándonos de nuevo con 1ml y se resuspendieron de nuevo suavemente. A continuación se añadieron 10ml de solución fijadora (MeOH:Ac. Acético (3:1) a 4°C), despacio y con suave agitación. Este paso se repitió un par de veces. Una vez fijadas las células, se prepararon los portas y se "tiraron" desde lo más alto posible con una pipeta Pasteur. Se dejaron secando toda la noche, estando así

preparadas para realizar las hibridaciones. Las muestras sobrantes, se guardaron en crioviales a -80°C hasta ser nuevamente utilizadas.

### **b) Hibridación de las metafases (FISH telomérico)**

Para la hibridación de las metafases se utilizó una sonda PNA (*Peptide Nucleic Acid*) telomérica (Eurogentec S.A.; PNAPC80017/PV92827). La secuencia de dicha sonda es la siguiente: LLCCCTAACCCCTAACCCCTAA la cual se conjugó con un fluorocromo FITC para su visualización microscópica. Al finalizar todo el proceso de hibridación, los portas se montaron con el medio Vectashield® (Cat. n° H-1500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), con DAPI. Una vez montados, los portas se sellaron y se procedió a la captura de imágenes.

### **c) Captura de imágenes**

Para la toma de imágenes se utilizó un microscopio de fluorescencia *Leica DMR* (con un objetivo de 100X) una cámara *NICKON 1200* y el software informático *ImageJ*. Se tomaron imágenes de una media de 50 metafases diferentes de cada una de las muestras fijadas con el fin de poder realizar un análisis estadístico fiable posterior.

## **6. Marcajes, tinciones celulares e inmunocitoquímicas**

### **6.1. Tipos de marcaje celular**

Una vez concluida su caracterización las células se marcaron, con el complejo Endorem® o con proteínas fluorescentes, con el fin de poder hacer su seguimiento *in vivo* posterior así como realizar estudios moleculares o mediante inmunohistoquímica de las muestras tomadas al finalizar el tiempo de monitorización.

#### **6.1.1. Marcaje con Endorem®**

Para su seguimiento *in vivo* las células se marcaron con un complejo formado de nanopartículas de óxido de Fe superparamagnético para su visualización con técnicas de imagen por resonancia magnética (RMN).

Para su seguimiento *in vivo* mediante resonancia magnética nuclear (RMN) las células se marcaron con el complejo Endorem® (C.N. 682153.4 ampollas de 8 ml, I.V., Sol. Inyectable, Lab. Farm. GUERBET, S.A.). Para ello se incubaron durante 24h en medio de cultivo basal con un complejo formado por 25µg/ml de nanopartículas de óxido de Fe superparamagnético (Endorem®) y 0.375µg/ml de poli-L-Lisina ó PLL (Cat. n° P1524, Sigma, St. Louis, MO).

#### **6.1.2. Marcaje con proteínas fluorescentes**

Para el marcaje con proteínas fluorescentes se utilizaron vectores lentivirales (ver Apartado 7. *Manipulaciones genéticas*). En el caso del marcaje celular con la proteína fluorescente verde (GFP) se utilizó el vector pRRLsin18.CMV-IRES-GFP.

Las paMSC utilizadas como tratamiento en el grupo 4 de estudio, que sobreexpresaban los factores de crecimiento IGF1 y HGF, donde se utilizaron como genes reporteros eGFP y Cherry respectivamente. Los vectores utilizados fueron por tanto pRRLsin18.CMV-IRES-eGFP y pRRLsin18.CMV-IRES-Cherry como se indica en los esquemas de *Manipulaciones genéticas*.

## **6.2. Tinciones celulares**

En todas las tinciones se realizó el mismo procedimiento con las muestras control en cada caso, las cuales fueron sometidas al mismo tipo de tinción que las muestras problema, realizando siempre la metodología de forma paralela en todos los casos.

### **6.2.1. Tinción con azul de Prusia. Validación de los marcajes con Endorem®**

La tinción de azul de Prusia se utiliza para detectar los depósitos de hierro en células o tejidos. En nuestro caso, se empleó esta tinción para validar el marcaje de las paMSC con el complejo Endorem®, utilizado para el seguimiento *in vivo* de las células trasplantadas en uno de los grupos de estudio (Grupo 2).

Para ello, primeramente se fijaron las células de la forma habitual y se utilizó una solución (1:1) de ferrocianuro potásico ( $\text{Fe}_7\text{C}_{18}\text{N}_{18}\text{K}_x$ ) al 4% (Cat. 141505, PANREAC Química SAU, Barcelona) y HCl al 8%, dejándolo incubar durante 30 minutos a T<sup>a</sup> ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavaron las preparaciones con H<sub>2</sub>O destilada un par de veces y se montaron los portas con cubreobjetos para su visualización al microscopio.

### **6.2.2. Tinción con Oil Red O**

Con el fin de poder observar la acumulación de lípidos intracelulares característicos tras la inducción adipogénica, y poder confirmar mediante tinción la capacidad de diferenciación hacia este linaje de las paMSC, se ha utilizado la tinción histoquímica de Oil Red-O. Para ello se fijaron las células con 4% de formaldehído en PBS durante 15 minutos a T<sup>a</sup> ambiente. Después de lavarse 3 veces con PBS (5 minutos), se incubaron con isopropanol al 60% durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró el isopropanol y se dejó secar completamente para después teñir con una solución de 1mg/ml de Oil Red O (Sigma O0625) en isopropanol al 60% en H<sub>2</sub>O durante 5 minutos. Después se retiró y se lavó con H<sub>2</sub>O abundante, se montaron los portas con cubreobjetos para su visualización al microscopio.

### **6.2.3. Tinción con Alcian blue 8GX**

La producción de matriz cartilaginosa característica del fenotipo condrogénico se llevó a cabo mediante tinción con Alcian blue. Para ello se preparó una solución stock con 1g de Alcian blue 8GX en 100ml de HCl 0.1M y pH 1.0. Se fijaron las células con MeOH a -20°C durante 15 minutos. Después de lavar con PBS se volvió a lavar con HCl 0.1M para después incubar con Alcian blue al 1% (Sigma A5268) durante 2 horas. Posteriormente se lavaron con

HCl 0.1M y H<sub>2</sub>O destilada, durante 5 minutos cada lavado. Los acúmulos cartilagosos se tiñen de azul que pueden apreciarse claramente mediante microscopía.

### 6.2.4. Tinción con Alizarin Red S

Para observar los depósitos de matriz ósea mineralizada y comprobar así el fenotipo osteogénico se llevó a cabo la tinción con Alizarin Red-S en las paMSC derivadas hacia este linaje. Para ello, como en otras ocasiones, se fijaron las células con 4% de formaldehído en PBS durante 15 minutos a T<sup>a</sup> ambiente. Después de lavarse 3 veces con PBS (5 minutos/lavado), se incubaron con una solución 40mM de Alizarin Red S (Sigma A5533) en H<sub>2</sub>O y pH 4.1 durante 30 minutos. Posteriormente se realizaron cuatro lavados con H<sub>2</sub>O para su posterior visualización mediante microscopía.

## 6.3. Inmunocitoquímica/Inmunofluorescencia

Previamente en todos los casos, las paMSC se sembraron sobre cubres de cristal en los pocillos donde se fijaron con PFA al 4%. La tinción de los núcleos se realizó de varias maneras, (con reactivos varios); por un lado se utilizó Hoechst 33342 (Cat. n° H1399, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), por otro se utilizaron medios de montaje con DAPI incorporado como el *Prolong® Gold Antifade with DAPI* (Cat. n° P36935, Invitrogen) o el Vectashield® (Cat. n° H-1500, Vector Laboratories).

### 6.3.1. Inmunocitoquímicas (pre y post sorting)

Se realizaron inmunocitoquímicas específicas en las paMSC transducidas con los vectores lentivirales (Apartado 7. *Manipulaciones genéticas*) antes y después de la separación celular, con el fin de determinar la expresión de los factores de crecimiento IGF1 y HGF en estas células y confirmar los procesos de transducción.

Para ello se utilizaron los anticuerpos, diluciones y tiempos de incubación que se muestran a continuación:

- IGF1 (Cat. n° sc-9013, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a 1/50 durante 1 hora.
- HGF (Cat. n° sc-7949, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a 1/50 (O/N)
- Donkey-anti-rabbit (Cat. n° A10042, Invitrogen) Alexa 568, a 1/800 durante 1 hora.
- Goat-anti-rabbit (Cat. n° A11034, Invitrogen) Alexa 488, a 1/800 durante 1 hora.

### 6.3.2. Inmunofluorescencia con anticuerpos de citometría

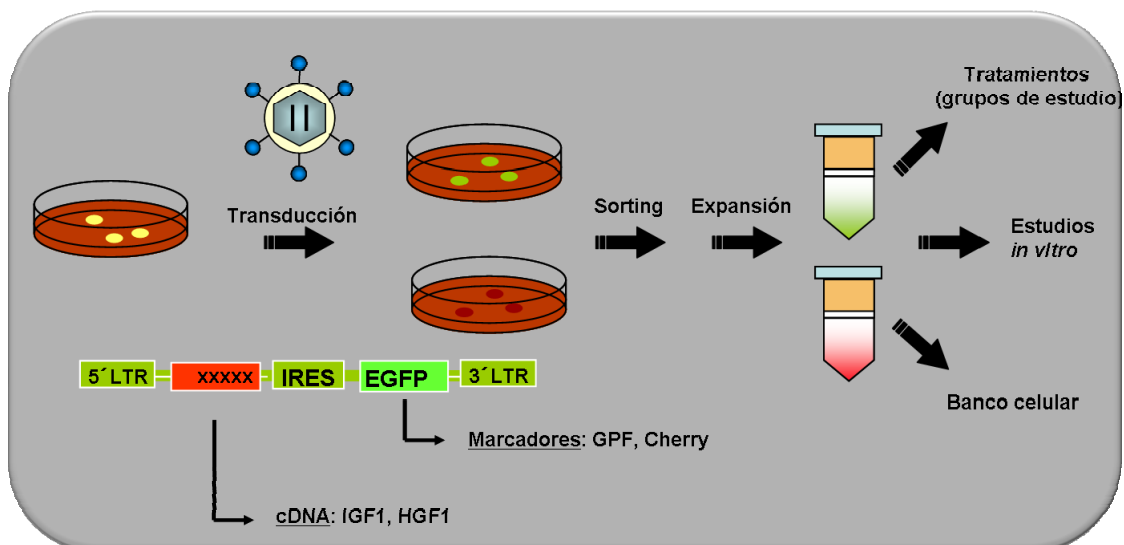
Para confirmar la fluorescencia emitida por las paMSC, marcadas con los anticuerpos utilizados en citometría de flujo para la determinación del inmunofenotipo, las paMSC se fijaron con MeOH frío durante 10 minutos.

Los anticuerpos utilizados fueron el CD44 FITC (Cat. nº ab19622, Abcam) a 1/100 y CD105 FITC a 1/10 (Cat. nº ab53318, Abcam) y para la tinción de los núcleos en este caso se utilizó el Hoechst 33342. Posteriormente las muestras se observaron al microscopio para comprobar el marcaje.

## 7. Manipulaciones genéticas

Las manipulaciones genéticas se realizaron mediante la transducción celular específica en cada uno de los casos, utilizando vectores lentivirales correspondientes con los que se obtuvieron los sobrenadantes virales correspondientes que fueron proporcionados por el Departamento de Vectores Virales del CNIC. En todos los casos, las paMSC se sembraron el día anterior a una confluencia del 70% en placas P100 ( $3 \times 10^5$  paMSC/placa) con 10ml de medio completo al que se le añadió, el día de la infección una cantidad de los sobrenadantes concentrados de los distintos vectores con  $8 \mu\text{g/ml}$  de polibreno (Cat. nº H9268, Sigma). Se dejó actuar durante 6 horas, transcurrido ese tiempo se diluyó ese medio a la mitad (eliminando 5ml del medio con polibreno y añadiendo 5ml de medio fresco) cambiando de nuevo el medio al día siguiente.

En los casos en los que la transducción se realizó con vectores con marcadores fluorescentes (ver Apartado 7.1. *Transducción de paMSC con la proteína fluorescente verde* y 7.3. *Introducción de cDNA seleccionados (IGF1/HGF)*), una vez realizada la infección, se procedió a separar las paMSC transducidas de las que no lo estaban mediante procesos de separación celular o “*sorting*”, con el fin de obtener poblaciones puras (ver en el Apartado 8.2. *Separación celular o “sorting”* de este apartado). Posteriormente se llevó a cabo la expansión celular de las células infectadas hasta obtener la cantidad necesaria de paMSC correspondiente a cada tratamiento. La expansión celular se realizó también con el objetivo de poder realizar los estudios *in vitro* posteriores y crear un banco celular de este tipo de células en nuestro laboratorio para estudios posteriores, como se muestra en el Esquema 14:



**Esquema 14:** Esquema general en el tiempo de las paMSC desde su siembra para la infección con vectores lentivirales hasta su uso para distintos fines y objetivos.



### **7.1. Transducción de paMSC con la proteína fluorescente verde (GFP)**

La proteína fluorescente verde (o GFP, por sus siglas en inglés, *green fluorescent protein*) es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria*, que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. De esta medusa se aisló la aequorina, proteína dependiente de calcio, que activa la emisión de luz azul. La GFP, por su parte, absorbe la luz liberada por la primera y produce su característica luz verde. El gen que lo codifica está aislado y es utilizado habitualmente en biología molecular como marcador. La estructura de la proteína verde fluorescente se determinó en 1996 y consiste en un barril beta, formado por once hojas  $\beta$  antiparalelas, acompañadas de una hélice  $\alpha$  con el cromóforo al centro de dicha estructura (Ormö M, 1996). Está constituida por 238 aminoácidos cuya secuencia fue descifrada por Prasher y sus colaboradores. La GFP presenta un cromóforo p-hidroxibenzilideneimidazolinona (Prasher DC, 1992) que se forma por ciclación espontánea y la oxidación de los residuos 65-67, correspondientes a los aminoácidos Ser 65-Tyr 66-Gly 67 de la proteína nativa y es el responsable de la luz verde.

La GFP original de la medusa posee dos picos de excitación: uno menor, a 475nm, y uno mayor, a 395nm. Su pico de emisión está a 509nm, en la zona verde del espectro. Esta proteína fue aislada por primera vez a principios de los años 60 por Osamu Shimomura, pero su potencial como marcador no fue reconocido hasta 1987 por Douglas Prasher. Recientemente los Drs. Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien recibieron el Premio Nobel de Química en 2008 por su desarrollo.

En los últimos años se han creado o identificado otras proteínas fluorescentes entre las que se encuentran la proteína amarilla fluorescente (YFP, por sus siglas en inglés) o la roja (RFP). Además, estas proteínas originales han sido modificadas para mejorar sus prestaciones (toxicidad, vida media, etc). Uno de los resultados de estas mejoras es la proteína verde fluorescente mejorada (o EGFP, del inglés "*enhanced green fluorescent protein*").

En este caso el vector utilizado fue el pRRsin.18.CMV-IRES-GFP del cual se obtuvo el sobrenadante viral. Para la infección se añadió al cultivo de las paMSC un mix formado por 10ml de medio de cultivo completo, 8 $\mu$ l de polibreno (1/1000) y 40 $\mu$ l del virus a una concentración de 1-2 x 10<sup>7</sup> U/ml (aprox.).

### **7.2. Inmortalización con h-TERT**

Con el fin de obtener líneas celulares inmortales y retrasar el proceso de envejecimiento en estas células, se realizó la infección de las paMSC con un vector portador del gen de la telomerasa humana (hTERT).



Para ello se utilizó la subpoblación paMSC10 donde se siguió el mismo procedimiento que en el caso anterior, aunque en este caso se añadieron 5ml del sobrenadante viral a una concentración de  $5 \times 10^6$  U/ml (aprox.). El vector utilizado para conseguir la inmortalización de las paMSC mediante la inserción del gen de la telomerasa humana h-TERT, fue el pRRLsin.18.hTERT. Se trata de un vector que no presenta ningún marcador de selección ni de seguimiento por lo que, para confirmar si la infección se ha producido o no, es necesario analizar el gen de la telomerasa humana hTERT mediante el llamado ensayo TRAP, utilizando técnicas de Q-RT-PCR. Éste ensayo, también llamado ensayo de actividad telomerasa, estaría directamente relacionado con la longitud telomérica de los cromosomas, que juegan un papel esencial en los procesos de envejecimiento celular.

Este estudio se realizó de forma paralela con una línea celular humana (haMSC40), con el fin de comparar los resultados con células humanas del mismo tipo. Como controles se utilizaron las mismas líneas celulares no transducidas con el vector.

### **7.2.1. Ensayo TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol)**

Con el fin de validar el proceso de infección con el gen de la telomerasa humana se realiza el que se conoce como Ensayo TRAP o también llamado ensayo de actividad telomerasa. En este ensayo se analizaron los extractos proteicos de cuatro líneas celulares, por un lado la subpoblación 10 de las paMSC (infectadas con el gen de la telomerasa humana hTERT y esta misma subpoblación sin infectar utilizada como control negativo de la infección), por otro se utilizó una línea de este tipo celular de origen humano haMSC34 (infectada y sin infectar) con el fin de comparar los resultados obtenidos entre ambas especies. Para ello se realizó el siguiente procedimiento:

1.- La medida de la concentración de proteína se realizó con el kit *DC Protein Assay* (Cat. n° 500-0113, Cat. n° 500-0114 y Cat. n° 500-0115, BIO-RAD).

2.- Se preparó una recta patrón con diluciones de la proteína estándar (BSA) en buffer de lisis NP40 a las siguientes concentraciones: 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063 y 0 (mg/ml).

#### **3.- Ensayo TRAP:**

- Se realizó con 5µg y 1µg de extracto proteico donde preparamos tres muestras diferentes: una del extracto a 1µg/µl (que llamamos *Muestra N*), otra a 0.2µg/µl (diluida 5 veces por lo que la nombramos como *Muestra 1/5*) y un control negativo que obtuvimos inactivando 5µg de la muestra calentando durante 10 minutos a 80°C (la nombramos como *Muestra I*).

- A cada muestra se añadieron 5µl de la siguiente mezcla: Buffer Tell 10X (1µl/muestra); dAGT a 33mM (0.6µl/muestra); oligo TS (1µl/muestra) y H<sub>2</sub>O (12.4µl/muestra).

- Las muestras se pusieron en el termociclador con el programa para este ensayo (durante 60 minutos a 30 °C).

- Del producto resultante se utilizaron 2µl para la Q-PCR.

#### 4.- Q-PCR:

- Para ello se preparó una mezcla de: SYBR Green (12,5µl/muestra); EGTA 10mM (2.5µl/muestra); Oligo ACX (GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACCC) a 100ng/µl (1µl/muestra); Oligo TS (AATCCGTCGAGCAGAGTT) a 100ng/µl (1µl/muestra) y H<sub>2</sub>O hasta 23µl (6.5µl/muestra).

- Se tomaron 23µl de la mezcla anterior y se añadieron 2µl de la mezcla preparada en el punto 3 de este procedimiento, para cada una de las muestras a analizar (cada muestra se realizó por triplicado).

- Todas las muestras se analizaron mediante Q-PCR con el siguiente programa de temperaturas que se repitió durante 40 ciclos:

- 94°C durante 10 minutos.
- 94°C durante 15 segundos.
- 60°C durante 30 segundos.

- Posteriormente, una vez terminada la Q-PCR se observaron las curvas de amplificación y se analizaron los resultados, en función de la recta de calibrado obtenida inicialmente.

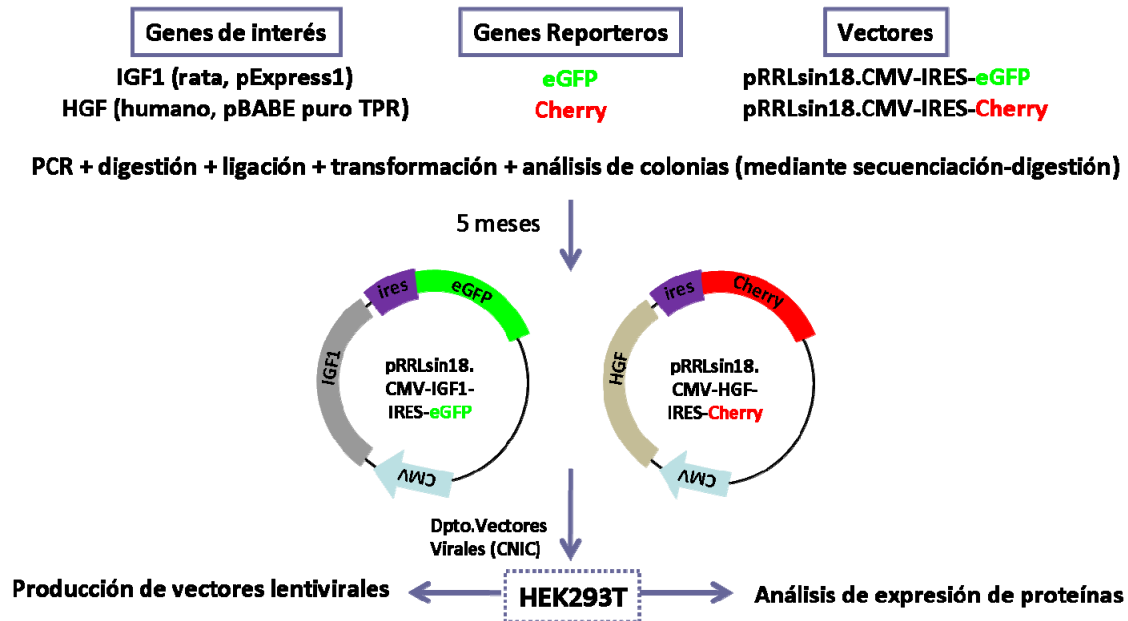
### 7.3. Introducción de cDNA seleccionados (HGF/IGF1)

Con el fin de que las paMSC sobreexpresaran los factores de crecimiento IGF1 y HGF, se transdujeron con los vectores lentivirales pRRLsin.18.CMV-IGF1-IRES-GFP y pRRLsin.18.CMV-HGF-IRES-Cherry, respectivamente (como se muestra en el Esquema 14 anteriormente indicado).

Con el vector lentiviral pRRLsin.18.CMV-IGF1-IRES-GFP se obtuvieron sobrenadantes concentrados con unos títulos de  $1.98 \times 10^7$  U/ml y un 79% de células infectadas al ser analizadas por citometría de flujo. En el caso del vector pRRLsin.18.CMV-HGF-IRES-Cherry se obtuvieron sobrenadantes concentrados con unos títulos de  $1.65 \times 10^7$  U/ml y un 66% de células infectadas. Para la titulación se utilizó la línea tumoral HEK293T y los plásmidos de origen empleados fueron para IGF1 el pExpress-IGF1 (Clon Image 7300903, Geneservice) de la especie *Rattus norvegicus*, Secuencia: BC086374. El plásmido de origen para HGF el pBABE puro HGF (plásmido 10901, de Addgene) de la especie humana.

El proceso de transducción para ambos casos se probó a diferentes concentraciones (MOI1, MOI5, MOI20 y MOI50) utilizándose finalmente la mas concentrada para el proceso de separación celular y posterior expansión.

En el Esquema 15 que se muestra a continuación se presenta un resumen de los pasos seguidos para la obtención de estos vectores:



**Esquema 15:** Obtención y clonaje de los vectores lentivirales para la sobreexpresión de IGF1 y HGF en las paMSC.

## 8. Citometría de flujo

Los análisis de citometría de flujo, para determinar el fenotipo mediante marcadores de superficie, se llevaron a cabo en un equipo FACS Scam (BD Biosciences, CA, USA) mientras que para los estudios fenotípicos comparados entre pCSC y paMSC se utilizó un equipo EPICS XL-MCL (BECKMAN-COULTER). Los procesos de separación celular se realizaron mediante FACS (*Fluorescence activated cell sorting*) y se llevaron a cabo en un citómetro de flujo separador Falsaria II SORP (BD Biosciences).

### 8.1. Análisis de marcadores de superficie (fenotipo)

Para la determinación del patrón de expresión de antígenos de superficie de las poblaciones de paMSC analizadas (paMSC10, paMSC11 y paMSC12), las células se tripsinizaron y contaron para ser resuspendidas en PBS con 2% de FBS para lavarse. Se centrifugaron a 450xg durante 5 min y volvieron a resuspenderse en esta solución de modo que se tuvieran  $2.5 \times 10^5$  células/100 $\mu$ l. Se añadieron los anticuerpos que se indican a continuación a los tubos de poliestireno y se dejaron incubando en frío durante 30 minutos (en el caso de que el anticuerpo primario no estuviera marcado con un fluorocromo, se realizó una segunda incubación durante 30 minutos, con el secundario correspondiente, a T<sup>a</sup> ambiente). Se llenaron los tubos con PBS y centrifugaron a 450xg durante 5 minutos. Posteriormente se decantaron y resuspendieron las células con las gotas de PBS que quedaron en los tubos (100 $\mu$ l) y se midieron en el citómetro.

La evaluación de la expresión de las proteínas detectadas por citometría de flujo, se calculó mediante el Índice Medio de Fluorescencia (IMF) que corresponde a la división de la media geométrica de fluorescencia de la muestra sobre la media geométrica de fluorescencia del control negativo y/o control de isotipo.

Los anticuerpos utilizados quedan recogidos en la Tabla 9:

Anticuerpo	Referencia (Casa comercial)
CD105 (FITC)- Mouse monoclonal (MEM-229)	Cat. nº. ab53318 (Abcam, Cambridge, UK)
CD44 (FITC)- Rat monoclonal (IM7)	Cat. nº. ab19622 (Abcam, Cambridge, UK)
CD29, Integrin beta 1 (FITC)- Mouse monoclonal (MEM-101A)	Cat. nº. ab21845 (Abcam, Cambridge, UK)
CD45 (FITC)- Mouse anti pig	Cat. nº. MCA1222F (ABD Serotec, Oxford, UK)
CD31 (FITC)- Mouse anti pig	Cat. nº. MCA1746F (ABD Serotec, Oxford, UK)
SLA CLASS I (FITC)- Mouse anti pig	Cat. nº. MCA2261F (ABD Serotec, Oxford, UK)
SLA CLASS II DR (FITC)- Mouse anti pig	Cat. nº. MCA2314F (ABD Serotec, Oxford, UK)
CD90 (FITC)- Mouse anti-human	Cat. nº. 555595 (BD Pharmingen™)
Mouse anti A2B5- Monoclonal antibody	Cat. nº. MAB312 (Chemicon, CA, USA)
Rat IgG FITC- Isotype Control (IgG 2b)	Cat. nº. ab37364 (Abcam, Cambridge, UK)
Mouse IgG1 (FITC) - Isotype Control	Cat. nº. MG101 (Caltag™ Laboratories)
Mouse IgG 2a (FITC)-Isotype Control	Cat. nº. ab1281 (Abcam, Cambridge, UK)
Mouse IgM- λ Isotype Control	Cat. nº. 550963 (BD Pharmingen™)
IgM Rat anti mouse-(FITC)	Cat. nº. 553408 (BD Pharmingen™)

**Tabla 9:** Anticuerpos utilizados en el estudio del fenotipo de las paMSC.

## 8.2. Separación celular o “*sorting*”

La técnica FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) se utilizó para separar las poblaciones de paMSC transducidas con el vector lentiviral portador del gen de la proteína fluorescente verde (GFP) de las que no llegaron a infectarse o en las que el gen se había silenciado, las cuales se utilizaron como tratamiento en los grupos 2 y 3 en las evaluaciones *in vivo*. Por otra parte, esta técnica también se empleó en la separación de las mismas células transducidas con los vectores pRRLsin.18.CMV-IGF1-IRES-GFP y pRRLsin.18.CMV-HGF-IRES-Cherry de las negativas para dichas transducciones. Las poblaciones positivas obtenidas

en estos casos fueron las utilizadas como tratamiento en el grupo 4 durante las evaluaciones *in vivo*.

Para ello se preparó un buffer de separación donde se llevaron las paMSC que fueron sometidas al proceso de separación o “*sorting*”. Este buffer estaba compuesto por buffer fosfato (PBS), HEPES 10mM, EDTA 5mM, P/S 2% y FBS 1%. Tras su separación se recogieron en una solución de PBS con 50% de FBS y 5% de P/S. Después se pusieron en cultivo para comenzar la expansión celular.

## 9. Microencapsulación celular

La elaboración de las microcápsulas y la encapsulación celular fue desarrollada por el Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia del País Vasco (UPV-EHU).

### 9.1. Estudio preliminar con fibroblastos

Para el estudio inicial y puesta a punto de la elaboración de las microcápsulas se utilizaron fibroblastos productores de VEGF.

#### 9.1.1. Elaboración de las microcápsulas con y sin Endorem®

A continuación se describen los aspectos más importantes de los componentes utilizados en la elaboración de las microcápsulas.

- **Línea celular y medio de cultivo:** La línea celular de fibroblasto BHK (*Baby Hamster Kidney*) fue suministrada por el Departamento de Cirugía Neurológica de la Universidad de Okayama (Japón). Los fibroblastos BHK se cultivan en condiciones estándar en un medio Dulbecco (DMEM) modificado con 10% de suero bovino fetal, 2% de penicilina y estreptomicina y 1% de glutamina. Los cultivos se mantienen a 37°C con una humedad del 5% en CO<sub>2</sub> / 95% en aire atmosférico, haciendo cambios de medio cada dos o tres días.
- **Alginato:** En este estudio se ha utilizado un alginato purificado que tiene grado clínico, de bajo peso molecular con un alto contenido en ácido glucurónico (alginato G pur) extraído del alga *Laminaria hyperborea* y suministrado por Pronova Biomedical (Oslo, Noruega).

Este alginato se ha utilizado para hacer los núcleos que contienen el material biológico a una concentración de 1.5% o 1.875% y el último recubrimiento de las microcápsulas se ha realizado con alginato 0.1%.

- **Policación:** El policación que se ha utilizado ha sido poli-L-lisina que tiene un peso molecular de 15000-30000. Se ha utilizado en una concentración de 0.05% y se ha utilizado para hacer la membrana semipermeable de las microcápsulas.

- **Endorem<sup>®</sup>**: El principio activo de Endorem<sup>®</sup> consiste en una suspensión de cristales de óxido de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y es un agente de contraste que se utiliza específicamente en resonancia magnética, se presenta en forma de suspensión inyectable de color marrón rojizo. El Endorem<sup>®</sup> es la presentación europea del Feridex<sup>®</sup> que está aprobada por la FDA.

Para determinar el método de encapsulación se elaboraron dos tipos de microcápsulas:

- **Microcápsulas sin Endorem<sup>®</sup>** con núcleo y cubierta externa de alginato G purificado a concentraciones de 1.5% y 0.1% respectivamente y densidad celular de  $5 \times 10^6$  células/ml. Para la elaboración de la membrana semipermeable se utilizó poli-L-lisina a una concentración de 0.05%.
- **Microcápsulas con Endorem<sup>®</sup> (magnetocápsulas)** con núcleo y cubierta externa de alginato G purificado 1.875% y 0.1% respectivamente y densidad celular de  $5 \times 10^6$  células/ml. En este caso, se aumentó la concentración de alginato del núcleo para que al añadir el contraste la concentración final fuera de 1.5%. Para la elaboración de la membrana semipermeable se utilizó poli-L-lisina a una concentración de 0.05%.

Para la elaboración de las microcápsulas se siguió un protocolo común en el que se desarrolla un núcleo de alginato y en etapas posteriores se recubre con poli-L-lisina y alginato. Las microcápsulas se prepararon utilizando un goteador electrostático, por medio de gelificación iónica.

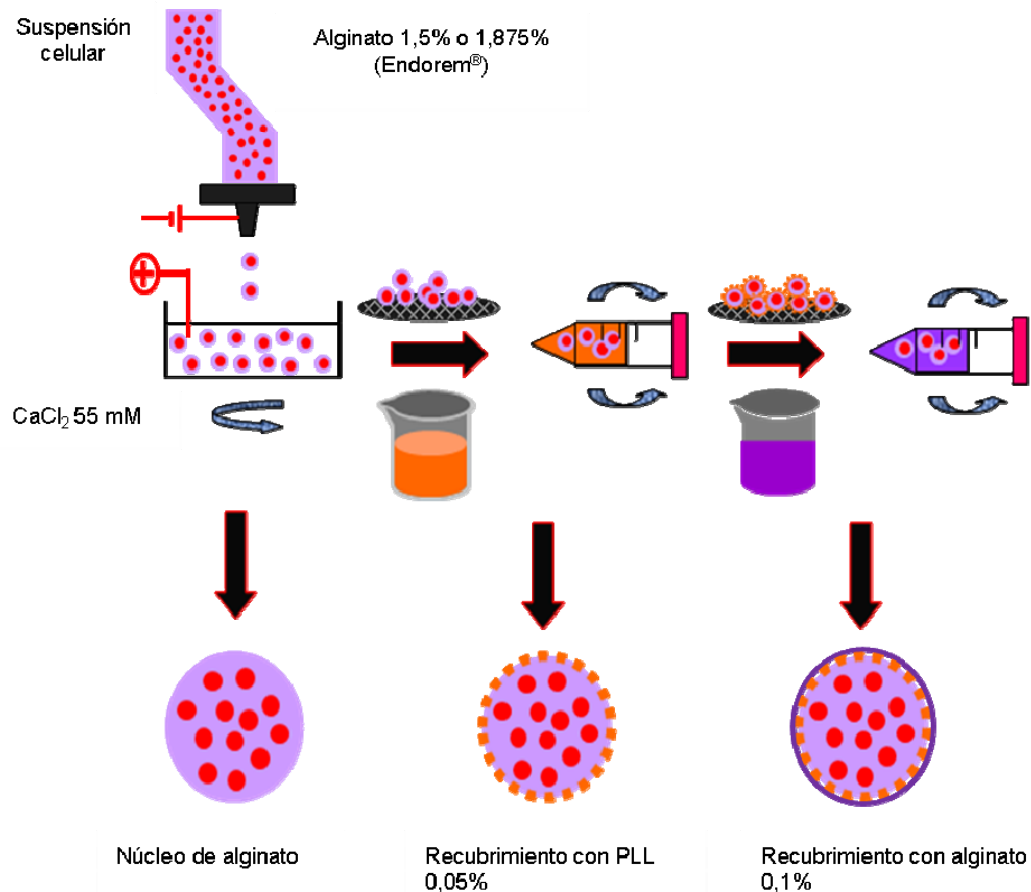
El proceso de elaboración es el siguiente:

Los fibroblastos que crecen en monocapa se desprenden de la pared del frasco de cultivo utilizando tripsina – EDTA (4ml) y agitando el frasco, hasta observar en el microscopio que las células no están agregadas. Por otro lado la solución de alginato al 1.5% o 1.875% una vez esterilizada por filtración ( $0.22\mu\text{m}$ ) se mezcla con los fibroblastos en una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml y esta suspensión celular se deposita en una jeringa (en el caso de las magnetocápsulas a esta suspensión celular se le añade el Endorem<sup>®</sup>). La jeringa se coloca en el goteador electrostático, y por acción de una bomba peristáltica y un voltaje van cayendo las gotas sobre la solución de cloruro cálcico 55mM, estas gotículas se mantienen en agitación durante 8-10 minutos para que el proceso de gelificación iónica se complete.

Posteriormente, se recubren las gotículas para que adquieran mayor resistencia mecánica, para ello el alginato de la cubierta se entrecruza químicamente con poli-L-lisina a una concentración de 0.05% durante 4 minutos. A continuación tras un lavado con manitol al 1% se incuban en alginato al 0.1% durante otros 4 minutos.

Una vez terminado el proceso de elaboración, las microcápsulas obtenidas se lavan con manitol 1%, se transfieren a medio DMEM completo y se mantienen en las condiciones normales de cultivo.

En el Esquema 16 se recoge un resumen del proceso de elaboración de las microcápsulas.



Esquema 16. Esquema del proceso de elaboración de las microcápsulas.

### 9.1.2. Caracterización morfológica de las microcápsulas

Para determinar el tamaño y la forma de las microcápsulas y las magnetocápsulas se utilizó un microscopio óptico invertido (Nikon® TSM) equipado con cámara Sony® CCD-iris.

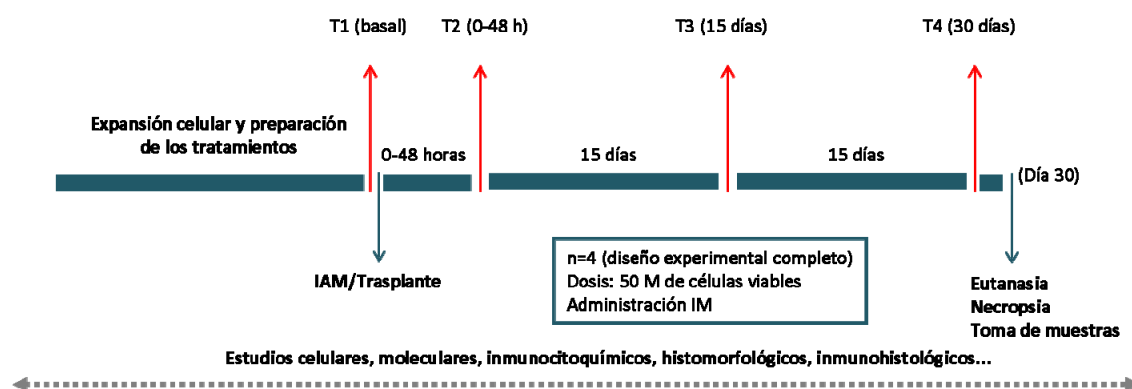
## 9.2. Encapsulación de paMSC

Las paMSC fueron inmovilizadas en microcápsulas de APA con un goteador electrostático de gotas (800V). El alginato UPLVG (del inglés, *Ultra pure low viscosity high guluronic*) se adquirió de FMC Biopolymer (Noruega) y la poli-L-lisina (PLL, bromohidrato, P.M: 15000-30000) a través de la casa comercial Sigma (St. Louis, MO, USA). Las células sembradas en monocapa se recogieron con tripsina-EDTA (Invitrogen) y se resuspendieron en una solución estéril de alginato LVG al 1.5% (peso/volumen) para obtener una densidad celular

de  $5 \times 10^6$  paMSC/ml de alginato. La solución celular resultante fue extraída en una solución 55mM de  $\text{CaCl}_2$  a través de una aguja de 0.35mm utilizando la jeringa estéril de la bomba peristáltica. Las microcápsulas de alginato se mantuvieron en agitación durante 10 minutos para completar el proceso de gelificación iónica. Al igual que con los fibroblastos, el alginato de la cubierta se entrecruzó químicamente con poli-L-lisina a una concentración de 0.05% durante 5 minutos y se incubó en alginato al 0.1% durante otros 5 minutos. Para la elaboración de las magnetocápsulas se utilizó el mismo procedimiento pero añadiendo a la solución estéril de alginato LVG inicial un 20% (v/v) del complejo Endorem®. Las microcápsulas se prepararon a Tª ambiente, en condiciones asépticas y cultivadas en medio completo (medio de cultivo habitual).

## 10. Procedimientos quirúrgicos

El diseño experimental que se ha llevado a cabo para el desarrollo de esta Tesis (en cada uno de los grupos de estudio), podría resumirse en el siguiente esquema general (Esquema 17):



**Esquema 17.** Detalle temporal de las actividades realizadas en cada grupo del estudio. Las flechas rojas indican los seguimientos por RMN, días en los que también fueron obtenidas muestras de sangre para las determinaciones analíticas.

En este esquema se muestra la metodología general utilizada a lo largo de todo el diseño experimental *in vivo* donde se presentan los tiempos de seguimiento y algunas de las características importantes del mismo.

### 10.1. Tratamiento farmacológico

Dado el protocolo quirúrgico al que fueron sometidos todos los animales de los distintos grupos de estudio, fue necesaria la administración del siguiente tratamiento farmacológico a cada uno de ellos:

#### 10.1.1. Tratamiento antiarrítmico

**-Trangorex® 200mg (Amiodarona)**, Desde 2 días antes y hasta 7 días después de la cirugía: administración vía oral (VO) de 400mg/24h.



- **Diltiazem** 24h antes de la cirugía: 180mg VO (dosis única).

#### **10.1.2. Tratamiento antiagregante plaquetario**

- **Aspirina® (AAS)** desde 2 días antes y hasta 7 días después de la cirugía: 500mg/día VO.

#### **10.1.3. Protección gástrica**

- **Urbal® Suspensión (Sucralfato)**, administración diaria 20 minutos antes de la Aspirina®.

#### **10.1.4. Tratamiento antibiótico**

- **Excenel (Ceftiofur Clorhidrato)** 3mg/kg administración IM, durante 5 días.

#### **10.1.5. Tratamiento analgésico**

- **Durogesic® Matrix (Parche transdérmico de Fentanilo)**. Cada parche libera 25µg/h de Fentanilo.

- **Buprex® Inyectable 0.3mg (Buprenorfina)** vía IM en la premedicación anestésica.

### **10.2. Protocolo anestésico**

La anestesia fue realizada por el personal de la Unidad de Anestesia del CCMIJU. Durante todas las intervenciones quirúrgicas (extracción de tejido adiposo, creación del modelo de IAM, trasplante celular, seguimientos por RMN, etc.), los animales se encontraban bajo anestesia general, para la cual fueron necesarios los siguientes pasos:

**1.- Premedicación:** Ketamina (Ketolar 50; Parke-Davis, Barcelona, España) (10mg/Kg).

Atropina (Atropina Braun; Braun Medical, Rubí, Barcelona, España) (0.04mg/kg).

Diazepam (Valium; Roche, Madrid, España) (0.1mg/Kg)

Tras la premedicación los animales se colocaron en un lugar tranquilo durante 5-10 minutos.

**2.- Inducción** intravenosa con Propofol (4mg/kg).

**3.-** Se administró infusión continua de Lactato Ringer (10-15mg/kg/h) a través de la vena marginal de la oreja.

**4.-** La tráquea se intubó y el tubo endotraqueal se conectó a un circuito circular semicerrado unido a un ventilador.

**5.- Mantenimiento anestésico:**

- Isoflurano a una dosis de 1.25 CAM (estudios previos concluyen que con dicha dosis se consigue un valor de BIS entre 40 y 60).

- Vecuronio a una dosis de 0.10mg/kg inicialmente y cada hora se repitió a una dosis de 0.05mg/kg.
- Infusión continua de remifentanilo: Se comenzó a administrar 10 minutos antes de crear el neumoperitoneo a una dosis de 10-15µg/kg/h.

### **10.3. Extracción de la grasa abdominal**

De los 38 animales descritos inicialmente, 9 de ellos fueron utilizados exclusivamente para el aislamiento y obtención de las paMSC, a partir de biopsias de grasa abdominal. Para ello, en el quirófano, bajo anestesia general y con los animales en posición decúbito dorsal, se realizó una incisión en la línea media abdominal y se extrajo el tejido adiposo para el aislamiento de las paMSC. Los animales utilizados se recuperaron posteriormente de la anestesia.

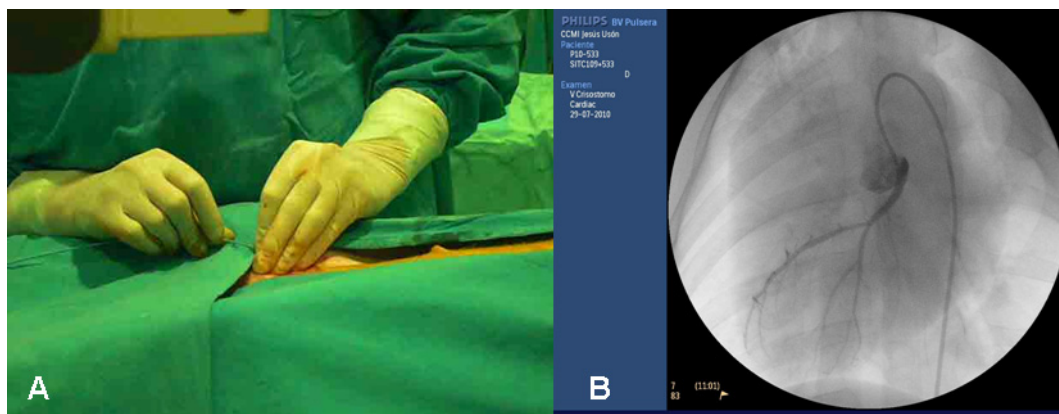
### **10.4. Obtención de tejidos para controles iniciales**

De un animal sano previo, no sometido a estudio, se tomaron muestras de diferentes tipos de tejidos para poder ser utilizados como control en estudios moleculares posteriores.

Los tejidos extraídos fueron los siguientes: hígado, médula ósea, bazo, páncreas, cerebro, arteria aorta, arteria renal, ápex, aurícula, tejido adiposo subcutáneo, tejido adiposo visceral, cartílago y hueso. Dichas muestras de tejidos fueron congeladas a -80°C justo tras el momento de su extracción hasta ser utilizadas.

### **10.5. Creación del modelo de infarto**

La creación del modelo de infarto lo llevó a cabo el personal de la Unidad de Diagnóstico y Terapéutica Endoluminal del CCMIJU, donde la utilización de un modelo endovascular de infarto agudo de miocardio (IAM) es habitual desde hace algún tiempo, siguiendo la metodología establecida para este modelo patológico (Pérez de Prado A, 2009). Bajo anestesia general y en condiciones de asepsia se estableció un acceso vascular percutáneo a la arteria femoral, a través del cual se llevó a cabo una angiografía selectiva de la arteria coronaria izquierda (rama descendente anterior) que se realizó con un sistema de fluoroscopia digital modelo BV-Pulsera (Philips Medical Systems. Best, The Netherlands). En base a esta imagen se determinó el punto de oclusión de la arteria para la inducción del infarto. Mediante la insuflación de un balón de angioplastia se interrumpió el flujo coronario epicárdico durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo, se desinsufló el balón y se comprobó la permeabilidad del vaso. Los animales se mantuvieron monitorizados bajo anestesia general durante 45 minutos tras la inducción del infarto, con el objetivo de tratar las posibles arritmias o fibrilaciones (Imagen 3). Para la realización de la coronariografía se utilizó un catéter-guía Match1™ (Boston Scientific Corporation, Natick, MA, USA) mientras que para la creación del modelo se utilizó un catéter-balón de angioplastia coronaria Apex™ (Boston Scientific Corporation, Natick, MA, USA) con un diámetro luminal de 0.014'' (0,36mm).



**Imagen 3.** Imágenes de distintos momentos de la creación del modelo de IAM en el CCMIJU. **A:** Técnica de Seldinger para abordaje endovascular. **B:** Angiografía intraoperatoria.

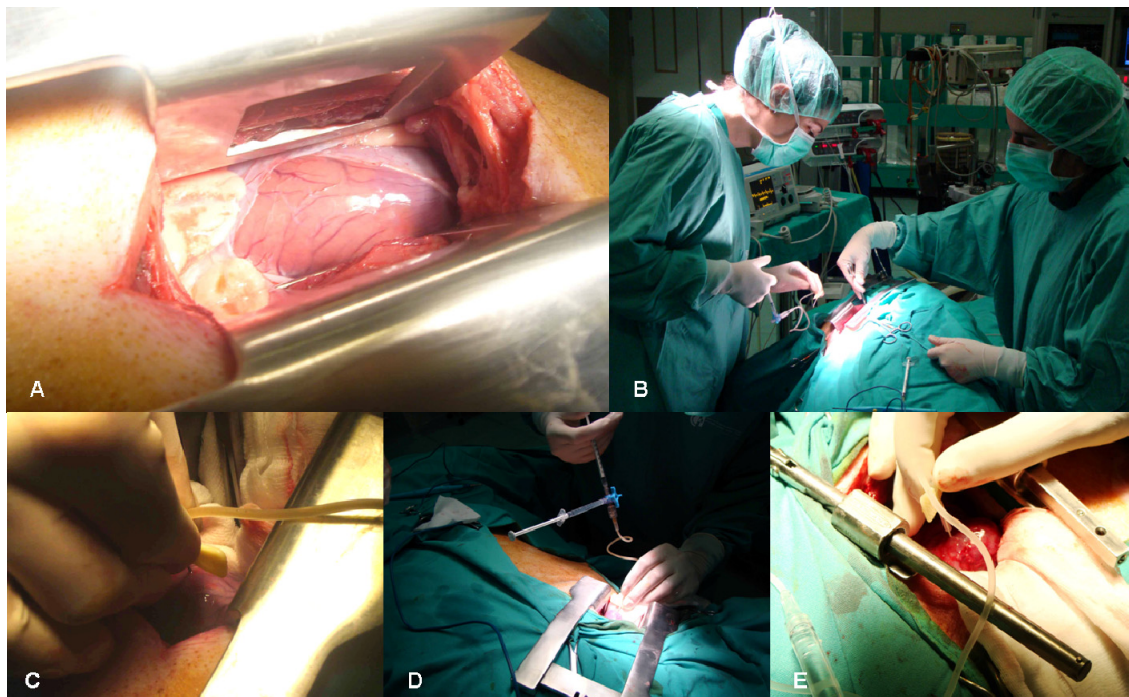
### 10.6. Trasplante celular

De forma general, para cada animal, las células correspondientes a cada tratamiento, se descongelaron y se resuspendieron en una cantidad de suero fisiológico NaCl al 0,9% (solución isotónica de cloruro sódico al 0,9% para perfusión intravenosa, B. BRAUN MEDICAL SA, Rubí; Barcelona) tal que el volumen final fuera de 1-1.5ml. La cantidad de células descongelada para cada animal ya ocupaba un volumen de entre 400-600 $\mu$ l, por lo que se utilizaron de 600-900 $\mu$ l de suero fisiológico para resuspender las células, y obtener así volumen final de 1-1.5ml. Los distintos tratamientos se cargaron en jeringas (25 GA 5/8 IN, 0.5 x 16mm) de 1ml (Cat. n $^{\circ}$  300014, BD Plastipak<sup>TM</sup>) y se trasladaron, en condiciones de esterilidad al quirófano.

El trasplante alogénico de las células se desarrolló a tiempo 0, el mismo día de la creación del modelo de infarto (Imagen 4). Su administración se realizó de forma directa en el corazón (administración intramiocárdica) tras retirar el balón de angioplastia y estabilizar a los animales después de 45 minutos de reperfusión. El acceso directo a la zona de inyección, se realizó mediante toracotomía (llevado a cabo, al igual que en el caso de la creación del modelo de infarto, por el personal de la Unidad de Diagnóstico y Terapéutica Endoluminal del CCMIJU). Así, tras el acceso a la cavidad torácica, se abrió el pericardio y se procedió a trasplantar los distintos tratamientos mediante varias inyecciones en la demarcación de la zona infartada. Se administró una única dosis (50 millones de células viables/animal) a los diferentes grupos de estudio en un volumen máximo de 1.5ml de suero fisiológico (mismo vehículo de inyección utilizado en el grupo control). Así, el trasplante de los distintos tratamientos (salvo el grupo de células microencapsuladas) se realizó mediante varias inyecciones (7-8 inyecciones) en las que se administraba un volumen de 0.2ml de células diluidas en suero fisiológico (unos 8M de células en cada punto de inyección) distribuidas por el área de infarto.

Para ello, y dado que las células utilizadas en los distintos tratamientos se encontraban en N<sub>2</sub> líquido hasta ése momento, las células se descongelaron de la manera habitual,

lavándolas dos veces con el vehículo de inyección previamente a cargar dichos tratamientos en las jeringas con las que se realizaron los trasplantes.



**Imagen 4. Trasplante alogénico.** En **A** y **B** se muestran diferentes momentos de la realización de la toracotomía para el abordaje al corazón. En el resto (**C**, **D** y **E**) se muestran las imágenes del momento del trasplante de los distintos tratamientos mediante inyecciones en la demarcación de la zona de infarto.

## 11. Grupos de estudio

Dentro de las estrategias que se tuvieron en cuenta para los estudios *in vivo*, se quisieron valorar diferentes aspectos. Por un lado, se quiso analizar la evolución normal de un infarto de miocardio sin ningún tipo de tratamiento relevante. Por otro, la acción que pudieran ejercer las células troncales adultas obtenidas de tejido adiposo por sí mismas. También se quiso analizar la influencia que ejercen, tanto en dichas células como en la evolución del tratamiento, por un lado su marcaje con Endorem® así como su transducción con genes que produjeran una sobreexpresión de los factores de crecimiento IGF1 y HGF. Por último, se intentó solventar el problema del anidamiento celular evaluando una forma farmacéutica que permitiera mantener las células en el lugar del daño cardíaco, evitando así la migración celular e intentando aumentar su supervivencia.

De este modo, para llevar a cabo este trabajo se utilizaron distintos grupos de estudio de cerdos de la especie *Large White* (n=4), a los que se les ha inducido un IAM mediante técnicas endovasculares. El número de animales utilizado fue de 4 en cada grupo, siempre que estos superaran todas las fases del estudio. Los grupos planteados se clasificaron en función del tratamiento al que fueron sometidos y el número de animales utilizado en cada grupo se describen a continuación en el siguiente esquema (Esquema 18):



**Esquema 18.** Grupos de estudio utilizados y condiciones generales del trasplante.

- **Grupo Control.** Grupo de animales a los que se les administró suero salino como tratamiento.
- **Grupo 1.** Grupo de animales a los que se les administró como tratamiento células paMSC encapsuladas (cápsulas marcadas con Endorem®).
- **Grupo 2.** Grupo de animales a los que se les administraron células paMSC-GFP+ marcadas con Endorem®.
- **Grupo 3.** Grupo de animales a los que se les administraron células paMSC-GFP+.
- **Grupo 4.** Grupo de animales a los que se les administró como tratamiento células paMSC transducidas con los factores de crecimiento IGF1 y HGF marcadas con los fluoróforos GFP y Cherry, respectivamente.

Para minimizar el número de variables - dado los diferentes grupos de tratamiento objeto de estudio - y poder comparar los efectos de todos ellos, era importante que se definieran una serie de parámetros fijos como el número de animales por grupo, la vía de administración para el trasplante celular, la dosis (número de células trasplantadas a cada animal), etc.

Con esta Tesis, no sólo se pretendía estudiar la potencial efectividad de los diferentes tratamientos, sino que también se estudió la eficacia y reproducibilidad del modelo patológico de infarto de miocardio en el cerdo producido mediante técnicas endoluminales. Por ello, en todos los grupos de estudio se consideró que el número de animales debería ser 4 siempre que dichos animales llegaran al final del seguimiento *in vivo*. Por otra parte se consideró que éste era un número razonable para el estudio de las muestras tomadas tras la eutanasia de los animales y tener por tanto una n=4 de los estudios realizados en el laboratorio para cada experimento. Así, los animales que no sobrevivieron a la intervención quirúrgica del desarrollo

del modelo, nos ayudaron a determinar la eficacia de la patología cardíaca desarrollada por radiología intervencionista.

Respecto a la forma de administrar los distintos tratamientos se tuvo en cuenta que la única vía de administración posible para inocular las paMSC encapsuladas era por administración directa en el miocardio, dado el tamaño de las cápsulas. Por tanto, de todas las vías de administración posibles, se decidió utilizar la administración intramiocárdica con el fin de valorar del mismo modo a todos los grupos de estudio y poder comparar resultados.

Estudios previos han aplicado este tipo de administración intramiocárdica para el trasplante de las células madre adultas empleando para ello volúmenes de inyección muy variables en función de la dosis y del modelo experimental utilizado. En nuestro caso se eligió un volumen de 1.5ml con la intención de concentrar los tratamientos sin que las paMSC utilizadas llegaran a agregarse.

Otro de los parámetros que había que definir era el número de células que se trasplantaría a cada animal. Desde que se iniciaron los estudios *in vivo* en terapia celular, las dosis utilizadas para los diferentes estudios han variado en función de los objetivos, de las especies de animales empleadas y de las vías de administración utilizadas en dichos estudios (Wei H, 2010). La dosis mas frecuentemente empleada hasta el momento ha sido la de 1 millón de células por Kg de peso, si no tenemos en cuenta los estudios de toxicidad. En nuestro caso, con el fin de tener el menor número de variables posibles, poder comparar el efecto de los distintos tratamientos y teniendo en cuenta la vía de administración elegida, se decidió administrar 50 millones de células a cada animal en todos los grupos, salvo en el grupo de las microcápsulas en el que el número de células vino determinado por el volumen que éstas ocupaban.

Teniendo en cuenta las células que se pierden durante los procesos de congelación/descongelación, así como las que pudieran morir en el momento del trasplante y las que se pudieran quedar retenidas en el catéter, el número de células descongeladas para la administración en cada caso fue de un 20-30% adicional, con el fin de asegurar los 50 millones de células viables en el trasplante. Todas las células descongeladas para cada animal, se resuspendieron en una cantidad de suero fisiológico tal que el volumen final fuera de 1-1.5ml. Dado que la cantidad de células descongelada para cada animal ya ocupaba un volumen de entre 400-600µl, la cantidad de suero fisiológico utilizado para resuspender las células fue de 600-900µl, para que el volumen final no sobrepasara el establecido (1-1.5ml).

La dosis establecida suponía un volumen de cultivos bastante elevado, por ello y con el fin de poder realizar todo el protocolo quirúrgico en más de un animal a la semana, se decidió que los distintos tratamientos se congelarían hasta el momento de la administración. Para ello,



según se expandían las células, se congelaban mediante el procedimiento habitual de congelación. En el caso del tratamiento del grupo 2 (paMSC+GFP+Endorem®), la congelación se realizó una vez que se comprobó que las células estaban marcadas (tras 24 horas de incubación con el complejo Endorem-PLL y su visualización directa al microscopio). La viabilidad tras la descongelación había sido comprobada previamente (Apartado 3.1 *Marcaje con el complejo Endorem®* de Resultados) confirmándose que dicho proceso mantenía el marcaje de forma óptima y que la viabilidad no se veía afectada. Este procedimiento se llevó a cabo en todos los grupos de tratamiento a excepción del grupo 1 (paMSC microencapsuladas). En este caso, los tratamientos se prepararon justo en los días previos al protocolo quirúrgico y se mantenían en cultivo hasta el momento del trasplante.

### **11.1. Grupo Control**

Con el fin de tener un grupo de animales con el que comparar la efectividad y eficacia de cada tratamiento, se determinó como control un grupo de animales al que se les indujo el infarto de miocardio del mismo modo que al resto de grupos de estudio. En su caso, en lugar de las diferentes estrategias de terapia celular definidas en los distintos grupos, se administró suero fisiológico NaCl al 0.9% (solución isotónica de cloruro sódico al 0.9% para perfusión intravenosa, B.BRAUN MEDICAL SA, Rubí; Barcelona). El volumen de suero administrado fue el mismo que el volumen final utilizado en el resto de tratamientos.

La metodología empleada en las cirugías, los seguimientos y tomas de muestra, así como los estudios posteriores, también fueron equivalentes al resto de grupos estudiados y por tanto, los resultados obtenidos con estos animales fueron tomados como referencia para el análisis posterior de los obtenidos con el resto de tratamientos.

### **11.2. Grupo 1. Animales a los que se les administró, como tratamiento, células paMSC encapsuladas (microcápsulas APA marcadas con Endorem®)**

El objetivo de la administración de este tratamiento con este grupo, fue el estudio del anidamiento y supervivencia celular utilizando microcápsulas de alginato y poli-L-Lisina como vehículo celular. Por otra parte se pretendía estudiar la influencia de dicha formulación farmacéutica tanto sobre las propias células como en la evolución del tratamiento. De este modo se compararon los resultados obtenidos en este grupo, donde las células se encontraban microencapsuladas, con el resto de grupos donde las células utilizadas en cada caso se administraron suspendidas en suero fisiológico, NaCl al 0.9%.

### **11.3. Grupo 2. Animales a los que se les administraron células paMSC-GFP+ marcadas con Endorem®**

Con el fin de determinar la potencial eficacia de un tratamiento con células obtenidas de tejido adiposo sobre un infarto de miocardio, se planteó un grupo de animales a los que se les inocularon células paMSC-GFP+ marcadas con el complejo Endorem®.

A las células paMSC-GFP+ se las marcó también con el complejo Endorem® con el objetivo de poder hacerlas el seguimiento *in vivo* mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Para ello se incubaron durante 24h en medio de cultivo basal con un complejo formado por 25µg/ml de nanopartículas de óxido de Fe superparamagnético (Endorem®) y 0.375µg/ml de poli-L-Lisina (PLL). El marcaje de las células con Endorem® para este grupo de estudio, se produjo justo antes de la congelación de éstas, una vez expandidas, y obtenida la cantidad suficiente para ser trasplantadas.

### **11.4. Grupo 3. Animales a los que se les administraron células paMSC-GFP+**

Como tercer tratamiento se planteó la administración de las células troncales adultas procedentes de tejido adiposo (paMSC) únicamente marcadas con la proteína fluorescente verde (GFP) para poder hacer su seguimiento posterior en el laboratorio tras las tomas de muestras al final de los estudios *in vivo*. Los animales pertenecientes a este grupo sirvieron como control respecto al resto de grupos donde se administraron células. De este modo se pudo estudiar la influencia del marcaje con el Endorem® en estas células así como en la evolución de la patología.

Del mismo modo, este grupo sirvió de referencia respecto al grupo en el que las mismas células fueron transducidas para sobreexpresar los genes IGF1 y HGF como tratamiento, grupo que se explica a continuación.

### **11.5. Grupo 4. Animales a los que se les administró, como tratamiento, células paMSC que sobreexpresan los factores de crecimiento IGF1 y HGF**

El último grupo de estudio consistió en el mismo número de animales al que se le administró, como tratamiento, células paMSC transducidas con vectores lentivirales para sobreexpresar los factores de crecimiento IGF1 y HGF; dichos vectores proporcionaban marcaje para dos fluoróforos compatibles, GFP y Cherry respectivamente.

El objetivo principal de este grupo de tratamiento fue conseguir una sobreexpresión de dichos factores por parte de las células administradas. El IGF1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1) estimula el crecimiento y la proliferación celular, es un potente inhibidor de la muerte



celular programada y su actividad está mediada por la unión a su receptor específico IGF1R. Por otro lado el HGF (factor de crecimiento hepático) regula el crecimiento y motilidad celular y la morfogénesis activando una cascada de señalización tirosina-kinasa tras su unión al receptor proto-oncogénico c-Met. Con la sobreexpresión de dichos factores se pretende obtener un grupo de tratamiento celular que proteja el tejido dañado y evite una mayor evolución de la fibrosis cardíaca tras el infarto de miocardio favoreciendo los procesos de revascularización alrededor del tejido afectado.

Por un lado se prepararon células a las que se les introdujo el gen del factor de crecimiento insulínico, IGF1, marcadas en verde con GFP. Por otro, se prepararon células transducidas con el gen del factor de crecimiento hepático, HGF, marcadas con un fluoróforo en rojo (Cherry). Para las transducciones se utilizaron vectores lentivirales como se indica en el Apartado 7.3. *Introducción de cDNA seleccionados (HGF/IGF1)* de esta sección. Ambos tipos celulares se inocularon en cada uno de los animales de este grupo en una mezcla 1:1, siendo por tanto la suspensión trasplantada 50% IGF1-GFP+ / 50% HGF-Cherry+.

## **12. Técnicas de diagnóstico**

Con el fin de valorar la situación del IAM en los animales y su evolución durante el tiempo de monitorización (un mes de seguimiento) se utilizaron dos tipos de técnicas diagnósticas. Por un lado se estudiaron las imágenes obtenidas por RMN, para analizar los parámetros que determinan la funcionalidad cardíaca de los distintos grupos de tratamiento y por otro se determinaron los niveles de enzimas cardíacas indicativas del IAM.

### **12.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)**

Una vez administrados los distintos tratamientos se realizó la monitorización de los animales donde se desarrollaron distintos estudios *in vivo* (evaluación del IAM, del efecto terapéutico y localización celular, seguimientos a distintos tiempos, etc.).

La evaluación morfológica y funcional del corazón se llevó a cabo mediante el uso de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se empleó un sistema de RMN de 1.5T (Intera 1,5T, Philips Medical Systems. Best, The Netherlands), utilizando sincronización cardíaca, con el animal en decúbito esternal y con una bobina phase-array de 4 canales colocada en torno al tórax. Para la evaluación morfológica del corazón se realizó un estudio con imágenes de modo cine con secuencias eco de gradiente (EG, Echo Gradient) incluyendo todo el ventrículo, que permiten obtener información funcional del ciclo cardíaco, evaluándose la masa miocárdica ventricular, volúmenes sistólico y diastólico, fracción de eyección y gasto cardíaco. Finalmente, mediante la administración de gadobutrol 1.0mmol/ml solución inyectable (Gadovist®, C.N. 674598-H, Laboratorios Bayer, Barcelona, España) se llevó a cabo el estudio de viabilidad (captación tardía del contraste) mediante la adquisición de imágenes 10-15 minutos tras la

## **Materiales y métodos**

administración de dicho contraste con una secuencia eco de gradiente de inversión-recuperación.

Los tiempos de seguimiento donde se llevaron a cabo los estudios por RMN son los siguientes:

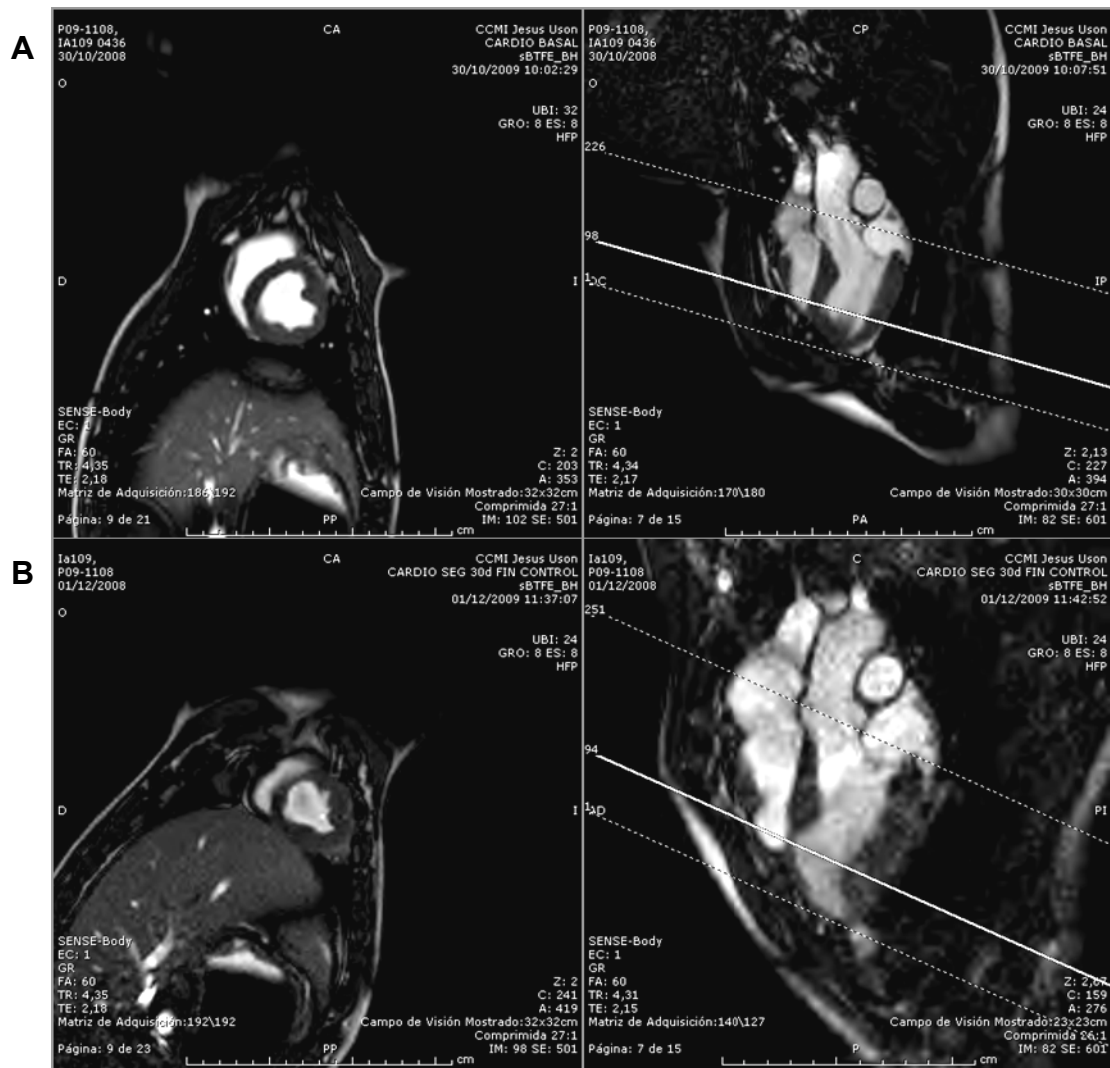
- **T1:** Estudio preoperatorio o basal. Realizado antes de la inducción del modelo de IAM y del trasplante de los diferentes tratamientos.
- **T2:** Primer estudio postoperatorio tras el trasplante celular. Este seguimiento se realizó durante las primeras horas (entre las 0 y 48 horas) después de administrar los tratamientos en los distintos grupos de estudio.
- **T3:** Estudio postoperatorio, realizado a los 15 días después del trasplante celular.
- **T4:** Fin de estudio postoperatorio, llevado a cabo a los 30 días, justo antes de proceder a la eutanasia de los animales.

Los parámetros valorados para determinar la funcionalidad cardíaca fueron la fracción de eyección, el gasto cardíaco, el volumen de eyección sistólico, la frecuencia cardíaca y el porcentaje de área de infarto. Los datos obtenidos de cada uno de estos parámetros en los diferentes grupos son los que nos ayudaron a evaluar la eficacia terapéutica de los tratamientos utilizados en el estudio.

Además, esta técnica se empleó en el estudio de localización celular con el fin de evaluar un sistema de administración alternativo que mejorara el trasplante y el anidamiento celular, donde se analizaron dos de los grupos de estudio (grupos 1 y 2). Previamente, se validaron los marcajes tanto celular como de las microcápsulas (magnetocápsulas). Por un lado, el tratamiento utilizado en el grupo 1 consistió en las paMSC microencapsuladas en cápsulas de alginato y marcadas éstas con el complejo Endorem-PLL; en el grupo 2 se incluyó como tratamiento las paMSC sin encapsular y marcadas también con el mismo complejo de hierro (en este grupo las células eran GFP positivas). Ambos grupos de estudio se compararon para la evaluación del anidamiento celular, uno de los principales problemas en los tratamientos de terapia celular, comparándolos a su vez con el grupo control sin tratamiento

### **12.1.1. Selección de imágenes**

Las imágenes en eje corto elegidas para los estudios, son las obtenidas de la sección de corte donde (en las imágenes en cuatro cámaras) se aprecia una mayor reducción de masa cardíaca en el septo interventricular, producida por la fibrosis del tejido cardíaco a causa del infarto, tal y como se aprecia en la Imagen 5 donde se expone un ejemplo de imágenes de RMN tomadas en uno de los animales del Grupo Control (Control 1):



**Imagen 5. Metodología utilizada para la selección de imágenes en cuatro cámaras. (A)** Imágenes tomadas en T1 (seguimiento basal) en cuatro cámaras (derecha), donde se aprecia el lugar de corte con la que se obtiene la imagen en eje corto (izquierda). **(B)** Muestra el mismo ejemplo pero en imágenes tomadas en el seguimiento a los 30 días (T4).

### 12.1.2. Análisis de los parámetros funcionales

Mediante un software específico (Extended MR WorkSpace 2.6.3.2, 2009. Philips Medical Systems. Best, The Netherlands) se analizaron los volúmenes telesistólico y telediastólico, calculados en base a las imágenes tomadas en cada uno de los seguimientos, a partir de los cuales se determinaron los parámetros de funcionalidad cardíaca. Todos estos cálculos se llevaron a cabo sobre las imágenes en eje corto.

### 12.2. Determinaciones analíticas

Las enzimas cardíacas que se determinaron para el diagnóstico del IAM fueron la troponina I (TnI), creatina kinasa miocárdica (CKMB) y la mioglobina (Myo). Cabe destacar que los resultados de los grupos control y grupo 1 corresponden a los valores obtenidos de un solo animal, por problemas en el desarrollo del estudio, por lo que podrían no ser representativos en todos los casos. Para la TnI los valores no detectables por el equipo ( $<0,010\mu\text{g/L}$ ) se asumió el

valor 0. En el caso de la Myo, los valores no detectables por el equipo (<20µg/L) se asumió el valor de 15.

Las determinaciones analíticas de las enzimas cardíacas (Tnl, CKMB y Myo) se realizaron de muestras de sangre tomadas en cada uno de los seguimientos anteriormente descritos (T1, T2, T3 y T4), en todos los animales sometidos a estudio. Las muestras de sangre se tomaron en tubos (Cat. nº.367654, BD Vacutainer™) con EDTA (K3E 15% 0,054ml). Estas muestras de sangre se centrifugaron durante 15 minutos a 2270xg y el plasma se guardó hasta realizar las determinaciones. Los niveles enzimáticos en los plasmas sanguíneos se determinan con un analizador fluorimétrico (AQT90 Flex, Radiometer Ibérica, Madrid, España) y con los kit de detección específicos para cada enzima cardíaca a analizar. Previamente a su uso, cada lote de dichos kits tiene que calibrarse con sus correspondientes kits de calibración. En el siguiente cuadro se especifican los reactivos utilizados y sus referencias correspondientes (Tabla 10):

Enzima	Reactivo	Referencia
Tnl	TNL TEST KIT TROPONINA	942-903, Radiometer Ibérica S.L.
Tnl	TNL CALIBRATION ADJUSTMENT CARTRIDGE BOX OF 1PCS	944-212, Radiometer Ibérica S.L.
CKMB	CKMB TEST KIT	942-906, Radiometer Ibérica S.L.
CKMB	TNL CALIBRATION ADJUSTMENT CARTRIDGE BOX OF 1PCS	944-216, Radiometer Ibérica S.L.
Myo	MYO TEST KIT	942-909, Radiometer Ibérica S.L.
Myo	TNL CALIBRATION ADJUSTMENT CARTRIDGE BOX OF 1PCS	944-214, Radiometer Ibérica S.L.

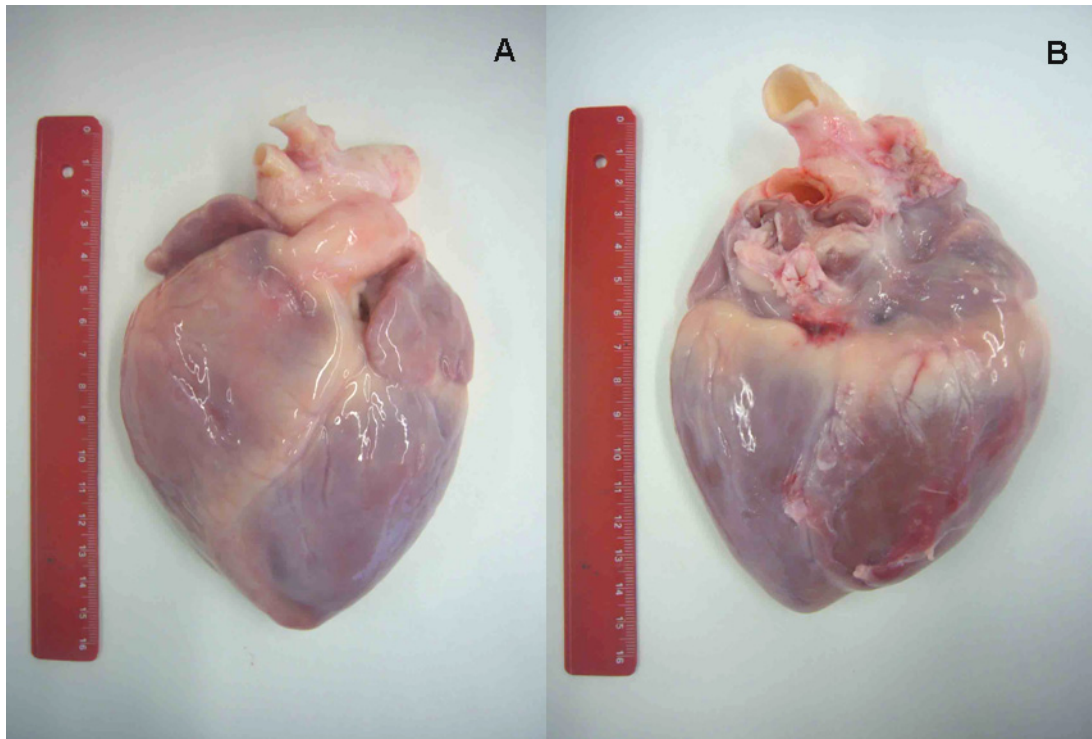
**Tabla 10.** Reactivos utilizados para la determinación de los niveles de enzimas cardíacas de los animales objeto de estudio.

### **13. Eutanasia, necropsia y toma de muestras**

Después de realizar el seguimiento por RMN correspondiente a los 30 días tras el trasplante (T4) y estando en condiciones de anestesia general, los animales fueron eutanasiados mediante la administración de cloruro potásico (C.N. 645804 E.C.H., B. Braun Medical S.A. Barcelona) (1-2mmol/kg) siguiendo las directrices de la *American Veterinary Medical Association Panel on Euthanasia* (JAVMA 2001; 218:680-681).

Tras la eutanasia animal se practicó una necropsia para realizar la valoración macroscópica de los órganos internos así como para poder practicar la toma de muestras de

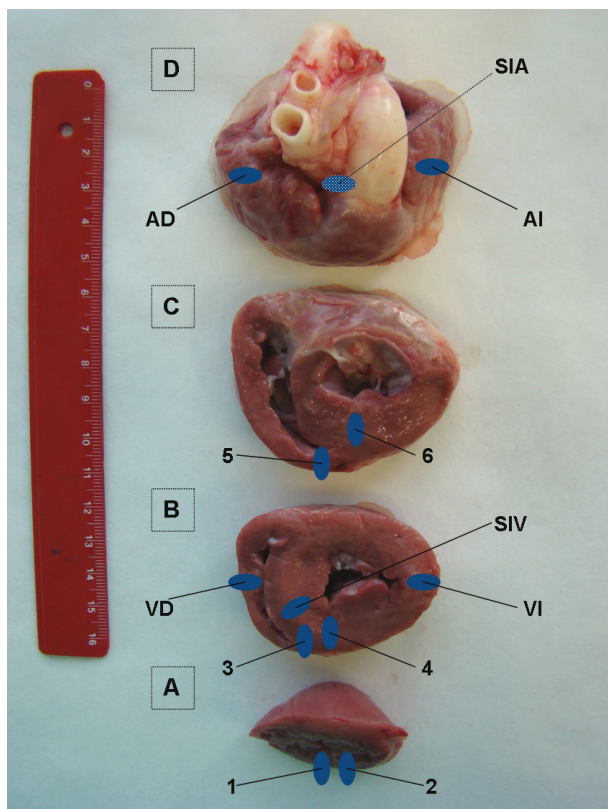
los animales sometidos a estudio. En la toma de muestras se recogieron especímenes de los siguientes órganos: hígado, riñón izquierdo, bazo, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, ganglios mediastínicos, pulmón izquierdo y timo. De cada una de las muestras elegidas se tomaron tres partes aleatorias que fueron sometidas a procesos diferentes. El corazón se recogió entero para hacer una valoración macroscópica (Imagen 6) y poder realizar una toma de muestras más específica.



**Imagen 6.** Valoración macroscópica del corazón. Vista frontal (A) y posterior (B) de un corazón representativo recogido en el momento de la necropsia.

Una vez realizada la valoración macroscópica se procedió a completar la toma de muestras de los corazones siguiendo el esquema que se muestra en la Imagen 7. De este órgano se obtuvieron 12 muestras diferentes y, como en los otros tejidos, cada una de las muestras se tomó por triplicado para procesarlas de diferente forma en función de los estudios a realizar. Aunque para el desarrollo de esta tesis no se han utilizado todos los tejidos, la toma de muestras se realizó de esta manera para poder llevar a cabo estudios posteriores con ellos que completarán esta línea de investigación. Así, se realizaron cortes transversales desde la altura del IAM hacia el ápex y se tomaron 6 muestras diferentes nombradas del 1 al 6. Además, se recogieron muestras de la aurícula izquierda (AI), aurícula derecha (AD), ventrículo izquierdo (VI), ventrículo derecho (VD), septo interauricular (SIA) y del septo interventricular (SIV) tal y como se expone en la siguiente imagen (Imagen 7).





**Imagen 7.** Localización de las diferentes partes del corazón que se recogieron en la toma de muestras. Todas las muestras se obtuvieron por triplicado.

Las muestras se tomaron por triplicado para ser procesadas de la siguiente manera:

- Una muestra para su inclusión en parafina. Para ello se tomó uno de los triplicados de cada muestra y se colocó en un casete (cerrado y rotulado) que directamente se introdujo en un bote con paraformaldehído al 4% (en PBS) para fijarlas. Se guardaron en el frigorífico hasta su inclusión en parafina entre las 24 y 48 horas siguientes (y poder realizar después los cortes en el microtomo). En el caso en el que no tuvimos la posibilidad de formar los bloques de parafina en el tiempo indicado, las muestras se mantuvieron en EtOH al 70% hasta su procesado.
- Otro de los triplicados de cada muestra, para la extracción de RNA. Cada una de estas muestras se introdujo en un criovial diferente rotulado y bien identificado. En el momento que la muestra estaba en el criovial, se pasó a N<sub>2</sub> líquido hasta finalizar toda la toma de muestras del animal en cuestión y posteriormente se conservaron en el ultracongelador (Herfreeze® HFU-4865-Basic, Sorvall® Heraeus) a -80°C hasta su utilización (extracción del RNA objeto de estudio).
- El tercero de los triplicados, se tomó para su posterior inclusión en OCT™. Para ello, estas muestras se pusieron previamente en sacarosa al 30% (en PBS) en un tubo (con +/- 5ml) y se dejaron en el frigorífico hasta que el tejido se encontraba en el fondo (entre 24-48 horas) momento en el que se pusieron en un molde de plástico (Cat. nº HTMP-032-100, de

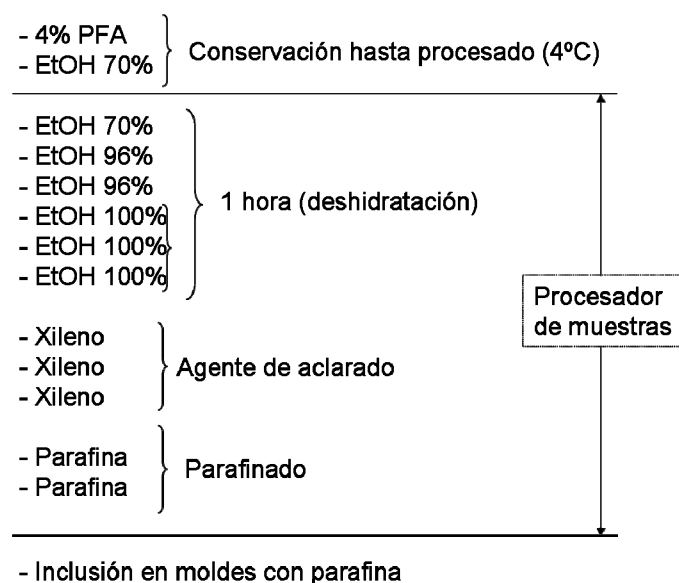
25x32x5mm, Labbox) para incluirlo en el OCT™, del inglés *Optimal Cutting Temperature* (Cat. nº 4583, Tissue.Tek). Estas muestras pasaron a conservarse también en el ultracongelador a -80°C hasta ser utilizadas. En el desarrollo de esta tesis no han sido analizadas pero fueron procesadas para llevar a cabo estudios futuros.

## 14. Histología

En la valoración histológica de las muestras analizadas (incluidas en parafina) se utilizaron dos técnicas de tinción distintas. La tinción del *tricromico de Masson* se empleó para la evaluación del grado de infarto de las muestras analizadas en todos los estudios. Con el objetivo de conocer el grado de resolución del infarto provocado en los animales mediante el trasplante intramiocárdico de los diferentes grupos de tratamiento administrados se analizaron las muestras teñidas con Hematoxilina/Eosina (H/E).

Las preparaciones analizadas correspondieron a los cinco grupos de estudio, a los que se les provocó el infarto de miocardio mediante técnicas endovasculares, (cuatro grupos de tratamiento y un grupo control). También se incluyeron las muestras de un animal en el que no se había producido infarto, como control de la patología cardíaca, pero al que se le trasplantó una dosis de 30M de células del mismo tipo que en el grupo de tratamiento 2. De cada animal se analizaron las muestras de tejido cardíaco nombradas como *Corazón 2*, *Corazón 4*, *Ventrículo izquierdo (VI)* y *Septo interventricular (SIV)*.

Las muestras utilizadas para histología fueron las destinadas a su inclusión en parafina. Para ello, antes de su inclusión, las muestras fueron procesadas en el procesador (Leica, ASP300) donde fueron sometidas a los siguientes pasos:



Una vez formados los bloques de parafina, se realizaron los cortes (5µm) de cada una de las muestras para realizar diferentes estudios histológicos que se describen en los siguientes apartados:

### **14.1. Tricrómico de Masson**

El Tricrómico de Masson es una tinción especial que nos permite visualizar las fibras de colágeno tipo I que forman fibras gruesas o haces. En este tipo de tinciones se utilizan tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno. De este modo, las fibras de colágeno y por tanto el tejido conjuntivo, se teñirán de azul; en el caso de los tejidos cardíacos analizados nos permitió identificar las zonas de fibrosis producidas como consecuencia del IAM. Por otra parte, las estructuras oxidadas y el citoplasma se tiñen de color rojo, así como la queratina, los glóbulos rojos y el tejido muscular. Finalmente los núcleos aparecen en un tono morado-marrón (aunque en las imágenes analizadas no se aprecian dados los aumentos con los que se realizó la captura de imágenes).

La tinción de Tricrómico de Masson se realizó con las muestras representativas de un animal de cada grupo con el fin de determinar y observar, de forma cualitativa, las zonas con fibrosis correspondientes a las zonas infartadas, además se añadieron las muestras correspondientes al animal al que no se le indujo infarto de miocardio. Las muestras a las que se les realizó esta tinción fueron las correspondientes a *Corazón 2*, *Corazón 4*, *Septo interventricular (SIV)* y *Ventrículo izquierdo (VI)*. Los pasos a seguir en esta tinción se indican en los siguientes puntos:

- 1.- H<sub>2</sub>O corriente ----- 1 lavado.
- 2.- HEMATOXILINA (Sigma) ----- 5 min.
- 3.- H<sub>2</sub>O corriente ----- 1 lavado.
- 4.- H<sub>2</sub>O acética ----- 1 lavado.
- 5.- H<sub>2</sub>O corriente ----- 1 lavado.
- 6.- FUCSINA de PONCEAU (Fuscina ácida, Sigma y Ponceau silidina, Merck) ----- 5 min.
- 7.- H<sub>2</sub>O corriente ----- 1 min.
- 8.- H<sub>2</sub>O acética ----- 1 min.
- 9.- ÁCIDO FOSFOMOLÍBDICO (Merck)----- 5 min.
- 10.- H<sub>2</sub>O acética ----- 1 min.
- 11.- AZUL DE ANILINA (Cat. nº 95290, Sigma) ----- 5 min.
- 12.- H<sub>2</sub>O corriente ----- 1 lavado.
- 13.- H<sub>2</sub>O acética ----- 1 lavado.
- 14.- H<sub>2</sub>O corriente ----- 1 lavado.
- 15.- DESHIDRATACIÓN:
  - EtOH 70° ----- 5 min.
  - EtOH 96° ----- 2 x 5 min.



- EtOH 100° ----- 2 x 10 min.
- Xileno Recuperado ----- 10 min.
- Xileno Nuevo ----- 10 min.

16.- Montaje con Eukitt (Cat.nº A10250, DELTALAB, Eurotubo®).

Por otra parte, la captura de imágenes en este caso se realizó con la lupa SMZ800 (NIKON) con cámara digital DS-Fi1 (NIKON) a 1X.

## 14.2. Hematoxilina/Eosina (H/E)

### 14.2.1. Tinción

Esta tinción se realizó en todos los animales incluidos en el estudio y se añadieron las muestras correspondientes al animal al que no se le indujo la patología cardíaca. Para la tinción de las muestras analizadas (*Corazón 2*, *Corazón 4*, *Septo interventricular* y *Ventrículo izquierdo*) se siguieron los pasos siguientes:

- 1.-Desparafinado en la estufa a 65°C -----30 min.
- 2.-Hidratación:
  - Xilol-----2 x 5 min.
  - EtOH Absoluto -----5 min.
  - EtOH 96%-----5 min.
  - EtOH 80%-----5 min.
  - EtOH 70%-----5 min.
  - EtOH 50%-----5 min.
  - H<sub>2</sub>O destilada-----5 min.
- 3.- Hematoxilina (MHS-16, Sigma-Aldrich)-----3-4 min.
- 4.- H<sub>2</sub>O corriente----- 2 min. (Tª ambiente).
- 5.- EtOH ácido (EtOH 70% + 1% HCl) -----1 dips.  
(Aquí se controló la tinción de los núcleos en el microscopio)
- 6.- H<sub>2</sub>O corriente-----4 min.
- 7.- Eosina 5% alcohólica (HT11031284L, Sigma-Aldrich)-----5 min.
- 8.- H<sub>2</sub>O corriente-----2 dips.
- 9.- Deshidratación:
  - EtOH 50%-----5 dips (ó 30 seg).
  - EtOH 70%-----5 dips (ó 30 seg).
  - EtOH 80%-----5 dips (ó 30 seg).
  - EtOH 96%-----5 dips (ó 30 seg).
  - EtOH Absoluto -----10 dips (1 min).
  - Xilol-----2 x 3 min.
- 10.- Montaje con Eukitt (Cat.nº A10250, DELTALAB, Eurotubo®).

### **14.2.2. Análisis histomorfológico**

La valoración y evaluación histomorfológica de las muestras la realizó el Laboratorio de Diagnóstico Anatomopatológico Veterinario *ANAPATH* (Granada) al que se remitieron las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina, correspondientes a 4 grupos de tratamiento de animales infartados más un grupo control, formados cada uno por cuatro animales. Además, se incluyó un animal en el que no se había producido infarto. De cada animal se enviaron 4 fragmentos nombrados como *Corazón 2*, *Corazón 4*, *Ventrículo izquierdo (VI)* y *Septo interventricular (SIV)*. De todas ellas la nombrada como *Ventrículo izquierdo (VI)* es la que se utilizó como control negativo.

En la tinción de H/E se valoró el grado de inflamación considerando el infiltrado de células inflamatorias y edema y asignando los valores de: 0 cuando era inexistente, 1 leve, 2 ligero, 3 moderado y 4 severo. La presencia de áreas de fibrosis se consideró 0 cuando la lesión no fue observada, 1 cuando su extensión se situó por debajo del 5% de la muestra, 2 entre 5-30%, 3 entre el 30 y el 60% y 4 cuando superaba el 60%. A la metaplasia cartilaginosa o calcificaciones distróficas se les aplicó el mismo *score* que para la inflamación. Para valorar el aumento del número de neovasos entre las fibras musculares o el tejido conjuntivo (angiogénesis) se consideró 0 cuando no se observaron neovasos, 1 escaso número de vasos, 2 leve, 3 moderado número y 4 numerosos neovasos. Por último, la presencia de inflamación en el pericardio se valoró de la misma manera que para la inflamación del miocardio.

### **14.3. Azul de Prusia**

Tal y como se indicó en el Apartado 6.2.1. *Tinción con azul de Prusia. Validación de los marcajes con Endorem®*, la tinción de azul de Prusia se utiliza para detectar los depósitos de hierro en células o tejidos. En este caso, esta tinción se ha empleado para localizar y confirmar la presencia de los tratamientos administrados, que utilizaron el complejo Endorem® (Grupos 1 y 2), en el tejido cardíaco de los distintos grupos de estudio tras un mes de seguimiento. La tinción se realizó con las muestras representativas de un animal de cada grupo, en la sección nombrada como *Corazón 2*, la cual mostró ser la más adecuada para localizar los tratamientos.

Para ello, las muestras de tejido en parafina ya cortadas (cortes de 5µm), fueron desparafinadas e hidratadas en los siguientes pasos:

1.-Desparafinado en la estufa a 65°C -----30 min.

2.-Hidratación:

- Xilol-----2 x 5 min.
- EtOH Absoluto -----5 min.
- EtOH 96%-----5 min.
- EtOH 80%-----5 min.
- EtOH 70%-----5 min.

- EtOH 50%-----5 min.
- H<sub>2</sub>O destilada-----5 min.

A continuación, se utilizó una solución (1:1) de ferrocianuro potásico (Fe<sub>7</sub>C<sub>18</sub>N<sub>18</sub>K<sub>x</sub>) al 4% (Cat. 141505, PANREAC Química SAU, Barcelona) y HCl al 8%, dejándolo incubar durante 30 minutos a T<sup>a</sup> ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavaron las preparaciones con H<sub>2</sub>O destilada un par de veces y se montaron los portas con cubreobjetos para su visualización al microscopio.

## 14.4. Inmunohistoquímicas

### 14.4.1. Inmunorreacción con DAB para el estudio de la expresión de IGF1

Al confirmarse que el anticuerpo contra IGF1 policlonal anti-humano utilizado no era funcional para la técnica de western blot, se procedió a realizar técnicas de inmunohistoquímica con DAB (diaminobenzadina) para determinar la presencia de esta proteína en el tejido tomado tras la eutanasia. Se analizó una muestra (*Corazón 2*) de uno de los animales del grupo 4, donde cabría encontrar una mayor expresión de esta proteína.

Este tipo de inmunodetección (inmunoperoxidasa indirecta) se realiza en dos pasos principalmente y en este caso se intentó determinar la expresión de IGF1 con el anticuerpo correspondiente. En el primero, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario IGF1 (sc-9013, Santa Cruz Biotechnology, INC) a una dilución 1/50 habiendo previamente eliminado la peroxidada endógena con 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en MeOH durante 10min. Se produjo el desenmascaramiento del antígeno con citrato sódico 10mM + Tween (0,05%) a pH=6.0. El anticuerpo secundario ha de estar biotinilado (está unido covalentemente con la enzima peroxidasa que cataliza la formación de peróxido de hidrógeno), se utilizó para ello el kit HRP (Vectastain (ABC kit) Elite PK-6101, Vectorlabs), a una dilución 1/100. Finalmente el producto de reacción se reveló con 3,3'-diaminobencidina (DAB), que al oxidarse forma un producto marrón insoluble.

### 14.4.2. Búsqueda de paMSC marcadas con la proteína fluorescente verde (GFP) en tejido cardíaco

Posteriormente, y con la intención de ver si la expresión de IGF1 encontrada había sido o no promovida por el trasplante de las paMSC transducidas con IGF1-GFP (trasplantadas en este grupo de tratamiento), se llevaron a cabo técnicas de inmunofluorescencia para encontrar células GFP positivas en esto tejidos.

En la búsqueda de células GFP positivas contábamos con tejido cardíaco del animal al que no se le produjo el IAM, pero al que se le realizó el trasplante de paMSC GFP positivas y marcadas también con el complejo Endorem®. En este caso la dosis administrada era la mitad que en el resto de animales del estudio, sin embargo el tiempo de monitorización terminó en

una semana. Por esto, en el caso de encontrar alguna paMSC positiva para GFP, este animal es el que consideraríamos como control positivo.

Otro dato a tener en cuenta es la autofluorescencia que presenta el tejido cardíaco (tanto al rojo como al verde), hecho que ha complicado la localización de células positivas. Por otra parte, los eritrocitos presentes en los tejidos tienen también una elevada fluorescencia para ambos colores. Por todo esto, fue necesario utilizar otro control negativo adicional, (muestras teñidas sólo con DAPI), con el fin de conocer la fluorescencia base del tejido. Además, hay que tener en cuenta la importancia de haber realizado una buena toma de muestras, recogiendo los tejidos justo en las zonas de inyección, ya que el tamaño del corazón porcino (similar al humano) es bastante más grande que el de la mayoría de modelos animales utilizados en los estudios *in vivo*.

En el caso del animal sin infarto se utilizaron dos controles negativos, uno con la tinción de DAPI únicamente y otro utilizando sólo el anticuerpo secundario (utilizando Alexa Fluor 568 como anticuerpo fluorescente). La identificación se realizó mediante inmunofluorescencia, utilizando el anticuerpo primario contra la proteína fluorescente verde (GFP). Como anticuerpo secundario se empleó principalmente el Alexa Fluor 568 (rojo), con el fin de destacar esta señal frente a la autofluorescencia del tejido. De este modo, las células positivas en estos estudios presentarían un color amarillo-anaranjado al coincidir con la fluorescencia verde de las células transducidas con GFP. En este caso, al tratarse de un animal cuyo seguimiento *in vivo* se realizó durante una semana, estas muestras se han tomado como controles positivos (es probable que a mayor tiempo de seguimiento sea más difícil encontrar positivos para GFP).

Otro control negativo que se utilizó fue el tejido cardíaco perteneciente al grupo control, grupo al que no se realizó ningún trasplante celular.

La búsqueda de paMSC marcadas con GFP se realizó con el anticuerpo primario contra esta proteína (anti-GFP; anticuerpo policlonal obtenido en conejo, Cat. nº ab290, Abcam) a una dilución 1/200 dejándolo actuar durante 1 hora. Como anticuerpos secundarios se utilizaron varios (indicados a continuación), con el fin de poder identificar mejor este tipo de células tras un mes de seguimiento:

- $\alpha$  Rabbit Alexa 568 a una dilución 1/800 (Cat. nº A7900, Sigma).
- $\alpha$  Rabbit Biotinilado a una dilución 1/100 (Cat. nº. ab6720, Abcam) y como fluoróforos:
  - Cy3-Streptavidina a una dilución 1/600 (Cat. nº 43-4315).
  - FITC-Streptavidina a una dilución 1/600 (Cat. nº 43-4311).

Todas las muestras se montaron con el medio Vectashield® (Cat. nº H-1500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), el cual lleva incorporado el DAPI para la tinción de los núcleos.

## **15. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows (SpSS inc., Chicago, Illinois). Las variables que se analizaron fueron las siguientes:

- Variables hemodinámicas: Fracción de eyección, gasto cardíaco, volumen de eyección sistólico, frecuencia cardíaca, y área infartada.
- Marcadores cardíacos: Troponina I (TnI), Creatina kinasa miocárdica (CKMB) y Mioglobina (Myo).
- Variables histológicas: Grado de inflamación, fibrosis y formación de nuevos vasos (neovascularización).

Cada una de las variables previamente indicadas, se describieron mediante la media  $\pm$  desviación estándar (SD). Los resultados obtenidos se han comparado y analizado empleando un test de ANOVA para medidas repetidas, seguido de un test de Tukey para todas las variables, con la excepción de las relativas al estudio histológico. Se han comparado todos los tratamientos entre ellos a los diferentes tiempos de seguimiento. En el caso de las variables del estudio histológico se ha realizado un test no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente, para ver diferencias entre grupos, se ha realizado un test de Mann-Whitney. Los valores de  $p < 0.05$  se han considerado estadísticamente significativos.



## Resultados





## 1. Aislamientos, cultivo y expansión celular

El aislamiento de las células madre adultas procedentes de tejido adiposo de cerdo (paMSC), se realizó según los protocolos de aislamiento de MSC en humanos y especie porcina. Los rendimientos obtenidos en cada uno de los aislamientos (Tabla 1 de *Material y Métodos*) se realizaron tomando como referencia los recuentos en pase 1. Dichos recuentos iniciales se consideraron orientativos, y se prefirió tener en cuenta los resultantes tras el primer pase, donde también se pierden muchas células teniendo en cuenta la difícil tripsinización de las células sembradas inicialmente (Figura 1).

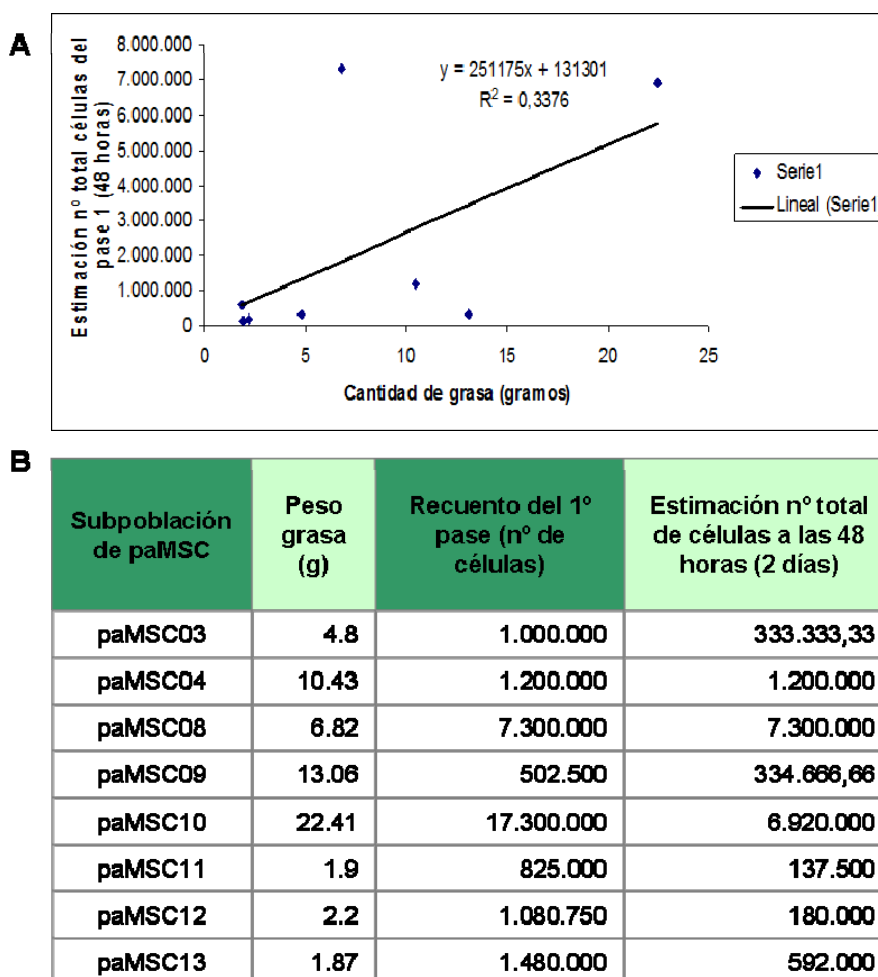


Figura 1. Gráfico (A) y tabla (B) de rendimientos obtenidos con cada uno de los aislamientos.

Los análisis de detección de micoplasma, llevados a cabo en cada uno de los aislamientos, resultaron negativos en todos los casos.

Tras los aislamientos celulares y la comprobación de ausencia de micoplasma en cultivo, que pudieran interferir en el desarrollo de los experimentos, se procedió a hacer un estudio del crecimiento de los cultivos a varias concentraciones, que establecieron las condiciones más favorables para la expansión de las distintas poblaciones.

## Resultados

Los datos del número total de células, a cada una de las concentraciones analizadas (con las medias de cada uno de los recuentos), se muestran en la Figura 2. En este gráfico se observa la evolución obtenida en el crecimiento celular a diferentes densidades de siembra. Se aprecia que tras 17 días en cultivo, las células sembradas a una menor concentración multiplican por 10 el número de las sembradas inicialmente. Por el contrario, en el caso de las sembradas a una mayor concentración, el número de células totales obtenidas, transcurrido el tiempo de estudio, es 3 veces el número de células sembradas el primer día.

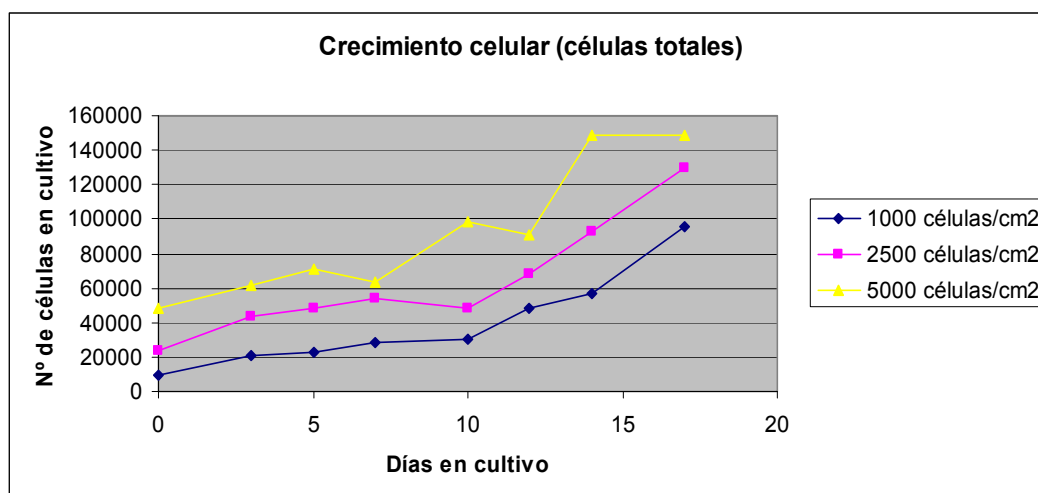


Figura 2. Estudio del crecimiento celular en número de células totales de los cultivos de paMSC llevados a cabo a distintas concentraciones. Los cultivos se mantuvieron sin realizar ningún pase a lo largo de los 17 días que duró el seguimiento.

De este modo se estimaron las tendencias de crecimiento a cada una de las concentraciones (Figura 3), y aunque los rendimientos obtenidos fueron mejores en el caso de las paMSC sembradas a 1000 células/cm<sup>2</sup>, se decidió establecer la de 5000 células/cm<sup>2</sup> en las condiciones de siembra, con el fin de obtener el mayor número de células en el menor tiempo posible.

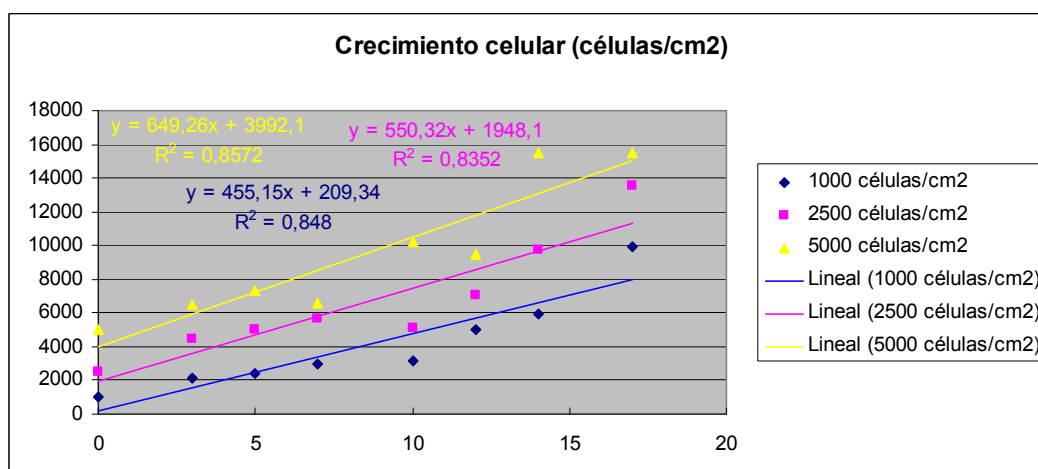
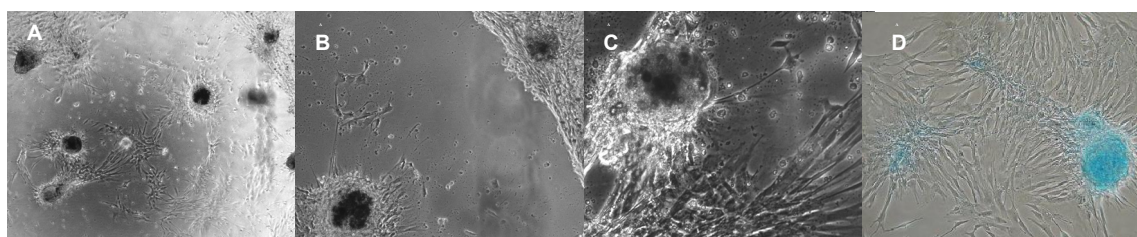


Figura 3. Tendencias de crecimiento a distintas concentraciones de células paMSC en cultivo en pase 1. El gráfico indica el crecimiento celular en nº de células/cm<sup>2</sup>.

Una de las observaciones realizadas durante el proceso de expansión celular, es la dificultad encontrada en la tripsinización de los cultivos durante los primeros pases, dificultad que disminuye conforme avanzamos en el número de pases. Este hecho podría estar relacionado con una variación en la presencia de moléculas de adhesión de las células en cultivo. Por otra parte, no sólo era importante determinar la concentración a la que las células tenían una mayor velocidad de crecimiento, también se estudió el efecto que provocaba sobre ellas la confluencia a la que podían llegar antes de realizar el siguiente pase. Por ello se dejaron los cultivos creciendo de manera indefinida para observar su comportamiento.

En los cultivos, una vez superada su confluencia adecuada (80% de confluencia), puede que o las células acaben levantándose de los soportes de cultivo por la falta de espacio, o bien inicien procesos de diferenciación espontánea, tal y como se observa en la Figura 4. Las células comenzaron a formar los conglomerados característicos de una incipiente diferenciación condrogénica que se confirmó con la tinción con Alzian blue que pone de manifiesto la producción de matriz cartilaginosa.



**Figura 4. Proceso de diferenciación espontánea al mantener los cultivos a una elevada confluencia. A, B y C:** Diferenciación espontánea observada al microscopio a 4X, 10X y 20X respectivamente. En D se pone de manifiesto la producción de matriz cartilaginosa con la tinción con Alzian blue.

Por todo esto la determinación de las condiciones óptimas de cultivo es un aspecto fundamental para conseguir mantener los cultivos en un estado similar al momento del aislamiento. Dada su capacidad de diferenciación, característica fundamental de este tipo de células, la optimización de condiciones como la concentración de siembra así como evitar una alta confluencia en los cultivos en el proceso de expansión es determinante para conseguir la dosis adecuada en las mejores condiciones posibles.

Para la conservación y almacenamiento de las células se llevaron a cabo los procedimientos de congelación/descongelación habituales. La viabilidad media observada, tras los procesos de congelación/descongelación habituales mediante exclusión con azul de tripán, fue de un 97% en la mayoría de los casos.

## 2. Caracterización de las paMSC

Dado que los estudios que se han llevado a cabo han sido realizados sobre líneas celulares primarias, o lo que es lo mismo desde aislamientos primarios de las líneas celulares

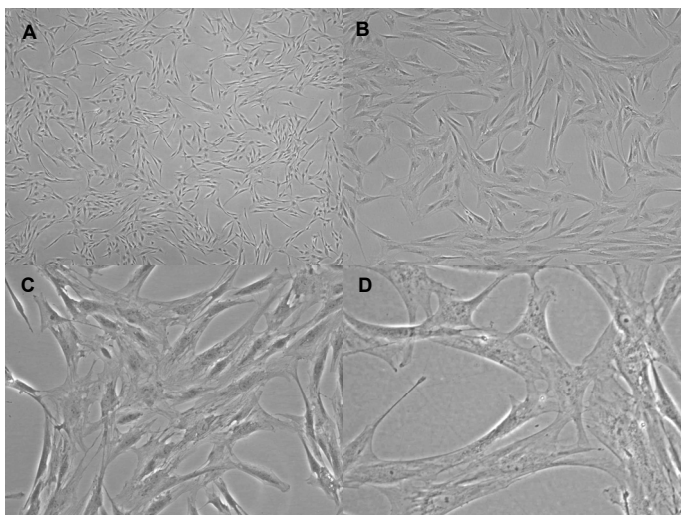
## Resultados

objeto de estudio. Por esto, se hace necesaria una caracterización celular y molecular que nos permita identificarlas así como comparar, en futuros estudios, nuestros resultados con los de otras líneas celulares (la misma línea en diferentes especies o bien diferentes líneas celulares de una misma especie), así como con los obtenidos por otros grupos y por tanto aportar datos que nos permitan avanzar y profundizar en el conocimiento de las células madre y en concreto de las MSC.

### 2.1. Caracterización celular

#### 2.1.1. Evaluación morfológica

Las MSC son células que se adhieren al plástico cuando se cultivan y adquieren una morfología fibroblástica. La adherencia de las paMSC a la placa de cultivo, quedó establecida en el momento de su aislamiento, puesto que sólo aquellas células adherentes son seleccionadas para su cultivo. Pudimos confirmar que el tamaño de este tipo de células oscila entre  $10\mu\text{m}$  y  $15\mu\text{m}$  (Figura 5).

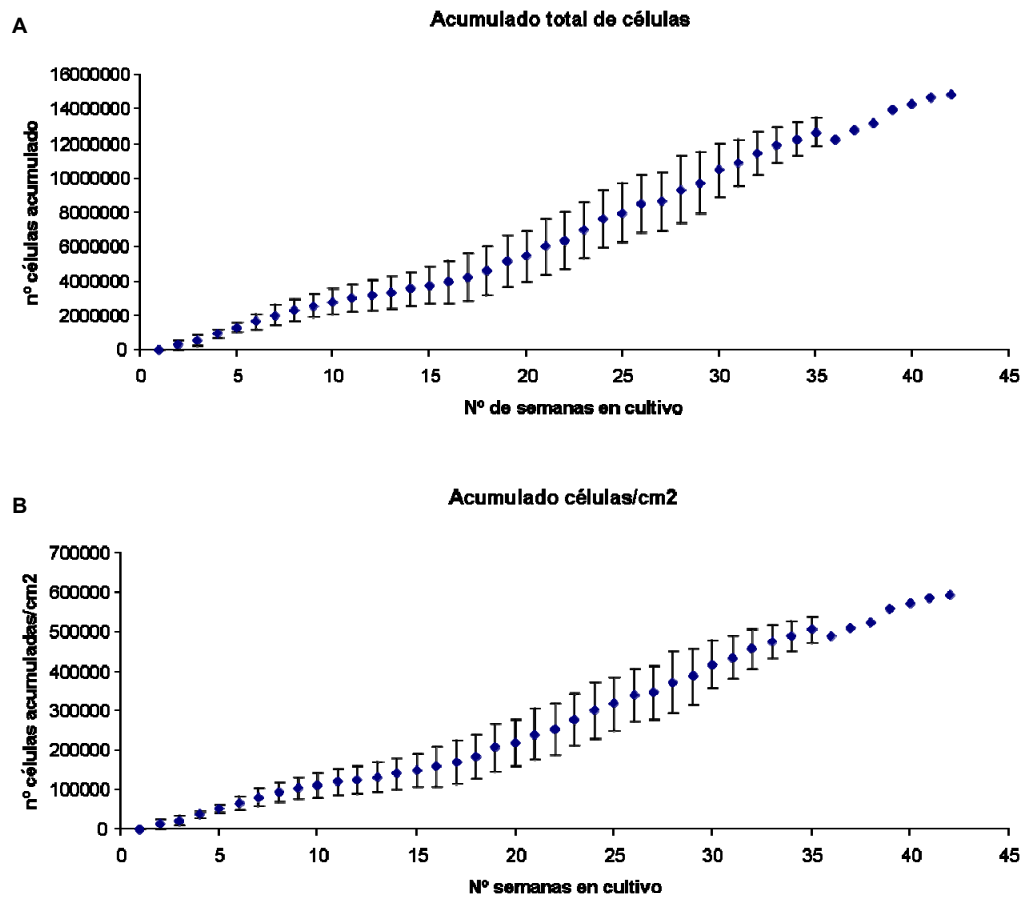


**Figura 5. Morfología de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo porcino.** Las células se adhieren a la superficie de plástico y después de una semana de cultivo adquieren una morfología fibroblástica. (Imágenes tomadas bajo contraste de fases; **A:** a 4X; **B:** a 10X; **C:** a 20X; **D:** a 40X).

#### 2.1.2. Estudio del crecimiento celular: curvas de crecimiento

Por otra parte, una de las características de las células madre es su capacidad para autorenovarse, es decir, la capacidad para obtener en sus divisiones copias idénticas a ellas mismas. Esta característica permite expandirlas fácilmente en cultivo por lo que se realizó un seguimiento a largo plazo mediante curvas de crecimiento que nos permitieran estudiar distintos parámetros.

Los estudios de crecimiento celular se llevaron a cabo con una  $n=4$  correspondiente a 4 subpoblaciones diferentes. En cada subpoblación los recuentos se hicieron por duplicado y se analizó el número de células totales acumulado, observándose que la densidad aumentaba ligeramente con el paso del tiempo (al estimar el número de células/ $\text{cm}^2$  de cada recuento) (Figura 6).



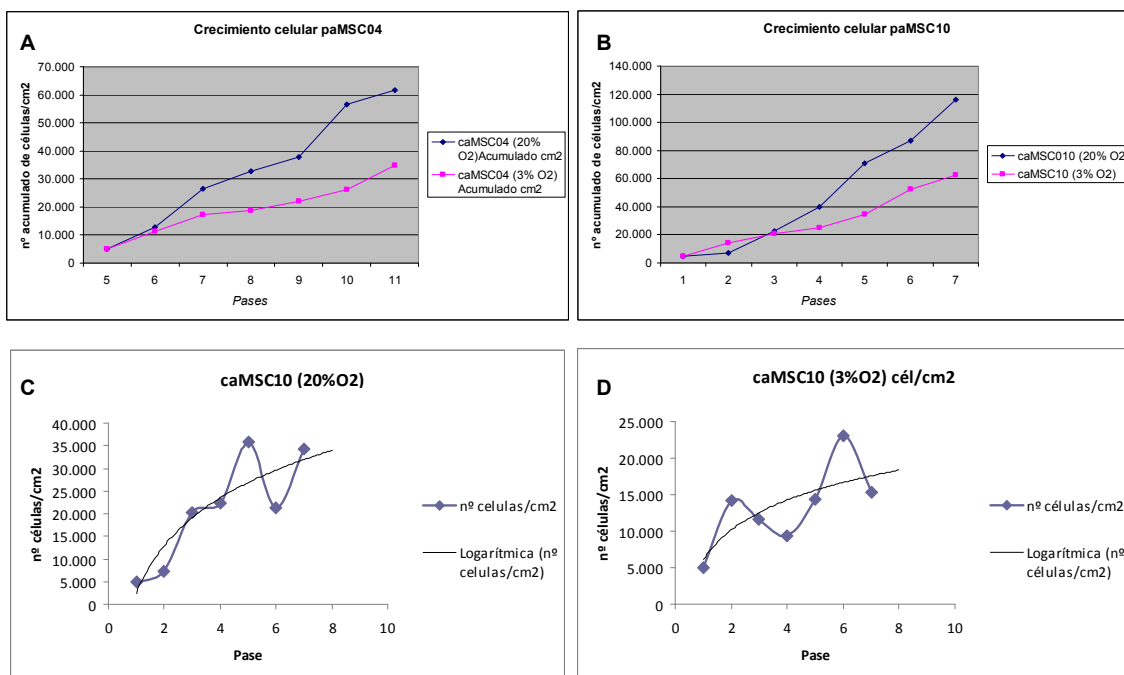
**Figura 6. Curvas de crecimiento de paMSC de 4 subpoblaciones a 5000 células/cm<sup>2</sup> (125.000 células totales).** El estudio se realiza sobre el número total de células acumulado (**A**) y el número de células acumulado/cm<sup>2</sup> (**B**) manteniendo los cultivos durante 35 semanas de seguimiento.

Los resultados finales son los obtenidos con la media de los recuentos de cada una de las subpoblaciones celulares, comportándose todas ellas de la misma manera después de más de 35 semanas en cultivo. Estos resultados corresponden a unas condiciones de cultivo de 37°C y 5% CO<sub>2</sub> manteniendo las mismas a un 20% de O<sub>2</sub> (condiciones habituales de los incubadores).

En los estudios comparativos de crecimiento celular variando las condiciones de O<sub>2</sub>, se analizaron las subpoblaciones paMSC04 y paMSC10 inicialmente y la paMSC10 y paMSC11 meses más tarde, al repetir el experimento con un mayor número de pases.

En el primer caso los cultivos se mantuvieron durante 7 pases y se estudió la tendencia en el crecimiento bajo ambas condiciones (20% de O<sub>2</sub> y 3% de O<sub>2</sub>) realizando siempre los recuentos de forma paralela en el tiempo (Figura 7).

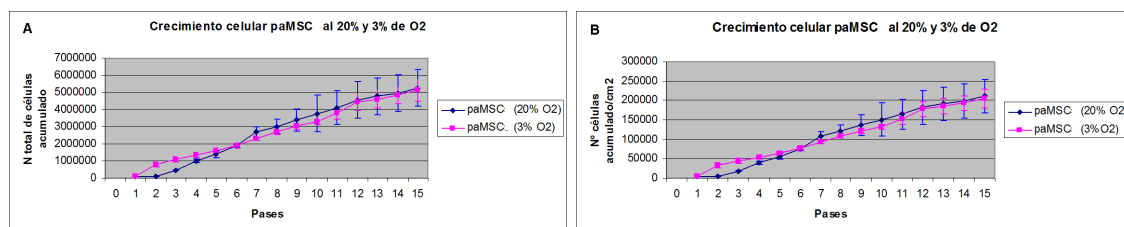
## Resultados



**Figura 7. Estudio del crecimiento celular bajo diferentes condiciones de O<sub>2</sub> de las subpoblaciones paMSC04 y paMSC10.** Crecimiento celular de las subpoblaciones paMSC04 (A) y paMSC10 (B) en condiciones de cultivo al 20% O<sub>2</sub> (en azul) y al 3% de O<sub>2</sub> (en rosa) sembradas a una concentración de 5000 células/cm<sup>2</sup>. En los gráficos C y D se muestran las líneas de tendencia correspondiente al crecimiento de la subpoblación caMSC10 con el número de pases variando las condiciones de O<sub>2</sub>.

Los resultados pusieron de manifiesto el comportamiento de las células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo porcino al modificar el % de O<sub>2</sub> en las condiciones de cultivo, observándose un mayor crecimiento celular entre el pase 4 y el pase 7 en ambas subpoblaciones al mantener las condiciones habituales (20% de O<sub>2</sub>).

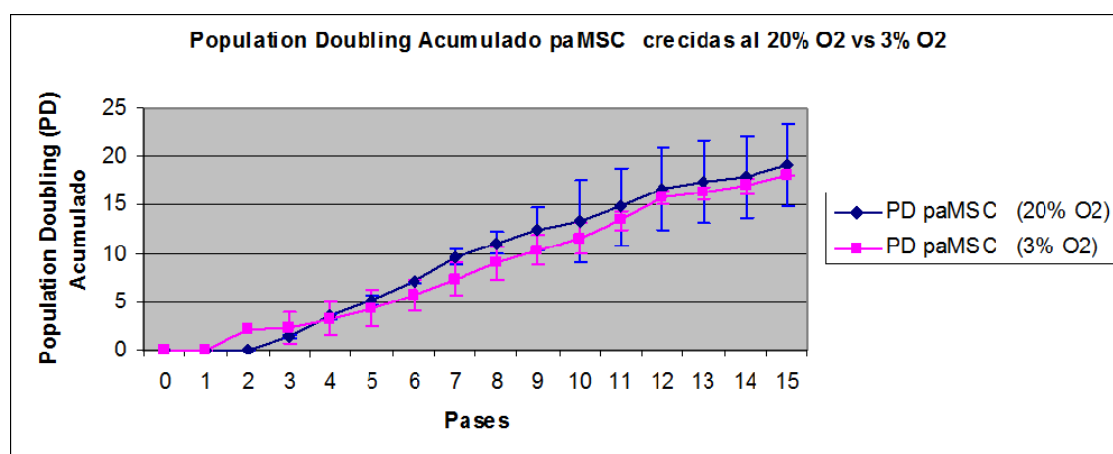
En estudios posteriores se analizaron las subpoblaciones paMSC10 y paMSC11 manteniendo los cultivos durante 15 pases, estudiando la tendencia en el crecimiento bajo ambas condiciones (20% de O<sub>2</sub> y 3% de O<sub>2</sub>) y realizando siempre los recuentos de forma paralela en el tiempo (Figura 8).



**Figura 8. Crecimiento celular bajo diferentes condiciones de O<sub>2</sub>.** Media de los resultados obtenidos en los estudios de crecimiento celular de las subpoblaciones paMSC10 y paMSC11 en condiciones de cultivo al 20% O<sub>2</sub> (en azul) y al 3% de O<sub>2</sub> (en rosa) sembradas a una concentración de 5000 células/cm<sup>2</sup>. En los gráficos se muestran tanto el número total de células acumuladas en cada pase (A) como el número de células acumuladas/cm<sup>2</sup> (B).

Estos resultados confirman lo observado previamente con las subpoblaciones paMSC04 y paMSC10. Además se muestra como, a partir del pase 11, el crecimiento celular bajo condiciones del 3% de O<sub>2</sub> se va igualando con el obtenido en condiciones habituales (20% de O<sub>2</sub>), siendo casi inapreciables las diferencias existentes durante los últimos pases analizados.

En la Figura 9 se representa otro de los parámetros estudiados que resulta imprescindible en los análisis del crecimiento celular. Este parámetro es el PD (del inglés *Population Doubling*) o tiempo de duplicación y nos indica el número de veces que las células se duplican en cada uno de los pases.



**Figura 9.** *Population Doubling* acumulado de las subpoblaciones paMSC10 y paMSC11. En el gráfico se muestra la media de los resultados de ambas subpoblaciones en condiciones de cultivo al 20% de O<sub>2</sub> (en azul) y al 3% de O<sub>2</sub> (en rosa) sembradas a una concentración de 5000 células/cm<sup>2</sup>.

Todos estos resultados pusieron de manifiesto que el comportamiento que se observa en la paMSC presenta una tendencia de crecimiento similar en ambas condiciones (20% de O<sub>2</sub> vs 3% de O<sub>2</sub>), siendo incluso ligeramente superior en el caso del grupo de células que fueron expuestas a un 20% de O<sub>2</sub> en su crecimiento.

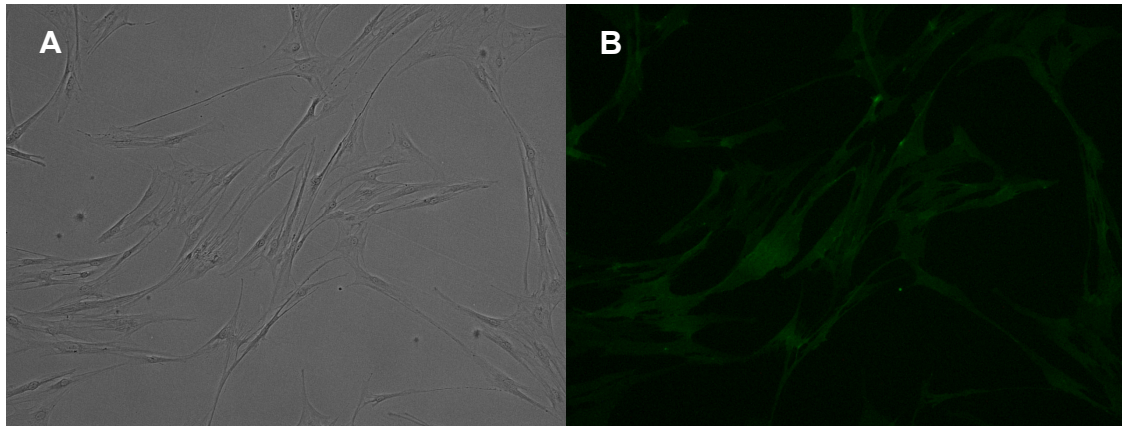
Con estos estudios pudimos establecer finalmente las condiciones óptimas de cultivo (crecimiento celular al 20% de O<sub>2</sub> y sembradas a una densidad de 5000 células/cm<sup>2</sup>) con las que llevar a cabo las expansiones celulares para la producción de las células que posteriormente se trasplantaron en los distintos grupos de estudio en el modelo porcino.

### 2.1.3. Inmunocitoquímica/Inmunofluorescencia

Antes de analizar los marcadores de superficie que expresaban las subpoblaciones celulares y evaluar la expresión de las proteínas detectadas por citometría de flujo, se comprobó que el marcaje mediante la tinción de las células previamente fijadas era eficaz con técnicas inmunofluorescentes y análisis por microscopía como se muestra en la Figura 10.



## Resultados

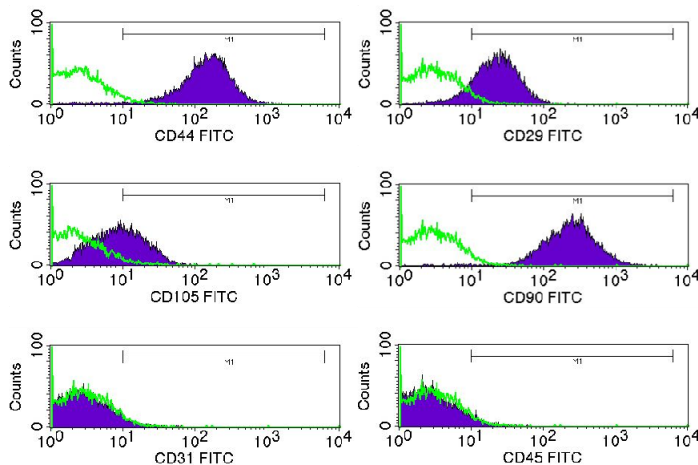


**Figura 10. Inmunocitoquímica de paMSC contra CD44.** Células de la subpoblación paMSC10 marcadas con el anticuerpo de superficie CD44 y visualizadas por contraste de fases a 10X en **A** y por fluorescencia en **B**.

Tal y como se aprecia en la imagen B, la fluorescencia verde observada muestra la expresión del marcador de superficie CD44, característico de este tipo de células, confirmando por tanto la eficacia de la técnica inmunocitoquímica realizada.

### 2.1.4. Análisis inmunofenotípico

Los estudios llevados a cabo para la determinación del fenotipo de la población celular aislada, muestran que las células analizadas son positivas a los marcadores de superficie CD90 y CD105, y negativas para CD45. El panel de marcadores positivos se completó con los antígenos CD44 y CD29, así como el antígeno negativo CD31, que demuestran la identidad de las paMSC aisladas (Figura 11).



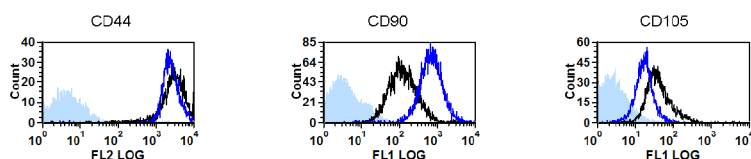
**Figura 11. Estudio inmunofenotípico de las paMSC.** El análisis del inmunofenotipo de las paMSC de las subpoblaciones celulares aisladas coincide con el establecido por la ISCT. La imagen muestra la intensidad de fluorescencia de cada uno de los antígenos señalados comparada con su correspondiente isotipo.

Además, en el estudio comparativo entre las paMSC y las células madre cardíacas de origen porcino (pCSC) se analizó un panel de anticuerpos con el fin de establecer varios parámetros. Por un lado, el análisis de marcadores de superficie que determinan la identidad de células madre, como son CD44, CD90 o CD105, resultó positivo para ambas líneas celulares. Otros marcadores identificativos serían CD29 o CD166, SSEA-1 y CD73, pero son necesarios

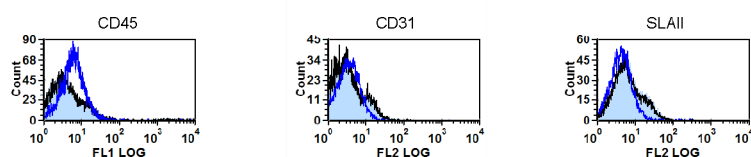


anticuerpos específicos anti-pig. Por otro lado, la pureza se corroboró con la ausencia de los marcadores de superficie CD45, CD31 y SLAI (Figura 12).

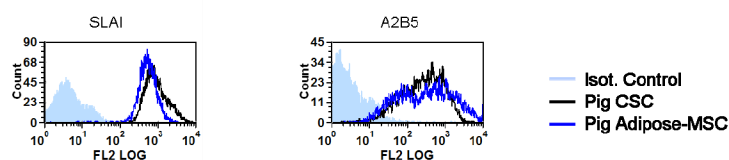
#### Identidad: expresión de marcadores de superficie en pCSC y paMSC.



#### Pureza: expresión de marcadores de superficie en pCSC y paMSC.



#### Expresión de otros marcadores de superficie en pCSC y paMSC.



**Figura 12. Análisis inmunofenotípico comparativo de paMSC y pCSC.** Imágenes en las que se muestran los estudios comparativos del fenotipo de las células paMSC y pCSC donde se observa la similitud de ambas líneas celulares.

La comparación de otros marcadores de superficie como SLAI y A2B5 reflejó la presencia de ambos en los dos tipos celulares, aunque también sería interesante buscar anticuerpos específicos anti-pig de CD34 y CD19.

Las únicas diferencias que se encontraron fueron en la intensidad de expresión de las moléculas CD90 y CD105. En las paMSC, la intensidad que presenta el CD90 es superior a la presentada en las pCSC. Por el contrario, en el caso del CD105 esta intensidad es ligeramente inferior que en las pCSC.

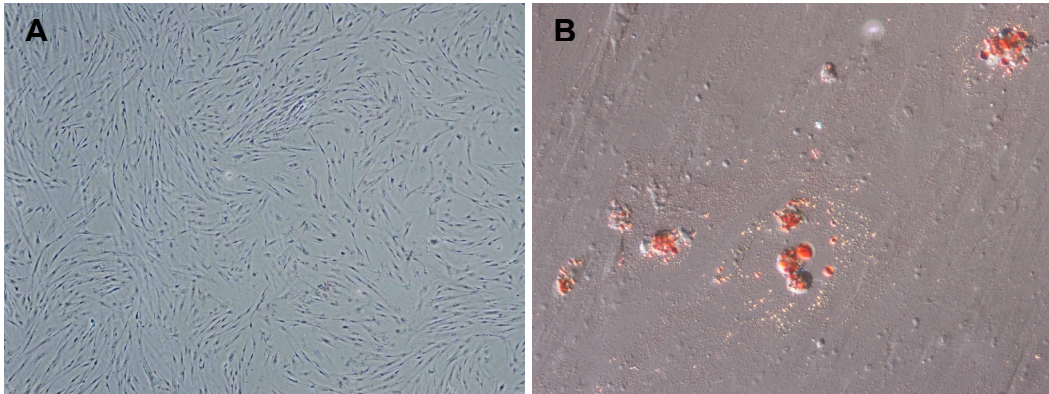
#### **2.1.5. Determinación de la multipotencialidad de las paMSC (capacidad de diferenciación)**

Para determinar la multipotencialidad de las paMSC utilizadas en este estudio, se han realizado estudios de diferenciación hacia tres linajes celulares: adipocitos, condrocitos y osteocitos.

La identificación del nuevo fenotipo se llevó a cabo mediante observación microscópica con tinciones diferenciales. Así, la presencia de acúmulos lipídicos intracelulares (teñidos de rojo), característicos de la diferenciación adipogénica, se confirmó tras la tinción positiva con Oil

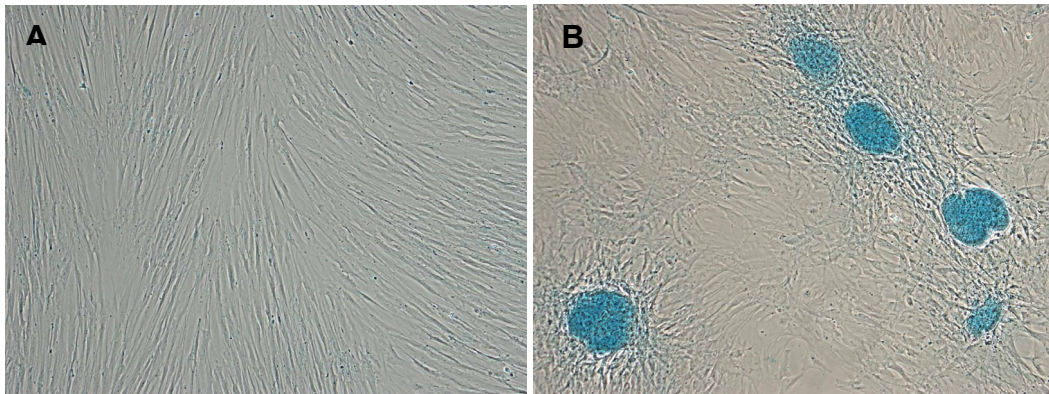
## Resultados

Red-O de las células crecidas con medio específico de diferenciación, como se muestra en la Figura 13.



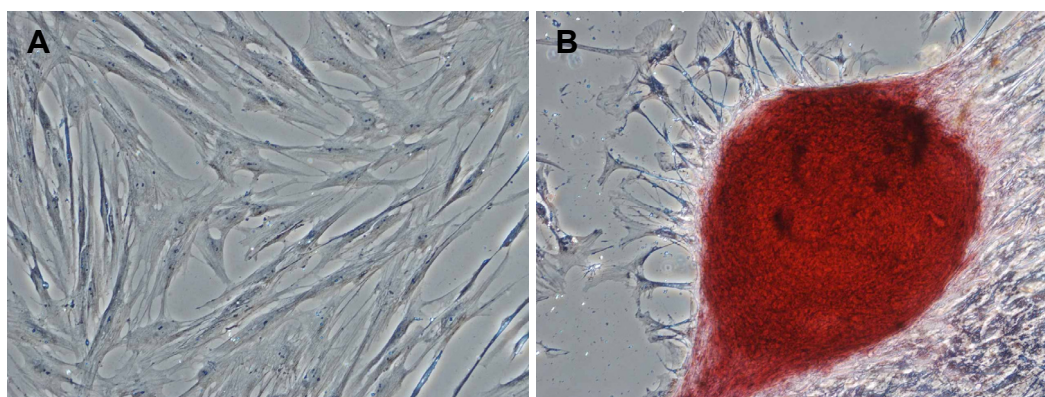
**Figura 13. Capacidad de diferenciación adipogénica.** Imágenes de paMSC visualizadas por microscopía de contraste de fases que muestran su capacidad de diferenciación adipogénica. Todas las células corresponden a la subpoblación paMSC13 en fase 2 crecidas al 20% de O<sub>2</sub>. **A:** Células crecidas con su medio habitual y utilizadas como control negativo del experimento visualizadas con un aumento de 4X. **B:** Células crecidas con medio específico de diferenciación adipogénica y visualizadas bajo DIC (*Differential Interferente Contrast*) a 40X.

La evaluación del fenotipo condrogénico se confirmó mediante la tinción positiva con Alzian blue, que pone de manifiesto la producción de matriz cartilaginosa (en azul) como se observa en la Figura 14.



**Figura 14. Capacidad de diferenciación condrogénica.** Imágenes de paMSC visualizadas por microscopía de contraste de fases que muestran su capacidad de diferenciación condrogénica. Las células corresponden a la subpoblación paMSC13 en fase 2 crecidas al 20% de O<sub>2</sub>. **A:** Células crecidas con su medio habitual y utilizadas como control negativo del experimento visualizadas con un aumento de 10X. **B:** Células crecidas con medio específico de diferenciación condrogénica visualizadas a 10X.

Por último, el fenotipo osteogénico se comprobó mediante tinción con Alzian Red-S, que permite observar en rojo los depósitos de matriz ósea mineralizada (Figura 15).



**Figura 15. Capacidad de diferenciación osteogénica.** Imágenes de paMSC13 en fase 2 crecidas al 20% de O<sub>2</sub> visualizadas por microscopía de contraste de fases que muestran su capacidad de diferenciación osteogénica. **A:** Células crecidas con su medio habitual y utilizadas como control negativo del experimento. **B:** Células crecidas con medio específico de diferenciación osteogénica (ambas imágenes visualizadas a 20X).

La capacidad de diferenciación de estas células se puso de manifiesto con los resultados positivos a las tinciones anteriormente descritas. Para confirmar esta característica fundamental de las “células stem” posteriormente se corroboraron estos resultados con los estudios moleculares que se describen en el Apartado 2.2 *Caracterización molecular*.

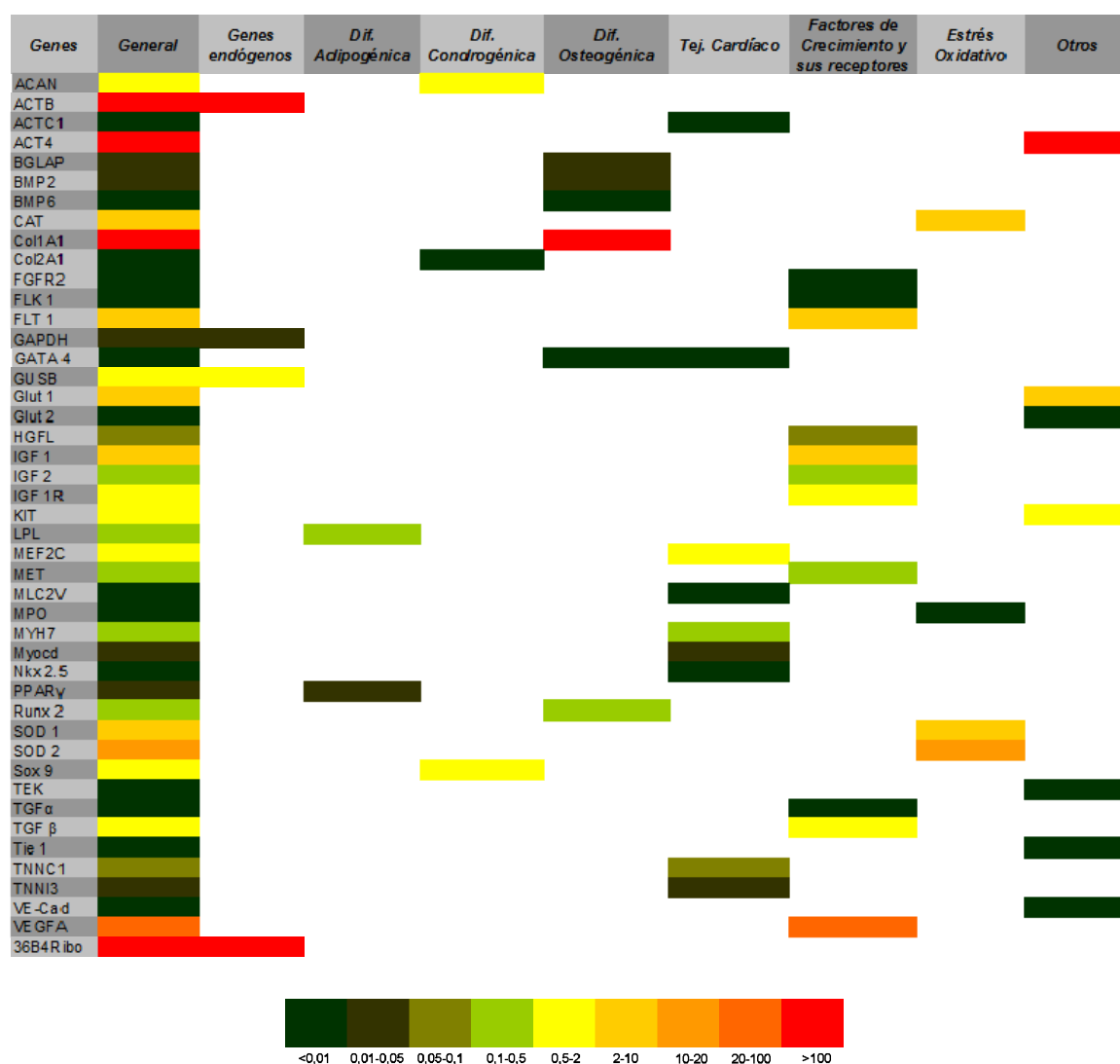
## 2.2. Caracterización molecular

### 2.2.1. Análisis de expresión génica de las paMSC

Del mismo modo que en el caso de la caracterización celular, cuatro subpoblaciones de las células paMSC fueron analizadas en sus pases tempranos (Pase 3) para un estudio molecular con los genes objeto de estudio mediante Q-RT-PCR. La cantidad relativa de mRNA se calculó como  $2^{(-\Delta Ct)}$  donde  $\Delta Ct$  es el valor normalizado respecto al gen endógeno de referencia GUSB.

En los resultados obtenidos (Figura 16), se observa una elevada expresión basal de los genes endógenos ACTB y 36B4Ribo mientras que la media de los de GAPDH se encuentra entre 0.01 y 0.05 con valores independientes algo inestables. En base a estos resultados se decidió utilizar como gen de referencia endógeno GUSB, que nos permitió obtener valores relativos más coherentes. Los marcadores relacionados con los procesos de diferenciación muestran, por lo general, valores relativos bajos (0-0.5) a excepción de Col1A1 ( $\approx 100$ ), ACAN y Sox9 (0.5-2). En los marcadores específicos de tejido cardíaco se observan valores relativos inferiores a 2 en todos los casos, mientras que los relacionados con diversos factores de crecimiento y sus receptores se aprecia una gran variabilidad en los resultados, siendo VEGF en factor de crecimiento que se expresa en mayor medida de forma basal. Por otro lado, los marcadores implicados en los procesos de estrés oxidativo presentan valores relativamente altos (2-20) a excepción de la expresión de MPO que es casi inapreciable.

## Resultados

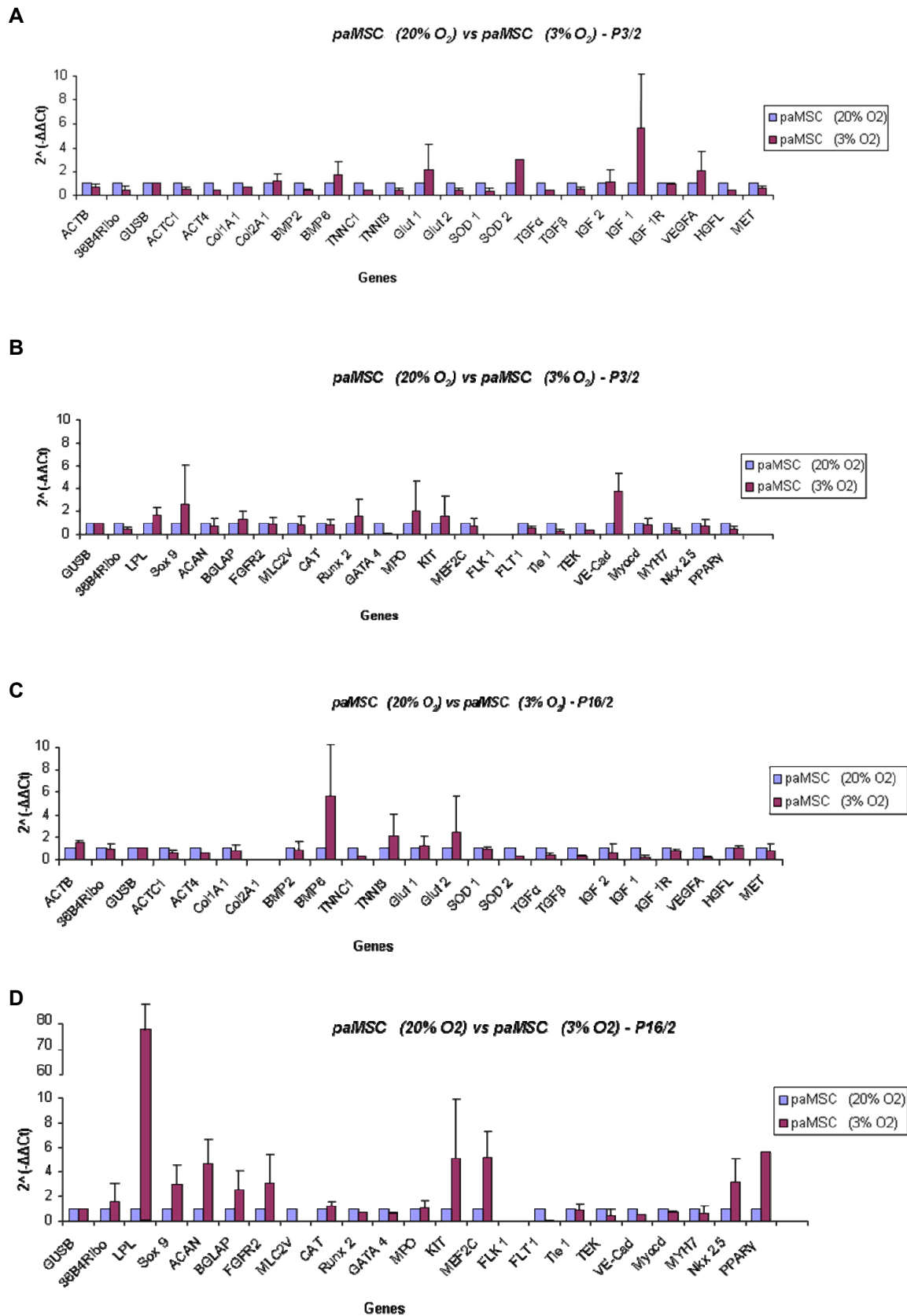


**Figura 16. Patrón de expresión génica de las células paMSC obtenido mediante Q-RT-PCR.** En la escala de colores se muestran los rangos de valores correspondientes a cada color en función de la expresión relativa. Las cuatro subpoblaciones de paMSC analizadas se encontraban en fase 3 y los resultados corresponden al valor promedio de todos los obtenidos.

Del mismo modo que en la caracterización celular, se analizaron las posibles variaciones que se pudieran presentar a nivel molecular variando las condiciones de  $O_2$  en el crecimiento celular de los cultivos.

En este experimento se compararon las diferencias producidas en los niveles de expresión génica de las paMSC ( $n=2$ ) crecidas en paralelo y sometidas a diferentes condiciones de  $O_2$  en su crecimiento (20% de  $O_2$  vs 3% de  $O_2$ ). Los gráficos que se muestran en la Figura 17 analizan tanto los resultados obtenidos en fases iniciales (P3) como en fases más avanzadas (P16). En este caso, la cantidad relativa de mRNA se calculó como  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  donde  $\Delta\Delta Ct$  es el valor normalizado respecto a una muestra control. Como control se utilizó la expresión del gen endógeno GUSB y en todos los casos los valores se normalizaron respecto a los cultivos sometidos a un 20% de  $O_2$  en su crecimiento.





**Figura 17. Perfil de expresión génica de las paMSC bajo diferentes condiciones de O<sub>2</sub>.** Los gráficos **A** y **B** muestran los análisis de expresión por Q-RT-PCR de las paMSC en pases iniciales (P3) mientras que en **C** y **D** los resultados corresponden a pases más avanzados (P16).

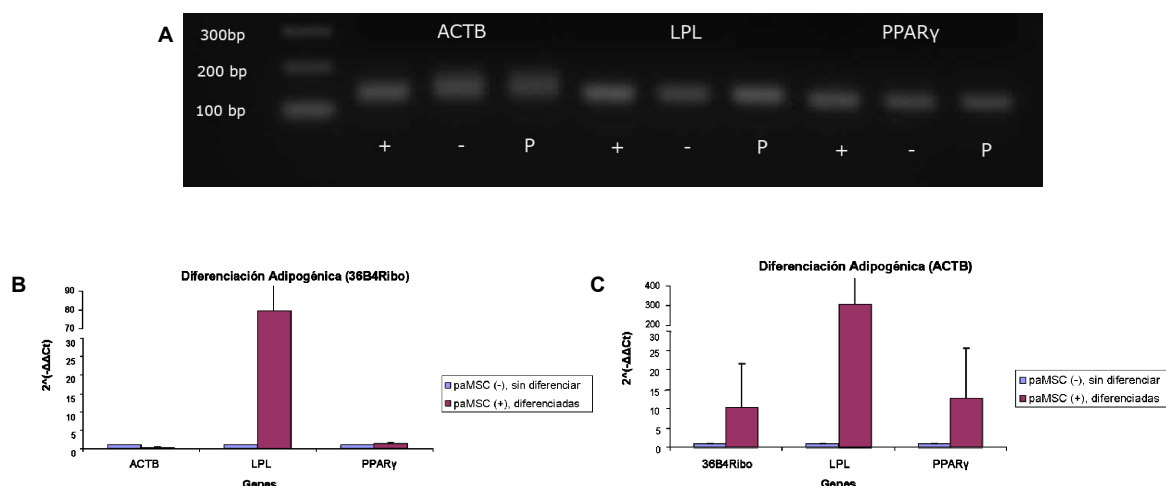
## Resultados

Por lo general, el perfil de expresión de las paMSC no se ve afectado en gran medida durante los pases iniciales al disminuir los niveles de O<sub>2</sub> en las condiciones de crecimiento. A pesar de esto, algunos marcadores se ven ligeramente aumentados como BMP6, SOD2, VEGFA, LPL, Sox9, BGLAP, Runx2, MPO, KIT o VE-Cad. El factor de crecimiento IGF1 presenta un aumento mayor, aunque es importante señalar la variabilidad en los resultados observados de forma independiente. Sin embargo, las diferencias encontradas se hacen más evidentes al analizar estos resultados en pases más avanzados (P16/2). Así, se observa un claro aumento en los niveles de BMP6, Glut2, LPL, Sox9, ACAN, BGLAP, FGFR2, KIT, MEF2C, Nkx2.5 y PPAR $\gamma$ . Este aumento en la expresión es algo más ligero en genes como TNN3 y SOD1. No obstante, los valores de algunos genes en pases altos se ven ligeramente disminuidos respecto a la observada al 20% de O<sub>2</sub>, como en el caso de SOD2 o IGF1R. Las diferencias encontradas en los niveles de aquellos marcadores que ven disminuida su expresión al pasar del 20% al 3% de O<sub>2</sub> también se presentan al comparar pases altos y bajos. Tal es el caso de los factores de crecimiento IGF1 y VEGFA donde no sólo hay una disminución de los valores al reducir los niveles de O<sub>2</sub> en pase 16. Además, esta reducción es mucho mayor si lo comparamos con los valores obtenidos en pases iniciales, donde sus niveles estaban aumentados en las mismas condiciones. Por lo tanto, las diferencias encontradas en el patrón de expresión de todos los marcadores analizados, no sólo se ven afectadas al disminuir el % de O<sub>2</sub> en las condiciones de cultivo, sino que estas diferencias se hacen más notables al aumentar en el número de pase.

### 2.2.2. Análisis de expresión génica en los estudios de diferenciación de las paMSC

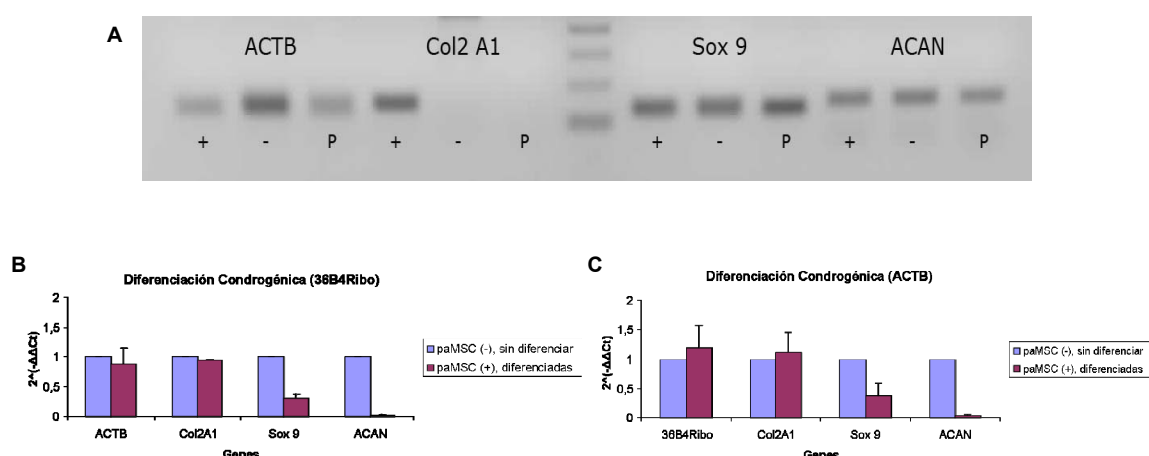
Los estudios moleculares de expresión génica con los marcadores de diferenciación hacia los linajes adipogénico (PPAR- $\gamma$  y LPL), condrogénico (Col2A1, ACAN, Sox-9) y osteogénico (Runx-2, BMP-2, BMP-6, GATA-4, Col1A1 y BGLAP que es equivalente a la osteocalcina en humanos), y cuya expresión y/o activación es necesaria para el compromiso y progresión de cada vía de diferenciación en particular, confirmaron la multipotencialidad de las paMSC.

En un análisis rápido estándar por RT-PCR semicuantitativa, parece que hay un aumento de algunos genes (no todos) cuando las células se crecen en medio de diferenciación respecto a las crecidas en medio habitual. Tal es el caso de la LPL y la PPAR- $\gamma$  en la diferenciación adipogénica (Figura 18), Sox-9 y ACAN en la diferenciación condrogénica (Figura 19), o Col1A1 y Runx-2 en la diferenciación osteogénica (Figura 20), teniendo siempre en cuenta la normalización de la ACTB.



**Figura 18. Estudio molecular de la capacidad de diferenciación adipogénica.** **A:** Patrón de expresión de los genes ACTB (tomado como gen de referencia), LPL y PPAR $\gamma$  tras electroforesis en gel de agarosa. Las muestras utilizadas como control positivo (+) corresponden a cDNA obtenido de tejido adiposo subcutáneo de modelo porcino, las negativas (-) a las células paMSC cultivadas con su medio habitual y las muestras problema (P) corresponden a cDNA obtenidos de las células crecidas con el medio de diferenciación adipogénico. En las figuras **B** y **C** se representan los estudios cuantitativos tomando como referencia los genes endógenos 36B4Ribo y ACTB respectivamente. En ambos casos la cuantificación se realizó de las muestras crecidas en el medio de diferenciación adipogénico respecto a las muestras crecidas en su medio habitual.

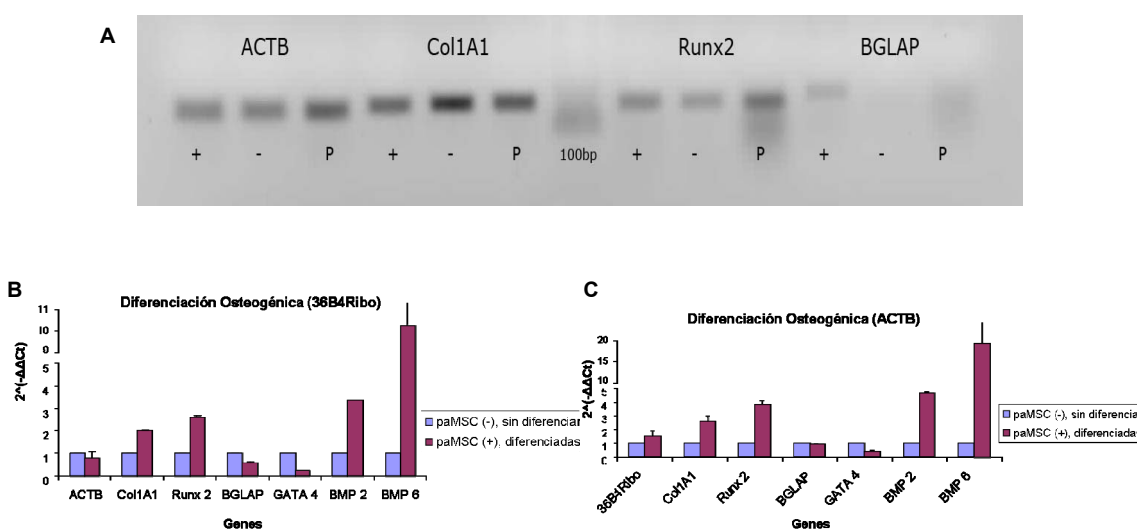
Aunque en algunos genes se ha visto una ligera sobreexpresión, con otros se han tenido problemas a la hora de sacar conclusiones mediante las técnicas convencionales. Podemos decir, por tanto, que la metodología empleada en el caso de los análisis cualitativos (Figuras 18A, 19A y 20A) son un análisis de datos previo al análisis cuantitativo que se realizó posteriormente. Ha de tenerse en cuenta también el hecho de que los cebadores se diseñaron con el objetivo de ser empleados en los estudios por Q-RT-PCR por lo que algunos de ellos no se llegaron a poner a punto en las RT-PCR convencionales, tal es el caso del BMP2, BMP6 y GATA-4 en las diferenciación osteogénica (Figura 20).



**Figura 19. Estudio molecular de la capacidad de diferenciación condrogénica.** **A:** Patrón de expresión de los genes ACTB (tomado como gen de referencia), Col2A1, Sox-9 y ACAN tras electroforesis en gel de agarosa. Las muestras utilizadas como control positivo (+) corresponden a cDNA obtenido de cartílago de modelo porcino, las negativas (-) a las células paMSC cultivadas con su medio habitual y las muestras problema (P) corresponden a cDNA obtenidos de las células crecidas con el medio de diferenciación condrogénico. En las figuras **B** y **C** se representan los estudios cuantitativos tomando como referencia los genes endógenos 36B4Ribo y ACTB respectivamente. En ambos casos la cuantificación se realizó de las muestras crecidas en el medio de diferenciación condrogénico respecto a las muestras crecidas en su medio habitual.

## Resultados

Los análisis por Q-RT-PCR confirmaron lo que en un principio se observó de forma convencional en todos los casos. Cabe destacar el aumento de la LPL y PPAR $\gamma$  en las células sometidas a diferenciación adipogénica en ambas técnicas (cuantitativas y convencionales). Sin embargo, en el caso de los análisis de expresión realizados a los cultivos derivados a linajes condrogénicos no se puede decir lo mismo. A pesar de esto, la capacidad de diferenciación de las paMSC pudo observarse con la tinción directa de las mismas con Alcian blue donde se puso de manifiesto la producción de matriz cartilaginosa.



**Figura 20. Estudio molecular de la capacidad de diferenciación osteogénica.** **A:** Patrón de expresión de los genes ACTB (tomado como gen de referencia), Col1A1, Runx2 y BGLAP tras electroforesis en gel de agarosa. Las muestras utilizadas como control positivo (+) corresponden a cDNA obtenido de hueso de modelo porcino, las negativas (-) a las células paMSC cultivadas con su medio habitual y las muestras problema (P) corresponden a cDNA obtenidos de las células crecidas con el medio de diferenciación osteogénica. En las figuras **B** y **C** se representan los estudios cuantitativos tomando como referencia los genes endógenos 36B4Ribo y ACTB respectivamente. En ambos casos la cuantificación se realizó de las muestras crecidas en el medio de diferenciación osteogénica respecto a las muestras crecidas en su medio habitual.

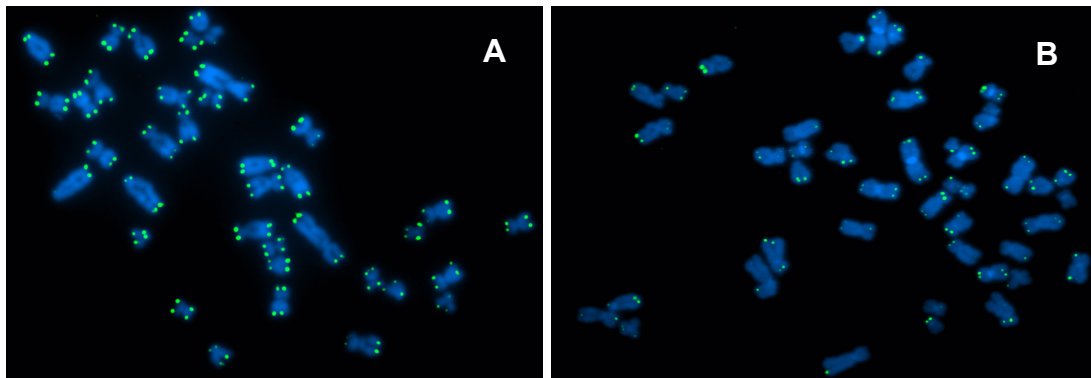
Los análisis moleculares de las células sometidas a diferenciación osteogénica presentaron un aumento importante en genes como BMP2 y BMP6 (que no pudieron estudiarse de forma convencional) respecto a las células sin diferenciar. También se observó una mayor expresión de otros como Runx2 (tal y como se pudo determinar en el gel de agarosa inicialmente) y Col1A1, donde los análisis convencionales no mostraron ese aumento en su expresión de manera clara.

### 2.2.3. Estudio de la estabilidad genética de las paMSC en cultivo

Actualmente estamos realizando el estudio del cariotipo de nuestras células con el objeto de identificar posibles aberraciones cromosómicas que pudieran aparecer con el paso del tiempo así como las diferencias encontradas tanto al variar las condiciones de oxígeno en su crecimiento como en las paMSC utilizadas en los distintos tratamientos (datos no mostrados al estar en desarrollo). Para ello se está utilizando la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH: *Fluorescence in situ Hybridization*) en concreto el FISH telomérico. Finalmente, otro de



los objetivos es poder comparar los resultados obtenidos con los descritos en bibliografía del mismo tipo celular en humano.



**Figura 21. Estudio comparativo del cariotipo de MSC de tejido adiposo porcino y humanas. A:** Cariotipo de células paMSC04 crecidas al 3% de O<sub>2</sub> en pase 5. **B:** Cariotipo de células hMSC34 crecidas al 20% de O<sub>2</sub> en pase 8 (46 cromosomas (23 pares diploides 2n: 22 pares autosómicos o somáticos (cualquier cromosoma que no sea sexual), y un par sexual (hombre: XY; mujer: XX)).

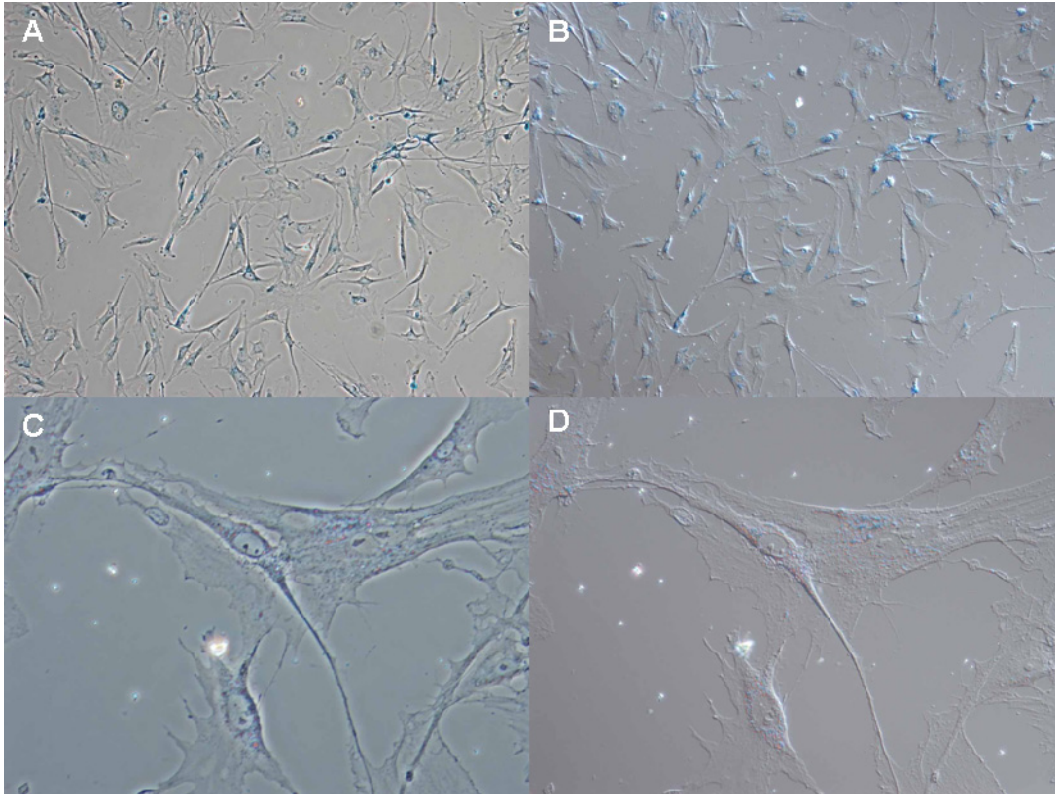
Hasta el momento se han realizado las preparaciones de metafases, la hibridación y captura de imágenes de algunas de las muestras, para posteriormente hacer los análisis mediante el conteo directo de las aberraciones (estructurales) cromosómicas. Las imágenes de la Figura 21 nos muestran la similitud morfológica de los cromosomas porcinos y los humanos en metafase. Además, estas imágenes nos indican que el proceso de hibridación (FISH telomérico) se ha realizado correctamente, al observarse de forma clara los telómeros en los extremos de los brazos cromosómicos.

### 3. Marcaje de las células paMSC

#### 3.1. Marcaje con el complejo Endorem®

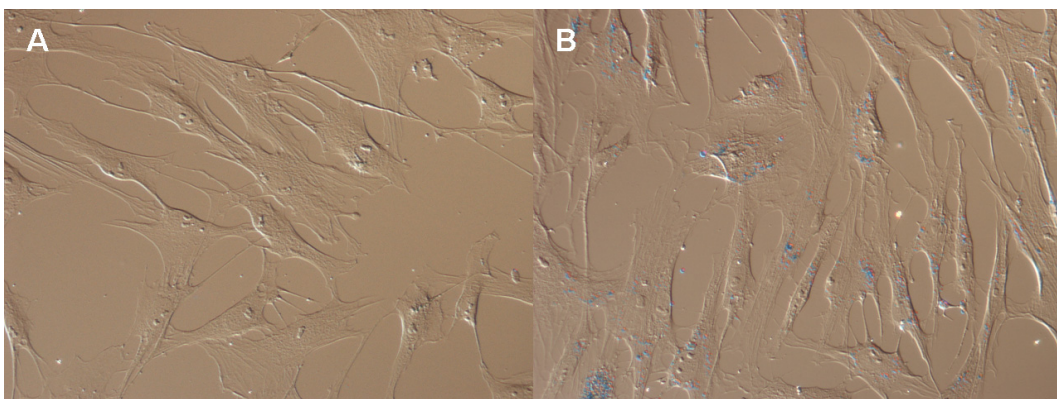
La tinción positiva de las paMSC con Azul de Prusia confirmó el marcaje con el complejo Endorem®. Así, en la Figura 22 pueden apreciarse, en color azul, las células que contienen nanopartículas de óxido de hierro (SPIO) en su interior.

## Resultados



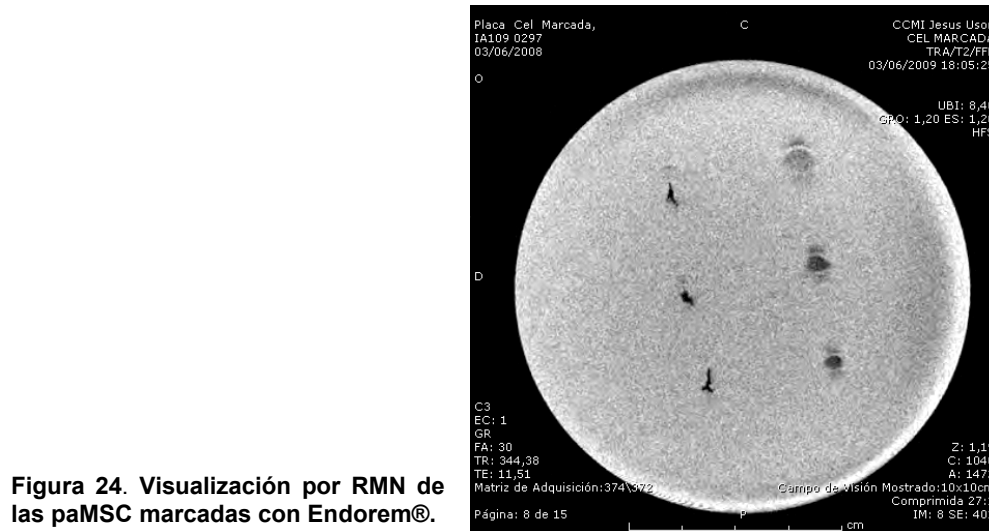
**Figura 22. Tinción de paMSC con azul de Prusia.** Imágenes de paMSC teñidas con azul de Prusia tras su incubación durante 24h con el complejo Endorem-PLL y visualizadas a 10X (**A y B**) y 40X (**C y D**). Imágenes tomadas con contraste de fases (**A y C**) y DIC, (*Differential Interference Contrast*) en **B y D**.

La validación del marcaje se comprobó en primer lugar con los resultados de viabilidad, tras la congelación de las células marcadas ( $89.25\% \pm 7,8$ ,  $n= 5$  frente a  $96.9\% \pm 1.5$ ,  $n= 26$  en células sin marcar) obtenidos mediante la técnica de exclusión de azul de tripán. Así mismo, la eficiencia del marcaje, obtenida mediante recuento directo de las células positivas a la tinción del hierro con azul de Prusia, fue del 99%, ( $n= 8$ ) (Figura 23).



**Figura 23. Marcaje de las paMSC con iones superparamagnéticos para su visualización por RMN.** Las imágenes muestran las células paMSC teñidas con azul de Prusia tras su incubación durante 24h sin (Control, **A**) y con el complejo Endorem-PLL (**B**), donde la eficiencia de marcaje alcanzó un 99%. Imágenes tomadas bajo DIC, (*Differential Interference Contrast*), x20.

Por último, y para determinar el número mínimo de células marcadas necesarias para producir un descenso suficiente de la intensidad de la señal en RMN, diferentes concentraciones de células marcadas y no marcadas se inyectaron en un gel de agar (4%) y se sometieron a RMN. Se comprobó que, en estas condiciones,  $5 \times 10^5$  células son suficientes para producir una señal detectable (Figura 24).



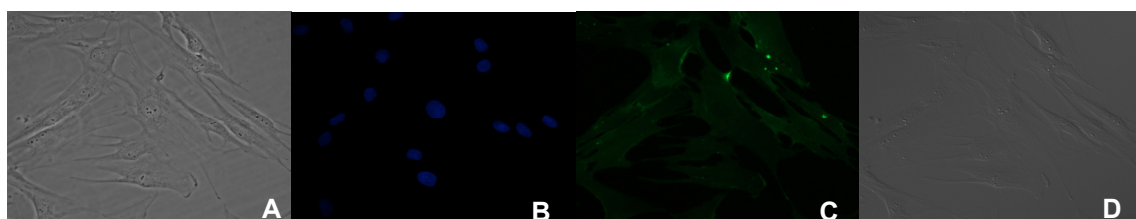
**Figura 24. Visualización por RMN de las paMSC marcadas con Endorem®.**

## 3.2. Marcaje con proteínas fluorescentes

### 3.2.1. GFP+Hoechst/DAPI

Una vez concluido el seguimiento *in vivo* es necesario el análisis molecular e inmunohistoquímico de las muestras tomadas a los animales de los distintos grupos de estudio. Las células son marcadas con la proteína fluorescente verde, no sólo para realizar los estudios de localización y migración de las mismas una vez concluidos los seguimientos *in vivo*, sino también es importante intentar averiguar, en el caso que haya otro tipo de procesos como neoangiogénesis, transdiferenciación, etc., en qué medida las células trasplantadas se encuentran implicadas en dichos procesos. Por ello, es importante identificar y localizar estas células para lo cual su combinación con un marcaje de los núcleos es fundamental.

Como se muestra en la Figura 25, las paMSC observadas al microscopio con luz visible (A) están marcadas con la GFP, al visualizar la fluorescencia verde en todas ellas (C). Además se aprecia como el marcaje de los núcleos es correcto (B) y nos ayuda a identificar todas las células presentes en la muestra.

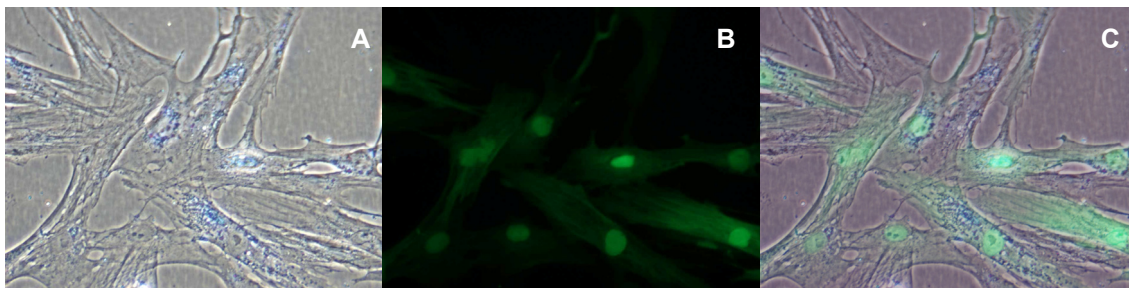


**Figura 25. Marcaje de las paMSC con la proteína fluorescente verde (GFP), 20X. A:** Imagen tomada con contraste de fases. **B:** Tinción de los núcleos con Hoechst. **C:** Imagen de fluorescencia de las células paMSC-GFP+ tomada con contraste de fases. **D:** Imagen tomada bajo DIC (Differential Interference Contrast) x20).

## Resultados

### 3.2.2. GFP+ Endorem®

La eficacia de la combinación de ambos marcajes se comprobó tras emplear el complejo Endorem® en células previamente transducidas con un vector lentiviral que codifica la proteína fluorescente verde (paMSC-GFP+) como se muestra en la Figura 26.



**Figura 26. Marcaje de las paMSC-GFP+ con iones superparamagnéticos para su visualización por RMN y posterior seguimiento por histología.** Las imágenes muestran las células paMSC-GFP+ teñidas con Azul de Prusia tras su incubación durante 24h con el complejo Endorem-PLL (A), visualizadas mediante fluorescencia (B) y la combinación de ambas imágenes (merge, en la imagen C), todas vistas a 20X

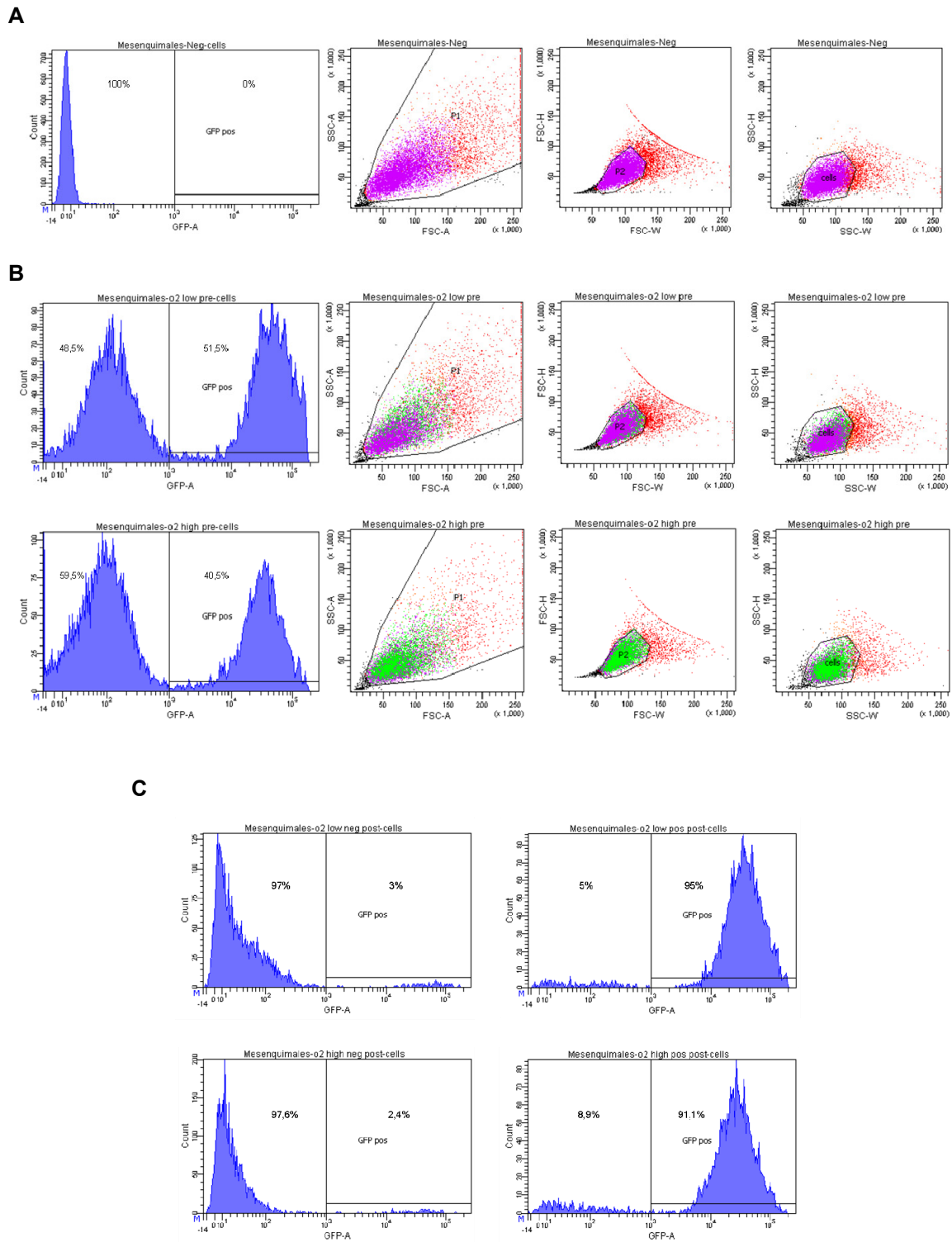
Los resultados observados en el microscopio tras la tinción con azul de Prusia en muestras con paMSC-GFP+ marcadas también con Endorem®, evidenciaron la compatibilidad de ambos marcajes *in vitro*. Todas las células presentes en las muestras analizadas resultaron positivas a esta tinción, al visualizarse las partículas de hierro en color azul, además al analizarlas mediante fluorescencia, estas mantenían el marcaje verde correspondiente a la GFP. Las paMSC resultantes de esta combinación constituyeron uno de los grupos de tratamiento administrados en este estudio.

## 4. Manipulaciones genéticas de paMSC

### 4.1. Transducción mediante vectores lentivirales de la proteína fluorescente verde (GFP)

La proteína GFP no es completamente inerte para la célula (produce estrés oxidativo), por lo que durante el proceso de transducción, aquellas cuya infección fue mayor (mayor número de provirus integrados y por tanto las que más fluorescencia presentaron), acabaron siendo eliminadas por muerte celular. Tanto en el proceso de infección como en el de separación celular se utilizaron las subpoblaciones crecidas bajo las diferentes condiciones de oxígeno analizadas previamente (20% y 3% de O<sub>2</sub>). Así, se podría comprobar si estas condiciones de cultivo afectan de alguna manera bien a la transducción o a la supervivencia celular. Tras su infección, y una vez obtenida la cantidad de células adecuada, las paMSC infectadas y sometidas al proceso de separación celular o “*sorting*”, se obtuvieron poblaciones puras de paMSC-GFP positivas y separadas de las que no llegaron a infectarse o aquellas en las que el gen se había silenciado. Como control negativo en este proceso se utilizó una población que no había sido sometida a la infección mediante vector lentiviral de la proteína GFP (Figura 27A).





**Figura 27: Separación celular tras la transducción de paMSC.** En el panel superior de **B** se muestran los resultados obtenidos en el caso de la subpoblación sometida a un crecimiento del 3% de  $O_2$  mientras que en el panel inferior de la misma figura los obtenidos bajo crecimiento del 20% de  $O_2$ . La imagen **C** muestra las cuatro subpoblaciones resultantes de este proceso. Como control negativo se utilizó una población de estas células que no fueron infectadas con el vector (**A**).

## Resultados

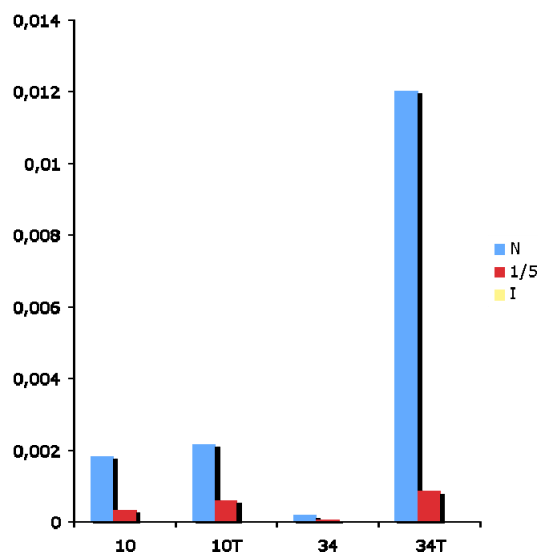
Los resultados en la separación celular indicaron la eficiencia de la infección de ambas poblaciones obteniéndose un 40.5% de células infectadas en el caso de las crecidas al 20% de O<sub>2</sub>. En la población crecida en condiciones del 3% de O<sub>2</sub>, se obtuvo un 51.5% de células GFP positivas (Figura 27B). Este resultado podría estar relacionado con lo expuesto anteriormente, donde se sugiere una mayor resistencia de estas células frente al estrés oxidativo.

El proceso de separación celular proporcionó una población GFP positiva del 91.1% de pureza en las paMSC crecidas al 20%, que posteriormente se utilizó para la obtención de los tratamientos de todos los animales de los grupos 2 y 3.

### 4.2. Transducción de las paMSC con un vector portador del gen de la telomerasa humana (hTERT)

En los resultados que se muestran en la Figura 28, se observa un aumento significativo de la actividad telomerasa, en las células mesenquimales procedentes de tejido adiposo humano cuando son infectadas por el vector portador del gen hTERT. Sin embargo, tras tres intentos, en las células de origen porcino no se detectaron modificaciones significativas en dicha actividad enzimática.

**Figura 28: Transducción con el vector portador del gen de la telomerasa humana hTERT.** Las barras en azul indican la actividad telomerasa normal de las distintas muestras. Las barras rojas muestran la actividad telomerasa de las muestras diluidas 5 veces y las amarillas en preparaciones donde se ha realizado la inactivación de la enzima. 10 y 34: muestras de MSC (porcina y humana respectivamente) sin infectar por el vector; 10T y 34T: muestras de MSC (porcina y humana respectivamente) transducidas con el vector del gen portador de la telomerasa humana.



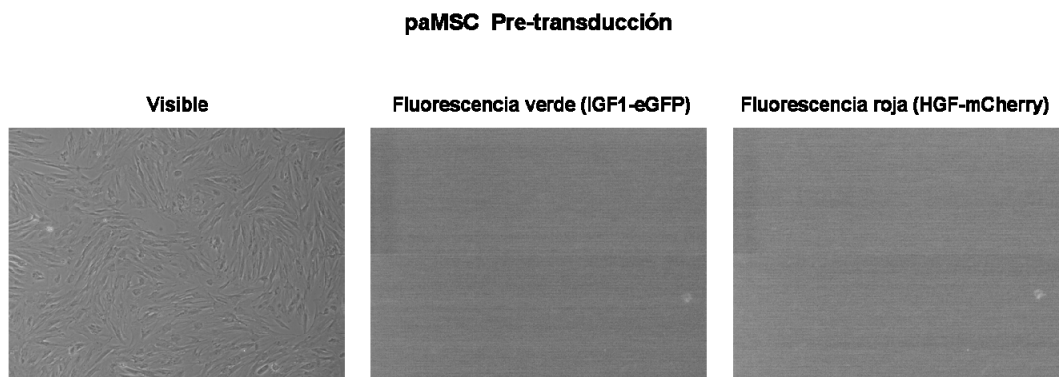
### 4.3. Obtención de paMSC que sobreexpresan las proteínas IGF1 y HGF

Se generaron y validaron los vectores pRRLsin18.CMV-IGF1-IRES-GFP y pRRLsin18.CMV-HGF-IRES-Cherry para la posterior transducción/purificación de estas células con los vectores lentivirales.

#### 4.3.1. Proceso de transducción celular

En la infección celular con ambos vectores, se analizó la concentración más apropiada con la que obtener las células transducidas. Para ello se probaron distintas concentraciones virales haciendo un seguimiento directo, desde el momento de la infección hasta la separación celular o “*sorting*”.

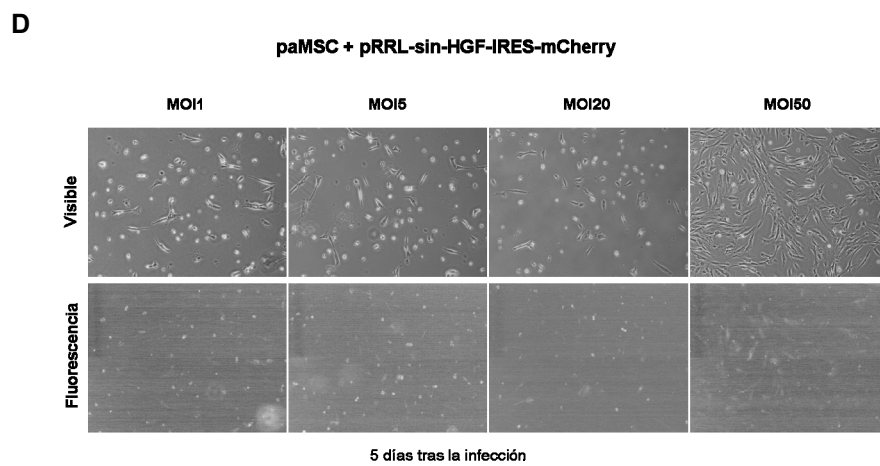
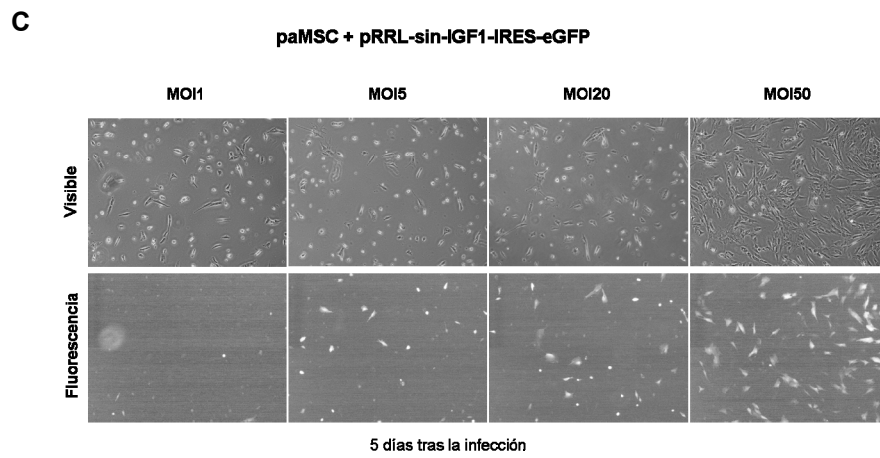
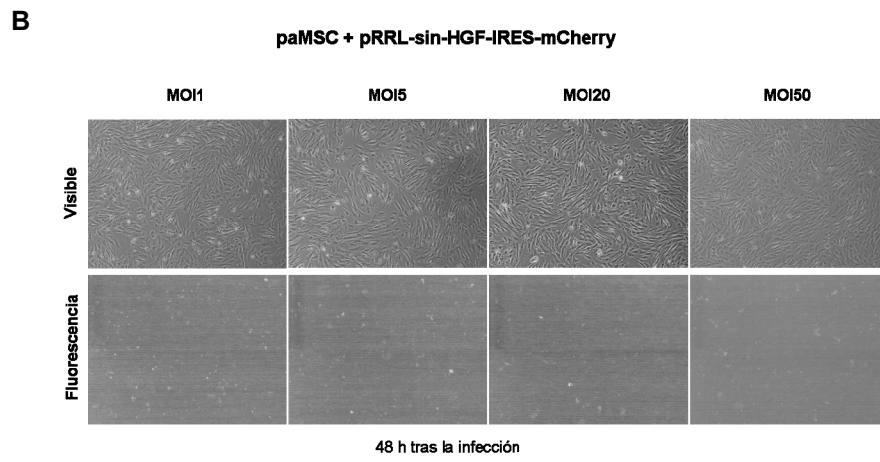
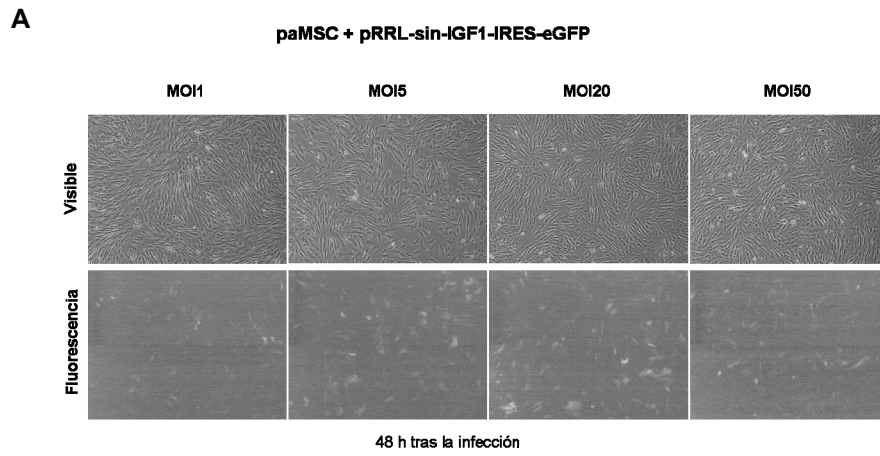
Con el control negativo de este seguimiento, se comprobó la ausencia de fluorescencia emitida por estas células, tanto para el verde como para el rojo, antes de la infección con ambos vectores (Figura 29).



**Figura 29: Control negativo de la infección.** Fluorescencia observada (para el verde y el rojo) en los cultivos de la subpoblación paMSC04 antes del proceso de transducción.

Como se observa en la Figura 30, en las primeras 48 horas la fluorescencia verde emitida por la GFP era más intensa en MOI20, dando a entender que esta podría ser la concentración adecuada de infección. Sin embargo, con el paso de los días se observó que el número de células que finalmente resultaron positivas a la infección disminuyó, seguramente porque aquellas que más fluorescencia emitían inicialmente no sobrevivieron al proceso, mientras que en MOI50 ocurría justo lo contrario. Por otra parte, el seguimiento realizado de la fluorescencia roja (Cherry), aunque en todo momento fue de menor intensidad que la producida por la GFP, siempre pareció responder mejor a la mayor concentración viral.

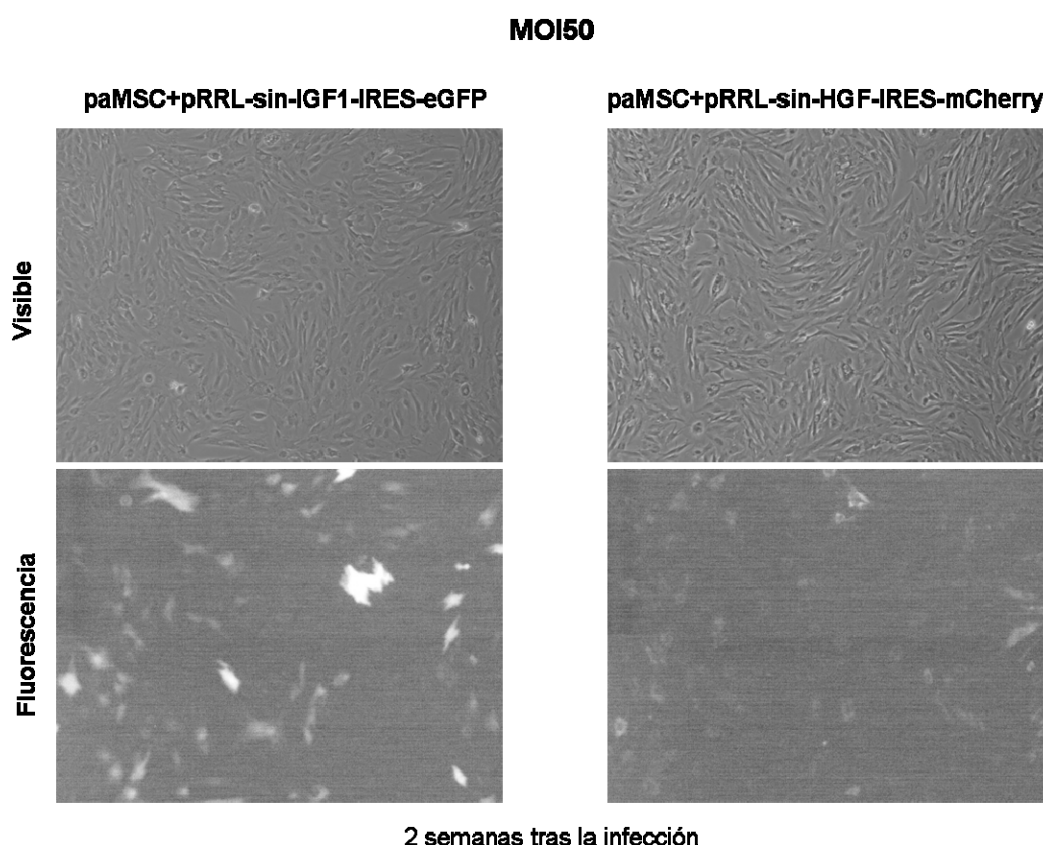
Resultados





**Figura 30: Seguimiento de la fluorescencia emitida por los cultivos, tras la transducción con ambos vectores, con las distintas concentraciones virales analizadas.** Las imágenes de **A** y **C** corresponden a las paMSC-IGF1-GFP a las 48 horas y 5 días después de la infección. En **B** y **D** se muestran los seguimientos de las paMSC-HGF-Cherry en los mismos tiempos.

Así, tras un seguimiento de dos semanas, se observó que la concentración idónea para llevar a cabo el proceso de infección, era la más concentrada de las que se utilizaron (MOI50), como se muestra en la Figura 31. No se observaron fenómenos deletéreos para las células.



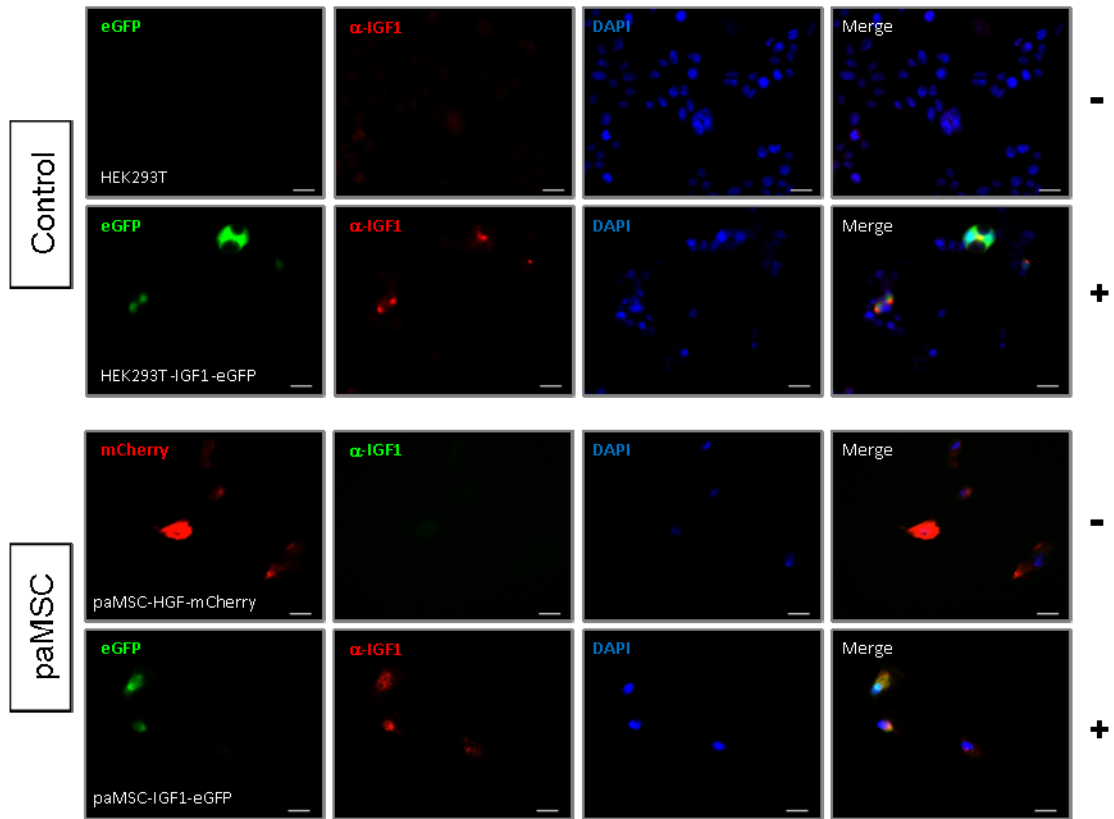
**Figura 31: Seguimiento de las paMSC tras la infección.** Poblaciones de paMSC+pRRL-sin-IGF1-IRES-eGFP y paMSC+pRRL-sin-HGF-IRES-mCherry observadas al microscopio (4X) antes del proceso de separación celular (dos semanas después de la infección).

#### 4.3.2. Análisis inmunocitoquímico

Antes de realizar la separación, se confirmó la expresión génica de IGF1 y HGF de cada una de las poblaciones. En el estudio inmunocitoquímico correspondiente con el anticuerpo policlonal humano contra IGF1, se observa la expresión de IGF1 en las paMSC infectadas con pRRL-sin-IGF1-IRES-eGFP en amarillo (por la combinación de la fluorescencia verde de la GFP y del fluoróforo del anticuerpo secundario en rojo) (Figura 32A). Por otro lado, en las paMSC infectadas con pRRL-sin-HGF-IRES-mCherry, también se observa en amarillo la expresión de HGF tras el estudio inmunocitoquímico correspondiente con el anticuerpo policlonal humano contra HGF (Figura 32B).

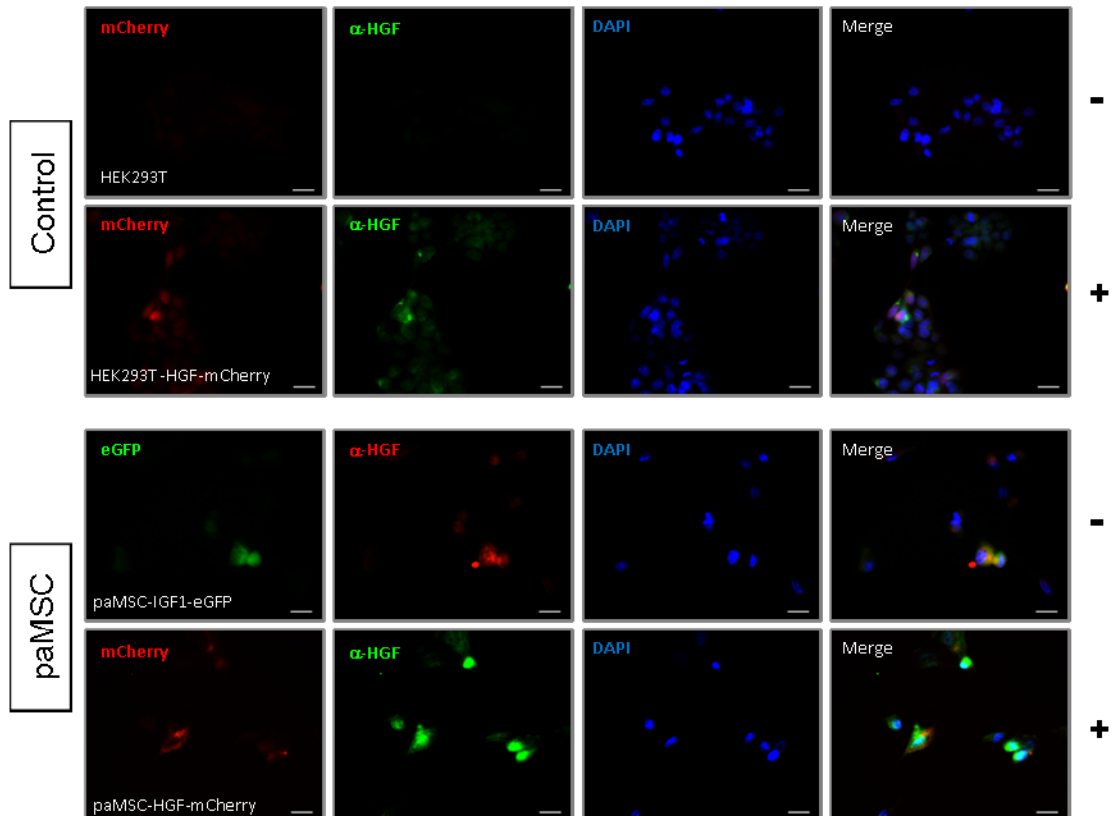
A

**$\alpha$ -IGF1 en HEK293T y paMSC infectadas con pRRL-sin-IGF1-IRES-eGFP**



B

**$\alpha$ -HGF en HEK293T y paMSC infectadas con pRRL-sin-HGF-IRES-mCherry**

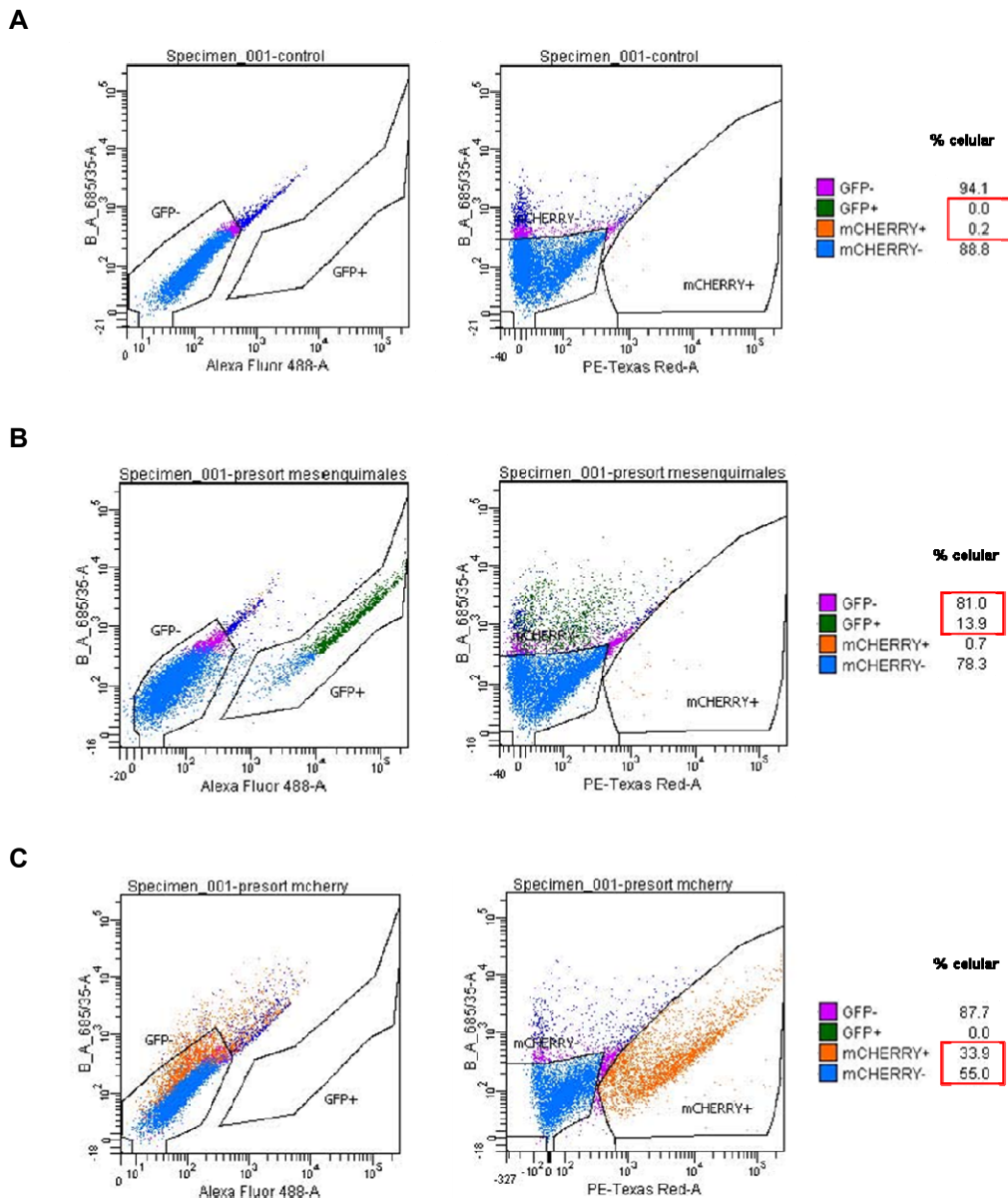


**Figura 32:** ICQ para IGF1 en paMSC+pRRL-sin-IGF1-IRES-eGFP (imagen A) y HGF en paMSC+pRRL-sin-HGF-IRES-mCherry (imagen B). En ambos casos se utilizaron como controles los mismos análisis en la línea tumoral HEK293T. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron Alexa Flúor 488 (verde) y el Alexa Flúor 568 (rojo), (Barra: 20  $\mu$ m).

Como controles negativos se utilizaron, por un lado las poblaciones transducidas con el vector contrario al estudiado y por otro la línea tumoral HEK293T utilizada en el clonaje. Como control positivo en cada caso, se utilizó ésta misma línea tumoral con el vector de interés ya insertado. La expresión de HGF observada en el negativo que utiliza las poblaciones con el vector contrario al analizado, podría corresponder a la expresión basal de este factor de crecimiento por parte de las propias células y no a una sobreexpresión a consecuencia de la infección.

#### 4.3.3. Proceso de separación celular o “*sorting*”

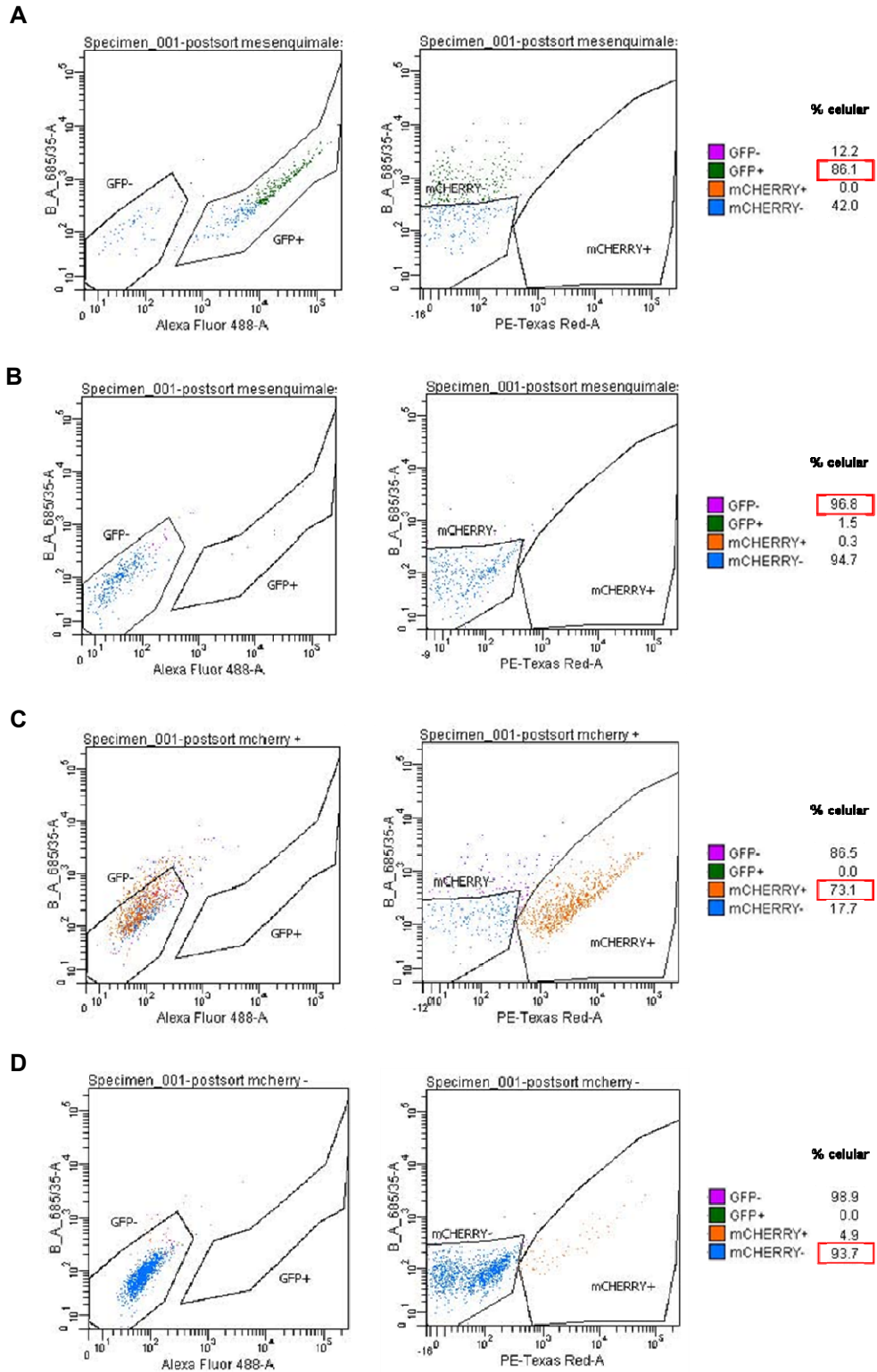
Los análisis previos establecieron la eficiencia de ambas infecciones, obteniéndose un 14% de células infectadas con el vector pRRL-sin-IGF1-IRES-eGFP y un 34% en el caso de las paMSC+pRRL-sin-HGF-IRES-mCherry. Para esta separación, se empleó como control negativo la misma subpoblación paMSC04 sin translucir (Figura 33A).



**Figura 33: Eficiencia del proceso de infección.** **A** corresponde al control negativo utilizado en el proceso de separación celular. En la imagen **B** se muestran los resultados antes de la separación celular de paMSC+pRRL-sin-IGF1-IRES-eGFP. Los resultados pre-sorting obtenidos en la población paMSC+pRRL-sin-HGF-IRES-mCherry se presentan en **C**.

**Resultados**

Las poblaciones obtenidas después del proceso de separación celular se muestran en la Figura 34:



**Figura 34: Poblaciones obtenidas tras el proceso de separación celular.** En A y C se muestran las poblaciones positivas para IGF1-eGFP y HGF-mCherry respectivamente. En B y D se muestran las poblaciones negativas.



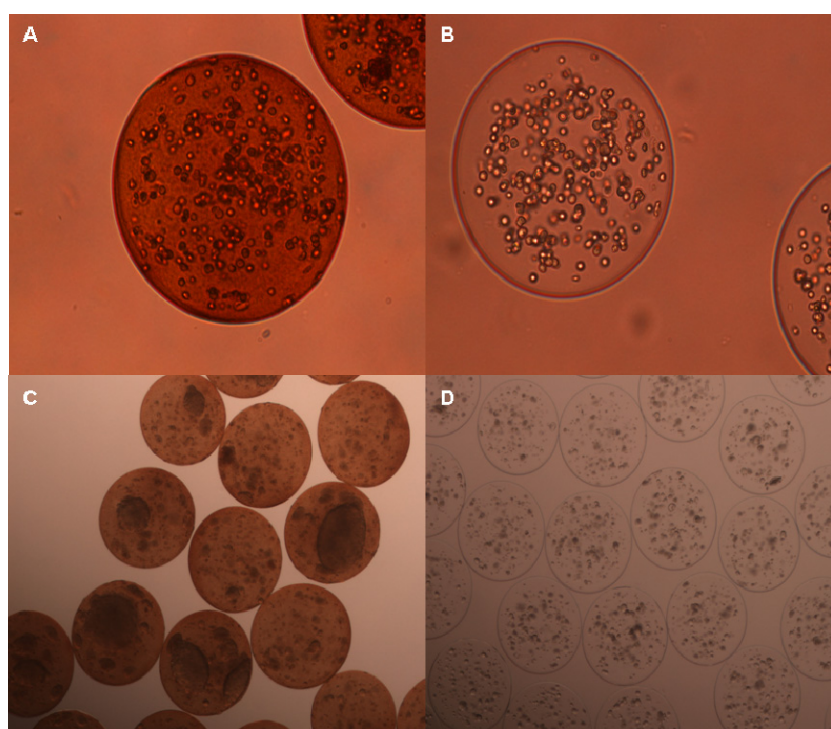
Las células MSC, tanto humanas como de ratón, son poblaciones relativamente difíciles de manipular por lo que los resultados obtenidos con las paMSC no son sorprendentes y entran dentro del rango esperado. La pureza obtenida en el proceso de separación celular fue del 86.1% en las paMSC-IGF1-eGFP (Figura 34A) y del 73.1% en la población paMSC-HGF-mCherry (Figura 34C). Posteriormente, ambas poblaciones por separado, se expandieron con el objetivo de obtener el tratamiento utilizado en el grupo 4.

## 5. Microencapsulación celular

### 5.1. Estudio preliminar *in vitro*

Antes de la encapsulación de las células madre adultas (paMSC), se realizaron estudios preliminares *in vitro* utilizando fibroblastos productores de VEGF como células modelo para la optimización de las microcápsulas que contienen las células y el agente de contraste (Endorem®).

Se obtuvieron microcápsulas totalmente esféricas, de superficie lisa y de unos 400µm de diámetro. En la Figura 35, se pueden observar los agregados celulares formados en el interior de las magnetocápsulas (microcápsulas que contienen las células y el Endorem®), el día 42 de cultivo, comparándolo tanto con las magnetocápsulas el día de elaboración, como con las microcápsulas en las que no se incluyó el Endorem®.

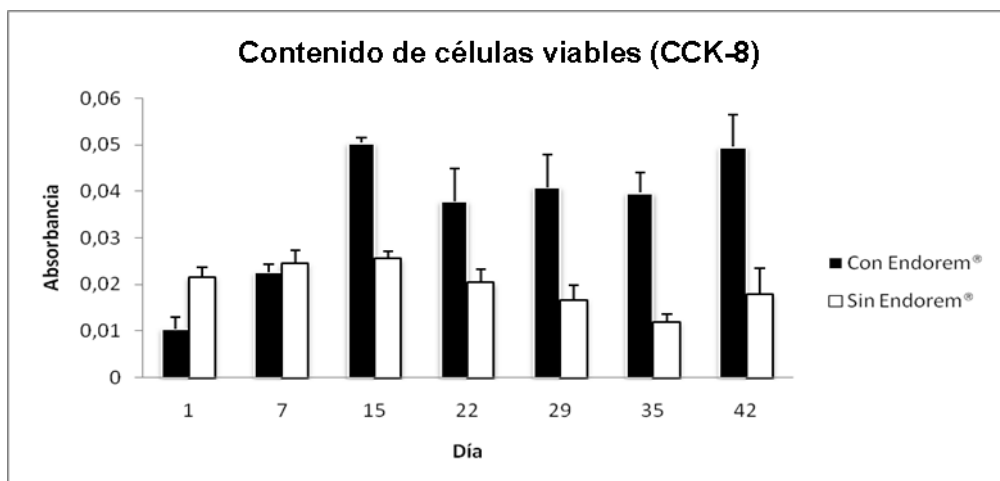


**Figura 35:** Imágenes de microscopía óptica de las microcápsulas cargadas con  $5 \times 10^6$  células/mL alginato. Magnetocápsulas: **A:** Día de elaboración (Día 0) **C:** Último día del ensayo (Día 42). Microcápsulas: **B:** Día de elaboración (Día 0) **D:** Último día del ensayo (Día 42).

## Resultados

En cuanto al estudio del contenido de células viables, analizado con método del CCK-8 (*Cell Counting Kit-8*), tal y como se observa en la Figura 36, la absorbancia medida en el caso de las células microencapsuladas conjuntamente con Endorem® (magnetocápsulas) se incrementa significativamente hasta los 15 días post-encapsulación y se mantiene en niveles elevados hasta los 42 días de cultivo *in vitro*.

Mientras que en el caso de las microcápsulas con únicamente células no se observaron cambios importantes en este parámetro.

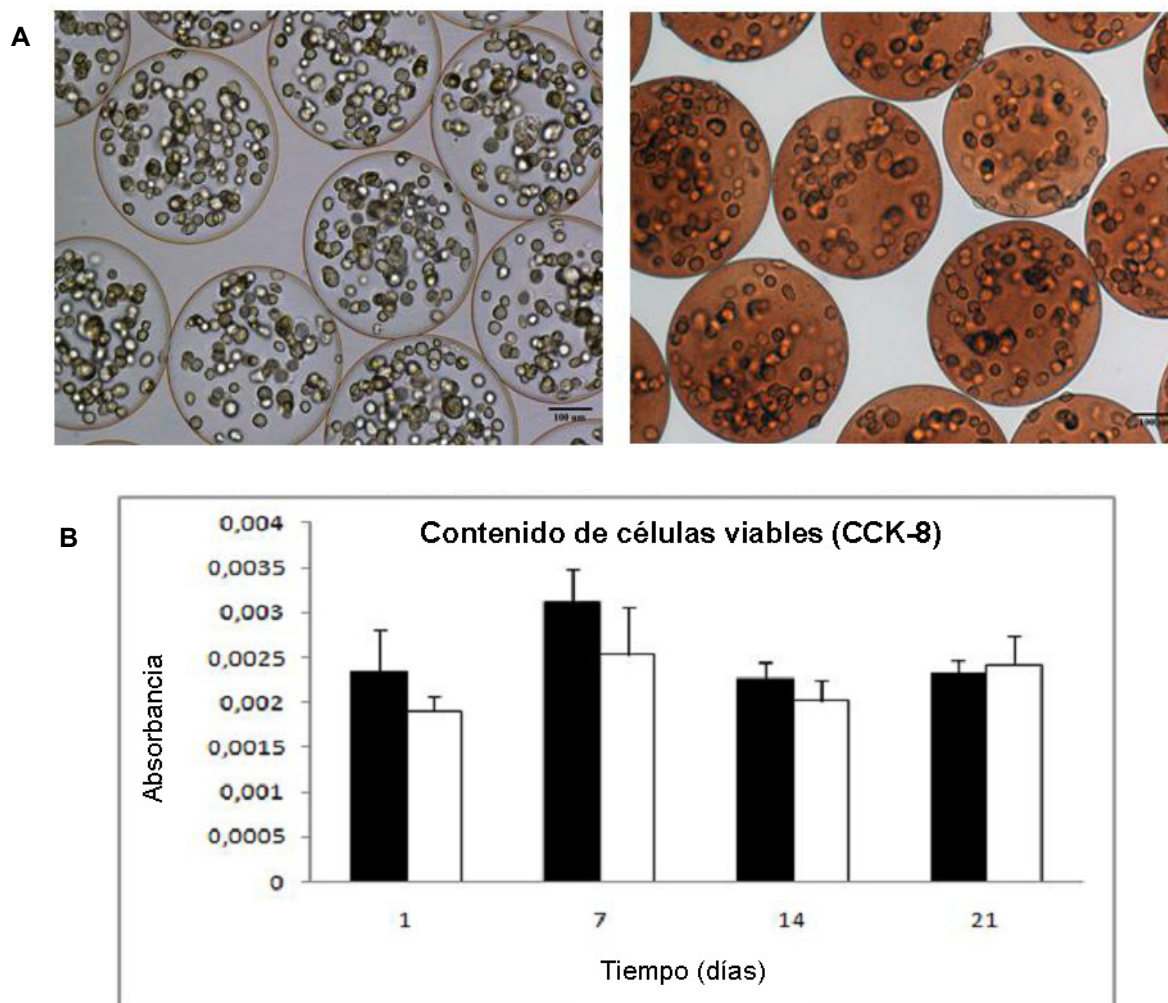


**Figura 36: Absorbancia (equivalente al contenido de células viables) medida en las microcápsulas cargadas a una densidad celular de  $5 \times 10^6$  células/mL alginato.** Leyenda: Con Endorem® (microcapsulas con células y Endorem®, magnetocápsulas), Sin Endorem® (microcápsulas con células y sin Endorem®)

## 5.2. Encapsulación de las paMSC

Se elaboraron magnetocápsulas cargadas con  $5 \times 10^6$  paMSC/mL y con Endorem® (20%). Se obtuvieron microcápsulas de  $400 \mu\text{m}$  de diámetro que contenían, cada una de ellas, unas 170 paMSC.

En la Figura 37 (imágenes superiores) se recogen microfotografías de las microcápsulas que contenían las células troncales adultas y de las mismas marcadas con Endorem® (magnetocápsulas). Por otra parte, en la misma Figura 37 (imagen inferior) se presentan los resultados del estudio del contenido de células viables realizado con el método del CCK-8 durante 21 días, donde se observa la similitud en cuanto a valores de absorbancia al comparar los resultados entre microcápsulas marcadas con Endorem® (barras blancas) frente a los obtenidos en las microcápsulas sin marcar (barras negras).



**Figura 37: Estudio del contenido de células viables.** En **A** se muestran imágenes de microscopía óptica de las microcápsulas de alginato (izquierda) y de las magnetocápsulas (derecha), ambas cargadas con  $5 \times 10^6$  paMSC/mL alginato. En la figura **B** se presentan los resultados obtenidos en cuanto al estudio del contenido de células viables (paMSC) en las microcápsulas (barras negras) vs magnetocápsulas (barras blancas) durante 21 días.

## 6. Validación de tratamientos específicos con paMSC

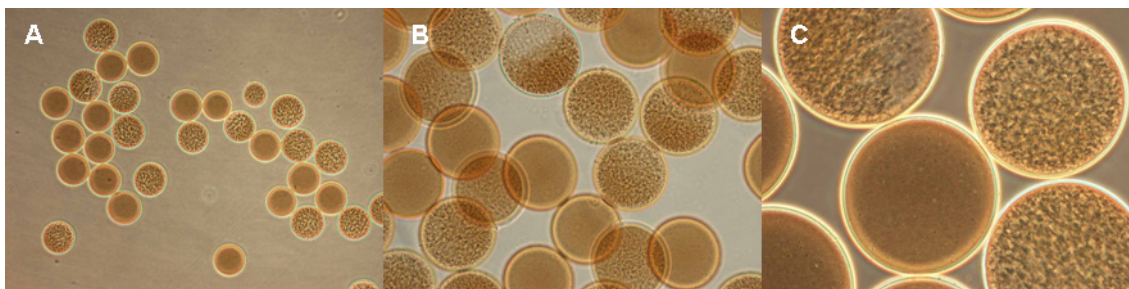
### 6.1. Tratamiento de paMSC encapsuladas (microcápsulas APA marcadas con Endorem®), administrado al grupo de estudio 1

Con la preparación de este tratamiento se consiguió una formulación farmacéutica que permitió inmovilizar las células troncales adultas procedentes de tejido adiposo (paMSC) inoculadas.

En este caso, la evaluación de este tratamiento dio lugar a que tuvieron que variarse algunos de los parámetros que inicialmente se determinaron para todos los grupos. Uno de ellos fue el número de células a administrar y otro el volumen en cada inoculación. La razón fue el tamaño de las microcápsulas, esto no permitió administrar más de  $5 \times 10^6$  células a ninguno de los animales pertenecientes a este grupo.

## Resultados

En la Figura 38 se muestran las microcápsulas de alginato y poli-L-Lisina obtenidas, sin ningún tratamiento en su interior, visualizadas a diferentes aumentos.

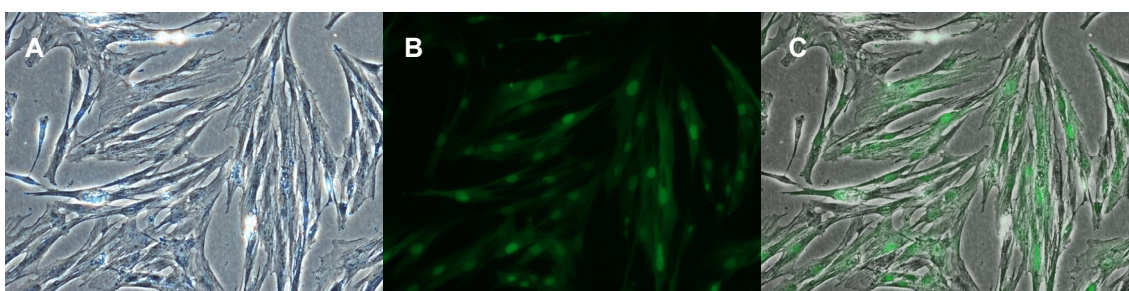


**Figura 38. Formulación farmacéutica de microcápsulas APA.** Imágenes de microcápsulas APA vacías (sin ningún tipo celular en su interior) tomadas en microscopio bajo contraste de fases a distintos aumentos, 4X (A), 10X (B) y 20X (C).

El tamaño obtenido de estas cápsulas de alginato fue de unos 400 $\mu$ m de diámetro conteniendo cada una de ellas unas 170 paMSC. En la Figura 37 de este documento (Apartado 5.2 *Encapsulación de las paMSC*) se muestra la imagen de microscopía óptica, del tratamiento a administrar en este grupo de estudio.

### 6.2. Tratamiento de paMSC-GFP+ marcadas con Endorem®, administrado al grupo de estudio 2

Los resultados obtenidos confirman la correcta preparación del tratamiento del grupo 2 donde se observa, mediante visualización directa en el microscopio, la fluorescencia verde de las células transducidas con la proteína fluorescente verde (GFP) y la tinción positiva con azul de Prusia de forma conjunta (Figura 39).

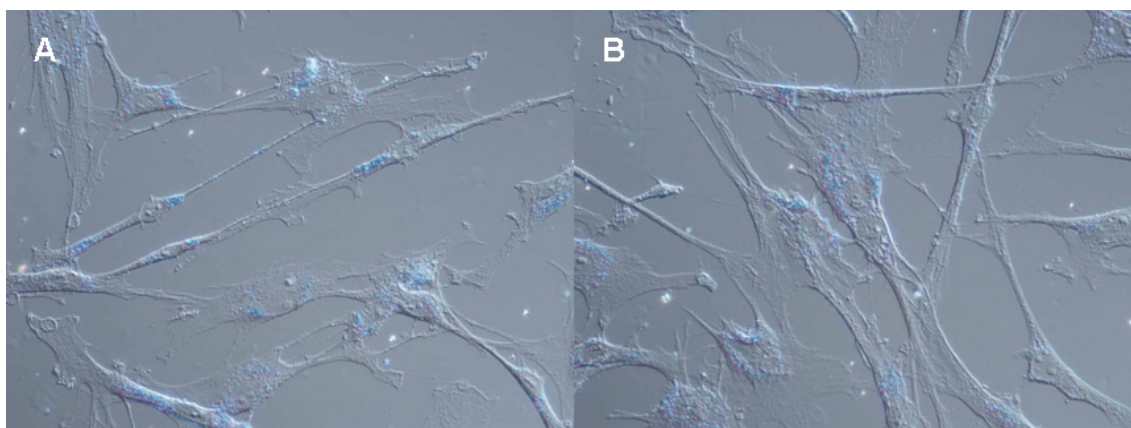


**Figura 39. Marcaje de las paMSC-GFP+ con iones superparamagnéticos para su visualización por RMN y posterior seguimiento por histología.** Las imágenes muestran las células paMSC-GFP+ teñidas con azul de Prusia tras su incubación durante 24h con el complejo Endorem-PLL (A), visualizadas mediante fluorescencia (B) y la combinación de ambas imágenes (merge, en la imagen C), todas vistas a 20X mediante contraste de fases.

El marcaje con la proteína fluorescente verde (GFP) nos permitió hacer el seguimiento y los análisis posteriores de las células mediante técnicas inmunohistoquímicas y moleculares, una vez terminado el tiempo de seguimiento de los animales. Por otra parte, la tinción positiva al



azul de Prusia tras el marcaje con Endorem®, confirmó la compatibilidad de ambos marcajes en un mismo tratamiento.



**Figura 40. Tinción positiva al azul de Prusia.** Las imágenes muestran las paMSC teñidas con azul de Prusia tras su incubación durante 24h con el complejo Endorem-PLL visualizadas a 40X (**A y B**) y tomadas bajo DIC, (*Differential Interference Contrast*).

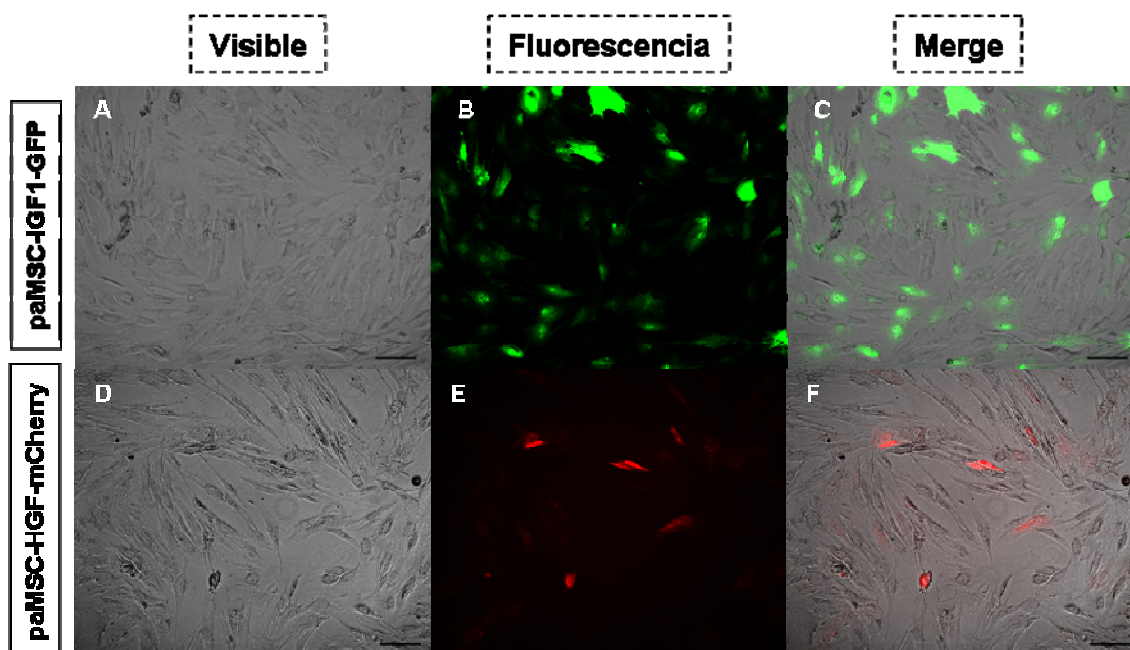
Uno de los problemas que se encontraron en la preparación de las células que posteriormente serían inoculadas a los animales de este grupo, fue que el marcaje con Endorem® se perdía durante la expansión celular. Para solventar este problema se realizaron varias pruebas de congelación/descongelación de células marcadas y se observó que las células congeladas justo tras el marcaje, lo mantenían tras la descongelación de forma intacta.

La efectividad del marcaje tras los procesos de congelación/descongelación se comprobó tanto por visualización directa en el microscopio mediante la tinción con azul de Prusia (Figura 40) como por resonancia magnética tras su administración intramiocárdica. Por tanto el marcaje de las células con Endorem® para este grupo de estudio, se produjo justo antes de la congelación de éstas, una vez expandidas, y obtenida la cantidad suficiente para ser trasplantadas.

### 6.3. Tratamiento de paMSC que sobreexpresan los factores de crecimiento IGF1 y HGF, administrado al grupo de estudio 4

Por un lado se obtuvieron células a las que se les introdujo el gen del factor de crecimiento insulínico, IGF1, marcadas en verde con GFP. Por otro, se obtuvieron células transducidas con el gen del factor de crecimiento hepático, HGF, marcadas con un fluoróforo en rojo (Cherry). El tratamiento final se consiguió con una mezcla 1:1 de cada tipo celular obtenido, siendo por tanto la suspensión trasplantada 50% IGF1-GFP+ / 50% HGF-Cherry+.

Los resultados obtenidos en la preparación del tratamiento a administrar en el grupo 4 se muestran en la Figura 41 donde se aprecia la fluorescencia verde correspondiente a la sobreexpresión del factor de crecimiento IGF1 y la fluorescencia roja correspondiente a la sobreexpresión del factor de crecimiento HGF.



**Figura 41. Células paMSC transducidas con los factores de crecimiento IGF1 y HGF observadas en un microscopio Zeiss a 40x.** Las imágenes muestran en primer lugar, las células *paMSC + pRRL-sin-IGF1-IRES-eGFP* (en verde) observadas con luz visible (A), mediante fluorescencia (B) y el merge (C). En el segundo grupo de imágenes se aprecian las *paMSC + pRRL-sin-HGF-IRES-mCherry* (en rojo) observadas con luz visible (D), mediante fluorescencia (E) y el merge (F). Barra: 100µm.

## 7. Trasplante y evaluación funcional del potencial terapéutico de células paMSC alogénicas en el modelo de infarto agudo de miocardio porcino

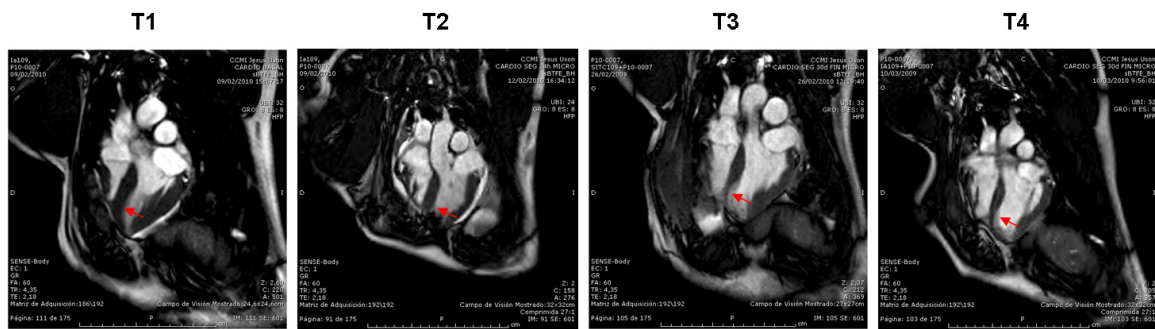
### 7.1. Desarrollo y producción del infarto de miocardio

La eficacia del modelo se determinó tras analizar, en primer lugar, la supervivencia de los animales a los que se les provocó el IAM mediante técnicas endoluminales obteniéndose un 71.43% de animales que superaron la intervención (n=28). En segundo lugar, durante los seguimientos *in vivo*, se llevaron a cabo diferentes pruebas diagnósticas para analizar la presencia y gravedad del IAM. Entre ellas se analizaron los niveles de enzimas cardíacas en sangre y se utilizaron técnicas de RMN (donde se estudiaron tanto las imágenes como los parámetros de funcionalidad cardíaca). En las Figuras 42 y 43 se muestran los resultados obtenidos en dichas pruebas durante los seguimientos realizados entre las 0 y 48 horas tras la intervención (T2), comparándolos con los resultados basales (T1) confirmando así la presencia de la patología en cada uno de los grupos.

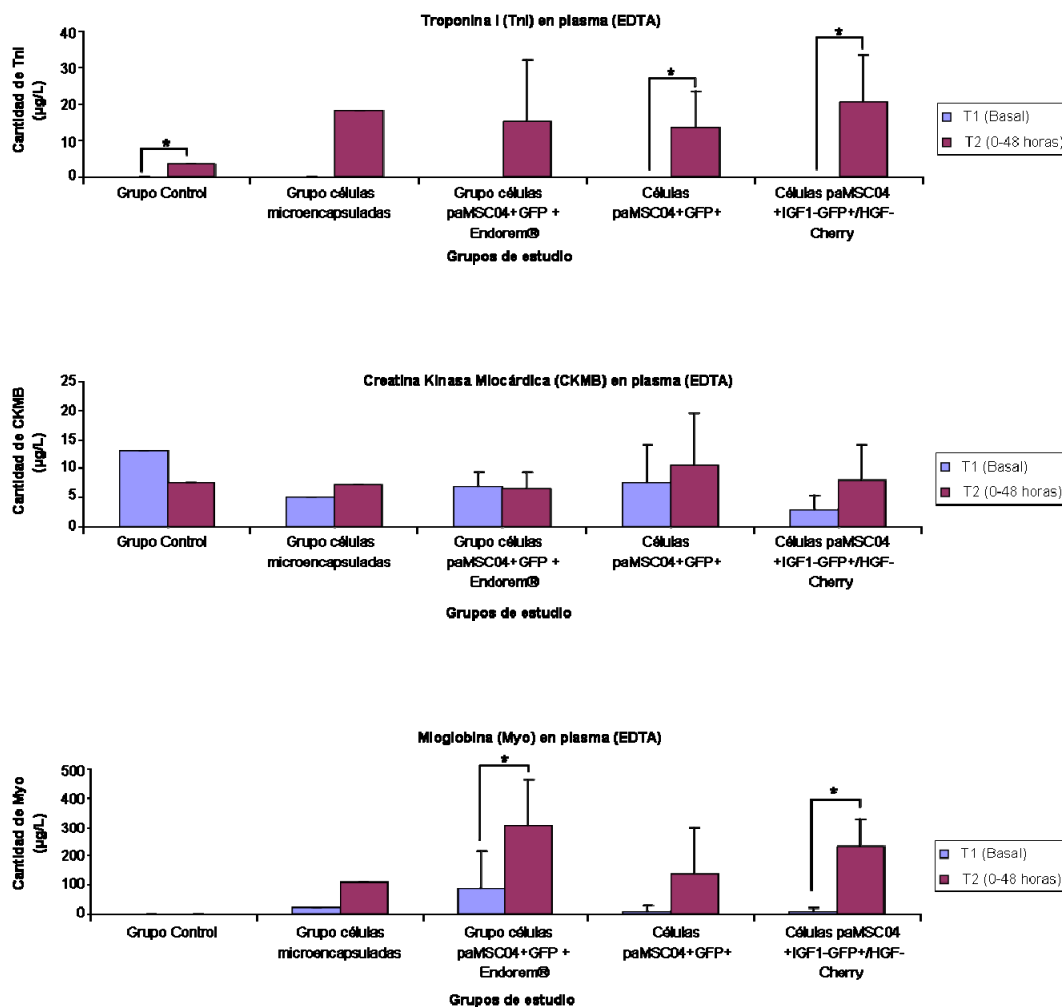
Así en la Figura 42A se observa un estrechamiento de la pared del ventrículo izquierdo en los estudios postoperatorios por RMN (T2, T3 y T4) respecto a la imagen basal (T1). Estos resultados se corresponden además, con los obtenidos al analizar el área infartada en T1 vs T2 (Figura 43). En todos los grupos se aprecia un aumento del área de infarto tras la inducción del IAM entre las 0-48 horas (T2) mientras que en los estudios basales los estudios indicaron la ausencia de área infartada (0%) en todos los animales sometidos a estudio. La reducción de los

valores en los parámetros funcionales en T2 respecto a los valores iniciales (T1), son indicativos de la pérdida de funcionalidad cardíaca a consecuencia de la patología cardíaca (Figura 43).

A

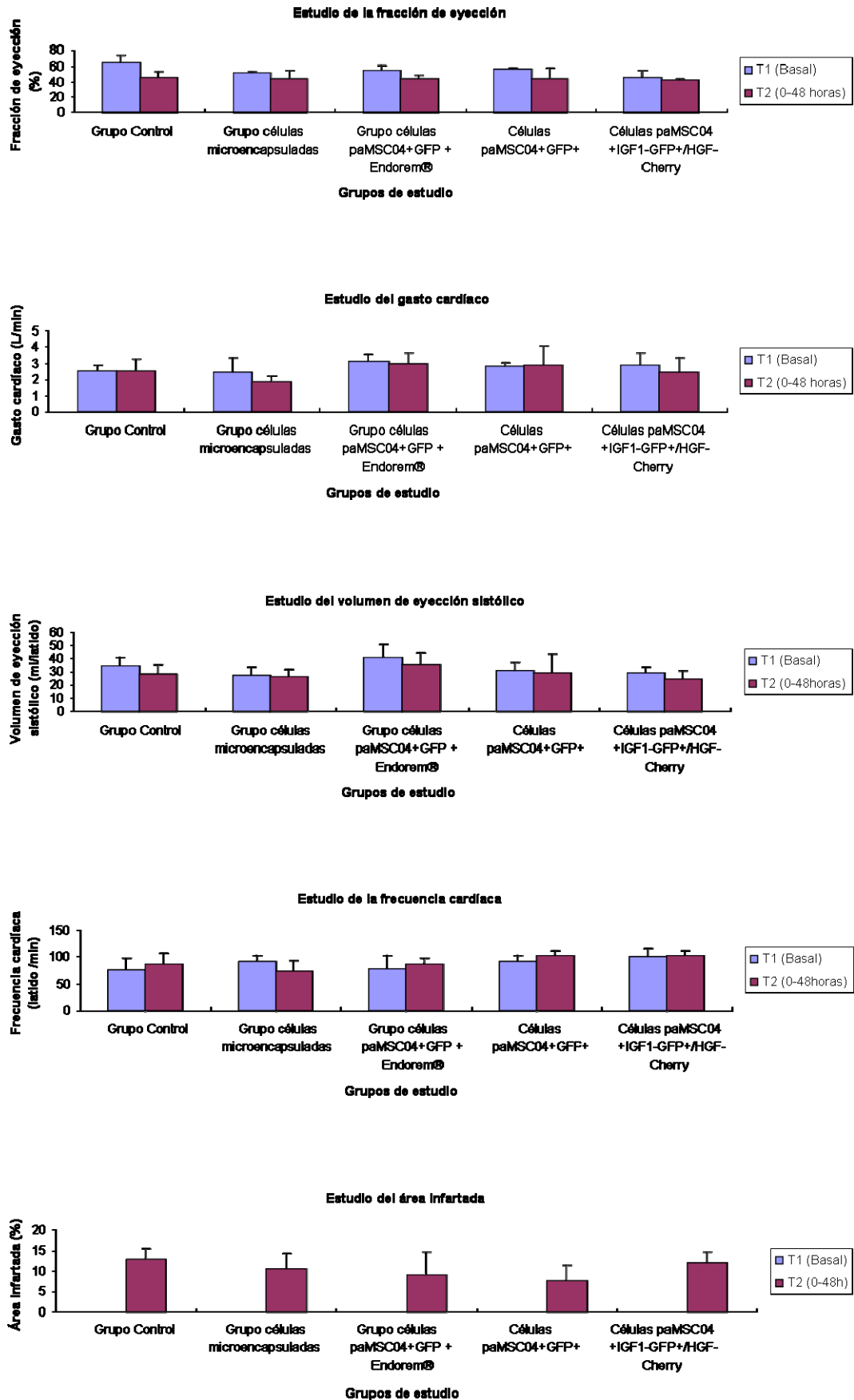


B



**Figura 42. Valoración del modelo patológico de IAM.** En A se muestran las imágenes de resonancia magnética (RMN) del corazón en 4 cámaras comparando los exámenes en los distintos tiempos de seguimiento T1, T2, T3 y T4. El estudio postoperatorio de RMN (izquierda) muestra una reducción característica de la pared del ventrículo izquierdo de comparación con el examen inicial (derecha). Los resultados de los análisis de Troponina I (TnI), Creatina Kinasa Miocárdica (CKMB) y Mioglobina (Myo) de todos los grupos se muestran en la figura B.

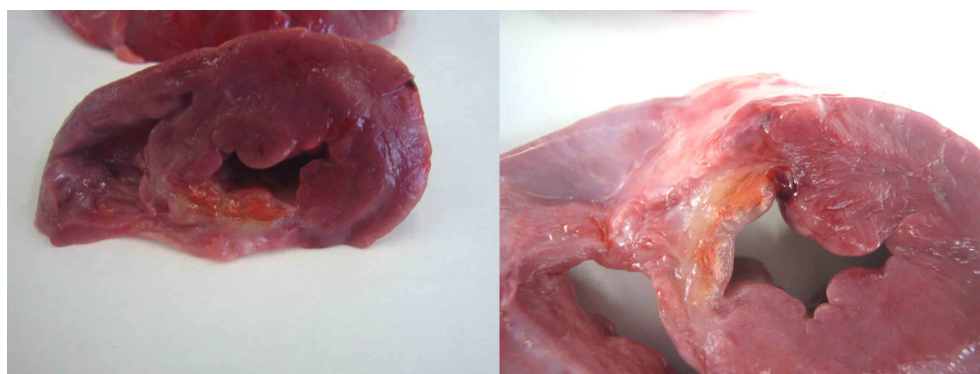
## Resultados



**Figura 43. Estudios de funcionalidad entre T1 vs T2.** La figura representa los análisis de los distintos parámetros de funcionalidad cardíaca (fracción de eyección, frecuencia cardíaca, gasto cardíaco, volumen de eyección sistólico y área infartada) comparando T1 vs T2 en cada uno de los grupos.

Los resultados evidencian la presencia de la patología cardíaca, poniendo de manifiesto el éxito en la inducción del IAM. Se consiguió una reducción del 31.7% en la fracción de eyección (animal control 4) y un área de infarto de hasta un 16% (animal control 3). Los valores enzimáticos también confirmaron la presencia del infarto al detectarse un aumento respecto a los valores basales de Tnl y Myo en T2 (0-48 horas), en todos los grupos. El aumento se produjo de forma significativa en el caso de Tnl para los grupos de microcápsulas (grupo 1), las marcadas con GFP y Endorem® (grupo 2) y las que sobreexpresaban IGF1 y HGF (grupo 4), pudiendo estar este hecho relacionado con la administración de los distintos tratamientos (Figura 42).

Finalmente, los daños en el tejido cardíaco se pudieron comprobar en la toma de muestras al finalizar el estudio, tal y como se muestra en la Figura 44, donde se aprecia la fibrosis del tejido producida como consecuencia del IAM. La localización de esta fibrosis fue siempre en el apex y parte del septo interventricular, como resultado de la isquemia producida en esta zona debida a la ubicación del balón de angioplastia a nivel de la arteria coronaria izquierda (descendente anterior).



**Figura 44. Lesiones macroscópicas del tejido cardíaco.** Fibrosis observada el tejido cardíaco de algunos animales durante la toma de muestras realizada tras la eutanasia de los mismos después de 30 días de seguimiento.

## 7.2. Trasplante celular

En este apartado se pretenden exponer las dificultades encontradas a lo largo de este proceso y que han hecho que el protocolo inicial se modificara a medida que avanzaba la fase experimental. Así, uno de los principales problemas que nos encontramos fue la administración de la dosis establecida inicialmente para el grupo de células microencapsuladas. Se pudo comprobar que, el volumen máximo elegido (1.5ml) fue el adecuado, al no producirse ningún inconveniente durante el trasplante en casi todos los animales. Sin embargo, en el grupo 1 (cuyo tratamiento incluía la utilización de la nueva formulación farmacéutica) no logramos administrar la dosis ni el volumen de inyección, inicialmente establecidos, debido a que el volumen que éstas ocupaban era mucho mayor. Por este motivo, la dosis administrada en este grupo de tratamiento disminuyó considerablemente. De este modo, la dosis administrada para cada uno de los grupos de tratamiento fue muy similar en los tres últimos tratamientos,

## Resultados

disminuyendo de forma significativa la dosis media administrada para el grupo de células microencapsuladas. En el grupo control no se administraron células, aunque se empleó el mismo volumen del vehículo utilizado en el resto de tratamientos para disminuir el número de variables a la hora de comparar resultados.

Tras la preparación de la dosis establecida, las células eran arrastradas con una jeringa de suero salino con el fin de inyectar el mayor número de células posibles y evitar que éstas se perdieran en la inyección. A pesar de ello, se comprobó el número de paMSC que quedaban retenidas en el catéter mediante un recuento directo, una vez terminada cada una de las intervenciones. Se observó que la cantidad media de células retenidas en el catéter era de unos 3 millones, por lo que se tuvo en cuenta este dato para el ajuste de las dosis en las intervenciones siguientes.

Otro de los aspectos que se observó, como consecuencia del protocolo quirúrgico utilizado en el trasplante, fue la presencia de adherencias torácicas. Estas adherencias, que dificultaron la toma de muestras de los tejidos en las necropsias, fueron atribuidas al proceso de cicatrización normal tras la toracotomía, ya que tras la incisión de la pleura y el pericardio se pueden generar depósitos de fibrina y adherencias torácicas.

### 7.3. Validación de los lotes de paMSC utilizados en los estudios *in vivo*

#### 7.3.1. Estudio de la influencia del marcaje con Endorem® en la viabilidad celular

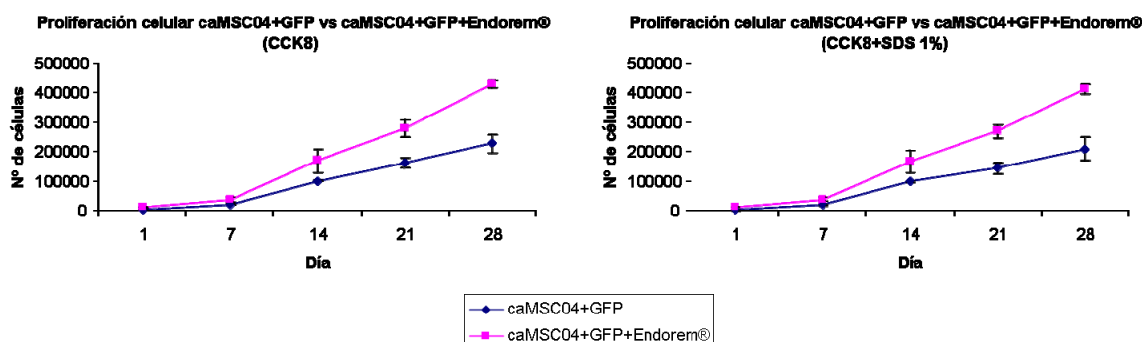
Con el fin de analizar la influencia del marcaje ferromagnético, presente en el marcaje celular con Endorem®, en la viabilidad celular se realizaron dos estudios diferentes en paralelo. Por un lado, y con el objetivo de comparar los resultados obtenidos con las pruebas de viabilidad de las células microencapsuladas (grupo 1), este estudio se llevó a cabo con el reactivo CCK8 (*Cell Counting Kit-8*). Por otro, y con el fin de validar los resultados obtenidos con el CCK-8, se realizaron recuentos celulares de la manera tradicional (mediante exclusión con azul de tripán).

##### **a) Estudio de viabilidad con CCK-8**

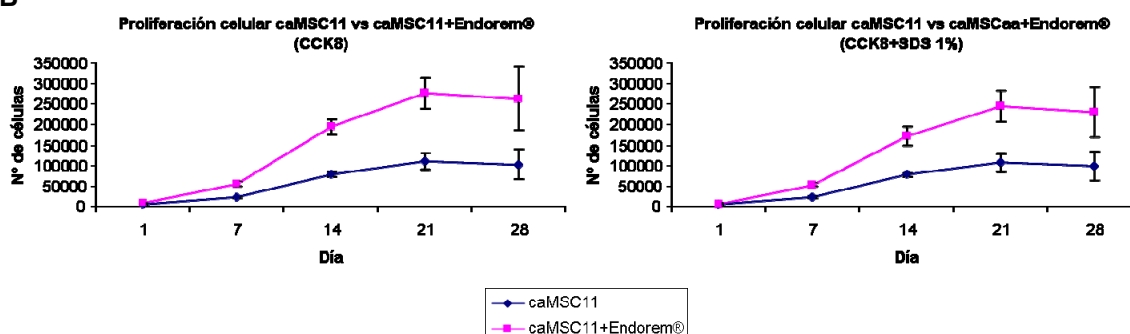
Los resultados obtenidos al comparar la viabilidad celular de los grupos de tratamiento 2 y 3 son los que se muestran en la Figura 45. En B de la misma figura se presentan los de la subpoblación paMSC11 marcadas y sin marcar con Endorem® con el fin de compararlos con el mismo estudio en estas mismas células microencapsuladas (Figura 37B).



A



B

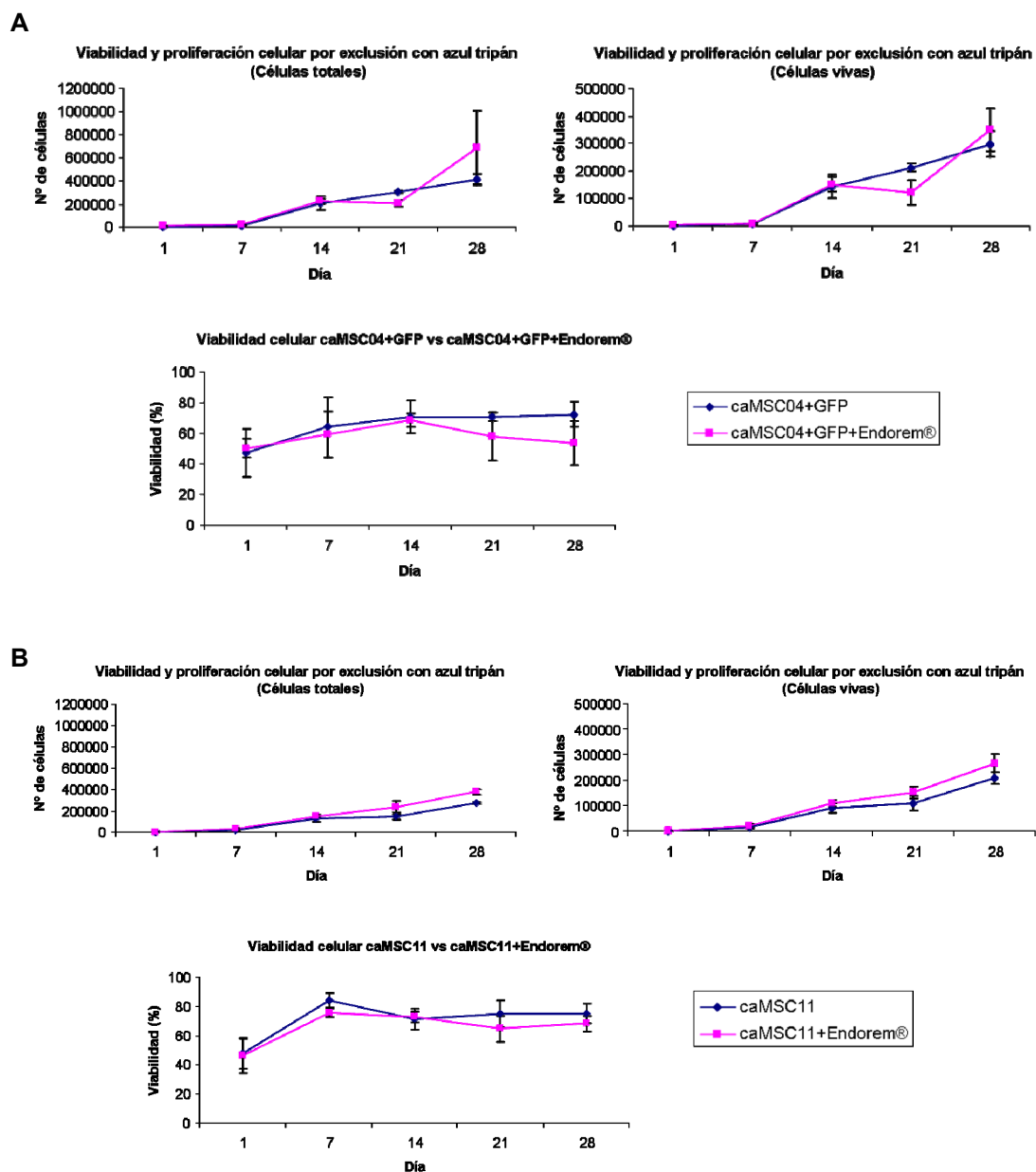


**Figura 45. Estudio comparativo del crecimiento celular mediante el método del CCK-8.** En los gráficos se muestran los resultados obtenidos con las células utilizadas en los grupos de tratamiento 2 y 3 (A) y de las mismas células utilizadas en el grupo 1 sin encapsular, marcadas y sin marcar con Endorem® (B). Los resultados se presentan como en número de células viables (con y sin SDS al 1%).

Los resultados de este estudio no indican diferencias importantes entre las células marcadas y sin marcar con Endorem®; En cualquier caso, estas diferencias favorecen siempre a las células marcadas, las cuales presentan siempre una mayor proliferación que las no marcadas.

#### **b) Estudio de viabilidad con azul de tripán**

Para validar los resultados anteriores obtenidos con el CCK-8, se realizaron recuentos celulares directos mediante el método de exclusión con azul de tripán. Para ello, se analizaron tanto el número total de células presentes en los pocillos como las células viables. Como se observa en la Figura 46, al igual que ocurre en los estudios con el CCK-8, no se han encontrado diferencias importantes entre las células marcadas y sin marcar con Endorem® en ninguna de las subpoblaciones estudiadas.



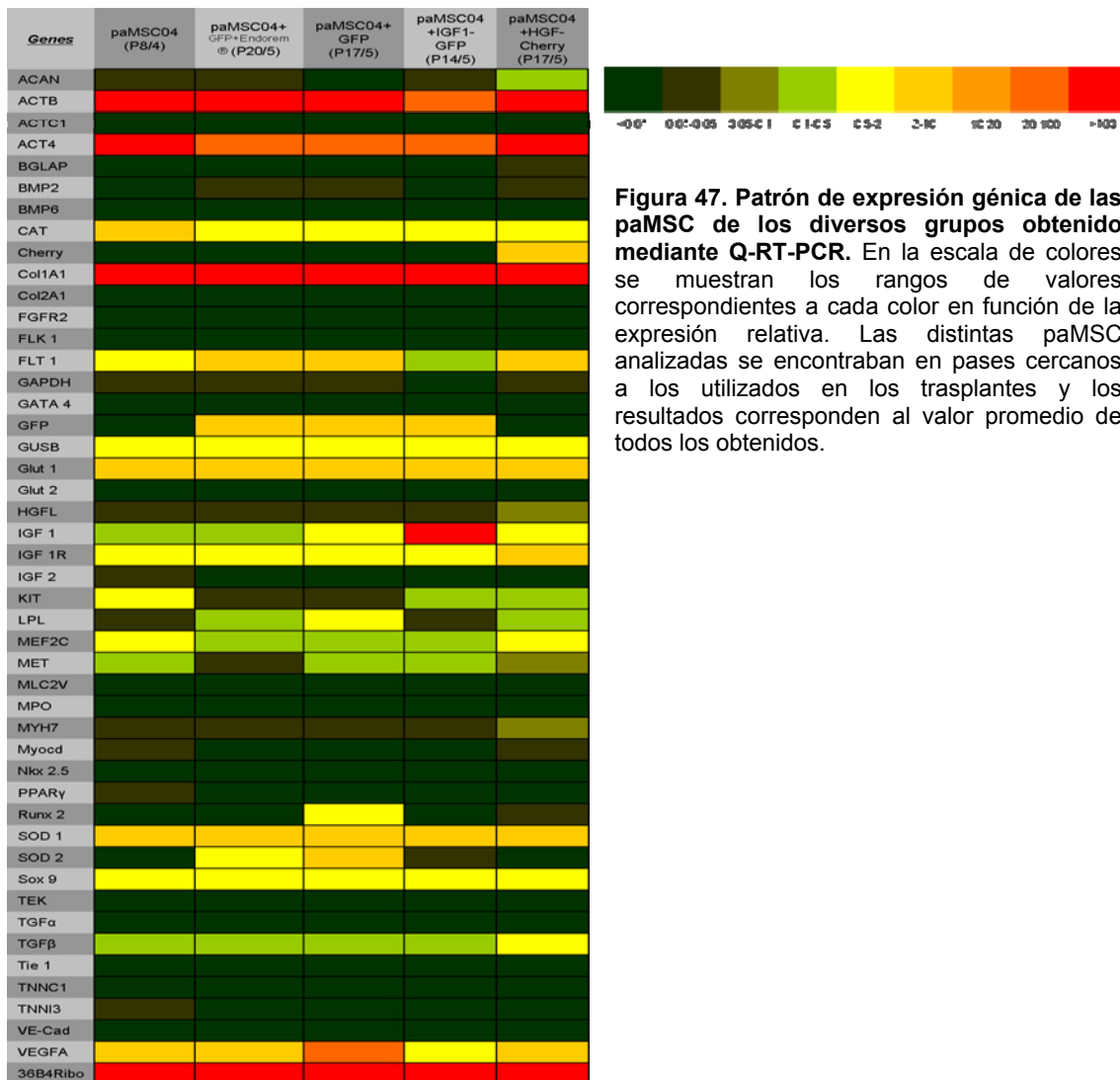
**Figura 46. Estudio comparativo de viabilidad, mediante exclusión con azul de tripán.** En los gráficos se muestran los resultados obtenidos con las células utilizadas en los grupos de tratamiento 2 y 3 (A) y de las mismas células utilizadas en el grupo 1 sin encapsular, marcadas y sin marcar con Endorem® (B). Los resultados se presentan como número total de células contadas, células vivas y viabilidad respecto al número total.

La proliferación celular obtenida es algo menos constante al utilizar el Endorem® en las paMSC que expresan GFP. El estancamiento observado en las paMSC+GFP+Endorem® durante la tercera semana hace que, a pesar de presentar un mayor número de células totales el último día del estudio, las diferencias en cuanto a número de células vivas se reduzcan siendo, finalmente, la viabilidad (en %) algo inferior al utilizar el Endorem® (tratamiento 2) respecto a las que no lo utilizan (tratamiento 3). En el estudio de las células que fueron encapsuladas y se utilizaron como tratamiento en el grupo 1, los resultados fueron muy similares, siendo casi inapreciables las diferencias encontradas entre el uso o no del Endorem®.



### 7.3.2. Análisis molecular de las células utilizadas en los distintos grupos de tratamiento

En la Figura 47 se muestran los resultados obtenidos en este análisis donde se aprecia la similitud en el patrón de expresión de las distintas paMSC utilizadas en los tratamientos.



**Figura 47. Patrón de expresión génica de las paMSC de los diversos grupos obtenido mediante Q-RT-PCR.** En la escala de colores se muestran los rangos de valores correspondientes a cada color en función de la expresión relativa. Las distintas paMSC analizadas se encontraban en pases cercanos a los utilizados en los trasplantes y los resultados corresponden al valor promedio de todos los obtenidos.

A pesar de ello, pueden apreciarse algunas variaciones; entre ellas destaca una expresión muy superior de IGF1 en el grupo de paMSC transducidas con el vector pRRLsin18.CMV-IGF1-IRES-eGFP. También en éste grupo, al igual que en los tratamientos utilizados en los grupos 2 y 3, se observa la expresión de GFP frente a su ausencia en el primer y último grupo de paMSC. Del mismo modo, y como se esperaba, el grupo de paMSC transducidas con el vector pRRLsin18.CMV-HGF-IRES-Cherry presenta niveles de expresión superiores para HGFL así como para el fluoróforo utilizado en este vector (Cherry), el cual se encuentra ausente en el resto de paMSC. También en este grupo, los niveles de ACAN se encuentran ligeramente aumentados respecto del resto de paMSC. Por otra parte, se observan ligeras variaciones en el caso de la expresión de KIT (marcador de membrana identificativo de células primitivas), donde su presencia es superior en las células sin transducir disminuyendo ésta en las células que fueron transducidas para sobreexpresar IGF1/HGF. Las células utilizadas

## Resultados

en los grupos 2 y 3 son los que presentaron los niveles más bajos de este marcador. Finalmente, puede observarse un ligero aumento en la expresión de Runx 2, VEGFA, LPL y SOD2 en el grupo de las paMSC marcadas únicamente con GFP respecto al resto de células estudiadas.

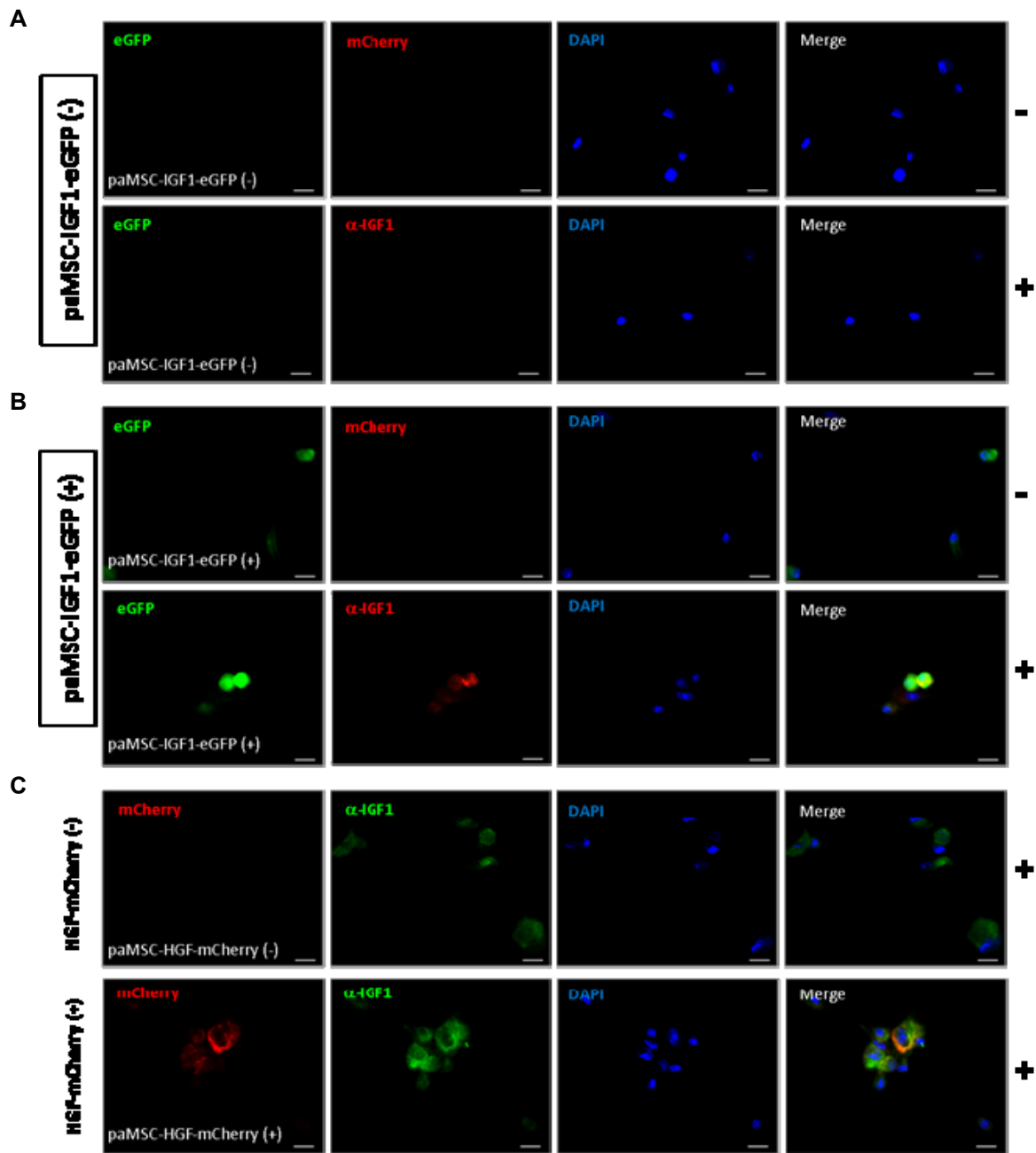
### 7.3.3. Estudios realizados en las células empleadas en el grupo de tratamiento 4 (paMSC IGF1-eGFP/HGF-mCherry)

#### **a) Estudio inmunocitoquímico de las paMSC transducidas, utilizadas en el grupo 4**

Una vez separadas las células transducidas mediante “*sorting*”, se procedió a confirmar la expresión de los genes implicados en las infecciones de todas las poblaciones. Tanto en el caso de las paMSC transducidas con el vector pRRLsin18.CMV-IGF1-IRES-eGFP como en el de las transducidas con pRRLsin18.CMV-HGF-IRES-Cherry, se realizaron los estudios inmunocitoquímicos correspondientes. Estos se hicieron, en primer lugar, contra IGF1 en las distintas poblaciones (las obtenidas como negativas tras la separación, las positivas y como control negativo las obtenidas de la transducción con la construcción pRRLsin18.CMV-HGF-IRES-Cherry).

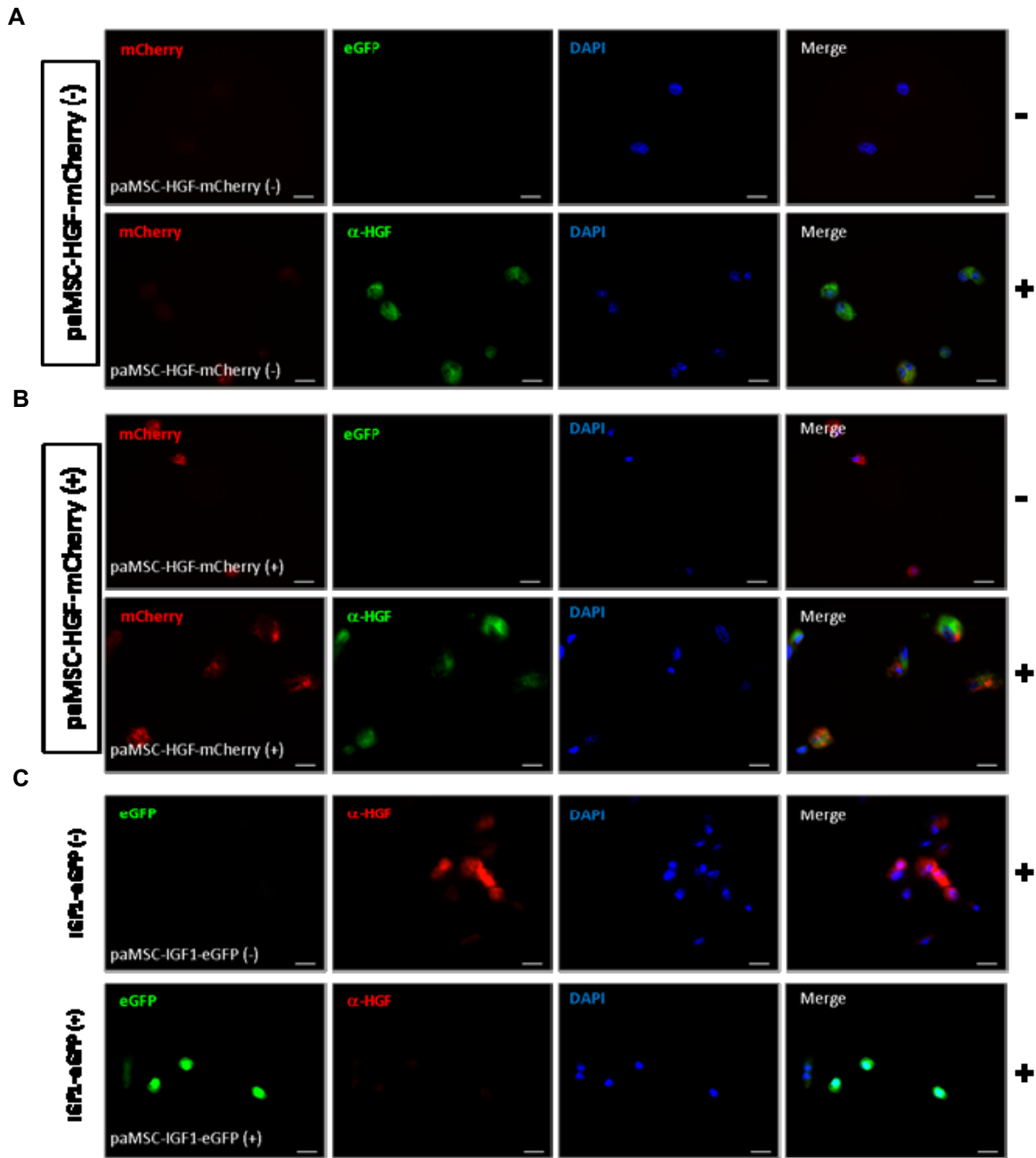
Así las inmunocitoquímicas señaladas como (-) en el signo de la derecha son aquellas donde no se han incluido el anticuerpo primario, (sólo se ha puesto el secundario) y nos sirve de control negativo de la técnica. Las señaladas como (+) son aquellas que llevan ambos anticuerpos.

En la Figura 48 se confirma que la separación celular se desarrolló de forma correcta obteniendo los resultados esperados. Destaca la expresión de IGF1 en el control negativo de transducción (tanto en la población negativa paMSC-HGF-mCherry (-) como para la positiva paMSC-HGF-mCherry (+), que se observa en C de esta figura. Esto puede ser debido a que, al estar analizando expresión de IGF1, la expresión observada sea la que se produce de forma basal en este tipo de células.



**Figura 48. ICQ post-sorting  $\alpha$ -IGF1.** Inmunoquímicas realizadas contra IGF1 en las poblaciones obtenidas tras la separación celular de la transducción de las paMSC con el vector pRRLsin18.CMV-IGF1-IRES-eGFP (las negativas en la figura **A**, las positivas en **B**) así como una población de células utilizada como control negativo de la transducción con pRRLsin18.CMV-IGF1-IRES-eGFP en **C**. (Barra: 20  $\mu$ m).

En el caso de las inmunoquímicas contra HGF ocurre lo mismo que para el caso anterior donde los resultados confirman una separación adecuada de las poblaciones (Figura 49).



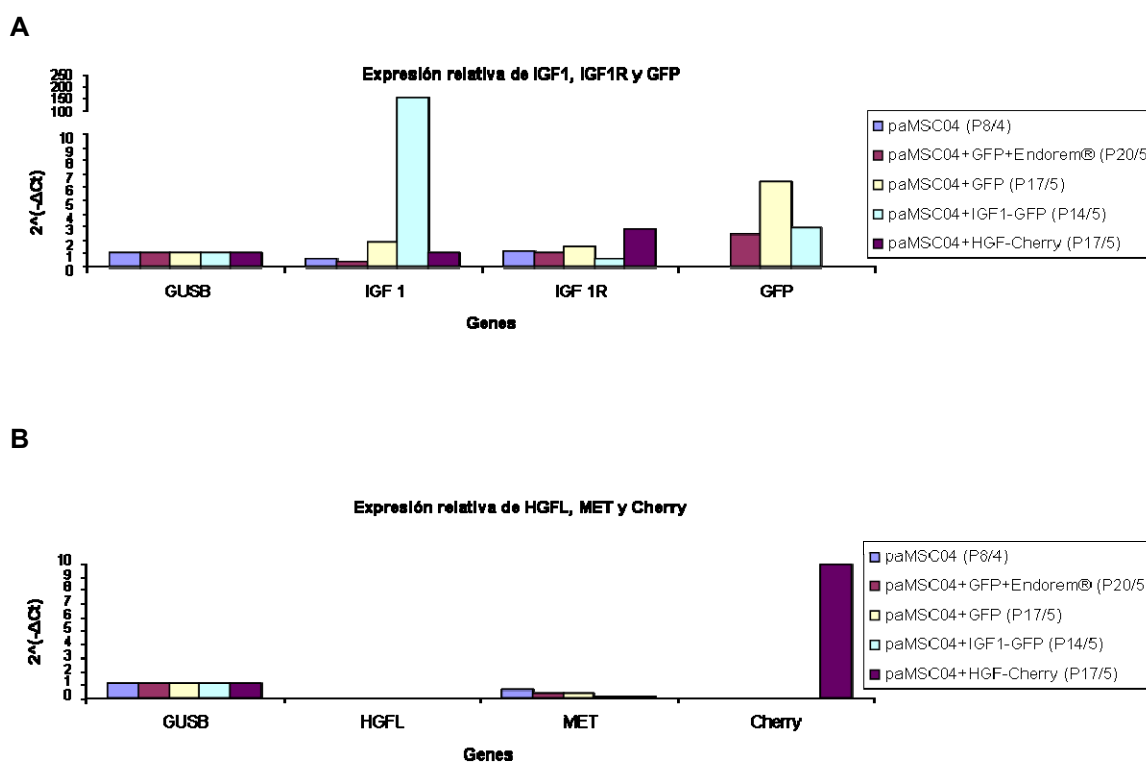
**Figura 49. ICQ post-sorting  $\alpha$ -HGF.** Inmunocitoquímicas realizadas contra HGF en las poblaciones obtenidas tras la separación celular de la transducción de las paMSC con el vector pRRLsin18.CMV-HGF-IRES-Cherry (las negativas en la figura **A**, las positivas en **B**) así como la población de células transducidas con el vector pRRLsin18.CMV-IGF1-IRES-eGFP como control negativo de la transducción con pRRLsin18.CMV-HGF-IRES-Cherry (**C**). (Barra: 20  $\mu$ m)

En la población negativa únicamente se aprecia la expresión basal de HGF en verde (a consecuencia del empleo de ese color en el anticuerpo secundario), confirmando la ausencia de fluorescencia por GFP o mCherry. Sin embargo, en la población positiva se aprecia sobreexpresión de HGF, en amarillo (consecuencia de la mezcla del verde del anticuerpo secundario y la fluorescencia roja del vector con mCherry). Al igual que ocurre con IGF1, en este caso también se observa expresión de HGF para los controles negativos de infección (en

C) pero esta expresión es mucho menor y se entiende que de forma basal las paMSC producen niveles bajos.

### b) Análisis molecular de las paMSC transducidas, utilizadas en el grupo 4

La valoración de los marcadores directamente relacionados con la actividad de los genes manipulados se muestra en la Figura 50. En esta figura se observa la expresión del gen que codifica la proteína IGF1, la de su receptor IGF1R y la del fluoróforo utilizado en el proceso de infección eGFP (Figura 50A). Por otro lado, en B puede apreciarse la expresión obtenida de HGF, de su receptor c-MET y la del fluoróforo Cherry en las distintas líneas celulares estudiadas.



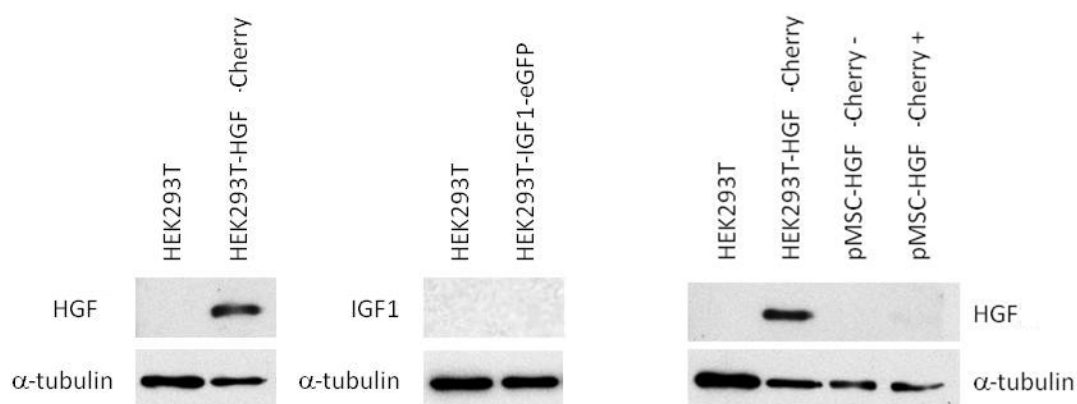
**Figura 50. Expresión relativa de los marcadores de interés en las células utilizadas en los distintos grupos de tratamiento.** En el caso del grupo 1, se ha utilizado la subpoblación 04 en lugar de la 11 con el fin de poder servir también de control respecto a las células infectadas del resto de grupos. **A:** Expresión relativa de IGF1, IGF1R y GFP respecto al gen endógeno GUSB. **B:** Expresión relativa de HGFL, c-MET y Cherry tomando de referencia el mismo endógeno.

Los marcadores para GFP y Cherry se expresan en las células en la que intervienen como marcadores de la transducción. Esta expresión, en el caso del GFP, es mayor en el grupo donde sólo interviene este marcador frente a su combinación tanto con el complejo Endorem® como en el caso de las paMSC infectadas con IGF1. La expresión de Cherry es clara en el último grupo de células analizado donde únicamente aparece. El mRNA correspondiente a IGF1 se vio elevada de una forma significativa en las paMSC infectadas con el vector pRRLsin18.CMV-IGF1-IRES-eGFP respecto al resto de líneas estudiadas, confirmando su sobreexpresión sin embargo su receptor IGF1R en esta línea celular disminuye ligeramente.

## Resultados

La variación del mRNA correspondiente a la proteína HGF mediante Q-RT-PCR es casi inapreciable en las células paMSC infectadas con el vector pRRLsin18.CMV-HGF-IRES-Cherry respecto al resto de paMSC analizadas. A pesar de ello, dicha variación si se observó en los análisis inmunocitoquímicos anteriormente descritos. La expresión de su receptor c-MET disminuye también en esta línea celular, al igual que ocurre con IGF1R en las paMSC transducidas con IGF1-GFP.

Aunque se confirmó la funcionalidad del anticuerpo para HGF mediante western blot, los resultados no fueron satisfactorios observándose una leve expresión de HGF, seguramente porque la cantidad de proteína analizada en este caso era insuficiente (Figura 51). Por el contrario, a pesar de varios intentos, no fue posible obtener ningún tipo de resultados con el anticuerpo para IGF1 por lo que se descartó para esta técnica.



**Figura 51. Análisis de la expresión proteica de HGF en las poblaciones celulares resultantes de la transducción con el vector pRRLsin18.CMV-HGF-IRES-Cherry.** Como control de población se utilizó la línea celular HEK293T, utilizada en el clonaje.

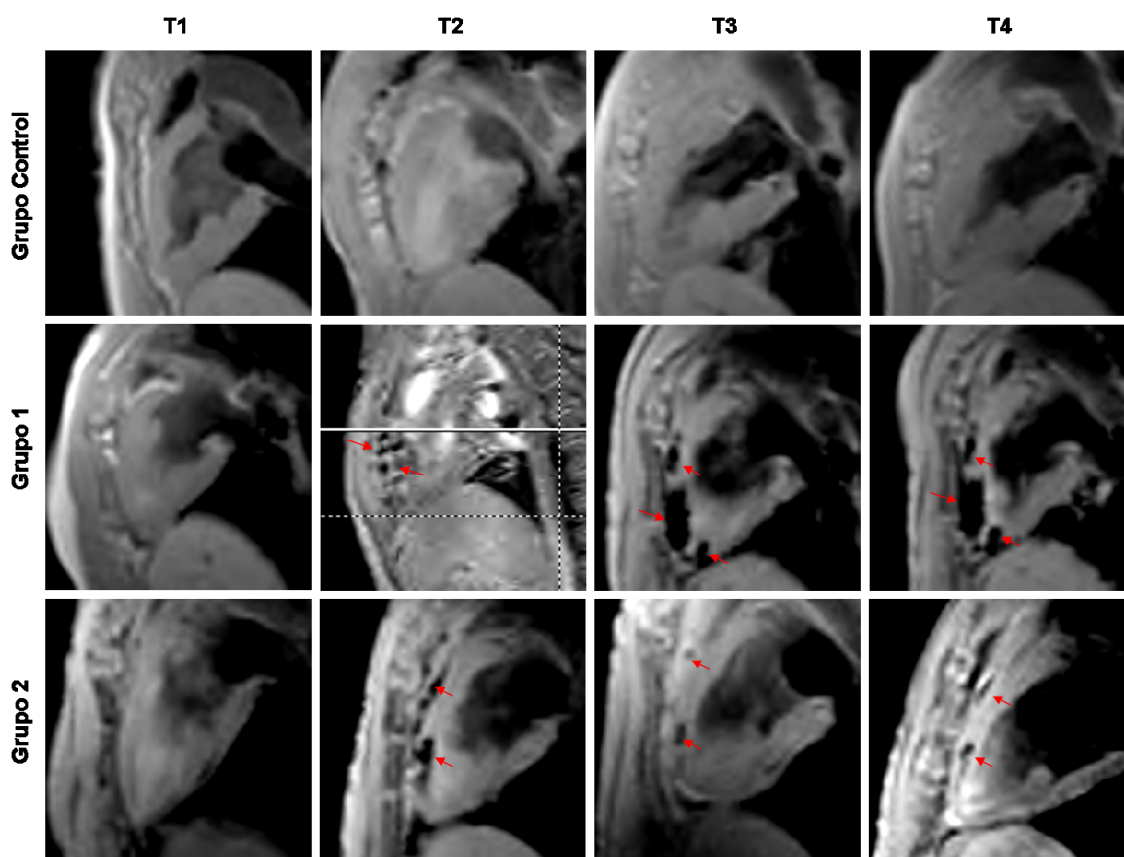
## 7.4. Análisis tras las intervenciones terapéuticas

### 7.4.1. Análisis tras el trasplante: seguimientos *in vivo*

#### a) Estudio de localización celular. Seguimiento por RMN

Para este estudio, se tomaron secuencias de imágenes T2Star (T2\*) por RMN en secciones en eje largo del corazón donde se pudieron apreciar las señales producidas por el hierro del marcaje de los tratamientos (Figura 52). A pesar de la diferencia en la dosis administrada en ambos grupos analizados (la dosis en el grupo 1, en número absoluto de células, fue significativamente inferior a la administrada en el grupo 2), las señales generadas en los animales cuyo tratamiento incluyeron la nueva formulación farmacéutica fueron mucho más intensas que aquellas que no la utilizaron. Esto pudiera ser debido a la superficie de marcaje que en el caso del grupo 1, en las magnetocápsulas es muy superior a las células en suspensión. Aunque la dosis celular administrada en el grupo 2 sea superior, las células pudieran diseminarse en el tejido, rápidamente, obteniendo una señal menos intensa que en el caso de las magnetocápsulas siendo más difícil su localización. De este modo, estos resultados nos indican que el empleo de esta nueva formulación farmacéutica favorece el anidamiento y

localización de este tipo de tratamientos aunque sea limitante en el aspecto de la dosis administrable.



**Figura 52. Localización celular por RMN.** En la figura se muestran las secuencias de imágenes de un animal representativo de los grupos control, células paMSC microencapsuladas (grupo 1) y paMSC marcadas con Endorem® (grupo 2). Imágenes tomadas en eje largo y bajo el formato T2Star (T2\*). La flecha indica la localización de los tratamientos marcados con Endorem® en los grupos estudiados.

## ***b) Estudio de la evolución del IAM durante el tiempo de seguimiento***

### ***b.1) Estudios por RMN***

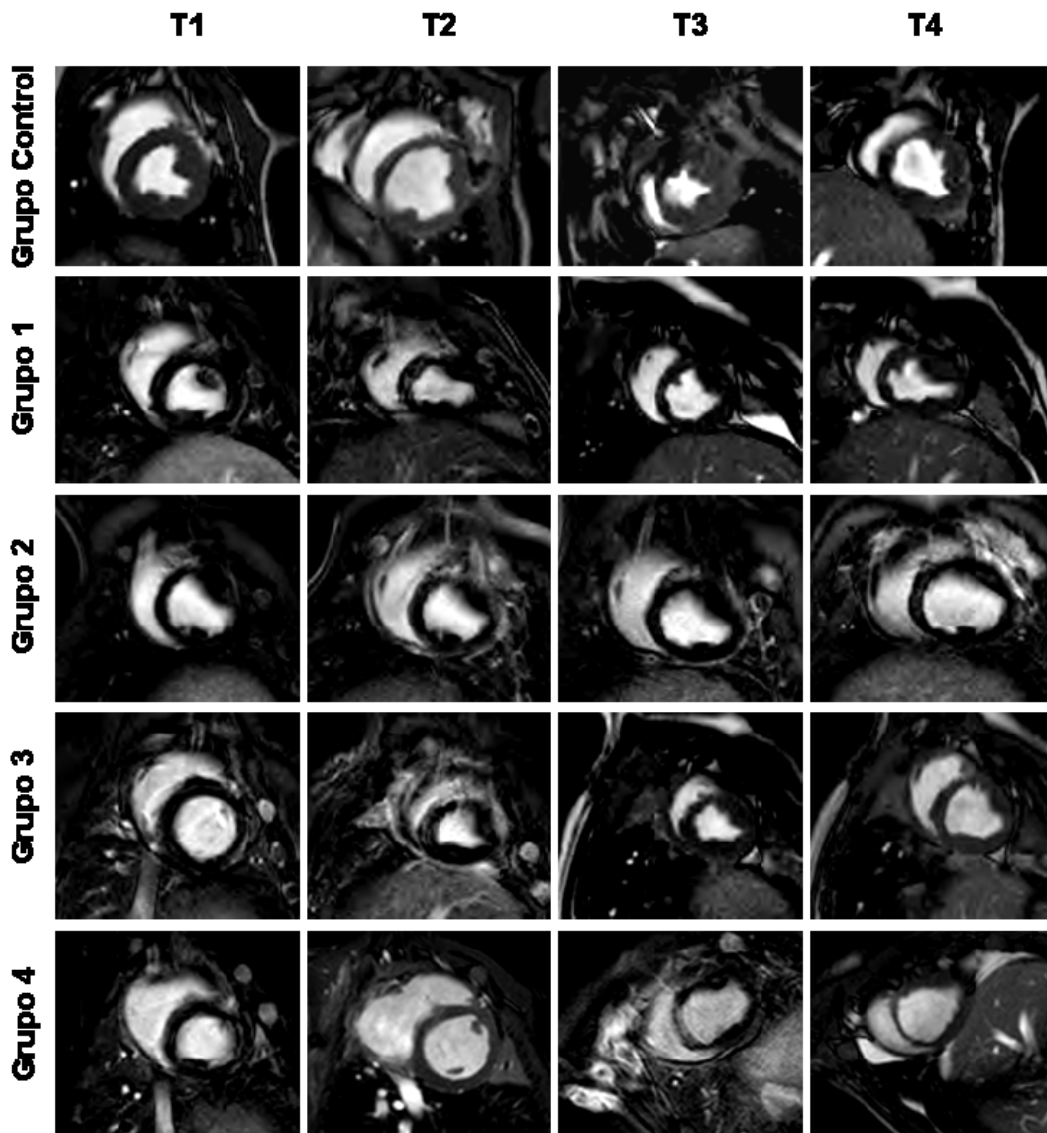
El análisis de las imágenes de RMN contribuyó en la valoración de la evolución de las lesiones del tejido cardíaco a lo largo del tiempo. En las secuencias tomadas del corazón en eje corto de todos los animales (donde se aprecian los dos ventrículos y el septo interventricular), se observó la evolución de los daños producidos por el IAM. La localización de las zonas afectadas es determinante para analizar la evolución del proceso a través de esta técnica diagnóstica.

En la Figura 53 se presenta una secuencia de imágenes representativa de los resultados de este estudio, donde se muestra la evolución observada en uno de los animales de cada grupo. En ella se aprecia como en las imágenes basales (T1), la pared del ventrículo izquierdo no sufre ningún tipo de lesión, puesto que su grosor es similar y homogéneo en todos sus puntos. En la imágenes correspondientes a los 15 primeros días tras la inducción de la



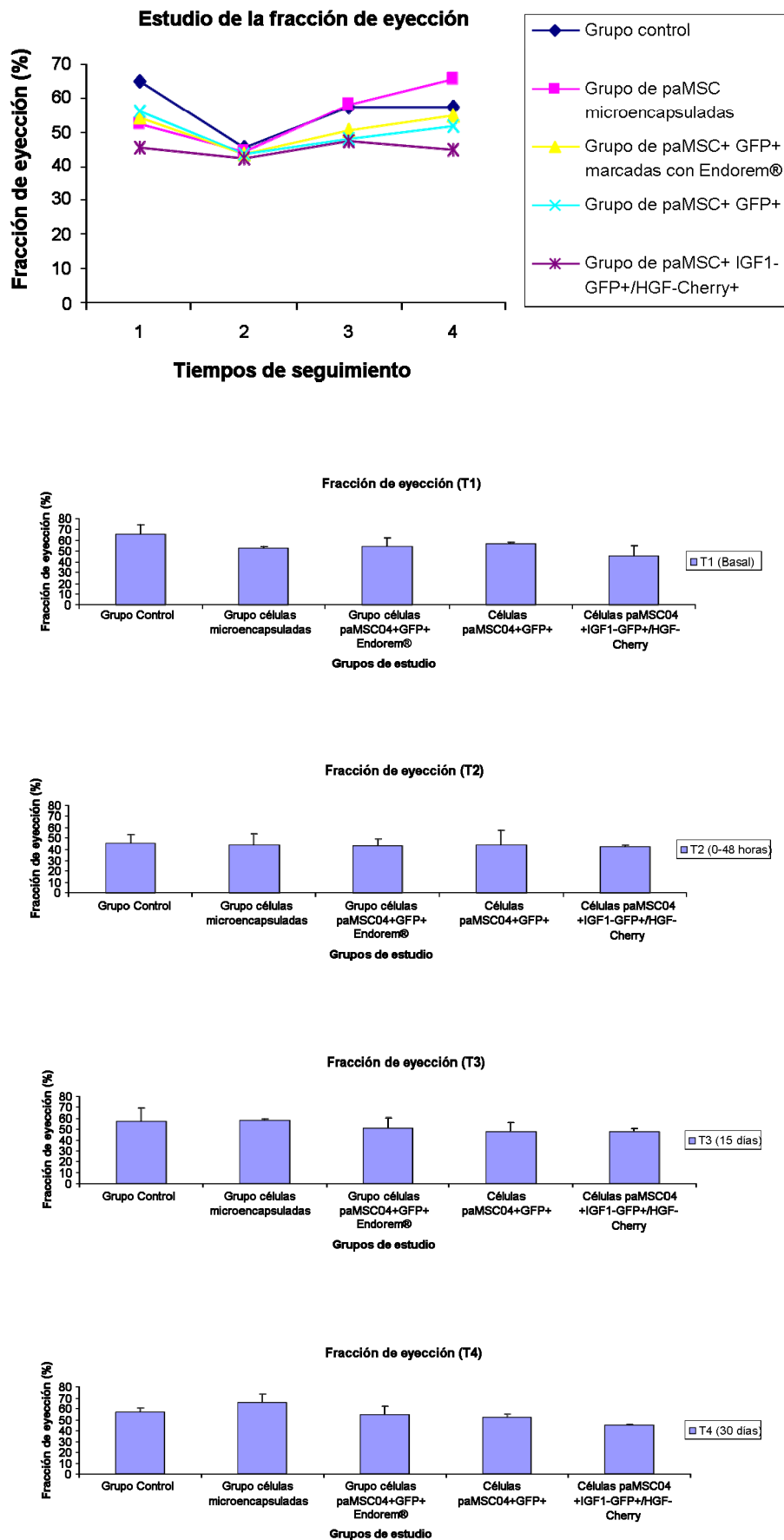
## Resultados

patología cardíaca (T2 y T3), se observa una reducción gradual del septo interventricular más próxima al ápex, principalmente en el grupo control y el grupo 4, donde se produce un claro estrechamiento de la pared ventricular a causa de las lesiones ocasionadas. Transcurrido el mes de monitorización de los animales (T4), aunque no se produce una recuperación total de las lesiones, se observa una leve mejora de las zonas afectadas en todos los grupos, obteniéndose en algunos casos imágenes similares a las basales, como se aprecia en las correspondientes a los grupos 1 y 2.



**Figura 53. Seguimiento del IAM a través de imágenes de RMN.** En la figura se muestran las secuencias de imágenes de un animal representativo de cada uno de los grupos de estudio a lo largo de los cuatro tiempos de seguimiento establecidos. Imágenes tomadas en eje corto y bajo el formato T2.

Los resultados obtenidos al evaluar los parámetros que determinan la funcionalidad cardíaca son los presentados en las Figuras 54-58 que se muestran a continuación:



**Figura 54. Estudio de la fracción de eyeción.** En el gráfico general se presentan los resultados obtenidos en la fracción de eyeción (%) de los distintos grupos a lo largo de todo el estudio. En los gráficos de barras se representan los valores obtenidos en cada uno de los tiempos de seguimiento.

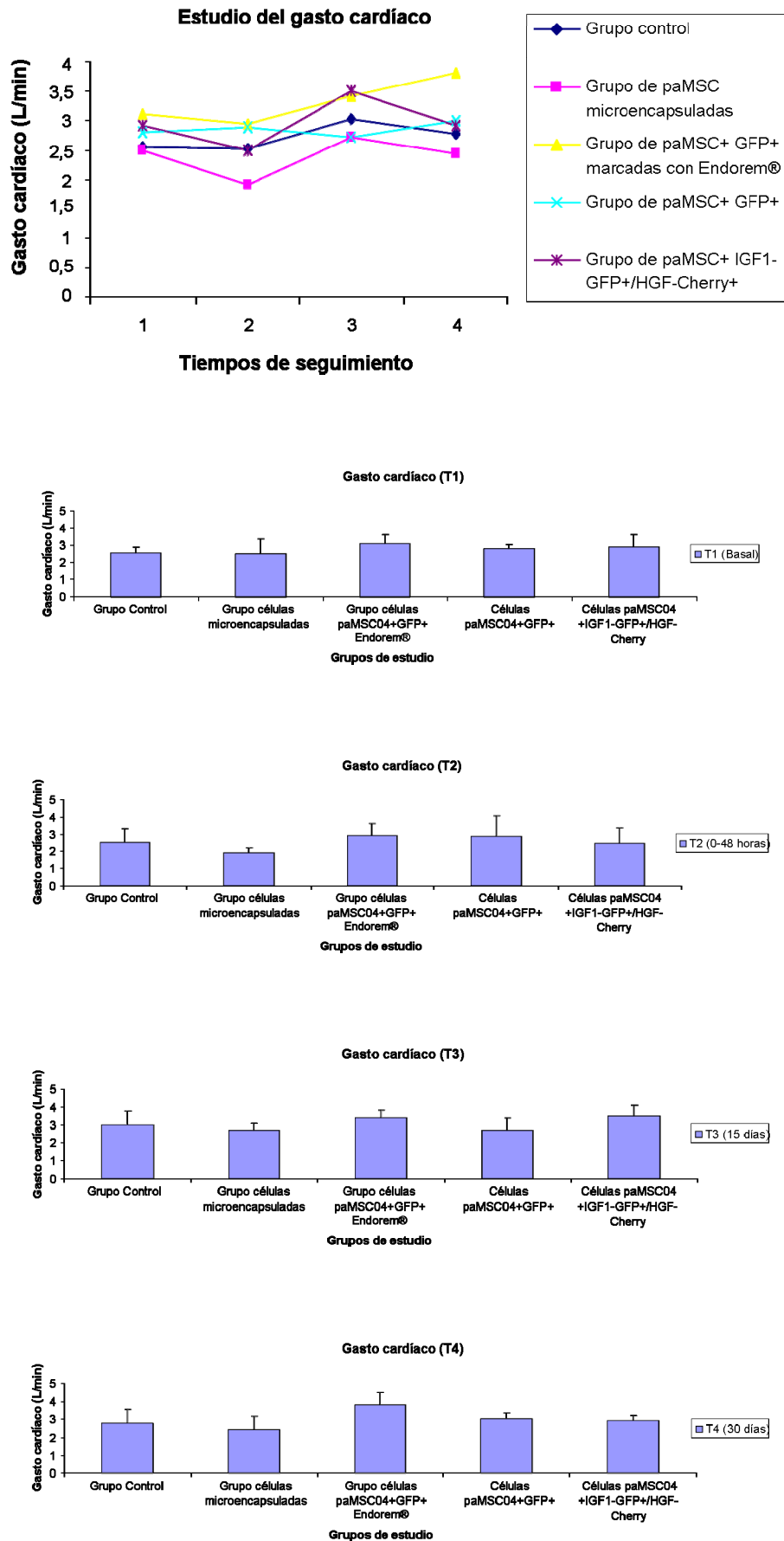


Figura 55. Valoración del gasto cardíaco a lo largo del estudio.

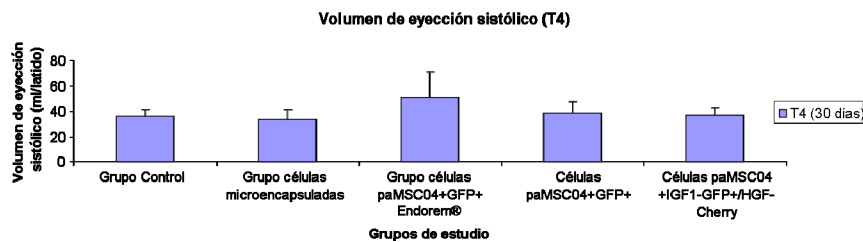
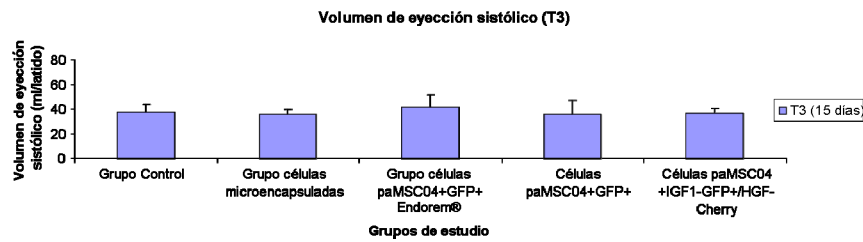
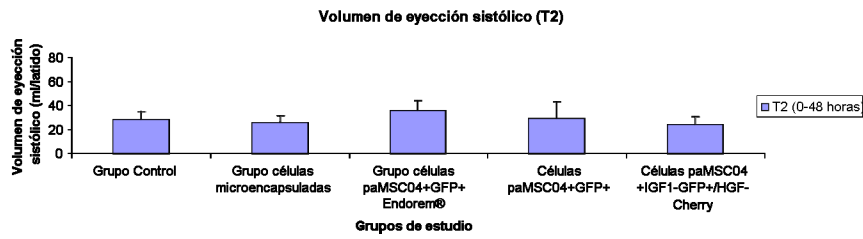
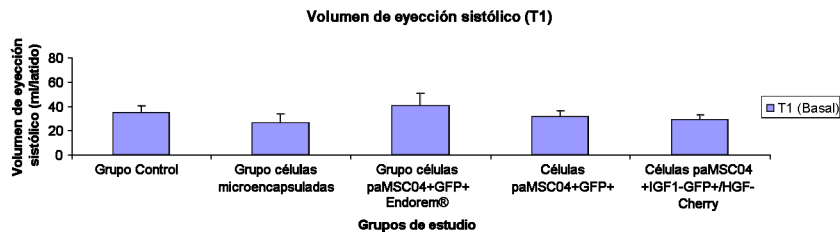
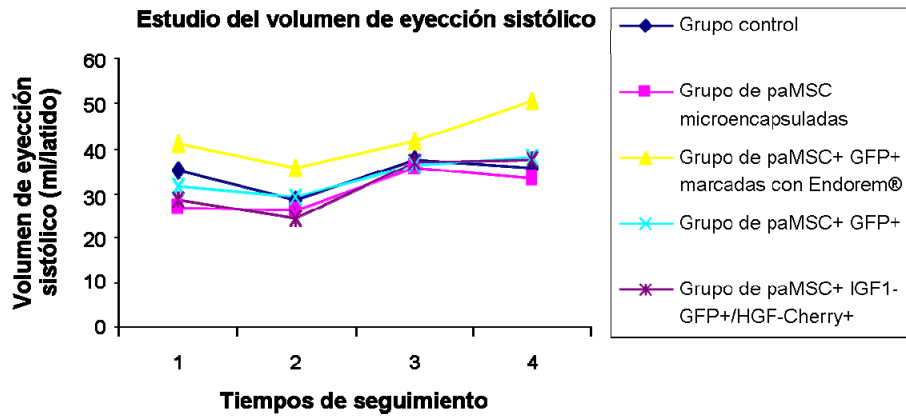


Figura 56. Estudio del volumen de eyeción sistólico.

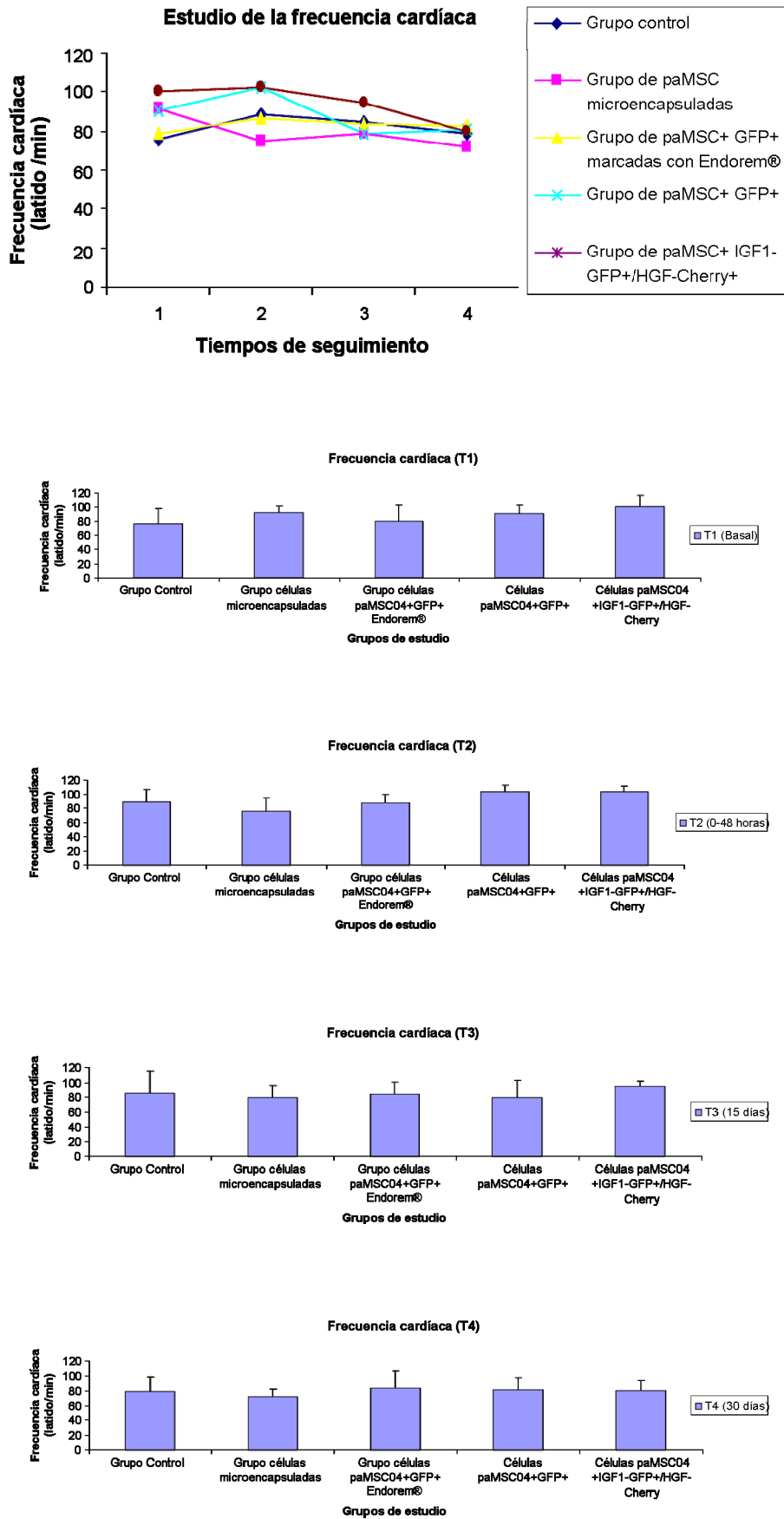


Figura 57. Estudio de la frecuencia cardíaca llevado a cabo durante todo el estudio.

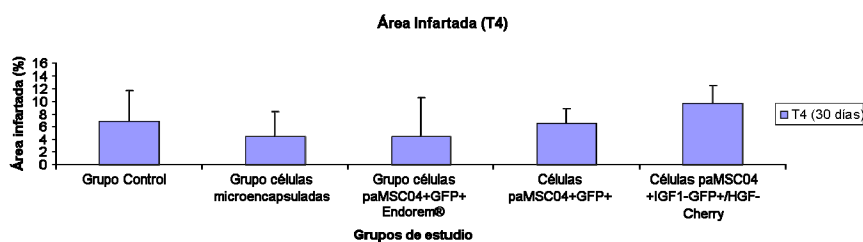
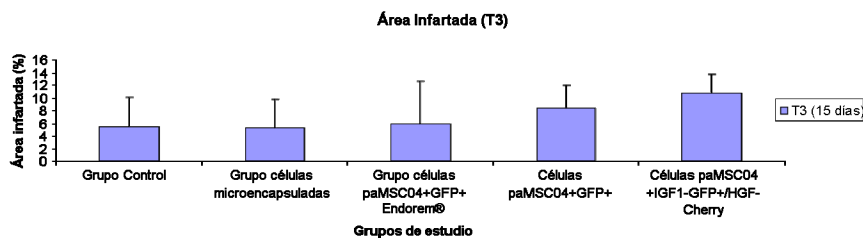
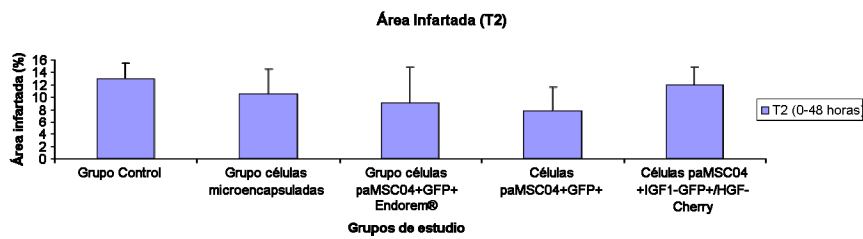
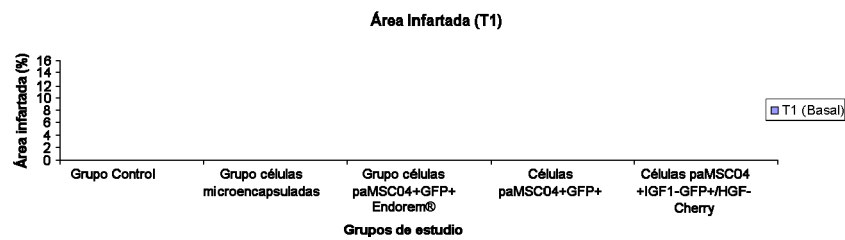
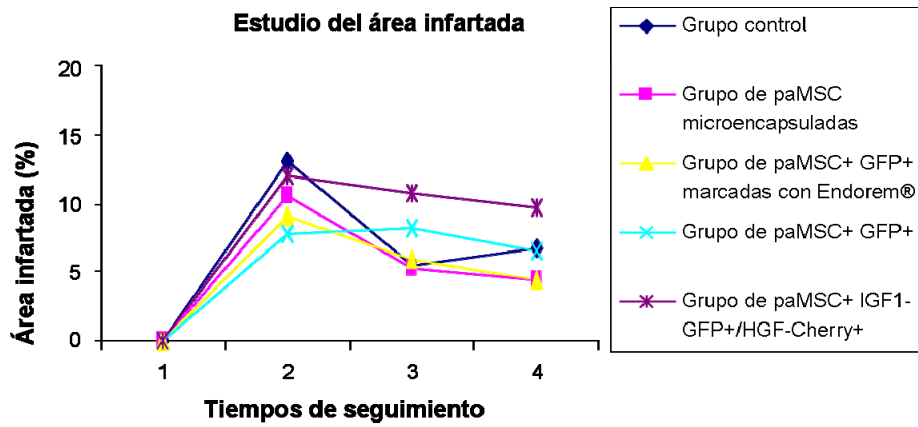


Figura 58. Análisis del área infartada (%) obtenido a través de los estudios con las imágenes de Resonancia Magnética.

## Resultados

En el estudio de la fracción de eyección (Figura 54) se observa como, en todos los grupos estudiados, en T2 (0-48h) se produce una reducción de los % respecto a los valores basales (T1), a causa del daño producido por la inducción del IAM. Esta reducción fue mayor en el grupo control, seguido de los grupo 3 y 2, respectivamente. Sin embargo, es importante señalar también que es en estos grupos donde los % basales presentan valores mas elevados. A medida que pasa el tiempo, y tras la administración de los tratamientos, se va produciendo una recuperación alcanzando niveles muy parecidos a los iniciales en la mayor parte de los grupos con tratamiento celular, e incluso en algún grupo (grupo 1 con paMSC microencapsuladas como tratamiento), mejorando en T4 los obtenidos antes de la producción de la patología cardíaca. Los porcentajes de recuperación obtenidos al comparar los valores de fracción de eyección en T4 con los presentados tras la inducción de la patología cardíaca (T2), mostraron una mayor recuperación en el grupo 1 (21,97%), seguido del grupo control (11,77%), el grupo 2 (11,42%) y el grupo 3 (8,43%), siendo el grupo 4 donde la recuperación en este parámetro funcional fue menor (2,34%), tras un mes de la administración del tratamiento (valores medios de recuperación en %).

Respecto a los resultados obtenidos en el gasto cardíaco (Figura 55) y volumen de eyección sistólico (Figura 56) se observan algunas similitudes en el comportamiento de ambos parámetros en casi todos los grupos estudiados. Por un lado, en el grupo control y el grupo 1 se produce una reducción de ambos valores en T2 respecto a T1, mientras que a los 15 días de estudio (T3) estos valores mejoran los obtenidos antes de la patología. Durante los últimos 15 días de estudio, estos valores se estabilizan y disminuyen ligeramente, aunque superando los obtenidos de forma basal (T1). En los grupos 2 y 3, donde se administraron paMSC+GFP+Endorem® y paMSC+GFP respectivamente, la evolución de estos dos parámetros a lo largo del estudio es similar a los grupos anteriormente descritos, con la diferencia de que en el último seguimiento (T4), ambos valores siguen mejorando respecto a los obtenidos en el seguimiento anterior (T3), superando en todos los casos los valores previos a la inducción del IAM. En el grupo 4 (paMSC+IGF1-GFP/HGF-Cherry) la evolución del gasto cardíaco es similar a los dos primeros grupos (disminuyendo su valor en T4 respecto a T3, aunque alcanzando los valores basales), mientras que el volumen de eyección sistólico en T4 mejora los obtenidos en el estudio anterior (T3), al igual que ocurre en los grupos 2 y 3.

En relación a los análisis realizados de la frecuencia cardíaca (Figura 57) se observa una gran variabilidad en los resultados durante todo el estudio, aunque por lo general este parámetro, después de un mes de seguimiento (T4), disminuye respecto a sus valores iniciales (T1) como se observa en los grupos 1, 3 y 4. En los grupos de estudio donde se ven aumentados (grupo control y grupo 2), este aumento es moderado con diferencias muy leves respecto a los basales.

Finalmente, en los resultados obtenidos referentes al área de infarto (Figura 58), en todos los casos se observa la ausencia de zonas dañadas antes del IAM, alcanzándose valores



medios de entre un 7.75% y un 13% en el área de infarto obtenido por la inducción de la patología cardíaca (T2). Durante el tiempo de monitorización, aunque en ningún caso se recuperan los valores basales, se observa una reducción gradual del % de área infartada en todos los grupos.

Los datos numéricos de estos resultados, representados en las figuras anteriormente indicadas, se resumen en la Tabla 11:

Grupo	Tiempo	Fracción de eyección (%)	Gasto cardíaco (L/min)	Volumen de eyección sistólico (ml/latido)	Frecuencia cardíaca (latido/min)	Área infartada (%)
Grupo Control	1	64.93±9.07	2.55±0.35	34.85±6.29	75.75±22.23	0±0
	2	45.38±8.17	2.53±0.79	28.58±6.72	88.25±18.46	13±2.58
	3	57.45±12.24	3.03±0.75	37.25±6.66	84.75±30.63	5.5±4.51
	4	57.15±3.54	2.78±0.78	35.7±4.85	78.25±19.97	6.75±4.99
Grupo de paMSC microencapsuladas (Grupo 1)	1	52.08±1.97	2.5±0.88	27±7.03	91.5±10.38	0±0
	2	43.88±10.46	1.9±0.32	26.05±5.54	74.75±19.97	10.5±4.04
	3	57.88±2.24	2.73±0.38	35.43±4.56	78.75±17.40	5.25±4.57
	4	65.85±7.63	2.43±0.73	33.13±7.50	71.75±9.84	4.5±3.87
Grupo de paMSC04+ GFP+Endorem® (Grupo 2)	1	54.18±7.72	3.1±0.51	40.75±10.23	79±23.49	0±0
	2	43.23±5.77	2.95±0.69	35.75±8.57	87±12.49	9±5.83
	3	50.7±9.68	3.43±0.42	41.55±9.71	83.75±16.5	6±6.68
	4	54.85±7.95	3.8±0.73	50.35±20.89	82.75±23.67	4.5±6.14
Grupo de paMSC04+GFP+ (Grupo 3)	1	56±1.93	2.8±0.26	31.35±5.58	90.75±11.76	0±0
	2	43.25±14.02	2.88±1.23	29.4±13.99	102.5±10.08	7.75±3.86
	3	47.75±8.78	2.73±0.66	36.18±11.37	79±23.71	8.25±3.77
	4	51.68±3.57	3±0.36	38.3±8.89	80.5±16.38	6.5±2.38
Grupo de paMSC04 + IGF1-GFP+/HGF-Cherry+ (Grupo 4)	1	45.3±9.35	2.9±0.74	28.78±4.94	100.25±15.71	0±0
	2	42.23±1.25	2.5±0.89	24.27±6.34	102.87±9.29	12±2.83
	3	47.5±3.76	3.5±0.61	36.73±3.80	94.67±7.64	10.67±3.06
	4	44.57±1.11	2.9±0.3	37.13±5.54	80±14.11	9.67±2.89

Tabla 11. Resultados obtenidos de los parámetros analizados mediante RMN (valores medios de cada grupo y sus desviaciones).

Al realizar el análisis estadístico de estos datos se observa que, a pesar de no haber diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados, en todos los grupos se produce una reacción a la inducción de la patología cardíaca. Esto se comprueba al comparar los datos obtenidos en T2 (0-48 horas) con los valores basales, donde se aprecia una disminución de la función cardíaca al analizar parámetros como la fracción de eyección, el gasto cardíaco o el volumen de eyección sistólico. Además, el % de área de infarto observado en este tiempo de seguimiento (T2), corrobora las lesiones producidas, dado que los estudios iniciales se caracterizan por la ausencia completa de zonas dañadas en todos los grupos. Por otra parte, esta disminución de la funcionalidad cardíaca se ve recuperada con el paso del tiempo en todos

## Resultados

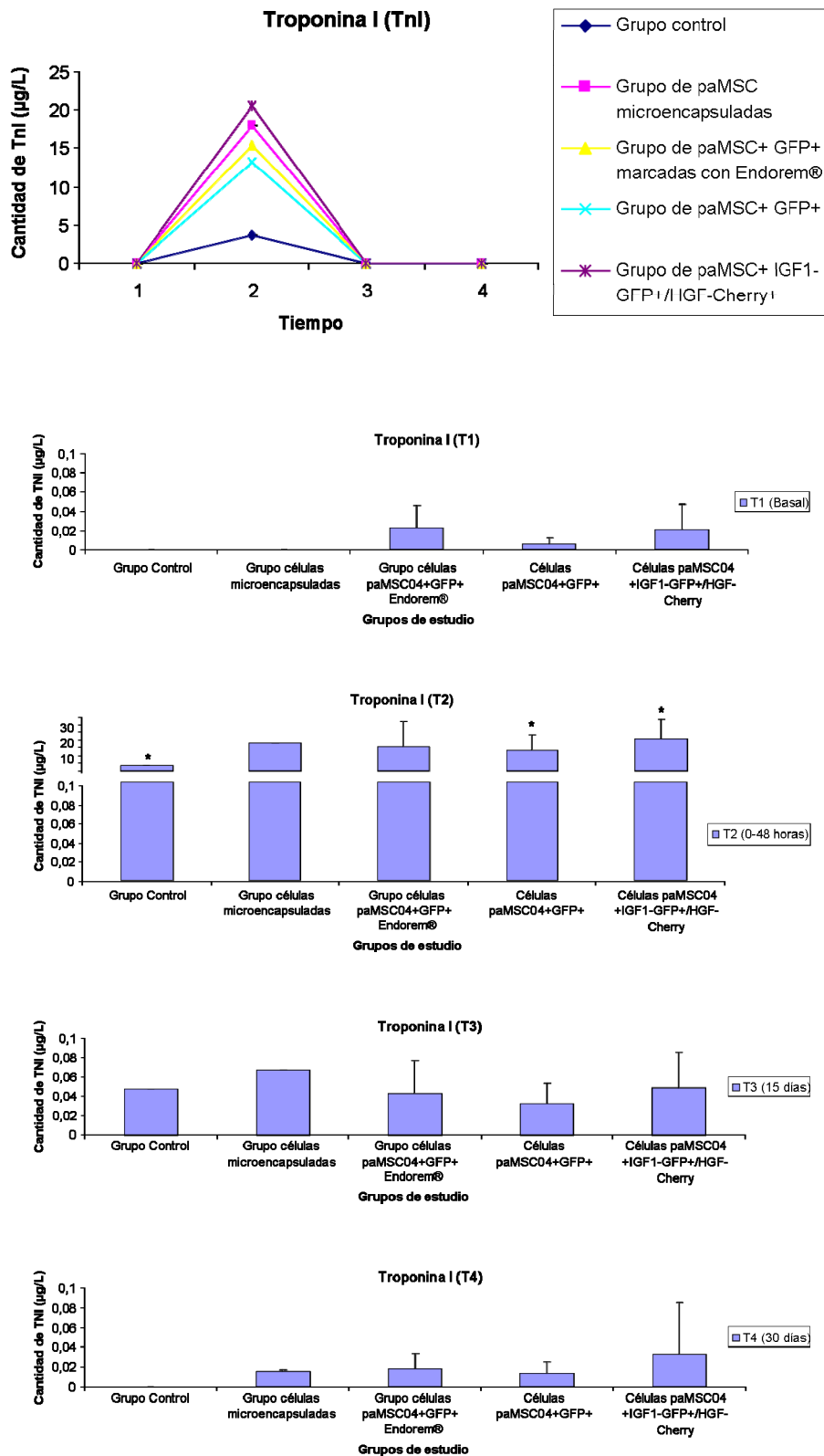
los casos, llegando a obtener valores medios similares a los observados antes de la inducción de la patología. Del mismo modo ocurre con las zonas correspondientes a las lesiones, las cuales se ven reducidas en el transcurso del mes de seguimiento, a pesar de no recuperar en este caso los valores iniciales. Con todo esto, la ausencia de diferencias significativas podría ser debido a que, tal y como se observa en la tabla, existe una gran variabilidad dentro de los grupos. Esto se manifiesta por la elevada desviación estándar observada en cada uno de los parámetros analizados.

### *b.2) Determinaciones analíticas*

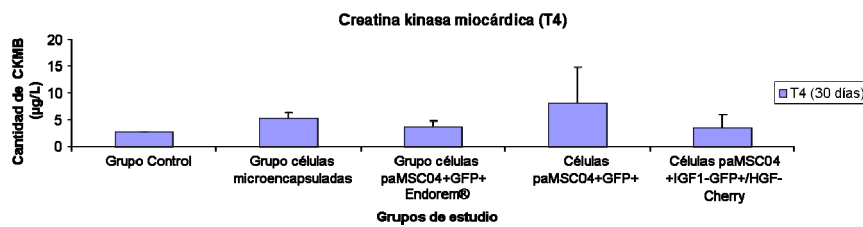
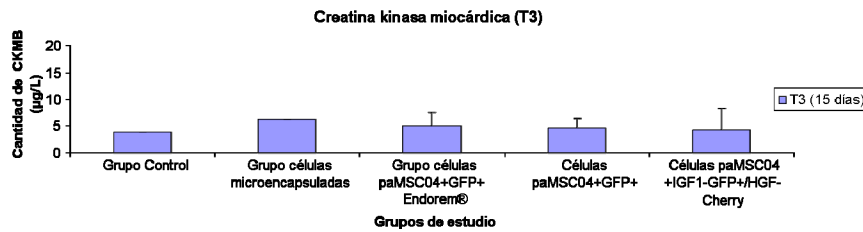
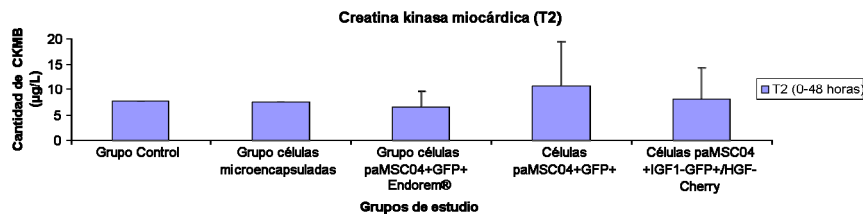
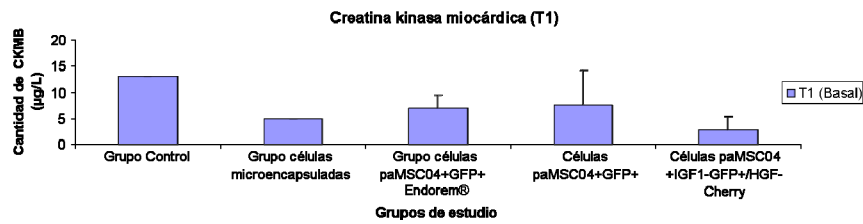
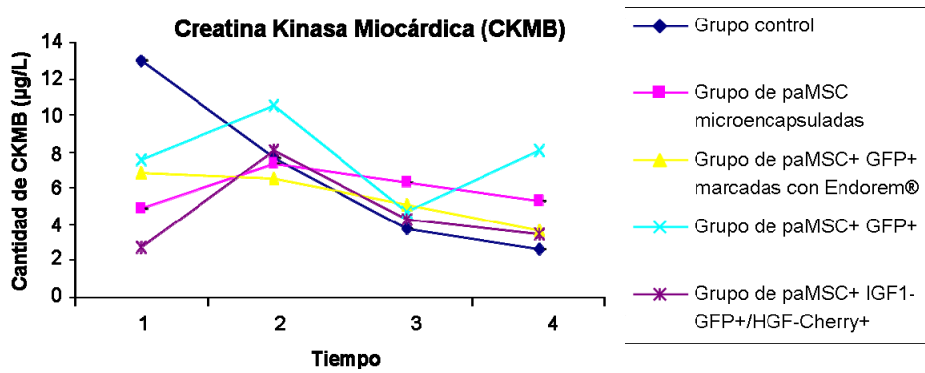
En los resultados obtenidos hay que destacar la elevación que sufren los niveles en plasma de la TnI en el segundo tiempo de seguimiento (T2), donde se alcanzan valores medios de hasta 20µg/L, indicativos de la presencia de un IAM. Además, estas diferencias observadas en los valores obtenidos en T2, son estadísticamente significativas respecto al resto de tiempos analizados (T1, T3 y T4) en el grupo control, el grupo de paMSC+GFP y en el que utiliza como tratamiento paMSC+IGF1-GFP/HGF-Cherry (Figura 59). De esta manera, en T3 y T4 estos niveles enzimáticos disminuyen, en todos los casos, de forma importante aunque no llegan a alcanzar los valores basales tras un mes de seguimiento salvo en el grupo control, del cual hay que decir que obtuvo el valor medio de TnI más bajo en T2.

Respecto a la CKMB, los resultados obtenidos en este estudio muestran una enorme variabilidad en los niveles basales de esta enzima en los diferentes grupos de estudio. Dado que se trata de una enzima cardíaca utilizada normalmente en el diagnóstico del IAM se ha llevado a cabo la determinación de sus niveles plasmáticos, aunque los resultados obtenidos en los distintos tiempos de seguimiento no han sido concluyentes para ninguno de los grupos (Figura 60).

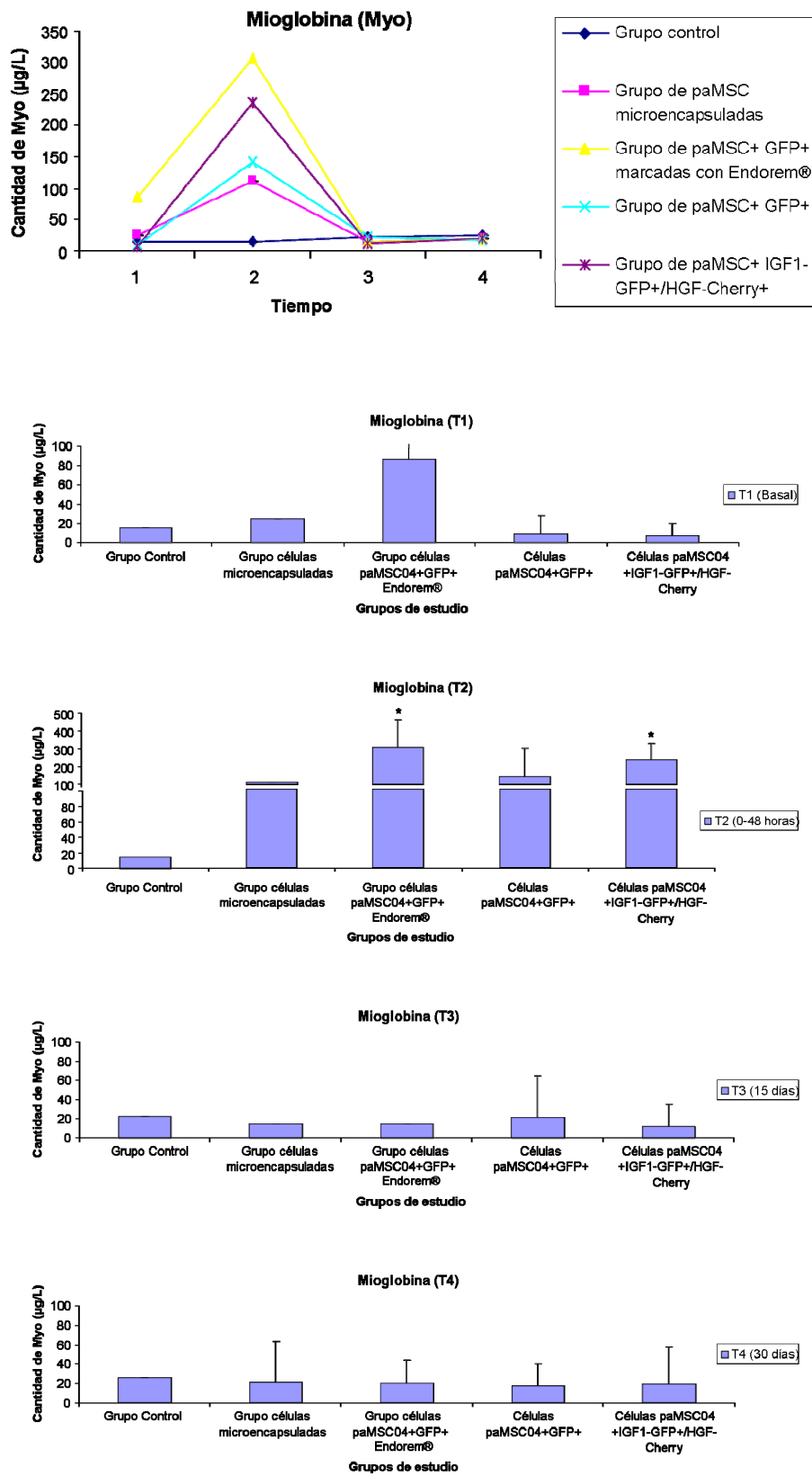
En cuanto a los resultados obtenidos en los niveles plasmáticos de Myo, cabe destacar los observados en el grupo control (en el único animal de este grupo al que se le realizaron las determinaciones enzimáticas), durante el segundo seguimiento (T2). Estos valores (T2) no varían respecto a los basales. En el resto de grupos, este mismo valor se encuentra aumentado respecto al primer seguimiento (T1) en todos los casos, aunque con valores muy diferentes en cada uno de los grupos. Así, los análisis estadísticos muestran diferencias significativas entre los valores obtenidos en T2 con el resto de tiempos de seguimiento analizados (T1, T3 y T4), únicamente en los grupos de paMSC+GFP+Endorem® y paMSC+IGF1-GFP/HGF-Cherry. A pesar de ello, durante los seguimientos posteriores (T3 y T4) los niveles plasmáticos de esta enzima se igualan en todos los grupos, recuperando los valores iniciales (Figura 61).



**Figura 59. Troponina I (TnI).** En el gráfico general se presentan los niveles plasmáticos de TnI en los distintos grupos de estudio a lo largo de todo el tiempo de evaluación. En los gráficos de barras se representan los valores obtenidos en cada uno de los tiempos de seguimiento.



**Figura 60. Creatina Kinasa Miocárdica (CKMB).** En el gráfico general se presentan los niveles plasmáticos de CKMB en los distintos grupos de estudio a lo largo de todo el estudio. En los gráficos de barras se representan los valores obtenidos en cada uno de los tiempos de seguimiento.



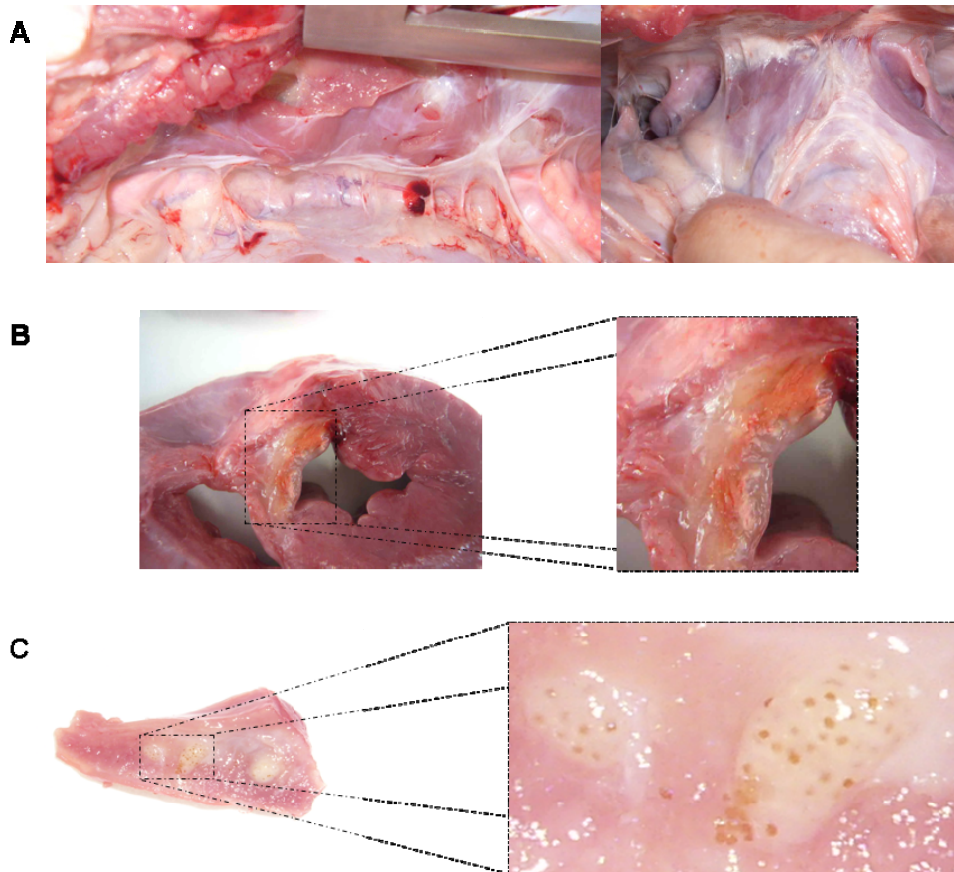
**Figura 61. Mioglobina (Myo).** En el gráfico general se presentan los niveles plasmáticos de Myo en los distintos grupos de estudio a lo largo de todo el estudio. En los gráficos de barras se representan los valores obtenidos en cada tiempo de seguimiento.

#### 7.4.2. Análisis tras el trasplante: estudios tras la eutanasia

##### a) Estudio macroscópico y valoración general tras la eutanasia

Tras la eutanasia, se procedió a la necropsia completa y reglada de todos los animales. La inspección de los órganos abdominales no reveló ninguna alteración destacable: el aspecto, el tamaño y la consistencia de los órganos resultó normal para animales de esta especie y edad. Las únicas alteraciones reseñables fueron observadas en la cavidad torácica, donde se detectaron abundantes depósitos de fibrina que generaban extensas adherencias, tanto en la pared costal izquierda (área de incisión de la toracotomía) como en el pericardio (pericardiotomía), así como en las estructuras pulmonares adyacentes (Figura 62).

La valoración macroscópica del corazón evidenció zonas fibróticas en el ápex y el septo interventricular de todos los animales; cabe resaltar la observación macroscópica de pequeñas esferas de color marrón en las zonas de infarto de los animales tratados con microcápsulas (Figura 62).



**Figura 62. Valoración macroscópica.** **A:** Adherencias observadas en las necropsias como consecuencia del protocolo quirúrgico utilizado en el trasplante celular; **B:** Fibrosis en el tejido cardíaco encontrada en algunos animales, durante la toma de muestras realizada tras la eutanasia de los mismos, después de 30 días de seguimiento; **C:** Microcápsulas anidadas en el corazón observadas durante la toma de muestras tras un mes de seguimiento.

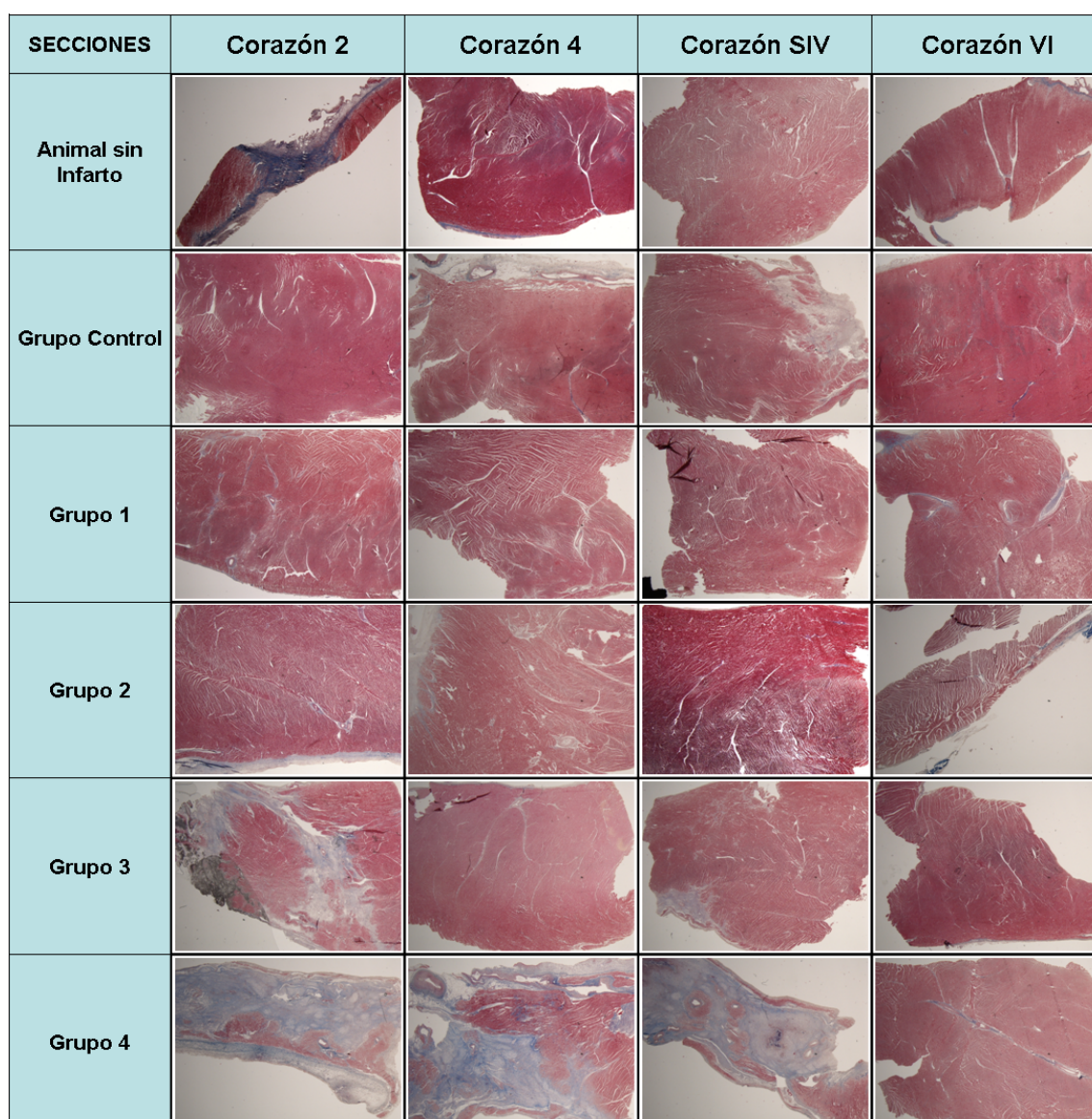


## b) Valoración histológica del tejido cardíaco

### b.1) Tricrómico de Masson

En la Figura 63 se observan las imágenes correspondientes a los resultados obtenidos tras este tipo de tinción, realizado en las muestras cardíacas en un animal representativo de cada grupo de estudio, así como en las muestras analizadas del animal sin IAM.

En los resultados cabe destacar la presencia de importantes zonas de fibrosis en el grupo 4, principalmente así como en la muestra correspondiente al Corazón 2 del animal al que no se le indujo el IAM. En este último caso, el color azul (más oscuro que en el resto de muestras) podría corresponder a tejido vascular y no a zonas de fibrosis.



**Figura 63. Evaluación histológica mediante tinción con *Tricrómico de Masson*.** En la figura se presentan imágenes de muestras representativas de cada grupo teñidas con *Tricrómico de Masson* para la visualización de las zonas fibróticas producidas como consecuencia del IAM (SIV: Septo inter-ventricular; VI: Ventriculo izquierdo).

## Resultados

### b.2) Hematoxilina/Eosina

Las lesiones observadas han sido superiores en el fragmento nombrado como *Corazón 2* y en el *Septo interventricular (SIV)* que en el resto de las porciones remitidas.

Las observaciones predominantes son la fibrosis y la neovascularización que coinciden en la localización y con una severidad muy similar. La inflamación está presente como un infiltrado de tipo crónico con linfocitos y células plasmáticas entre los fibroblastos y la matriz extracelular (grupo control) o también, cuando es más severa, en forma de granulomas. Estos granulomas se suelen presentar de forma multifocal en las zonas de fibrosis. En el grupo 1 son de cuerpo extraño, desarrollados alrededor de estructuras inertes que se tiñen de color pardo (probablemente las cápsulas rotas de alginato) y rodeados de células gigantes multinucleadas y polimorfonucleares neutrófilos. En el resto, sobre todo en el grupo 4 pero también en el 3, están formados por linfocitos, macrófagos y en menor número también por células gigantes. En estos grupos no se ve la presencia de cuerpos extraños. En el grupo 2, los granulomas también están compuestos de linfocitos y macrófagos aunque su número es menor.

Aparecen calcificaciones distróficas que generalmente se encuentran en zonas de necrosis y rodeadas de células gigantes. Son muy abundantes en los grupos 3 y 4, pero también se observan en el grupo 2. Por otro lado, en el animal 4, en la preparación correspondiente al *Septo interventricular (SIV)* se observa una metaplasia cartilaginosa.

La pericarditis es severa en el *Ventrículo izquierdo (VI)* del grupo de animales control, siendo muy leve en pocas muestras del resto de los animales de los diferentes grupos. Está formada por células inflamatorias de tipo crónico (linfocitos y células plasmáticas) y se observan también edema, hemorragia y neovasos.

En cuanto a los grupos, en el animal al que no se le ha provocado infarto se observa un infiltrado multifocal de tipo piogranulomatoso alrededor de un cuerpo extraño de etiología desconocida en la porción de *Corazón 4* (Figura 64: A y B). En la porción de *Corazón 2* y en el *Ventrículo izquierdo (VI)* aparece además una pericarditis moderada (Figura 64: C y D). Las lesiones observadas en las diferentes imágenes de la Figura 64 son las que se indican a continuación:

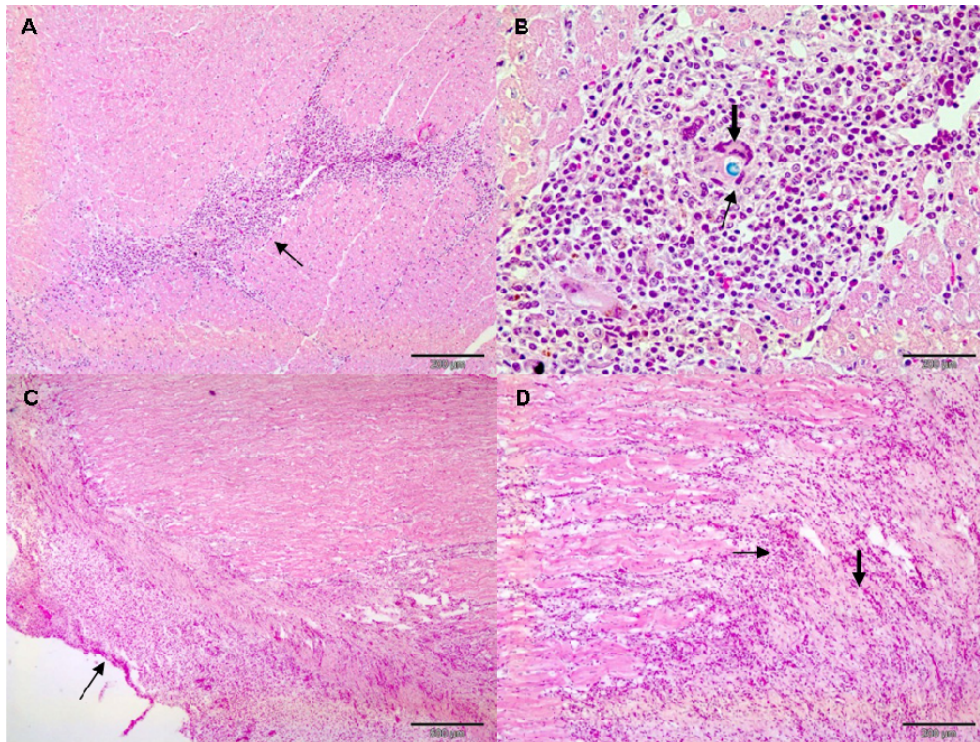
A: Piogranuloma

B: Flecha fina: cuerpo extraño azul. Flecha gruesa: célula gigante cuerpo extraño:

C: Pericarditis

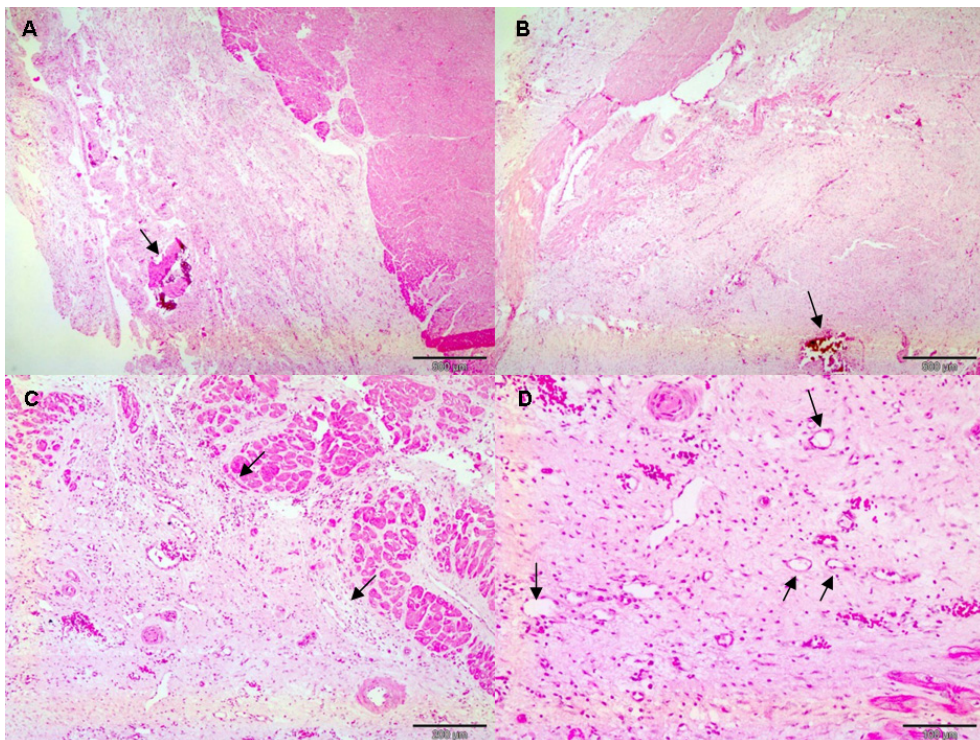
D: Flecha fina: infiltrado de células inflamatorias. Flecha gruesa: fibrosis.





**Figura 64. Evaluación histológica mediante tinción con H/E del animal sin infarto. A y B** presencia de piogranulomas con células gigantes alrededor de un cuerpo extraño. **C y D** pericarditis fibrinosa con infiltrados inflamatorios.

El grupo control tiene valores de lesión inferiores a todos los grupos, aunque esta diferencia es más pequeña con los grupos 1 y 2. Sin embargo, las lesiones están más extendidas a lo largo de todas las porciones estudiadas. La pericarditis es muy severa en el *Ventrículo izquierdo*, sobre todo en el control 3 (Figura 65).



**Figura 65. Evaluación histológica mediante tinción con H/E del grupo control. A:** Animal 3, (VI); **B:** Animal 4, (*Corazón 2*). Áreas de calcificación e infiltrado inflamatorio en el pericardio.; **C y D:** Animal 1, (*SIV*). Fibrosis miocárdica moderada con aumento en el número de vasos entre los fibroblastos y la matriz extracelular.



## Resultados

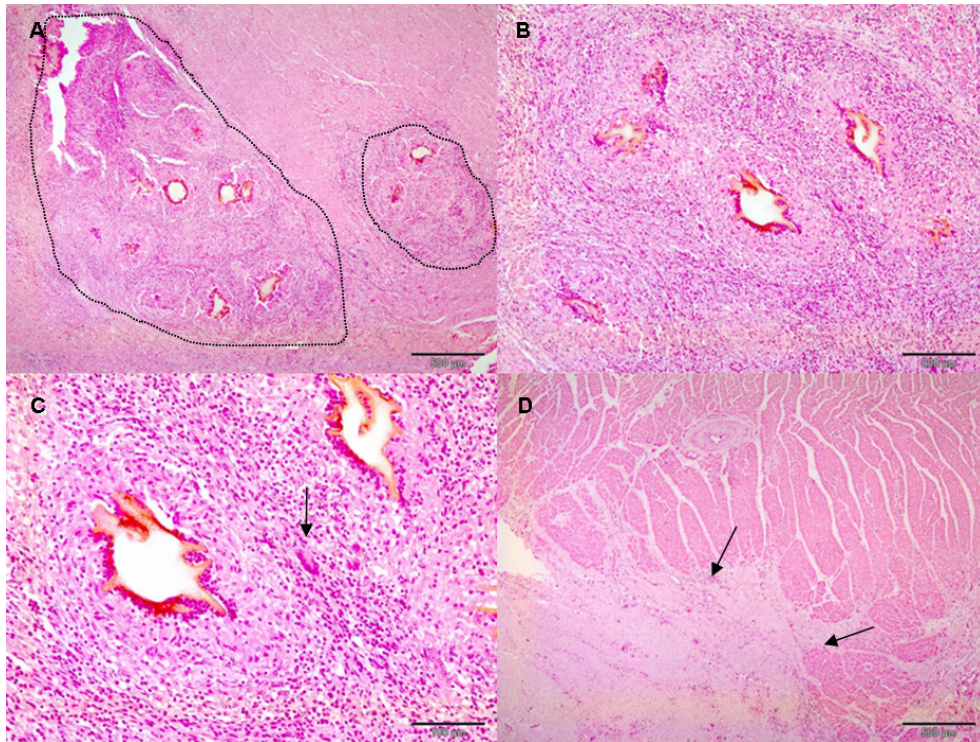
Las lesiones observadas en las diferentes imágenes de la Figura 65 son las que se indican a continuación:

A y B: Las flechas marcan zonas de calcificación.

C: Entre las fibras musculares aparecen áreas de color claro correspondiente a la fibrosis, señalada con flechas.

D: Algunos neovasos marcados con flechas entre las áreas de fibrosis

Los grupos 1 y 2 son similares en cuanto a la proporción de fibrosis, siendo más importante en la sección del *Corazón 2* en el grupo 1 y en la sección *S/IV* en el grupo 2. En el caso de la inflamación, la diferencia estriba en que mientras en el grupo 1 está formada por granulomas de cuerpo extraño de gran tamaño formados por polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos y células gigantes (Figura 66: A, B y C).



**Figura 66. Evaluación histológica mediante tinción con H/E del grupo 1. A, B y C:** Animal 2 (*Corazón 2*). Presencia de granulomas compuestos por polimorfonucleares neutrófilos y sobre todo por macrófagos y células gigantes de cuerpo extraño. **D:** Animal 3, (*S/IV*). Áreas de fibrosis y neovascularización.

Las lesiones observadas en las diferentes imágenes de la Figura 66 son las que se indican a continuación:

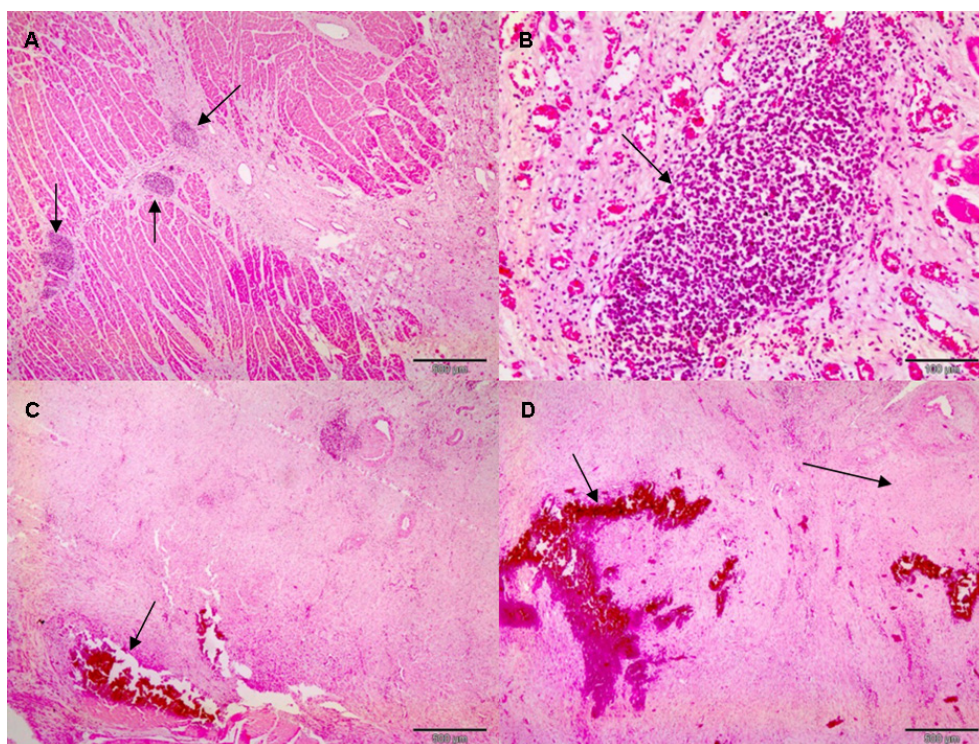
A: Granulomas enmarcados entre líneas

B: Granuloma a mayor aumento

C: La flecha señala una célula gigante multinucleada.

D: las flechas marcan la zona de fibrosis.

En el grupo 2 son de tipo linfoplasmocitario y de menor tamaño (Figura 67: A y B). Esto sugiere que las lesiones son más agudas en el grupo 1 que en el 2. Por otro lado, en el grupo 2 se observan algunas zonas de calcificación y degeneración mixoide (Figura 67: C y D), que no están presentes en el grupo 1.



**Figura 67. Evaluación histológica mediante tinción con H/E del grupo 2. A y B:** Animal 2 (*Corazón 2*). Presencia de fibrosis y granulomas linfoplasmocitarios. **C:** Animal 4 (*Corazón 2*); **D:** Animal 4 (*SIV*). Extensas áreas de calcificación con presencia de focos de componente mixoide.

Las lesiones observadas en las diferentes imágenes de la Figura 67 son las que se indican a continuación:

A: las flechas señalan los granulomas linfoplasmocitarios. Las zonas rosa más clara es la fibrosis entre las fibras musculares de color rosa más intenso.

B: Granuloma linfoplasmocitario. Se observan numerosos neovasos alrededor.

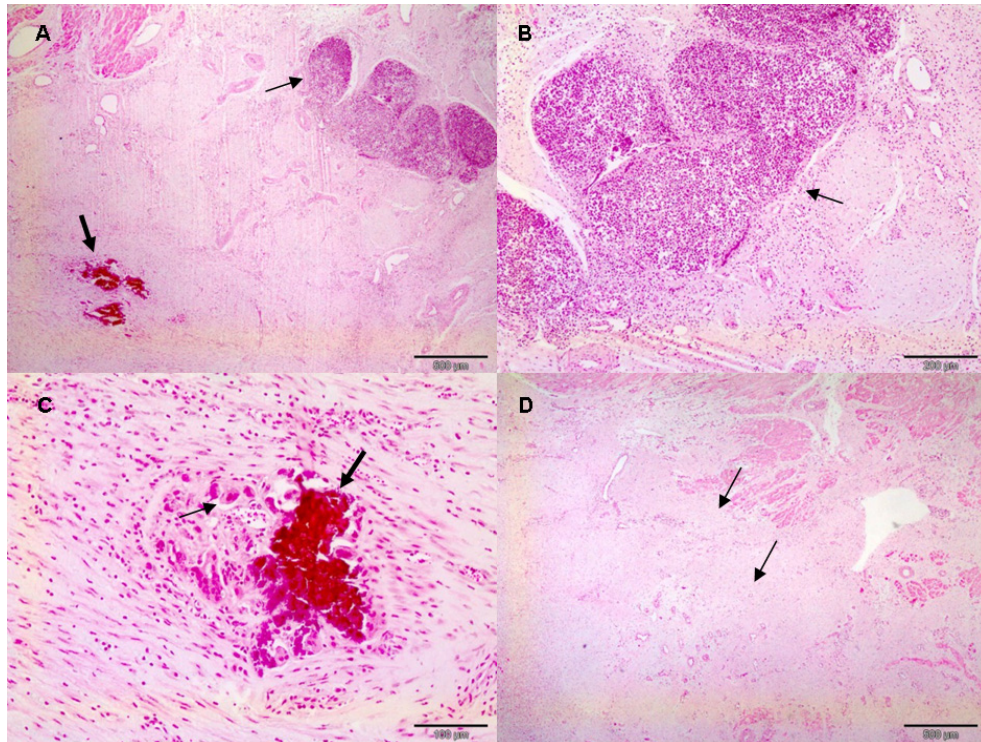
C: La flecha indica áreas de calcificación

D: La flecha izquierda indica área de calcificación y la flecha de la derecha zona de fibrosis

En el grupo 3 la fibrosis es también muy marcada y como en el grupo 4, es más severa en la porción del *Corazón 2* seguido del septo interventricular y asociada a la neovascularización. En cuanto a la inflamación, es el segundo grupo en severidad, detrás del grupo 4. Se observan extensas áreas de calcificación distrófica en tres animales, en dos en la porción de *Corazón 2* y en 1 en el *SIV* (Figura 68).



## Resultados

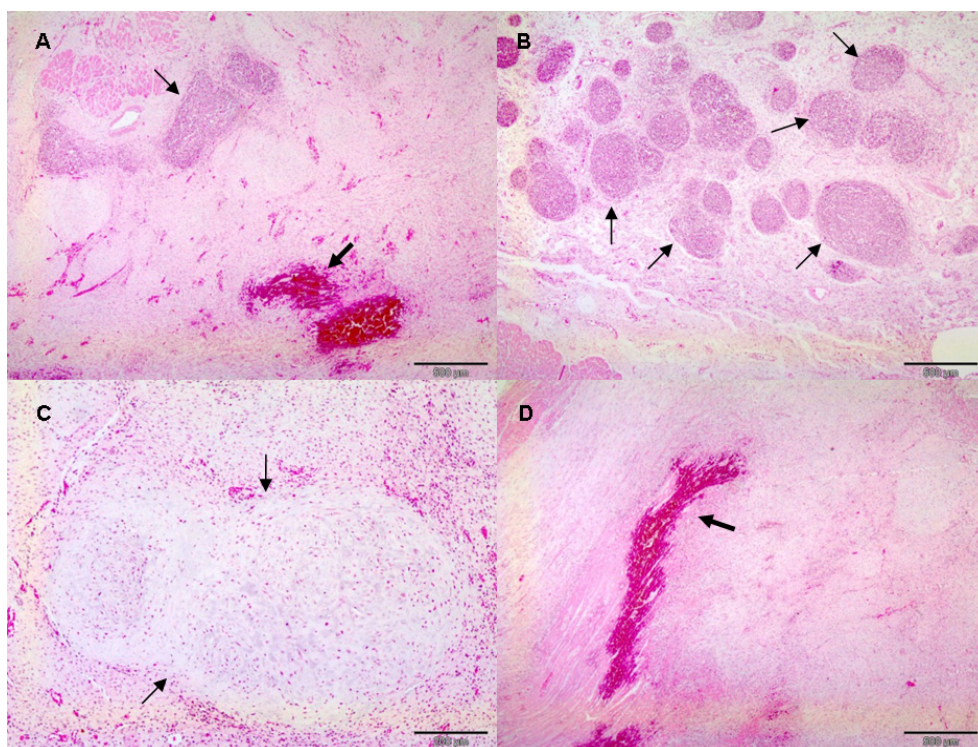


**Figura 68. Evaluación histológica mediante tinción con H/E del grupo 3. A y B:** Animal 2 (*Corazón 2*). Fibrosis muy marcada con áreas de calcificación y granulomas. **C:** Animal 1 (*Corazón 2*). Calcificación distrófica rodeada de células gigantes multinucleadas. **D:** Animal 1 (*SIV*). Severa fibrosis y neovascularización.

Las lesiones observadas en las diferentes imágenes de la Figura 68 son las que se indican a continuación:

- A: Flecha gruesa: área de calcificación. Flecha fina: granuloma linfoplasmocitario.
- B: Granuloma linfoplasmocitario.
- C: Flecha gruesa: área de calcificación. Flecha fina: células gigantes
- D: Fibrosis marcada con flechas

Por último, el grupo que presenta las mayores lesiones es el grupo 4, sobre todo en lo referente a la fibrosis y en las porciones de *Corazón 2* y *SIV*. Esta es severa en 3 de los 4 animales en la sección de *Corazón 2* y en 2 de los 4 animales en la sección de *SIV*. En el resto es moderada y sólo en un caso, leve. Incluso aparece también en la porción del *Corazón 4*, donde en la mayoría de los animales de otros grupos apenas si está presente (sólo en el grupo 3, animal 1). La inflamación también es más severa en este grupo que en el resto, con presencia de granulomas multifocales de gran tamaño extendidos a lo largo de las áreas de fibrosis. En estas áreas de fibrosis se observan muchos neovasos. Aparecen zonas de calcificación distrófica de tamaño moderado e incluso áreas de metaplasia cartilaginosa en el septo interventricular del animal 2.

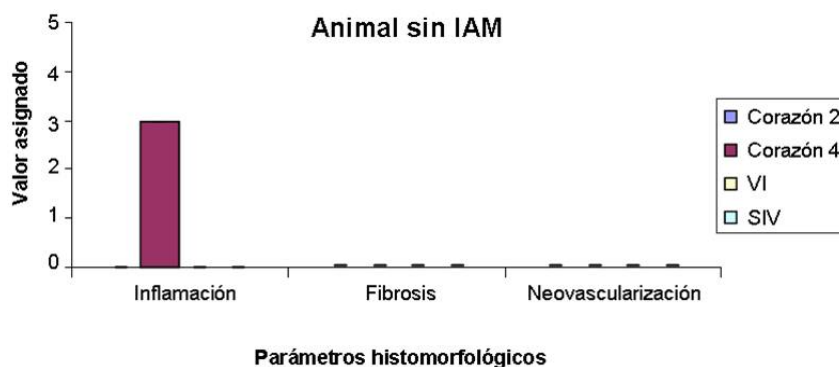


**Figura 69. Evaluación histológica mediante tinción con H/E del grupo 4. A y B:** Animal 2 (*Corazón 2*). Numerosos granulomas junto con áreas de calcificación en la zona de fibrosis. **C:** Animal 2 (*SIV*). Metaplasia cartilaginosa en el SIV. **D:** Animal 3 (*SIV*).

Las lesiones observadas en las diferentes imágenes de la Figura 69 son las que se indican a continuación:

- A: Flecha gruesa: área de calcificación. Flecha fina: granuloma. Alrededor fibrosis.
- B: Flechas marcan granulomas
- C: Las flechas señalan la metaplasia cartilaginosa.
- D: Flecha gruesa: área de calcificación. El resto es fibrosis.

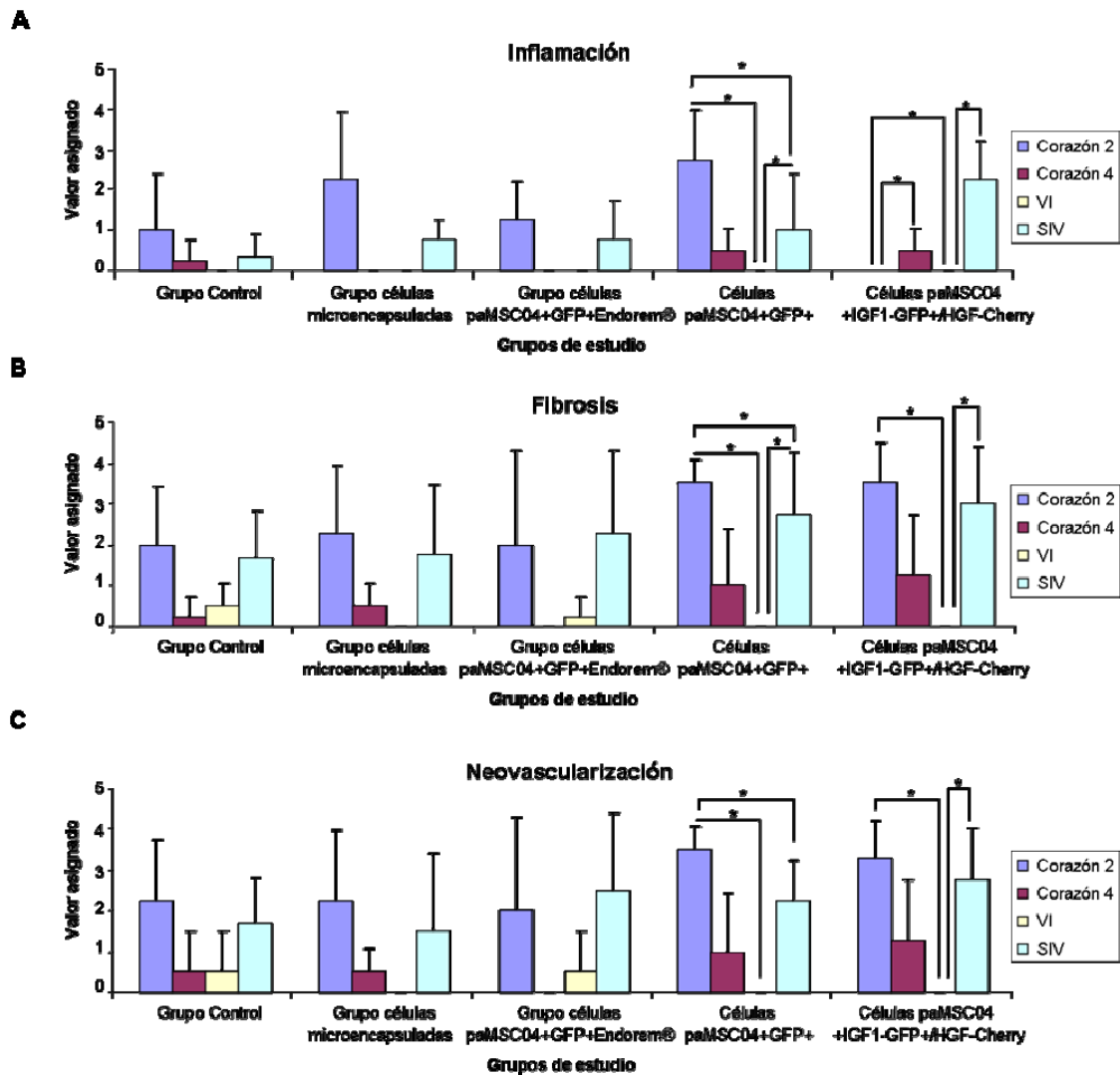
Así, los resultados obtenidos tras las valoraciones anatomopatológicas se resumen en forma de gráficos en las Figuras 70 y 71, donde se pueden observar las diferencias encontradas entre las distintas muestras analizadas (*Corazón 2*, *Corazón 4*, *Ventrículo izquierdo (VI)* y *Septo interventricular (SIV)*) en cada uno de los grupos estudiados. Además, también se analizaron las mismas muestras en el animal al que no se le produjo IAM y los resultados de los diferentes parámetros histopatológicos analizados, los cuales se tomaron como control de las lesiones producidas por la patología, se muestran en la Figura 70. En esta figura cabe destacar la presencia de inflamación moderada en la sección correspondiente al *Corazón 4*, mientras que en el resto de secciones analizadas no se aprecia este tipo de lesión. Además, en ninguna de las muestras analizadas en este animal se observan signos de fibrosis ni procesos de formación de nuevos vasos.



**Figura 70. Análisis de los parámetros histomorfológicos en el animal sin IAM.** Representación gráfica de los estudios anatomopatológicos realizados respecto a la Inflamación, fibrosis y formación de vasos nuevos de cada una de las muestras en el animal al que no se le indujo la patología cardíaca (n=1).

Los análisis estadísticos indicaron que no hay diferencias significativas entre los grupos, en ninguna de las zonas estudiadas (prueba Kruskal-Wallis). Al comparar las distintas zonas dentro de cada grupo, se observaron diferencias en cuanto a inflamación ( $p=0.029$ ) en el grupo 1 (paMSC microencapsuladas), aunque no fue posible determinar entre qué zonas. También para los grupos 3 (paMSC+GFP+) y 4 (paMSC+IGF-GFP+/HGF-Cherry+) se encontraron diferencias significativas en todos los parámetros estudiados, y para determinar entre qué zonas se utilizó la prueba de Mann-Whitney (los valores obtenidos de “ $p$ ” en ambas pruebas se indican entre paréntesis). Así los resultados obtenidos en estos grupos fueron los siguientes:

- **Grupo 3.** (prueba Kruskal-Wallis): Inflamación (0.030), fibrosis (0.014) y neovascularización (0.010). Para determinar entre qué zonas Prueba de Mann-Whitney:
  - Entre *Corazón 2* y *SIV*: Inflamación (0.036), fibrosis (0.036) y neovascularización (0.036).
  - Entre *VI* y *SIV*: Inflamación (0.029), fibrosis (0.029).
  - Entre *Corazón 2* y *VI*: Inflamación (0.029), fibrosis (0.029) y neovascularización (0.029).
  
- **Grupo 4.** (prueba Kruskal-Wallis): Inflamación (0.006), fibrosis (0.015) y neovascularización (0.020). Para determinar entre qué zonas prueba de Mann-Whitney:
  - Entre *Corazón 2* y *Corazón 4*: Inflamación (0.029).
  - Entre *Corazón 2* y *VI*: Inflamación (0.029), fibrosis (0.029) y neovascularización (0.029).
  - Entre *VI* y *SIV*: Inflamación (0.029), fibrosis (0.029) y neovascularización (0.029).



**Figura 71. Representación gráfica del estudio anatomopatológico.** En los gráficos se muestran los resultados obtenidos respecto a la Inflamación (A), fibrosis (B) y formación de vasos nuevos (C), en cada una de las muestras de los grupos estudiados. Los valores representados equivalen al promedio de los obtenidos de cada animal en cada grupo (n=4), (\* $p \leq 0.005$ ).

El animal en el que no se ha producido infarto presentó pericarditis y una inflamación granulomatosa como respuesta probablemente a la administración de células. Sin embargo, no se observaron áreas de fibrosis.

El grupo control es donde el grado de las lesiones era más bajo sobre todo en *Corazón 2* y *SIV*, aunque la pericarditis fue más severa que en el resto de los grupos y las lesiones aparecen en todas las porciones estudiadas.

La distribución de las lesiones probablemente esté relacionada con la administración de los diferentes tratamientos ya que coincidieron en todos los grupos analizados. Por otro lado, las porciones de *Corazón 2* y *SIV* del grupo 4 parecen ser las más afectadas en cuanto a la



## Resultados

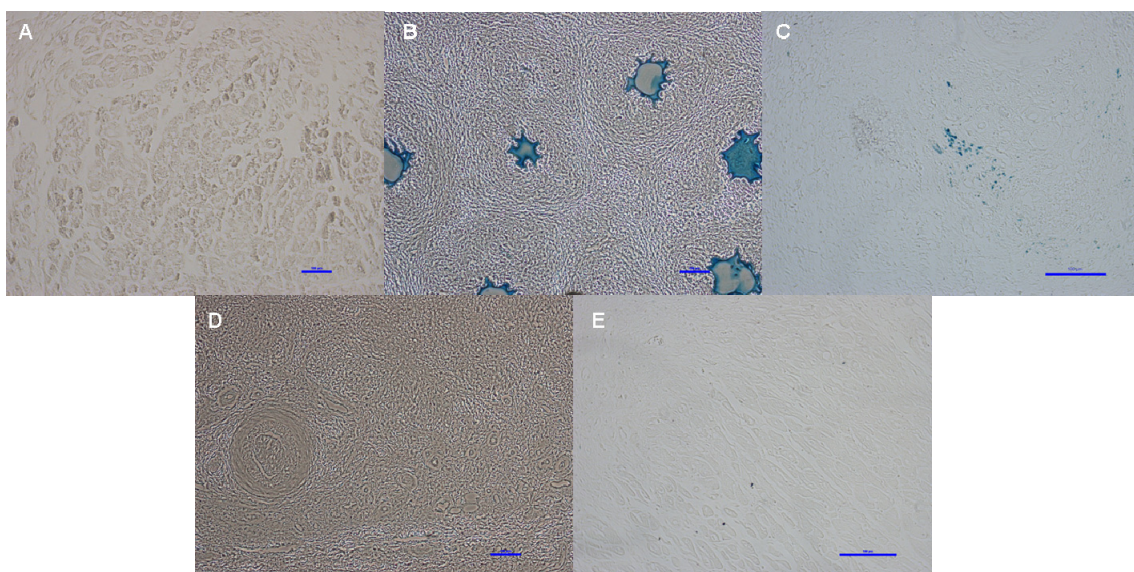
presencia de fibrosis, inflamación y neovascularización. A continuación es el grupo 3, mientras que los grupo 1 y 2 presentaron un grado de lesión inferior y similar entre ambos. Las cápsulas de alginato parecen ser las responsables de la inflamación granulomatosa observada en casi todas las muestras del grupo 1, en la zona del *Corazón 2*. Sin embargo, en el resto, los granulomas están sobre todo formados por linfocitos y macrófagos, indicando un proceso más crónico.

Cabe destacar los datos del grupo control donde las lesiones son menores. La menor inflamación respecto al resto de grupos podría explicarse por la ausencia de tratamiento aunque en el caso de las lesiones de fibrosis indica la diferencia en el grado del infarto respecto al resto. Para poder hacer una valoración objetiva del efecto terapéutico de cada tratamiento sería interesante poder obtener un mismo grado de lesión cardíaca en el modelo patológico aunque esto, en los modelos *in vivo*, viene determinado por factores de cada individuo y de su capacidad de respuesta ante esta patología.

Por otra parte, se aprecia un aumento en el número de neovasos entre las fibras musculares o el tejido conjuntivo (angiogénesis), habiéndose obtenido los mejores resultados, y de forma muy superior al resto, en el caso del tratamiento utilizado en el grupo 4. Si bien es cierto que este grupo es el que presenta mayor neovascularización, también es el de mayores lesiones, por lo que esto pudiera estar relacionado. Estos resultados corresponden con los obtenidos por RMN a lo largo de los seguimientos *in vivo*.

### b.3) Azul de Prusia.

Los resultados obtenidos tras la tinción con azul de Prusia del tejido cardíaco de los grupos de estudio se muestran en la Figura 72.



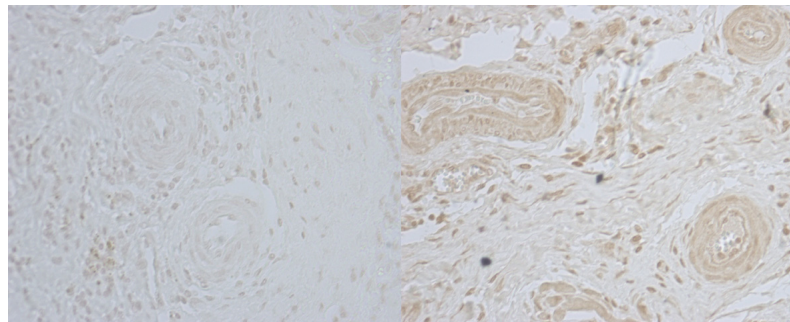
**Figura 72. Tinción con azul de Prusia del tejido cardíaco.** Las imágenes muestran los resultados obtenidos tras la tinción con azul de Prusia de la sección *Corazón 2* en un animal representativo de cada grupo de estudio. **A:** Grupo control (suero salino); **B:** Grupo 1 (paMSC microencapsuladas marcadas con Endorem® (magnetocápsulas)); **C:** Grupo 2 (paMSC+GFP+Endorem®); **D:** Grupo 3 (paMSC+GFP) y **E:** Grupo 4 (paMSC+IGF1-GFP/HGF-Cherry). (Barras: 100µm).

La tinción positiva en la sección *Corazón 2*, de las muestras correspondientes a los grupos 1 y 2, confirma la presencia de nanopartículas de óxido de hierro al finalizar el estudio, tras un mes de seguimiento. Sin embargo en el resto de grupos, en cuyos tratamiento no se incluía el marcaje con el complejo Endorem®, no se observan zonas de este color, dada la ausencia de partículas de hierro en estos tejidos.

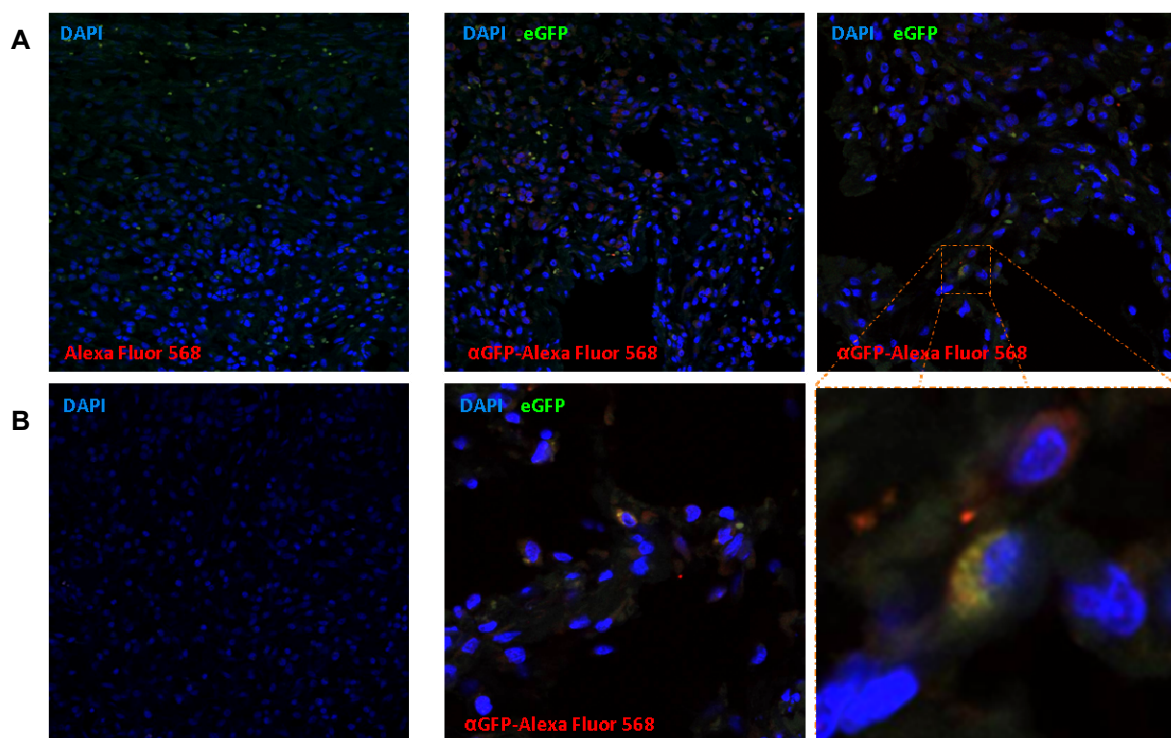
### c) Estudios inmunohistoquímicos del tejido cardíaco

En la Figura 73 se muestra la tinción con el anticuerpo anti-IGF1, detectado con inmunohistoquímica DAB. Los resultados indican que el IGF1 se expresa en esta zona del corazón en los animales donde se trasplantaron las paMSC infectadas con IGF1-GFP/HGF-Cherry.

**Figura 73. IHQ  $\alpha$ -IGF1 del tejido cardíaco.** Expresión de IGF1 detectado mediante inmuno-reacción en tejido cardíaco tomado de un animal sometido al tratamiento con paMSC infectadas con IGF1-GFP/HGF-Cherry (imagen derecha). En la imagen izquierda se muestra el control negativo sin el anticuerpo secundario.



En la búsqueda de células GFP positivas se identificaron en el control positivo utilizado (animal sin infarto) en color amarillo-anaranjado (Figura 74). En esta figura puede apreciarse además la ausencia de este tipo de células en los controles negativos mostrados en las imágenes de la izquierda de ambos paneles.

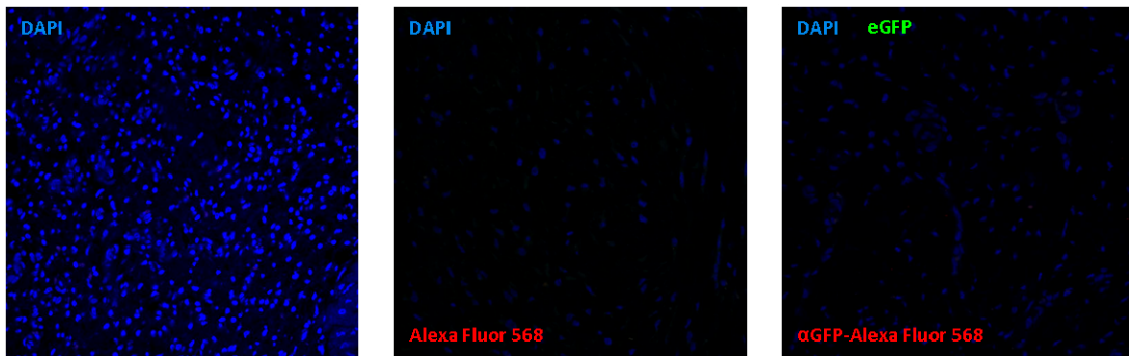


**Figura 74. IHQ realizadas en tejido cardíaco (corazón 2) de un animal sin infarto de miocardio con un trasplante de células paMSC+GFP+Endorem® (30 millones).** Las imágenes de la izquierda (tanto del panel A como del B) presentan los controles negativos de la técnica. En el resto de imágenes se aprecia la presencia aislada de células GFP positivas (IHQ:  $\alpha$ GFP-A568).



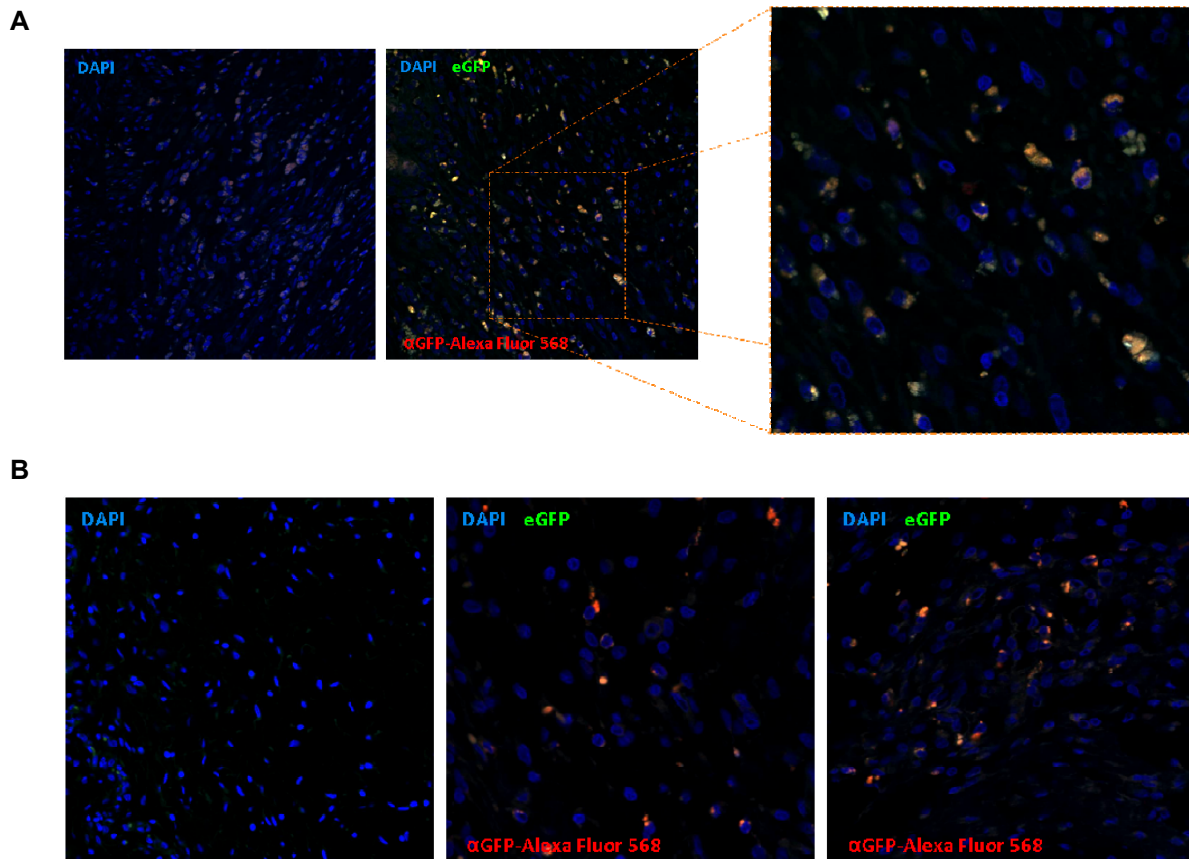
## Resultados

La figura que se presenta a continuación (Figura 75) confirma la ausencia de este tipo de células en el grupo control.



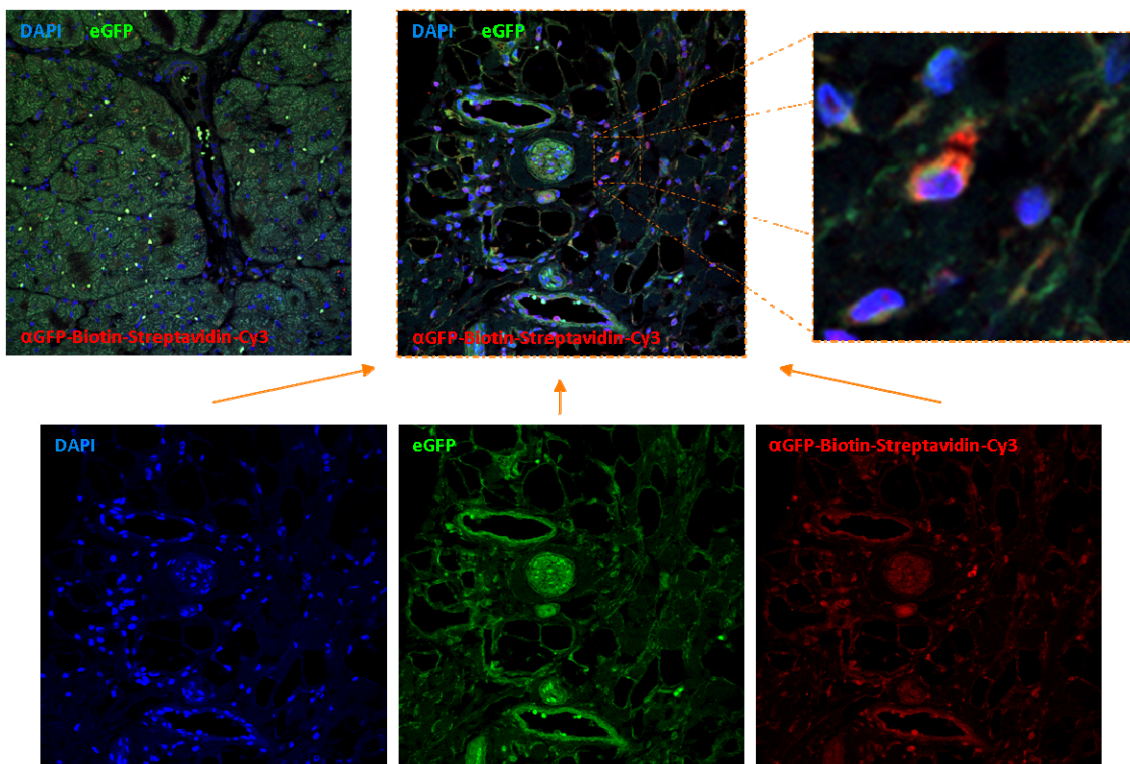
**Figura 75.** IHQ realizadas en tejido cardíaco (corazón 2) de uno de los animales del grupo control (sin tratamiento). Las dos primeras imágenes presentan los controles negativos de la técnica (tinción con DAPI y la incubación sólo con el secundario Alexa Fluor 568). La imagen final presenta el resultado negativo para la reacción inmunofluorescente contra GFP. (IHQ:  $\alpha$ GFP-A568).

Sin embargo, se pudo evidenciar la presencia de células GFP positivas en distintas muestras del grupo 4 (grupo cuyo tratamiento consistió en paMSCs transducidas con IGF1-GFP/HGF-Cherry), a pesar de la autofluorescencia del tejido (observado en el control). Éstas aparecen en grupo, como cabría esperar, y no de forma aislada como se encontró en el animal sin infarto (Figura 76).



**Figura 76.** Presencia de paMSC positivas para GFP en dos animales diferentes del grupo 4 (A y B). Las células positivas para GFP en este grupo suponemos que son indicativas de una sobreexpresión de IGF1 en estos tejidos.

Ante la posibilidad de haber considerado falsos positivos, se planteó la posibilidad de utilizar técnicas de amplificación en estos inmunoanálisis y obtener así una mejor detección de la señal contra GFP (amplificación mediante el sistema Biotina-Streptavidina). Así, para confirmar la expresión de IGF1 detectada mediante inmunohistoquímica con DAB en la Figura 73, se buscó la presencia de vasos, donde se observó una expresión más acusada de esta proteína. Como control negativo se utilizó el tejido cardíaco del grupo control (sin trasplante) donde, a pesar de la autofluorescencia del tejido, no se aprecia una mayor intensidad de la fluorescencia verde (producida por la proteína GFP) ni de la roja (producto de la IHQ con el anticuerpo secundario marcado con Cy3) en los vasos presentes de la muestra (primera imagen izquierda de la Figura 77).



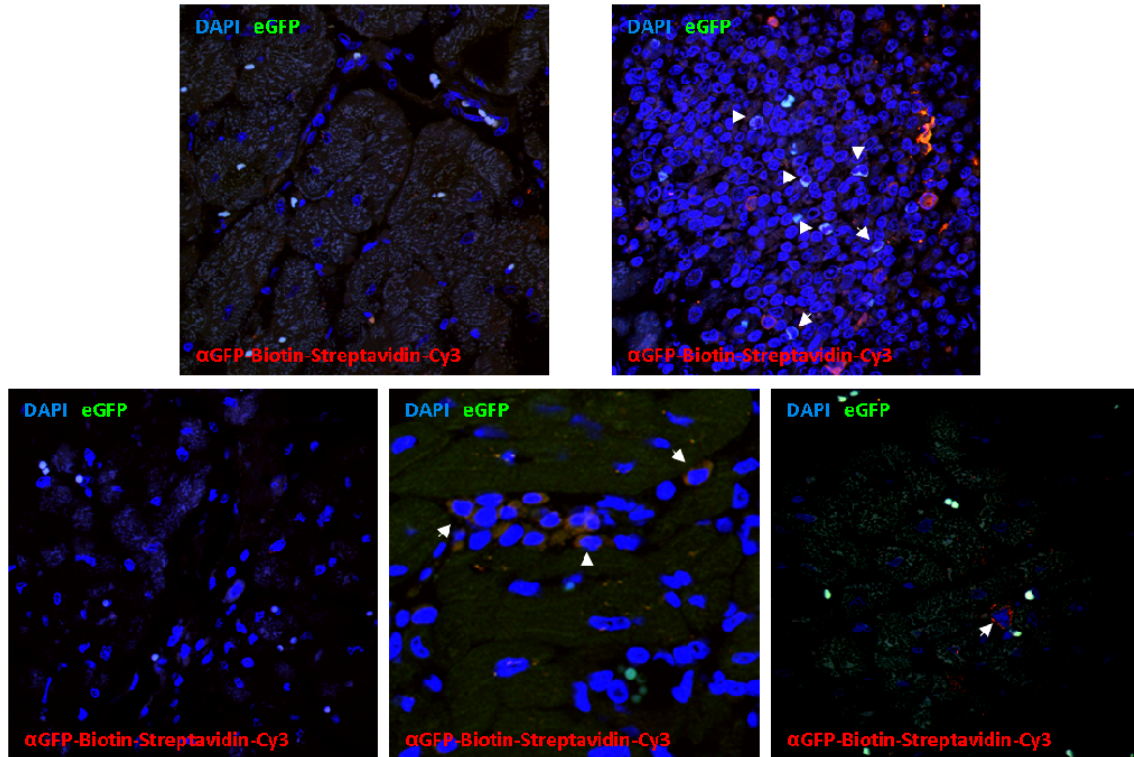
**Figura 77. IHQ  $\alpha$ -GFP con Cy3.** Transducción de paMSC con vectores pRRLsin18.CMV-IGF1-IRES-eGFP y pRRLsin18.CMV-HGF-IRES-Cherry. El panel representa secciones de 5  $\mu$ m teñidas con un anticuerpo contra GFP. La detección inmunofluorescente con un anticuerpo secundario Cy3 indica la expresión de IGF1.

Por el contrario, en los vasos de las muestras analizadas en el grupo 4, la intensidad de señal para ambas fluorescencias, se presenta algo más intensa que en el resto del tejido. Además, se apreciaron células GFP positivas cerca de estos vasos pudiendo estar sobreexpresando la proteína IGF1 e interviniendo en los procesos de neoangiogénesis.

La amplificación mediante el sistema Biotina-Streptavidina se realizó en las muestras de todos los animales del estudio en la sección nombrada como *Corazón 4*. En los animales del grupo control no fue posible detectar ninguna señal indicativa de la presencia de células GFP positivas (control negativo), sin embargo en el animal sin infarto se encontraron secciones con

## Resultados

grupos de células claramente positivas como se aprecia en las imágenes del panel superior de la Figura 78. En las muestras de los animales del grupo 2 ha sido complicada su localización. Esto es dependiente, en gran medida y como se ha comentado con anterioridad, de la sección estudiada dado el tamaño del órgano objeto de estudio. En la Figura 80 pueden verse grupos de paMSC-GFP presentes en el tejido cardíaco, como ocurre con la imagen correspondiente a las muestras de animales pertenecientes al grupo 3 (imagen central del panel inferior).

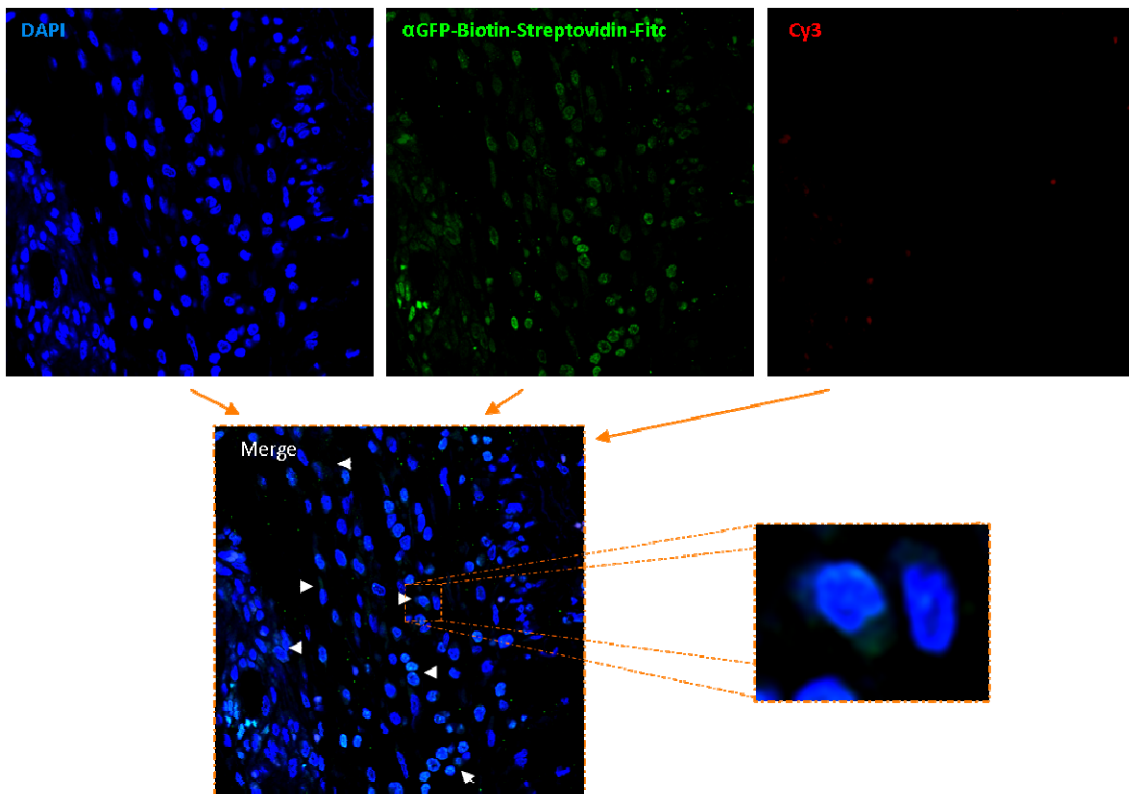


**Figura 78. IHQ  $\alpha$ -GFP con Cy3 amplificado.** Análisis mediante inmunoensayo amplificado con el sistema Biotina-Streptavidina (contra GFP y marcaje con Cy3) de muestras (*Corazón 4*) pertenecientes a los distintos animales estudiados. Las imágenes del panel superior pertenecen al grupo control (izquierda) y del animal sin infarto (derecha). En el panel inferior se presentan las imágenes de muestras correspondientes a los animales de los distintos grupos (grupo 2: izquierda; grupo 3: imagen central; grupo 4: derecha).

En alguna de estas secciones también aparecen células positivas a la reacción de inmunohistoquímica (en rojo) con la fluorescencia verde (propia de las GFP), apreciándose un grupo de células de color anaranjado (pertenecientes al grupo 3). En el grupo 2 no llegaron a localizarse células positivas para GFP en estas secciones analizadas. En el caso del grupo cuatro esta fluorescencia en rojo podría pertenecer a alguna célula aislada de las transducidas con el vector pRRLsin18.CMV-HGF-IRES-Cherry.

Además, estas muestras se analizaron también con un marcador fluorescente FITC (verde) con el fin de amplificar mucho más la fluorescencia de las células positivas y determinar mejor su localización. Los resultados se presentan en la Figura 79 donde se muestran las imágenes correspondientes a las diferentes fluorescencias observadas en este caso.

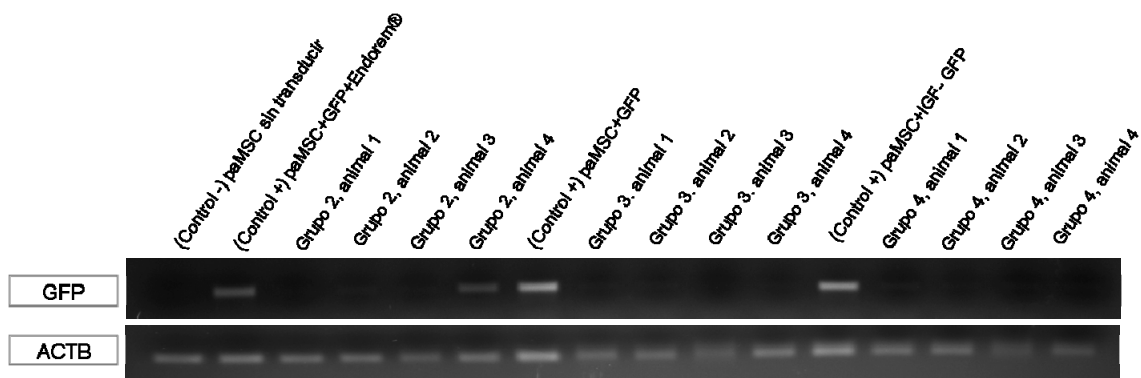




**Figura 79. IHQ α-GFP con FITC amplificado.** Análisis mediante inmunoensayo amplificado con el sistema Biotina-Streptavidina (contra GFP y marcaje con FITC) de una muestra (*Corazón 4*) correspondiente al animal sin infarto. La figura muestra la ausencia de fluorescencia roja (imagen derecha del panel superior).

**d) Análisis molecular del tejido cardíaco**

Los resultados obtenidos indican la presencia clara de GFP en todos los controles positivos utilizados así como la ausencia en el control negativo. Todas las muestras demostraron expresar ACTB. Finalmente, y aunque en la mayoría de los tejidos analizados no se aprecia señal, se confirma la presencia de células positivas para GFP en la muestra correspondiente al animal 4 del grupo de tratamiento 2 (paMSC+GFP+Endorem®), como se aprecia en la Figura 80.



**Figura 80. Análisis molecular del tejido cardíaco.** Estudio de la presencia de células GFP positivas tras un mes de seguimiento en el tejido cardíaco analizado (*Corazón 2*).

## **Resultados**

Estos resultados confirman la viabilidad de las células después de un mes de su trasplante en un medio hostil como es el tejido isquémico tras un IAM. Se seleccionó la muestra *Corazón 2* al ser la que presentó, en general, mayores lesiones en cuanto a inflamación y fibrosis, según los estudios histomorfológicos.



**Discusión**



Los avances médicos desarrollados durante la segunda mitad del siglo pasado, mejoraron la calidad y la esperanza de vida de los pacientes que padecían multitud de enfermedades. Esta evolución en la medicina se centró, durante mucho tiempo, en paliar los síntomas de muchas de estas patologías, llegando a la cronificación de muchas de ellas pero incrementando de forma considerable la vida media de los pacientes. Con el descubrimiento de las células madre y sus posibilidades, el concepto de terapia se ha visto modificado, y los objetivos científicos han empezado a centrarse en terapias que sustituyan estructuras dañadas por otras nuevas y funcionales.

Hoy en día, las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la causa de mortalidad más importante de las personas adultas en los países desarrollados, debido entre otras cosas, al envejecimiento de la población y a las secuelas producidas en el corazón tras un IAM. Así, cualquier método capaz de reparar o regenerar el miocardio dañado contribuirá de forma muy significativa al tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

## 1. El cerdo como animal grande predilecto para estudios preclínicos

A pesar de que los procesos de regeneración miocárdica son similares en modelos de experimentación como el ratón y el modelo humano, es importante tener en cuenta las diferencias anatómicas y funcionales existentes entre ambos. Para salvar estas diferencias, desde hace años se estudiaron diferentes modelos experimentales que se asemejaran al humano en cuanto a tamaño, fisiología y comportamiento tras sufrir un IAM. Después de diversos estudios en conejos, perros, ovejas y cerdos, se demostró la idoneidad de éste último respecto al resto de modelos animales para los estudios preclínicos en esta patología (Suzuki Y, 2011), (Zaragoza C, 2011). Se trata de una especie animal cuyo uso está ampliamente descrito para modelización de patologías cardiovasculares humanas (Smith CP. Information resources on swine biomedical research. US Department of Agriculture, National Agricultural Library. Disponible en <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/swine/swine.htm#art>). Por otro lado, se trata de una especie que presenta numerosas similitudes con los humanos, entre las que se cuentan la existencia de escasa circulación colateral a nivel coronario, distribución del flujo coronario con un sistema típicamente con dominancia derecha, sistema de conducción y metabolismo cardíaco muy similar al humano. De forma similar, el ratio de tamaño cardíaco/peso corporal (0.005) de un cerdo de 30kg es idéntico al humano (Hughes HC, 1986). Con el desarrollo de esta Tesis, además de la evaluación del efecto terapéutico de los distintos grupos de estudio tras un IAM, se ha validado el modelo de la patología en la especie porcina y se ha determinado su eficacia. En los resultados obtenidos en nuestro estudio, se alcanzó 71.43% de supervivencia, mejorando los descritos por Hughes GC et al. en 2003, donde muestra tasas de mortalidad de casi el 30% al comparar los estudios de este modelo patológico en cerdos y perros (Hughes GC, 2003). La gran mayoría de estas muertes, relacionadas con la

isquemia, se producen durante el periodo de desinflado del balón de oclusión; esto es debido a que la especie porcina, al igual que la humana, presenta una escasa circulación colateral a nivel coronario, por lo que toleran mal una oclusión coronaria aguda, la cual provoca grandes áreas de infarto y como resultado la muerte (Görge G, 1989), (White FC, 1981). Asimismo, hay que tener en cuenta el protocolo del diseño experimental de nuestro trabajo (Esquema 17), donde los animales fueron sometidos a intervenciones muy largas, soportando largos periodos de anestesia (6-7 horas) y donde, además de la inducción del IAM, fueron sometidos a una intervención quirúrgica agresiva (toracotomía) para realizar el trasplante celular. También hay que tener en cuenta los periodos de anestesia para el diagnóstico por resonancia magnética nuclear (RMN) en los seguimientos iniciales. Por todo ello, a lo largo del desarrollo de la fase experimental de los distintos grupos, el intervalo de tiempo en el que se realizaron los seguimientos a  $t=0h$ , (T2, justo tras el trasplante celular) fue ampliado, y como consecuencia se realizaron los seguimientos entre las 0 y 48 horas. La muerte de los animales que no superaron la inducción del IAM se produjo, en su gran mayoría, durante el periodo de desinflado del balón de oclusión. Esto podría ser debido a que la circulación colateral a nivel coronario es escasa en la especie porcina por lo que una oclusión aguda provoca grandes áreas de infarto aumentando el riesgo de morir en la intervención, coincidiendo por tanto con lo descrito por Görge y White. Esta situación es bastante similar en el proceso patológico en humanos, dañándose una proporción similar de tejido cardíaco en ambos casos y por tanto una proporción de masa ventricular a restaurar muy parecida. En los modelos murinos con esta patología, para regenerar un infarto que ha destruido el 30% de la masa ventricular se requiere la producción de 20mg de miocardio en una capa muscular muy delgada. El ventrículo izquierdo en la mayoría de los pacientes con un IAM pesa más o menos 500g y tiene un espesor mayor a 1cm. Para regenerar el 30% del ventrículo se requiere la formación de una pared muscular gruesa con múltiples arterias, arteriolas y capilares. Esta labor es 7.000 veces superior y mucho más compleja que la regeneración del ratón (Nadal-Ginard B, 2006).

Por otra parte, la similitud de la irrigación coronaria se puso de manifiesto tras los análisis de imagen por RMN donde las zonas afectadas por el IAM eran similares a las producidas en humanos. De este modo en nuestro estudio, y tras la oclusión de la arteria coronaria izquierda, en su rama descendente anterior, las zonas dañadas y con mayor grado de fibrosis coinciden con los afectados en humanos, al verse afectada esa misma arteria. Así, la eficacia del modelo patológico y su similitud con el mismo proceso en humanos, pudo demostrarse con los análisis de imagen por RMN, donde en todos los grupos se observó una reducción en los valores de los parámetros indicativos de funcionalidad cardíaca (FE, GC y VES), al comparar las imágenes de RMN basales (T1) y las realizadas tras la inducción de los IAM (T2). Se ha llegado a obtener una reducción de la FE de hasta un 31.7% en uno de los animales del grupo control, aunque las variaciones funcionales en general no fueron significativas. Este parámetro se expresa en porcentaje y sus valores normales se encuentran entre el 55% y 80% en condiciones de reposo, mientras que valores inferiores al 55% son

indicativos de una disminución en la contractilidad miocárdica. Asimismo, el GC es una variable cardiovascular extremadamente importante que se ajusta continuamente para que el sistema cardiovascular se adapte a las necesidades de transporte del organismo en cada momento, es quizás por este motivo que en los grupos 2 y 3, los valores de T1 y T2 sean muy similares y no se aprecie una disminución más clara de T2 respecto a T1. Algunos de los factores que influyen en la frecuencia cardíaca lo hacen mediante la alteración de las características en la despolarización diastólica de los cardiomiocitos, principales células del corazón y las responsables de la contracción cardíaca (Mohrman DE, 2010). Respecto al área de infarto, analizado también con las imágenes de RMN, en todos los datos basales se observa la ausencia de zonas dañadas. Después de la inducción del IAM, se produce un aumento en el % del área de infarto en todos los animales, llegando en algún caso a apreciarse un aumento de hasta un 16 % de área infartada. Estos resultados fueron confirmados tras los estudios histomorfológicos del tejido cardíaco después de la toma de muestras, donde se observaron las mayores zonas de fibrosis en las muestras nombradas como *Corazón 2* y *SIV (Septo interventricular)*. Además, el aumento de los niveles de enzimas cardíacas en T2 confirmó la presencia de la patología en todos los grupos, siendo significativos en los grupos 1, 2 y 4 respecto a T1 en el caso de la TnI, coincidiendo con lo descrito por K. Thygesen al considerar a esta enzima como biomarcador preferido indicativo de necrosis miocárdica (Thygesen K, 2007). Además, los niveles enzimáticos son similares a los referidos en los manuales de diagnóstico que describen una elevación de la TnI y la CKMB a las 4-6 horas desde el inicio de la isquemia. Sin embargo, los niveles de la Myo se elevan muy precozmente (2ª hora), aunque es muy poco específica dado que se normaliza a las 24 horas del inicio de la isquemia. Esto puede explicar los niveles del grupo control en la T2 (en el único animal de este grupo al que se le realizaron las determinaciones enzimáticas). Estos valores (T2) no varían respecto a los basales dado que en este caso el segundo seguimiento se realizó a las 48 horas de la producción del IAM pudiendo haberse normalizado en el momento de la determinación.

## 2. El modelo porcino en el ámbito de la terapia celular

La similitud entre el modelo porcino y el humano, no sólo ha de tenerse en cuenta a nivel de órgano adulto. En el contexto de la terapia celular es necesario un análisis molecular de este órgano que nos permita determinar estrategias adecuadas así como determinar los marcadores moleculares indicativos, tanto de un daño como de una regeneración, reparación o mejora del mismo tras dicha lesión. Por todo esto, es importante analizar los factores moleculares implicados en la cardiogénesis y establecer los marcadores específicos implicados en una modificación de los distintos procesos que se producen en el corazón durante la patología isquémica y los procesos de recuperación. Además, estos estudios moleculares han sido determinantes para identificar las causas de muchas cardiopatías congénitas (CC) relacionadas con malformaciones en la estructura del corazón.

## 2.1. Factores moleculares implicados en la cardiogénesis

Durante el desarrollo embrionario, las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) son las que formarán los diferentes órganos y tejidos del organismo. El corazón es el primer órgano en funcionar en el embrión y se forma por la elevación de las dos capas de la hoja esplácnica del mesodermo lateral, es decir la capa esplácnica dorsal y ventral (Scott GF, 2006). Pasa de ser una estructura tubular sencilla a convertirse en un órgano de una gran complejidad que requiere la diferenciación y el crecimiento de distintas estructuras embrionarias (Franco D, 2002). En la formación de este órgano, así como en la de los vasos sanguíneos, están implicados multitud y complicados procesos (6 fases o estadíos). Durante el cuarto estadío, se aprecia el conocido *corazón embrionario*, donde se pueden comenzar a distinguir diferentes regiones miocárdicas (tracto de entrada, atrio embrionario, el canal atrio-ventricular, el ventrículo embrionario y el tracto de salida), las cuales presentan un patrón de expresión diferencial y características funcionales distintas (Franco D, 1998), (Moorman AFM, 1994). Éste es el resultado de muchos años de estudios en anatomía que han permitido llegar a conocer, de forma muy específica y concreta, la estructura adulta del corazón. Sin embargo, los avances desarrollados en biología molecular en la última década han permitido conocer las bases moleculares de la cardiogénesis. Así, determinar los mecanismos que regulan la expresión génica en el corazón es fundamental para entender los complejos procesos que se llevan a cabo durante el desarrollo embrionario cardíaco.

Uno de los marcadores de las células progenitoras del corazón más conocidos y con mayor implicación en la morfogénesis cardíaca es el Nkx2.5, el cual se expresa predominantemente en el músculo cardíaco adulto, sin aparecer de forma significativa en el músculo esquelético adulto o en otros tejidos (Lints TJ, 1996). Dada su importancia en el proceso de cardiogénesis, este marcador ha sido objeto de estudio para identificar los determinantes genéticos relacionados con muchas de las enfermedades congénitas relacionadas con malformaciones en la estructura del corazón, también llamadas cardiopatías congénitas (CC), las cuales son responsables de una elevada mortalidad infantil (Lloyd-Jones D, 2009) y cuya etiología se desconoce mayoritariamente (Jenkins JL, 2007), (Pierpont ME, 2007). Precisamente, mutaciones de este gen están relacionadas con muchas de estas CC, tales como defectos en la conducción aurículo-ventricular con herencia autosómica dominante (Schott JJ, 1998), defectos estructurales como comunicaciones interauriculares u otras alteraciones como la tetralogía de Fallot (Gelb BC, 2004) o el síndrome de corazón izquierdo hipoplásico (Stallmeyer B, 2010), aunque los mecanismos moleculares no están muy claros (McElhinney DB, 2003), (Reamon-Buettner SM, 2004) y (Pashmforoush M, 2004). Hasta hace poco, la expresión de Nkx2.5 parecía estar restringida a la banda lateral interna de las crestas precardíacas (región medial) (Raffin M, 2000), sin embargo estudios mas recientes sugieren que este gen está también implicado en las etapas posteriores del desarrollo y maduración del corazón, además de su papel en la formación de las células progenitoras cardíacas (Prall OW, 2007).

Por otro lado, se ha demostrado la relación existente entre Nkx2.5 y el factor de transcripción GATA-4 (Garg V, 2003), (Durocher D, 1997), (Zhu W, 2000). GATA-4 es imprescindible en los primeros estadios de gestación (Kuo CT, 1997) al igual que MEF2C, y ambos factores de transcripción parecen ser cofactores esenciales donde el primero estaría relacionado en la formación del septo interauricular y el segundo en la de los ventrículos. De este modo, Nkx2.5, GATA-4 y MEF2C estarían presentes durante los tres primeros estadios iniciales del desarrollo cardíaco. Otros factores implicados en la cardiomiogénesis serían los miembros de la familias del TGF $\beta$ , BMP y FGF, de los cuales los dos últimos intervendrían en la regulación del Nkx2.5. Estudios recientes han informado que el epicardio deriva de progenitores cardíacos que expresan este gen y pueden diferenciarse a cardiomiocitos contráctiles (Munoz-Chapuli R, 2002), (Cai CL, 2008), (Ma Q, 2008), (Zhou B, 2008), (Saga Y, 2000). En el trabajo publicado por Van Wijk B. en 2009, se propone que la regeneración miocárdica requiere la señalización de BMP por Smad y la inhibición de la señalización de FGF mediada por MEK1/2 (van Wijk B, 2009).

En el patrón de expresión del corazón embrionario (estadio IV) están presentes las proteínas contráctiles MLC2V en todas las regiones miocárdicas formadas, a excepción del tracto de salida, donde se encuentran las MLC1V. Durante este estadio, y en la región correspondiente al tracto de entrada, también están presentes la Toponina y la Troponina I. Al igual que las primeras (MLC2V en el canal atrio-ventricular, ventrículos y tracto de salida), la Troponina I está también presente durante el último estadio del desarrollo, en el corazón fetal, manteniéndose en el músculo cardíaco adulto donde intervienen en la contracción cardíaca, modificándose de forma importante en procesos de cardiopatía isquémica, donde son utilizadas como método de diagnóstico. MYH7 es el gen que codifica la cadena pesada beta de miosina (MHC $\beta$ ), está relacionada con la velocidad de contracción del corazón y una mutación en este gen está asociada en un alto porcentaje a la cardiomiopatía hipertrófica (Frey N, 2011), (Otsuka H, 2011). Durante el desarrollo fetal temprano su expresión predomina en los ventrículos mientras que la isoforma  $\alpha$  ó MYH6 lo hace en las aurículas. Finalmente, la cascada de señalización de Myocd modula la expresión génica de cardiomiocitos embrionarios, fetales y postnatales. La miocardina (Myocd) es un coactivador transcripcional del músculo esquelético y de los genes cardíacos. Está regulada al alza en las fases finales de la insuficiencia cardíaca y últimamente se han evidenciado los beneficios terapéuticos que podría tener su inhibición moderada en enfermedades cardíacas (Cen B, 2004), (Liu N, 2006), (Parmacek MS, 2007), (Miano JM, 2007), (Miano JM, 2010), (Torrado M, 2011).

Todos estos estudios relacionados con los factores moleculares implicados en la cardiogénesis son esenciales, dado que muchos autores han propuesto la posible relación de los potenciales mecanismos de regeneración/reparación con la reactivación de programas embrionarios (Powel C, 2012), (Miyamoto K, 2011), (Nguyen H, 2006), (Ansieau S, 2010).



Además, estos estudios previos, nos han permitido determinar los marcadores cardíacos a tener en cuenta para el desarrollo de esta tesis. A pesar de ello y por cuestiones de tiempo, los estudios moleculares realizados se han centrado en el estudio de dichos marcadores en las paMSC y su variación bajo diferentes condiciones (% de O<sub>2</sub> y número de pase). Este estudio preliminar es fundamental para determinar los marcadores específicos a estudiar en análisis posteriores del tejido cardíaco porcino, dado que estas células provienen de la misma capa embrionaria que el corazón. Debido a este origen común, confirmado en nuestro caso con la caracterización molecular, muchos han sido los protocolos de diferenciación de las MSC hacia células cardíacas que se han llevado a cabo sin éxito. Entre los estudios de diferenciación realizados en nuestro laboratorio, también se intentó utilizando 5-azacitidina (datos no mostrados), y aunque los resultados fueron similares a los de otros grupos, se observó la importancia de MYH7 como factor determinante y diferencial entre las paMSC y el tejido cardíaco porcino.

## 2.2. Evolución del uso del modelo porcino en la terapia celular y sus aplicaciones

Las HSC fueron identificadas después de una larga búsqueda de células que sobrevivieran tras la exposición a la radiación. En este tiempo, algunos estudios demostraron que la médula ósea podía formar hueso cuando se trasplantaba en un lugar ectópico (Urist MR, 1952). El aislamiento y cultivo de células de la médula ósea que formara hueso ectópico fue demostrado por primera vez por Friedenstein y sus colaboradores utilizando un modelo porcino (Friedenstein AJ, 1970). Posteriormente, varios grupos publicaron datos similares con células de rata o conejo aisladas de médula ósea y otros tejidos (Friedenstein AJ, 1970), (Owen M, 1988), (Caplan AI, 1991). Pero en la médula ósea no sólo hay células hematopoyéticas, además existen otras denominadas células mesenquimales (MSC) a las que se identificó como BM-MSC precisamente por su origen mesodérmico (del inglés *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*). Así, del mismo modo que las HSC, surgió el concepto que debería haber MSC capaces de formar hueso, cartílago y otros tejidos del mesoderma embrionario (Owen M, 1988), (Caplan AI, 1991). Posteriormente, diferentes estudios *in vitro* demostraron la capacidad de estas células para diferenciarse a varios linajes celulares incluidos osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Pittenger MF, 1999), (Muraglia A, 2000).

De esta manera, las aplicaciones clínicas atribuidas a las células madre y sus beneficios como terapia, en todos los campos de la medicina, han favorecido que la ciencia se centre intensamente en el estudio de la terapia celular durante los últimos años. Y aunque los resultados no han sido los esperados inicialmente, dado el paso inmediato a la clínica por las expectativas creadas originariamente, el empleo de modelos animales grandes está siendo habitual y ampliamente utilizado para dar respuestas a las preguntas que han ido surgiendo y que inicialmente no se plantearon. En este sentido, los campos más estudiados hasta el momento en terapia celular han sido los relacionados con la regeneración de hueso y cartílago,

entre otros motivos por las propiedades intrínsecas y, ampliamente conocidas y demostradas de las MSC. Las MSC, obtenidas tanto de médula ósea como de grasa, han sido utilizadas para la reparación de lesiones óseas extensas, normalmente utilizando algún soporte para las MSC. Además se han utilizado para tratar defectos cartilagosos y lesiones traumáticas. También se han utilizado este tipo de células en el tratamiento de niños con osteogénesis imperfecta (Horwitz EM, 1999). En modelos porcinos de la especie “*Göttingen Minipig*” se ha observado recientemente que terapia con células madre, combinada con hidrogeles es capaz de regenerar parcialmente la degeneración del disco intervertebral manteniendo la perfusión y la permeabilidad de la placa terminal vertebral y el hueso subcondral (Bendtsen M, 2011). Para analizar la evolución de este estudio se utilizó la RMN, al igual que en otros relacionados con la regeneración de cartílago donde se han empleado hBM-MSC marcadas con partículas superparamagnéticas de óxido de hierro o SPIO y con la proteína GFP, con el fin de estudiar la influencia de los marcajes en el comportamiento celular, así como su visualización y cuantificación en un ambiente intra-articular en cadáveres humanos con defectos en el cartílago (van Buul GM, 2011).

Los resultados de este estudio se corresponden con los obtenidos en el nuestro, donde se observa un comportamiento celular similar en todas las poblaciones utilizadas en los distintos tratamientos, donde se utilizaron los mismos tipos de marcaje celular para su seguimiento posterior. Además, nuestro análisis, llevado a cabo mediante dos metodologías diferentes con el fin de validar los resultados, se pone de manifiesto la compatibilidad de ambos marcajes sin que esto afecte a la viabilidad de los cultivos. En endocrinología, resultados positivos obtenidos mediante el trasplante de islotes de páncreas en pacientes diabéticos, así como estudios realizados en modelos preclínicos de gran tamaño como el cerdo (Sakata N, 2012), han incrementado el interés por utilizar células capaces de producir insulina. En este estudio en modelo porcino, los islotes son trasplantados encapsulados en una membrana semipermeable, similar al utilizado en el grupo de tratamiento 1 de nuestro estudio, que los protege de la inmunidad del receptor. Por otro lado, las células madre de la pulpa dental o DPSC (del inglés *Dental Pulp Stem Cells*) constituyen una gran promesa para la regeneración dental y las enfermedades dentales. Recientemente se ha estudiado la viabilidad de la utilidad del trasplante alogénico de DPSC, analizando su inmunogenicidad y su actividad inmunomoduladora sobre linfocitos T (Tang R, 2012). En oftalmología, se ha estudiado la diferenciación de iPS de la especie porcina en fotorreceptores de bastones y su integración en la retina (Zhou L, 2011). A nivel muscular, se han utilizado modelos experimentales de la enfermedad de Duchenne para determinar la capacidad de distintos tipos de células madre de contribuir a regenerar el músculo esquelético. Los primeros estudios en modelos de distrofia muscular se realizaron con mioblastos esqueléticos en los años 90 y aunque los resultados iniciales no fueron positivos permitieron determinar aspectos importantes como la inmunosupresión, para diseños posteriores. En cuanto a indicaciones relacionadas con el sistema nervioso, las células madre presentan un enorme potencial como células capaces de

reconstruir neuronas y estructuras dañadas en enfermedades como la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Alzheimer, esclerosis en placas, infartos cerebrales o lesiones medulares. En la enfermedad del Parkinson se han utilizado células de origen fetal en ensayos clínicos en humanos con resultados bastante controvertidos inicialmente (Fischbach GD, 2001), (Dunnett SB, 2001) y a día de hoy se están desarrollando tres ensayos en humanos a nivel mundial con MSC. En nuestro país, y tras los buenos resultados obtenidos en animales, se están llevando a cabo ensayos clínicos en enfermos de ELA, coordinados desde el Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández (UMH/CSIC), mediante el autotrasplante de células mononucleares de médula ósea a médula espinal (Cabanés C, 2007). Durante el pasado año se llevó a cabo la reprogramación de células progenitoras neurales porcinas o NPC (del inglés *Neural Progenitor Cells*) derivadas del epiblasto, para estudiar los mecanismos implicados en la transición temprana desde la pluripotencia a la multipotencia en el cerdo y la reversión del proceso provocado por reprogramación (Rasmussen MA, 2011). La posibilidad de regenerar tejido hepático con células madre hematopoyéticas se describió por primera vez por el grupo de Petersen (Petersen BE, 1999) y al menos *in vitro* se ha demostrado la capacidad de las MSC de diferenciarse a hepatocitos maduros y funcionales (Schwartz RE, 2002). Durante este mismo año se ha realizado el trasplante intraportal de hBM-MSK en cerdos de forma inmediata, evitando su muerte por insuficiencia hepática grave (Li J, 2012).

De este modo, se podría concluir que el modelo porcino está siendo empleado cada vez con más intensidad en el ámbito de la terapia celular, en todos sus campos de aplicación dadas las características del mismo. A pesar de que ningún modelo animal se comporta y es exactamente igual al humano, el modelo porcino es el que más se asemeja en todos los sentidos, aunque ello conlleve un incremento en el coste económico en los estudios preclínicos así como disponer de recursos humanos y materiales especializados para su manejo. En el caso de las enfermedades cardiovasculares, el uso de este modelo es considerado el idóneo, por lo que se ha convertido en un paso previo imprescindible a realizar, ante cualquier ensayo clínico en humanos, a pesar de las reticencias iniciales de los científicos por el retraso y dificultades que este modelo supone. Todo esto será analizado con más detalle a partir del punto 3.3 de este apartado de discusión.

## 2.3. Desarrollos tecnológicos específicos

### 2.3.1. Técnicas de imagen para el diagnóstico y seguimiento *in vivo* en estudios preclínicos

El empleo del modelo porcino en estudios preclínicos, ha contribuido al desarrollo de técnicas que permitan valorar la evolución de los diversos estudios, sin necesidad de realizar el sacrificio de los animales de experimentación en tiempos cortos de seguimiento, como ocurre con modelos más pequeños. El análisis de resultados a diferentes tiempos, es fundamental en los laboratorios de ciencia más básica, para estudiar como se producen los mecanismos

responsables en un experimento y analizar los procesos intermedios que lo desencadenan. Por eso, los modelos animales de experimentación como el ratón, seguirán siendo utilizados de forma habitual en ciencia, dado el incremento en el coste económico y el esfuerzo adicional que supone trabajar con la misma metodología en modelos más grandes como el cerdo. A pesar de ello, si se quiere avanzar en enfermedades de elevada incidencia en la sociedad, como la diabetes, enfermedades del sistema nervioso o las enfermedades cardiovasculares, es necesario acercarse a una situación similar a lo que ocurre en los humanos. Esto supone además, intentar evaluar los resultados *in vivo* durante largos periodos de tiempo, ya que la evolución de estas enfermedades y la mejora en los síntomas, es apreciable a largo plazo. Por todo esto, las técnicas de imagen están siendo consideradas las técnicas de elección en la valoración de muchos estudios preclínicos con estos modelos.

En estudios como el nuestro, donde no sólo se busca analizar la evolución de la enfermedad con los distintos tratamientos, sino que es fundamental saber si el modelo patológico conseguido es el adecuado, estas técnicas de imagen se hacen necesarias además en términos de diagnóstico. Actualmente en el IAM, las técnicas de diagnóstico por imagen más utilizadas a nivel clínico son la *gammagrafía de perfusión miocárdica con isótopos* (el Talio no se une a las células isquémicas ni a las necróticas), *ecocardiograma de estrés*, la *angiografía isotópica con Tecnecio-99*, *el TAC multicorte* y la *coronariografía*. Ésta última, ha sido utilizada en nuestro estudio para determinar el lugar de oclusión en la producción del IAM. Además, para la inducción de la patología, se empleó conjuntamente con técnicas normalmente utilizadas en terapia de reperfusión, como la intervención coronaria percutánea (ICP) o angioplastia transluminal percutánea (ACTP). En nuestro caso, el balón de oclusión se utilizó para disminuir el riego en la arteria de elección y no para romper la placa de ateroma y restaurar la perfusión del miocardio isquémico, como ocurre en su empleo terapéutico. Por otra parte, a pesar de haber elegido la vía intramiocárdica para la administración de los tratamientos, una manipulación continuada de las arterias puede dar lugar a la obstrucción de los vasos distales o la microcirculación existente bajo la arteria relacionada con la isquemia. Así, a pesar de restaurar el flujo epicárdico normal, puede darse una perfusión miocárdica disminuida, que se asocia a un mayor tamaño del infarto, menor fracción de eyección del ventrículo izquierdo y un aumento de la mortalidad (Hoffmann R, 2004). Todo esto podría estar relacionado con la mortalidad asociada al modelo patológico y a la variabilidad de los infartos conseguidos en nuestro estudio, y que posteriormente han condicionado los resultados en cuanto a eficacia de los tratamientos.

Para analizar la evolución *in vivo* de los diversos estudios, sobre todo en el caso del IAM, la técnica de imagen de elección es la RMN. Ésta, a nivel morfológico permite calcular el porcentaje de área infartada, y a nivel funcional pueden evaluarse la masa miocárdica ventricular, los volúmenes sistólico y diastólico, fracción de eyección y gasto cardíaco. La RMN está siendo utilizada, tanto en el ámbito clínico como en el experimental, y han surgido nuevas

revistas especializadas que recogen los estudios más relevantes y actuales que la manejan (Pennell DJ, 2011), (Pennell DJ, 2010). Últimamente, ésta es una de las técnicas de elección en los estudios experimentales preclínicos en el ámbito de las enfermedades cardiovasculares, tanto en los modelos animales habituales como el ratón (Brix L, 2009), (Berry CJ, 2009. A), (Berry JC, 2009. B), (Parczyk M, 2010), y la rata (Daire JL, 2008), así como en modelos grandes como el porcino (Elgeti T, 2009), (Schuster A, 2010). Por todo esto y por la capacidad de poder evaluar en una única sesión la funcionalidad, viabilidad y perfusión miocárdica (Bettencourt N, 2009), la RMN cardiovascular se utiliza cada vez con mayor frecuencia, en el diagnóstico y evaluación de las enfermedades cardiovasculares. Estos estudios de RMN se están llevando a cabo además, en otros modelos porcinos como los “*Minipigs*” (Ko SF, 2011), que permiten seguimientos más largos sin que el tamaño de los animales suponga un problema en la metodología. También, para los seguimientos por RMN ha sido necesario estudiar y analizar el marcaje de las poblaciones celulares con partículas de óxido de hierro superparamagnéticas o SPIO (Ma GS, 2011), o de forma conjunta con la proteína GFP (Yang K, 2011), que permitan el seguimiento y localización de los tratamientos de terapia celular. Aunque el marcaje de las células con el complejo Endorem<sup>®</sup> (una clase de SPIO, aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) como un agente de contraste de RMN) es importante para su seguimiento *in vivo* hay que tener en cuenta una serie de factores determinantes. Por un lado este marcaje no se transmite en la división celular. Dada la capacidad de multiplicación de estas células, al dividirse, el hierro contenido en el interior citoplasmático pasa a una de las células “*hijas*” o bien se distribuye entre ellas, pero la cantidad es la misma que la del marcaje inicial. Todo esto ha sido analizado por JL Gu en su estudio del pasado año, donde propone las distintas rutas de internalización y los mecanismos posibles implicados en el destino metabólico de las SPIO (Gu JL, 2011). De este modo, con el paso del tiempo, aunque haya un mayor número de células, la señal total detectada por la resonancia siempre será la misma, y por tanto se irá haciendo más difusa. Por otro lado, en el caso que las células no hayan recibido nada del marcaje en la mitosis, no sólo estas células sino las que provengan de ellas desde entonces no podrán detectarse en los seguimientos *in vivo*. Esto se comprobó en los estudios de validación del marcaje donde, tras estudiar tanto la viabilidad de las células marcadas como la eficiencia del marcaje, se observó que al mantener dichas células marcadas en cultivo, al cabo de una semana (donde se produjeron entre 1 y 2 duplicaciones) más de la mitad de las células eran negativas a la tinción de hierro de azul de Prusia.

Otro factor a tener en cuenta es que el marcaje con Endorem<sup>®</sup> no es indicativo de viabilidad celular; si las células marcadas murieran, el hierro contenido en su interior seguiría dando la misma señal en resonancia que en el caso que dichas células se mantuvieran viables. Además, en este último caso, parte de la señal podría pasar a otras células no relacionadas, encargadas de eliminar las células apoptóticas o necróticas, como los macrófagos (Wahajuddin, 2012). Todo esto nos indica que el marcaje con Endorem<sup>®</sup>, para el seguimiento de nuestras células *in vivo*, es importante de una forma relativa y nos ayudó para observar la

localización inicial tras el trasplante así como una posible migración, en el caso que se produjera. Por otra parte, no es posible hacer un seguimiento de las células trasplantadas en todo momento ni estudiar las posibles transformaciones que pudieran sufrir a lo largo de todo el seguimiento *in vivo*.

Por todo esto era necesario contar con análisis posteriores de las muestras tomadas al finalizar dicho seguimiento *in vivo* y por tanto marcar las células de tal modo que se pudieran localizar al finalizar el estudio. Para ello se marcaron las células con la proteína fluorescente verde (GFP), mediante el uso de vectores lentivirales que quedan integrados en el DNA celular, pudiéndose transmitir a la progenie y localizarlas a nivel histológico. De este modo, en uno de los grupos de estudio, las células se transdujeron con un vector lentiviral que codifica la proteína fluorescente verde y posteriormente, las células GFP+ fueron marcadas con el complejo Endorem® asegurando así ambos tipos de marcaje.

La evaluación de la seguridad y eficacia de este tipo de marcajes es fundamental ante la posibilidad de plantear estudios en humanos, por lo que los análisis previos en modelos experimentales grandes, son la mejor opción. Estos marcajes han sido evaluados también en otros campos médicos dentro del contexto de la terapia celular, como en el caso del trasplante de islotes pancreáticos para la diabetes (Tang KX, 2011) o en estudios relacionados con la regeneración del cartílago (van Buul GM, 2011). Nuestros resultados evidencian que la incubación con el complejo Endorem® durante 24h es suficiente para obtener un 99% de eficacia en el marcaje, y la cantidad mínima de paMSC detectables por RMN es de  $5 \times 10^5$  células. Se confirmó además, la compatibilidad del marcaje con SPIO de forma conjunta con GFP. Este hecho se puso de manifiesto al comprobar que el marcaje con SPIO en paMSC-GFP+ y en paMSC-GFP- no afecta a la eficacia de ninguno de los marcajes, así como tampoco influye en la viabilidad de los cultivos. Los estudios de proliferación celular realizados con las poblaciones celulares utilizadas en los distintos grupos de tratamiento, confirmaron la ausencia de diferencias en cuanto a su comportamiento, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros grupos. A nivel molecular, el patrón de expresión de los tratamientos es muy similar en todos los casos, observándose algunas variaciones como en el caso de los marcadores KIT o MEF2C, donde se ven disminuidos respecto al control sin ningún marcaje. VEGFA y Runx2 aumentan cuando están marcados únicamente con la proteína GFP, mientras que otros como la LPL y SOD2 son algo más variables, aumentando ligeramente su expresión con ambos marcajes. Finalmente, en lo referente a la seguridad a corto plazo, tampoco se observaron efectos que pudieran comprometerla durante el tiempo que duró el estudio, y en el caso de los grupos de tratamiento marcados con SPIO, nos permitió su localización durante los seguimientos *in vivo*. A pesar de esto y como se ha descrito anteriormente, las señales detectadas por RMN no son indicativas de viabilidad celular (las paMSC que mueren liberan las nanopartículas de hierro que siguen siendo detectadas por RMN). Por tanto, es necesario disponer de otro tipo de técnicas de imagen, que permitan localizar las células trasplantadas,

de forma conjunta con la RMN. Actualmente se están utilizando otras técnicas de imagen, como la Tomografía Computarizada por Emisión de Fotones Individuales o SPECT (del inglés *Single-Photon Emission Computed Tomography*) (Peng C, 2011), la Tomografía por Emisión de Positrones-Tomografía Computarizada o PET/CT (del inglés *Positron Emission Tomography-Computed Tomography*) (Perin EC, 2011) como técnicas complementarias a la RMN. El SPECT utiliza los rayos gamma que producen isótopos radioactivos como el tecnecio 99m. Estos isótopos se introducen en el cuerpo como parte de moléculas biológicamente activas. El procedimiento es similar al PET, pero en el SPECT es el isótopo el que produce directamente el rayo gamma, mientras en el PET el isótopo produce un positrón que después se aniquila con un electrón para producir los dos rayos gamma. Estos dos rayos gamma salen en direcciones opuestas y su detección simultánea permite localizar el isótopo de forma más precisa que en el SPECT. El SPECT es, sin embargo, más simple porque pueden usarse isótopos más fáciles de obtener y de vida media más larga.

### 2.3.2. Combinación con biomatrices

La combinación de la terapia celular y la bioingeniería es otro de los enfoques que están siendo mayormente estudiados en la actualidad para la obtención de tejido funcional. Los mayores esfuerzos se centran en obtener soportes artificiales adecuados que favorezcan el crecimiento de las poblaciones celulares empleadas como tratamiento, y promuevan el desarrollo de sus propiedades en un entorno hostil tras un daño o lesión. Aunque en los últimos años, la teoría de la diferenciación celular no es la más considerada, muchos grupos opinan que la capacidad de diferenciación de las células madre no está favorecida por el entorno donde se encuentran en muchos casos. En este sentido, a nivel cardíaco algunos grupos están analizando en cerdos, las propiedades estructurales y mecánicas del miocardio con el fin de obtener soportes que, por un lado permitan la integración de las MSC y por otro favorezcan su diferenciación a cardiomiocitos funcionales, dadas las propiedades del soporte (nanofibras de poliuretano elásticas en un campo eléctrico). En este estudio, J. Guan y sus colaboradores han conseguido que las células diferenciadas incrementen notablemente marcadores cardíacos como GATA4, Nkx2.5 y MEF2C, además de desarrollar canales de calcio, necesarios para tener las propiedades electrofisiológicas adecuadas (Guan J, 2011). Asimismo, siguiendo la metodología propuesta por la Dra. D. Taylor, se ha conseguido la descelularización de hueso para crear un microambiente adecuado y promover la diferenciación osteogénica con MSC de rata (Hashimoto Y, 2011).

En esta tesis, el uso combinado de células madre y biomateriales se ha utilizado para desarrollar una forma farmacéutica que asegure la permanencia de las células dentro del miocardio después del trasplante. En estudios como el nuestro, se ha visto que una gran proporción de células inyectadas, se pierden en el miocardio durante los primeros minutos después de las inyecciones (Mazo M, 2011), (Paul A, 2009). Nuestra hipótesis planteaba la inmovilización de las paMSC en microcápsulas de alginato, para disminuir las pérdidas mecánicas de células y mejorar su retención en el miocardio. El uso del alginato como



biomaterial ha sido confirmado recientemente (Zhang H, 2008), (Yu J, 2010), (Bai XP, 2011), concretamente las cápsulas de alginato, pudiendo ser excelentes vehículos para la administración de células y factores de crecimiento. Además, estas cápsulas pueden ser marcadas fácilmente con SPIO (magnetocápsulas), para un mejor seguimiento y localización mediante RMN. En el grupo de tratamiento 1, las paMSC se encapsularon en microcápsulas de alginato y se marcaron con SPIO utilizando la especialidad comercial Endorem®. Estas magnetocápsulas, cargadas con las paMSC, se utilizaron para inmovilizar y proteger las células, además de localizarlas por RMN, actuando como un sistema de suministro de fármacos que secretan factores de crecimiento y citoquinas. Los resultados del presente estudio revelan que las paMSC encapsuladas no se ven afectadas por el marcaje de las microcápsulas con Endorem®, coincidiendo con los obtenidos *in vitro* con las células sin encapsular. Esto sugiere que las paMSC se han adaptado correctamente al entorno del biomaterial, y que el marcaje de este polímero con Endorem® no influye en la proliferación normal de las células. Las imágenes obtenidas por RMN demostraron la inmovilización de las paMSC en este grupo de tratamiento. Además, se localizaron e identificaron de forma clara durante todo el seguimiento *in vivo* y tras la toma de muestras en los estudios histológicos. Sin embargo, estos estudios histológicos evidencian reacciones a cuerpo extraño, coincidiendo con los resultados obtenidos por Robert Robitaille en 2005, a diferencia de lo que ocurre con las paMSC sin encapsular (Robitaille R, 2005). Además, el principal inconveniente encontrado en este grupo fue que el trasplante intramiocárdico no permitió la administración de una dosis similar al resto de tratamientos, debido al tamaño de las cápsulas. Por otra parte, y en contrapunto a lo anteriormente expuesto, los resultados observados, en cuanto a funcionalidad cardíaca y neovascularización del tejido, no son significativamente muy diferentes al resto de grupos, a pesar de la diferencia en las dosis. En este sentido, podría considerarse el empleo de esta forma farmacéutica para reducir las dosis a trasplantar en este tipo de terapias, debido al aumento en la retención celular y por tanto ser una estrategia eficaz que podría aumentar el efecto de la terapia. No obstante, serían necesarios más estudios para analizar los mecanismos que intervienen y explican las mejoras observadas en la funcionalidad cardíaca y que aun no están claros. Esta teoría coincidiría con la planteada por Tao Wang en 2009, el cual demuestra en conejos, una mayor efectividad del tratamiento de BM-MSc tras un infarto de miocardio cuando estas son administradas en combinación con un hidrogel de  $\alpha$ -ciclodextrina/MPEG-PCL-MPEG (Wang T, 2009).

### 3. Terapia celular con MSC de origen porcino

#### 3.1. Las MSC porcinas en relación con las humanas y murinas

La caracterización de los diferentes precursores pluri o multipotenciales adultos se suele llevar a cabo, aunque no exclusivamente, a través de los denominados Marcadores de Superficie o Grupos de Diferenciación (CD; *Cluster of Differentiation*). Las MSC constituyeron las primeras células multipotentes no hematopoyéticas aisladas y caracterizadas de médula ósea. Pueden identificarse a partir de una serie de marcadores específicos cuando se analizan

## Discusión

en su conjunto, como CD29, CD44, CD71, CD90, CD105 y CD106 (VCAM-1), además de SH2, SH3 o SH4. Por otra parte, no expresan CD45, CD34, CD11 o CD14 (De Pablo Dávila F, 2009), (Barry FP, 1999), (Barry F, 2001). Los estudios de caracterización celular realizados con las paMSC aisladas en esta Tesis, presentaron marcadores de superficie mesenquimales (CD90 y CD44), pero no endoteliales (CD31), ni marcadores de células hematopoyéticas (CD45). Además presentaron la capacidad de diferenciarse a los linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico. Sin embargo, los análisis de expresión realizados a los cultivos derivados a linajes condrogénicos no resultaron muy claros. Esto pudiera ser debido a que los genes elegidos para el estudio molecular se pongan de manifiesto de forma más temprana en el proceso de condrogénesis, como demuestra Zuk. P. A. y sus colaboradores en los mismos análisis con haMSC procedentes de lipoaspirados (Zuk PA, 2002). En su estudio analizan la capacidad de diferenciación de estas células hacia distintos linajes observando que, al inducirlas con medio de diferenciación adipogénico durante cinco semanas, se produce un aumento en la expresión de LPL a partir del día 7, que se mantiene durante todo su estudio. Al analizar el nivel de expresión de PPAR $\gamma$ , lo hace de sus isoformas 1 y 2, concluyendo que es la segunda la que se expresa de forma exclusiva a partir del día 7 tras la inducción adipogénica (PPAR $\gamma$ 1 se expresa también en su control, aunque en menor medida, al igual que ocurre con las paMSC de nuestro estudio). La isoforma 1 de este gen comienza con niveles de expresión superiores a los obtenidos de forma basal a partir de la tercera semana. Entre los marcadores de diferenciación condrogénica que analiza se encuentran, al igual que es nuestro caso con las paMSC, el colágeno tipo II (Col2A1) y el aggrecan (ACAN). En su estudio realizado con haMSC, Zuk. P. A. observó que la señal correspondiente a la expresión de dichos marcadores queda restringida entre los días 7 y 10, desapareciendo después y confirmando así su expresión temprana. A diferencia de las haMSC, donde la expresión de estos marcadores es exclusiva tras la inducción condrogénica, en las paMSC se observa la expresión basal de ACAN en los controles (paMSC crecidas en su medio habitual). Esto podría deberse a que, al igual que PPAR $\gamma$ , el aggrecan presenta también varias isoformas pudiendo haberse analizado en cada caso (haMSC y paMSC) una diferente. Al analizar la capacidad de diferenciación osteogénica, la expresión de osteocalcina (OCN) en haMSC se observa exclusivamente en el día 7, no apreciándose por tanto ninguna señal para su equivalente en la especie porcina (BGLAP) a día 21. En ninguna de las líneas celulares se observó señal correspondiente a BMP2 mediante RT-PCR. A pesar de ello, al analizar sus niveles de expresión de forma cuantitativa se observó un aumento de expresión respecto al control en el caso de las paMSC. La colagenasa tipo I (Col1A1), se presenta de forma basal en ambos tipos celulares a lo largo de todo el estudio, produciéndose un aumento moderado en su expresión al inducir la diferenciación osteogénica tanto en haMSC como en paMSC.

En los estudios moleculares realizados para determinar la capacidad de diferenciación de las paMSC, los niveles de expresión de todos los marcadores fueron analizados únicamente a día 21, después de tres semanas con los medios de diferenciación correspondiente. Por este

motivo, aquellos cuya presencia se hace patente en días previos, en el estudio con haMSC, no pudieron ser detectados en nuestro caso con paMSC. A pesar de ello, podríamos asegurar que el patrón de expresión estudiado para determinar la capacidad de diferenciación es similar en ambos tipos celulares (humano y porcino).

Las características de las paMSC estudiadas coinciden con los criterios que establece la ISCT, confirmándose así su naturaleza de células madre. Estas similitudes con MSC de origen humano y de ratón fueron apreciables tanto en el perfil de expresión de marcadores de superficie, como en su capacidad de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica. Esta capacidad de diferenciación se confirmó con las tinciones correspondientes así como en el patrón de expresión en cada uno de los casos. Sin embargo, los estudios de proliferación celular se vieron alterados respecto a lo observado con MSC de otro origen. En este sentido, en las curvas de crecimiento obtenidas por otros grupos, donde se analizan los tiempos de duplicación bajo diferentes condiciones de  $O_2$ , se observa un aumento considerable de la proliferación celular al disminuir las condiciones de cultivo del 20% al 3% de  $O_2$  (Estrada JC, 2011), (Fehrer C, 2007). Esto puede ser debido a que las células expuestas a elevadas concentraciones de  $O_2$  pueden verse dañadas en su DNA, contribuyendo a llegar antes a estados de senescencia, y como consecuencia producir una disminución en la viabilidad en los cultivos celulares (Parrinello S, 2003), (Chen Q, 1995), (Busuttill RA, 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos con MSC de origen porcino, presentan un crecimiento similar, tanto si las condiciones de cultivo se producen al 20% de  $O_2$  como si lo hacen al 3%. Puede afirmarse incluso que, a diferencia de lo que ocurre con las MSC de origen humano y de ratón, el crecimiento de las MSC porcinas es ligeramente superior bajo condiciones de crecimiento del 20% de  $O_2$ . Esto sugiere que las paMSC podrían presentar una mayor resistencia al estrés oxidativo que las de otros orígenes, aunque para confirmar esta hipótesis sería necesario realizar un análisis más exhaustivo de su patrón de expresión, además de analizar su estabilidad genética mediante ensayos de Q-FISH, a diferentes tiempos y bajo ambas concentraciones de  $O_2$ .

### 3.2. Importancia de los estudios preclínicos con MSC

Ante las enormes expectativas creadas y de una forma un tanto precipitada, se pusieron en marcha numerosos ensayos clínicos utilizando el trasplante autólogo de un "pool" de células que contenían tanto MSC, células progenitoras endoteliales y HSC (para una mínima manipulación del trasplante) principalmente para cardiopatías isquémicas (Perin EC, 2003), (Stamm C, 2004), (Britten MB, 2003). En relación a esto, recientemente se puso de manifiesto que las MSC proporcionaban mejores resultados que los precursores hematopoyéticos en el tratamiento del IAM (Armiñan A, 2010). Posteriormente se emplearon MSC obtenidas de tejido adiposo y en todos los casos se creó una gran controversia frente a los resultados obtenidos entre la comunidad científica más básica y los clínicos. Estos últimos apuntaban a mejoras en los parámetros funcionales, aunque los mecanismos no estaban del todo muy claros, por lo que

ha sido necesario retroceder en este tipo de investigaciones para conocer los aspectos más biológicos y moleculares de este tipo de terapias.

A pesar de esto, a día de hoy se puede apreciar la situación clínica actual referente al empleo de estas células en la base de datos del Instituto Nacional de Salud de EE.UU. (NCBI), donde existen registrados más de 213 ensayos con MSC cuando hace tan sólo 9 años no había ninguno. La mayoría se encuentran en fases iniciales (fases I y II) y los campos donde más se están estudiando son en enfermedades cardiovasculares (Flynn A, 2011), (Pelacho B, 2008), en cirugía torácica (en defectos del árbol respiratorio), en oftalmología, en cirugía general y digestiva donde destaca el tratamiento de fístulas (García-Olmo D, 2009) que finalizaron los estudios en fase III, en cirugía ortopédica y traumatología, donde en 2010 la EMEA aprobó el primer fármaco basado en células madre a un laboratorio farmacéutico (aprobación del *ChondroCelet*® por las agencias reguladoras) y en el campo de la cirugía plástica y reconstructiva (grandes quemados). En este último campo también se han utilizado en lesiones cutáneas producidas como consecuencia de la radioterapia y se ha demostrado la recuperación de tejido epitelial y un aumento de vasos en úlceras cutáneas (François S, 2006). Todo esto podría estar relacionado con la capacidad inmunomoduladora de las MSC que podrían mejorar y acelerar el proceso de cicatrización. En estudios recientes, JG. Casado y col. han analizado algunos de estos mecanismos inmunomoduladores de las MSC, demostrando que la interacción de las células NK con las MSC promueve la liberación de IFN- $\gamma$  por parte de las NK, que actúan sobre las MSC estimulando la síntesis deIDO. En su artículo se plantea la hipótesis de que este IFN- $\gamma$ , no sólo actúan activando IDO sino que modula el fenotipo y la funcionalidad de las células NK. Por otro lado tampoco se descarta la existencia de otros mecanismos inmunomoduladores de las PGE2 u otros factores (DelaRosa O, 2011). Estas propiedades inmunomoduladoras podrían explicar la ausencia de rechazo inicial y la seguridad a corto plazo, observadas durante el mes de seguimiento de nuestro estudio, a pesar de tratarse de trasplantes de células alógenas en todos los grupos de estudio.

Los estudios experimentales más recientes con MSC porcinas están siendo utilizados para estudiar la mejora en la revascularización para restaurar la función renal en estenosis aterosclerótica de la arteria renal (Eirin A, 2012), la inmunogenicidad y las propiedades inmunomoduladoras de estas células (Kumar G, 2012), en ingeniería tisular para reparaciones de cartilago (Chang CH, 2011) o como modelo experimental de trasplantes de órganos sólidos (Comite P, 2010). A pesar de todo, donde más se están estudiando las MSC porcinas son en las patologías cardíacas como las cardiopatías isquémicas (Wang D, 2011), (Sato T, 2011), en la evaluación de la función cardíaca mediante diversas técnicas de imagen tras su trasplante como tratamiento del IAM (Yang K, 2011), (Perin EC, 2011), en aneurisma de aorta (Turnbull IC, 2011), y para compararlas con las de origen humano y así poder contrastar resultados (Noort WA, 2011). Por otro lado, los efectos inmunomoduladores y anti-inflamatorios de las MSC podrían proporcionar un potencial enfoque terapéutico mejorándose la supervivencia en

los xenotrasplantes de células al incluir la terapia génica de forma combinada. Las conclusiones iniciales de estudios recientes, llevados a cabo en este aspecto, sugieren que las MSC de cerdos modificados genéticamente podrían ser una fuente de MSC para tratamientos futuros en humanos, considerando estos modelos animales, no sólo en experimentación preclínica sino como donantes potenciales de MSC (Ezzelarab M, 2011), (Kumar G, 2012).

### 3.3. Las MSC como tratamiento en enfermedades cardiovasculares

Son varios los tipos celulares que están siendo investigados por su potencial terapéutico en el infarto agudo de miocardio (IAM). Las MSC derivadas de tejido adiposo se han convertido en un tipo nuevo y prometedor, porque el tejido adiposo es una fuente abundante de células madre, que carece de limitación de los donantes y que es posible obtener por métodos mínimamente invasivos. El mecanismo por el cual la terapia basada en el trasplante de MSC causa efectos beneficiosos es controvertido. Hay muchas hipótesis sobre los mecanismos implicados en la regeneración de tejidos, incluyendo la fusión celular, transdiferenciación, o la secreción de mediadores paracrin. Algunos estudios sugieren que la mejora en la función cardíaca puede ser atribuida principalmente a la liberación de factores paracrin que median la supervivencia, neovascularización, la remodelación y la proliferación celular (Tang YL, 2005), (Nguyen BK, 2010), (Iwasaki H, 2011), (Tang JM, 2011), (Timmers L, 2011). Muchos son los estudios realizados para explicar estos mecanismos, entre los más recientes se encuentran los que utilizan co-cultivos de MSC con cardiomiocitos de rata para promover la diferenciación de las primeras hacia cardiomiocitos (Song YH, 2011).

Algunos de los estudios recientes, como los presentados por G. Suzuki a finales del pasado año, plantean la hipótesis de que las MSC movilizan a las células progenitoras de la médula ósea provocando un aumento en la proliferación de miocitos en el miocardio debido a un aumento de células cKit+/CD133+ (Suzuki G, 2011). Otros artículos apuntan que las MSC podrían reducir los riesgos de sufrir arritmias tras un IAM (Wang D, 2011). Uno de los principales objetivos en el tratamiento de las isquemias cardíacas es estimular los mecanismos de reparación vascular. Algunos grupos han analizado el potencial angiogénico de los factores que secretan las MSC para utilizar estos medios condicionados como terapia en estas enfermedades. En los resultados se observó una reducción en el tamaño del infarto, a la vez que conservaban el rendimiento sistólico y diastólico. Por otra parte, la administración intravenosa de estos medios condicionados de MSC porcinas, aumentaron la densidad capilar preservando la función cardíaca, probablemente por el aumento de la perfusión del miocardio (Timmers L, 2011).

Los estudios llevados a cabo con MSC porcinas en las cardiopatías isquémicas son varios y con objetivos científicos muy diversos. En algunos casos se estudian las posibilidades de las MSC modificadas genéticamente, se analizan los parámetros funcionales cardíacos con diversas técnicas de imagen, han sido combinadas con otras disciplinas como la bioingeniería.

Además, se han utilizado en estudios comparativos entre varios tipos celulares, obtenidos de tejidos distintos o de diversas especies. También, se están estudiando las propiedades inmunomoduladoras que presentan, la capacidad que estas células tienen para promover la migración de otras hacia el lugar de lesión o su capacidad para favorecer la neovascularización en las zonas isquémicas. Se han utilizado varias vías de administración, dosis, tiempos de seguimientos, etc. Pero los estudios no cesan en ninguno de los aspectos, siendo cada vez más frecuentes las revisiones que intentan unificar y recopilar resultados para poder obtener conclusiones y evitar repetir estudios tanto a nivel experimental (van der Spoel TI, 2011) como en los ensayos clínicos (Clifford DM, 2012). Los estudios iniciales de crecimiento celular, nos permitieron establecer las condiciones adecuadas de siembra para obtener las dosis establecidas, de cada uno de los tratamientos en un tiempo razonable. Establecer estas condiciones óptimas es fundamental para evitar procesos de diferenciación espontánea, fenómeno estudiado por otros autores (García S, 2010), (Rubio D, 2005), que podrían influir en la eficacia de los tratamientos.

### 3.4. IGF1 y HGF en terapia cardiovascular

Con la terapia celular, aun en el caso de que las células derivadas de los cardiomiocitos residentes o de células madre circulantes o trasplantadas tuvieran capacidad regenerativa tras un IAM, ésta no sería suficiente para detener los efectos de la remodelación ventricular. La angiogénesis es insuficiente para equilibrar la gran demanda de  $O_2$  y nutrientes necesaria en ese momento, y prevenir la apoptosis de los cardiomiocitos hipertrofiados o la remodelación ventricular. Por lo tanto, aumentando la perfusión al miocardio infartado, para mejorar la liberación de  $O_2$  y nutrientes a través de la formación de nuevos vasos sanguíneos, mejoraría la función del miocardio (Tacchi HH, 2006). Las pretensiones de la terapia celular en este área implicaban la obtención de un miocardio funcional tras un fenómeno de necrosis. Para ello, el miocardio necrótico podía reemplazarse mediante el trasplante de células que se diferencian a cardiomiocitos o promover la neovascularización. Otros métodos implicaban a las citoquinas, como el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CFS) y los factores de células madre (SCF), aquellos que promueven la movilización de las células madre desde la médula ósea hacia el miocardio infartado (Orlic D, 2001. B). Como se ha indicado con anterioridad, esta capacidad de migración podría estar relacionada con algunos factores de crecimiento como el VEGF o el SDF-1. Desde hace años, se conocía que la expresión de estos factores está aumentada en los tejidos hipóxicos, pudiendo ser señales que reclamen a estas células para que lleven a cabo la reparación endógena en el tejido infartado (Banai S, 1994), (Brogi F, 1996), (Lee SH, 2000).

El proceso de reparación endógena después de la necrosis miocárdica puede estar también aumentado por factores de crecimiento específico como el factor de crecimiento hepático o HGF y el factor de crecimiento insulínico o IGF1, que estimulan la duplicación de los cardiomiocitos y atraen a las células madre cardíacas residentes (Welch S, 2002), (Semsarian

C, 1999). Así, estos factores de crecimiento están siendo utilizados en este tipo de terapias por su implicación en la reparación miocárdica (Deute T, 2009), (Nguyen BK, 2010). Algunos estudios han demostrado que tratamientos post-IAM con el gen o proteína HGF atenúan la remodelación cardíaca crónica y la disfunción, ejerciendo un efecto cardioprotector tras un IAM, como indican Jin H. y sus colaboradores, pudiendo estar relacionados con mecanismos angiogénicos y anti-apoptóticos (Jin H, 2004). Del mismo modo, existen evidencias que apoyan que el factor de crecimiento insulínico IGF1 está implicado en la protección vascular y puede ser beneficioso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica producida tras esta patología (Abbas A, 2008), así como los efectos beneficiosos de este factor de crecimiento en el tratamiento de la disfunción cardíaca en la sepsis (Zhao P, 2009).

Algunos grupos han evaluado, en modelos de rata, el tratamiento previo de las MSC con “cócteles” de ciertos factores de crecimiento (FGF2, IGF1 y BMP2) con los objetivos de, por un lado promover su diferenciación a cardiomiocitos y por otro ejercer un efecto de protección sobre los existentes en el tratamiento del IAM. Los resultados dieron lugar a una reducción del miocardio infartado y una mejora en la función cardíaca, además el tratamiento con los factores de crecimiento mejoró las uniones “*gap-junction*” de las MSC trasplantadas sin producir arritmias (Hahn JY, 2008). También se ha observado que cambios en los niveles de HGF promueven la regeneración osteogénica en conejos mediada por las MSC (Wen Q, 2011), aunque en esta especie no se han estudiado los factores de crecimiento IGF1 y HGF a nivel cardiovascular pasando estos estudios directamente a modelos experimentales de mayor tamaño como el perro o el modelo porcino. Por otra parte, se ha observado que los estímulos producidos tras un IAM causan la activación de las CSC, y esta activación está mediada por una retroalimentación paracrina entre los miocitos y las CSC. En respuesta al estrés, los miocitos producen factores de crecimiento y citoquinas para los que existen receptores en las CSC. Así, después de demostrar que las CSC responden a los factores de crecimiento secretados por los miocitos adyacentes, se comprobó la activación *in situ* de las CSC por estos factores de crecimiento mediante la administración local de una combinación de IGF1 y HGF en modelo porcino de infarto de miocardio (Torella D, 2007). Previamente, la combinación de IGF1 y HGF había demostrado su eficacia en ratones (Urbanek K, 2005) y perros (Linke A, 2005). Así, la administración intracoronaria de la combinación de ambos factores, ha demostrado ser una estrategia eficaz para reducir la remodelación cardíaca producida tras un IAM, inducir la regeneración del miocardio y mejorar la función ventricular en modelo porcino (Ellison GM, 2011).

Otra de las estrategias utilizadas en terapia celular combina las células madre con la terapia génica selectiva, para intensificar las opciones de regeneración o reemplazo de células que se han destruido o están lesionadas, como también para la destrucción tumoral. El mínimo requerido para el éxito de la terapia génica es conseguir el producto genético terapéutico, en el correcto contexto biológico con mínimos efectos colaterales perjudiciales. Para conseguirlo, se



requieren nuevas estrategias para modular la expresión génica terapéutica, y métodos eficientes para el envío de genes a la célula madre. En este sentido, ante los resultados obtenidos con la administración directa de los factores IGF1 y HGF, una estrategia interesante consistía en obtener células modificadas genéticamente que pudieran sobreexpresar dichos factores y potenciar los efectos que las MSC ejercen en el miocardio isquémico. Hasta el momento, los estudios llevados a cabo han estudiado los efectos de la administración de distintos tipos celulares o de los factores de crecimiento, pero siempre por separado y de una forma independiente. Con el presente trabajo se planteó la posibilidad de combinar ambas estrategias utilizando MSC modificadas genéticamente que sobreexpresaran los factores de crecimiento IGF1 o HGF y utilizarlas de forma conjunta como tratamiento en un modelo porcino de IAM. Para ello fue necesaria la generación y validación de los vectores adecuados (pRRLsin18.CMV-IGF1-IRES-GFP y pRRLsin18.CMV-HGF-IRES-Cherry) y transducción/purificación de estas células con los vectores lentivirales. Los resultados obtenidos en los estudios ICQ y moleculares de las paMSC transducidas utilizadas en el grupo 4, demuestran la correcta preparación del tratamiento. Se confirmó que la metodología se llevó a cabo de forma correcta, tanto en los procesos de transducción celular con los dos vectores lentivirales, como en los procesos de separación celular. Por otra parte, aunque en los estudios moleculares de expresión por Q-RT-PCR se observó una clara sobreexpresión para IGF1, GFP y Cherry, esto no fue posible en el caso del HGF, probablemente por algún error en el diseño del cebador. En los estudios de expresión proteica, los resultados fueron justo al contrario, confirmándose la expresión para HGF mientras que para IGF1 no se obtuvo ninguna señal, pudiendo ser debido a que el anticuerpo utilizado no fuera el adecuado. En cualquier caso, el análisis de todos los resultados en su conjunto demuestra que las paMSC, utilizadas como tratamiento en el grupo 4 de estudio, sobreexpresaban los factores de crecimiento IGF1 y HGF.

En la valoración del efecto terapéutico de este tratamiento, a pesar de que los datos obtenidos en la evaluación del área de infarto no arrojaron una mejora significativa en el grupo 4 (correspondiente a los animales tratados con paMSC que sobreexpresan IGF1 y HGF), se produjo una angiogénesis superior al resto de grupos. Si bien es cierto que este grupo es el que presenta mayor neovascularización, también es el de mayor tasa de lesiones, por lo que pudiera existir una relación. De aquí la importancia de intentar obtener lesiones cardíacas similares en los modelos patológicos para así poder valorar mejor el efecto terapéutico de los tratamientos. A pesar de esto, el aumento de la angiogénesis también podría estar relacionada con el efecto que provoca el factor de crecimiento hepático (HGF) sobre esta patología, tal y como describen Toshikazu Nakamura y Shinya Mizuno en 2010, durante la revisión que hacen sobre esta proteína y su papel, tanto en biología celular como en la clínica médica (Nakamura T, 2010). Estos resultados corresponden con los obtenidos por RMN a lo largo de los seguimientos *in vivo* pudiendo estar relacionados con la aceleración en las cinéticas del proceso de cicatrización y en los fenómenos reparativos descritos por Kren observados en animales jóvenes como los utilizados en este estudio (Kren L, 2010).

### 3.5. Las MSC frente a nuevas opciones de terapia celular

Son muchos los desafíos a los que se enfrenta la terapia celular, no sólo en las enfermedades cardiovasculares sino en el resto de disciplinas. Después de las intensas investigaciones realizadas durante los últimos cinco años, las preguntas siguen siendo numerosas y variadas. Una de las más importantes es el tipo celular apropiado a utilizar para una terapia segura y eficaz. Son muchas las poblaciones celulares que han demostrado favorecer los procesos de reparación, regeneración, remodelación, etc., en el corazón tras un IAM. Con los resultados obtenidos durante estos años, se han ido clarificando algunos de los mecanismos implicados en las mejoras observadas con terapia celular en función del tipo celular utilizado. Una de las primeras estrategias de regeneración cardíaca basada en terapia con células fue la inyección de mioblastos esqueléticos en un miocardio isquémico. Este tipo celular puede diferenciarse a miotubos *in vivo*, aunque no a cardiomiocitos, y ha demostrado mejorar la función ventricular en animales de experimentación en el laboratorio (Menasche P, 2007). A pesar de ello los ensayos clínicos donde se utilizaron no presentaron la eficacia esperada inicialmente. Otra de las opciones tenidas en cuenta son las células derivadas de la médula ósea, las cuales han sido estudiadas por multitud de grupos y de las que se sabe incluyen una gran variedad de tipos celulares diferentes. Entre ellas se encuentran las células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea, que fueron las primeras en hacer referencia a una diferenciación a cardiomiocitos, al ser trasplantadas en corazones infartados de ratón, aunque este hecho se produce en bajas proporciones. Otra subpoblación de la médula ósea que ha demostrado su capacidad para diferenciarse a cardiomiocitos son las células progenitoras endoteliales o EPC (del inglés *Endothelial Progenitor Cells*), aunque esta capacidad no ha sido aún demostrada *in vivo* por lo que es posible que estén implicados en procesos de angiogénesis. Las células mononucleares de la médula ósea también han mostrado mejoras en la función cardíaca, pero estas han sido muy leves. En esta población, es poco probable que el mecanismo implicado sea su diferenciación a cardiomiocitos, más bien se considera que las mejoras funcionales observadas puedan ser producidas por los factores de crecimiento y citoquinas que éstas secreten. Este efecto paracrino es el mecanismo más acertado que también se le atribuye a las MSC de la médula ósea (Segers VF, 2008). A pesar de esto, las MSC presentan una predeterminación para diferenciarse hacia el linaje de donde proceden y algunos grupos han presentado protocolos de diferenciación hacia cardiomiocitos. Además, estas MSC han demostrado presentar interesantes propiedades inmunomoduladoras a tener en cuenta para otro tipo de aplicaciones. Por otra parte, las MSC obtenidas de tejido adiposo estudiadas en el presente trabajo, han demostrado tener características similares a las EPC y BM-MSc aisladas del mismo modelo, si bien estos datos no han sido recogidos en la Tesis.

La reciente identificación de diferentes clases de células progenitoras cardíacas o CPC, sugieren que el corazón, considerado hasta hace poco como un órgano post-mitótico y totalmente diferenciado, contiene un reservorio de células madre responsable de su

regeneración en situaciones de daño (agudo o crónico) en el tejido cardíaco. Varios grupos han estudiado el aislamiento de diferentes tipos de células madre cardíacas basándose en marcadores de superficie como c-Kit, Isl-1 y Sca-1, en su capacidad para generar cardiomiocitos e integrarse en el tejido cardíaco como células madre pluripotentes inducidas (Narazaki G, 2008) o en su capacidad para influir en la neovascularización del tejido isquémico como las células satélite. Estas células pueden llegar a restaurar la función cardíaca, tras una lesión isquémica aunque con una eficiencia muy variable. Otro tipo de células asociadas con el corazón son los mesangioblastos, una clase de células madre asociadas a los vasos capaces de diferenciarse a varios tipos celulares mesodérmicos. Durante este mismo año, se ha estudiado el aislamiento, caracterización y capacidad de diferenciación en modelo porcino de distintas CSC (Vanelli A, 2012). También ha sido analizado el crecimiento de estas CSC, obtenidas de biopsias de corazones humanos, en condiciones fisiológicas (bajas concentraciones de O<sub>2</sub>), obteniéndose resultados similares a los obtenidos con MSC humanas y de ratón (Li TS, 2011). Nuestro estudio comparativo entre las paMSC y pCSC evidenció las similitudes fenotípicas existentes entre ambos tipos celulares, datos a considerar para trabajos futuros. Este tipo de células ha de tenerse muy en cuenta para estudios posteriores, esto es debido al conocimiento de los mecanismos implicados, donde se combinan la regeneración directa del miocardio y los efectos paracrinos (Chimenti I, 2010). De hecho, ya se están realizando los primeros ensayos clínicos con este tipo celular con resultados alentadores. Los resultados del estudio en fase I, han sido publicados a finales del pasado año, habiéndose observado mejoras importantes en la función ventricular y reducciones en el tamaño del infarto en pacientes con IC después de un IAM, justificando así los estudios en fase II (Bolli R, 2011). También han sido recientemente evaluados los efectos de la administración directa (mediante toracotomía) de cardiosferas y de células derivadas de cardiosferas o CDC (del inglés *Cardiosphere-Derived Cells*) en modelo porcino "Minipig". A pesar que las CDC y las cardiosferas presentaron efectos equivalentes en la FE del ventrículo izquierdo, las segundas dieron lugar a una mejoría muy superior en la hemodinámica, en la función regional y en la atenuación de la remodelación del ventrículo (Lee ST, 2011).

Finalmente, otro de los tipos celulares que ha vuelto a tener protagonismo en estos estudios son las ES, las cuales pueden diferenciarse hacia cualquier tipo celular del organismo adulto. Los obstáculos que se interponen para su uso en terapéutica siguen siendo los mismos, el rechazo inmunológico y la predisposición a formar tumores, eso sin contar con los problemas éticos que conllevan. Así, conocer las vías de diferenciación de las ES y el estudio del desarrollo embrionario del corazón, han sido algunos de los objetivos en los estudios de varios grupos (Paige SL, 2012), (Mummery CL, 2012), (Voronova A, 2012). Otros retos implican la selección genética con estas células, y los resultados de estas investigaciones podrían hacer más controlable la diferenciación de las ES, limitando la formación de teratomas. Además, nuevas opciones con las ES incluyen la diferenciación *in vitro* previa a cualquier trasplante,

aunque a día de hoy, tanto las manipulaciones genéticas como el empleo de las propias ES siguen teniendo limitaciones importantes para su uso terapéutico.

Sin embargo, la capacidad limitada del corazón para regenerar el tejido cardíaco dañado ha propiciado el desarrollo de metodologías diversas para la creación de cardiomiocitos *de novo*, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, más allá de los usos en terapia de reemplazo celular, la “creación” de cardiomiocitos específicos para cada paciente podría tener aplicaciones en el testado y descubrimiento de nuevos fármacos así como en un mayor control de la enfermedad. Recientemente, las investigaciones se están centrando en tres fuentes de obtención de estos cardiomiocitos: a partir de células madre pluripotentes, de las CPC y a partir de la reprogramación de fibroblastos (Burridge PW, 2012).

#### 4. Valoración general y planteamientos futuros

Los resultados obtenidos en el *Apartado 6 de Resultados*, demuestran la correcta preparación de los diferentes tratamientos específicos evaluados en esta tesis, en un modelo porcino de IAM. Sin embargo, es preciso recordar las limitaciones que presentan a día de hoy, los grupos que utilizan vectores virales en su preparación, para un posible tratamiento en clínica. A pesar de ello, estos estudios se hacen necesarios para conocer el comportamiento de estas células y los mecanismos implicados en los procesos de reparación cardíaca. Aunque hasta el momento las conclusiones a nivel funcional no han confirmado parámetros y variables fundamentales a establecer en cualquier terapia convencional, con nuestro estudio podemos afirmar que la dosis elegida no plantea problemas de toxicidad y seguridad a corto plazo. Aunque en todos los grupos se observan mejoras en la funcionalidad cardíaca, y reducciones del % de área infartada a partir de los 15 días (T3), estas mejoras no son significativas, posiblemente debido a la presencia de una gran variabilidad intra-grupos. Sería conveniente por tanto, no sólo aumentar el número de animales en cada grupo, sino incrementar el tiempo de seguimiento *in vivo* para así valorar mejor los resultados. Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas podría estar relacionado con la edad de los animales donde, tal y como afirma L. Kren, en estos animales de joven edad, las cinéticas del proceso de cicatrización y los fenómenos reparativos están acelerados en modelos de infarto agudo de miocardio reperfundido similares al nuestro (Kren L, 2010). Además, es posible que los beneficios de los tratamientos hayan estado influidos por el momento en el que se realizaron los trasplantes, ya que éste es un factor determinante en la efectividad de estos tratamientos. Durante el proceso de isquemia tras un IAM, se llevan a cabo una serie de procesos en los momentos iniciales que tienden a producir la cicatrización del tejido. En las primeras horas, la apoptosis afecta a la gran mayoría de las células cardíacas de la zona, mientras que a partir del primer día, es la necrosis el mecanismo causante de la muerte celular. En este sentido sería interesante considerar algún estudio donde evaluar la eficacia de las paMSC, variando el momento en el que se realiza el trasplante celular. Éste es otro de los aspectos importantes a determinar. Ya es conocido que el intervalo óptimo para trasplantar las células oscila entre el

momento desde que se produce un IAM hasta una semana después, aunque aun no se ha concretado el momento idóneo para llevarlo a cabo. Posiblemente, el trasplante de los tratamientos a T0 podría haber disminuido la eficacia de los mismos. Los niveles enzimáticos indicaron la presencia de la patología cardíaca, por los valores observados en T2. Sin embargo, los niveles de todas las enzimas cardíacas disminuyen en T3 y T4, aunque no llegan a alcanzar los valores basales, coincidiendo así con lo indicado por K. Thygesen. Este autor describe que los valores de TnI se mantienen elevados hasta día 7 y son estos los de referencia fundamental para el diagnóstico, los de la CKMB comienzan a disminuir a partir de las 48-72 horas y los de la Myo se normalizan a partir de las 24 horas del inicio de la isquemia (Thygesen K, 2007). Respecto a la CKMB, hasta hace relativamente poco tiempo era la enzima cardíaca de referencia para “definir” el IAM junto con los signos y síntomas característicos y las variaciones en el ECG (Alpert JS, 2000). A día de hoy se sabe que se trata de una enzima muy sensible que puede elevarse también en daño muscular o en situaciones de daño miocárdico no isquémico (miocarditis, cardioversión eléctrica y algunas neoplasias malignas), por lo que se altera fácilmente pudiendo dar falsos positivos si se considera de forma aislada. Esto se observa en los resultados obtenidos en este estudio donde puede apreciarse una enorme variabilidad en los niveles basales de los diferentes grupos de estudio.

Una vez finalizados los seguimientos *in vivo*, la inspección de los órganos abdominales en las necropsias de todos los animales no mostró alteraciones destacables, aunque se detectaron abundantes depósitos de fibrina en la cavidad torácica, dando lugar a extensas adherencias, provocadas seguramente por el protocolo quirúrgico utilizado para los trasplantes de los tratamientos. La observación de zonas fibróticas en el ápex y septo inter-ventricular, durante la valoración macroscópica y toma de muestras, confirmó las áreas de infarto previamente analizadas por RMN. La evaluación del grado de infarto de las muestras analizadas mediante la tinción del tricómico de Masson, mostró una mayor proporción de zonas afectadas en el grupo 4, seguramente por el hecho que es en este grupo donde los infartos se mostraron de manera más acusada.

Por otra parte, en los estudios histológicos de las muestras teñidas con H/E, se realizaron con el objeto de determinar el grado de resolución del daño cardíaco, provocado por los distintos tratamientos. En este sentido, en el grupo Control es donde el grado de las lesiones es más bajo, sobre todo en las muestras *Corazón 2* y *SIV*, aunque la pericarditis es más severa que en el resto de los grupos, y las lesiones aparecen en todas las porciones estudiadas. La distribución de las lesiones probablemente esté relacionada con la administración de los diferentes tratamientos ya que coinciden en todos los grupos analizados. Por otro lado, las porciones de *Corazón 2* y *SIV* del grupo 4 parecen ser las más afectadas en cuanto a la presencia de fibrosis, inflamación y neovascularización. A continuación es el grupo 3 mientras que los grupo 1 y 2 presentan un grado de lesión inferior y similar entre ambos. Las cápsulas de alginato parecen ser las responsables de la inflamación granulomatosa observada

en casi todas las muestras del grupo 1 (en la zona del *Corazón 2*). Sin embargo, en el resto, los granulomas están sobre todo formados por linfocitos y macrófagos, indicando un proceso más crónico. Respecto al animal en el que no se produjo infarto, presenta pericarditis y una inflamación granulomatosa como respuesta probablemente a la administración de las paMSC, sin embargo, no se observan áreas de fibrosis. Por otra parte, los análisis estadísticos determinan que no hay diferencias significativas entre los diferentes grupos, aunque si las hay al comparar las distintas zonas analizadas. Estas diferencias significativas están presentes principalmente en los grupos 3 y 4 debido a que es en estos grupos donde los infartos fueron más intensos y provocaron mayores lesiones. Pero es en estos grupos también, donde los procesos de neovascularización son más notables. Este fenómeno puede tener varias interpretaciones. Por un lado, podría considerarse que un mayor grado de lesión puede estar relacionado con una mayor neoangiogénesis, debido a procesos internos donde el corazón intenta compensar la falta de oxígeno con la formación de nuevos vasos. Por otro lado, no se puede descartar la posibilidad del efecto terapéutico de los tratamientos, y que éstos hayan contribuido, en mayor o menor medida, a potenciar y favorecer los procesos de neovascularización.

Finalmente, aunque no fue posible identificar los tratamientos en todas las muestras esperadas, los resultados globales obtenidos en los estudios IHQ y moleculares confirman la presencia de los tratamientos tras un mes de seguimiento. Es necesario indicar la importancia de llevar a cabo una correcta toma de muestras en este modelo, dado el tamaño del órgano a analizar, donde es fácil obtener falsos negativos. Sin embargo, la localización de paMSC vivas en alguna de las muestras, nos indica la viabilidad de los tratamientos tras un mes de seguimiento, coincidiendo con los resultados obtenidos por I.C. Turnbull el cual también es capaz de detectar células positivas para GFP, aunque es su caso el tiempo de seguimiento fue de una semana (Turnbull IC, 2011).

Dentro de los trabajos que se plantean de forma inmediata y en relación con esta Tesis, se encuentran entre otros, diversos estudios IHQ y moleculares del tejido cardíaco y otros órganos, recopilados en la toma de muestras. Además, sería interesante confirmar nuestra hipótesis referente a la mayor resistencia que las MSC porcinas presentan al estrés oxidativo. Para ello, sería necesario realizar un análisis más profundo del patrón de expresión de estas células. Además sería importante analizar la estabilidad cromosómica de los cultivos, bajo diferentes concentraciones de O<sub>2</sub> a lo largo del tiempo, mediante ensayos de Q-FISH. Durante los estudios iniciales de crecimiento celular, se han llegado a alcanzar pases muy altos (P41), sin evidenciarse signos de senescencia celular, por lo que se plantea analizar la actividad telomerasa presente en estos cultivos, estudios que ya han iniciado algunos autores (Jeon BG, 2011).

## *Discusión*

Por otra parte, nuestro grupo ha aislado MSC porcinas procedentes de médula ósea y sangre periférica, por lo que nuestra intención es continuar con estudios comparativos de MSC procedentes de diferentes orígenes, no sólo en cuanto a sus características y comportamiento celular, sino en lo referente a su potencial terapéutico en estudios preclínicos. Dentro de los trabajos previstos en este sentido se incluyen el estudio de diferentes vías de administración, dosis o el análisis del efecto de estos tratamientos a largo plazo.

La colaboración con otros grupos, nos ha permitido ampliar nuestra línea en el campo de la cardiología, utilizando otros tipos celulares como las CSC en el tratamiento del IAM. Además, con la participación en diversos proyectos, hemos iniciado nuevas líneas de investigación en áreas tan diversas como la diabetes, la reproducción asistida o la regeneración osteoarticular.

A pesar de lo que se ha adelantado en estos últimos años, son muchos los aspectos que aún no se conocen en relación a éstas y otras células utilizadas en terapia celular. Aún falta mucho por explorar y son numerosos los conceptos por afianzar. Tampoco conocemos el verdadero potencial que este tipo de terapias puede ofrecer a la sociedad, y donde realmente se instaurarán como terapéutica habitual. A pesar de esto, el camino que nos conduce a todas estas respuestas suponen un trayecto apasionante, y de lo que si podemos estar seguros es que, en mayor o menor medida, los pacientes serán los beneficiados.



## **Conclusiones**



1. El modelo porcino de infarto agudo de miocardio (IAM) establecido, ha mostrado ser adecuado para estudios preclínicos en esta patología cardíaca. Este modelo experimental puede ser utilizado para evaluar diversos tratamientos al demostrar características similares a las que presentan los seres humanos.
2. Se han puesto a punto protocolos específicos para la obtención y purificación de las paMSC, estableciéndose las condiciones óptimas de cultivo con las que llevar a cabo la expansión *in vitro*, para la producción de las células que se administraron como tratamiento.
3. Los estudios de caracterización celular y molecular confirman la similitud de las MSC porcinas con las humanas y murinas. Sin embargo, los estudios de crecimiento celular sugieren que las MSC porcinas (paMSC) podrían presentar una mayor resistencia al estrés oxidativo que la mostrada por estas células en otras especies.
4. Las células madre mesenquimales obtenidas de tejido adiposo porcino (paMSC), marcadas con SPIO (Endorem®), han podido ser monitorizadas mediante RMN durante todo el tiempo del estudio, comprobándose que el procedimiento de marcaje no parece afectar significativamente al comportamiento normal de las células.
5. El empleo de microcápsulas de alginato, como formulación farmacéutica en terapia celular, mejora el anidamiento celular y la localización de los tratamientos por RMN. El proceso de encapsulación de las paMSC y el marcaje con SPIO (Endorem®) de estas microcápsulas no parece afectar al comportamiento celular.
6. El trasplante alogénico de todos los tratamientos evaluados han demostrado su seguridad a corto plazo (un mes de seguimiento), pudiendo estar este hecho relacionado con las propiedades inmunomoduladoras de las MSC. Además, en relación a la eficacia de los mismos, se han mejorado los parámetros de funcionalidad cardíaca en todos los casos, aunque no de forma significativa, seguramente por el corto periodo de estudio.
7. Todos los grupos analizados han presentado procesos de neoangiogénesis tras la administración de los tratamientos. La neovascularización demostró niveles variables, siendo de menor intensidad en el grupo de tratamiento 1 (paMSC microencapsuladas), y el grupo de tratamiento 4 (paMSC-IGF1-GFP+/paMSC-HGF-Cherry+) el que presentó mayor grado de angiogénesis.

## *Conclusiones*

8. Parte de paMSC administradas en los distintos grupos de tratamiento han sido identificadas en el tejido cardíaco después de un mes de seguimiento, confirmando así su viabilidad.
9. La sobreexpresión simultánea de IGF1 y HGF ha demostrado favorecer los procesos de neoangiogénesis respecto al resto de grupos; sin embargo este hallazgo no ha sido proporcional respecto a los valores de funcionalidad cardíaca, seguramente por el alto grado de infarto que presentó este grupo de estudio.
10. Los estudios moleculares de los tratamientos administrados en los distintos grupos de estudio, indican que el patrón de expresión de las paMSC no se ve alterado, de forma significativa, por el marcaje con SPIO, ni por las manipulaciones genéticas realizadas. Las variaciones más importantes de expresión génica observadas, son las correspondientes a los marcadores específicos objeto de modificación.

## **Bibliografía**



Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.* 26:1276-84 (2008).

Abbas A, Grant PJ, Kearney MT. Role of IGF-1 in glucose regulation and cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 6:1135-49 (2008).

Afilalo J, Majdan AA, Eisenberg MJ. Intensive statin therapy in acute coronary syndromes and stable coronary heart disease: a comparative meta-analysis of randomised controlled trials. *Heart.* 93:914-21(2007).

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 105:1815-22 (2005).

Al Kindi AH, Asenjo JF, Ge Y, Chen GY, Bhatena J, Chiu RC, Prakash S, Shum-Tim D. Microencapsulation to reduce mechanical loss of microspheres: implications in myocardial cell therapy. *Eur J Cardiothorac Surg.* 39:241-7 (2010).

Aleman A, Verhaar HJ, De Haan EH, De Vries WR, Samson MM, Drent ML, Van der Veen EA, Koppeschaar HP. Insulin-like growth factor-i and cognitive function in healthy older men. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:471-475 (1999).

Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined — a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 36:959-969 (2000).

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* 425:968-73 (2003).

Annunziata M, Granata R, Ghigo E. The IGF system. *Acta Diabetol.* 48:1-9 (2011).

Ansieau S, Courtois-Cox S, Morel AP, Puisieux A. Failsafe program escape and EMT: a deleterious partnership. *Semin Cancer Biol.* 21:392-6 (2011).

Armiñán A, Gandía C, García-Verdugo JM, Lledó E, Trigueros C, Ruiz-Saurí A, Miñana MD, Solves P, Payá R, Montero JA, Sepúlveda P. Mesenchymal stem cells provide better results than hematopoietic precursors for the treatment of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 55:2244-53 (2010).

Arnqvist HJ. The role of igf-system in vascular insulin resistance. *Horm Metab Res.* 40:588-92 (2008).

Atala A, Lanza R, Thomson J, Nerem R. *Principles of Regenerative Medicine.* (First Edition), Elsevier, (2008).

Audet J, Stanford WL. *Stem cells in regenerative medicine (Methods in Molecular Biology TM)* Humana Press, Canada (2009).

Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res.* 21: 420-31 (2003).

Bai XP, Zheng HX, Fang R, Wang TR, Hou XL, Li Y, Chen XB, Tian WM. Fabrication of engineered heart tissue grafts from alginate/collagen barium composite microbeads, *Biomed. Mater.* 6:045002 (2011).

Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC, Zanchetti A. en representación de la Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of



## Bibliografía

antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Br Med J.* 324:71–86 (2002).

Bailey B, Izarra A, Alvarez R, Fischer KM, Cottage CT, Quijada P, Díez-Juan A, Sussman MA. Cardiac stem cell genetic engineering using the alphaMHC promoter. *Regen Med.* 4:823-33 (2009).

Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 28:1176-9 (1994).

Barbeito CG, Andrés Laube PF. Los factores de crecimiento. Aspectos básicos y potencialidades terapéuticas. *Analecta Verineraria.* 25:8-27 (2005).

Barnett BP, Arepally A, Karmarkar PV, Qian D, Gilson WD, Walczak P, Howland V, Lawler L, Lauzon C, Stuber M, Kraitichman DL, Bulte JW. Magnetic resonance-guided, real-time targeted delivery and imaging of magnetocapsules immunoprotecting pancreatic islet cells. *Nat Med.* 13:986-91 (2007).

Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun.* 265:134-9 (1999).

Barry F, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, Zaia J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 289:519-524 (2001).

Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 344:1750-7 (2001).

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 114:763-76 (2003).

Ben-Haim SA, Osadchy D, Schuster I, Gepstein L, Hayam G, Josephson ME. Nonfluoroscopic, in vivo navigation and mapping technology. *Nat Med.* 2:1393-1395 (1996).

Bendtsen M, Bünger CE, Zou X, Foldager C, Jørgensen HS. Autologous stem cell therapy maintains vertebral blood flow and contrast diffusion through the endplate in experimental intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 36:E373-9 (2011).

Berry CJ, Miller JD, McGroary KA, Thedens DR, Young SG, Heistad DD, Weiss RM. Biventricular adaptation to volume overload in mice with aortic regurgitation. *J Cardiovasc Magn Reson.* 11:27 (2009).

Berry CJ, Thedens DR, Light-McGroary K, Miller JD, Kutschke W, Zimmerman KA, Weiss RM. Effects of deep sedation or general anesthesia on cardiac function in mice undergoing cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 11:16 (2009).

Bettencourt N, Chiribiri A, Schuster A, Nagel E. Assessment of myocardial ischemia and viability using cardiac magnetic resonance. *Current heart failure reports.* 6:142-153 (2009).

Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol.* 174:249-82 (2006).

Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, Cacoub P, Cohen EA, Creager MA, Easton JD, Flather MD, Haffner SM, Hamm CW, Hankey GJ, Johnston SC, Mak KH, Mas JL, Montalescot G, Pearson TA, Steg PG, Steinhubl SR, Weber MA, Brennan DM, Fabry-

- Ribaudo L, Booth J, Topol EJ; CHARISMA Investigators. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med.* 354:1706-17 (2006).
- Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 105:1663-8 (2000).
- Birchmeier C, Gherardi E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 8:404-10 (1998).
- Birukova AA, Alekseeva E, Mikaelyan A, Birukov KG. HGF attenuates thrombin-induced endothelial permeability by Tiam1-mediated activation of the Rac pathway and by Tiam1/Rac-dependent inhibition of the Rho pathway. *FASEB J.* 21:2776-86 (2007).
- Bittira B, Shum-Tim D, Al-Khalidi A, Chiu RC. Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg.* 24:393-8 (2003).
- Blundell TL, Bedarkar S, Rinderknecht E, Humbel RE. Insulin-like growth factor: a model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75:180-4 (1978).
- Boersma E, Maas AC, Deckers JW, Simoons M. Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: re-appraisal of the golden hour. *Lancet.* 348:771-5 (1996).
- Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet.* 378:1847-57 (2011).
- Bosch P, Pratt SL, Stice SL. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol Reprod.* 74:46-57 (2006).
- Botta R, Gao E, Stassi G, Bonci D, Pelosi E, Zwas D, Patti M, Colonna L, Baiocchi M, Coppola S, Ma X, Condorelli G, Peschle C. Heart infarct in NOD-SCID mice: therapeutic vasculogenesis by transplantation of human CD34+ cells and low dose CD34+KDR+ cells. *FASEB J.* 18:1392-4 (2004).
- Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JW, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE, Fleischmann BK. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood.* 110:1362-9 (2007).
- Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schächinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation.* 108:2212-2218 (2003).
- Brix L, Ringgaard S, Rasmusson A, Sørensen TS, Kim WY. Three dimensional three component whole heart cardiovascular magnetic resonance velocity mapping: comparison of flow measurements from 3D and 2D acquisitions. *J Cardiovasc Magn Reson.* 11:3 (2009).
- Brogi E, Schatteman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, Isner JM. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest.* 97:469-76 (1996).
- Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 16:155-62 (1998).
- Bruyninckx R, Aertgeerts B, Bruyninckx P, Buntinx F. Signs and symptoms in diagnosing acute myocardial infarction and acute coronary syndrome: a diagnostic meta-analysis. *Br J Gen Pract.* 58e1-e8 (2008).

## *Bibliografia*

Budde MD, Frank JA. Magnetic tagging of therapeutic cells for MRI, *J. Nucl. Med.* 50:171-4 (2009).

Burridge PW, Keller G, Gold JD, Wu JC. Production of De Novo Cardiomyocytes: Human Pluripotent Stem Cell Differentiation and Direct Reprogramming. *Cell Stem Cell.* DOI:10.1016/j.stem.2011.12.013 (2012).

Busseuil D, Shi Y, Mecteau M, Brand G, Kernaleguen AE, Thorin E, Latour JG, Rhéaume E, Tardif JC. Regression of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic peptide infusions in rabbits. *Br J Pharmacol.* 154:765-73 (2008).

Busuttill RA, Rubio M, Dolle ME, Campisi J, Vijg J. Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell.* 2:287–294 (2003).

Cabanes C, Bonilla S, Tabares L, Martínez S. Neuroprotective effect of adult hematopoietic stem cells in a mouse model of motoneuron degeneration. *Neurobiol Dis.* 26:408-18 (2007).

Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, Yang L, Bu L, Liang X, Zhang X, Stallcup WB, Denton CP, McCulloch A, Chen J, Evans SM. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature.* 454:104–108 (2008).

Camacho-Hubner C, Woods KA, Clark AJ, Savage MO. Insulin-like growth factor (igf)-i gene deletion. *Rev Endocr Metab Disord.* 3:357–61 (2002).

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 9:641-650 (1999).

Cao H, Chu Y, Zhu H, Sun J, Pu Y, Gao Z, Yang C, Peng S, Dou Z, Hua J. Characterization of immortalized mesenchymal stem cells derived from foetal porcine pancreas. *Cell Prolif.* 44:19-32 (2011).

Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Høydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW 2nd, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 13:613-8 (2007).

Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. Serum insulin-like growth factor i regulates brain amyloid- beta levels. *Nat. Med.* 8:1390–7 (2002).

Gen B, Selvaraj A, Prywes R. Myocardin/MKL family of SRF Coactivators: key regulators of immediate early and muscle specific gene expression. *J Cell Biochem.* 93:74–82 (2004).

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 25:2739-49 (2007).

Chang CH, Kuo TF, Lin FH, Wang JH, Hsu YM, Huang HT, Loo ST, Fang HW, Liu HC, Wang WC. Tissue engineering-based cartilage repair with mesenchymal stem cells in a porcine model. *J Orthop Res.* 29:1874-80 (2011).

Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:4337–4341 (1995).

Chen J, Lu Z, Cheng D, Peng S, Wang H. Isolation and characterization of porcine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. *PLoS One.* 6:e19964 (2011).

Cheng L, Qasba P, Vanguri P, Thiede MA. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34 (+) hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol.* 184:58-69 (2000).

- Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells*. 21:131-42 (2003).
- Chimenti I, Smith RR, Li TS, Gerstenblith G, Messina E, Giacomello A, Marbán E. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res*. 106:971–980 (2010).
- Clemmons DR, Moses AC, McKay MJ, Sommer A, Rosen DM, Ruckle J. The combination of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein-3 reduces insulin requirements in insulin-dependent type 1 diabetes: evidence for in vivo biological activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 85:1518–24 (2000).
- Clemmons DR, Moses AC, Sommer A, Jacobson W, Rogol AD, Sleevi MR, Allan G. Rh/igf-i/rhigfbp-3 administration to patients with type 2 diabetes mellitus reduces insulin requirements while also lowering fasting glucose. *Growth Horm IGF Res*. 15:265–74 (2005).
- Clemmons DR. Involvement of insulin-like growth factor-i in the control of glucose homeostasis. *Curr Opin Pharmacol*. 6:620–5 (2006).
- Clemmons DR. Role of igf-i in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol Metab*. 20:349–56 (2009).
- Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, Doree C, Mathur A, Watt S, Martin-Rendon E. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2:CD006536 (2012).
- Colao A. The gh-igf-i axis and the cardiovascular system: clinical implications. *Clin Endocrinol (Oxf)* 69:347–58 (2008).
- Comite P, Cobianchi L, Avanzini MA, Zonta S, Mantelli M, Achille V, De Martino M, Cansolino L, Ferrari C, Alessiani M, Maccario R, Gandolfo GM, Dionigi P, Locatelli F, Bernardo ME. Isolation and ex vivo expansion of bone marrow-derived porcine mesenchymal stromal cells: potential for application in an experimental model of solid organ transplantation in large animals. *Transplant Proc*. 42:1341-3 (2010).
- Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*. 64:271-80 (1991).
- Cusi K, DeFronzo R. Recombinant human insulin-like growth factor i treatment for 1 week improves metabolic control in type 2 diabetes by ameliorating hepatic and muscle insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 85:3077–84 (2000).
- Daire JL, Jacob JP, Hyacinthe JN, Croisille P, Montet-Abou K, Richter S, Botsikas D, Lepetit-Coiffé M, Morel D, Vallée JP. Cine and tagged cardiovascular magnetic resonance imaging in normal rat at 1.5 T: a rest and stress study. *J Cardiovasc Magn Reson*. 10:48 (2008).
- Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD Jr, van den Brande JL, van Wyk JJ. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature*. 235:107 (1972).
- Daughaday WH, Hall K, Salmon WD Jr, Van den Brande JL, Van Wyk JJ. On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab*. 65:1075-6 (1987).
- De Kok IJ, Peter SJ, Archambault M, et al. Investigation of allogeneic mesenchymal stem cellbased alveolar bone formation: preliminary findings. *Clin Oral Implants Res*. 14:481-489 (2003).
- De Pablo Dávila F, Cascales Angosto M. CÉLULAS MADRE Y TERAPIA REGENERATIVA. Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España, Monografía XXVII (2009).
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 28:875-84 (2000).

## Bibliografía

Delarosa O, Sánchez-Correa B, Morgado S, Ramírez C, Del Río B, Menta R, Lombardo E, Tarazona R, Casado JG. Human Adipose-Derived Stem Cells Impair Natural Killer Cell Function and Exhibit Low Susceptibility to Natural Killer-Mediated Lysis. *Stem Cells Dev.* PMID:21867426 (2011).

Deute T, Peter C, Fedak PW, Doyle T, et al. Hepatocyte growth factor or vascular endothelial growth factor gene transfer maximizes mesenchymal stem cell-based myocardial salvage after acute myocardial infarction. *Circulation.* 120:S247-54 (2009).

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 99:3838-43 (2002).

Dickson RB, Lippman ME. Growth factors in breast cancer. *Endocr Rev.* 16:559-89 (1995).

Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.* 107:275-81 (1999).

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8:315-7 (2006).

Du XF, Kwon SK, Song JJ, Cho CG, Park SW. Tracheal reconstruction by mesenchymal stem cells with small intestine submucosa in rabbits. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 76:345-51 (2012).

Dubrot J, Portero A, Orive G, Hernandez RM, Palazon A, Rouzaut A, Perez-Gracia JL, Hervás-Stubbs S, Pedraz JL, Melero I. Delivery of immunostimulatory monoclonal antibodies by encapsulated hybridoma cells. *Cancer Immunol Immunother.* 59:1621-31 (2010).

Dunnett SB, Bjorklund A, Lindvall O. Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go?. *Nat Rev Neurosci.* 2:365-369 (2001).

Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* 16:5687-96 (1997).

Eble DM, Walker JD, Samarel AM, Spinale FG. Myosin heavy chain synthesis during the progression of chronic tachycardia induced heart failure in rabbits. *Basic Research in Cardiology.* 93:50-5 (1998).

Edwards R, Yousef Z, Rakhit R, Wright M, Rosenthal E, Redwood S, Marber M. A model of closed chest regional myocardial infarction in the rabbit: a clinically relevant in vivo assay system of post-infarction remodeling. *Basic Res Cardiol.* 97:374-83 (2002).

Ehrlich HP, Freedman BM. Topical platelet-derived growth factor in patients enhances wound closure in the absence of wound contraction. *Cytokines Cell Mol Ther.* 7:85-90 (2002).

Eirin A, Zhu XY, Krier JD, Tang H, Jordan KL, Grande JP, Lerman A, Textor SC, Lerman LO. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Revascularization Outcomes to Restore Renal Function in Swine Atherosclerotic Renal Artery Stenosis. *Stem Cells.* doi: 10.1002/stem.1047 (2012).

Elgeti T, Laule M, Kaufels N, Schnorr J, Hamm B, Samani A, Braun J, Sack I. Cardiac MR Elastography: Comparison with left ventricular pressure measurement. *J Cardiovasc Magn Reson.* 11:44 (2009).

Ellison GM, Torella D, DelleGrottaglie S, Perez-Martinez C, Perez de Prado A, Vicinanza C, Purushothaman S, Galuppo V, Iaconetti C, Waring CD, Smith A, Torella M, Cuellas Ramon C, Gonzalo-Orden JM, Agosti V, Indolfi C, Galiñanes M, Fernandez-Vazquez F, Nadal-Ginard B.

Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart. *J Am Coll Cardiol.* 58:977-86 (2011).

Estrada JC, Albo C, Benguría A, Dopazo A, López-Romero P, Carrera-Quintanar L, Roche E, Clemente EP, Enríquez JA, Bernad A, Samper E. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ.* doi: 10.1038/cdd.2011.172 (2011).

Ezzelarab M, Ezzelarab C, Wilhite T, Kumar G, Hara H, Ayares D, Cooper DK. Genetically-modified pig mesenchymal stromal cells: xenoantigenicity and effect on human T-cell xenoresponses. *Xenotransplantation.* 18:183-95 (2011).

Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell.* 6:745–757 (2007).

Fischbach GD, Mckhann GM. Cell therapy for Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 344:763-765 (2001).

Flynn A, O'Brien T. Stem cell therapy for cardiac disease. *Expert Opin Biol Ther.* 11:177-87 (2011).

Fozzard HA. Validity of myocardial infarction models. *Circulation.* 52:131–46 (1975).

Franco D, Lamers WH, Moorman AFM. Patterns of gene expression in the developing myocardium: towards a morphologically integrated transcriptional model. *Cardiovasc Res.* 38:25-53 (1998).

Franco D, Domínguez J, de Castro Md Mdel P, Aránega A. [Regulation of myocardial gene expression during heart development]. *Rev Esp Cardiol.* 55:167-84 (2002).

François S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Saché A, Bouchet S, Thierry D, Gourmelon P, Gorin NC, Chapel A. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells.* 24:1020-9 (2006).

Franzosi MG, Santoro E, Zuanetti G, Baigent C, Collins R, Flather M, Kjekshus J, Latini R, Liu LS, Maggioni AP, Sleight P, Swedberg K, Tognoni G, Yusuf S. como miembros del Comité de Redacción del ACE Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. Indications for ACE inhibitors in the early treatment of acute myocardial infarction. Systematic overview of individual data from 100 000 patients in randomized trials. *Circulation.* 97:2202–2212 (1998).

Freemantle N, Cleland J, Young P, Mason J, Harrison J. Beta-blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis. *Br Med J.* 318:1730–7 (1999).

Frey N, Luedde M, Katus HA. Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol.* doi: 10.1038/nrcardio.2011.159 (2011).

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 16:381-90 (1966).

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3: 393-403 (1970).

Froesch ER, Buergi H, Ramseier EB, Bally P, Labhart A. Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. *An*



## Bibliografia

insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J Clin Invest.* 42:1816-34 (1963).

Fu M, Sun CK, Lin YC, Wang CJ, Wu CJ, Ko SF, Chua S, Sheu JJ, Chiang CH, Shao PL, Leu S, Yip HK. Extracorporeal shock wave therapy reverses ischemia-related left ventricular dysfunction and remodeling: molecular-cellular and functional assessment. *PLoS One.* 6:e24342 (2011).

Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. *Clin. Chim. Acta* 327, 1–23 (2003).

Furlong RA, Takehara T, Taylor WG, Nakamura T, Rubin JS. Comparison of biological and immunochemical properties indicates that scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable. *J. Cell Sci.* 100:173–7 (1991).

Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG, Gurtner GC. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol.* 164:1935-47 (2004).

Garcia S, Bernad A, Martín MC, Cigudosa JC, Garcia-Castro J, de la Fuente R. Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 316:1648-50 (2010).

García-Olmo D, García-Verdugo JM, Alemany J and Gutiérrez-Fuentes JA. *Cell Therapy.* Ed. Mc Graw Hill (2008).

Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, Garcia-Arranz M, Pascual M. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum.* 52:79-86 (2009).

Garg V, Kathiriya IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, Rothrock CR, Eapen RS, Hirayama-Yamada K, Joo K, Matsuoka R, Cohen JC, Srivastava D. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature.* 424:443–7 (2003).

Gadue P, Huber TL, Nostro MC, Kattman S, Keller GM. Germ layer induction from embryonic stem cells. *Exp Hematol.* 33:955-64 (2005).

Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Roura S, Farré J, Soler-Botija C, Llucà-Valldeperas A, Díaz-Güemes I, Sánchez-Margallo FM, Arís A, Bayes-Genis A. Transposition of a pericardial-derived vascular adipose flap for myocardial salvage after infarct. *Cardiovasc Res.* 91:659-67 (2011).

Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Roura S, Soler-Botija C, Llucà-Valldeperas A, Díaz-Güemes I, Sánchez-Margallo FM, Bayes-Genis A. Post-infarction scar coverage using a pericardial-derived vascular adipose flap. Pre-clinical results. *Int J Cardiol.* PMID: 22137092 (2011).

Gao J, Dennis JE, Solchaga LA, Awadallah AS, Goldberg VM, Caplan AI. Tissue-engineered fabrication of an osteochondral composite graft using rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 7:363-71 (2001).

Gelb BC. Genetic basis of congenital heart disease. *Curr Opin Cardiol.* 19:110-5 (2004).

Gepstein L, Hayam G, Ben-Haim SA. A novel method for nonfluoroscopic catheter-based electroanatomical mapping of the heart. In vitro and in vivo accuracy results. *Circulation.* 95:1611–22 (1997).

Gerrits RJ, Lunney JK, Johnson LA, Pursel VG, Kraeling RR, Rohrer GA, Dobrinsky JR. A vision for artificial insemination and genomics to improve the global swine population. *Theriogenology.* 63:283-99 (2005).



Ghatpande S, Ghatpande A, Zile M, Evans T. Anterior endoderm is sufficient to rescue foregut apoptosis and heart tube morphogenesis in an embryo lacking retinoic acid. *Dev Biol.* 219:59-70 (2000).

González GE, Seropian IM, Krieger ML, Palleiro J, Lopez Verrilli MA, Gironacci MM, Cavallero S, Wilensky L, Tomasi VH, Gelpi RJ, Morales C. Effect of early versus late AT(1) receptor blockade with losartan on postmyocardial infarction ventricular remodeling in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 297:H375-86 (2009).

Gornick CC, Adler SW, Pederson B, Hauck J, Budd J, Schweitzer J. Validation of a new noncontact catheter system for electroanatomic mapping of left ventricular endocardium. *Circulation.* 99:829-35 (1999).

Görge G, Schmidt T, Ito BR, Pantely GA, and Schaper W. Microvascular and collateral adaptation in swine hearts following progressive coronary artery stenosis. *Basic Res Cardiol.* 84:524-35 (1989).

Green JA, Kim JG, Whitworth KM, Agca C, Prather RS. The use of microarrays to define functionally-related genes that are differentially expressed in the cycling pig uterus. *Reprod Suppl.* 62:163-76 (2006).

Gu JL, Xu HF, Han YH, Dai W, Hao W, Wang C, Gu N, Xu H, Cao J. The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264. 7 cell. *Sci China Life Sci.* 54:793-805 (2011).

Guan J, Wang F, Li Z, Chen J, Guo X, Liao J, Moldovan NI. The stimulation of the cardiac differentiation of mesenchymal stem cells in tissue constructs that mimic myocardium structure and biomechanics. *Biomaterials.* 32:5568-80 (2011).

Guercio A, Di Marco P, Casella S, Cannella V, Russotto L, Purpari G, Di Bella S, Piccione G. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biol Int.* 36:189-94 (2012).

Gustavsson I. Standard Karyotype of the domestic pig. *Hereditas.* 109:151-7 (1988).

Guyton A.C. & J.E. Hall, *Tratado de Fisiología Médica.* Décima edición. Editorial Mc Graw Hill (2000).

Gyongyosi M, Khorsand A, Zamini S, Sperker W, Strehblow C, Kastrup J, Jorgensen E, Hesse B, Tagil K, Botker HE, Ruzyllo W, Teresinska A, Dudek D, Hubalewska A, Ruck A, Nielsen SS, Graf S, Mundigler G, Novak J, Sochor H, Maurer G, Glogar D, Sylven C. NOGA-guided analysis of regional myocardial perfusion abnormalities treated with intramyocardial injections of plasmid encoding vascular endothelial growth factor A-165 in patients with chronic myocardial ischemia: subanalysis of the EUROINJECTONE multicenter double-blind randomized study. *Circulation.* 112:1157-1165 (2005).

Hahn JY, Cho HJ, Kang HJ, Kim TS, Kim MH, Chung JH, Bae JW, Oh BH, Park YB, Kim HS. Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 51:933-43 (2008).

Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell.* 143:508-25 (2010).

Hashimoto Y, Funamoto S, Kimura T, Nam K, Fujisato T, Kishida A. The effect of decellularized bone/bone marrow produced by high-hydrostatic pressurization on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 32:7060-7 (2011).

## Bibliografia

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol.* 166:585-92 (1996).

Henning TD, Gawande R, Khurana A, Tavri S, Mandrussow L, Golovko D, Horvai A, Sennino B, McDonald D, Meier R, Wendland M, Derugin N, Link TM, Daldrup-Link HE. Magnetic Resonance Imaging of Ferumoxide-Labeled Mesenchymal Stem Cells in Cartilage Defects: In Vitro and In Vivo Investigations. *Mol Imaging.* PMID:21955668 (2011).

Hernandez RM, Orive G, Murua A, Pedraz JL. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62:711-30 (2010).

Higashi Y, Sukhanov S, Anwar A, Shai SY, Delafontaine P. Igf-1, oxidative stress and atheroprotection. *Trends Endocrinol Metab.* 21:245–54 (2010).

Hoffmann R, Lepper W, Heussen N, Elkelini M, Sieswerda GT, Kamp O, de Cock CC, Voci P, Visser CA, Hanrath P. Impact of flow level on coronary flow velocity pattern. A doppler flow study in patients with first acute myocardial infarction. *Int J Cardiovasc Imaging.* 20:27–35 (2004).

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 5:309-313 (1999).

Hou YB, Zou CW, Wang Y, Li DC, Li QB, Li HX, Zhang HZ, Zhang Q, Fan QX. Establishing a new electrical conduction pathway by anastomosis of the right auricle and right ventricle assisted by mesenchymal stem cells in a canine model. *Transplant Proc.* 43:3980-6 (2011).

Hughes GC, Post MJ, Simons M, Annex BH. Translational Physiology: Porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. *J Appl Physiol.* 94:1689-701 (2003).

Hughes HC. Swine in cardiovascular research. *Lab Anim Sci.* 36:348-50 (1986)

Humbert S, Bryson EA, Cordelieres FP, Connors NC, Datta SR, Finkbeiner S, Greenberg ME, Saudou F. The igf-1/akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by akt. *Dev Cell.* 2:831–7 (2002).

Hunter S, Langemo DK, Anderson J, Hanson D, Thompson P. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Adv Skin Wound Care.* 23:116-9 (2010).

Ikeda S, He A, Kong SW, Lu J, Bejar R, Bodyak N, Lee KH, Ma Q, Kang PM, Golub TR, Pu WT. MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. *Mol Cell Biol.* 29:2193-204 (2009).

Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair?. *Placenta* 30:2-10 (2009).

Ito W, Kanehiro A, Matsumoto K, Hirano A, Ono K, Maruyama H, Kataoka M, Nakamura T, Gelfand EW, Tanimoto M. Hepatocyte growth factor attenuates airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 32:268–80 (2005).

Iwasaki H, Kawamoto A, Tjwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Matsumoto T, Suehiro S, Carmeliet P, Asahara T. PIGF repairs myocardial ischemia through mechanisms of angiogenesis, cardioprotection and recruitment of myo-angiogenic competent marrow progenitors. *PLoS One.* 6:e24872 (2011).

Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell.* 132:567-82 (2008).

- Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnavee P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 367:113–21 (2006).
- Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA, Botto L, Britt AE, Daniels SR, Elixson M, Warnes CA, Webb CL; American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young. Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young; endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*. 115:2995-3014 (2007).
- Jeon BG, Kwack DO, Rho GJ. Variation of telomerase activity and morphology in porcine mesenchymal stem cells and fibroblasts during prolonged in vitro culture. *Anim Biotechnol*. 22:197-210 (2011).
- Jin H, Wyss JM, Yang R, Schwall R. The therapeutic potential of hepatocyte growth factor for myocardial infarction and heart failure. *Curr Pharm Des*. 10:2525-33 (2004).
- Kastrati A, Mehilli J, Nekolla S, Bollwein H, Martinoff S, Pache J, Schühlen H, Seyfarth M, Gawaz M, Neumann FJ, Dirschinger J, Schwaiger M, Schömig A; STOPAMI-3 Study Investigators. A randomized trial comparing myocardial salvage achieved by coronary stenting versus balloon angioplasty in patients with acute myocardial infarction considered ineligible for reperfusion therapy. *J Am Coll Cardiol*. 43:734-41 (2004).
- Kahan BW, Ephrussi B. Developmental potentialities of clonal *in vitro* cultures of mouse testicular teratoma. *J Natl Cancer Inst*. 44:1015-36 (1970).
- Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*. 363:751-6 (2004).
- Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Tsuboi K, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, Hotta T, Ando K, Fukuda K. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*. 104:3581-7 (2004).
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24:1294-301 (2006).
- Kim K, Lerou P, Yabuuchi A, Lengerke C, Ng K, West J, Kirby A, Daly MJ, Daley GQ. Histocompatible embryonic stem cells by parthenogenesis. *Science* 315:482-6 (2007).
- Kim WG, Shin YC, Hwang SW, Lee C, Na CY. Comparison of myocardial infarction with sequential ligation of the left anterior descending artery and its diagonal branch in dogs and sheep. *International Journal of Artificial Organs*. 26:351–7 (2003).
- Kim YJ, Huh YM, Choe KO, Choi BW, Choi EJ, Jang Y, Lee JM, Suh JS. In vivo magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells in rat myocardial infarction; simultaneous cell tracking and left ventricular function measurement. *Int. J Cardiovasc Imaging*. 25:99-109 (2009).
- Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*. 444:481-5 (2006).
- Ko SF, Yip HK, Lee CC, Sheu JJ, Sun CK, Ng SH, Huang CC, Lin YC, Chang LT, Chen MC. Immediate intramyocardial bone marrow-derived mononuclear cells implantation in minipig

## *Bibliografia*

myocardium after permanent coronary artery ligation: magnetic resonance imaging with histopathologic and immunochemical correlation. *Invest Radiol.* 46:495-503 (2011).

Kobayashi E, Sasamura H, Mifune M, Shimizu-Hirota R, Kuroda M, Hayashi M, Saruta T. Hepatocyte growth factor regulates proteoglycan synthesis in interstitial fibroblasts. *Kidney Int.* 64:1179–88 (2003).

Koide M, Hamawaki M, Narishige T, Sato H, Nemoto S, DeFreyte G, Zile MR, Cooper G IV, Carabello BA. Microtubule depolymerization normalizes in vivo myocardial contractile function in dogs with pressure-overload left ventricular hypertrophy. *Circulation.* 102:1045–52 (2000).

Konishi T, Takehara T, Tsuji T, Ohsato K, Matsumoto K, Nakamura T. Scatter factor from human embryonic lung fibroblasts is probably identical to hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 180:765-73 (1991).

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:10711-6 (1999).

Kornowski R, Hong MK, Gepstein L, Goldstein S, Ellahham S, Ben-Haim SA, Leon MB. Preliminary animal and clinical experiences using an electromechanical endocardial mapping procedure to distinguish infarcted from healthy myocardium. *Circulation.* 98:1116–24 (1998).

Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, Tsujimoto Y, Nakamura T. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 244:683-90 (1998).

Kraitchman DL, Bluemke DA, Chin BB, Heldman AW, and Heldman A. W. A minimally invasive method for creating coronary stenosis in a swine model for MRI and SPECT imaging. *Investigative Radiology.* 35:445–51 (2000).

Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, Amado LC, Martin BJ, Pittenger MF, Hare JM, Bulte JW. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation.* 107:2290-3 (2003).

Kraitchman DL, Gilson WD, Lorenz CH. Stem Cell therapy: MRI guidance and monitoring. *J Magn Reson Imaging.* 27:299-310 (2008).

Kren L, Meluzin J, Pavlovsky Z, Mayer J, Kala P, Groch L, Hornacek I, Rauser P, Vlasin M.. Experimental model of myocardial infarction: Histopathology and reperfusion damage revisited. *Pathol Res Pract.* 15:206:647-50 (2010).

Krijnen PA, Nijmeijer R, Meijer CJ, Visser CA, Hack CE, Niessen HW. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J Clin Pathol.* 55:801-11 (2002).

Kubo M, Li TS, Kurazumi H, Takemoto Y, Ohshima M, Murata T, Katsura S, Morikage N, Furutani A, Hamano K. Hypoxic Preconditioning Enhances Angiogenic Potential of Bone Marrow Cells With Aging-Related Functional Impairment. *Circ J.* PMID:22293445 (2012).

Kumar G, Hara H, Long C, Shaikh H, Ayares D, Cooper DK, Ezzelarab M. Adipose-derived mesenchymal stromal cells from genetically modified pigs: immunogenicity and immune modulatory properties. *Cytotherapy.* 14:494-504 (2012).

Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* 11:1048-60 (1997).

Lacci KM, Dardik A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale Journal of Biology and Medicine.* 83:1-9 (2010).

- Lavine SJ. Effect of changes in contractility on the index of myocardial performance in the dysfunctional left ventricle. *Cardiovascular Ultrasound*. 4:45 (2006).
- Lavitrano M, Busnelli M, Cerrito MG, Giovannoni R, Manzini S, Vargiolu A. Sperm-mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev*. 18:19-23 (2006).
- Le Roith D. The insulin-like growth factor system. *Exp Diabetes Res*. 4:205-12 (2003).
- Lee DC, Simonetti OP, Harris KR, Holly TA, Judd RM, Wu E, Klocke FJ. Magnetic resonance versus radionuclide pharmacological stress perfusion imaging for flow-limiting stenoses of varying severity. *Circulation*. 110:58-65 (2004).
- Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med*. 342:626-33 (2000).
- Lee ST, White AJ, Matsushita S, K Malliaras, Steenbergen C, Zhang Y, Li TS, Terrovitis J, Yee K, Simsir S, Makkar R, Marba'n E. Intramyocardial Injection of Autologous Cardiospheres or Cardiosphere-Derived Cells Preserves Function and Minimizes Adverse Ventricular Remodeling in Pigs With Heart Failure Post-Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 57:455–65 (2011).
- Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, Granot Y, Cohen S. Bioengineered cardiac grafts: a new approach to repair the infarcted myocardium?. *Circulation*. 102:III56–III61 (2000).
- Leri A. *CARDIOVASCULAR REGENERATION AND CELL THERAPY*. Edited by Annarosa Leri, Piero Anversa and William H. Frishman. Blackwell Futura (2007).
- Li B, Setoguchi M, Wang X, Andreoli AM, Leri A, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P. Insulin-like growth factor-1 attenuates the detrimental impact of nonocclusive coronary artery constriction on the heart. *Circ. Res*. 84:1007–1019 (1999).
- Li J, Zhang L, Xin J, Jiang L, Li J, Zhang T, Jin L, Li J, Zhou P, Hao S, Cao H, Li L. Immediate intraportal transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells prevents death from fulminant hepatic failure in pigs. *Hepatology*. doi: 10.1002/hep.25722 (2012).
- Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation*. 100:II63–II69 (1999).
- Li TS, Cheng K, Malliaras K, Matsushita N, Sun B, Marba'n L, Zhang Y, Marba'n E. Expansion of human cardiac stem cells in physiological oxygen improves cell production efficiency and potency for myocardial repair. *Cardiovascular Research*. 89:157–165 (2011).
- Liu N, Olson EN Coactivator control of cardiovascular growth and remodeling. *Curr Opin Cell Biol*. 18:715–722 (2006).
- Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 6:1282-6 (2000).
- Linke A, Müller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, Castaldo C, Cascapera S, Böhm M, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Hintze TH, Kajstura J, Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:8966-71 (2005).
- Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*. 119:419-431 (1993).

## Bibliografia

- Litvak J, Siderides LE, Vineberg AM. The experimental production of coronary artery insufficiency and occlusion. *American Heart Journal*. 53:505-18 (1957).
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  methods. *Methods*. 25:402-8 (2001).
- Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL. Mechanisms mediating brain plasticity: igf1 and adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist*. 15:134-48 (2009).
- Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 119:e21-181 (2009).
- Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grøgaard HK, Bjørnerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 355:1199-209 (2006).
- Lunney JK. Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci*. 3:179-84 (2007).
- Ma GS, Qi CM, Liu NF, Shen CX, Chen Z, Liu XJ, Hu YP, Zhang XL, Teng GJ, Ju SH, Ma M, Tang YL. Efficiently tracking of stem cells in vivo using different kinds of superparamagnetic iron oxide in swine with myocardial infarction. *Chin Med J*. 124:1199-204 (2011).
- Ma Q, Zhou B, Pu WT. Reassessment of Isl1 and Nkx2-5 cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity. *Dev Biol*. 323:98-104 (2008).
- Mack CA, Patel SR, Schwarz EA, Zanzonico P, Hahn RT, Ilercil A, Devereux RB, Goldsmith SJ, Christian TF, Sanborn TA, Kovesdi I, Hackett N, Isom OW, Crystal RG, Rosengart TK. Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 115:168-77 (1998).
- Mackenzie TC, Flake AW. Human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentiation, and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep. *Blood Cells Mol Dis*. 27:1-4 (2001).
- Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res*. 9:841-8 (2000).
- Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 10:228-41 (2003).
- Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*. 6:597-641 (1990).
- Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 67:753-91 (1998).
- Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions. *Crit. Rev. Oncog*. 3:27-54 (1992).



- Mazo M, Gavira JJ, Pelacho B, Prosper F. Adipose-derived Stem Cells for Myocardial Infarction, *J Cardiovasc Transl Res.* 4:145-53 (2011).
- McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmantz E. NKX2-5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 42:1650-5 (2003).
- Mehta SR, Yusuf S. Short- and long-term oral antiplatelet therapy in acute coronary syndromes and percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol.* 41:79S-88S (2003).
- Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 41:1078-83 (2003).
- Menasche P. Skeletal myoblasts as a therapeutic agent. *Prog Cardiovasc Dis.* 50:7-17 (2007).
- Miano JM, Long X, Fujiwara K. Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292:C70-81 (2007).
- Miano JM. Role of serum response factor in the pathogenesis of disease. *Lab Invest.* 90:1274-1284 (2010).
- Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells.* 24:376-85 (2006).
- Miyamoto K, Gurdon JB. Nuclear actin and transcriptional activation. *Commun Intergr Biol.* 4:582-3 (2011).
- Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nihon Med Sch.* 76:56-66 (2009).
- Mizuno S, Nakamura T. Suppressions of chronic glomerular injuries and TGF- $\beta$ 1 production by HGF in attenuation of murine diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 286:F134-F143 (2004).
- Mizuno S, Nakamura T. Prevention of neutrophil extravasation by hepatocyte growth factor leads to attenuations of tubular apoptosis and renal dysfunction in mouse ischemic kidneys. *Am J Pathol.* 166:1895-905 (2005).
- Mizuno S, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: a regenerative drug for acute hepatitis and liver cirrhosis. *Regen Med.* 2:161-70 (2007).
- Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. HGF as a renoprotective and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. *Front Biosci.* 13:7072-86 (2008).
- Mohrman DE, Heller LJ. *CARDIOVASCULAR PHYSIOLOGY.* (7th Edition). Mc Graw-Hill, (2010).
- Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell.* 67:901-8 (1991).
- Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science.* 311:1880-5 (2006).
- Moorman AFM, Lamers WH. Molecular anatomy of the developing heart. *Trends Cardiovasc Med.* 4:257-64 (1994).
- Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, Taniyama Y, Moriguchi A, Nagano T, Taiji M, Noguchi H, Takeshita S, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T. Therapeutic angiogenesis



## Bibliografía

induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension*. 33:1379–84 (1999).

Moroni L, Poort G, Van Keulen F, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. Dynamic mechanical properties of 3D fiber-deposited PEOT/PBT scaffolds: an experimental and numerical analysis. *J Biomed Mater Res A*. 78:605-14 (2006).

Moscoso I, Centeno A, López E, Rodríguez-Barbosa JI, Santamarina I, Filgueira P, Sánchez MJ, Domínguez-Perles R, Peñuelas-Rivas G, Domenech N. Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. *Transplant Proc*. 37:481-2 (2005).

Moscoso I, Rodríguez-Barbosa JI, Barallobre-Barreiro J, Anon P, Domenech N. Immortalization of bone marrow-derived porcine mesenchymal stem cells and their differentiation into cells expressing cardiac phenotypic markers. *J Tissue Eng Regen Med*. doi: 10.1002/term.469. (2011).

Muller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, Dow JS, Sakoda T, Long TI, Laird PW, Kedes L. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 34:107-16 (2002).

Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elefany AG, Kamp TJ. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res*. 111:344-58 (2012).

Munoz-Chapuli R, Macias D, Gonzalez-Iriarte M, Carmona R, Atencia G, Perez-Pomares JM. The epicardium and epicardial-derived cells: multiple functions in cardiac development. *Rev Esp Cardiol*. 55:1070–1082 (2002).

Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. 113:1161-1166 (2000).

Murua A, Herran E, Orive G, Igartua M, Blanco FJ, Pedraz JL, Hernandez RM. Design of a composite drug delivery system to prolong functionality of cell-based scaffolds. *Int J Pharm*. 407:142-50 (2011).

Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*. 92:139-50 (2003).

Nadal-Ginard B, Torella D, Ellison G. Cardiovascular regenerative medicine at the crossroads. Clinical trials of cellular therapy must now be based on reliable experimental data from animals with characteristics similar to human's. *Rev Esp Cardiol*. 59:1175-89 (2006).

Nadal-Ginard B, Fuster V. Myocardial cell therapy at the crossroads. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 4:1 (2007).

Nagel E, Lehmkühl HB, Bocksch W, Klein C, Vogel U, Frantz E, Ellmer A, Dreyse S, Fleck E. Noninvasive diagnosis of ischemia-induced wall motion abnormalities with the use of high-dose dobutamine stress MRI: comparison with dobutamine stress echocardiography. *Circulation*. 99:763-70 (1999).

Nakamura T, Tomita Y, Ichihara A. Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochem*. 94:1029-35 (1983).

Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 122:1450-9 (1984).

Nakamura T. Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog. Growth Factor Res*. 3:67-85 (1991).

Nakamura T, Matsumoto K, Mizuno S, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents tissue fibrosis, remodeling, and dysfunction in cardiomyopathic hamster hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288:H2131–H2139 (2005).

Nakamura T, Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86:588-610 (2010).

Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, Kida I, Aoki M, Moriguchi A, Yamada K, Hayashi S, Yo Y, Nakano H, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T. Hepatocyte growth factor is a novel member of the endothelium-specific growth factors: additive stimulatory effect of hepatocyte growth factor with basic fibroblast growth factor but not with vascular endothelial growth factor. *J. Hypertens.* 14:1067–72 (1996).

Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from Mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation,* 118:498-506 (2008).

Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood.* 108:2114-20 (2006).

National Institutes of Health. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions © 2001 Terese Winslow.

National Institutes of Health. Regenerative Medicine © 2006 Terese Winslow.

Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S, Okada H, Wada-Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S. Long-term Engraftment of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells That Differentiate to Form Myogenic Cells in Dogs With Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther.* 20:168-77 (2012).

Nguyen BK, Maltais S, Perrault LP, et al. Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors. *J Cardiovasc Transl Res.* 3:547-58 (2010).

Nguyen H, Rendl M, Fuchs E. Tcf3 governs stem cell features and represses cell fate determination in skin. *Cell.* 127:171-83 (2006).

Noel D, Djouad F, Jorgense C. Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr Opin Investig Drugs.* 3:1000-4 (2002).

Noort WA, Oerlemans MI, Rozemuller H, Feyen D, Jaksani S, Stecher D, Naaijken B, Martens AC, Bühring HJ, Doevendans PA, Sluijter JP. Human versus porcine mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation potential, immunomodulation and cardiac improvement after transplantation. *J Cell Mol Med.* doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01455.x. (2011).

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 410:701-5 (2001).

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:10344-9 (2001).

Ormö M, Cubitt AB, Kalio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science.* 273:1392-5 (1996).

Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells.* 22:377-84 (2004).

## Bibliografia

Otsuka H, Arimura T, Abe T, Kawai H, Aizawa Y, Kubo T, Kitaoka H, Nakamura H, Nakamura K, Okamoto H, Ichida F, Ayusawa M, Nunoda S, Isobe M, Matsuzaki M, Doi YL, Fukuda K, Sasaoka T, Izumi T, Ashizawa N, Kimura A. Prevalence and Distribution of Sarcomeric Gene Mutations in Japanese Patients With Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ J*. PMID: 22112859 (2011).

Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 14:213-21 (2008).

Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 136:42-60 (1988).

Paige SL, Thomas S, Stoick-Cooper CL, Wang H, Maves L, Sandstrom R, Pabon L, Reinecke H, Pratt G, Keller G, Moon RT, Stamatoyannopoulos J, Murry CE. A temporal chromatin signature in human embryonic stem cells identifies regulators of cardiac development. *Cell*. 151:221-32 (2012).

Parczyk M, Herold V, Klug G, Bauer RW, Rommel E, Jakob MP: Regional in vivo transit time measurements of aortic pulse wave velocity in mice with high-field CMR at 17.6 Tesla. *J Cardiovasc Magn Reson*. 12:72 (2010).

Parmacek MS Myocardin-related transcription factors: critical coactivators regulating cardiovascular development and adaptation. *Circ Res*. 100:633-644 (2007).

Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol*. 5:741-747 (2003).

Pashmforoush M, Lu JT, Chen H, Amand TS, Kondo R, Pravervand S, et al. NKX2-5 pathways and congenital heart disease: Loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block. *Cell*. 117:373-86 (2004).

Paul A, Ge Y, Prakash S, Shum-Tim D. Microencapsulated stem cells for tissue repairing: implications in cell-based myocardial therapy. *Regen Med*. 4:733-45 (2009).

Paul T, Windhagen-Mahnert B, Kriebel T, Bertram H, Kaulitz R, Korte T, Niehaus M, Tebbenjohanns J. Atrial reentrant tachycardia after surgery for congenital heart disease: endocardial mapping and radiofrequency catheter ablation using a novel, noncontact mapping system. *Circulation*. 103:2266-71 (2001).

Pavelić J, Matijević T, Knezević J. Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. *Indian J Med Res*. 125:511-22 (2007).

Pelacho B, Prosper F. Stem cells and cardiac disease: where are we going? *Curr Stem Cell Res Ther*. 3:265-76 (2008).

Peng C, Yang K, Xiang P, Zhang C, Zou L, Wu X, Gao Y, Kang Z, He K, Liu J, Cheng M, Wang J, Chen L. Effect of transplantation with autologous bone marrow stem cells on acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. PMID:21640407 (2011).

Pennell DJ, Firmin DN, Kilner PJ, Manning WJ, Mohiaddin RH, Neubauer S, Prasad SK. Review of *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 2009. *J Cardiovasc Magn Reson*. 12:15 (2010).

Pennell DJ, Firmin DN, Kilner PJ, Manning WJ, Mohiaddin RH, Prasad SK. Review of *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 2010. *J Cardiovasc Magn Reson*. 13:48 (2011).

Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, Simon D, Livezey K, Prockop DJ. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues

in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:1142-7 (1998).

Pérez de Prado A, Cuellas-Ramón C, Regueiro-Purriños M, Gonzalo-Orden JM, Pérez-Martínez C, Altónaga JR, García-Iglesias MJ, Orden-Recio MA, García-Marín JF, Fernández-Vázquez F. Closed-chest experimental porcine model of acute myocardial infarction reperfusion. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 60:301-6 (2009).

Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belém L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 107:2294-2302 (2003).

Perin EC, Tian M, Marini FC 3rd, Silva GV, Zheng Y, Baimbridge F, Quan X, Fernandes MR, Gahremanpour A, Young D, Paolillo V, Mukhopadhyay U, Borne AT, Uthamanthil R, Brammer D, Jackson J, Decker WK, Najjar AM, Thomas MW, Volgin A, Rabinovich B, Soghomonyan S, Jeong HJ, Rios JM, Steiner D, Robinson S, Mawlawi O, Pan T, Stafford J, Kundra V, Li C, Alauddin MM, Willerson JT, Shpall E, Gelovani JG. Imaging long-term fate of intramyocardially implanted mesenchymal stem cells in a porcine myocardial infarction model. *PLoS One*. 6:e22949 (2011).

Peters KG, Marcus ML, Harrison DG. Vasopressin and the mature coronary collateral circulation. *Circulation*. 79:1324-1331 (1989).

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 284:1168-1170 (1999).

Phan TT, Lim IJ, Bay BH, Qi R, Longaker MT, Lee ST, Huynh H. Role of IGF system of mitogens in the induction of fibroblast proliferation by keloid-derived keratinocytes in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol*. 284:C860-9 (2003).

Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 25:2896-902 (2007).

Pierpont ME, Basson CT, Benson DW Jr, Gelb BD, Giglia TM, Goldmuntz E, McGee G, Sable CA, Srivastava D, Webb CL; American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*. 115:3015-3038 (2007).

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284:143-147 (1999).

Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 95:9-20 (2004).

Powell C, Elsaiedi F, Goldman D. Injury-dependent Müller glia and ganglion cell reprogramming during tissue regeneration requires Apobec2a and Apobec2b. *J Neurosci*. 32:1096-109 (2012).

Prall OW, Menon MK, Solloway MJ, Watanabe Y, Zaffran S, Bajolle F, Biben C, McBride JJ, Robertson BR, Chaulet H, Stennard FA, Wise N, Schaft D, Wolstein O, Furtado MB, Shiratori H, Chien KR, Hamada H, Black BL, Saga Y, Robertson EJ, Buckingham ME, Harvey RP. An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. *Cell*. 128:947-959 (2007).

## Bibliografía

- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 111:229-33 (1992).
- Prather RS. Nuclear remodeling and nuclear reprogramming for making transgenic pigs by nuclear transfer. *Adv Exp Med Biol*. 591:1-13 (2007).
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 276:71-4 (1997).
- Prósper F, Verfaillie CM. Adult stem cells. *An Sist Sanit Navar*. 26:245-56 (2003).
- Prósper F, Gavira JJ, Herreros J, Rábago G, Luquin R, Moreno J, Robles JE, Redondo P. [Cell transplant and regenerative therapy with stem cells]. *An Sist Sanit Navar*. 29 Suppl 2:219-34 (2006).
- Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 129:118-29 (2005).
- Qu CQ, Zhang GH, Zhang LJ, Yang GS. Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 43:95-100 (2007).
- Raffin M, Leong LM, Ronés MS, Sparrow D, Mohun T, Mercola M. Subdivision of the cardiac Nkx2.5 expression domain into myogenic and nonmyogenic compartments. *Dev Biol*. 218:326-40 (2000).
- Rapps JA, Sturek M, Jones AW, Parker JL. Altered reactivity of coronary arteries located distal to a chronic coronary occlusion. *Am. J. Physiol*. 273:H1879-H1887 (1997).
- Rasmussen MA, Hall VJ, Petkov SG, Ujhelly O, Purity M, Dinnyes A, Niemann H, Hyttel P. Reprogramming of porcine epiblast-derived neural progenitor cells to pluripotency. *Reprod Fertil Dev*. 24:289 (2011).
- Reamon-Buettner SM, Hecker H, Spang-Borowki, Craatz S, Kuenzel E, Borlak J. Novel NKX2-5 mutations in diseased heart tissues of patients with cardiac malformations. *Am J Pathol*. 164:2117-25 (2004).
- Robitaille R, Dusseault J, Henley N, Desbiens K, Labrecque N, Hallé JP. Inflammatory response to peritoneal implantation of alginate-poly-L-lysine microcapsules. *Biomaterials*. 26:4119-27 (2005).
- Rockman HA, Wachhorst SP, Mao L, Ross J. ANG II receptor blockade prevents ventricular hypertrophy and ANF gene expression with pressure overload in mice. *American Journal of Physiology*. 266:H2468-H24751 (1994).
- Rohrer GA, Wise TH, Ford JJ. Deciphering the pig genome to understand gamete production. *Reprod Suppl*. 62:293-301 (2006).
- Roncalli J, Lemarchand P. Autologous bone marrow cells and ischemic cardiomyopathy. *Future Cardiol*. 7:603-7 (2011).
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 65:3035-3039 (2005).
- Ruiz Romero G, Moreno M, López M, Vega M. *Medicina Regenerativa y Terapia Celular. GENOMA ESPAÑA/FUAM* (2008).
- Rus Ciucă D, Sorițău O, Sușman S, Pop VI, Mișu CM. Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stem cells from the placenta. *Rom J Morphol Embryol*. 52:803-8 (2011).

Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, de Ritis DG, Curti A, Danese S, Pessina G, Pandolfi S, Natoni F, Di Febo A, Scambia G, Manfredini R, Salati S, Ferrari S, Pierelli L, Leone G, Lemoli RM. Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10+IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features. *Blood*. 108:218–27 (2006).

Saga Y, Kitajima S, Miyagawa-Tomita S. Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med*. 10:345–352 (2000).

Sakata N, Sumi S, Yoshimatsu G, Goto M, Egawa S, Unno M. Encapsulated islets transplantation: Past, present and future. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 3:19-26 (2012).

Salem HK, Thiernemann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 28:585-96 (2010).

Santolucito PA, Tighe DA, McManus DD, Yarzebski J, Lessard D, Gore JM, Goldberg RJ. Management and Outcomes of Renal Disease and Acute Myocardial Infarction. *Am J Med*. 123:847–55 (2010).

Santos E, Orive G, Calvo A, Catena R, Fernandez-Robredo P, Layana AG, Hernandez RM, Pedraz JL. Optimization of 100µm alginate-poly-L-lysine-alginate capsules for intravitreal administration. *J Control Release*. PMID:21971294 (2012).

Saukkonen T, Shojaaee-Moradie F, Williams RM, Amin R, Yuen KC, Watts A, Acerini CL, Umpleby AM, Dunger DB. Effects of recombinant human igf-I/IGF-binding protein-3 complex on glucose and glycerol metabolism in type 1 diabetes. *Diabetes*. 55:2365–70 (2006).

Sato T, Iso Y, Uyama T, Kawachi K, Wakabayashi K, Omori Y, Soda T, Shoji M, Koba S, Yokoyama S, Fukuda N, Saito S, Katagiri T, Kobayashi Y, Takeyama Y, Umezawa A, Suzuki H. Coronary vein infusion of multipotent stromal cells from bone marrow preserves cardiac function in swine ischemic cardiomyopathy via enhanced neovascularization. *Lab Invest*. 91:553-64 (2011).

Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 355:1210-21 (2006).

Schalij MJ, van Ruyge FP, Siezenga M, van der Velde ET. Endocardial activation mapping of ventricular tachycardia in patients: first application of a 32-site bipolar mapping electrode catheter. *Circulation* 98:2168–79 (1998).

Schook LB, Tumbleson ME. *Advances in Swine in Biomedical Research*. Springer Publishing Corp. (2004).

Schook L, Beattie C, Beever J, Donovan S, Jamison R, Zuckermann F, Niemi S, Rothschild M, Rutherford M, Smith D. Swine in biomedical research: creating the building blocks of animal models. *Anim Biotechnol*. 16:183-90 (2005).

Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP et al. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science*. 281:108-111 (1998).

Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *Journal of Clinical Investigation*. 86:1913-20 (1990).

Schuster A, Grünwald I, Chiribiri A, Southworth R, Ishida M, Hay G, Neumann N, Morton G, Perera D, Schaeffter T, Nagel E: An isolated perfused pig heart model for the development,



## *Bibliografía*

validation and translation of novel cardiovascular magnetic resonance techniques. *J Cardiovasc Magn Reson.* 12:53 (2010).

Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest.* 109:1291-1302 (2002).

Schwarz ER, Montino H, Fleischhauer J, Klues HG, Vom Dahl J, Hanrath P. The angiotensin II receptor antagonist EXP 3174 reduces infarct size comparable with enalaprilat and augments preconditioning in the pig heart. *Cardiovascular Drugs and Therapy.* 11:687-95 (1997).

Schwarz ER, Fleischhauer J, Montino H, Chakurakal R, Foresti M, Schuetz T, Sack S, Mohri M, Arras M, Schaper W, Hanrath P. Infarct size reduction by ischemic preconditioning is a monophasic, short-lived phenomenon in anesthetized pigs. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics.* 3:63-70 (1998).

Schwarz ER, Reffelmann T, Schoendube F, Hermanns B, Chakurakal R, Doerge H, Schuetz T, Foresti M, Messmer BJ, Radke PW, vom Dahl J, Hanrath P. Hypoxic hypoperfusion fails to induce myocardial hibernation in anesthetized swine. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics.* 4:235-47 (1999).

Schwitzer J, Nanz D, Kneifel S, Bertschinger K, Büchi M, Knüsel PR, Marincek B, Lüscher TF, von Schulthess GK. Assessment of myocardial perfusion in coronary artery disease by magnetic resonance: a comparison with positron emission tomography and coronary angiography. *Circulation.* 103:2230-5 (2001).

Schwitzer J, Wacker CM, van Rossum AC, Lombardi M, Al-Saadi N, Ahlstrom H, Dill T, Larsson HB, Flamm SD, Marquardt M, Johansson L. MRIMPACT: comparison of perfusion-cardiac magnetic resonance with single-photon emission computed tomography for the detection of coronary artery disease in a multicentre, multivendor, randomized trial. *European Heart Journal.* 29:480-9 (2008).

Scimeca CL, Bharara M, Fisher TK, Kimbriel H, Armstrong DG. Novel use of platelet-rich plasma to augment curative diabetic foot surgery. *Journal of Diabetes Science and Technology* 4:5 (2010).

Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature.* 451:937-42 (2008).

Sellke FW, Quillen JE, Brooks LA, Harrison DG. Endothelial modulation of the coronary vasculature in vessels perfused via mature collaterals. *Circulation.* 81:1938-1947 (1990).

Sellke FW, Kagaya Y, Johnson RG, Sharique R, Schoen FJ, Grossman W, Weintraub RM. Endothelial modulation of porcine coronary microcirculation perfused via immature collaterals. *Am. J. Physiol.* 262: H1669-H1675 (1992).

Semsarian C, Wu MJ, Ju YK, Marciniak T, Yeoh T, Allen DG, Harvey RP, Graham RM. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature.* 400:576-81 (1999).

Serra-Peñaranda A, Miranda-Guardiola F, Venegas-Aravena R. Análisis y características de los stents farmacológicos disponibles en la actualidad. Futuros desarrollos. *Rev Esp Cardiol.* 7:8-28 (2007).

Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev.* 5:91-116 (2006).

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* 73:1919-25 (2002).



- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:13726-31 (1998).
- Shimizu M, Tanaka R, Fukuyama T, Aoki R, Orito K, Yamane Y. Cardiac remodeling and angiotensin II-forming enzyme activity of the left ventricle in hamsters with chronic pressure overload induced by ascending aortic stenosis. *Journal of Veterinary Medical Science*. 68:271–6 (2006).
- Song YH, Pinkernell K, Alt E. Stem cell induced cardiac regeneration: fusion/mitochondrial exchange and/or transdifferentiation?. *Cell Cycle*. 10:2281-6 (2011).
- Smimov P. Cellular magnetic resonance imaging using superparamagnetic anionic iron oxide nanoparticles: applications to in vivo trafficking of lymphocytes and cell-based anticancer therapy. *Methods Mol Biol*. 512:333-53 (2009).
- Smith GD, Gunnell D, Holly J. Cancer and insulin-like growth factor-I. A potential mechanism linking the environment with cancer risk. *BMJ*. 321:847-8 (2000).
- Smith TJ. Insulin-like growth factor-i regulation of immune function: a potential therapeutic target in autoimmune diseases? *Pharmacol Rev* 62:199–236 (2010).
- Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, Bountiokos M, Onderwater EE, Lee CH, Maat AP, Serruys PW. Catheterbased intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol*. 42:2063–9 (2003).
- Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, Walker JD, Mukherjee R, Hebbar L. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circulation Research*. 82:482-95 (1998).
- Stallmeyer B, Fenge H, Nowak-Gottl U and Schulze-Bahr E. Mutational spectrum in the cardiac transcription factor gene NKX2.5 (CSX) associated with congenital heart disease. *Clin Genet*. 78:533-540 (2010).
- Stamm C, Kleine HD, Westphal B, et al. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg*. 52:152-158 (2004).
- Steg PG, Bonnefoy E, Chabaud S, Lapostolle F, Dubien PY, Cristofini P, Leizorovicz A, Touboul P. Comparison of Angioplasty and Prehospital Thrombolysis In acute Myocardial infarction (CAPTIM) Investigators. Impact of time to treatment on mortality after prehospital fibrinolysis or primary angioplasty: data from the CAPTIM randomized clinical trial. *Circulation*. 108:2851-6 (2003).
- Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*. 327:239-42 (1987).
- Strzezek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklinska M. Proteomics of boar seminal plasma - current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol*. 5:279-90 (2005).
- Suleiman MS, Singh RJ, Stewart CE. Apoptosis and the cardiac action of insulin-like growth factor i. *Pharmacol Ther*. 114:278–94 (2007).
- Sun QY, Nagai T. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Dev*. 49:347-59 (2003).

## Bibliografía

Suzuki G, Iyer V, Lee TC, Cauty JM Jr. Autologous mesenchymal stem cells mobilize cKit+ and CD133+ bone marrow progenitor cells and improve regional function in hibernating myocardium. *Circ Res.* 109:1044-54 (2011).

Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, Brand NJ, Barton PJ, Varela-Carver A, Fukushima S, Coppin SR, Partridge TA, Yacoub MH. Role of interleukin-1beta in acute inflammation and graft death after cell transplantation to the heart. *Circulation.* 110:II219-24 (2004).

Suzuki Y, Lyons JK, Yeung AC, Ikeno F. In vivo porcine model of reperfused myocardial infarction: in situ double staining to measure precise infarct area/area at risk. *Catheterization and Cardiovascular Interventions.* 71:100-7 (2008).

Suzuki Y, Yeung AC, Ikeno F. The representative porcine model for human cardiovascular disease. *J Biomed Biotechnol.* PMID:21253493 (2011)

Syková E, Jendelová P, Herynek V. Magnetic resonance imaging of stem cell migration. *Methods Mol Biol.* 750:79-90 (2011).

Tacchi HH. Aplicaciones clínicas de stem cells en terapia cardiovascular. *Insuf. Cardíaca.* (Vol I) 4:190-199. ISSN: 1850-1044. ©2006 Silver Horse srl. (2006).

Tajima H, Higuchi O, Mizuno K, Nakamura T. Tissue distribution of hepatocyte growth factor receptor and its exclusive downregulation in a regenerating organ after injury. *J Biochem.* 111:401-6 (1992).

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126:663-76 (2006).

Takeuchi K, McGowan FX Jr, Glynn P, Moran AM, Rader CM, Cao-Danh H, del Nido PJ. Glucose transporter upregulation improves ischemic tolerance in hypertrophied failing heart. *Circulation.* 98:II234-II239 (1998).

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131:861-72 (2007).

Tang JM, Wang JN, Zhang L, Zheng F, Yang JY, Kong X, Guo LY, Chen L, Huang YZ, Wan Y, Chen SY. VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart. *Cardiovasc Res.* 91:402-11 (2011).

Tang KX, Shen YF, Yang XB, Gu HM, Duan HJ, Yan ZX, Weng JP. [A study of tracking the superparamagnetic iron oxide and enhanced green fluorescent protein labeled miniature porcine bone marrow stem cells by in vitro MRI]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 50:322-7 (2011).

Tang R, Ding G. Swine dental pulp stem cells inhibit T-cell proliferation. *Transplant Proc.* 43:3955-9 (2011).

Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, Phillips MI. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg.* 80:229-36 (2005).

Tayade C, Black GP, Fang Y, Croy BA. Differential gene expression in endometrium, endometrial lymphocytes, and trophoblasts during successful and abortive embryo implantation. *J Immunol.* 176:148-56 (2006).

Teng CJ, Luo J, Chiu RC, Shum-Tim D. Massive mechanical loss of microspheres with direct intramyocardial injection in the beating heart: implications for cellular cardiomyoplasty. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 132:628-32 (2006).

Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 28:2525-38 (2007).

- Thomas ED, Lochte HL Jr., Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 257:491-6, (1957).
- Timmers L, Lim SK, Hoefler IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AA, Goumans MJ, Strijder C, Sze SK, Choo A, Piek JJ, Doevendans PA, Pasterkamp G, de Kleijn DP. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res.* 6:206-14 (2011).
- Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Oka T, Minamino T, Okada S, Morimoto S, Zhan DY, Terasaki F, Anderson ME, Inoue M, Yao A, Nagai R, Kitaura Y, Sasaguri T, Komuro I. Ca<sup>2+</sup>/calmodulindependent kinase II $\delta$  causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 122:891-9 (2010).
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 105:93-8 (2002).
- Tomé M, López-Romero P, Albo C, Sepúlveda JC, Fernández-Gutiérrez B, Dopazo A, Bernad A, González MA. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 18:985-95 (2011).
- Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation.* 100:II247-II256 (1999).
- Torella D, Ellison GM, Karakikes I, Nadal-Ginard B. Growth-factor-mediated cardiac stem cell activation in myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 4:S46-51 (2007).
- Torrado M, Iglesias R, Centeno A, López E, Mikhailov AT. Targeted gene-silencing reveals the functional significance of myocardin signaling in the failing heart. *PLoS One.* 6:e26392 (2011).
- Torres-Aleman I. Toward a comprehensive neurobiology of igf-i. *Dev Neurobiol.* 70:384-96 (2010).
- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 75:389-97 (2003).
- Turnbull IC, Hadri L, Rapti K, Sadek M, Liang L, Shin HJ, Costa KD, Marin ML, Hajjar RJ, Faries PL. Aortic implantation of mesenchymal stem cells after aneurysm injury in a porcine model. *J Surg Res.* 170:e179-88 (2011).
- Tuyet HL, Nguyen Quynh TT, Vo Hoang Minh H, Thi Bich DN, Do Dinh T, Le Tan D, Van HL, Le Huy T, Doan Huu H, Tran Trong TN. The efficacy and safety of epidermal growth factor in treatment of diabetic foot ulcers: the preliminary results. *Int Wound J.* 6:159-66 (2009).
- Ubbink Dt, Westerbos SJ, Nelson EA, Vermeulen H. A systematic review of topical negative pressure therapy for acute and chronic wounds. *Br J Surg.* 95:685-92 (2008).
- Uludag H, De Vos P, Tresco PA. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev.* 42:29-64 (2000).
- Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Chimenti S, Baker M, Limana F, Nurzynska D, Torella D, Rotatori F, Rastaldo R, Musso E, Quaini F, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res.* 97:663-73 (2005).
- Urist MR, McLean LF. Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J Bone Joint Surg Am.* 34A:443-476 (1952).

## Bibliografia

van Buul GM, Kotek G, Wielopolski PA, Farrell E, Bos PK, Weinans H, Grohnert AU, Jahr H, Verhaar JA, Krestin GP, van Osch GJ, Bernsen MR. Clinically translatable cell tracking and quantification by MRI in cartilage repair using superparamagnetic iron oxides. *PLoS One*. 6:e17001 (2011).

van der Spoel TI, Jansen of Lorkeers SJ, Agostoni P, van Belle E, Gyöngyösi M, Sluijter JP, Cramer MJ, Doevendans PA, Chamuleau SA. Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*. 91:649-58 (2011).

Van Oosterhout MFM, Arts T, Muijtjens AMM, Reneman RS, Prinzen FW. Remodeling by ventricular pacing in hypertrophying dog hearts. *Cardiovascular Research*. 49:771-8 (2001).

van Wijk B, van den Berg G, Abu-Issa R, Barnett P, van der Velden S, Schmidt M, Ruijter JM, Kirby ML, Moorman AF, van den Hoff MJ. Epicardium and myocardium separate from a common precursor pool by crosstalk between bone morphogenetic protein- and fibroblast growth factor-signaling pathways. *Circ Res*. 105:431-41 (2009).

Vanelli A, Pennarossa G, Maffei S, Galvez GB, Cossu G, Rahaman M, Gandolfi F, Brevini TA. Isolation, Characterization and Differentiation Potential of Cardiac Progenitor Cells in Adult Pigs. *Stem Cell Rev and Rep*. DOI 10.1007/s12015-011-9339-2 (2012).

Vodicka P, Smetana K Jr., Dvorankova B, Emerick T, Xu YZ, Ourednik J, Ourednik V, Motlik J. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann N Y Acad Sci*. 1049:161-71 (2005).

Voronova A, Al Madhoun A, Fischer A, Shelton M, Karamboulas C, Skerjanc IS. Gli2 and MEF2C activate each other's expression and function synergistically during cardiomyogenesis in vitro. *Nucleic Acids Res*. 40:3329-47 (2012).

Wahajuddin, Arora S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine*. 7:3445-71 (2012).

Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 76:579-92 (1994).

Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 18:1417-26 (1995).

Wang D, Jin Y, Ding C, Zhang F, Chen M, Yang B, Shan Q, Zou J, Cao K. Intracoronary delivery of mesenchymal stem cells reduces proarrhythmogenic risks in swine with myocardial infarction. *Ir J Med Sci*. 180:379-85 (2011).

Wang T, Jiang XJ, Tang QZ, Li XY, Lin T, Wu DQ, Zhang XZ, Okello E. Bone marrow stem cells implantation with alpha-cyclodextrin/MPEG-PCL-MPEG hydrogel improves cardiac function after myocardial infarction. *Acta Biomater*. 5:2939-44 (2009).

Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Padiaditakis P, Johnson C, Bell A, Michalopoulos GK, Zarnegar R. A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol. Cell*. 9:411-21 (2002).

Wei H, Ooi TH, Tan G, Lim SY, Qian L, Wong P, Shim W. Cell delivery and tracking in post-myocardial infarction cardiac stem cell therapy: an introduction for clinical researchers. *Heart Fail Rev*. 15:1-14 (2010).

Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel P, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG, Van Etten J, Maniloff J, Woese CR. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J Bacteriol*. 171:6455-67 (1989).

- Welch S, Plank D, Witt S, Glascock B, Schaefer E, Chimenti S, Andreoli AM, Limana F, Leri A, Kajstura J, Anversa P, Sussman MA. Cardiac-specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpressing transgenic mice. *Circ Res.* 90:641-8 (2002).
- Wen Q, Zhou L, Zhou C, Zhou M, Luo W, Ma L. Change in hepatocyte growth factor concentration promote mesenchymal stem cell-mediated osteogenic regeneration. *J Cell Mol Med.* doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01407.x. (2011).
- White FC, Bloor CM. Coronary collateral circulation in the pig: correlation of collateral flow with coronary bed size. *Basic Res Cardiol.* 76:189-96 (1981).
- Wieben O, Francois C, Reeder SB. Cardiac MRI of ischemic heart disease at 3 T: potential and challenges. *European journal of radiology.* 65:15-28 (2008).
- Wilmot I. Somatic cell nuclear transfer (SCNT): prospects in disease research and treatment. *Stem Cells Research—Status, Prospects, Prerequisites.* European Molecular Biology Organization (2006).
- Wolf T, Gepstein L, Hayam G, Zaretzky A, Shofty R, Kirshenbaum D, Uretzky G, Oron U, Ben-Haim SA. Threedimensional endocardial impedance mapping: a new approach for myocardial infarction assessment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:H179–H188 (2001).
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 61:364-70 (2000).
- Wu GD, Nolte JA, Jin YS, Barr ML, Yu H, Starnes VA, Cramer DV. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation.* 75:679-85 (2003).
- Yamamoto K, Morishita R, Hayashi S, Matsushita H, Nakagami H, Moriguchi A, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Contribution of Bcl-2, but not Bcl-xL and Bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. *Hypertension.* 37:1341-8 (2001).
- Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13:96–107 (2002).
- Yang K, Xiang P, Zhang C, Zou L, Wu X, Gao Y, Kang Z, He K, Liu J, Peng C. Magnetic resonance evaluation of transplanted mesenchymal stem cells after myocardial infarction in swine. *Can J Cardiol.* 27:818-25 (2011).
- Yasuda T, Weisel RD, Kiani C, Mickle DA, Maganti M, Li RK. Quantitative analysis of survival of transplanted smooth muscle cells with real-time polymerase chain reaction. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 129:904-11 (2005).
- Ye Y, Bogaert J. Cell therapy in myocardial infarction: emphasis on the role of MRI. *Eur Radiol.* 18:548-69 (2008).
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 318:1917-20 (2007).
- Yu J, Du KT, Fang Q, Gu Y, Mihardja SS, Sievers RE, Wu JC, Lee RJ. The use of human mesenchymal stem cells encapsulated in RGD modified alginate microspheres in the repair of myocardial infarction in the rat. *Biomaterials.* 31:7012-7020 (2010).
- Yuen KC, Dunger DB. Therapeutic aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-i treatment on visceral fat and insulin sensitivity in adults. *Diabetes Obes Metab.* 9:11-22 (2007).

## Bibliografía

Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, Tarin C, Mas S, Ortiz A, Egido J. Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2011:497841. doi:10.1155/2011/497841 (2011).

Zhang H, Zhu SJ, Wang W, Wei YJ, Hu SS. Transplantation of microencapsulated genetically modified xenogeneic cells augments angiogenesis and improves heart function. *Gene Ther.* 15:40-48 (2008).

Zhao P, Turdi S, Dong F, Xiao X, Su G, Zhu X, Scott GI, Ren J. Cardiac-specific overexpression of insulin-like growth factor I (IGF-1) rescues lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction and activation of stress signaling in murine cardiomyocytes. *Shock.* 32:100-7 (2009).

Zhen-Qiang F, Bing-Wei Y, Yong-Liang L, Xiang-Wei W, Shan-Hong Y, Yuan-Ning Z, Wei-Sheng J, Wei C, Ye G. Localized expression of human BMP-7 by BM-MSCs enhances renal repair in an in vivo model of ischemia-reperfusion injury. *Genes Cells.* 17:53-64 (2012).

Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, Jiang D, von GA, Ikeda S, Chien KR, Pu WT. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature.* 454:109-113 (2008).

Zhou L, Wang W, Liu Y, de Castro JF, Ezashi T, Telugu BP, Roberts RM, Kaplan HJ, Dean DC. Differentiation of induced pluripotent stem cells of swine into rod photoreceptors and their integration into the retina. *Stem Cells.* 29:972-80 (2011).

Zhu W, Shiojima I, Hiroi Y, Zou Y, Akazawa H, Mizukami M, Toko H, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Functional analyses of three Csx/Nkx-2.5 mutations that cause human congenital heart disease. *J Biol Chem.* 275:35291-6 (2000).

Zimmermann WH, Eschenhagen T. Cardiac tissue engineering for replacement therapy. *Heart Fail Rev.* 8:259-269 (2003).

Zimmermann WH, Melnychenko I, Eschenhagen T. Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials.* 25:1639-1647(2004).

Zimmermann WH, Didié M, Döker S, Melnychenko I, Naito H, Rogge C, Tiburcy M, Eschenhagen T. Heart muscle engineering: an update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovasc Res.* 71:419-29 (2006).

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7:211-26 (2001).

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 13:4279-95 (2002).

## Guías o Manuales:

Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, et al. *ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients with Acute Myocardial Infarction) 2004.*

MINISTERIO DE SANIDAD Y POLÍTICA SOCIAL. 2009. Estrategia en Cardiopatía Isquémica del Sistema Nacional de Salud (Actualización aprobada por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud el 22 de octubre de 2009).

Smith SC Jr, Feldman TE, Hirshfeld JW Jr, Jacobs AK, Kern MJ, King SB 3rd, Morrison DA, O'Neill WW, Schaff HV, Whitlow PL, Williams DO, Antman EM, Smith SC Jr, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Jacobs AK, Nishimura R,



Ornato JP, Page RL, Riegel B; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention. ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *J Am Coll Cardiol.* 47(1):e1-121 (2006).

Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, Filippatos G, Fox K, Huber K, Kastrati A, Rosengren A, Steg PG, Tubaro M, Verheugt F, Weidinger F, Weis M. Rev ESC guidelines on management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation. *Esp Cardiol.* 62(3):293, e1-47 (2009).

Villar F, Benegas JR, Donado JM, Rodríguez F. Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo .Informe SEA España 2007.

### Páginas web:

- <http://www.ccmijesususon.com>
- <http://www.clinicaltrials.gov>
- <http://www.iera.es>
- <http://www.ivi.es>
- <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NOGA+and+stem+cells>
- <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/swine/swine.htm#art>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=sus%20scrofa>

### Legislación:

- Directiva 86/609/CEE del Consejo de Europa de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. DOL358; 18-12-1986.
- Real Decreto 413/1996, de 1 de marzo, por el que se establecen los requisitos técnicos y funcionales precisos para la autorización y homologación de los centros y servicios sanitarios relacionados con las técnicas de reproducción humana asistida.
- Real Decreto 1201/2005, del 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE252; 21-10-2005.
- Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida.
- Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. BOE159; 04-07-2007.
- Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación transporte, experimentación y sacrificio. BOE268; 08-11-2007.





**Publicaciones, participación en  
proyectos, aportaciones a  
congresos y otros méritos**



## ARTÍCULOS:

**Gómez-Mauricio G<sup>1</sup>**, Bernad A<sup>2</sup>, Crisóstomo V<sup>1</sup>, Martín-Cancho MF<sup>1</sup>, Celdrán D<sup>1</sup>, Casado JG<sup>1</sup>, Mijares J<sup>1</sup>, Álvarez V<sup>1</sup>, Sánchez-Margallo FM<sup>1</sup>. "ASCs THAT OVEREXPRESS IGF1 AND HGF AS A TREATMENT IN A PORCINE MODEL OF ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION: HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES". *Histology and Histopathology*. Volume 27 (supplement 1), pag. 59 (2012).

**Gomez-Mauricio G<sup>1</sup>**, Acarregui A<sup>2,3</sup>, Sánchez-Margallo FM<sup>1</sup>, Celdrán D<sup>1</sup>, Crisóstomo V<sup>1</sup>, Orive G<sup>2,3</sup>, Hernández RM<sup>2,3</sup>, Pedraz JL<sup>2,3</sup>, Martínez-Caballero S<sup>1</sup>, Martín-Cancho MF<sup>1</sup>. "USE OF ALGINATE CAPSULES AND SPIO LABELING, FOR ASCs IN ISQUEMIC HEART DISEASE: IN VIVO LOCALIZATION AND HISTOMORPHOLOGIC ANALYSIS". *Histology and Histopathology*. Volume 27 (supplement 1), pag. 100 (2012).

**Gomez-Mauricio G<sup>1</sup>**, Acarregui A<sup>2,3</sup>, Sánchez-Margallo FM<sup>1</sup>, Celdrán D<sup>1</sup>, Crisóstomo V<sup>1</sup>, Orive G<sup>2,3</sup>, Hernández RM<sup>2,3</sup>, Pedraz JL<sup>2,3</sup>, Martínez-Caballero S<sup>1</sup>, Martín-Cancho MF<sup>1</sup>. "Influence of the effects of Endorem® on encapsulated and unencapsulated pASCs in proliferation and cell viability". *Histology and Histopathology*. Volume 27 (supplement 1), pag. 68 (2012).

Javier G Casado<sup>1</sup>, **G Gomez-Mauricio<sup>1</sup>**, V Alvarez<sup>1</sup>, J Mijares<sup>1</sup>, R Tarazona<sup>2</sup>, A Bernad<sup>3</sup>, FM Sanchez-Margallo<sup>1</sup>. "Phenotype, differentiation behaviour and gene expression of porcine MSCs isolated from different sources: a step forward for translational preclinical research". *Histology and Histopathology*. Volume 27 (supplement 1), pag. 35 (2012).

Javier G Casado, **G Gomez-Mauricio**, V Alvarez, FM Sanchez-Margallo. "PRE-TREATED SUTURES IMPROVE THE IMPLANTING OF MESENCHYMAL STEM CELL IN TISSUE BY ENHANCING THEIR RESISTANCE TO MULTIPLE SUTURE PASSAGES". *Histology and Histopathology*. Volume 27 (supplement 1), pag. 76 (2012).

Javier G Casado, **G Gomez-Mauricio**, V Alvarez, J Mijares, R Tarazona, A Bernad, FM Sanchez-Margallo. Comparative phenotypic and molecular characterization of porcine mesenchymal stem cells from different sources for translational studies in a large animal model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 147:104-12 (2012).

Martín-Cancho MF, **G. Gómez Mauricio**, V. Crisóstomo Ayala, D. Celdrán Bonafonte, J. Usón-Gargallo, F.M. Sánchez-Margallo. Tratamiento con células madre en modelo porcino de infarto de miocardio. *Industria Farmacéutica*. Vol.: Enero/Febrero 2011, pag.:64-68, (2011).

**Gomez-Mauricio RG<sup>\*1</sup>**, Argia Acarregui<sup>\*2,3</sup>, FM Sánchez-Margallo<sup>1</sup>, V Crisóstomo<sup>1</sup>, I. Gallo<sup>4</sup>, Rosa M. Hernández<sup>2,3</sup>, José Luis Pedraz<sup>2,3</sup>, Gorka Orive<sup>2,3,#</sup>, MF Martín-Cancho<sup>1,#</sup>. The use of

adipose tissue-derived stem cells encapsulated in magnetic resonance-labeled alginate microspheres in the repair of myocardial infarction in a porcine ischemia model.

*Eur J Pharm Biopharm.* (Enviado para su publicación en octubre de 2012).

Casado JG<sup>1</sup>, Jorge I<sup>2</sup>, **Gómez-Mauricio G**<sup>1</sup>, Alvarez V<sup>1</sup>, Ortega-Muñoz M<sup>2</sup>, Vázquez J<sup>2</sup>, Sánchez-Margallo FM<sup>1</sup>. Mesenchymal stem cell-coated sutures enhance collagen depositions in sutured tissues. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* (Enviado para su publicación en octubre de 2012).

### REVISIONES:

Enrique Roche, Miriam Ramírez, Carmen Ramírez-Castillejo, **Guadalupe Gómez-Mauricio**, Jesús Usón. STEM CELL POTENTIAL FOR TYPE 1 DIABETES THERAPY Cell Therapy in diabetes. *Central European Journal of Biology (CEJB).* 2(4) 449–480, (2007).

### CAPÍTULOS DE LIBRO:

Autores (p. o. de firma): Javier G Casado, **Gomez G**, Martínez-Caballero S, Mijares J, Alvarez V, Llanes D, Moreno A, Sanchez-Margallo FM.

Título: Flow cytometry applied to the characterization and study of porcine mesenchymal stem cells.

Título del libro: XXIX Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica

Editorial (si libro): Centro de Cirugía de Mínima Invasión

Año: 2011 ISBN 978 84 615 5434 82011

Página inicial: 583 Página final: 586

### PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS:

- **“CartMan: Una fábrica de tejidos osteoarticulares”**. Proyecto solicitado al Programa Nacional de Cooperación Público-Privada, subprograma INNFACTO 2012, dentro de la línea instrumental de Articulación e Internacionalización del Sistema, en el marco del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011 (Ministerio de Economía y Competitividad). Concedido en octubre de 2012. Solicitante: DANOBAT, SDAD. COOP. LTDA.- MÁQUINAS HERRAMIENTA. Participando en el mismo como miembro del equipo investigador. (Cód. externo: IPT-2012-0743-010000).

- **“Desarrollo de nuevas Tecnologías para la mejora de la implantación embrionaria en Fecundación in vitro”**. Proyecto solicitado a la convocatoria de *Ayudas para Proyectos de Investigación enmarcados en las Estrategias de Salud de la Región de Extremadura, (Junta de Extremadura. IV PRI Estratégicos)* por el Dr. Francisco Miguel Sánchez Margallo (como I.P. del

subproyecto) y el Dr. Ignacio Santiago Álvarez (I.P. del proyecto en conjunto) y concedido en 2011 (2011-201). Participando en el mismo como miembro del equipo investigador. (Cód. externo: PCJ100801 y Cód. interno: IRA111).

- **“Estudio de viabilidad y eficacia de distintas vías de inoculación de células madre multipotenciales en la resolución del infarto agudo de miocardio”**. Proyecto interno del CCMIJU (con código interno: IL111) desarrollado desde marzo de 2011 a marzo de 2012. Participando en el mismo como miembro del equipo investigador.

- **“Tratamiento Crosslinking asociado a queratoplastia conductiva: Técnica novedosa alternativa al trasplante de cornea”**. Proyecto solicitado a la Fundación Mutua Madrileña (FMM) por la Lda. Elena Abellán (I.P.) de la Unidad de Microcirugía del CCMIJU y concedido en Julio de 2011 (2011-2012). Participando en el mismo como miembro del grupo investigador.

- **“CARE-MI Cardio Repair European Multidisciplinary Initiative”**. Proyecto del 7º Programa Marco en el Área de Salud. Proyecto coordinado por el CNIC y cuyo I.P es el Dr. Antonio Bernad Miana. Participante como investigadora dentro del grupo del CCMIJU dentro de este proyecto. **(SEVENTH FRAMEWORK PROGRAMME THEME HEALTH- 2009. 242038)**. (2010-2015).

- **“RETICS: Incorporación del Centro de Cirugía de Mínima Invasión a la Red de Terapia Celular (TerCel)”** en la solicitud de la Red Temática de Investigación cooperativa, financiada por el Fondo de Investigación Sanitaria, con el **número de expediente RD06/0010/1014**, “Red de Terapia Celular” siendo el Investigador Principal el Dr. Jesús Usón Gargallo, (2008-2011).

- **“Estudio de la viabilidad de la isquemia de miocardio mediante la implantación en modelo porcino de células mesenquimales procedentes de médula ósea frente a la implantación de dichas células microencapsuladas”**. Proyecto solicitado a la convocatoria de *Ayudas para Proyectos de Investigación enmarcados en las Estrategias de Salud de la Región de Extremadura, 2008* por la Dra. M<sup>a</sup> Fernanda Martín Cancho (I.P.) y concedido en Marzo de 2009. Participando en el mismo como becaria. (Fundesalud-PRI08A048).

- **“Bioingeniería de Células Mesenquimales de Tejido Adiposo hacia Células Productoras de Insulina”**. Proyecto solicitado a la Fundación Mutua Madrileña (FMM) por el Dr. Enrique Roche Collado (I.P.) y concedido en Julio de 2008 (2008-2011). Participando en el mismo dentro del grupo investigador.

## **CONGRESOS:**

ESGCT 20th ANNIVERSARY CONGRESS IN COLLABORATION WITH THE SFTCG. (25th to 29th October, Versailles, France). **Gómez-Mauricio G<sup>1</sup>**, Bernad A<sup>2</sup>, Crisóstomo V<sup>1</sup>, Martín-Cancho MF<sup>1</sup>, Celdrán D<sup>1</sup>, Báez C<sup>1</sup>, Mijares J<sup>1</sup>, Martínez-Caballero S<sup>1</sup>, Álvarez V<sup>1</sup>, Casado JG<sup>1</sup>, Sánchez-Margallo FM<sup>1</sup>. Póster: Evaluation of different parameters involved in cardiac function by MRI after intramyocardial administration of treatments with ASCs in a porcine AMI model.

ESGCT 20th ANNIVERSARY CONGRESS IN COLLABORATION WITH THE SFTCG. (25th to 29th October, Versailles, France). **Gómez-Mauricio G<sup>1</sup>**, Bernad A<sup>2</sup>, Crisóstomo V<sup>1</sup>, Martín-Cancho MF<sup>1</sup>, Celdrán D<sup>1</sup>, Báez C<sup>1</sup>, Mijares J<sup>1</sup>, Martínez-Caballero S<sup>1</sup>, Álvarez V<sup>1</sup>, Casado JG<sup>1</sup>, Sánchez-Margallo FM<sup>1</sup>. Póster: Histological and immunohistochemical studies after intramyocardial administration of different treatments with ASCs in a porcine AMI model.

ESGCT 20th ANNIVERSARY CONGRESS IN COLLABORATION WITH THE SFTCG. (25th to 29th October, Versailles, France). Casado JG<sup>1</sup>, Jorge I<sup>2</sup>, Ortega-Muñoz M<sup>2</sup>, **Gómez-Mauricio G<sup>1</sup>**, Alvarez V<sup>1</sup>, Bernad A<sup>3</sup>, Vázquez J<sup>2</sup>, Sánchez-Margallo FM<sup>1</sup>. Póster: Absorbable surgical sutures coated with mesenchymal stem cells improve wound healing through the release of different collagen types.

ESGCT 20th ANNIVERSARY CONGRESS IN COLLABORATION WITH THE SFTCG. (25th to 29th October, Versailles, France). Báez C<sup>1</sup>, Crisóstomo V<sup>1</sup>, Abad JL<sup>2</sup>, Nunes V<sup>2</sup>, Palacios I<sup>2</sup>, García-Lindo<sup>1</sup>, González M<sup>1</sup>, Sun F<sup>1</sup>, **Gómez-Mauricio G<sup>1</sup>**, Casado JG<sup>1</sup>, Sánchez-Margallo FM<sup>1</sup>. Póster: Intracoronary administration of porcine cardiac stem cells in a porcine model of acute myocardial infarction: A preclinical safety evaluation.

6<sup>th</sup> European Congress of Pharmacology, EPHAR 2012 (Granada, Spain. July 17<sup>th</sup>-20<sup>th</sup>, 2012). **G Gómez-Mauricio**, A Acarregui, FM Sánchez-Margallo, D Celdrán, G Orive, RM Hernández, JL Pedraz, MF Martín-Cancho. Oral Communication C032: Comparative study of myocardial infarction treatment with or without microencapsulated stem cells in a porcine model.

I International Symposium on Cell and Gene-Based Therapies. (Granada, Spain. June 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2012). **Gómez-Mauricio G<sup>1</sup>**, Bernad A<sup>2</sup>, Crisóstomo V<sup>1</sup>, Martín-Cancho MF<sup>1</sup>, Celdrán D<sup>1</sup>, Casado JG<sup>1</sup>, Mijares J<sup>1</sup>, Álvarez V<sup>1</sup>, Sánchez-Margallo FM<sup>1</sup>. Póster: ASCs that overexpress IGF1 and HGF as a treatment in a porcine model of acute myocardial infarction: histological and immunohistochemical studies.

I International Symposium on Cell and Gene-Based Therapies. (Granada, Spain. June 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2012). **Gomez-Mauricio G<sup>1</sup>**, Acarregui A<sup>2,3</sup>, Sánchez-Margallo FM<sup>1</sup>, Celdrán D<sup>1</sup>, Crisóstomo V<sup>1</sup>, Orive G<sup>2,3</sup>, Hernández RM<sup>2,3</sup>, Pedraz JL<sup>2,3</sup>, Martínez-Caballero S<sup>1</sup>, Martín-Cancho MF<sup>1</sup>. Póster:



Use of alginate capsules and SPIO labeling, for ASCs in ischemic heart disease: in vivo localization and histomorphologic analysis.

I International Symposium on Cell and Gene-Based Therapies. (Granada, Spain. June 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2012). **Gomez-Mauricio G**<sup>1</sup>, Acarregui A<sup>2,3</sup>, Sánchez-Margallo FM<sup>1</sup>, Celdrán D<sup>1</sup>, Crisóstomo V<sup>1</sup>, Orive G<sup>2,3</sup>, Hernández RM<sup>2,3</sup>, Pedraz JL<sup>2,3</sup>, Martínez-Caballero S<sup>1</sup>, Martín-Cancho MF<sup>1</sup>. Póster: Influence of the effects of Endorem® on encapsulated and unencapsulated pASCs in proliferation and cell viability.

I International Symposium on Cell and Gene-Based Therapies. (Granada, Spain. June 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2012). Javier G Casado<sup>1</sup>, **G Gomez-Mauricio**<sup>1</sup>, V Alvarez<sup>1</sup>, J Mijares<sup>1</sup>, R Tarazona<sup>2</sup>, A Bernad<sup>3</sup>, FM Sanchez-Margallo<sup>1</sup>. Póster: Phenotype, differentiation behaviour and gene expression of porcine MSCs isolated from different sources: a step forward for translational preclinical research.

I International Symposium on Cell and Gene-Based Therapies. (Granada, Spain. June 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2012). Javier G Casado, **G Gomez-Mauricio**, V Alvarez, FM Sanchez-Margallo. Póster: Pre-treated sutures improve the implanting of mesenchymal stem cells in tissue by enhancing their resistance to multiple suture passages.

9<sup>th</sup> International Symposium on Stem Cell Therapy and Cardiovascular Innovations. (Madrid, Spain. June 7<sup>th</sup>-8<sup>th</sup>, 2012.). **Gómez-Mauricio G**<sup>1</sup>, Bernad A<sup>2</sup>, Crisóstomo V<sup>1</sup>, Martín-Cancho MF<sup>1</sup>, Celdrán D<sup>1</sup>, Báez C<sup>1</sup>, Casado JG<sup>1</sup>, Álvarez V<sup>1</sup>, Sánchez-Margallo FM<sup>1</sup>. Scientific Poster and Oral Communication: Intramyocardial administration of different treatments with ASCs in a porcine model of acute myocardial infarction: Study of cardiac function and monitoring by MRI.

XXIX Congreso anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica, CASEIB, 2011. (Cáceres, España. 16-18 de noviembre de 2011). J. García Casado, **G. Gómez**, S. Martínez-Caballero, J. Mijares, V. Álvarez, D. Llanes, A. Moreno, Sánchez-Margallo FM. Póster: Flow cytometry applied to the characterization and study of porcine mesenchymal stem cells.

VI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Terapia Génica y Celular. (Zaragoza, España. 21-23 de septiembre de 2011). **Gómez-Mauricio G**<sup>1</sup>, Martín-Cancho MF<sup>1</sup>, Bernad A<sup>2</sup>, Crisóstomo V<sup>1</sup>, Celdrán D<sup>1</sup>, Javier G Casado<sup>1</sup>, Martínez-Caballero S<sup>1</sup>, Mijares J<sup>1</sup>, Álvarez V<sup>1</sup>, Sánchez-Margallo FM<sup>1</sup>. Póster: Influence of cardiac function in a model of porcine myocardial infarction after intramyocardial administration of adult stem cells from adipose tissue.

VI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Terapia Génica y Celular. (Zaragoza, España. 21-23 de septiembre de 2011). Javier G. Casado, **Gómez G.**, Martínez-Caballero S., Mijares J., Álvarez V., Llanes D., Moreno A., Bernad A., Sánchez-Margallo FM. Póster:

Phenotypical and molecular characterization of porcine adult stem cells: an attractive tool for preclinical studies in a large animal model.

First Annual Consortium and Scientific Progress Meeting (7PM: Cardio Repair European Multidisciplinary Initiative-CARE-MI). (Liverpool, UK. 10<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> July, 2011). Póster: Influence of the passage through the catheter of the pCSCs on cell viability as a previous step in preclinical trials with porcine model. **Gómez-Mauricio G**<sup>1</sup>, Casado JG<sup>1</sup>, Abad JL<sup>2</sup>, Crisóstomo V<sup>1</sup>, Martín-Cancho MF<sup>1</sup>, Borlado LR<sup>2</sup>, Leonardo E<sup>2</sup>, Álvarez V<sup>1</sup>, Sánchez Margallo FM<sup>1</sup>.

8<sup>th</sup> International Symposium on Stem Cell Therapy and Cardiovascular Innovations. (Madrid, Spain. 9<sup>th</sup>-10<sup>th</sup>, June. 2011). Javier G. Casado, **Gómez G.**, Martínez-Caballero S., Mijares J., Álvarez V., Llanes D., Moreno A., Sánchez-Margallo FM. Póster: Adult Stem Cells From a Large Preclinical Animal Model: Isolation, Differentiation and Characterization of Different Porcine Stem Cells.

XVII Congreso Nacional Farmacéutico. (Bilbao, España. 20-22 de octubre de 2010). Martín-Cancho MF, Moreno B, Celdrán D, **Gómez G**, Sánchez J, Sánchez-Margallo FM. Póster: Desarrollo de la Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs) en el Servicio de Análisis Clínico del Centro de Cirugía de Mínima Invasión (CCMIJU).

XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacología (SEF). (Salamanca, España. 26-29 de septiembre de 2004). Martín, G., Ortiz de Urbina, A.V., Morán, A., Martín, M.L., San Román, L., **Gómez, R.G.**, Caballero, E. Póster: Central hypotensive activity induced by acyclic derivatives of imidazole.

XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Química Terapéutica (SEQT). (Santiago de Compostela, España. 9-12 de septiembre de 2003). Pilar Puebla, **R. Guadalupe Gómez**, Dulce Alonso, Esther Caballero, Manuel Medarde, Fernando Tomé. Póster: Atrialquilsiloxibutadienos como intermedios en la preparación de análogos de Granulatimida.

©Todas las ilustraciones del presente trabajo están bajo propiedad intelectual del Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón* (CCMIJU) a excepción de las referenciadas en el texto.