



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PATRONES DE EXPRESIÓN DURANTE EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA Y DE TEJIDO ADIPOSO

MODALIDAD DE GRADUACIÓN POR TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

BLANCA REBECA IBARRA IBARRA

TUTOR:

DR. FELIPE ALONSO MASSÓ ROJAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MÉXICO D.F. ENERO 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

Introducción y Planteamiento del problema	2
Preguntas de Investigación	3
Justificación sobre la originalidad del tema y su pertinencia	4
Viabilidad del problema a resolver	5
Antecedentes amplios sobre el tema y análisis de los antecedentes	6
Objetivo general y Objetivos particulares	12
Hipótesis	13
Metodología adecuada para la solución del problema a resolver	14
Infraestructura con la que se cuenta para desarrollar el trabajo de investigación	23
Resultados obtenidos en la Maestría	24
Discusión de los resultados obtenidos durante la Maestría	35
Conclusiones de los resultados obtenidos durante la Maestría	37
Resultados esperados para el proyecto de Doctorado	38
Cronograma de actividades	38
Referencias bibliográficas	39
Anexo	47

Introducción y planteamiento del problema

La medicina regenerativa en los últimos años ha revolucionado el tratamiento de diversas enfermedades como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y crónico-degenerativas, donde se ha evidenciado el beneficio y seguridad del uso de la terapia celular. Ante la necesidad de encontrar un tratamiento eficaz para las enfermedades cardiovasculares, el estudio de las células troncales se ha convertido en los últimos años en un recurso con gran potencial para la medicina. Actualmente, los tratamientos son generalmente paliativos y en el caso de una enfermedad terminal como la falla cardíaca sólo existe el trasplante como último recurso. En estos casos, la medicina regenerativa ha demostrado ser eficaz y una alternativa para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades cardiovasculares son una causa significativa de morbilidad y mortalidad mundialmente. El infarto al miocardio es una condición en la que se produce la muerte de cardiomiocitos por medio de dos procesos apoptosis y/o necrosis. Los cardiomiocitos muertos son reemplazados por fibroblastos que migran al área de infarto y generan tejido cicatrizal, con lo que se ocasiona el adelgazamiento de las paredes del ventrículo y una contractilidad inadecuada. El tejido fibroblástico inicia una serie de eventos que llevan al remodelamiento e hipertrofia y, por lo tanto, a una falla cardíaca consumándose en la muerte celular.

A pesar de que el corazón adulto tiene la capacidad de regenerarse de forma limitada, esta regeneración es insuficiente para compensar la muerte celular ocasionada por las enfermedades cardíacas como el infarto agudo de miocardio (Poss, Wilson, & Keating, 2002). Es por esto que se ha buscado la forma de regenerar el tejido cardíaco por medio del uso de células troncales. El objetivo principal de la terapia celular en cardiología es la regeneración de miocardio y la revascularización al reestablecer la contractilidad sincrónica y conductividad bioeléctrica para mejorar la función cardíaca sin tener efectos adversos graves.

Muchos esfuerzos se han realizado hasta el momento para obtener mejores resultados; sin embargo, se conoce sólo una mínima parte de la compleja regulación de los procesos de diferenciación que llevan a cabo estas células, razón por la cual es importante conocer la expresión génica en las células troncales indiferenciadas y durante el proceso de diferenciación hacia cardiomiocito. Una de las limitantes para el estudio de la expresión génica es la baja eficiencia terminal de diferenciación hacia cardiomiocito a partir de las células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSC) y de tejido adiposo (ASC), por lo que en este estudio se propuso aumentar la eficiencia terminal de diferenciación por medio de la transducción de genes que inhiben la vía clásica de NF- κ B y hacer posible el análisis de expresión génica durante el proceso de diferenciación de dichas células hacia cardiomiocitos.

Preguntas de investigación

¿Cómo se modifica el patrón de expresión génica diferencial de las células troncales mesenquimales de médula ósea y aquellas derivadas de tejido adiposo desde su estado indiferenciado hasta su diferenciación a cardiomiocitos?

¿La transducción de adenovirus recombinantes con genes que inhiban la vía clásica de NF- κ B (*I κ B- α* y *A20*) aumentará la eficiencia terminal de diferenciación hacia cardiomiocito de las células troncales mesenquimales de médula ósea y de tejido adiposo?

¿Cómo se modifica el patrón de expresión de las células troncales mesenquimales de médula ósea y aquellas derivadas de tejido adiposo por medio de la transducción de adenovirus recombinantes con genes que inhiban la vía clásica de NF- κ B (*I κ B- α* y *A20*)?

Justificación sobre la originalidad del tema y su pertinencia

En los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo por identificar y caracterizar las células troncales de los tejidos adultos, como son las BM-MSC y ASC. Se ha observado tanto en estudios pre-clínicos como clínicos los beneficios que ofrece la terapia celular con este tipo de células en la enfermedad cardiovascular y también se ha demostrado que su uso es seguro. A pesar de la gran cantidad de estudios sobre la diferenciación cardíaca de las BM-MSC y ASC, se conoce poco sobre los mecanismos moleculares y regulatorios que definen al estado indiferenciado. Además, se desconoce qué genes se encuentran con regulación al alta o a la baja en el proceso de diferenciación hacia cardiomiocitos de dichas células. El conocer los genes y vías involucradas permitirá comprender mejor el proceso de diferenciación para que en un futuro se puedan mejorar o adecuar las técnicas actualmente implementadas e incluso perfeccionar la eficacia terapéutica de estas células en estudios clínicos.

Actualmente, la proliferación de las BM-MSC y ASC diferenciadas a cardiomiocito es limitada, es decir, presentan una baja eficiencia terminal de diferenciación, situación que puede limitar el estudio de expresión génica. En la actualidad, se ha buscado la forma de aumentar la eficiencia terminal de diferenciación con otro tipo de células troncales como las células troncales pluripotenciales inducidas (IPSC), pero la reprogramación a estados muy indiferenciados se acompaña de un incremento en la generación de células neoplásicas. A fin de resolver dicha problemática, en el presente estudio se indujo la diferenciación de las BM-MSC y ASC por medio de la transducción con adenovirus recombinantes que contienen genes que inhiben la vía clásica de NF- κ B. Esto con el fin de diferenciarlas específicamente a cardiomiocito añadiendo factores de crecimiento y/o biomatriz cardíaca y así obtener una alta tasa de diferenciación hacia cardiomiocito.

El presente estudio permitirá conocer en detalle las modificaciones en el perfil de expresión de las células en diferentes estadios de diferenciación con lo que se espera mejorar la comprensión del proceso mediante el cual las BM-MSC y ASC se diferencian en cardiomiocitos. Además, permitirá conocer de qué manera la transducción y la inducción de la diferenciación afecta en su conjunto a la regulación de la expresión génica de éstas células al estudiar el perfil de expresión génica a partir de la transducción de genes que inhiban la vía de NF- κ B junto con la inducción a la diferenciación hacia cardiomiocitos de las BM-MSC y compararla bajo las mismas condiciones con las ASC.

Viabilidad del problema a resolver

El proyecto de investigación propuesto será de gran ayuda para determinar la expresión génica diferencial durante el proceso de diferenciación a cardiomiocito a partir de las BM-MSC y ASC. Actualmente, son pocas las investigaciones al respecto y no se ha logrado conocer del todo su regulación para su aplicación en el mejoramiento de la regeneración de tejidos a partir de ellas (Rao, 2012). Una de las limitantes que presentaba el presente proyecto era que la eficiencia terminal de diferenciación a cardiomiocito a partir de BM-MSC y ASC es muy baja, menor al 1 %. Razón por la que durante la Maestría nos enfocamos a aumentar dicha eficiencia.

Se realizaron varios experimentos de diferenciación a cardiomiocito a partir de BM-MSC y ASC, en los cuales se obtuvieron resultados favorecedores. Más adelante se mencionan los resultados obtenidos, pero, en resumen, se logró aumentar la eficiencia de diferenciación a cardiomiocito inmaduro entre 45-61 % con adenovirus recombinantes, factores de crecimiento específicos y biomatriz cardíaca; no obstante, está diferenciación no se mantuvo después del día 14. En otro experimento realizado con un medio comercial especial para diferenciación a cardiomiocito (CARDIO.D.Media 100) aunado a adenovirus recombinantes, se obtuvo una eficiencia menor de 12 %; sin embargo, la diferenciación se mantuvo y aumentó a partir del día 21, además de presentar marcadores de maduración cardíaca como la cadena pesada de miosina, resultado no observado en el experimento antes mencionado.

Es muy importante tener un aumento en la eficiencia terminal de diferenciación, así como determinar las mejores condiciones y tiempos en los que se realizaran los experimentos en microarreglos, eso con el fin de permitir el análisis de la expresión génica diferencial durante el proceso de diferenciación a cardiomiocito a partir de las BM-MSC y ASC e incluso por el elevado costo de cada microarreglo de expresión. Una vez definidas las condiciones y tiempos para realizar los experimentos en microarreglos de expresión, los resultados obtenidos ayudarán a conocer a fondo sobre el proceso de diferenciación a cardiomiocito a partir de las BM-MSC y ASC, ofreciendo posibles blancos para mejorar las terapias celulares. Por los resultados favorecedores obtenidos durante la Maestría, además de contar con la infraestructura y los recursos económicos necesarios, la continuación del proyecto al Doctorado es completamente viable.

Antecedentes amplios sobre el tema y análisis de los antecedentes

Generalidades de las células troncales

Las células madre o células troncales (SC) son células indiferenciadas con capacidad de proliferación, diferenciación y auto-renovación. Por dichas características, las SC son una excelente herramienta con gran potencial en la medicina regenerativa. Las SC en diferentes etapas del desarrollo parecen tener diferentes capacidades de auto-renovación y diferenciación. A grandes rasgos existen dos tipos de SC: las células troncales embrionarias (ESC) y las células troncales del adulto, tejido específico o somáticas (SSC). Además, las SC se pueden clasificar de acuerdo con su plasticidad que se refiere a la capacidad de dicha célula de diferenciarse a diversas estirpes celulares. Se clasifican de la siguiente manera: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y en algunos textos se ha mencionado las unipotenciales (Robert, 2004).

Las SC totipotenciales son aquellas que son removidas en la etapa de pre-blastocisto en el desarrollo embrionario; son células indiferenciadas que pueden formar tanto las células que darán origen a un embrión como a las células que conforman al trofoblasto. Después de la tercera división celular durante el desarrollo embrionario, las células comienzan a diferenciarse. La masa de células internas que forman el blastocisto (ESC) son células pluripotentes (Robert, 2004).

Las ESC son células que provienen del blastocisto, una etapa de pre-implantación durante el desarrollo embrionario. El blastocisto consiste en su interior en una masa de células internas, compuesta de 30 a 34 células, las cuales son pluripotentes. Tres factores de transcripción son conocidos por ser críticos para el mantenimiento de la pluripotencia, *Oct-4*, *Nanog* y *Sox-2*. Una de las limitaciones de estas células es que no pueden ser utilizadas en su estado indiferenciado directamente en los trasplantes celulares, ya que pueden producir teratomas. Otro problema es que su uso ha sido objeto de controversias bioéticas al provenir de embriones.

Recientemente, se describieron las células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC) que son células somáticas como fibroblastos reprogramadas mediante la introducción de genes que contribuyen a la proliferación y mantenimiento de la pluripotencia (*Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*). Estas células presentan un comportamiento similar a las ESC. Una de las limitantes de estas células es que al ser reprogramadas pueden producir teratomas (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Las SSC se encuentran más restringidas en cuanto a su diferenciación hacia otras estirpes celulares, por lo que se les denomina multipotenciales (Robert, 2004); sin embargo, se ha reportado en la literatura que algunos tipos de SSC presentan factores críticos del mantenimiento de la pluripotencia como *Oct3/4* y *Sox2*, por lo que se les puede denominar como pluripotenciales (Kronenberg, 2009).

Las células unipotenciales, a pesar de que son denominadas SC, no se les debería llamar así, ya que sólo cumplen con la condición de ser auto-renovables y, por tanto, no cumplen con los demás criterios mínimos para considerarse como SC (Robert, 2004).

Las SSC han demostrado ser células viables y eficaces para la terapia celular y, además, no generan un conflicto ético como es en el caso de las ESC. Son células indiferenciadas que se pueden obtener de prácticamente todos los tejidos y se caracterizan por ser multipotenciales o pluripotenciales. Dentro de las limitantes de las SSC es que son relativamente poco comunes (sus frecuencias varían entre 0.0001 % al 5 % en el total de células de un tejido), además de que son difíciles de aislar. Tienen un ciclo celular relativamente más lento en comparación con otras células. Estas células permanecen en los tejidos en un estado quiescente (sin división celular) por muchos años hasta que son activadas por enfermedades o tejido dañado. La actividad de las células troncales está regulada por el microambiente o nicho, lo que compromete a las moléculas de adhesión, señalización y factores de crecimiento (Tuan, Boland, & Tuli, 2003) (Kronenberg, 2009; Tuan *et al.*, 2003) .

En el siglo XIX, Tavassoli y Crosby demostraron el potencial osteogénico de la médula ósea. Cohneim fue el primero que sugirió la presencia de células no hematopoyéticas en la médula ósea. Sin embargo, no fue sino hasta hace 50 años aproximadamente que Friedenstein y colaboradores lograron identificar dos tipos de SC en la médula ósea. A la primera población de células la llamaron células troncales hematopoyéticas y a la segunda población células troncales de médula ósea estromales, ya que formaban una unidad formadora de colonias fibroblástica CFU-Fs (Friedenstein, Chailakhjan, & Lalykina, 1970). Posteriormente, demostraron que dichas células eran capaces de generar células de hueso (Luria, Owen, Friedenstein, Morris, & Kuznetsow, 1987), cartílago (Caplan, 1991), grasa y tejido conectivo fibroso (Friedenstein, Chailakhyan, & Gerasimov, 1987; Pittenger *et al.*, 1999). En 1991, Caplan denomina a estas células como células troncales mesenquimales (MSC) (Caplan, 1991) .

Las MSC no sólo se encuentran en medula ósea también se han identificado en grasa (Sulser & Eberli, 2010), sangre de cordón umbilical, líquido amniótico (Tsai, Lee, Chang, & Hwang, 2004), pulpa dentaria (Shi & Gronthos, 2003), tendones (Bi *et al.*, 2007), vellosidades coriónicas (Igura *et al.*, 2004), membrana sinovial (De Bari, Dell'Accio, Tylzanowski, & Luyten, 2001) y músculo esquelético (Crisan, Deasy, *et al.*, 2008), entre otros. Las principales características de las MSC son las siguientes (Wenfeng Xu, 2013):

- 1) Potencial de diferenciación multilínea en condiciones *in vitro* (hueso, cartílago, grasa, músculo, cardiomiocito, células nerviosas).
- 2) Disponibilidad en múltiples tejidos (médula ósea, cordón umbilical, sangre de cordón umbilical, placenta, tejido adiposo, piel, corazón hígado, bazo, pulpa dentaria, entre otros)
- 3) No causan reacción inmunológica

Fenotípicamente, las MSC expresan una serie de marcadores de superficie no específicos pero característicos, que nos permiten diferenciar este tipo celular de otros tipos celulares por medio de citometría de flujo. Las MSC no expresan marcadores de superficie hematopoyéticos como es CD45, CD34, CD14 o CD11. Tampoco expresan moléculas co-

estimuladoras como CD80, CD86 o CD40 o moléculas de adhesión como CD31, CD18 o CD56 (Chamberlain, Fox, Ashton, & Middleton, 2007). Las MSC expresan CD105, CD73, CD44, CD90, CD71 y moléculas de adhesión como CD106, CD166 y CD29. Pueden existir diferencias mínimas en la expresión de ciertos marcadores entre las MSC humanas u otra especie animal. En concreto, se ha observado que en ambos casos las MSC de ser CD45 y CD31 negativas (marcador hematopoyético y endotelial respectivamente), así como también CD34 negativas excepto en ratón (Chamberlain *et al.*, 2007).

En las células derivadas de tejido adiposo (ASC), pueden expresarse otros marcadores que no se expresan en las MSC, como CD49b. También estas células se diferencian por no expresar CD106 (Zuk *et al.*, 2002). Las MSC son consideradas inmunogénicas, por dicha razón, estas células pueden ser trasplantadas de forma alogénica sin requerir de ningún tratamiento inmunosupresor. El fenotipo inmunológico de las MSC es MHC I positivo, MHC II, CD40, CD80 y CD86 negativos (Javazon, Beggs, & Flake, 2004).

Una de las propiedades de las MSC es la de inmunosupresión: a pesar de que las moléculas de MHC I activan las células T, en ausencia de moléculas coestimuladoras no se genera una respuesta secundaria y, por ende, las células T se encuentran anérgicas (Bartholomew *et al.*, 2002; Di Nicola *et al.*, 2002). También se ha demostrado que las MSC tienen propiedades inmunomoduladoras que intervienen en la maduración y función de las células dendríticas. Inhiben *in vitro* la proliferación de células B, diferenciación y quimiotaxis.

Las células troncales mesenquimales de médula ósea (BM-MSK) son células no hematopoyéticas que se aíslan de la médula ósea, tienen una alta capacidad de proliferación y auto-renovación, además de ser multipotenciales. Estas células no sólo se diferencian a células que provienen del mesodermo como osteoblastos, células estromales, adipocitos, condrocitos, miocitos y células endoteliales, sino también pueden formar células que provienen del ectodermo como células nerviosas. Se han demostrado sus beneficios en estudios preclínicos y clínicos para la reparación de tejidos en diversas enfermedades (Zandstra & Nagy, 2001).

La International Fat Applied Technology Society denominó por conceso a la población de células adherentes multipotentes aisladas de tejido adiposo digerido con colagenasa con el nombre de células troncales derivadas de tejido adiposo (ASC) (J. Gimble & Guilak, 2003; J. M. Gimble, Katz, & Bunnell, 2007). El tejido adiposo proviene del mesodermo y se desarrolla tanto prenatal como postnatalmente. La razón por la cual el tejido adiposo posea SC se desconoce. Algunos autores han propuesto que esta subpoblación de células son en realidad fibroblastos que residen en el tejido adiposo o que son células mesenquimales que viajan por el torrente sanguíneo y se alojan en el tejido graso (Crisan, Yap, *et al.*, 2008). Estas células representan una fuente de SC accesible y con potencial para la medicina regenerativa. Asimismo, han demostrado tener una plasticidad sobresaliente. Si comparamos las ASC con BM-MSK, han mostrado tener cinética de crecimiento, senescencia celular, eficiencia de traducción génica similares. Igualmente, han demostrado tener la misma expresión de marcadores de superficie y transcripción génica.

Gupta y colaboradores describieron el uso de las células troncales mesenquimales (MSC) para la reparación de cartílago en osteoartritis (Gupta, Das, Chullikana, & Majumdar, 2012). Aunado a esto, Donnelly y colaboradores describieron el uso de células troncales neurales en el daño a la médula espinal (Donnelly, Lamanna, & Boulis, 2012). Está comprobado por múltiples estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que ambas líneas celulares pueden diferenciarse hacia cardiomiocito demostrado por su morfología celular, marcadores de diferenciación cardíaca con GATA-4, NK2.5, ANP, proteínas cardíacas como BETA-MHC, troponina T, alfa actina entre otras, estudios electrofisiológicos y funcionales de respuesta adrenérgica y colinérgica) (Jiang et al., 2010; Mohsin, Siddiqi, Collins, & Sussman, 2011; van der Spoel et al., 2011). Incluso se ha demostrado su seguridad y beneficio tanto en estudios pre-clínicos como clínicos, en donde la constante ha sido que existe un incremento de FEVI y una disminución el área de infarto (li et al., 2011; Laflamme & Murry, 2005; Léobon et al., 2009; Menasché, 2008; Tatsumi et al., 2007).

Los estudios pre-clínicos en diversos modelos animales con infarto agudo de miocardio y cardiomiopatía isquémica mostraron la seguridad, factibilidad y eficacia del uso de las SC. Un meta-análisis analizó 52 estudios pre-clínicos en modelos de diversos animales como perros, ovejas y cerdos tratados con diversos tipos SC como ESC, MSC, BM-MSC, ASC, HSC, células troncales cardíacas (CSC) y células progenitoras endoteliales (EPC) para investigar el efecto de la terapia celular en la enfermedad isquémica cardíaca. Los resultados mostraron que la terapia celular mejoraba la FEVI un 7.5 % (6.2-8.9 %, IC95 %; $p < 0.001$) debido a un decremento significativo del volumen sistólico final; no hubo un incremento en la mortalidad después del tratamiento, en el tipo de célula y en el tipo de infarto. El análisis de sensibilidad sugirió que las MSC; el infarto de la arteria descendente anterior, el modelo de oclusión crónica, un mayor número de células ($\geq 10^7$) y la inyección de células al menos una semana después del infarto tenía un efecto benéfico en la FEVI. No hubo diferencias entre el modelo animal y la vía de administración de las células (Jiang et al., 2010).

En estudios clínicos, el trasplante de SC no cardíacas como progenitores de músculo esquelético y BM-MSC ha resultado en un mejoramiento leve de la LVEF, pero se ha observado la inducción de arritmias (Menasché, 2008). Otros estudios han observado que existe un efecto sinérgico o paracrino que permite la angiogénesis o neovascularización (Gnecchi, Danieli, & Cervio, 2012; li et al., 2011). Recientemente, *The Cochrane Collaboration* realizó un meta-análisis en el que se revisaron 33 ensayos clínicos controlados con un total de 1765 participantes. El tratamiento con SC no mostró cambios estadísticamente significativos en la mortalidad (RR 0.70, IC 95 % 0.40 - 1.21) o en la morbilidad; sin embargo, los ensayos clínicos tenían un alto grado de heterogeneidad. En el seguimiento a corto plazo, la terapia con SC mejoró la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) significativamente (WMD 2.87, IC 95 % 2.00 - 3.73). La mejora en la FEVI se mantuvo en el seguimiento a largo plazo 12 a 61 meses (WMD 3.75, IC 95% 2.57 - 4.93). También se observó que reduce los volúmenes finales sistólico y diastólico izquierdos y disminuye significativamente el tamaño del infarto a largo plazo. En estudios con resonancia magnética, se encontró correlación con el número de células infundidas y el efecto de la FEVI, igualmente, se midió por angiografía ventricular izquierda (Dm et al., 2012; Tatsumi et al., 2007).

Un gran reto ha sido identificar las vías y moléculas involucradas en los diversos procesos que llevan a cabo las células troncales actualmente. A pesar de que ya se conocen varios de los genes que caracterizan a las células troncales, aún no se comprende del todo el cómo interactúa esta red compleja de mecanismos moleculares. Los procesos de desarrollo se caracterizan particularmente por la expresión regulada de la temporalidad y el espacio. Se han realizado grandes esfuerzos en los últimos años para determinar la base molecular que le confiere a las células troncales su potencialidad. El uso de microarreglos es una herramienta con gran potencial para determinar la expresión de genes en una sola ocasión, permitiendo así el análisis a gran escala del estado molecular de una línea celular (Schena, Shalon, Davis, & Brown, 1995). En diversos estudios con microarreglos de expresión, se ha tenido el propósito de identificar la firma molecular implicada en conferir las características tan particulares de las células troncales (Ivanova et al., 2002; Kelly & Rizzino, 2000; Ramalho-Santos, Yoon, Matsuzaki, Mulligan, & Melton, 2002). Además, se han tratado de describir los transcriptomas de varias líneas celulares para determinar qué factores están involucrados en control, auto-renovación y diferenciación; sin embargo, no se ha llegado a un consenso (Fortunel *et al.*, 2003).

La mayoría de estudios en relación a la regulación génica de los procesos de auto-renovación y diferenciación se han realizado en las ESC por su capacidad de auto-renovación ilimitada y su amplia diferenciación. Se ha observado que son bastante complejos los mecanismos moleculares que dictan el destino celular de estas células. Tres factores de transcripción son conocidos por ser críticos para el mantenimiento de la pluripotencia y sugieren ser suficientes para establecer la auto renovación y llevar a cabo la diferenciación en las células troncales embrionarias de ratón (Niwa, Miyazaki, & Smith, 2000), Oct-4, Nanog y Sox-2 (Avilion *et al.*, 2003; Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003). Varios estudios han descrito las vías de señalización implicadas en las ESC como Jak/Stat, BMP-Smad, MAPK-ERK, NF- κ B, Wnt y FGF. Otros factores que juegan un papel importante son la remodelación de cromatina, así como las moléculas de reparación de DNA y microRNA (Burdon, Stracey, Chambers, Nichols, & Smith, 1999; Y. Kim, Kang, Park, Nam, & Kwon, n.d.; Kléber & Sommer, 2004; Niwa, Burdon, Chambers, & Smith, 1998).

Al igual que la regulación en las ESC, las MSC se regulan a partir de diversas moléculas como las que participan en la vía de Wnt, LIF/STAT, MAPK, Smads, PPAR γ y Notch 1, entre otras moléculas efectoras de las vías de señalización. La vía de Wnt regula el mantenimiento del proceso de auto-renovación en las SSC, como HSC, NSC, intestinales y piel. Wnt tiene efectos pleiotróficos, por lo que puede participar tanto en la regulación de la proliferación celular como en la inhibición de la diferenciación. También se ha sugerido la participación de la β -Catenina, Bmi-1 (Molécula de la familia Polycomb), LIF, FGF y ciertos microRNAs en el control de la auto-renovación de la MSC (Boland, Perkins, Hall, & Tuan, 2004; Kléber & Sommer, 2004; Metcalf, 2003; Park et al., 2003; Zaragosi, Ailhaud, & Dani, 2006).

Hasta el momento, existen pocos estudios sobre la expresión génica durante el proceso de diferenciación en BM-MS y ASC. Los estudios se han enfocado principalmente a condrogénesis, osteogénesis y adipogénesis en modelos porcinos,

murinos y en células humanas (S.-H. Kim et al., 2011; Menssen et al., 2011; Nakanishi et al., 2011): ningún estudio ha tomado en cuenta la diferenciación a otras estirpes celulares como la diferenciación hacia cardiomiocito. Una problemática para realizar estudios de expresión génica durante el proceso de diferenciación hacia cardiomiocito a partir de las BM-MSc y ASC es que la eficiencia terminal de diferenciación de dichas células es muy baja. Se han utilizado otros tipos celulares como las iPSC; sin embargo, éstas últimas pueden aumentar el riesgo de generar células neoplásicas (Zhang *et al.*, 2012).

Una opción distinta para optimizar la eficiencia terminal de diferenciación hacia cardiomiocito a partir de las BM-MSc y ASC es emplear la transducción de genes que inhiben la vía clásica del factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B) (Afzal et al., 2010; Armstrong et al., 2006; Chang et al., 2013; Ruland, 2011) directamente en las células troncales mesenquimales para facilitar la diferenciación y, posteriormente, llevar a cabo una inducción mediante factores de diferenciación como factores de crecimiento y biomatriz cardíaca. En un estudio reciente realizado en nuestro grupo de investigación, se logró aumentar la diferenciación hacia cardiomiocito a partir de las BM-MSc y ASC por medio de la inhibición de la vía clásica de NF- κ B y de adenovirus recombinantes que contienen genes como *I κ B- α* y *A20*. Este estudio se basó en los reportados previamente, donde la inhibición específica de NF- κ B induce la diferenciación de las ESC humanas (Armstrong *et al.*, 2006). Además, en las MSC dicha inhibición había sido vinculada al aumento de la diferenciación hacia condrocitos, osteocitos y músculo esquelético (Gilbert et al., 2000; Guttridge, Mayo, Madrid, Wang, & Baldwin, 2000; Mourkioti et al., 2006; Murakami, Lefebvre, & de Crombrughe, 2000; Schugar, Robbins, & Deasy, 2008; Thaloor, Miller, Gephart, Mitchell, & Pavlath, 1999).

El NF- κ B es un factor nuclear de transcripción que tiene un papel crítico en la supervivencia celular, inflamación, inmunidad, proliferación y diferenciación. Las proteínas de la familia Rel/NF- κ B pueden formar diversos complejos diméricos al unirse al DNA por medio de sitios κ B, donde regulan directamente la expresión génica. Se han reconocido dos principales vías de activación de NF- κ B, conocidas como la vía clásica y vía alterna. Asimismo, se conocen dos potentes inhibidores de la vía clásica de NF- κ B, *I κ B- α* y *A20*, también conocido como TNFAIP3 (Tumor de Necrosis Tumoral Alfa, proteína 3 inducida): *I κ B- α* por medio de la unión a NF- κ B impidiendo su translocación al núcleo y *A20* por medio de la desubiquitinación de RIP1 (Lys63) y IKK γ , desensamblando el complejo proximal activador de NF- κ B (Shembade, Ma, & Harhaj, 2010; Vereecke, Beyaert, & van Loo, 2009; Wertz et al., 2004).

Objetivo general

1. Aumentar la eficiencia terminal de diferenciación hacia cardiomiocito a partir de las BM-MSC y ASC.
2. Conocer el patrón de expresión génica diferencial desde el estado indiferenciado de las BM-MSC y ASC hacia su diferenciación a cardiomiocito.
3. Conocer cómo afecta la transducción de genes que inhiben la vía de NF- κ B en la expresión génica durante el proceso de diferenciación a cardiomiocito de las BM-MSC y ASC.

Objetivos particulares

- A) Aislar y caracterizar las células troncales mesenquimales de médula ósea y las derivadas de tejido adiposo.
- B) Inhibir la vía de NF- κ B en ambas estirpes celulares por transducción con adenovirus recombinantes que contengan genes como *I κ B- α* y *A20*.
- C) Inducir la diferenciación a cardiomiocito de ambas líneas celulares empleando factores de crecimiento, biomatriz cardíaca y medios especiales de diferenciación.
- D) Determinar los cambios en el perfil de expresión génica diferencial durante el proceso de diferenciación comparándolos con aquellos encontrados en las células troncales antes de sufrir la inhibición de la vía de NF- κ B junto con la inducción con factores de crecimiento específicos que induzcan la diferenciación hacia cardiomiocito.
- E) Validar los genes candidatos mediante PCR en tiempo real.

Hipótesis

A) La transducción de las BM-MSc y ASC con adenovirus recombinantes que contengan genes que inhiban la vía de NF- κ B como *I κ B- α* o *A20* aumenta la eficiencia terminal de diferenciación.

B) Durante el proceso de inducción a la diferenciación hacia cardiomiocito de las BM-MSc y ASC, existen patrones de expresión génica distinta que caracteriza al estado indiferenciado, el proceso de diferenciación y el estado diferenciado.

C) La inhibición de la vía de NF- κ B con *I κ B- α* o *A20* modifica el patrón de expresión génica durante el proceso de diferenciación en las BM-MSc y ASC.

Metodología adecuada para la solución del problema a resolver

Extracción de células mesenquimales

Se utilizaron ratas macho o hembra de la cepa Wistar de 250 a 300 g de peso corporal. Fueron mantenidas en bioterio en jaulas con libre acceso al agua y alimento, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas en estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para cuidado de animales de experimentación.

Extracción de células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSC)

Se realizó eutanasia de la rata con CO₂. Se rasuraron las patas traseras, abdomen y región lumbar. En condiciones de asepsia y con material estéril, se realizó un corte de la piel en las patas traseras, decolando el tejido paralelo al hueso y se extrayendo ambos fémures, tibias y peronés de la rata. El hueso extraído fue colocado en un tubo de 50 mL con 30 mL de PBS 1x estéril (NaCl, 8g/L; KCl, 0.2g/L; Na₂HPO₄, 1.09g/L; KH₂PO₄, 0.26 g/L, pH 7.2) con una mezcla antibióticos y antimicótico al 3x (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin y anfotericina B).

En la campana en condiciones estériles se colocaron los huesos extraídos en una caja Petri con PBS 1x + Antibiótico y se limpió completamente el hueso. El hueso se colocó en una caja Petri nueva y se trituraron los huesos con unas pinzas. Se agregó 9 mL de medio base DMEM + antibiótico y se le agregó 750 µl de tripsina 0.25 % y se dejó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se inactivó con 5 mL de medio completo. Se colocó el contenido de la caja Petri en un tubo de 50 mL (huesos, médula ósea y medio completo). Se agregó 2ml de colagenasa tipo II con albúmina al 2 % y se incubó con agitación a 37 grados centígrados durante 45 a 60 minutos. Se retiraron los huesos por medio de filtración. El sobrenadante se centrifugó a 3500 rpm durante 7 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón. Se agregó 5 mL de buffer de lisis durante 1 minuto de incubación a temperatura ambiente sin exceder el tiempo, se agregó 10 mL de PBS 1x y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón. Se agregó medio completo y se colocó en 8 cajas p100. 24 horas después se descartó el sobrenadante que contiene células hematopoyéticas, se lavó con PBS 1X y se colocó nuevo medio.

Extracción de células troncales derivadas de tejido adiposo (ASC)

Se eutanizó la rata con CO₂. Se rasuraron las patas traseras, abdomen y región lumbar. En condiciones de asepsia y con material estéril se realizó una incisión en la piel abdominal y se procedió a disecar el tejido adiposo subdérmico. El tejido adiposo extraído fue colocado en un tubo de 50 mL con 30 mL de PBS 1x estéril (NaCl, 8g/L; KCl, 0.2g/L; Na₂HPO₄, 1.09g/L; KH₂PO₄, 0.26 g/L, pH 7.2) con una mezcla antibióticos y antimicótico al 3x (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin y anfotericina B).

En la campana en condiciones estériles se colocó el tejido adiposo extraído en una caja Petri con una cantidad mínima de PBS 1x + Antibiótico y se disgregó por medio de tijeras y bisturí hasta obtener una mezcla homogénea. Se colocó el tejido adiposo disgregado y homogenizado en un tubo de 50 mL y se agregará 9 mL de medio DMEM con antibiótico. Por cada

1.5 g de grasa se agregó 500 µl de colagenasa tipo II al 0.1 % (Sigma) y se incubó con agitación a 37 grados centígrados durante 45 a 60 minutos. Se agregó medio completo para inactivar y se filtró. El filtrado se centrifugó a 2500 rpm por minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón con medio completo. Se colocó en una caja p100 y se realizaron lavados con PBS 1x cada 2 días para retirar los residuos de grasa.

Mantenimiento de los cultivos de BM-MSC y ASC

La proliferación de los cultivos se evaluó a diario para observar el desarrollo de colonias visibles y descartar la presencia de microorganismos patógenos. Las colonias de fueron visibles para el día 5-7 posterior a su extracción y siembra. La población de BM-MSC y ASC en los cultivos celulares se evaluaron por su adherencia, morfología espiculada y su expansión a través de los pases. Se realizaron subcultivos cada vez que los cultivos presentaron confluencia del 70 % al 80 %. La actividad de proliferación entre las BM-MSC y ASC se midió a través del conteo celular, ya sea por citometría de flujo o hemocitometro.

Caracterización de BM-MSC y ASC por citometría de flujo

Para confirmar que las BM-MSC y ASC mantenían sus características fenotípicas después de su crecimiento en cultivo, se evaluaron las BM-MSC y ASC indiferenciadas por medio de citometría de flujo (FACScalibur Becton Dickinson). Se recolectaron las células y se centrifugó. Se resuspendió el botón celular en 300 µl de PBS con albúmina. El inmunofenotipo de las BM-MSC y ASC se realizó con anticuerpos contra rata antígeno CD45, CD90, CD105, CD44, RT1A, CD73 y CD34. Se incubaron con isotiocinato de fluoresceína (FITC) anticuerpos conjugados y ficoeritrina PE por 30 minutos con agitación a temperatura ambiente.

Inhibición de la vía de NF-κB en BM-MSC y ASC con vectores virales:

Se analizó en ambos tipos celulares y por separado las vías clásicas NF-κB. Se utilizaron adenovirus con moléculas que inhiban la vía de señalización clásica como son IκB-α y A20, como control usamos un adenovirus con GFP. Experimentos preliminares nos mostraron que una MOI (Multiplicity of Infection) de 100 es suficiente para lograr modificar los patrones de expresión y ver resultados (Hernández-Gutierrez *et al.*, 2006).

Construcción de plásmidos y generación de adenovirus recombinante

El adenovirus recombinante que se utilizó para inhibir la vía clásica de NF-κB fue previamente sintetizado siguiendo los siguientes pasos (Hernández-Gutierrez *et al.*, 2006): Se realizó subclonación y selección del gen de interés (GOI) para transferirlo al vector shuttle, linearización y transformación, recombinación homóloga para introducir el GOI en la estructura del adenovirus (ΔE1), linearización de la estructura pAd+GOI, empaquetamiento del virus por medio de las células 293, amplificación y purificación del virus.

Experimentos de transducción de cultivos de BM-MSC y ASC con adenovirus recombinante (*IκB-α* y *A20*)

Se realizaron cultivos de BM-MSC y ASC por triplicado para realizar conteo celular y valoración de viabilidad a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la transducción con adenovirus recombinantes que contenga genes como *IκB-α* o *A20*. El conteo celular y viabilidad se realizará en la cámara de Neubauer con azul de tripano. Se observó la morfología celular de ambos cultivos con tinción de hematoxilina y eosina a las 72 horas post-transducción.

Diferenciación hacia cardiomiocito a partir de BM-MSC y ASC

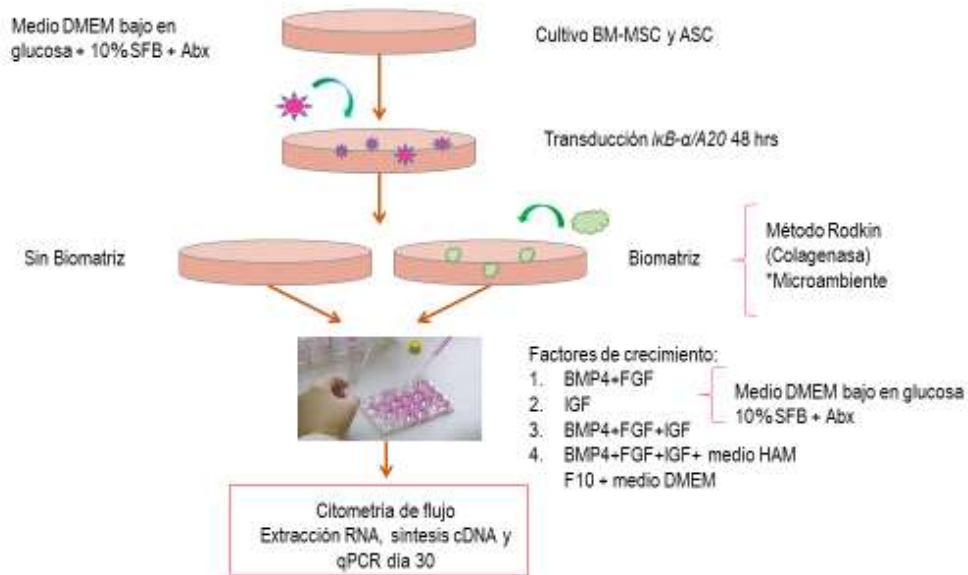
Se realizaron cuatro experimentos de diferenciación cardíaca *in vitro* de BM-MSC y ASC de rata. Los experimentos consistieron principalmente en la transducción con adenovirus recombinantes, tratamiento de las células con factores de crecimiento que favorecen la diferenciación a cardiomiocito, biomatriz cardíaca, el uso de un medio especializado para la diferenciación a cardiomiocitos y el tratamiento de 5-azacitidina. Más adelante se detalla el método utilizado en cada experimento.

Experimento 1 (Diferenciación cardíaca a partir de BM-MSC y ASC)

Se obtuvieron los cultivos de BM-MSC y ASC. Entre el pase 4-5, se realizó la transducción con adenovirus recombinantes que inhiben la vía clásica de NF-κB (*IκB-α* o *A20*). A las 48 horas post-traducción se sembraron las células con medio DMEM completo en placas con las siguientes condiciones: adenovirus recombinante (*IκB-α* o *A20*) + factores de crecimiento (BMP-4, FGF-2 y IGF-1) con/sin biomatriz cardíaca. La biomatriz cardíaca se obtuvo a partir de corazones de ratas neonatas por el método de Rodkin (Castaldo *et al.*, 2013). Se agregó dicha biomatriz cardíaca para crear un microambiente similar al que se encuentra en el corazón. Los factores de crecimiento fueron añadidos durante 4 semanas (Semana 1: BMP-4 y FGF2; Semana 2: IGF-1; Semana 3: BMP4, FGF-2 y IGF-1; Semana 4: BMP4, FGF-2 y IGF-1 + Medio DMEM y Ham F10 completo) (Figura 1).

Se evaluó la diferenciación cardíaca a los 7, 14, 21 y 30 días por medio de citometría de flujo con los siguientes marcadores de diferenciación cardíaca: Gata4, Troponina I y Myh. Se determinó por medio qRT-PCR, el grado de diferenciación cardíaca al día 30. El procedimiento se especifica más adelante en el experimento 2.

Figura 1. Experimento de diferenciación cardíaca #1



Experimento 2 (Diferenciación cardíaca a partir de BM-MSc y ASC)

Se obtuvieron los cultivos de BM-MSc y ASC. Entre el pase 4-5, se realizó la transducción con adenovirus recombinantes que inhiben la vía clásica de NF- κ B ($\text{ikB-}\alpha$ o A20). A las 48 horas post-traducción, se sembraron las células con medio DMEM completo en placas con las siguientes condiciones: adenovirus recombinante ($\text{ikB-}\alpha$ o A20) + factores de crecimiento (BMP-4, FGF-2, IGF-1 y HGF). Los factores de crecimiento fueron añadidos durante 4 semanas (Semana 1: BMP-4 y FGF2; Semana 2: IGF-1 y HGF; Semana 3: BMP4, FGF-2, IGF-1 y HGF; Semana 4: BMP4, FGF-2, IGF-1 y HGF + Medio DMEM y Ham F10 completo) (Figura 2). El grado de inducción a la diferenciación cardíaca se estudió mediante qRT-PCR a distintos tiempos (0, 3, 7, 14, 21 y 30 días), con los siguientes genes como marcadores (*Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, α -*Mhc*, β -*Mhc*, *Troponina T*, *MyoD*, *Conexina 43* y *Gadph*).

La extracción de RNA de los cultivos a diferentes tiempos se obtuvo por medio del protocolo de extracción de RNA con TRizol (TriPure Isolation Reagent) según lo establecido por el fabricante. Se realizó un análisis por espectrofotometría (NanoDrop 1000, Thermo Scientific); la relación A_{260}/A_{280} fue mayor a 1.6. El RNA fue almacenado a -80°C hasta su síntesis a cDNA. La síntesis de RNA a cDNA se realizó con el kit de MMLV High Performance Reverse Transcriptase (Epicentre Biotechnologies), según lo especificado por el fabricante, en el termociclador Veriti (96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems). El cDNA obtenido fue analizado por espectrofotometría (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). Fue almacenado a -20°C hasta ser utilizado para la qPCR. La qPCR se realizó con Ssofast Eva Green supermix en el termociclador CFX96 C1000 Thermal cycler, (BioRad) bajo las siguientes condiciones: $1\mu\text{g}$ cDNA fue utilizado como plantilla; cada *primer* fue usado a 100nM y una T_m de 60°C , siguiendo las instrucciones del fabricante. Los *primers* utilizados se resumen en la

tabla 1 (Tabla 1). El gen *Gadph* fue usado como gen constitutivo. Como referencia cada gen fue probado con RNA de corazón de rata adulta. La expresión relativa se obtuvo por el método de $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Figura 2. Experimento de diferenciación cardíaca #2

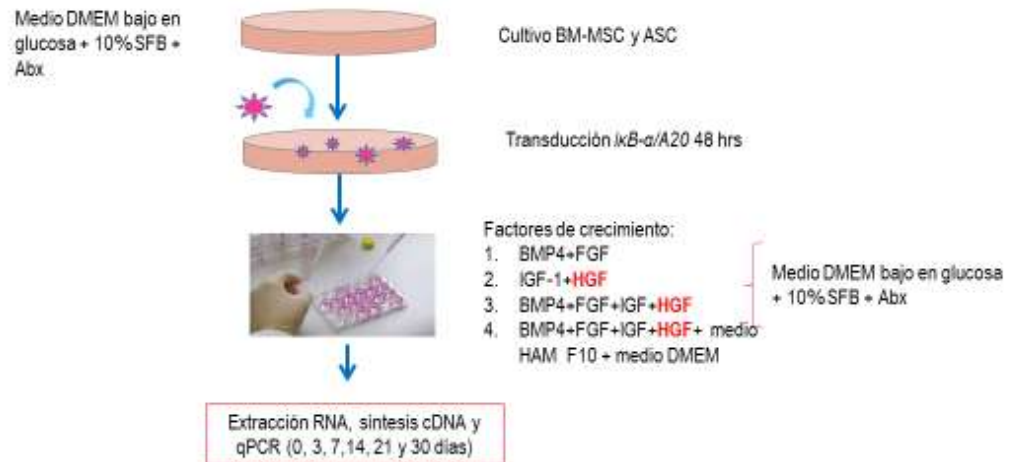


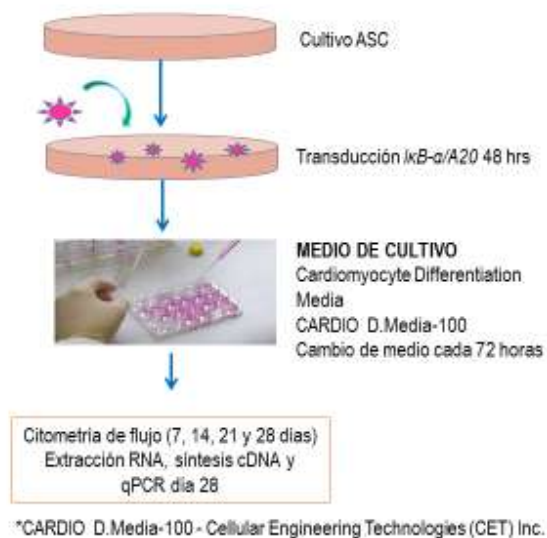
Tabla 1. Genes y secuencia de primers.

GEN	Primer	Dirección 5'-3'
<i>Conexina 43</i>	FW	CTCACGTCCCACGGAGAAAA
	RV	CGCGATCCTTAACGCCTTTG
<i>MyoD</i>	FW	CTAGGTGTGGGCTGATTCGG
	RV	GTCAGGGTGGGTTCTGACA
<i>Troponina T</i>	FW	CCAAGGAGCTTATGGCAGAGT
	RV	TGCTGCTTGAACTTTTCTGC
<i>Gata-4</i>	FW	CCGGGCTGTCTCACTATG
	RV	TTCAGAGCAGACAGCACTGGAT
<i>Mef2c</i>	FW	CTGGCCACCCGTCTCT
	RV	GTCAGATCTCCGCCATCA
<i>Nkx2.5</i>	FW	CCTACGGTGACCCGACCC
	RV	GCCATCCGTCTCGGCTTT
<i>α-Mhc</i>	FW	TGAGACGGTGGTGGGTTTG
	RV	AGAGCAGACTGTTTGAAGGA
<i>β-Mhc</i>	FW	TCCTCACATCTTCCATCTCTGA
	RV	AGCAAAATATTGGATGACCCTCTT
<i>Gadph</i>	FW	ATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC
	RV	GAAGGCAGCCCTGGTAACC

Experimento 3 (Diferenciación cardíaca a partir de ASC)

Se obtuvieron los cultivos de ASC. Entre el pase 4-5, se realizó la transducción con adenovirus recombinantes que inhiben la vía clásica de NF- κ B (*I κ B- α* o *A20*). A las 48 horas post-traducción, se sembraron las células en placas con las siguientes condiciones: adenovirus recombinante (*I κ B- α* o *A20*) con/sin medio especializado para diferenciación cardíaca (Cardiomyocyte Differentiation Media, CARDIO.D.Media-100; Cellular Engineering Technologies (CET) Inc.). Se evaluó la diferenciación cardíaca a los 7, 14, 21 y 28 días por medio de citometría de flujo con los siguientes marcadores de diferenciación cardíaca: Gata4, Troponina I y Myh. Se determinó por medio qRT-PCR, el grado de diferenciación cardíaca al día 28. El procedimiento se especificó en el experimento 2 (Figura 3).

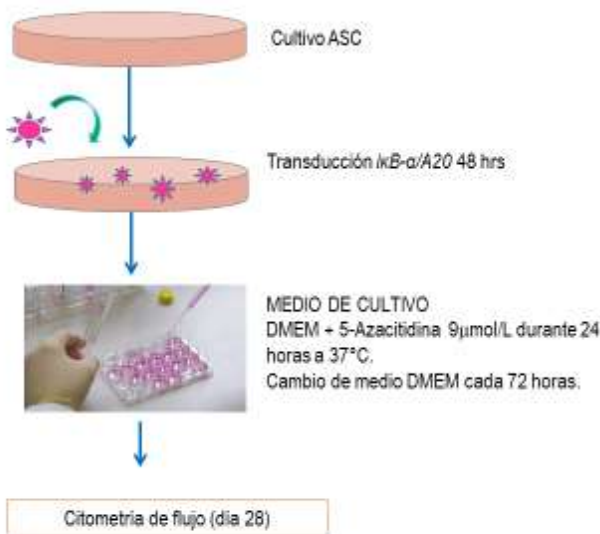
Figura 3. Experimento de diferenciación cardíaca #3



Experimento 4 (Diferenciación cardíaca a partir de ASC)

Se obtuvieron los cultivos de ASC. Entre el pase 4-5, se realizó la transducción con adenovirus recombinantes que inhiben la vía clásica de NF- κ B (*I κ B- α* o *A20*). A las 48 horas post-traducción, se sembraron las células con medio DMEM completo en placas con las siguientes condiciones: adenovirus recombinante (*I κ B- α* o *A20*) con/sin tratamiento con 5-azacitidina. En el día 1 se trataron las células con 9 μ mol/L de 5-azacitidina, se incubó durante 24 horas a 37°C, a las 24 horas se lavaron las células con PBS1X y se agregó medio DMEM completo. Se evaluó la diferenciación cardíaca a los 28 días por medio de citometría de flujo con los siguientes marcadores de diferenciación cardíaca: Gata4, Troponina I y Myh (Figura 4).

Figura 4. Experimento de diferenciación cardíaca #4



Patrón de expresión génica: Extracción mRNA y Microarreglos de expresión (Doctorado).

Una vez establecidas las condiciones óptimas para inducir la diferenciación se estudiará el patrón de expresión génica mediante la obtención de mRNA de alta calidad de los cultivos celulares en sus diferentes estadios.

Para comparar la expresión génica de las BM-MSc y ASC, el análisis de microarreglos se realizará conforme a los métodos previamente reportados (16). Ya que se requiere de una extracción de mRNA de alta calidad, se utilizará de RNeasy Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El mRNA será cuantificado por un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) y la calidad del RNA será confirmada por gel de agarosa para electroforesis o mediante electroforesis capilar.

Posteriormente, se emplearán microarreglos de expresión comerciales (hibridación, detección, normalización y evaluación) siguiendo los protocolos del fabricante GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) conteniendo 31,099 genes. Se utilizarán controles negativos y controles positivos (gen constitutivo) para evaluar impurezas, hibridación subóptima y normalización. Este microarreglo se utilizará para intentar comprender mejor el proceso de inducción a la diferenciación y así estar en una mejor posibilidad de obtener células suficientes en el punto óptimo de diferenciación para su posible empleo en la medicina regenerativa.

Los microarreglos serán evaluados por el GenChipScanner 3000 (Affymetrix). La normalización, filtrado y análisis ontológico de genes se realizará con GeneSpring GX 7.3.1. La información cruda de cada microarreglo será normalizado como sigue: cada archivo CEL será preprocesado por un modelo RMA (Robust multi-array average model) y la medida de

cada gen será dividida por la percentila 80. Los genes que muestren al menos un cambio de 3 veces serán seleccionados. Se validará la información obtenida de los genes sobre o subexpresados mediante qRT-PCR. Se extraerá RNA total de los cultivos de las BM-MSc y ASC como se describió previamente. Los niveles de expresión génica se normalizarán de acuerdo con el gen *Gapdh*.

Diseño del estudio

Se realizará un estudio experimental para microarreglos a través del tiempo para un proceso de desarrollo (diferenciación hacia cardiomiocito a partir de las BM-MSc y ASC). Se tendrá un control positivo y negativo (célula cardíaca diferenciada y célula endotelial, respectivamente).

Análisis estadístico de la expresión diferencial para los experimentos con microarreglos

Se utilizará el Modelo de Bayes empírico multivariado (Smyth, 2004) porque tiene menor cantidad de falsos positivos y de falsos negativos en comparación con ANOVA (Kerr, Martin, & Churchill, 2000). Para realizar el análisis estadístico se utilizará el programa Limma (Bioconductor) o Timecourse (Bioconductor). Las diferencias serán consideradas significativas con una $p < 0.05$. Para la identificación de la clasificación de genes diferencialmente expresados estadísticamente significativos que se encuentran sobre o subexpresados se utilizará el paquete NetAffx GO Mining (X^2).

IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 2. Operacionalización de variables		
Variable	Definición	Tipo de variable
Perfil de expresión en tiempo 0 (estado indiferenciado)	Nivel de expresión génica de cada gen en tiempo 0 (estado indiferenciado) Expresado en log2 de las proporciones.	Variable dependiente, cuantitativa continua
Perfil de expresión en tiempo 1 (durante diferenciación)	Nivel de expresión génica de cada gen en tiempo 1 (durante diferenciación) Expresado en log2 de las proporciones.	Variable dependiente, cuantitativa continua
Perfil de expresión en tiempo 2 (estado diferenciado)	Nivel de expresión génica de cada gen en tiempo 2 (estado diferenciado) Expresado en log2 de las proporciones.	Variable dependiente, cuantitativa continua
Células troncales mesenquimales de médula ósea	BM-MSC BM-MSC + $1\kappa B-\alpha$ BM-MSC + A20	Variable independiente, cualitativa nominal
Células troncales derivadas de tejido adiposo	ASC ASC + $1\kappa B-\alpha$ ASC + A20	Variable independiente, cualitativa nominal
Eficiencia terminal de diferenciación	Cantidad de células en un cultivo diferenciadas hacia cardiomiocito	Variable cuantitativa discreta

Infraestructura con la que se cuenta para desarrollar el trabajo de investigación

Los experimentos relacionados a la diferenciación cardíaca se llevaron a cabo en el laboratorio de Fisiología sección Biología Celular del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez. Los experimentos relacionados con los adenovirus recombinantes fueron realizados en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Panamericana.

Los experimentos relacionados con los microarreglos, así como su análisis, se llevarán a cabo en los laboratorios del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Los laboratorios cuentan con el equipo necesario para realizar el trabajo de investigación.

Recursos financieros

El proyecto será financiado por el Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Panamericana, Instituto Nacional de Medicina Genómica y CONACyT.

Comité de Bioética e Investigación del INCICH

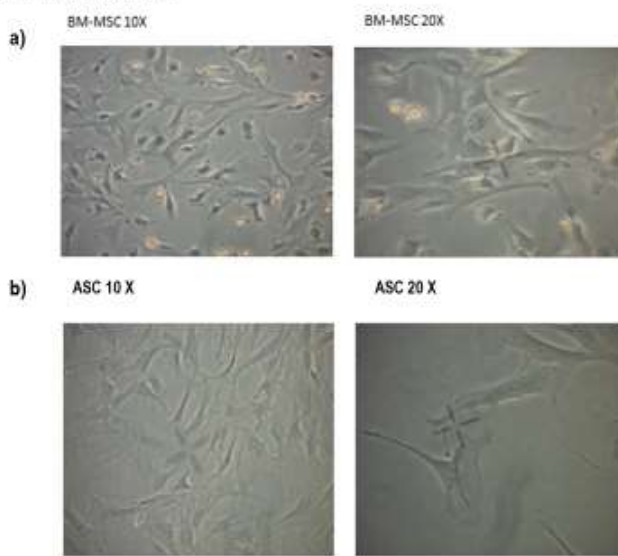
El protocolo fue autorizado por los comités de Investigación y Bioética del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez.

Resultados obtenidos en la Maestría

Caracterización por citometría de flujo de células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSC), células troncales de tejido adiposo (ASC) y morfología celular.

Después de la extracción de los cultivos celulares en el pase 4-5 se observó por medio de microscopía óptica de luz que las BM-MSC y ASC tenían una morfología celular similar a fibroblastos (Figura 5a y 5b), según lo descrito previamente para dichas células.

Figura 5. Imágenes de microscopía óptica de luz a 10X y 20X. **a)** BM-MSC con morfología espiculada, similar a fibroblastos. **b)** ASC con morfología espiculada, similar a fibroblastos.

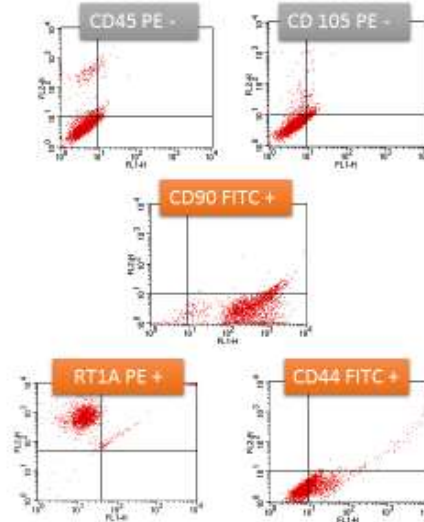


La caracterización de las ASC demostró que las células fueron positivas para CD90+ (96 %), CD44+ (98.7 %) RT1A+ (87.9 %) y CD73+ (98.4 %); y negativas para CD45- (99.5 %) y CD105- (95.6 %) (Gráfica 1 y Figura 6). La caracterización de las BM-MSC demostró que las células fueron positivas para CD90+ (95 %), RT1A+ (86.1 %); y negativas para CD45- (87.5 %), CD105- (93.8 %) y CD44- (53.5 %) (Gráfica 2 y Figura 7).

Gráfica 1. Caracterización por citometría de flujo de cultivos de ASC (Porcentaje de células positivas y células negativas para CD45, CD105, CD90, CD44, RT1A y CD73).



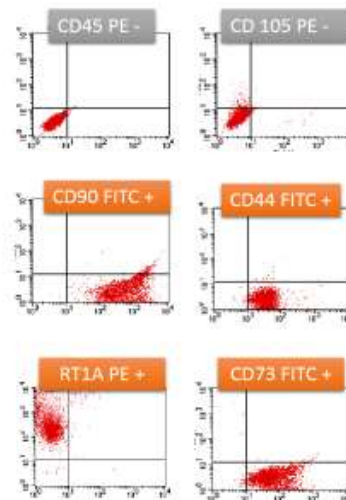
Figura 6. Caracterización por citometría de flujo de cultivos de ASC.



Gráfica 2. Caracterización por citometría de flujo de cultivos de ASC (Porcentaje de células positivas y células negativas para CD45, CD105, CD90, CD44, RT1A y CD73).



Figura 7. Caracterización por citometría de flujo de cultivos de ASC.

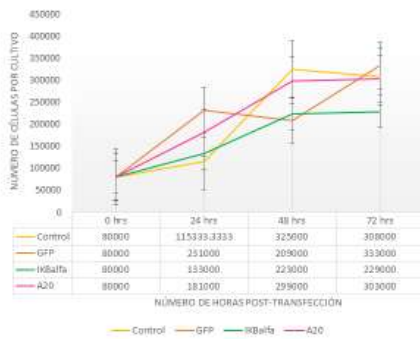


Experimentos de transducción de cultivos de BM-MSC y ASC a las 24, 48 y 72 horas.

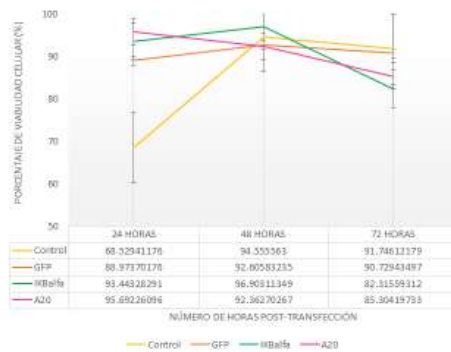
Con el fin de conocer la viabilidad celular y la cantidad de células en los cultivos transducidos, se realizaron experimentos post-traducción de *IkB-α* o *A20* a las 24, 48 y 72 horas. La viabilidad celular en los cultivos fue mayor al 80 % (Ver Anexo; Gráficas 4 y 6). El conteo celular nos permitió observar que las células mantenían su capacidad de auto-renovación post-transducción, ya que las BM-MSC y ASC duplicaron y triplicaron la cantidad inicial de células sembradas a las 72 horas respectivamente (Gráficas 3 y 5).

Se evaluó la morfología celular de ambos cultivos a las 72 horas post-transducción con tinción de hematoxilina y eosina (Figura 8a y 8b). Se observó que la morfología celular similar a fibroblastos se mantenía cuando los cultivos eran transducidos con *A20* e *IkB-α*; sin embargo, en las ASC se observaron algunas células con una morfología distinta con prolongaciones similares a dendritas (Figura 8b). No se pudo evaluar *IkB-α* en las BM-MSC por cristalización de la muestra.

Gráfica 3. Conteo celular de experimentos en BM-MSC post-traducción a las 24, 48 y 72 hrs.



Gráfica 4. Viabilidad celular de experimentos en BM-MSC post-traducción a las 24, 48 y 72 hrs.



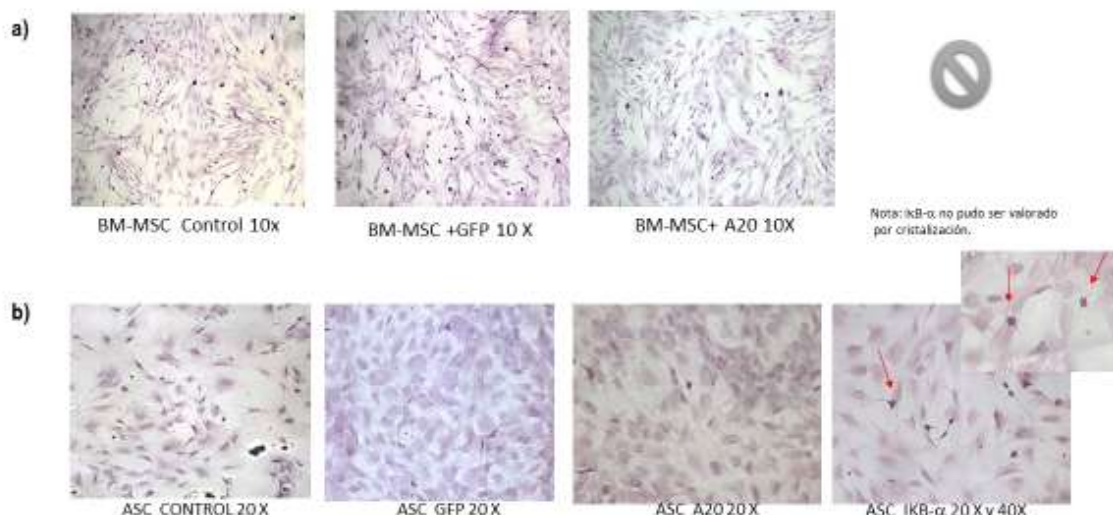
Gráfica 5. Conteo celular de experimentos en ASC post-traducción a las 24, 48 y 72 hrs.



Gráfica 6. Viabilidad celular de experimentos en ASC post-traducción a las 24, 48 y 72 hrs.



Figura 8. Morfología celular con tinción de Hematoxilina y Eosina a las 72 horas post-traduccion. **a)** BM-MSc, mantiene la morfología espiculada post-transduccion. **b)** ASC, mantiene la morfología espiculada, sin embargo en ASC con IKB-A se observan células con prolongaciones similares a dendritas (flechas roja).



Experimentos de diferenciación cardíaca a partir de BM-MSc y ASC.

Experimento 1

Por medio de citometría de flujo, se obtuvo el porcentaje de células positivas para tres marcadores de diferenciación cardíaca (GATA-4, Troponina I y Myh) (Gráficas 7-10 y Figura 9-10).

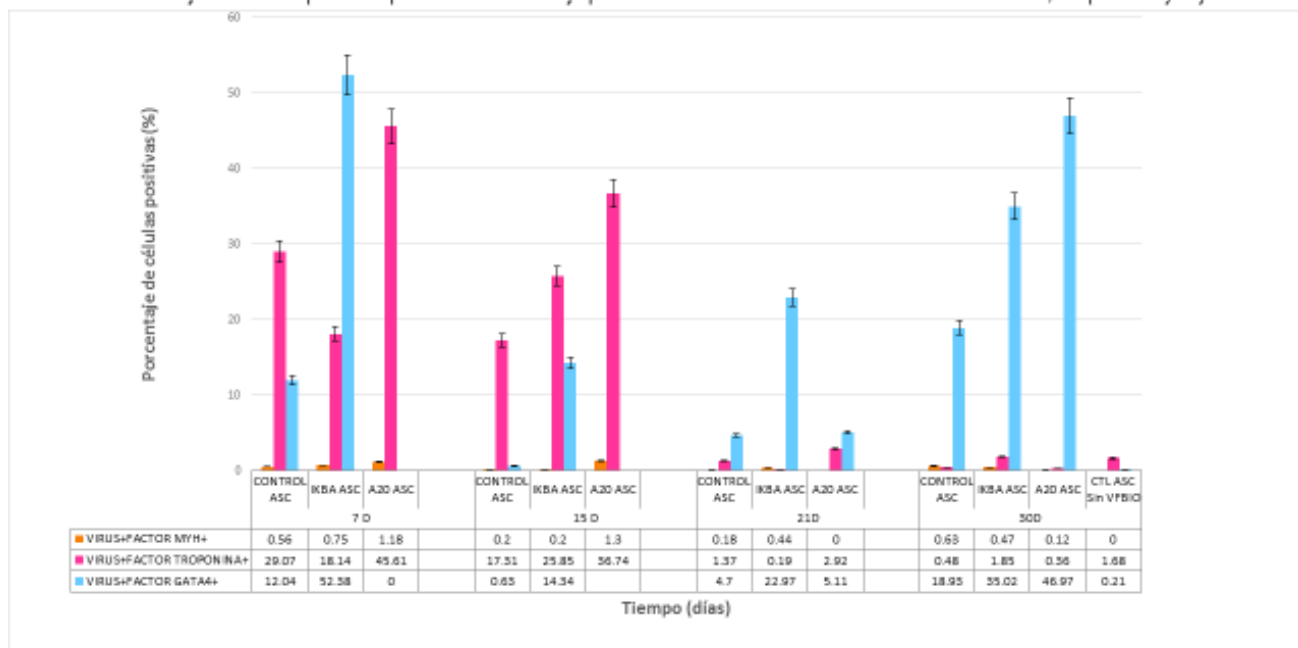
En los cultivos de ASC se observó diferenciación a cardiomiocitos inmaduros al día 7 con y sin biomatriz cardíaca, la inducción a la diferenciación se mantuvo hasta el día 14. El nivel más alto de Troponina I se observó en los cultivos transducidos con A20 con y sin biomatriz cardíaca (45.6 % y 61.8 % células positivas para Troponina I, respectivamente). Para el día 21, se observó una disminución de los niveles de Troponina I, con un sustancial incremento de GATA-4 para el día 30. El nivel más alto de GATA-4 fue en los cultivos transducidos con IKB-α con biomatriz, 74.7 % para el día 30 (Ver Anexo; Gráfica 7 y 8). Por el seguimiento con microscopía óptica de luz se observaron células redondeadas y birrefringentes, considerándose como cambios esperados en la morfología celular durante el proceso diferenciación celular. No se observaron latidos espontáneos en los cultivos (Figura 9 y 10).

En los experimentos de diferenciación de los cultivos con BM-MSc se observó diferenciación a cardiomiocitos inmaduros al día 7 en el experimento que contenía adenovirus recombinantes con IKB-α + factores de crecimiento sin biomatriz cardíaca (54 % de células positivas para Troponina I). No pudo ser evaluado el día 7 del experimento con biomatriz cardíaca por la

cantidad reducida de células. Al igual que en los experimentos en ASC, se observó una desdiferenciación a partir del día 14 (Gráfica 9 y 10). No se observaron latidos espontáneos en los cultivos.

Por medio de qPCR se determinó la expresión génica de diversos marcadores de diferenciación cardíaca (*Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *Troponina T*, α -*Mhc*, β -*Mhc* y *Conexina 43*) y un marcador de músculo esquelético (*MyoD*) en el día 30 para las BM-*MSC* y *ASC* del experimento 1. Todos los marcadores de diferenciación cardíaca se encontraron subexpresados en comparación con cardiomiocitos adultos. El gen *MyoD* se encontró sobreexpresado en la en las *ASC* transducidas con *I κ B- α* , con un valor de expresión relativa de 1.6. (Ver Anexo; Gráfica 24).

Gráfica 7. Experimento de diferenciación cardíaca #1, condición adenovirus recombinantes + factores de crecimiento sin biomatriz cardíaca en *ASC*. Porcentaje de células positivas por citometría de flujo para marcadores de diferenciación cardíaca *Gata-4*, *Troponina I* y *Myh*.



Gráfica 8. Experimento de diferenciación cardíaca #1, condición adenovirus recombinantes + factores de crecimiento con biomatriz cardíaca en ASC. Porcentaje de células positivas por citometría de flujo para marcadores de diferenciación cardíaca Gata-4, Troponina I y Myh.

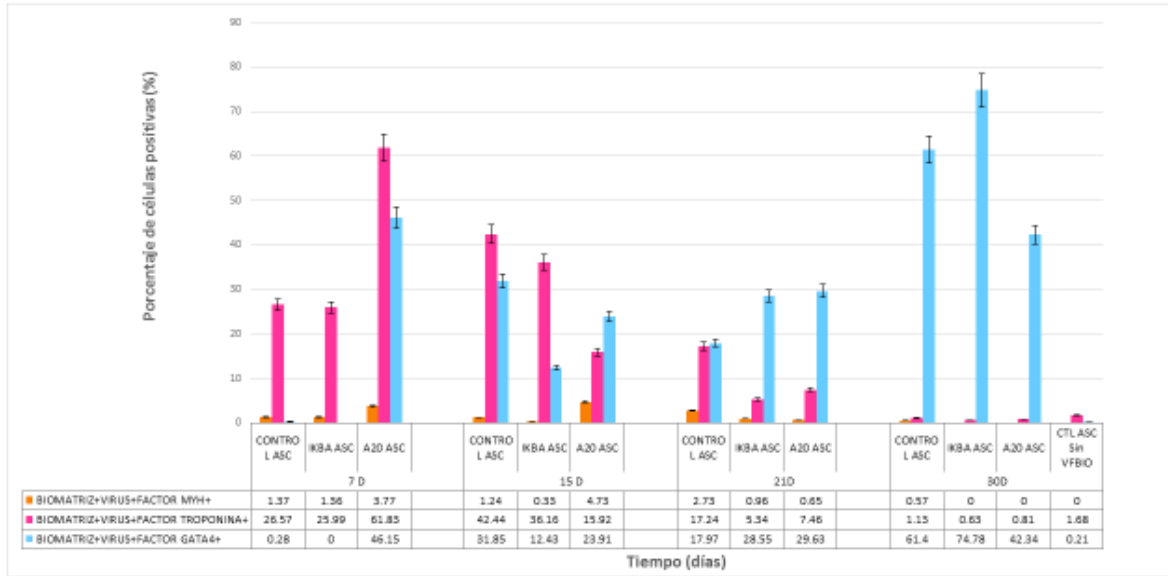


Figura 9. Experimentos de diferenciación en ASC sin biomatriz. a) Imagen de microscopía óptica de luz de cultivo ASC sin biomatriz cardíaca día 0 y día 7. b) Porcentaje de células positivas a Troponina I en ASC transducidas con A20 sin biomatriz cardíaca al día 7. c) Porcentaje de células positivas de Gata-4 con biomatriz cardíaca al día 30.

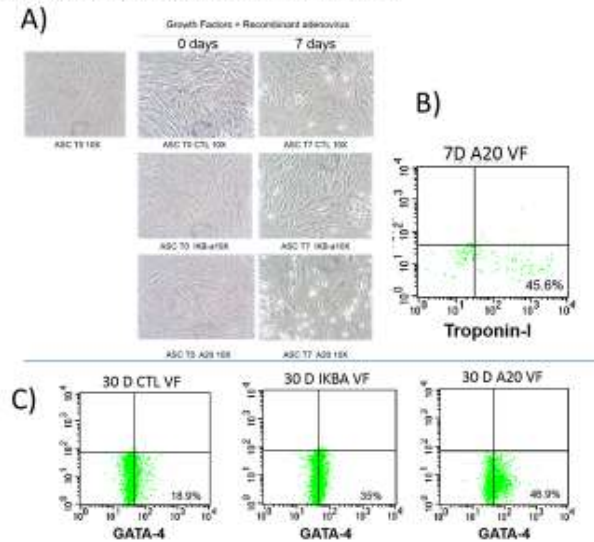
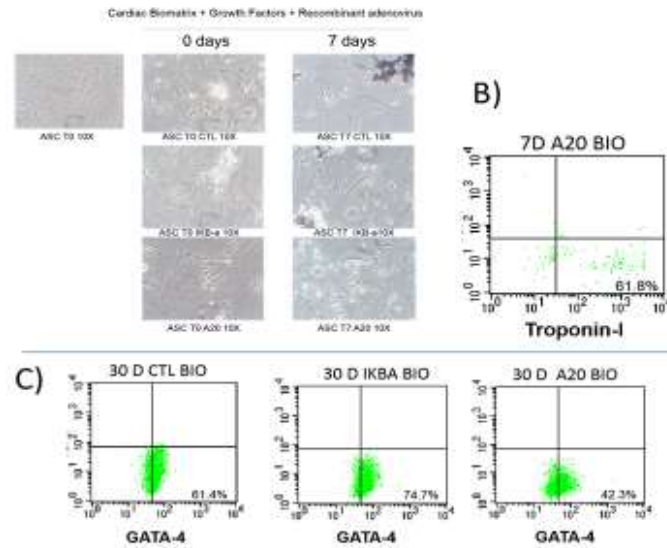
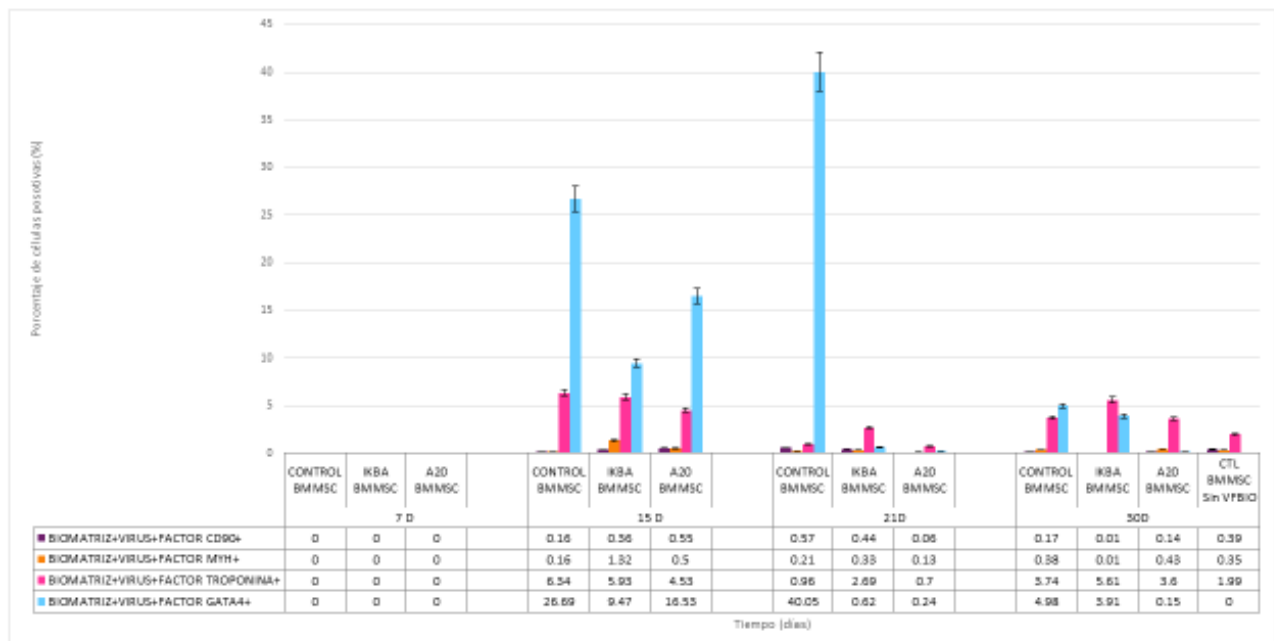


Figura 10. Experimentos de diferenciación en ASC. a) Imagen de microscopia óptica de luz de cultivo ASC con biomatriz cardíaca día 0 y día 7. b) Porcentaje de células positivas a Troponina I en ASC transducidas con A20 con biomatriz cardíaca al día 7. c) Porcentaje de células positivas de Gata-4 con biomatriz cardíaca al día 30.



Gráfica 10. Experimento de diferenciación cardíaca #1, condición adenovirus recombinantes + factores de crecimiento con biomatriz cardíaca en BM-MSC. Porcentaje de células positivas por citometría de flujo para marcadores de diferenciación cardíaca Gata-4, Troponina I y Myh.



Experimento 2

Por medio de qPCR, se determinó la expresión génica de diversos marcadores de diferenciación cardíaca (*Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *Troponina T*, α -*Mhc*, β -*Mhc* y *Conexina 43*) y un marcador de músculo esquelético (*MyoD*) en los días 0, 3, 7, 14, 21 y 30 durante la diferenciación a cardiomiocito a partir de BM-MSC y ASC en el experimento 2. (Ver Anexo; Gráficas 11-22)

Para este experimento, se tuvieron 6 condiciones por cada tiempo. Las condiciones de los cultivos fueron las siguientes: Condición 1= Control (sólo células), Condición 2 = Células+ Factores de crecimiento, Condición 3= Células + *IkB- α* , Condición 4= Células + A20, Condición 5= Células + *IkB- α* + Factores de crecimiento y Condición 6= Células + A20 + Factores de crecimiento.

En los experimentos realizados en las ASC se observó subexpresión de *Gata4*, *Troponina T*, α -*Mhc* y β -*Mhc* en todas las condiciones de cultivo y tiempos. En β -*Mhc* se identificó un valor fuera de rango (T7ASC1). En el día 21, en la condición 5 (T21ASC5) se observó sobreexpresión de *Nkx2.5*, con un valor de expresión relativa de 2.65; sin embargo, en el resto de las condiciones de cultivo y tiempos se observó subexpresión de dicho gen. Para el gen *Mef2c*, sólo el día 3, en la condición 3 y 5 (T3ASC3 y T3ASC5) se observaron sobreexpresiones con un valor de expresión relativa de 1.18 y 1.62, respectivamente; el resto de las condiciones y tiempos se encontraban subexpresados para dicho gen. Se observaron sobreexpresiones de todas las condiciones y tiempos para los genes *MyoD* y *Conexina 43* (Ver Anexo; Gráficas 11-16).

En los experimentos realizados en las BM-MSC, se observaron subexpresiones de *Gata4*, *Troponina T*, α -*Mhc* y β -*Mhc* en todas las condiciones de cultivo y tiempos. Se observaron sobreexpresiones del gen *Nkx2.5* en las siguientes muestras T3BM3, T3BM4, T3BM5, T3BM6, T7BM5, T14BM1, T14BM3, T14BM4, T21BM3, T21BM5, T30BM1, T30BM2 y T30BM3; siendo el valor de expresión relativa más alto al día 30 en la condición 3 (Expresión relativa 79.3 veces más respecto a un cardiomiocito adulto); en el resto de las condiciones de cultivo y tiempos, se observaron subexpresiones de dicho gen. Para el gen *Mef2c*, se observaron sobreexpresiones del gen respecto a un cardiomiocito adulto en T0BMIKB, T3BM1, T3BM2, T3BM3, T3BM4, T3BM5, T3BM6, T7BM2, T7BM5, T7BM6, T14BM3, T14BM4, T14BM5, T14BM6, T21BM3, T21BM5, T21BM6, T30BM1, T30BM2, T30BM3 y T30BM6; siendo el valor de expresión relativa más alto al día 14 en la condición 5 con una expresión relativa de 105.4 veces más. Se observaron sobreexpresiones de todas las condiciones y tiempos para los genes *MyoD* y *Conexina 43*, con excepción de la subexpresión del gen *MyoD* en la muestra T21BM1 y la subexpresión del gen *Conexina 43* en las muestras T7BM3 y T14BM3 (Ver Anexo; Gráficas 17-22).

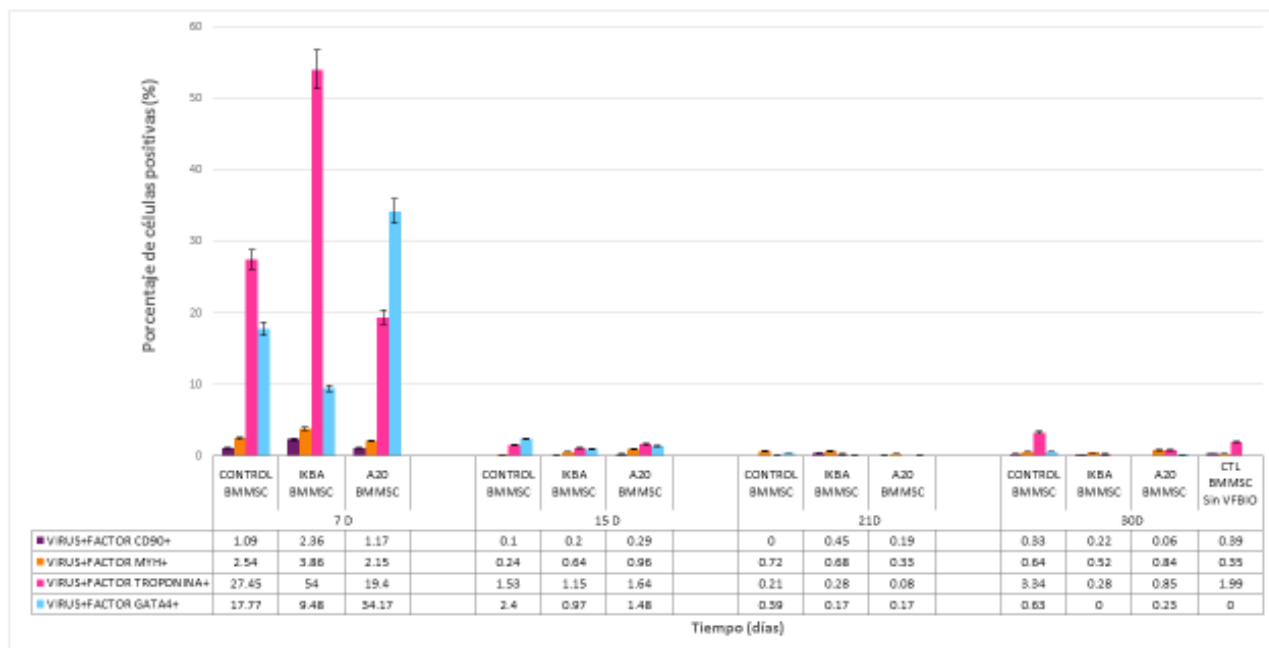
Experimento 3

Se evaluó por medio de citometría de flujo el porcentaje de células positivas para tres marcadores cardíacos (GATA-4, Troponina I y Myh) y un marcador de células troncales indiferenciadas (CD90) en los experimentos en ASC con medio especializado de diferenciación cardíaca (Cardiomyocyte Differentiation Media, CARDIO.D.Media-100; Cellular Engineering Technologies (CET) Inc.) (Gráfica 25). Se evaluaron los días 7, 14, 21 y 28.

Se observó diferenciación cardíaca a partir del día 21 que se mantuvo y aumentó para el día 28 tanto para los cultivos con medio especial (CDM) como para los cultivos con medio DMEM. Para el día 28, el cultivo con mayor cantidad de Troponina I fue el transducido con A20 + CDM (12.3 % células positivas); sin embargo, el cultivo transducido con IKB-A tuvo 5.9 % células positivas para Troponina I y 4.54 % de células positivas para Myh (Gráfica 25).

Por medio de qPCR, se determinó la expresión génica al día 28 de diversos marcadores de diferenciación cardíaca (*Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *Troponina T*, α -*Mhc*, β -*Mhc* y *Conexina 43*) y un marcador de músculo esquelético (*MyoD*) en el experimento 3. Todos los marcadores de diferenciación cardíaca con excepción de *Conexina 43* se encuentran subexpresados en comparación con cardiomiocitos adultos. *MyoD* y *Conexina 43* se encontraron sobreexpresados (Ver Anexo; Gráfica 23).

Gráfica 9. Experimento de diferenciación cardíaca #1, condición adenovirus recombinantes + factores de crecimiento con biomatriz cardíaca en BM-MSC. Porcentaje de células positivas por citometría de flujo para marcadores de diferenciación cardíaca Gata-4, Troponina I y Myh.



Gráfica 25. Experimento de diferenciación cardíaca #3 (ASC con medio especial CDM). Porcentaje de células positivas por citometría de flujo para marcadores de diferenciación cardíaca Gata-4, Troponina I, Myh y CD90 a los 7, 14, 21 y 28 días.

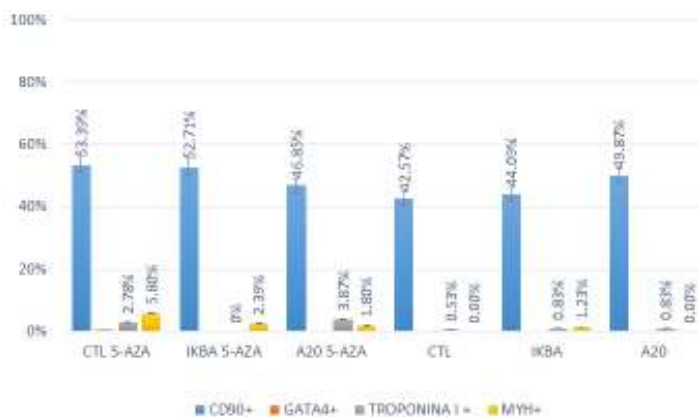


Experimento 4

Se evaluó el día 28, por medio de citometría de flujo, el porcentaje de células positivas para tres marcadores cardíacos (GATA-4, Troponina I y Myh) y un marcador de células troncales indiferenciadas (CD90) en los experimentos en ASC y tratamiento con 5-azacitidina (Gráfica 26).

El mayor porcentaje de células positivas observado fue en el cultivo de ASC transducido con A20 + 5-azacitidina con 3.8 % de células positivas para Troponina I y 1.8 % de células positivas para Myh. Sin embargo, el control tratado con 5-azacitidina mostró mayor cantidad de Myh (5.8 % células positivas) (Gráfica 26).

Gráfica 26. Experimento de diferenciación cardíaca #4 (ASC tratadas con 5-azacitidina). Porcentaje de células positivas por citometría de flujo para marcadores de diferenciación cardíaca Gata-4, Troponina I, Myh y CD90.



Discusión de los resultados obtenidos durante la Maestría

Una de las características de las células troncales mesenquimales es que deben tener un inmunofenotipo específico para poder descartar otros tipos celulares. La citometría de flujo en el estado indiferenciado de las BM-MSC y ASC nos permitió caracterizar las células con los marcadores de superficie que deben estar presentes en las células troncales mesenquimales indiferenciadas. La presencia de más de un 90 % de CD90 positivo es un marcador confiable de células troncales mesenquimales. Sin embargo, el CD45 negativo, nos confirma la ausencia de células troncales hematopoyéticas (Mitchell *et al.*, 2006; Strem *et al.*, 2005).

Como fue reportado previamente en la literatura, la morfología celular de los cultivos en el estado indiferenciado de las BM-MSC y ASC fue similar a la de los fibroblastos, con forma espiculada (Kern, Eichler, Stoeve, Klüter, & Bieback, 2006).

Para poder determinar si los cultivos se veían afectados después de la transducción, se realizaron experimentos de conteo y viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas en ambas líneas celulares. Se demostró que a las 72 horas post-transducción las células tenían una viabilidad mayor al 80 %, además de duplicar y triplicar el número de células, por lo que la transducción con adenovirus recombinantes fue exitosa, sin afectación a la supervivencia y auto-renovación celular. Es importante mencionar que en los cultivos transducidos con *IkB- α* a las 72 horas se identificaron células con una morfología diferente a la forma espiculada, estas células se caracterizaban por tener prolongaciones similares a dendritas con un citoplasma reducido y núcleo prominente.

En el primer experimento de diferenciación cardíaca en donde se evaluaron diferentes condiciones de cultivo con y sin biomatriz cardíaca, se demostró que las ASC tienen la capacidad de diferenciarse a cardiomiocitos inmaduros después de la inhibición de la vía de NF- κ B con adenovirus recombinantes combinado con factores específicos y biomatriz cardíaca. A20 parece mejor inductor de la diferenciación que *IkB- α* en ASC. También se demostró que las BM-MSC tienen la capacidad de diferenciarse a cardiomiocitos inmaduros después de la inhibición de la vía de NF- κ B con adenovirus recombinantes combinado con factores específicos. A diferencia de las ASC, *IkB- α* parece ser un mejor inductor de la diferenciación en las BM-MSC. La presencia de células positivas a Troponina I y Gata-4 nos habla de una diferenciación a cardiomiocito inmaduro, esto ha sido previamente establecido por otros grupos de investigación (Burridge, Keller, Gold, & Wu, 2012). Observamos cambios en la morfología celular; no obstante, no hubo latidos espontáneos en ninguno de los cultivos, lo cual es un indicador de maduración (Makino *et al.*, 1999). En las dos líneas celulares observamos que la inducción por adenovirus recombinantes puede incrementar la inducción a la diferenciación; sin embargo, no es suficiente para mantener el estado diferenciado, situación que otros grupos de investigación han denominado desdiferenciación (Wagers & Weissman, 2004).

Previamente, se había reportado una diferenciación a cardiomiocito a partir de las BM-MSC y ASC menor al 1 % (Lara-Martínez, Navarro-Betancourt, & Hernández-Gutiérrez, 2012). En el presente trabajo obtuvimos una excelente eficiencia de diferenciación, ya que se logró obtener cifras entre al 45-61 % de eficiencia de diferenciación a cardiomiocito inmaduro.

Hasta el momento no se ha reportado ningún estudio con esta eficiencia en este tipo celular, sólo se ha observado una eficiencia terminal de diferenciación a cardiomiocito mayor al 50 % en las células troncales pluripotenciales inducidas (IPSC) (Egashira *et al.*, 2012); sin embargo, éstas últimas no han podido ser utilizadas en los trasplantes celulares en pacientes por su riesgo elevado de generar células neoplásicas (Zhang *et al.*, 2012).

Se observó que la diferenciación con medios especiales como CARDIO.D.Media 100 (CDM) no muestran una mayor diferenciación que el experimento 1 en donde se logró obtener una eficiencia de diferenciación a cardiomiocito inmaduro entre el 45-61 %. No obstante, la eficiencia en las ASC transducidas con A20 con CDM fue de 12 % y, a diferencia del experimento 1, presentó un porcentaje mínimo de células positivas a la cadena pesada de miosina cardíaca (MYH). El fabricante menciona que a los 28 días se observa la fusión de las células y la formación de miotubos, los cuales no se observaron en los cultivos.

La 5-azacitidina es un agente de metilación de DNA. Se desconoce el mecanismo por el cual se ha observado la inducción a la diferenciación en células troncales mesenquimales. La inducción a la diferenciación a cardiomiocitos con 5-azacitidina es controversial. Los primeros estudios demostraron que la 5-azacitidina era un inductor de la diferenciación (Qian *et al.*, 2012; Rangappa *et al.*, 2003; Wenrong Xu *et al.*, 2008); sin embargo, varios grupos de investigación han demostrado que no funciona como inductor de la diferenciación (Kamarul, Wan, Makpol, Sathapan, & Chua, 2012) o que está ocurre sólo en condiciones especiales (Liu *et al.*, 2003). En el experimento con 5-azacitidina observamos que las ASC presentan una eficiencia terminal de diferenciación menor al 6 % sin la inducción con adenovirus recombinantes.

Hasta el momento, los resultados del experimento 2 no son concluyentes, aún están en revisión. Llama la atención la sobreexpresión del gen *MyoD*, ya que este último es un marcador de músculo esquelético. Se hará un nuevo análisis tomando como referencia RNA de corazón de ratas neonatas para los genes de diferenciación temprana (*Gata-4*, *Mef2c* y *Nkx2.5*), ya que estos genes se encuentran con una expresión menor en el tejido adulto y se utilizará RNA de músculo esquelético como referencia para el gen *MyoD*. También estamos a la espera de nuevos *primers* para analizar otros genes involucrados en la diferenciación cardíaca como *Tbx5*, entre otros. Una de las problemáticas que se presenta en el proceso de diferenciación en las células troncales son las diferencias intercelulares de los tiempos de diferenciación, ya que ciertas clonas puede estar en un menor o mayor grado de diferenciación en un mismo cultivo y también ciertas células no están comprometidas a diferenciarse a cardiomiocito. Para el proyecto de Doctorado se tiene contemplado disminuir dicha diferencia al clonar las células con marcadores de diferenciación cardíaca ya sea con Cell Sorting o microesferas con el fin de obtener mayor pureza en el cultivo.

Conclusiones de los resultados obtenidos durante la Maestría

Como hemos observado en los resultados, se diseñó un protocolo de cultivo eficiente y novedoso para la obtención de grandes cantidades de cardiomiocitos inmaduros a partir de ASC y BM-MSC, pero se necesita mayor investigación al respecto para obtener cardiomiocitos maduros. Se demostró que las BM-MSC y ASC tienen capacidad de diferenciarse en cardiomiocitos inmaduros después de la inhibición de la vía de NF- κ B con adenovirus recombinantes combinado con factores específicos con biomatriz cardíaca. A20 parece mejor inductor de la diferenciación que I κ B- α en las ASC (7 días) e I κ B- α parece un mejor inductor de la diferenciación que A20 en las BM-MSC (7 días). La inducción por adenovirus recombinantes puede incrementar la inducción a la diferenciación; sin embargo, no es suficiente para mantener el estado diferenciado.

La diferenciación con medio para diferenciación cardíaca como el CDM no mostró una diferenciación mayor en comparación con el uso de factores de crecimiento específico y/o biomatriz cardíaca; no obstante, no es menos apreciable con respecto a la cantidad de células positivas para Troponina I y MYH. La diferenciación con 5-azacitidina no muestra diferenciación cardíaca en las ASC importante como lo reportado en estudios previos. Algunas limitaciones se encuentran en la heterogeneidad de los cultivos y en el hecho de que no se ha podido obtener una diferenciación a cardiomiocitos maduros. Sin embargo, estas limitantes serán tomadas en cuenta para el proyecto de Doctorado.

Resultados esperados para el proyecto de Doctorado

Se espera obtener el perfil de expresión génica completo del estado indiferenciado de las BM-MSC y ASC, así como conocer cuál es la diferencia molecular que existe entre ellas. También, se espera conocer el perfil de expresión génica completo durante el proceso de diferenciación a cardiomiocito con el fin de identificar genes que puedan ser de relevancia para facilitar la diferenciación a cardiomiocito a partir de las BM-MSC y ASC. Además, se busca obtener un panorama molecular del proceso de diferenciación a cardiomiocito a partir de las BM-MSC y ASC.

En los resultados se deben observar ciertos marcadores de diferenciación cardíaca previamente establecidos en la cardiogénesis como Gata-4, Mef2c, Nkx2.5, Tbx5, Troponina I, Troponina T, α -Mhc, β -Mhc, entre otros (Burrige *et al.*, 2012). La transducción con adenovirus recombinantes con genes que inhiben la vía clásica de NF-KB, modificará la expresión génica durante la inducción a la diferenciación de las BM-MSC y ASC, en comparación a las células sin transducción.

Cronograma de actividades

1° y 2° Semestre: Experimentos de diferenciación cardíaca, obtención de mRNA de alta calidad y síntesis de RNA a cDNA.

3° y 4° Semestre: Microarreglos de expresión (marcaje e hibridación, captura de imagen y procesamiento y normalización de datos).

5° Semestre: Análisis estadístico y análisis de set de genes o Clustering.

6° Semestre: Validación de genes estadísticamente significativos por qRT-PCR.

7° y 8° Semestre: Análisis de resultados y preparación de artículo para publicación.

Referencias bibliográficas

- Afzal, M. R., Haider, H. K., Idris, N. M., Jiang, S., Ahmed, R. P. H., & Ashraf, M. (2010). Preconditioning promotes survival and angiomyogenic potential of mesenchymal stem cells in the infarcted heart via NF-kappaB signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, *12*(6), 693–702. doi:10.1089/ars.2009.2755
- Armstrong, L., Hughes, O., Yung, S., Hyslop, L., Stewart, R., Wappler, I., ... Lako, M. (2006). The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Human Molecular Genetics*, *15*(11), 1894–913. doi:10.1093/hmg/ddl112
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*, *17*(1), 126–40. doi:10.1101/gad.224503
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., ... Hoffman, R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*, *30*(1), 42–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823036>
- Bi, Y., Ehirchiou, D., Kilts, T. M., Inkson, C. A., Embree, M. C., Sonoyama, W., ... Young, M. F. (2007). Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nature Medicine*, *13*(10), 1219–27. doi:10.1038/nm1630
- Boland, G. M., Perkins, G., Hall, D. J., & Tuan, R. S. (2004). Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *93*(6), 1210–30. doi:10.1002/jcb.20284
- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., & Smith, A. (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology*, *210*(1), 30–43. doi:10.1006/dbio.1999.9265
- Burrige, P. W., Keller, G., Gold, J. D., & Wu, J. C. (2012). Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell*, *10*(1), 16–28. doi:10.1016/j.stem.2011.12.013
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, *9*(5), 641–50. doi:10.1002/jor.1100090504
- Castaldo, C., Di Meglio, F., Miraglia, R., Sacco, A. M., Romano, V., Bancone, C., ... Nurzynska, D. (2013). Cardiac fibroblast-derived extracellular matrix (biomatrix) as a model for the studies of cardiac primitive cell biological properties in normal and pathological adult human heart. *BioMed Research International*, *2013*, 352370. doi:10.1155/2013/352370
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *25*(11), 2739–49. doi:10.1634/stemcells.2007-0197

- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, *113*(5), 643–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787505>
- Chang, J., Liu, F., Lee, M., Wu, B., Ting, K., Zara, J. N., ... Wang, C.-Y. (2013). NF- κ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting β -catenin degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(23), 9469–74. doi:10.1073/pnas.1300532110
- Crisan, M., Deasy, B., Gavina, M., Zheng, B., Huard, J., Lazzari, L., & Péault, B. (2008). Purification and long-term culture of multipotent progenitor cells affiliated with the walls of human blood vessels: myoendothelial cells and pericytes. *Methods in Cell Biology*, *86*, 295–309. doi:10.1016/S0091-679X(08)00013-7
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T. S., ... Péault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, *3*(3), 301–13. doi:10.1016/j.stem.2008.07.003
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., & Luyten, F. P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and Rheumatism*, *44*(8), 1928–42. doi:10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., ... Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, *99*(10), 3838–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11986244>
- Dm, C., Sa, F., Sj, B., Doree, C., Mathur, A., & Watt, S. (2012). Stem cell treatment for acute myocardial infarction (Review), (2).
- Donnelly, E. M., Lamanna, J., & Boulis, N. M. (2012). Stem cell therapy for the spinal cord. *Stem Cell Research & Therapy*, *3*(4), 24. doi:10.1186/scri115
- Egashira, T., Yuasa, S., Suzuki, T., Aizawa, Y., Yamakawa, H., Matsuhashi, T., ... Fukuda, K. (2012). Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovascular Research*, *95*(4), 419–29. doi:10.1093/cvr/cvs206
- Fortunel, N. O., Otu, H. H., Ng, H.-H., Chen, J., Mu, X., Chevassut, T., ... Lim, B. (2003). Comment on “ ‘Stemness’: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells” and “a stem cell molecular signature”. *Science (New York, N.Y.)*, *302*(5644), 393; author reply 393. doi:10.1126/science.1086384
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. *Cell Proliferation*, *3*(4), 393–403. doi:10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., & Gerasimov, U. V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Proliferation*, *20*(3), 263–272. doi:10.1111/j.1365-2184.1987.tb01309.x

- Gilbert, L., He, X., Farmer, P., Boden, S., Kozlowski, M., Rubin, J., & Nanes, M. S. (2000). Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology*, *141*(11), 3956–64. doi:10.1210/endo.141.11.7739
- Gimble, J., & Guilak, F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, *5*(5), 362–9. doi:10.1080/14653240310003026
- Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. a. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, *100*(9), 1249–60. doi:10.1161/01.RES.0000265074.83288.09
- Gnecchi, M., Danieli, P., & Cervio, E. (2012). Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascular Pharmacology*, *57*(1), 48–55. doi:10.1016/j.vph.2012.04.002
- Gupta, P. K., Das, A. K., Chullikana, A., & Majumdar, A. S. (2012). Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Research & Therapy*, *3*(4), 25. doi:10.1186/srct116
- Guttridge, D. C., Mayo, M. W., Madrid, L. V., Wang, C. Y., & Baldwin, A. S. (2000). NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science (New York, N. Y.)*, *289*(5488), 2363–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11009425>
- Hernández-Gutierrez, S., García-Peláez, I., Zentella-Dehesa, A., Ramos-Kuri, M., Hernández-Franco, P., Hernández-Sánchez, F., & Rojas, E. (2006). NF-kappaB signaling blockade by Bay 11-7085 during early cardiac morphogenesis induces alterations of the outflow tract in chicken heart. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, *11*(7), 1101–9. doi:10.1007/s10495-006-6984-z
- Igura, K., Zhang, X., Takahashi, K., Mitsuru, A., Yamaguchi, S., & Takashi, T. A. (2004). Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*, *6*(6), 543–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15770794>
- Ii, M., Horii, M., Yokoyama, A., Shoji, T., Mifune, Y., Kawamoto, A., ... Asahara, T. (2011). Synergistic effect of adipose-derived stem cell therapy and bone marrow progenitor recruitment in ischemic heart. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *91*(4), 539–52. doi:10.1038/labinvest.2010.191
- Ivanova, N. B., Dimos, J. T., Schaniel, C., Hackney, J. a, Moore, K. a, & Lemischka, I. R. (2002). A stem cell molecular signature. *Science (New York, N. Y.)*, *298*(5593), 601–4. doi:10.1126/science.1073823
- Javazon, E. H., Beggs, K. J., & Flake, A. W. (2004). Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. *Experimental Hematology*. doi:10.1016/j.exphem.2004.02.004
- Jiang, M., He, B., Zhang, Q., Ge, H., Zang, M. H., Han, Z. H., ... Yin, X. Y. (2010). Randomized controlled trials on the therapeutic effects of adult progenitor cells for myocardial infarction: meta-analysis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *10*(5), 667–80. doi:10.1517/14712591003716437
- Kamarul, W., Wan, Z., Makpol, S., Sathapan, S., & Chua, K. H. (2012). 5-Azacytidine Is Insufficient For Cardiogenesis In Human Adipose-Derived Stem Cells. *Journal of Negative Results in BioMedicine*, *11*(1), 3. doi:10.1186/1477-5751-11-3

- Kelly, D. L., & Rizzino, A. (2000). DNA microarray analyses of genes regulated during the differentiation of embryonic stem cells. *Molecular Reproduction and Development*, 56(2), 113–23. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200006)56:2<113::AID-MRD1>3.0.CO;2-Q
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(5), 1294–301. doi:10.1634/stemcells.2005-0342
- Kerr, M. K., Martin, M., & Churchill, G. a. (2000). Analysis of variance for gene expression microarray data. *Journal of Computational Biology : A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 7(6), 819–37. doi:10.1089/10665270050514954
- Kim, S.-H., Kim, Y.-S., Lee, S.-Y., Kim, K.-H., Lee, Y.-M., Kim, W.-K., & Lee, Y.-K. (2011). Gene expression profile in mesenchymal stem cells derived from dental tissues and bone marrow. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 41(4), 192–200. doi:10.5051/jpis.2011.41.4.192
- Kim, Y., Kang, H., Park, J., Nam, K., & Kwon, H. (n.d.). Upregulation of NF- κ B upon differentiation of mouse embryonic stem cells, 705–709.
- Kléber, M., & Sommer, L. (2004). Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), 681–7. doi:10.1016/j.ceb.2004.08.006
- Kronenberg, H. (2009). Adult mesenchymal stem cells. *StemBook*, 1–12. doi:10.3824/stembook.1.38.1
- Laflamme, M. a, & Murry, C. E. (2005). Regenerating the heart. *Nature Biotechnology*, 23(7), 845–56. doi:10.1038/nbt1117
- Lara-Martínez, L. A., Navarro-Betancourt, J. R., & Hernández-Gutiérrez, S. (2012). Terapia celular y regeneración cardíaca: ¿Dónde estamos? *Revista Mexicana de Cardiología*, 23(2), 72–79. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-21982012000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Léobon, B., Roncalli, J., Joffre, C., Mazo, M., Boisson, M., Barreau, C., ... Casteilla, L. (2009). Adipose-derived cardiomyogenic cells: in vitro expansion and functional improvement in a mouse model of myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 83(4), 757–67. doi:10.1093/cvr/cvp167
- Liu, Y., Song, J., Liu, W., Wan, Y., Chen, X., & Hu, C. (2003). Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? *Cardiovascular Research*, 58(2), 460–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12757880>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Luria, E. A., Owen, M. E., Friedenstein, A. J., Morris, J. F., & Kuznetsow, S. A. (1987). Bone formation in organ cultures of bone marrow. *Cell and Tissue Research*, 248(2). doi:10.1007/BF00218212
- Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., ... Ogawa, S. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(5), 697–705. doi:10.1172/JCI5298

- Menasché, P. (2008). Skeletal myoblasts and cardiac repair. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45(4), 545–53. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.11.009
- Menssen, A., Häupl, T., Sittinger, M., Delorme, B., Charbord, P., & Ringe, J. (2011). Differential gene expression profiling of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during adipogenic development. *BMC Genomics*, 12(1), 461. doi:10.1186/1471-2164-12-461
- Metcalf, D. (2003). The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 21(1), 5–14. doi:10.1634/stemcells.21-1-5
- Mitchell, J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., ... Gimble, J. M. (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(2), 376–85. doi:10.1634/stemcells.2005-0234
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., ... Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), 631–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787504>
- Mohsin, S., Siddiqi, S., Collins, B., & Sussman, M. A. (2011). Empowering adult stem cells for myocardial regeneration. *Circulation Research*, 109(12), 1415–28. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243071
- Mourkioti, F., Kratsios, P., Luedde, T., Song, Y.-H., Delafontaine, P., Adami, R., ... Rosenthal, N. (2006). Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 2945–54. doi:10.1172/JCI28721
- Murakami, S., Lefebvre, V., & de Crombrughe, B. (2000). Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3687–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10652367>
- Nakanishi, C., Nagaya, N., Ohnishi, S., Yamahara, K., Takabatake, S., Konno, T., ... Yamagishi, M. (2011). Gene and Protein Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells Derived From Rat Adipose Tissue and Bone Marrow. *Circulation Journal*, 75(9), 2260–2268. doi:10.1253/circj.CJ-11-0246
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., & Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & Development*, 12(13), 2048–60. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=316954&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Niwa, H., Miyazaki, J., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24(4), 372–6. doi:10.1038/74199
- Park, I., Qian, D., Kiel, M., Becker, M. W., Pihalja, M., Weissman, I. L., ... Clarke, M. F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*, 423(6937), 302–5. doi:10.1038/nature01587
- Pittenger, M. F., Mackay, a M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ... Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), 143–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102814>
- Poss, K. D., Wilson, L. G., & Keating, M. T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5601), 2188–90. doi:10.1126/science.1077857

- Qian, Q., Qian, H., Zhang, X., Zhu, W., Yan, Y., Ye, S., ... Xu, W. (2012). 5-Azacytidine induces cardiac differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by activating extracellular regulated kinase. *Stem Cells and Development*, 21(1), 67–75. doi:10.1089/scd.2010.0519
- Ramalho-Santos, M., Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R. C., & Melton, D. a. (2002). "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5593), 597–600. doi:10.1126/science.1072530
- Rangappa, S., Fen, C., Lee, E. H., Bongso, A., Sim, E. K. W., & Wei, E. K. S. (2003). Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *The Annals of Thoracic Surgery*, 75(3), 775–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12645692>
- Rao, M. (2012). Stem cells and regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 3(4), 27. doi:10.1186/scrt118
- Robert, J. S. (2004). Model systems in stem cell biology. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 26(9), 1005–12. doi:10.1002/bies.20100
- Ruland, J. (2011). Return to homeostasis: downregulation of NF- κ B responses. *Nature Immunology*, 12(8), 709–14. doi:10.1038/ni.2055
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5235), 467–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7569999>
- Schugar, R. C., Robbins, P. D., & Deasy, B. M. (2008). Small molecules in stem cell self-renewal and differentiation. *Gene Therapy*, 15(2), 126–35. doi:10.1038/sj.gt.3303062
- Shembade, N., Ma, A., & Harhaj, E. W. (2010). Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5969), 1135–9. doi:10.1126/science.1182364
- Shi, S., & Gronthos, S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 18(4), 696–704. doi:10.1359/jbmr.2003.18.4.696
- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3(1), Article3. doi:10.2202/1544-6115.1027
- Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., ... Hedrick, M. H. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio Journal of Medicine*, 54(3), 132–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483444>
- Sulser, T., & Eberli, D. (2010). Adipose-Derived Stem Cells (ASCs).
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024

- Tatsumi, T., Ashihara, E., Yasui, T., Matsunaga, S., Kido, A., Sasada, Y., ... Matsubara, H. (2007). Intracoronary transplantation of non-expanded peripheral blood-derived mononuclear cells promotes improvement of cardiac function in patients with acute myocardial infarction. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 71(8), 1199–207. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17652881>
- Thaloor, D., Miller, K. J., Gephart, J., Mitchell, P. O., & Pavlath, G. K. (1999). Systemic administration of the NF-kappaB inhibitor curcumin stimulates muscle regeneration after traumatic injury. *The American Journal of Physiology*, 277(2 Pt 1), C320–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10444409>
- Tsai, M.-S., Lee, J.-L., Chang, Y.-J., & Hwang, S.-M. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(6), 1450–6. doi:10.1093/humrep/deh279
- Tuan, R. S., Boland, G., & Tuli, R. (2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering, 5(1). doi:10.1186/ar614
- Van der Spoel, T. I. G., Jansen of Lorkeers, S. J., Agostoni, P., van Belle, E., Gyöngyösi, M., Sluijter, J. P. G., ... Chamuleau, S. a J. (2011). Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovascular Research*, 91(4), 649–58. doi:10.1093/cvr/cvr113
- Vereecke, L., Beyaert, R., & van Loo, G. (2009). The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends in Immunology*, 30(8), 383–91. doi:10.1016/j.it.2009.05.007
- Wagers, A. J., & Weissman, I. L. (2004). Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell*, 116(5), 639–648. doi:10.1016/S0092-8674(04)00208-9
- Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., ... Dixit, V. M. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, 430(7000), 694–9. doi:10.1038/nature02794
- Xu, W. (2013). Tissue induction, the relationship between biomaterial's microenvironment and mesenchymal stem cell differentiation. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 06(01), 85–91. doi:10.4236/jbise.2013.61011
- Xu, W., Zhang, X., Qian, H., Zhu, W., Sun, X., Hu, J., ... Chen, Y. (2008). *Experimental Biology and Medicine*.
- Zandstra, P. W., & Nagy, A. (2001). Stem cell bioengineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 3, 275–305. doi:10.1146/annurev.bioeng.3.1.275
- Zaragosi, L.-E., Ailhaud, G., & Dani, C. (2006). Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(11), 2412–9. doi:10.1634/stemcells.2006-0006
- Zhang, G., Shang, B., Yang, P., Cao, Z., Pan, Y., & Zhou, Q. (2012). Induced pluripotent stem cell consensus genes: implication for the risk of tumorigenesis and cancers in induced pluripotent stem cell therapy. *Stem Cells and Development*, 21(6), 955–64. doi:10.1089/scd.2011.0649

Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., ... Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279–95. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105

ANEXO.

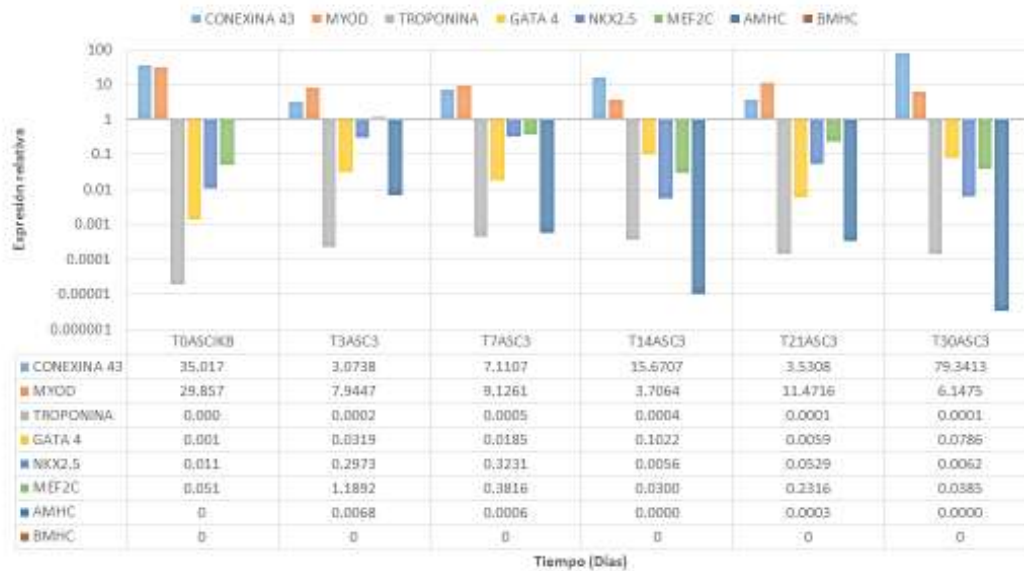
Gráfica 11. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardíaca #2 en ASC, condición 1 (Control, sólo células).



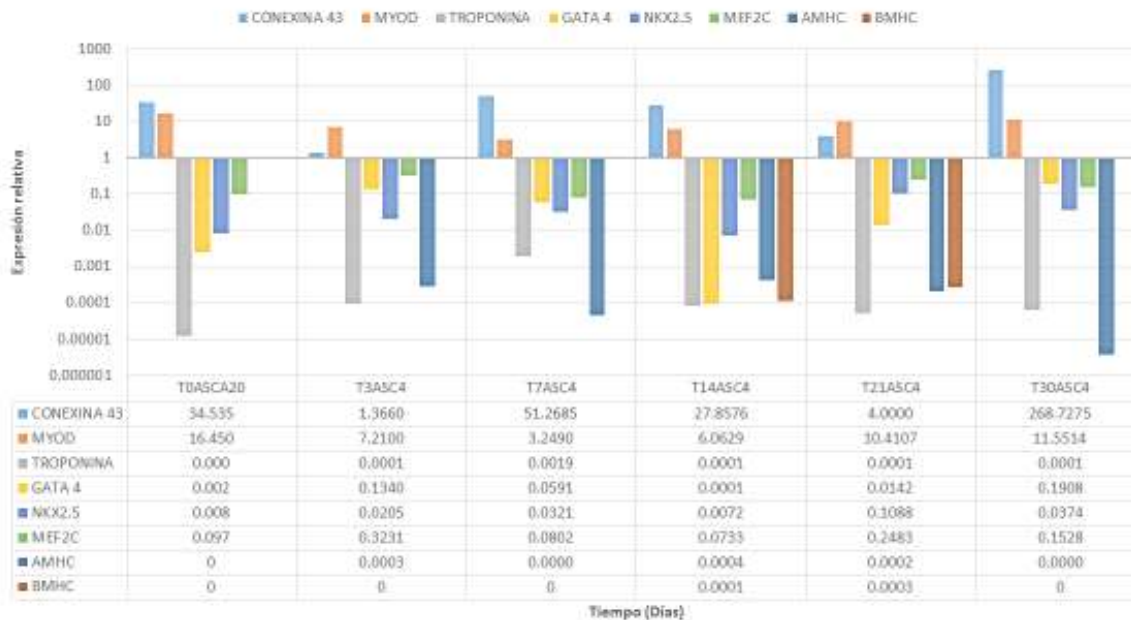
Gráfica 12. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardíaca #2 en ASC, condición 2 (ASC + Factores de crecimiento).



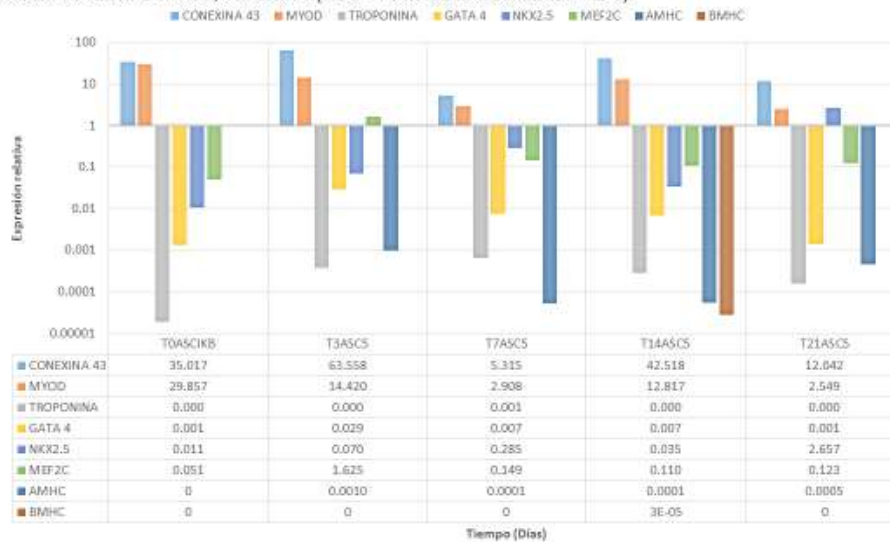
Gráfica 13. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardiaca #2 en ASC, condición 3 (ASC + *IkB-α*).



Gráfica 14. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardiaca #2 en ASC, condición 4 (ASC + A20).



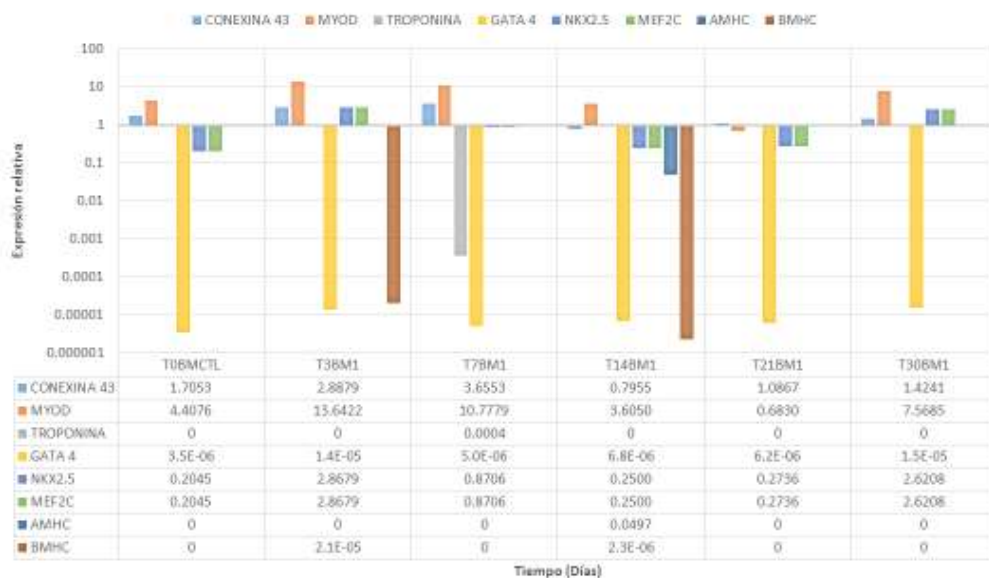
Gráfica 15. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardiaca #2 en ASC, condición 5 (ASC + Factores de crecimiento + *IkB- α*).



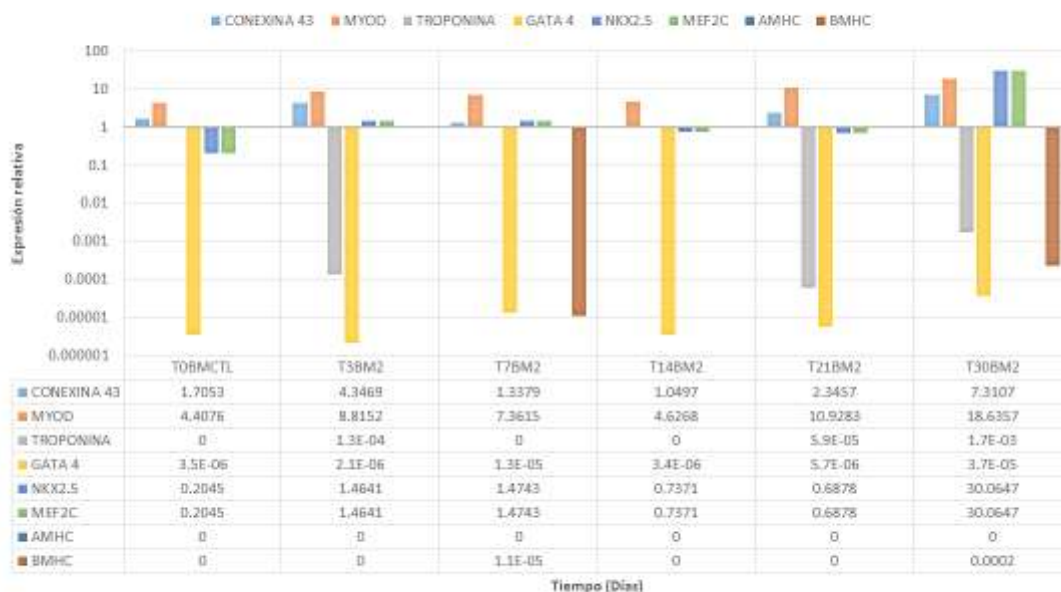
Gráfica 16. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardiaca #2 en ASC, condición 6 (ASC + Factores de crecimiento + *A20*).



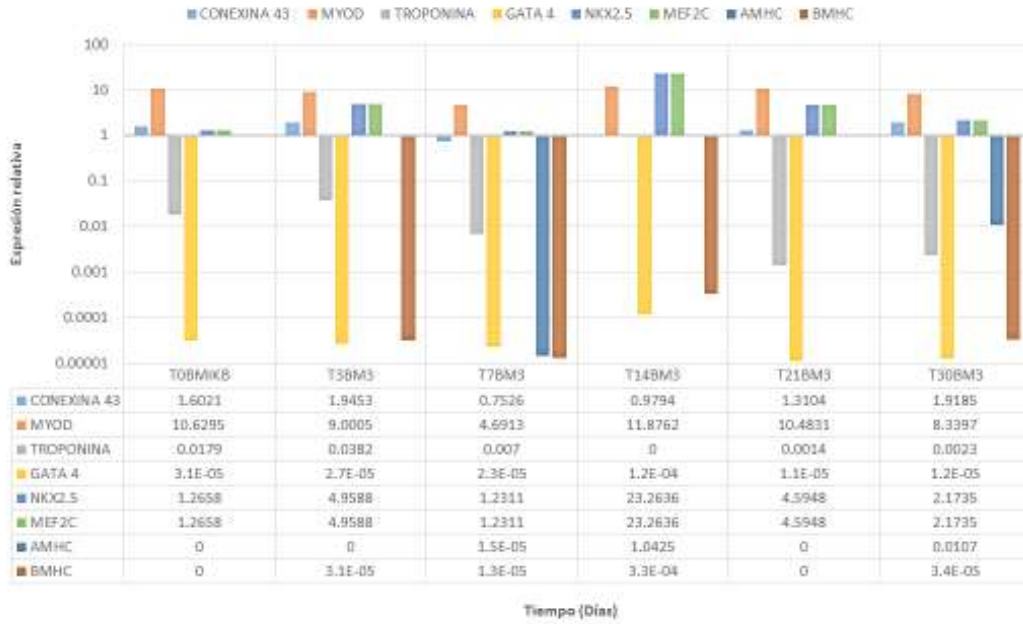
Gráfica 17. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardíaca #2 en BM-MSc, condición 1 (Control, sólo células).



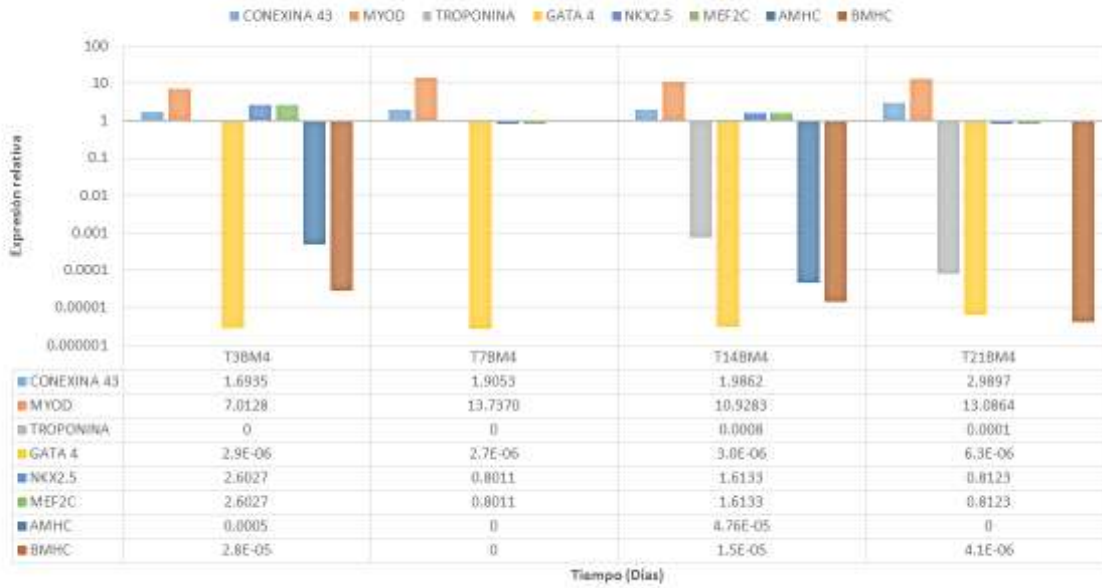
Gráfica 18. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardíaca #2 en BM-MSc, condición 2 (BM-MSc + Factores de crecimiento).



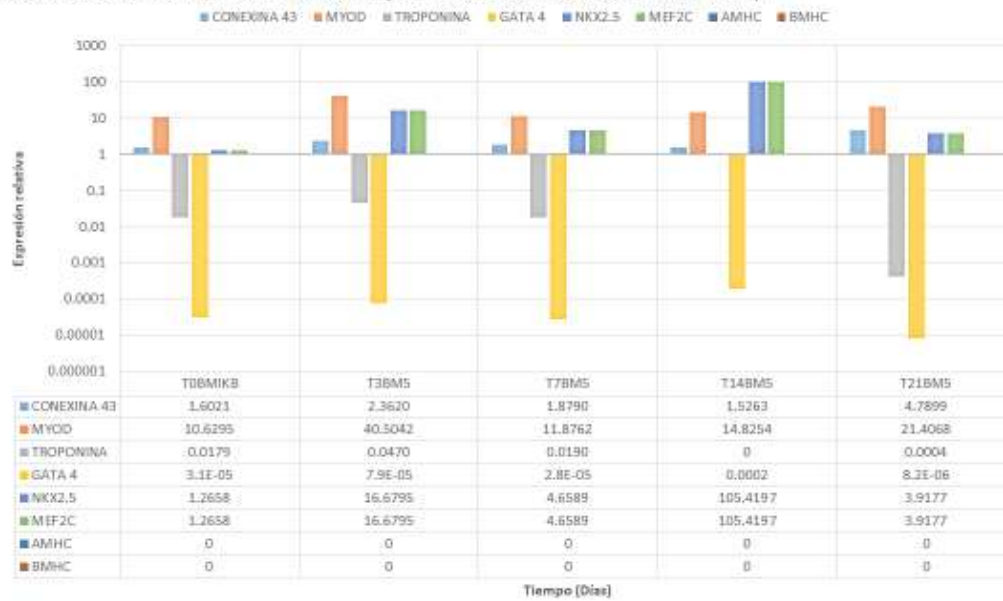
Gráfica 19. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardíaca #2 en BM-MSC, condición 3 (BM-MSC + *tkB-a*).



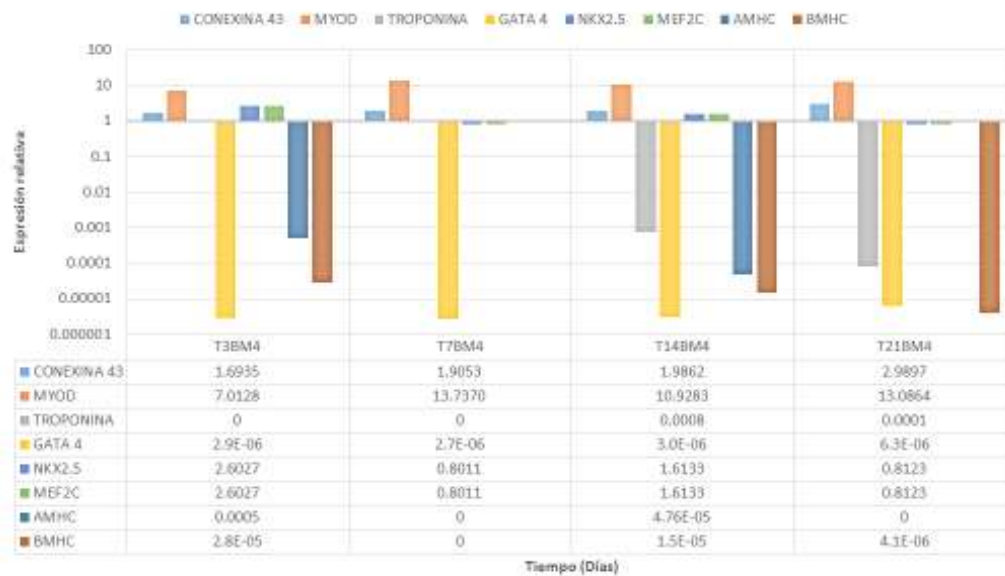
Gráfica 20. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardíaca #2 en BM-MSC, condición 4 (BM-MSC + A20).



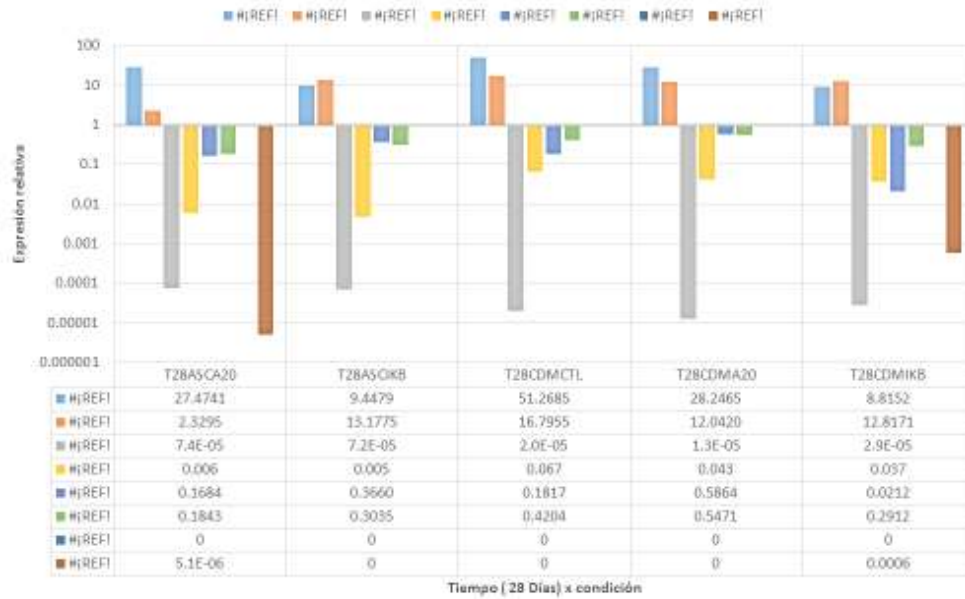
Gráfica 21. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardíaca #2 en BM-MSC, condición 5 (BM-MSC + Factores de crecimiento + $1\alpha B-\alpha$).



Gráfica 22. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardíaca #2 en BM-MSC, condición 6 (BM-MSC + Factores de crecimiento + A20).



Gráfica 23. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardiaca #3 en ASC con medio especial CDM.



Gráfica 24. Expresión Relativa de *Conexina 43*, *MyoD*, *Troponina T*, *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *a-Mhc* y *b-Mhc* del experimento de diferenciación cardiaca #1 en BM-MSC y ASC.

