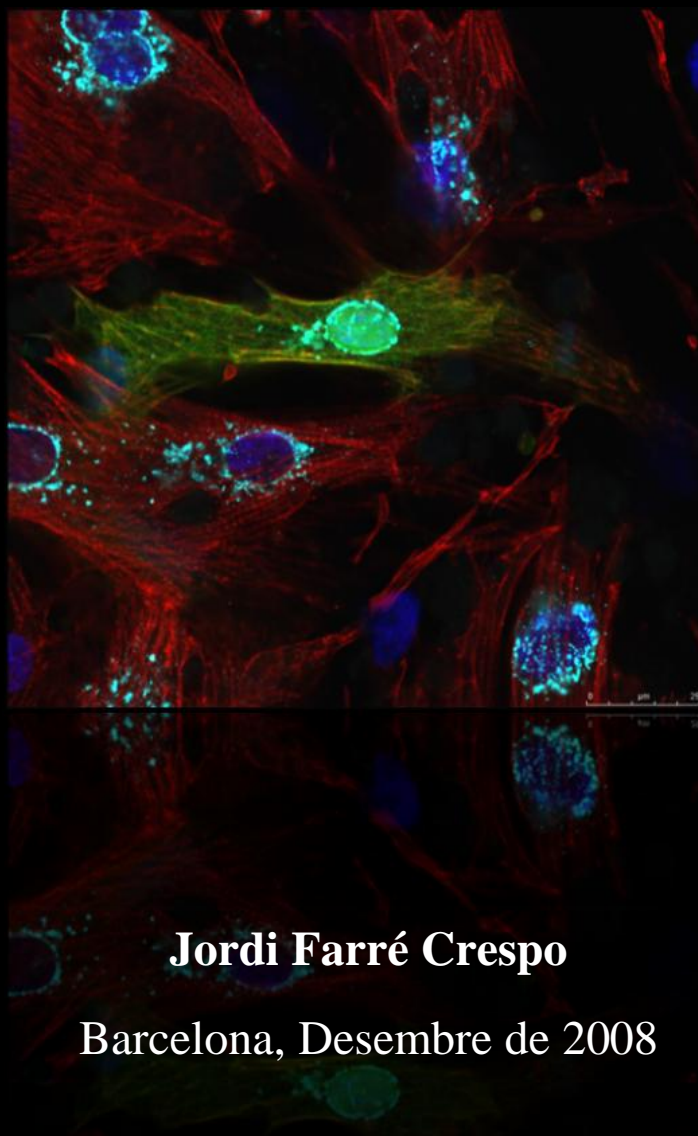




Universitat Autònoma de Barcelona

Departament d'Enginyeria Química

Cèl·lules mare mesenquimals humanes: aïllament, caracterització i potencialitat per a la regeneració cardíaca



Jordi Farré Crespo

Barcelona, Desembre de 2008

Programa de Doctorat en Biotecnologia
Tesi per optar al grau de Doctor per la
Universitat Autònoma de Barcelona



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament d'Enginyeria Química

Cèl·lules mare mesenquimals humanes:
aïllament, caracterització i potencialitat per
a la regeneració cardíaca

Jordi Farré Crespo

Barcelona, desembre de 2008

Programa de Doctorat en Biotecnologia
Tesi per optar al grau de Doctor per la
Universitat Autònoma de Barcelona



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament d'Enginyeria Química

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria

Memòria presentada per Jordi Farré Crespo per optar al grau de Doctor en Biotecnologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquest treball ha estat realitzat al Departament d'Enginyeria Química (ETSE) de la Universitat Autònoma de Barcelona i al Institut de Ciències Cardiovasculars de Catalunya (ICCC-CSIC-UAB), sota la direcció dels Doctors Francesc Gòdia Casablanca, Antoni Bayés Genís i Santiago Roura Ferrer.

Director

Co-director

Francesc Gòdia Casablanca

Antoni Bayés Genís

Co-director

L'interessat

Santiago Roura Ferrer

Jordi Farré Crespo

Barcelona, desembre de 2008

Koloreak preso bizi dira egunez hala ere gauez, ihes egiten dute hegan eta lo dagoen jendearen ametsetan sartzen dira, ordu batzuetan besterik ez bada ere, libre bizitzeko. Hargatik izaten dira ametsak hain bizi. Egunak ez du oraindik argitu baina oskarbi dago zerua. Pentsa, inor gutxik daukala bere herriaren egunsentiaz gozatzeko aukerarik ireki ba begiak jaiotzean dagoen egun berrirako, jarri gaitezen zirrikitutik harago begira, sarrailatik haragoko argira, gure bidean.

“Els colors viuen presos de dia però de nit, s’escapen volant i entren en els somnis de la gent dormida, per viure en llibertat, com a mínim durant unes hores. Per això, els somnis són tant vius. Encara no s’ha fet de dia, però el cel és clar. Pensa, que pocs tenen l’oportunitat de gaudir de l’alba del seu poble, obre bé els ulls al dia que està a punt de néixer, posem-nos a mirar més enllà de l’escletxa, a la llum de l’altra banda del pany, en el nostre camí.”

Sarraila (“Pany”), Kenzazpi

ÍNDEX

Índex	1
Abreviacions	7
Resum	13
Introducció	17
1. Desenvolupament, estructura i funció del cor	20
2. El cor humà: un òrgan diferenciat	24
3. Infart agut de miocardi	26
3.1. Epidemiologia i problemàtica social del infart agut de miocardi.....	26
3.2. Fisiopatologia i manifestacions clíniques de l'IAM.....	28
3.3. Tractament actual de l'IAM.....	30
3.3.1. Tractament mèdic i mitjançant cateterisme.....	30
3.3.2. Tractaments quirúrgics.....	32
4. Teràpia cel·lular	33
5. Cèl·lules mare: tipus i propietats	35
5.1. Cèl·lules mare embrionàries.....	36
5.2. Cèl·lules mare adultes.....	38
5.2.1. Mioblasts (múscul esquelètic).....	38
5.2.2. Cèl·lules mare cardíques (miocardi).....	39
5.2.3. Cèl·lules mare mononucleades (moll d'os).....	41
5.2.4. Cèl·lules progenitores endotelials (sang perifèrica).....	44
6. Cèl·lules mare mesenquimals	45
6.1. Cèl·lules mare derivades de teixit adipós.....	48
6.1.1. AIPC derivades de greix subcutani.....	49
6.1.2. Greix epicàrdic.....	50
Hipòtesi i objectius	53
Materials i mètodes	57
EXPERIMENTACIÓ IN VITRO	59
1. Aïllament i cultiu cel·lular	59
1.1. Cèl·lules mare mesenquimals derivades de moll d'os.....	59
1.2. Cèl·lules derivades de teixit adipós.....	60
1.3. Cultiu cel·lular.....	61
2. Assaig de clonogenicitat	62
3. Anàlisi d'expressió gènica	62
3.1. RT-PCR a temps real.....	62

4. Anàlisi d'expressió proteica	65
4.1. Citometria de flux	65
4.2. <i>Western-blot</i>	66
4.2.1. Obtenció d'extractes proteics a partir d'un cultiu cel·lular	66
4.2.1.1. Proteïna total	66
4.2.1.2. Proteïnes nuclears.....	67
4.2.2. Obtenció d'extractes proteics totals a partir de mostres de teixit.....	68
4.2.3. Quantificació de proteïna total d'una mostra	69
4.2.4. <i>Western-blot</i>	69
4.3. Immunocitofluorescència.....	75
4.4. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en les tècniques de <i>western-blot</i> i immunocitofluorescència	76
4.5. Anàlisi de secreció de citoquines en sobrenedants	77
5. Assaigs de diferenciació.....	78
5.1. Diferenciació adipogènica.....	78
5.2. Diferenciació osteogènica	79
5.3. Diferenciació cardiomiogènica	81
5.3.1. Agent químic: 5-azacitidina	81
5.3.2. Cocultiu amb cardiòcits de rata nounada	82
5.3.2.1. Extracció de cardiòcits de rata nounada.....	82
5.3.2.2. Transducció de les epiATPC amb lentivirus-eGFP	85
5.4. Diferenciació endotelial	85
EXPERIMENTACIÓ <i>IN VIVO</i>	89
6. Models <i>in vivo</i> d'infart de miocardi	89
6.1. Procediment quirúrgic per al model en ratolí.....	90
6.2. Procediment quirúrgic per al model en rata	92
6.3. Cirurgia aguda terminal	92
7. Anàlisi funcional: ecocardiografia	93
8. Anàlisi morfomètrica: tricròmica de Masson	94
8.1. Ratolí.....	94
8.2. Rata	95
8.3. Tricròmica de Masson.....	95
9. Densitat vascular: tinció amb lectina GSLI B4.....	97
9.1. Tinció amb lectina GSLI B4	98

10. Immunohistoquímica en teixit cardíac de rata.....	99
11. Tractament estadístic i anàlisi de dades.....	100
Resultats	103
1. Cèl·lules mare mesenquimals derivades de moll d'os.....	106
1.1. Aïllament i cultiu	106
1.2. Anàlisi de marcadors de superfície mitjançant citometria de flux.....	106
1.3. Determinació de la concentració cel·lular inicial òptima i del temps de duplicació.....	108
1.4. Anàlisi de la capacitat pluripotencial de les MSC humanes	111
1.5. Estudi del potencial cardiogènic de les MSC humanes	112
1.5.1. Anàlisi de l'expressió basal de marcadors cardíacs.....	112
1.5.2. Diferenciació cardiogènica de les MSC humanes: tractament amb 5-aza	115
2. Cèl·lules mare derivades de teixit adipós subcutani.....	117
2.1. Aïllament i cultiu	117
2.2. Anàlisi de marcadors de superfície mitjançant citometria de flux.....	117
2.3. Determinació del temps de duplicació	119
2.4. Anàlisi de la pluripotencialitat de les subATPC	120
2.5. Anàlisi de l'expressió basal de marcadors cardíacs en les subATPC	121
3. Cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós epicàrdic	123
3.1. Aïllament, cultiu i clonogenicitat.....	124
3.2. Anàlisi de marcadors de superfície mitjançant citometria de flux.....	124
3.3. Determinació del temps de duplicació	126
3.4. Anàlisi de la pluripotencialitat de les epiATPC.....	127
3.5. Estudi del potencial cardiogènic de les epiATPC.....	128
3.5.1. Anàlisi de l'expressió basal de marcadors cardíacs.....	128
3.5.2. Diferenciació cardiogènica de les epiATPC: cocultiu amb cardiòcits de rata neonatal	130
3.6. Diferenciació endotelial de les epiATPC.....	132
3.6.1. Assaig angiogènic funcional: tubulogènesi en Matrigel.....	134
3.7. Anàlisi de la secreció de factors proangiogènics	136
3.8. Injecció de les epiATPC en dos models d'infart <i>in vivo</i>	138
3.8.1. Model d'infart en ratolí C3H-SCID	138
3.8.1.1. Anàlisi morfomètrica	138

3.8.1.2. Anàlisi de la densitat vascular	140
3.8.2. Model d'infart en rata NIH-Foxn1 ^{tmu}	141
3.8.2.1. Anàlisi morfològica	141
3.8.2.2. Estudi de la funció cardíaca mitjançant ecocardiografia	142
3.8.2.3. Identificació intramiocàrdica de les cèl·lules injectades.....	143
<i>Discussió</i>	145
<i>Conclusions</i>	161
<i>Apèndix I: Descripció dels marcadors de superfície analitzats</i>	165
<i>Apèndix II: Descripció dels marcadors cardíacs analitzats</i>	171
<i>Apèndix III: Descripció dels marcadors endotelials analitzats</i>	177
<i>Apèndix IV: Descripció dels factors proangiogènics analitzats</i>	183
<i>Bibliografia</i>	187
<i>Agraïments</i>	209
<i>Publicacions</i>	215

ABREVIACIONES

5-aza	5-azacitidina
Ab	anticòs
α-MEM	medi mínim essencial d'Alfa
ATPC	cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós
BDM	monoxima 2,3-butanediona
bFGF	factor de creixement fibroblàstic bàsic
BSA	albúmina sèrica bovina
β-MHC	cadena pesada de la β -miosina
CD	grup de diferenciació
CDMO	cèl·lules mononucleades derivades de moll d'os
cDNA	àcid desoxiribonucleic complementari
CGPA	canvis en el gruix de la paret anterior
CM	cèl·lules mare
CMC	cèl·lules mare cardíques
CPE	cèl·lules progenitores endotelials
cTnI	troponina I cardíaca
Cx-43	connexina-43
Cy2	cianina 2
Cy3	cianina 3
Cy5	cianina 5
DAPI	diclorohidrat de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	àcid desoxiribonucleic
DTT	ditiotreitòl
ECA	enzim convertidor de l'angiotensina
EDTA	àcid etilendiaminotetracètic
EGF	factor de creixement epidèrmic
EGR	factor de resposta de creixement primerenc
EGTA	àcid etilenglicol tetracètic
epiATPC	cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós epicàrdic

FBS	sèrum fetal boví
FE	fracció d'ejecció
FGF	factor de creixement fibroblàstic
FITC	isotiocianat de fluoresceïna
FS	fracció d'escurçament
GAPDH	gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa
G-CSF	factor estimulator de colònies de granulòcits
GFP	proteïna verda fluorescent
HBSS	solució salina equilibrada de Hanks
HEPES	àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetansulfònic
HGF	factor de creixement d'hepatòcits
HLA	antígens leucocitaris humans
HRP	peroxidasa del rave
HS	sèrum de cavall
HUVEC	cèl·lules endotelials de la vena umbilical humana
IAM	infart agut de miocardi
ICC	insuficiència cardíaca congestiva
IF	immunocitofluorescència
IGF	factor de creixement de la insulina
IL-1β	interleuquina 1 β
IL-6	interleuquina 6
Isl-1	islet-1
LDL	lipoproteïna de baixa densitat
MHC	cadena pesada de la miosina
MMP	metal·loproteïnasa de matriu
mRNA	àcid ribonucleic missatger
MSC	cèl·lules mare mesenquimals
NGS	sèrum normal de cabra
O/N	<i>overnight</i>

PBS	solució amortidora de fosfat
PDGF_{BB}	factor de creixement derivat de plaquetes-BB
PE	ficoeritrina
PFA	paraformaldehid
PMSF	fluorur de fenil-metil-sulfonil
P/S	penicil·lina/estreptomicina
PVDF	difluorur de polivinil
RNA	àcid ribonucleic
RT-PCR	reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció reversa
rVEGF-2	receptor del factor de creixement de l'endoteli vascular-2
SCF	factor de cèl·lules mare
SDF	factor derivat de cèl·lules estromals
SDS	dodecil sulfat de sodi
SERCA-2	ATPasa 2 del calci del reticle sarco/endoplasmàtic
subATPC	cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós subcutani
TBS	solució salina amortidora de tris
Tris	tris(hidroximetil)aminoetà
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TGF-β	factor transformador- β
TnC	subunitat C de la troponina
TNF-α	factor de necrosi tumoral- α
TnI	subunitat I de la troponina
TnT	subunitat T de la troponina
tPA	activador del plasminogen tissular
VEGF	factor de creixement de l'endoteli vascular
vWF	factor von Willebrand

“Ciència és tot allò sobre el
qual sempre es pot discutir”

José Ortega i Gasset

RESUM

La insuficiència cardíaca congestiva és una epidèmia creixent a nivell mundial. Les causes principals de la insuficiència cardíaca estan relacionades amb el dany irreversible que resulta d'un infart de miocardi. El cor humà té una capacitat de regeneració limitada, i la pèrdua de múscul, juntament amb la contracció i la fibrosi de la cicatriu miocàrdica, posen en joc un conjunt d'esdeveniments anomenats *remodelat ventricular*, que finalment tendeixen cap a una insuficiència cardíaca congestiva.

En l'actualitat no hi ha cap tractament o procediment clínic, amb excepció del trasplantament cardíac, que substitueixi la cicatriu de l'infart per teixit contràctil funcional. Recentment, la identificació de diferents tipus de cèl·lules mare capaces de contribuir a la regeneració dels teixits ha generat un notable interès en la possibilitat que la teràpia cel·lular pugui ser utilitzada per reparar el miocardi danyat (cardiomioplàstia cel·lular). No obstant això, es desconeix encara quin és el tipus cel·lular ideal per a la cardiomioplàstia cel·lular.

Tradicionalment, es pensava que les cèl·lules mare pròpies d'un teixit adult només podien diferenciar-se cap a cèl·lules del teixit d'origen. Recentment, però, un conjunt d'estudis han demostrat que les cèl·lules mare adultes poden diferenciar-se cap a llinatges diferents als del seu teixit d'origen exhibint una plasticitat que ha estat anomenada *transdiferenciació*. Les cèl·lules mare mesenquimals són unes cèl·lules no hematopoètiques que típicament s'han aïllat del moll d'os però que més endavant s'ha demostrat que resideixen virtualment en tots els teixits. La seva accessibilitat, capacitat proliferativa, potencial de diferenciació i perfil immunològic fan que les cèl·lules mare mesenquimals adultes siguin un candidat principal per l'aplicació en teràpia regenerativa.

En aquesta tesi hem aïllat i estudiat tres tipus de cèl·lules mare d'origen mesenquimal de tres teixits diferents, el moll d'os, el teixit adipós subcutani i el teixit adipós epicàrdic. Tots ells s'han caracteritzat *in vitro* i se n'ha estudiat la velocitat de creixement, la seva expressió de marcadors de superfície i la seva capacitat pluripotencial vers els llinatges adipogènica i osteogènica. La recerca en aquesta tesi però, s'ha centrat en el seu potencial per a la regeneració cardiovascular. Per aquest motiu es va estudiar el potencial cardiomiogènica mitjançant l'anàlisi de l'expressió basal de marcadors característicament cardíacs i la seva capacitat de diferenciació cap a cardiòcits. Dels resultats obtinguts en aquesta primera fase *in vitro* vam concloure que

les cèl·lules progenitores derivades de greix epicàrdic (epiATPC), unes cèl·lules no descrites fins ara, eren el candidat cel·lular ideal per a l'estudi del seu potencial de regeneració del miocardi infartat *in vivo*. Per aquest motiu, es va estudiar l'efecte de les epiATPC trasplantades en dos models animals d'infart de miocardi en els quals es va observar una notable millora del miocardi infartat a nivell histològic i de funció.

En conclusió, les epiATPC són una font cel·lular alternativa per a la cardiomioplàstia cel·lular, com ho demostra la seva capacitat de diferenciació cap a cardiòcit i cèl·lula endotelial, així com la millora de la funció cardíaca observada en els dos models d'infart agut de miocardi estudiats en aquest treball.

“Cap pessimista va descobrir mai
el secret de les estrelles,
o va explorar una terra no cartografiada,
o va obrir un nou cel per a l'esperit humà.”

Hellen Keller

INTRODUCCIÓ

Tot i els avenços farmacològics i en estratègies de revascularització coronària, el conjunt de les malalties cardiovasculars, que inclou l'infart agut de miocardi (IAM) i la insuficiència cardíaca congestiva (ICC), representen la principal causa de mort en els països desenvolupats (16,7 milions de morts anualment segons la OMS l'any 2004)¹.

El cor és un òrgan amb una limitada capacitat de regeneració, principalment deguda a la incapacitat de les cèl·lules musculars cardíques (cardiòcits) adultes de reentrar de forma rutinària al cicle cel·lular i proliferar. El dany irreversible es dona ben aviat en el decurs del IAM, i el nombre absolut de cardiòcits perduts serà el principal determinant de la funció cardíaca postinfart i del pronòstic del malalt. Tot i les dades publicades recentment que documenten l'observació de cardiòcits en mitosi després d'un dany miocàrdic, la freqüència és tan baixa que fa difícil pensar que tinguin un paper principal en la reparació del miocardi. És més, en la ICC i després d'un infart agut, l'augment compensatori principal en la massa miocàrdica es produeix fruit d'una hipertròfia més que pel fenomen de divisió cel·lular^{2,3}.

Tradicionalment, l'única teràpia adreçada a solucionar el problema fonamental de la ICC, la pèrdua de cardiòcits, ha estat el trasplantament de cor, tractament que està molt limitat per l'escàs nombre de donants. Aquest concepte podria canviar amb el descobriment, estudi i primers assaigs clínics basats en l'ús de cèl·lules mare i progenitores que han permès l'establiment de les bases d'un nou i eficaç tractament per al conjunt de malalties cardíques: la cardiomioplàstia cel·lular.

El primer objectiu que persegueix la investigació bàsica en el camp de la cardiomioplàstia és trobar el tipus cel·lular més adequat per la seva aplicació en els futurs protocols de regeneració cardíaca. Idealment, aquest tipus cel·lular s'expandiria de forma eficient en cultiu, i quan es trasplantés regeneraria el teixit miocàrdic infartat, incloent-hi diferenciació cardiogènica amb angiogènesi local.

Les cèl·lules mare embrionàries són una font cel·lular atractiva atès el seu potencial proliferatiu i de diferenciació. No obstant això, aquest tipus de cèl·lules són al·logèniques i obligaria als pacients trasplantats a prendre immunosupressors durant tota la seva vida, tenen el potencial de desenvolupar teratocarcinomes, el seu ús comporta problemes ètics i el seu estudi està prohibit en determinats països com Àustria i Polònia, entre d'altres. Per totes aquestes limitacions, els estudis en cardiomioplàstia cel·lular s'han decantat per l'ús de les cèl·lules progenitores o mare adultes.

Dins del conjunt de cèl·lules mare adultes, les més estudiades per la seva aplicació al cor han estat els mioblasts esquelètics, les cèl·lules mare cardíques o cardioblasts, les cèl·lules mononucleades de moll d'os, les cèl·lules progenitores endotelials i les cèl·lules mare mesenquimals de diverses fonts. En el seu extens estudi *in vitro*, el conjunt d'aquestes cèl·lules han donat resultats variables, però, malgrat tot, força prometedors. A més, la seva implantació en models animals d'infart de miocardi ha demostrat una certa recuperació de la funció cardíaca i constitueix la denominada “prova de concepte” de la capacitat de diferenciació cap a cardiòcit i cèl·lula endotelial, ja que aconsegueix regenerar i revascularitzar part de la zona afectada del miocardi.

Aquestes observacions han permès el pas d'aquesta primera fase experimental a la clínica, on s'han portat a terme multitud d'assaigs en pacients amb IAM, els quals han demostrat que es tracta d'una teràpia segura i que aconsegueix, en la majoria de pacients, només una modesta recuperació de la funció cardíaca.

Tot i així, resten moltes preguntes que cal respondre per poder-ne assolir l'aplicació clínica generalitzada. Quin és el llinatge de progenitors més adient? Com i en quin moment després de produir-se el dany miocàrdic s'han d'implantar? Quantes cèl·lules s'han de trasplantar? A més, cal conèixer en detall conceptes relacionats amb l'aïllament, l'expansió *in vitro*, la supervivència, les propietats biològiques i la diferenciació de les cèl·lules mare o progenitores cap un cardiòcit plenament funcional.

Alguns d'aquests conceptes s'han estudiat en el treball que es presenta en aquesta tesi doctoral i que es descriu a continuació.

1. Desenvolupament, estructura i funció del cor

El cor és el primer òrgan que esdevé funcional durant el desenvolupament embrionari, atesa la necessitat de nodrir l'embrió mentre el seu sistema cardiovascular es desenvolupa i madura. Al llarg del seu desenvolupament seran necessaris processos morfogenètics complexos, expressió gènica diferencial, proliferació cel·lular, diferenciació, migració i canvis morfològics que s'hauran de coordinar per produir un cor multicambra.

Les cèl·lules que han de formar el cor es determinen al mesoderm anterior durant la gastrulació, i migren i formen les dues crestes precordíiques (figura 1a)^{4, 5}. Aquí reben un conjunt de senyals de l'endoderma anterior i l'ectoderma que indueixen el programa regulatori cardíac primerenc, que està regulat pels factors de transcripció Nkx2.5, GATA-4 i Tbx5, crucials en tot el procés del desenvolupament cardíac⁶⁻⁹.

Posteriorment, les crestes cardíiques es fusionen a la línia embrionària mitjana i formen el tub cardíac primitiu (figura 1b)^{4, 5}. En aquest estadi, el cor està format únicament per dues capes cel·lulars: el miocardi a la part externa i l'endocardi a la interna¹⁰. Poc després de formar-se, el cor tubular pateix una torsió cap a la dreta que serveix per alinear correctament les futures regions del cor que ja es comencen a distingir (figura 1c)^{4, 5}. Es podria dir que el cor embrionari està format pel tracte d'entrada, l'aurícula embrionària, el canal auriculoventricular, el ventricle embrionari i el tracte de sortida¹¹. Cada una d'aquestes regions miocardiàiques presenta un patró d'expressió diferencial, així com unes característiques funcionals pròpies^{11, 12}. Durant l'estadi fetal, aquestes 5 estructures hauran de ser septades per obtenir un cor amb doble circuit: sistèmic i pulmonar (figura 1d)^{4, 5}. La septació del ventricle i l'aurícula primitiva dona lloc als ventricles dret i esquerre, i a les aurícules dreta i esquerra, respectivament, donant forma a la configuració del cor adult amb les quatre cambres separades¹³ (figura 1e)^{4, 5}.

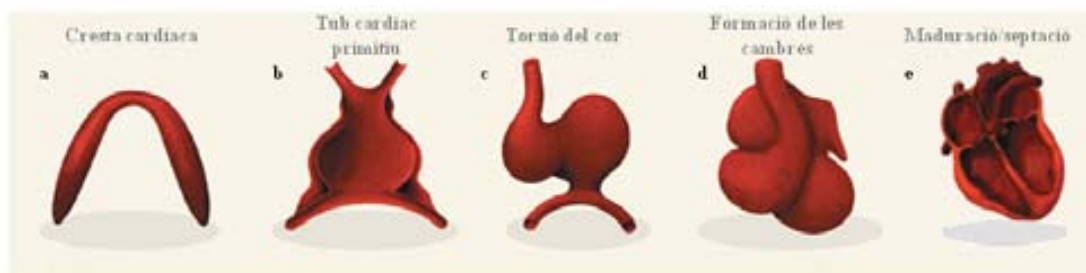


Fig. 1. a. Formació de la cresta cardíaca. b. Formació del tub cardíac primerenc. c. Torsió i inici de la formació de les cambres. d. Formació de les cambres. e. Maduració de les cambres, septació i formació de les vàlvules.

A escala funcional, el cor és un òrgan muscular que recull la sang dels teixits del cos i la bomba cap als pulmons, i recull la sang dels pulmons i la bomba cap a tots els teixits del cos. L'anatomia interna del cor (figura 2) deixa veure quatre cambres formades per múscul cardíac o miocardi. Les dos cambres superiors

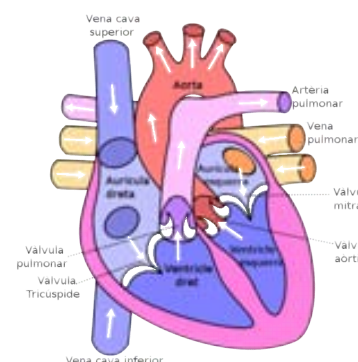


Fig. 2. Anatomia del cor.

(aurícules) funcionen principalment com a cambres col·lectores, encara que també bomben la sang cap als ventricles; les dos cambres inferiors (ventricles) tenen més força contràctil, i la seva funció és la de bombar sang a l'organisme. Tot i que el cor és ple de sang, aquesta nodreix i oxigena molt poc els seus teixits. Aquestes necessitats són subministrades per un sistema vascular separat de la resta: el sistema coronari¹⁴.

El miocardi està format per cardiòcits, unes cèl·lules especialitzades la funció principal de les quals recau en el cicle contracció-relaxació. El 75% del seu volum intern està destinat a un entramat de proteïnes contràctils ordenades paral·lelament o sarcòmer que dóna lloc a una

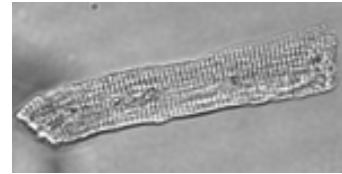


Fig. 3. Imatge d'un cardiòcit auricular.

aparença estriada sota el microscopi (figura 3). Els sarcòmers són les unitats funcionals contràctils envoltades a cada extrem per una matriu proteica, coneguda com la línia Z, i composta principalment per una altra proteïna contràctil, la α -actinina. Cada sarcòmer disposa d'un entramat interdigitat de filaments proteics prim i gruixuts. Els filaments prim són polímers formats a partir de subunitats globulars de la proteïna actina mentre que els filaments gruixuts estan formats per unitats de miosina. Les molècules de miosina s'uneixen a l'actina mitjançant dos dominis globulars que poden fer unions creuades i són els que actuen com a veritables motors moleculars responsables de la contracció muscular¹⁵ (figura 4)¹⁶. La contracció es regula per mitjà de les proteïnes tropomiosina i troponina, formada, al seu torn, per tres subunitats (TnC, subunitat d'unió al calci; TnI, subunitat que inhibeix la contracció muscular i TnT, subunitat que uneix el complex troponina amb la tropomiosina i l'actina)^{17, 18}.

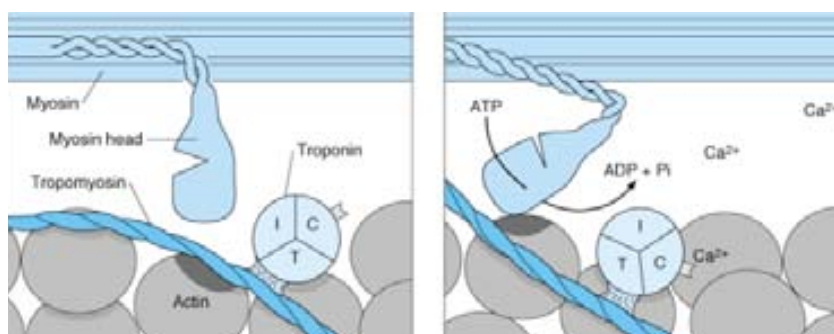


Fig. 4. Inici de la contracció muscular pel Ca^{2+} . Quan el Ca^{2+} s'uneix a la TnC, la tropomiosina es desplaça lateralment i exposa el lloc d'unió de la miosina a l'actina (àrea fosca). El cap de la miosina s'uneix, hidrolitza ATP i fa que la configuració de les regions del cap i del coll de la miosina canviïn i doni lloc al moviment.

L'òrganul més important del cardiòcit és el reticle sarcoplasmàtic. Des del reticle sarcoplasmàtic es descarrega, en resposta a l'ona d'excitació elèctrica, el calci que desencadena la contracció. Per contra, quan el calci és recaptat pel reticle sarcoplasmàtic mitjançant la bomba proteica SERCA-2, el cardiòcit es relaxa.

L'activitat elèctrica dels cardiòcits és fonamental per la seva funció normal. La majoria de cardiòcits són capaços de generar un gradient de càrrega mitjançant les bombes iòniques i els canals iònics selectius. La diferència de càrrega a través de la membrana es coneix com el potencial de repòs de membrana. L'energia relacionada amb la descàrrega d'aquest potencial està normalment associada amb les funcions cel·lulars específiques del cardiòcit. Per exemple, els canvis temporals del potencial elèctric (potencials d'acció) són necessaris per iniciar el procés conegut com l'acoblament excitació-contracció¹⁴.

Les fibres musculars es formen a partir de moltes cèl·lules individuals connectades en sèrie i en paral·lel les unes amb les altres. Entre una cèl·lula i l'adjacent, les membranes plasmàtiques es fusionen formant els discs intercalats on, majoritàriament, es formen unes connexions permeables (*gap junctions*) que permeten la difusió lliure d'ions. Això permet que els potencials d'acció viatgin fàcilment d'una cèl·lula muscular a una altra, i que, quan una s'exciti, el potencial d'acció es propagui per totes elles a través d'aquest entramat d'interconnexions¹⁸. Les *gap junctions* estan formades per proteïnes de membrana anomenades connexines¹⁹. En el cor dels mamífers, la principal connexina és la 43, que es localitza al miocardi ventricular i, en menor mesura, a l'auricular¹³.

El miocardi és un múscul estriat involuntari adaptat per ser molt resistent al fenomen de la fatiga: té una gran quantitat de mitocòndries que li permeten una respiració aeròbica continuada, nombroses mioglobines i una bona aportació de sang que li subministra constantment nutrients i oxigen. El cor està tan ben adaptat al metabolisme aeròbic que és incapaç de bombar suficientment en condicions isquèmiques. A un ritme metabòlic basal, només un 1% de l'energia deriva del metabolisme anaeròbic. Aquesta pot incrementar-se fins al 10% en condicions moderadament hipòxiques, però, en condicions d'hipòxia severa, no es pot alliberar prou energia a partir de la producció de lactat per mantenir les contraccions ventriculars¹⁶.

2. El cor humà: un òrgan diferenciat

Les primeres evidències de regeneració miocàrdica daten del 1974 en amfibis^{20, 21}. Gairebé 30 anys després es va demostrar també en el model de peix zebra que l'escissió de fins el 20% del ventricle portava a una regeneració espontània i reconstrucció del cor fruit d'un procés de proliferació tant de cardiòcits com de teixit connectiu²². En els mamífers, però, es pensava que aquesta capacitat regenerativa del cor es perdia quasi completament poc després del naixement.

En efecte, el múscul cardíac humà s'havia considerat tradicionalment un òrgan terminalment diferenciat sense capacitat de regeneració. Es pensava que els cardiòcits eren cèl·lules que sortien del cicle cel·lular poc després del naixement. Aquesta visió estàtica del miocardi implicava que tant la mort com la replicació dels miòcits no tenien cap paper en l'homeòstasi cardíaca.

Estudis recents, però, han rebutjat completament aquest dogma. Per una banda, s'ha trobat la presència de diverses poblacions cel·lulars amb el comportament i potencial de cèl·lules mare cardíques (CMC) en el miocardi humà adult. Per l'altra, estudis sobre quimerisme cardíac han demostrat que subpoblacions de cèl·lules extracardíques poden colonitzar el miocardi adult.

Les CMC estarien implicades al llarg de tota la vida en el procés de manteniment de l'homeòstasi cardíaca, substituint, si més no en part, les cèl·lules cardíques mortes. L'activació i implicació de les CMC s'ha demostrat en diferents condicions fisiopatològiques. Així, s'ha observat que el nombre de CMC augmenta de forma aguda després d'un infart agut de miocardi (IAM)^{23, 24}. En el cor humà trobem aproximadament 4000 CMC per cm³; després d'un IAM, aquest nombre augmenta fins a les 40.000 CMC per cm³ al marge del infart i fins a 20.000 CMC per cm³ a la regió distal²³.

La demostració de quimerisme cardíac s'ha obtingut en pacients trasplantats en què el receptor era de sexe diferent al donant. Mitjançant tècniques d'hibridació *in situ*, es pot fer un seguiment de les cèl·lules masculines portadores del cromosoma Y i la seva colonització miocàrdica (figura 5a)²⁵. Aquests estudis de quimerisme en humans han donat percentatges variables de colonització cel·lular per cèl·lules del receptor que oscil·len entre el 0,04% i el 10% en funció de l'estudi^{26, 27}. Així es demostra doncs, l'existència de cardiòcits d'origen extracardíac colonitzant el miocardi però no es dona

una resposta a quin és el seu origen. Per esbrinar si es tractava de progenitors derivats del moll d'os, alguns investigadors van analitzar el cor de dones (XX) que havien rebut un transplantament de moll d'os provinents d'homes (XY) (figura 5b)²⁵. Deb i col. van trobar que 0,23% dels cardiòcits presentaven el cromosoma Y²⁸. Bayés-Genis i col. van observar el fenomen del quimerisme cardíac tant en pacients que havien rebut un transplantament de cèl·lules mare de sang perifèrica mobilitzades amb G-CSF, com en pacients que havien rebut transplantament de moll d'os, en tots els casos, de sexe contrari entre donant i receptor²⁹.

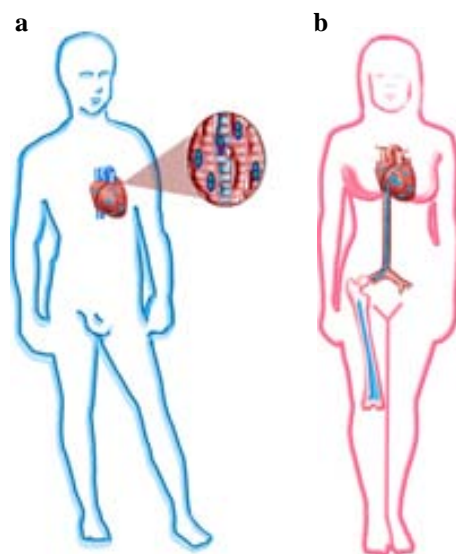


Figura 5. a. Quimerisme cardíac després d'un transplantament de cor. Les cèl·lules mare circulants o residents al cor participen en aquest procés. Els nuclis (blau fosc) amb cromosomes Y es representen com punts vermells i els cromosomes X com a punts verds. Les cèl·lules d'origen masculí es mostren en blau clar i les d'origen femení com en vermell rosat. **b.** Quimerisme després d'un transplantament de moll d'os o de cèl·lules progenitores. Les cèl·lules de moll d'os d'origen masculí colonitzen el cor femení sa. El blau clar simbolitza origen masculí mentre que els vermell rosat l'origen femení.

Per tant, en l'actualitat es pensa que tant les CMC com les cèl·lules progenitores cardíques d'origen extracardíac jugarien un paper clau en el procés natural de regeneració essencial que és l'homeòstasi cardíaca. Ara bé, a la vegada, s'evidencia que aquest rol és insuficient per evitar la formació de la cicatriu, la pèrdua de la funció contràctil i la progressió de la insuficiència cardíaca després de l'infart de miocardi³⁰⁻³⁴.

Per això, la teràpia cel·lular o cardiomioplàstia cel·lular, ja sigui amb cèl·lules autòlogues o heteròlogues pot tenir el potencial de reemplaçar els cardiòcits i els altres tipus cel·lulars que han mort després d'un infart agut de miocardi (IAM). Aquesta nova teràpia hauria de millorar la funció ventricular postinfart i evitar la progressió, com passa actualment, cap a la insuficiència cardíaca congestiva (ICC).

El tipus cel·lular ideal per regenerar el miocardi hauria de ser capaç de proliferar i diferenciar-se en cèl·lules contràctils, connectar-se electromecànicament amb les

cèl·lules adjacents, ser fàcil d'obtenir i en quantitats suficients, i la seva aplicació no hauria d'estar subjecta a rebuig immunològic, ètic o legal³⁵. Així, les cèl·lules per regenerar el miocardi podrien derivar de cèl·lules mare indiferenciades o de cèl·lules somàtiques més diferenciades. No s'ha identificat encara el tipus cel·lular ideal i, potser, més d'un tipus cel·lular podria ser vàlid per substituir el miocardi necrosat i minimitzar el remodelat.

La forma d'administració òptima d'aquestes cèl·lules també es desconeix. Fins ara, aquestes cèl·lules mare per a la regeneració cardíaca s'han administrat al cor per via intravenosa, intracoronària, intramiocàrdica o per mitjà de l'enginyeria de teixits. Hou i col. van realitzar un estudi amb cèl·lules humanes mononucleades de sang perifèrica marcades amb Indi¹¹¹ i injectades per via intracoronària, intramiocàrdica i de forma retrògrada per via coronària venosa en un model d'infart en porc³⁶. Com a resultat, es va observar que utilitzant les vies intracoronària i la via del sinus coronari la retenció de cèl·lules era només del 2,6% i el 3,2%, respectivament, mentre que utilitzant la injecció intramiocàrdica la retenció era de l'11%, tot i que aquesta última via era la que tenia més variabilitat en l'administració.

Les característiques, avantatges i desavantatges de cadascuna de les possibilitats de la teràpia cel·lular cardíaca es descriuran més endavant. En primer lloc, però, es descriurà la magnitud del problema del infart de miocardi i quines són les teràpies disponibles actualment.

3. Infart agut de miocardi

3.1. Epidemiologia i problemàtica social del infart agut de miocardi

La malaltia coronària és un dels principals problemes de salut en el món occidental industrialitzat, i l'infart agut de miocardi és la més greu de les seves manifestacions. L'IAM està causat per l'oclusió aguda d'una o diverses artèries coronàries que aporten sang al cor provocant un transport inadequat d'oxigen i nutrients resultant en la necrosi i pèrdua de capacitat contràctil d'una

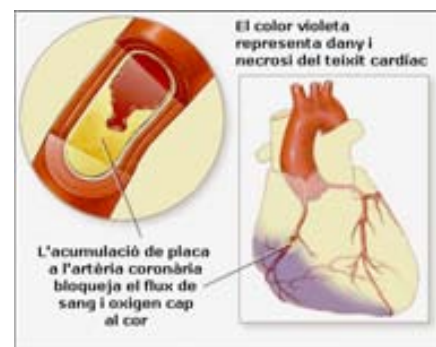


Fig. 6. Dibuix esquemàtic d'un cor infartat.

part del múscul cardíac³⁷ (figura 6)³⁸. L'infart provoca, doncs, una disfunció ventricular que pot manifestar-se clínicament amb limitacions per realitzar activitats quotidianes i eventualment pot conduir a la mort, ja sigui per fallada de la funció contràctil o per l'aparició d'una arítmia maligna.

Segons l'Organització Mundial de la Salut, es produeixen 7,1 milions de morts l'any per malaltia coronària a tot el món³⁹. Tot i que durant les darreres tres dècades s'han experimentat considerables avenços en el diagnòstic i tractament de l'IAM, aquest continua sent un greu problema de salut pública. Per exemple, als Estats Units cada any prop de 565.000 persones pateixen per primera vegada un IAM i al voltant de 300.000 presenten un reinfart. Encara que la mortalitat aguda de l'IAM s'ha reduït, la prevalença de la miocardiopatia isquèmica està creixent ràpidament degut al increment de l'esperança de vida. La morbiditat, la mortalitat i els costos socioeconòmics relacionats amb la miocardiopatia isquèmica pugen de manera sostinguda any rere any i es calcula que l'any 2008 arribaran als 448,5 bilions de dòlars⁴⁰.

A Espanya, més de 74.000 pacients són hospitalitzats cada any degut a un IAM o a una angina inestable⁷ constituint la primera causa de mortalitat en els homes i la segona en les dones, representant el 32,8% del total de defuncions. L'any 2005 es van produir 39.300 morts degudes a aquesta patologia: 17.119 dones i 22.181 homes⁴¹. Disposem darrerament d'importants registres poblacionals d'IAM com el MONICA⁴² a Catalunya o l'IBERICA⁴³. A partir d'aquest últim, s'ha publicat recentment una estimació de la incidència de l'IAM en la franja de població espanyola que va dels 25 als 74 anys, que arribaria als 194 casos per cada 100.000 habitants i any en els homes i als 38 casos per cada 100.000 habitants i any en les dones⁴⁴.

La causa de mort a curt termini més freqüent deguda a un infart és l'aparició d'una arítmia ventricular maligna (sobretot la fibril·lació ventricular) que dona lloc a mort sobtada cardíaca (\approx 20% dels IAM) o xoc cardiogènic (\approx 20-40% dels IAM). El xoc cardiogènic és una hipoperfusió dels teixits degut a la disfunció severa de la capacitat de contracció del cor. L'aparició del xoc cardiogènic és directament proporcional a la mida de l'infart. Habitualment, la necrosi de més del 40% de la massa ventricular esquerra produeix una situació de xoc cardiogènic.

A mig i llarg termini, la complicació més freqüent és la insuficiència cardíaca congestiva crònica deguda als canvis tissulars, geomètrics i funcionals que es produeixen en el post infart i que s'anomena remodelat ventricular. Aquestes

alteracions, pràcticament irreversibles, provoquen que el cor perdi eficàcia per bombar la sang cap als teixits de forma correcta⁴⁵.

En els últims anys, però, s'ha aconseguit una important reducció de la mortalitat aguda post infart, però, la insuficiència cardíaca causada pel remodelat ventricular és cada vegada més freqüent. Està adquirint proporcions epidèmiques i afecta com a mínim a 10 milions de persones a l'Europa occidental⁴⁶ i a més de 4,8 milions de persones als Estats Units, amb 400.000 nous casos cada any⁴⁷. Les prediccions són que aquesta situació empitjorarà amb un notable augment de les malalties cardiovasculars en els països desenvolupats i es calcula que les morts degudes a malalties cardiovasculars arribaran a 25 milions a l'any 2020 a tot el món¹.

Per a molts d'aquests malalts, aquesta progressió des de l'atac de cor fins a la insuficiència cardíaca congestiva és una dramàtica evidència de que els tractaments actuals no són un substitut vàlid dels cardiòcits morts⁴⁸.

3.2. Fisiopatologia i manifestacions clíniques de l'IAM

L'infart de miocardi es produeix quan el flux coronari cessa degut a una oclusió trombòtica d'una artèria coronària alterada degut a aterosclerosi (figura 7)⁴⁹.

L'aterosclerosi és una malaltia inflamatòria crònica que afecta fonamentalment i de forma difusa la capa íntima vascular arterial. Durant el seu desenvolupament, es diposita

colesterol, productes cel·lulars de rebuig, calci i altres substàncies a la capa íntima d'una artèria. Aquest acúmulo s'anomena placa d'ateroma. Les plaques d'ateroma poden arribar a ser tan grans que redueixin significativament el flux de sang a través d'una artèria (figura 7a). Tot i així, la majoria dels ateromes són asimptomàtics i mai arriben a causar manifestacions clíniques. El dany més greu, però, esdevé quan la placa es torna fràgil i es fissa o trenca. Aleshores, el col·lagen i el colesterol

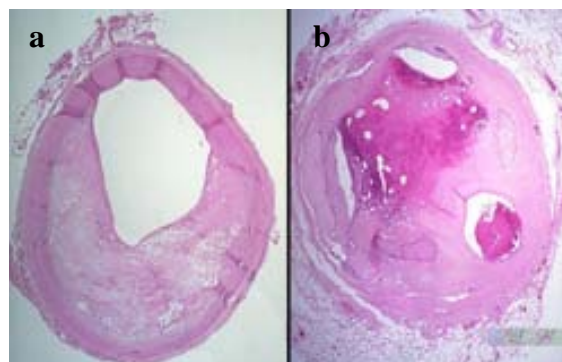


Fig. 7. **a.** Tall histològic d'una artèria coronària afectada per aterosclerosi. **b.** Tall histològic d'una artèria coronària quasi bé completament oclusa per la formació d'una placa trombòtica.

(fonamentalment LDL oxidat) que conté a l'interior entren en contacte amb la sang i s'inicia un procés d'agregació plaquetària trombòtica seguida per la formació d'un coàgul. El trombus tendeix a estendre's cap a la llum arterial causant la obstrucció del flux sanguini⁵⁰ (figura 7b). La falta de nutrients i oxigen (isquèmia) provoquen una necrosi de part del miocardi, això és el que es coneix com un atac de cor o infart agut de miocardi.

Degut a la seva elevada taxa metabòlica, la regió del miocardi irrigada per l'artèria coronària bloquejada comença a patir un dany irreversible als 20 minuts d'isquèmia. Les cèl·lules de les capes més externes del miocardi (epicardi) comencen a morir evolucionant cap a les capes més internes (endocardi) en un període



Fig. 8. Tall d'un cor. La zona infartada es veu de color grogós.

d'entre 3 i 6 hores. Tot i que els cardiòcits són la població més vulnerable, la isquèmia també afecta a altres tipus cel·lulars com les cèl·lules vasculares, els fibroblasts i els nervis cardíacs. La necrosi miocàrdica s'acompanya d'una vigorosa resposta inflamatòria amb cúmul de leucòcits, neutròfils i, més endavant, macròfags que infiltren la zona del infart. Aquests macròfags fagociten les restes de cèl·lules necròtiques i participen en les següents fases de la cicatrització del infart⁵¹. Alhora es comença a formar un teixit hidrofílic reparatiu provisional, anomenat teixit de granulació, ric en fibroblasts i cèl·lules endotelials. Al cap d'uns 7 dies, el teixit de granulació es remodela i es forma un dens teixit cicatricial molt ric en col·lagen (figura 8). Tot aquest procés reparador requereix diverses setmanes per completar-se⁵¹.

A nivell d'òrgan, la cicatriu de l'infart de miocardi és distensible i afavoreix la dilatació de la cavitat ventricular o remodelat ventricular. Aquests canvis estructurals incrementen l'estrès mecànic de la paret del ventricle i promouen una progressiva disfunció contràctil. La magnitud de la disfunció ventricular depèn de l'extensió del territori cardíac necrosat^{52, 53}, que depèn del nivell on s'ha produït l'obstrucció de l'artèria coronària. En general, una obstrucció coronària proximal donarà lloc a un infart més extens.

3.3. Tractament actual de l'IAM

3.3.1. Tractament mèdic i mitjançant cateterisme

L'infart de miocardi és una urgència mèdica perquè la precocitat en el tractament és essencial per salvar la vida del malalt. És clàssica l'afirmació de P.W. Serruys que diu: "Temps és miocardi" referint-se al miocardi salvat per cada minut que es guanya en iniciar el tractament.

Els objectius del tractament en la fase aguda del infart són aturar la progressió del infart, reduir les demandes al cor, controlar el dolor i evitar les complicacions. El tractament que es segueix es basa en l'ús de:

- l'àcid acetil salicílic (aspirina), que es considera el medicament essencial i de referència en el tractament del malalt amb un possible IAM. La funció de l'àcid acetil salicílic és la d'antiagregant plaquetari. L'administració d'aspirina pot afavorir la reperfusió arterial i redueix la mortalitat, el reinfart i els accidents vasculars cerebrals en els pacients amb IAM.
- oxigen perquè estigui més fàcilment disponible pels teixits de l'organisme i es redueixi la càrrega de treball del cor.
- morfina o derivats d'aquesta que són analgèsics potents, i nitroglicerina, un vasodilatador arterial.
- β -bloquejants, que són fàrmacs cronotrops negatius que redueixen els requeriments d'oxigen del propi cor i, en conseqüència, la isquèmia tissular.

El següent pas terapèutic que es realitza en la teràpia convencional de l'IAM té per objectiu limitar la mida del infart. Això s'aconsegueix amb la reperfusió de l'artèria coronària bloquejada, ja sigui de forma farmacològica (trombólisi) i/o de forma mecànica (angioplàstia/stent permanent), o ambdós. Per això, és essencial identificar ràpidament els malalts candidats a un tractament urgent de reperfusió. El tractament trombolític pot reduir el risc relatiu de mort intrahospitalària fins un 50% quan s'administra en la primera hora de l'inici dels símptomes de l'infart de miocardi. El tractament trombolític administrat de forma apropiada redueix, en principi, la mida de l'infart, limita la disfunció del ventricle esquerre i disminueix la

incidència de complicacions greus com la ruptura miocàrdica, el xoc cardiogènic o les arítmies ventriculars malignes.

Una alternativa eficaç a la trombòlisi per a obrir l'artèria coronària oclusa és la reperfusió coronària mecànica mitjançant catèter o angioplàstia coronària transmural percutània. Aquesta intervenció consisteix en la dilatació coronària amb un baló o la col·locació d'un stent permanent. L'angioplàstia (figura 9)⁵⁴ consisteix en introduir un baló fins a l'artèria coronària bloquejada, inflar el baló durant un cert temps que comprimeix la placa trombòtica contra les parets de l'artèria. En el 80% dels casos quan es realitza una angioplàstia també es col·loca un stent. Un stent és un malla metàl·lica que es deixa col·locada a l'artèria coronària bloquejada que garanteix la patència del vas i permet el flux sanguini cardíac (figura 10)⁵⁵.

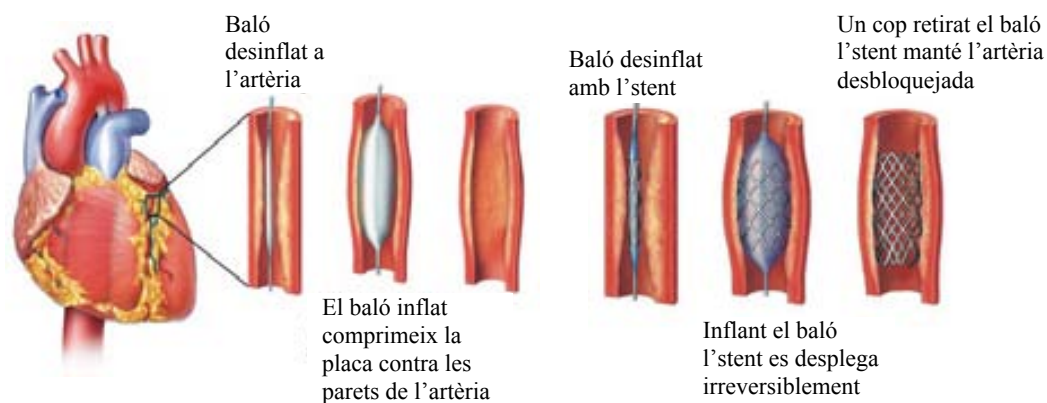


Fig. 9. Esquema de realització d'una angioplàstia.

Fig. 10. Col·locació d'un stent.

Un cop transcorreguda la fase aguda de l'infart, els tractaments més utilitzats a llarg termini tenen l'objectiu de disminuir el risc de reinfart i de controlar la ICC i els seus efectes que poden reduir la qualitat i durada de la vida del malalt i limitar les seves activitats quotidianes degut a la fatiga i la dispnea.

Els fàrmacs més utilitzats per pal·liar els efectes de la ICC són els β -bloquejants, els inhibidors de l'enzim convertidor de l'angiotensina (ECA), els bloquejadors del receptor de l'angiotensina i els diürètics. Tant els inhibidors de l'ECA com els que bloquegen el receptor de l'angiotensina contraresten el potent efecte vasoconstrictor de la angiotensina II i, en conseqüència, dilaten els vasos sanguinis disminuint la càrrega de treball del cor. Els diürètics s'administren per eliminar líquids retinguts⁵⁶. Els β -bloquejants bloquegen l'efecte de l'adrenalina sobre els receptors beta i

retarden els impulsos elèctrics que passen pel cor. Conseqüentment, fan que millori la contracció del ventricle esquerre i, a la vegada, disminueixen el risc d'arítmies. Per últim, l'aspirina i altres antiagregants plaquetaris com el clopidogrel s'administren per evitar el risc de reinfart degut a reoclusions trombòtiques. Acompanyant el tractament mèdic, els malalts amb ICC també han de canviar els hàbits de vida evitant els esforços i mantenint una dieta equilibrada i baixa en sal⁵⁷.

Ara bé, cap dels tractaments esmentats anteriorment, i que són els que s'apliquen en l'actualitat per tractar l'IAM i la ICC, és capaç de curar ni l'IAM ni la ICC. Es tracta només de tractaments pal·liatius que intenten evitar recaigudes i descarreguen el cor de treball per evitar que deixi de funcionar de manera definitiva, però cap d'ells substitueix el teixit miocàrdic mort en l'infart⁵⁸. És a dir, que tant l'IAM com la insuficiència cardíaca són malalties incurables per la gran majoria de malalts. Tot i que els tractaments que hem esmentat han demostrat eficàcia per a millorar la supervivència i la qualitat de vida d'aquests malalts, més de la meitat dels pacients moren durant els 5 anys posteriors al diagnòstic inicial de la malaltia⁵⁹.

Actualment, només un petit nombre de pacients poden tenir l'oportunitat de rebre l'únic tractament que sí aconsegueix recuperar completament la funció del cor, que és el trasplantament de cor. La teràpia cel·lular pot esdevenir una alternativa si es demostra la seva eficàcia.

3.3.2. Tractaments quirúrgics

Bypass aorto-coronari

En casos seleccionats i, quan s'observa que varies artèries tenen una reducció de la llum o estenosi significativa, és necessària la revascularització coronària quirúrgica o bypass aorto-coronari. Aquest procediment consisteix en la col·locació de segments de vasos sanguinis propis d'altres localitzacions suturant un extrem a l'aorta i l'altre a una artèria coronària distal a l'obstrucció (figura 11)⁶⁰.

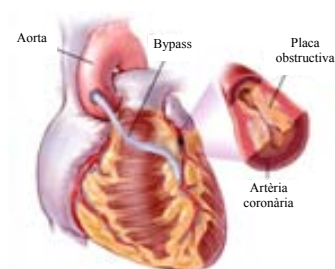


Fig. 11. Bypass aorto-coronari.

Trasplantament de cor

El trasplantament de cor és, a dia d'avui, l'únic tractament realment eficaç per la ICC avançada deguda a un IAM. Consisteix en la substitució del cor malalt per un de sa. No obstant això, no és una teràpia exempta de riscos. El 20% dels malalts mor durant el primer any i el risc de rebuig de l'empelt obliga al pacient a prendre medicaments immunosupressors de manera indefinida. Si es pot controlar el rebuig, més del 50% dels malalts tenen una esperança de vida superior als 10 anys.

Una altra de les limitacions relacionades amb aquest tipus de cirurgia és el limitat nombre de donants existent, que fa que la llista d'espera per un trasplantament de cor superi els 15.000 pacients a nivell mundial⁶¹. L'any 2007 es van realitzar 241 trasplantaments cardíacs a Espanya segons la "Organización Nacional de Trasplantes"⁶². Això ens indica que el trasplantament de cor, tot i ser fins ara l'única teràpia efectiva en els malalts amb ICC terminal amb un índex de supervivència als 5 anys de aproximadament el 70%⁶³, estarà sempre molt subeditada al nombre de donants de tal manera que no es podria aplicar a la immensa majoria de malalts amb insuficiència cardíaca.

4. Teràpia cel·lular

La teràpia cel·lular es pot definir com un grup de noves tècniques o tecnologies que tenen per objectiu substituir cèl·lules disfuncionals per altres de sanes i funcionals. L'aplicació d'aquestes noves tècniques s'està estudiant per a tractar un gran ventall de malalties humanes, moltes de les quals fins ara es pensava que eren incurables, incloent, entre d'altres, molts tipus de càncer, malalties neurodegeneratives com el Parkinson, lesions a l'espina dorsal, la diabetis i també en el tractament de l'IAM i la insuficiència cardíaca congestiva⁶⁴.

La teoria que suporta la teràpia cel·lular existeix des de fa centenars d'anys. La primera referència sobre el concepte teràpia cel·lular la va fer Philippus Aureolus Paracelsus (1493-1541), un metge i alquimista suís-alemany que va escriure el 1536 en el seu *Der grossen Wundartzney* ("Gran Llibre de Cirurgia") que "el cor cura el cor, el pulmó cura el pulmó, la melsa cura la melsa; semblant cura semblant"⁶⁵. La paternitat,

quasi per casualitat, de la teràpia cel·lular, però, s'atribueix al Dr. Paul Niehans (1882-1971), un controvertit metge suís. El 1931 Niehans volia trasplantar un pacient amb les glàndules paratiroides severament afectades, utilitzant les d'una vedella. Quan el pacient va començar a empitjorar abans de que el trasplantament es pogués dur a terme, Niehans va decidir tallar en petits fragments la glàndula de vedella, resuspendre'ls en una solució salina, i injectar-los en el pacient moribund. Immediatament el pacient va millorar i, de fet, va viure 30 anys més⁶⁶.

La cerca de les cèl·lules mare, en canvi, va començar després dels bombardejos d'Hiroshima i Nagasaki el 1945. Aquells que van morir temps després degut a dosis baixes de radiació tenien compromesos els seus sistemes hematopoètics, de manera que no podien generar ni el nombre suficient de leucòcits per protegir-se contra les infeccions no patogèniques ni suficients plaquetes per coagular la sang adequadament. Dosis més altes de radiació també mataven les cèl·lules mare del tracte intestinal resultant en una mort més ràpida. Més endavant, es va demostrar que ratolins exposats "a cos complet" a raig X desenvolupaven els mateixos símptomes i que, a la dosi letal mínima, els ratolins morien d'insuficiència hematopoètica aproximadament dues setmanes més tard⁶⁷. Poc després, els científics van demostrar que els ratolins irradiats a cos complet es podien recuperar injectant-los suspensions cel·lulars d'òrgans hematopoètics tals com el moll d'os⁶⁸. El 1956 tres laboratoris van demostrar que les cèl·lules de moll d'os injectades eren les responsables de la regeneració del sistema hematopoètic d'aquests animals⁶⁹⁻⁷¹.

La teràpia cel·lular, en l'actualitat, és una realitat clínica. Els trasplantaments de moll d'os són només un dels exemples mèdics on les cèl·lules sanes del moll d'os d'un donant s'utilitzen per substituir les cèl·lules de pacients víctimes d'una leucèmia o d'altres tipus de càncers. La teràpia cel·lular també s'està utilitzant en la creació d'empelts de pell nova per tractar cremades greus i per crear noves còrnies⁴⁷.

En l'àmbit cardiovascular, els investigadors treballen amb l'esperança de què la teràpia cel·lular podrà aconseguir substituir la matriu fibrosa ocasionada com a conseqüència de l'IAM, per un nou teixit funcional amb capacitat contràctil que eviti el remodelat del ventricle.

Com ja s'ha esmentat, estudis recents han demostrat que el cor en diferents condicions patològiques com la insuficiència cardíaca³ o l'infart de miocardi^{32, 72} té una relativa capacitat regenerativa. Avui en dia, però, es pensa que aquest procés natural de regeneració és essencial per a l'homeòstasi cardíaca però insuficient per regenerar el cor després d'un dany tan important com representa un IAM.

La regeneració del cor basada en cèl·lules mare ofereix, doncs, la possibilitat d'augmentar el procés regeneratiu del cor trasplantant cèl·lules autòlogues o heteròlogues que substitueixin els cardiòcits i els altres tipus cel·lulars que han mort després d'un IAM (cardiomioplàstia cel·lular) i, d'aquesta manera, es millori la funció ventricular i no degeneri, com passa actualment, en una insuficiència cardíaca congestiva.

5. Cèl·lules mare: tipus i propietats

Les cèl·lules mare són cèl·lules no especialitzades que es caracteritzen per la seva capacitat de renovar-se a si mateixes mitjançant divisió mitòtica (clonogènesi) i, en determinades condicions fisiològiques o experimentals, diferenciar-se cap a tipus cel·lulars especialitzats (potencialitat o plasticitat). En mamífers, els dos grans tipus de cèl·lules mare que trobem són: les cèl·lules mare embrionàries, que deriven de l'embrió en estadi de blastocist, i les cèl·lules mare adultes o somàtiques, que es troben en els teixits adults.

El primer tipus cel·lular que va ser utilitzat en teràpia cel·lular per a la regeneració cardíaca van ser els mioblasts esquelètics⁷³⁻⁷⁵. Recentment, però, aquest camp s'ha expandit utilitzant un ventall més ampli de cèl·lules mare/progenitores que inclou les cèl·lules derivades de moll d'os, les cèl·lules progenitores endotelials, les cèl·lules mare mesenquimals, les cèl·lules mare cardíques i les cèl·lules mare embrionàries. Tots aquests tipus cel·lulars tenen característiques i propietats que els poden conferir avantatges i desavantatges, per al seu us en la regeneració cardíaca, com es mostren a la taula 1 i es descriuen amb més detall tot seguit.

	Fàcil obtenció	Fàcil expansió	Diferenciació cardiomiogènica	Diferenciació endotelial	Consideracions ètiques	Aritmogènesi	Puresa
CM embrionàries		√	√	√	√		
Mioblasts esquelètics	√	√				√	√
CM cardíques		√	√				√
CDMO	√						
CPE	√			√			√
MSC derivades de MO		√	√ (?)	√			√
subATPC	√	√	√ (?)	√			√

Taula 1. Comparació de les característiques dels diferents tipus de cèl·lules utilitzats en teràpia cel·lular cardíaca. CM: cèl·lules mare; CDMO: cèl·lules mononucleades derivades de moll d'os; CPE: cèl·lules progenitores endotelials; MSC: cèl·lules mare mesenquimals; MO: moll d'os; ATPC: cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós.

5.1. Cèl·lules mare embrionàries

L'aïllament de les primeres cèl·lules mare embrionàries de ratolí va ser possible fa gairebé 30 anys gràcies al descobriment de les tècniques de cultiu *in vitro*⁷⁶⁻⁷⁸. Tot i així, no va ser fins el 1994 que es van aïllar les primeres cèl·lules mare embrionàries humanes, i la primera línia establerta no es va aconseguir fins el novembre de 1998 quan es va descriure la derivació d'una línia de cèl·lules mare embrionàries humanes a partir de blastocists⁷⁹.

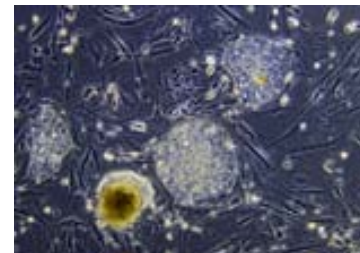


Fig. 12. Vista microscòpica d'una colònia de cèl·lules mare embrionàries humanes.

Les cèl·lules mare embrionàries deriven de la massa cel·lular interna de l'embrió en estadi de blastocist (7-14 dies). Són cèl·lules pluripotents que poden diferenciar-se en tots els tipus cel·lulars del cos, incloent els cardíocits. Una altra característica d'aquestes cèl·lules, i important per a la teràpia cel·lular, és que tenen la capacitat de replicar-se de forma indefinida, fet que permet cultivar-les a gran escala i obtenir-ne en gran nombre⁸⁰ (figura 12)⁸¹.

Per altra banda, les cèl·lules mare embrionàries són les que tenen la major capacitat per diferenciar-se cap a cardíocits funcionals⁸²⁻⁸⁵. La seva diferenciació *in vitro* produeix cèl·lules que recapitulen el fenotip cardíac expressant marcadors cardíacs

característics i demostren acoblament excitació-contracció^{82, 85-88}. A més, quan són trasplantades en models animals d'infart de miocardi, les cèl·lules mare embrionàries generen cardiòcits que repoblen significativament regions del miocardi disfuncional millorant-ne la seva contractibilitat i reduint la mortalitat.

Els cardiòcits derivats de cèl·lules mare embrionàries humanes han mostrat les mateixes característiques moleculars, estructurals, electrofisiològiques i contràctils que el miocardi embrionari^{86, 89-91}. Els primers estudis *in vivo* amb cardiòcits derivats de cèl·lules mare embrionàries foren encoratjadors⁹²⁻⁹⁷. Les dades obtingudes demostraven la correcta diferenciació, integració física i electromecànica de l'empelt en el miocardi hoste en cors malalts d'animals immunodeprimits i, per altra banda, una disminució del remodelat postinfart, una millora de la revascularització a la zona infartada, la millora de la funció cardíaca i la no formació de teratomes. Tot i així, estudis recents sí han observat la formació de teratomes al cor contradient els primers estudis^{98, 99}.

Per tant, per arribar a l'aplicació clínica en l'infart de miocardi de cardiòcits derivats de cèl·lules mare embrionàries s'hauran d'aconseguir un sèrie d'aspectes molt importants. El primer, desenvolupar protocols que permetin obtenir preparacions de cardiòcits funcionals a gran escala i de gran puresa. El segon, i molt important, serà que aquestes preparacions no generin cap tipus de teratoma ja que tendeixen a formar-ne en estat indiferenciat. Murry i Laflamme, amb l'experiència obtinguda en el seus treballs amb cèl·lules mare embrionàries, suggereixen que una selecció genètica seria la millor manera d'aconseguir la puresa necessària¹⁰⁰ i evitar així la formació de teratomes. El tercer escull a superar és el rebuig immunitari de l'empelt degut a que les cèl·lules mare embrionàries no es poden obtenir de l'individu adult (cèl·lules autòlogues) i, per tant, s'han d'aplicar de forma heteròloga. En aquest punt, l'obtenció de quatre línees de cèl·lules mare embrionàries úniques amb HLA-homozigots que no provocarien rebuig immunitari en gran part de la població n'és un avenç important¹⁰¹.

Per tot això, la utilització de cèl·lules mare embrionàries humanes amb finalitats per al desenvolupament de noves aproximacions terapèutiques ha estat i és objecte d'un gran debat social. A Espanya, l'any 2004 es va aprovar el Reial Decret 2132/2004 que permet l'ús per a recerca de cèl·lules mare embrionàries humanes obtingudes a partir de pre-embrions congelats sobrants dels processos de fecundació *in vitro*¹⁰². Més recentment, s'ha aprovat la "Lei de Investigación Biomédica" que, entre d'altres,

amplia els supòsits per investigar amb cèl·lules mare i n'autoritza la transferència nuclear¹⁰³.

5.2. Cèl·lules mare adultes

Les cèl·lules mare adultes són cèl·lules indiferenciades amb capacitat de renovar-se a sí mateixes i que s'obtenen de l'individu post natal (després del desenvolupament embrionari). Aquestes cèl·lules participen en l'homeòstasi dels teixits i en la regeneració (en general parcial) d'aquests quan hi ha un dany. Es coneixen els següents tipus de cèl·lules mare adultes en funció del seu origen:

5.2.1. Mioblasts (múscul esquelètic)

Després d'una lesió del múscul esquelètic, els mioblasts o cèl·lules satèl·lit entren en el cicle cel·lular mitòtic, es fusionen unes amb les altres amb les miofibril·les danyades restaurant el teixit miocitari danyat¹⁰⁴. Aquestes propietats de proliferació i diferenciació, com també la disponibilitat d'un origen autòleg, va fer pensar que aquestes cèl·lules mare podrien ser útils com a font per a la regeneració cardíaca.

Malgrat que la hipòtesi inicial de treball es basava en que els mioblasts empeltats es transdiferenciessin en cardiòcits, les evidències indiquen que aquestes cèl·lules continuen destinades a diferenciar-se cap a miotúbuls de múscul esquelètic^{73, 105, 106}. Les cèl·lules de múscul esquelètic madures no expressen les proteïnes d'adhesió i de *gap junction* necessàries per l'acoblament electromecànic entre les mateixes cèl·lules i amb les del miocardi de l'hoste¹⁰⁷. Aquest fet, junt amb les dades fisiològiques disponibles suggereixen que aquests empelts no bateguen sincronitzadament amb la resta del cor^{108, 109}. Malgrat aquests aparents desavantatges, estudis en petits i grans models animals han demostrat efectes beneficiosos dels empelts de mioblasts en la funció contràctil ventricular després d'un infart de miocardi^{75, 110-116}. Part de la protecció obtinguda sembla resultat de la reducció de la dilatació ventricular¹¹⁶. No obstant això, les bases completes del mecanisme d'aquesta millora del funcionament es desconeixen actualment.

Tot i aquest desconeixement, els mioblasts van ser el primer tipus cel·lular utilitzat clínicament per a la regeneració cel·lular cardíaca¹¹⁷ degut a la seva eficàcia pre-

clínica i al seu origen autòleg que evitava problemes ètic i immunogènics; la capacitat de ser amplificades *in vitro* (figura 13)¹¹⁸ obtenint fins a centenars de milions de cèl·lules a partir d'una petita biòpsia muscular i una relativament bona supervivència després de la implantació gràcies a la seva alta resistència a la isquèmia¹¹⁹.



Fig. 13. Mioblasts en cultiu.

En estudis clínics en fase I, s'ha observat que és possible obtenir més d'un bilió de cèl·lules a partir d'uns grams de teixit muscular i que es poden implantar per cirurgia cardíaca o amb sistemes basats en catèters. Malgrat la correcta implantació i diferenciació, més de la meitat dels pacients inclosos en aquest estudi van requerir la implantació d'un desfibril·lador ja que experimentaven arítmies ventriculars malignes posteriors^{119, 120}.

5.2.2. Cèl·lules mare cardíques (miocardi)

Fins fa 5 anys, el cor era un dels únics òrgans en el qual no s'havia identificat una població de cèl·lules progenitores. Els treballs de, principalment, 4 grups suggereixen ara que, com el cervell, el cor també disposa de poblacions de cèl·lules mare amb potencial cardiogènic.

L'any 2002, Hierlihy i col.¹²¹ van ser els primers en presentar l'evidència de l'existència d'una població de cèl·lules mare en el cor adult. En aquest estudi, van demostrar que el cor d'un ratolí post-natal contenia cèl·lules residents amb capacitat d'excloure el colorant Hoechst i sensibles al verapamil ($\approx 1\%$ del total de cèl·lules) i que aquestes cèl·lules podien formar colònies i diferenciar-se cap a cardiòcits quan eren cocultivades amb cardiòcits primaris.

Un any més tard, el grup d'Anversa i Nadal-Ginard¹²² van aïllar cèl·lules c-Kit⁺ del cor d'una rata adulta, les van expandir *in vitro* i després les van injectar en el cor d'una rata amb IAM. Van observar que, 10 dies després de la seva injecció, aquestes cèl·lules s'havien diferenciat cap cardiòcits, cèl·lules musculars llises i endoteli vascular, substituint gran part del teixit infartat. També van observar que aquestes cèl·lules, tot i que expressaven la miosina cardíaca, eren molt més petites (una desena part) que els cardiòcits i no presentaven ni un sarcòmer organitzat ni activitat

contràctil. Tot i així, la funció ventricular dels cors tractats va millorar significativament.

El mateix any, una tercera població progenitora va ser descrita per Oh i col·laboradors¹²³. Aquests autors van aïllar cèl·lules que, a diferència de les descrites anteriorment, expressaven el marcador Sca-1. Aquestes cèl·lules quan es tractaven *in vitro* amb 5-azacitidina (un compost químic que activa l'expressió d'algunes proteïnes cardíques en certs models cel·lulars^{89, 124-126}) expressaven gens cardíacs com Nkx2.5, MHC, troponina I cardíaca i α -actinina sarcomèrica. Així mateix, van injectar per via intravenosa les cèl·lules Sca-1⁺ en ratolins que se'ls havia provocat un infart 6 dies abans. Després de dues setmanes, van trobar cèl·lules del donant que s'havien empeltat al cor de l'hoste i que expressaven troponina I i actina sarcomèrica. Mitjançant estudis de recombinació amb el sistema Cre-Lox, van poder determinar que aproximadament la meitat de les cèl·lules del donant empeltades al cor s'havien fusionat amb cardiòcits de l'hoste i que l'altre meitat s'havien diferenciat cap a noves cèl·lules cardíques.

Per últim, Cai i col·laboradors¹²⁷ van identificar una quarta població de cèl·lules progenitores cardíques que expressava el factor de transcripció Islet-1 (Isl-1). En els seus estudis, van demostrar que aquestes cèl·lules contribuïen en la segona etapa de formació de cardiòcits durant el desenvolupament embrionari, sobretot en el ventricle dret, l'aurícula i part del ventricle esquerre. Basant-se en aquest treball, Laugwitz i col·laboradors¹²⁸ van demostrar l'existència de cèl·lules Isl-1⁺ en el cor adult, encara que en poca quantitat. Van aïllar aquestes cèl·lules, les van expandir *in vitro* mantenint el seu estat desdiferenciat però van veure que, si les cocultivaven amb cardiòcits aquestes es diferenciaven ràpidament cap a cardiòcits.

En conclusió, el conjunt d'aquestes dades evidencia que el cor post-natal té una o diverses poblacions de cèl·lules progenitores residents que poden formar nous cardiòcits sota determinades condicions. El paper que tenen aquestes cèl·lules en l'homeòstasi del cor o en resposta a danys encara resta poc clar. Fins ara, totes aquestes poblacions de cèl·lules mare cardíques es pensa que són diferents unes de les altres, per exemple, les cèl·lules Sca-1⁺ no expressen c-Kit i a la inversa, i les cèl·lules Isl-1⁺ no expressen ni c-Kit ni Sca-1. Sembla, doncs, que aquestes cèl·lules no responen de forma robusta davant d'un dany important com passa per exemple amb mioblasts del múscul esquelètic, i per tant, tampoc poden regenerar el cor després d'un IAM.

5.2.3. Cèl·lules mare mononucleades (moll d'os)

El 1998, Ferrari i col·laboradors¹²⁹ van demostrar que una població heteròloga de cèl·lules del moll de l'os i caracteritzades per ser cèl·lules mononucleades contribuïen a la regeneració del múscul esquelètic en ratolins. A partir d'aquell moment, molts grups es van posar a estudiar el potencial d'aquestes cèl·lules en el camp de la regeneració miocàrdica. La primera evidència que va suggerir que aquesta possibilitat era factible va venir del grup de Bittner¹³⁰ que va trasplantar moll d'os d'un ratolí mascle a femelles amb distròfia. Al cap de 70 dies, van trobar-se cèl·lules amb el cromosoma Y al nucli de cardiòcits en els cors dels ratolins femella. Un estudi posterior va demostrar la capacitat d'una població del moll de l'os, altament enriquida en cèl·lules mare hematopoètiques, de contribuir a la regeneració del miocardi després d'un infart¹³¹.

Ara bé, l'any 2003 Alvarez-Dolado¹³² i col·laboradors van demostrar que cèl·lules derivades de moll d'os es fusionaven ocasionalment amb cardiòcits en absència de cap dany donant lloc a cèl·lules híbrides. Segons s'indicava, la freqüència de fusió era comparable a la freqüència de diferenciació cap a cardiòcits descrita en estudis de trasplantament en humans i ratolí. Això va fer pensar que la fusió era el principal mecanisme pel qual s'originaven aquestes cèl·lules. Posteriorment, altres grups com el d'Anversa, Field, Nygren o Balsam van intentar comprovar si es formaven cardiòcits a partir de les cèl·lules de moll d'os i van obtenir resultats contraposats. Mentre que Anversa i col·laboradors¹³³ van demostrar que es formaven cardiòcits, tot i que amb morfologia diferent a la normal i sense sarcòmer i que es millorava la funció del cor després d'un infart, Balsam¹³⁴, Murry¹³⁵ i Nygren¹³⁶ no observaren formació significativa de nous cardiòcits, tot i que en el cas de Nygren sí que van veure fenòmens de fusió a la zona del voltant de l'infart¹³⁶.

De forma general, doncs, els resultats obtinguts semblen indicar que les cèl·lules mononucleades derivades del moll de l'os poden donar lloc a cardiòcits a través de mecanismes que inclouen, com a mínim, la fusió cel·lular. El significat fisiològic d'aquests esdeveniments de fusió encara no es coneix i faran falta més estudis. També serà necessària la demostració de si les cèl·lules derivades de moll d'os són capaces de regenerar el cor a gran escala.

Ara be, sí sembla demostrat de forma consistent que les cèl·lules mare derivades de moll d'os migren als llocs on hi ha dany, inflamació o isquèmia com en fractures

d'os¹³⁷⁻¹³⁹, isquèmia cerebral¹⁴⁰ i al cor infartat^{141, 142}. Això permet l'alliberació de forma local de factors que actuen de forma paracrina al teixit isquèmic que els envolta. Les mateixes cèl·lules mononucleades derivades de moll d'os també alliberen factors angiogènics com el VEGF, bFGF, IGF i angiopoïetines que potencien la resposta angiogènica local i, d'aquesta manera, la supervivència dels cardiòcits^{143, 144}.

Paral·lelament a la investigació bàsica, s'han realitzat nombrosos estudis clínics que utilitzen el moll de l'os com a font cel·lular per a regenerar el cor. Les taules 2 i 3 en resumeixen els seus resultats.

Taula 2. Proves clíniques amb injecció intracoronària de progenitors cel·lulars després d'un IAM.

Estudi	N	Dies després del IAM	Tipus cel·lular	Preparació cel·lular (volum/purificació/cultiu)	Nº mitjà de cèl·lules (x10 ⁶)	Seguretat	Funció ventricular
Strauer i col. ¹⁴⁵	10 + 10 controls	8	CDMO	40ml/Ficoll/overnight	28	+	↑Contractibilitat regional ↓volum sistòlic ↑perfusió
TOPCARE-AMI ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸	59	4,9	CPE	250 ml/sang/3 dies	16	+	↑Contractibilitat global ↓volum sistòlic ↑viabilitat
			CDMO	50 ml/Ficoll/no	213		↑reserva de flux resultats semblants per als 2 tipus cel.
BOOST ^{149, 150}	30 + 30 controls aleatoris	4,8	CDMO	150 ml/sedimentació en gelatina-polisuccinat/no	2.460	+	↑Fracció d'ejecció (6 mesos) =Fracció d'ejecció (18 mesos)
Fernández-Avilés i col. ¹⁵¹	20	13,5	CDMO	50 ml/Ficoll/overnight	78	+	↑Contractibilitat global ↓volum sistòlic
Janssens ¹⁵²	33 + 34 controls	1	CDMO	?/Ficoll/no	300	+	=
REPAIR-AMI ¹⁵³	102 +102 controls	4	CDMO	50 ml/Ficoll/no	240	+	↑Fracció d'ejecció ↓àrea infart
ASTAMI ¹⁵⁴	47 + 50 controls	4-7	CDMO	50 ml/Ficoll/no	87	+	=
Meluzin i col. ¹⁵⁵	40 + 20 controls	5-10	CDMO	100 o 150 ml/Ficoll/overnighth	100	+	↑Fracció d'ejecció

↑ indica increment; ↓ indica reducció; = indica sense canvis; + indica l'absència de reaccions adverses. CDMO, cèl·lules derivades de moll d'os; CPE, cèl·lules progenitores endotelials.

Fruit d'aquests estudis s'ha observat una millora modesta d'un 7-9% de la fracció d'ejecció del ventricle esquerre (normal \approx 60-70%), una reducció significativa dels volums tele-sistòlics i una millora de la perfusió a la zona infartada entre 4 i 6 mesos després del trasplantament de cèl·lules. Un altre element a destacar de l'ús de cèl·lules mare derivades de moll d'os per a la regeneració del miocardi després d'un IAM és que en els més de 3000 pacients estudiats, les complicacions no foren superiors a les del tractament convencional. El mateix es pot dir dels resultats de les proves clíniques amb cèl·lules derivades de moll d'os per tractar pacients amb ICC, on no es van observar complicacions superiors en els pacients tractats respecte els control, i on s'observà una millora molt lleu de la funció cardíaca dels pacients tractats (Taula 3).

En conclusió, aquests estudis demostren la seguretat de l'aplicació d'aquestes cèl·lules, però en cap cas s'ha aconseguit una millora de la supervivència o de la qualitat de vida del malalt evidenciant, com en els altres tipus cel·lulars descrits, que encara no s'ha trobat el tipus cel·lular idoni per a la regeneració del cor.

Taula 3. Proves clíniques amb injecció endocàrdica de cèl·lules derivades de moll d'os pel tractament de la insuficiència cardíaca crònica.

Estudi	N	Tipus cel·lular	Preparació cel·lular (volum/purificació/cultiu)	Nº mitjà de cèl·lules ($\times 10^6$)	Seguretat	Funció miocàrdica
Tse i col. ¹⁵⁶	8	CDMO	40 ml/Ficoll/no	No mostrat	+	↑Mobilitat i gruix de la paret ↓hipoperfusió
Fuchs i col. ¹⁵⁷	10	CDMO	Filtrades/no	78,3	+	↓angina ↓estrés induït per la isquèmia
Perin i col. ^{158, 159}	14	CDMO	50 ml/Ficoll/no	30	+	↓Contractibilitat global ↓volum sistòlic ↓defectes reversible de perfusió ↑capacitat d'exercici
Hendrikx i col. ¹⁶⁰	10 + 10 controls	CDMO	40 ml/Ficoll/overnight	60,3	+	= Contractibilitat global ↑contractibilitat regional
Mocini i col. ¹⁶¹	17 + 18 controls	CDMO		292	+	↑Fracció d'ejecció ↑Mobilitat de la paret

↑ indica increment; ↓ indica reducció; = indica sense canvis; + indica l'absència de reaccions adverses. CDMO, cèl·lules derivades de moll d'os.

5.2.4. Cèl·lules progenitores endotelials (sang perifèrica)

Aïllades per primera vegada per Asahara¹⁶² l'any 1997, les cèl·lules progenitores endotelials es desenvolupen a partir de cèl·lules mare hematopoètiques i són alliberades a la circulació des del moll de l'os¹⁶³. Poden ser aïllades a partir de la fracció leucocitària de la sang en circulació de diverses espècies animals adultes^{162, 164, 165} i també d'éssers humans adults¹⁶⁶, tot i que en petit nombre. Més recentment, també s'han aïllat de sang de cordó umbilical¹⁶⁷ i de les pròpies parets dels vasos¹⁶⁸. Les cèl·lules progenitores endotelials humanes es caracteritzen per l'expressió combinada entre d'altres, dels següents marcadors de superfície CD34, AC133 (o CD133) i el rVEGF-2^{162, 169, 170}. Aquestes cèl·lules poden diferenciar-se en cèl·lules endotelials funcionals *in vitro*, i s'ha demostrat que són mobilitzades en diferents processos patològics com l'IAM¹⁶³, la ICC¹⁷¹ i la miocardiopatia dilatada idiopàtica¹⁷², i que s'incorporen en llocs d'activa neovascularització^{146, 173, 174}.

Per tant, la revascularització del miocardi isquèmic podria ser un dels beneficis funcionals del trasplantament de les cèl·lules progenitores endotelials. De fet, Kocher i col·laboradors¹⁷⁵ van evidenciar que les cèl·lules progenitores endotelials humanes podien revascularitzar la cicatriu d'un infart de miocardi. Concretament, van aïllar cèl·lules progenitores endotelials de voluntaris humans i les van injectar per via venosa a rates atímiques dos dies després d'haver induït un infart de miocardi. Com a resultat, van observar que les cèl·lules humanes s'havien incorporat a la vasculatura de la regió infartada formant una circulació coronària quimèrica. Aquells animals que van rebre les cèl·lules van millorar la funció ventricular i es van detectar menys cardiòcits morint a la regió perinfart.

Posteriorment, s'han realitzat diversos estudis clínics utilitzant les cèl·lules progenitores endotelials en el tractament de l'IAM i la ICC^{146, 176-180}. Tot i les diferents poblacions cel·lulars utilitzades i les diferents vies d'aplicació (intravenosa vs. intracardíaca) en tots els casos, excepte un¹⁸⁰, es va demostrar que la teràpia era segura i produïa una millora en la contractibilitat global en els pacients tractats. A més, després d'un seguiment de 2 anys en l'estudi TOPCARE-AMI, es demostra clarament que la fracció d'ejecció es manté o augmenta respecte l'observada un any abans en els pacients tractats^{147, 181}.

Tot i les prometedores aplicacions per a la regeneració de teixits, la limitada freqüència d'aquestes cèl·lules en l'organisme (i encara més en pacients amb factors

de risc cardiovascular^{182, 183}), la baixa eficiència d'incorporació al cor (màxim un 10%¹⁸¹), el deteriorament en les seves propietats funcionals amb l'edat o la diabetis, i la seva baixa capacitat d'expansió *ex vivo* constitueixen importants limitacions per al trasplantament autòleg per a la regeneració del miocardi post-infart¹⁷⁰.

6. Cèl·lules mare mesenquimals

Les cèl·lules mare mesenquimals (MSC) són una població de cèl·lules aïllades originalment de l'estroma del moll de l'os, que és la regió no hematopoètica d'aquest teixit. Estudis de plaqueig indiquen que les MSC es troben presents en una freqüència molt baixa de menys d'una cèl·lula per cada 10^4 i 10^6 cèl·lules nucleades del moll de l'os¹⁸⁴. És

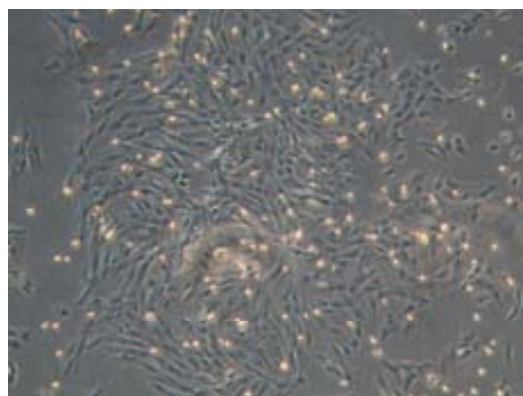


Fig. 14. Imatge de cèl·lules mare mesenquimals en cultiu captades amb el microscopi de contrast de fases.

a dir, uns 10 cops menys abundants que les cèl·lules mare hematopoètiques però amb l'avantatge que es poden expandir *in vitro* (figura 14), tot i mostrar una velocitat de creixement relativament baixa¹⁸⁵. En els darrers anys també s'han aïllat cèl·lules amb una morfologia i característiques similars a les MSC a partir d'altres teixits com sang perifèrica¹⁸⁶, teixit adipós¹⁸⁷, pell¹⁸⁸, os trabecular¹⁸⁹, pàncrees exocrí¹⁹⁰ i polpa dentària¹⁹¹. De fet, recentment, un estudi realitzat en ratolins ha demostrat que les MSC resideixen virtualment en tots els òrgans i teixits¹⁹².

Els primers grups que van aïllar MSC humanes ho van aconseguir a final dels anys 80 a partir de petits aspirats de moll d'os, i la primera evidència clara a la literatura és de Caplan al 1991¹⁹³. Aquest autor va demostrar que representen una població de cèl·lules multipotents amb capacitat de diferenciació cap a osteoblasts i condrocits. Més endavant, va ser Pittenger qui va expandir, caracteritzar fenotípicament i induir *in vitro* la diferenciació de les MSC en osteoblasts, condrocits i adipòcits¹⁹⁴.

Així, les MSC exhibeixen unes propietats úniques que han permès trencar amb el dogma que considerava que les cèl·lules mare derivades d'un teixit adult només poden produir llinatges característics del teixit en el que resideixen. Concretament, s'han descrit dues subpoblacions de MSC pluripotencials denominades MAPC (*Multipotent*

Adult progenitor Cells) i MIAMI (*Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible*), ambdues amb capacitat per diferenciar-se en tipus cel·lulars derivats de teixits de les tres capes embrionàries¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Aquest fenomen s'ha anomenat transdiferenciació.

A les MSC els hi manquen característiques específiques de teixit però sota les condicions apropiades es diferencien cap a cèl·lules especialitzades amb un fenotip diferent del precursor del qual provenen. S'especula que, en l'organisme adult, aquestes cèl·lules mare podrien ser reservoris de cèl·lules reparadores a punt per ser mobilitzades i diferenciades en resposta a múltiples situacions fisiopatològiques. Tot i així es desconeix encara el seu nivell de proliferació *in vivo*.

En el camp de la regeneració cardíaca, les MSC són, a priori, un bon tipus cel·lular a estudiar donat que, com el cor, aquestes deriven també del mesoderm. Els resultats publicats fins ara de l'ús de MSC en el tractament de l'infart de miocardi són prometedors. En models animals d'infart de miocardi, Shake i col¹⁹⁸ van demostrar que després d'injectar MSC al miocardi infartat, les cèl·lules empeltades van diferenciar-se cap a llinatge miogènic com s'evidenciava per l'expressió de α -actinina, troponina-T, tropomiosina i β -MHC entre d'altres. A més, la presència de connexina-43, proteïna responsable de la connexió intracel·lular i l'acoblament elèctric en les cèl·lules cardíques, suggeria una notable diferenciació cardiogènica. Tot i així, no es va observar que les MSC mostressin l'organització d'un sarcòmer madur, fet que sí que s'havia evidenciat quan les cèl·lules eren injectades en un miocardi sa¹⁹⁹. No obstant això, tot i sense una completa diferenciació cap a cardiòcits en el teixit infartat, la regeneració cardíaca promoguda per les MSC ha estat associada amb un gran nombre de millores funcionals del cor post-infart. El mateix Shake va descriure que els empelts de MSC prevenien l'aprimament patològic de la paret del miocardi en un 30% al cap de 12 setmanes i milloraven l'hemodinàmica del cor després de l'infart¹⁹⁸. També va observar una disminució significativa de la pressió tele-diastòlica (\approx 50% als 6 mesos) en els animals tractats, fet que suggeria una millora en la relaxació i reducció de l'estrès de la paret del ventricle probablement atribuïble a un remodelat ventricular favorable²⁰⁰. El conjunt d'aquests resultats suggereix que la implantació de MSC al miocardi danyat resulta en un ventricle menys rígid i millora les propietats de la funció diastòlica del ventricle.

Donat que el manteniment de la funció cardíaca depèn críticament d'un bon aport de sang, per restaurar la funció cardíaca després d'un IAM, serà cabdal la

revascularització de la regió infartada. Diversos treballs han demostrat que MSC injectades després d'un infart de miocardi milloren la vascularització del teixit danyat i que poden diferenciar-se en cèl·lules endotelials²⁰¹. Aquesta contribució vindria afavorida per la secreció per part de les MSC d'una gran varietat de citoquines com el VEGF, el FGF o el TGF- β entre d'altres, promotors de processos de neoangiogènesi^{202, 203}.

Una altra característica important de les MSC és que tenen un fenotip de la superfície cel·lular que és molt poc immunogènic^{194, 204, 205}. S'ha demostrat que els empelts de MSC al·logèniques es mantenen en diferents teixits durant llargs períodes sense immunosuprimir els animals model^{206, 207}. Concretament, estudis realitzats pel grup de Pittenger, en rates i porcs no immunodeprimits han demostrat que les MSC al·logèniques s'implanten a la regió infartada del miocardi i milloren la funció cardíaca sense evidències de rebuig immunològic o infiltració limfocitària²⁰⁸. Si això es comprovés en l'ésser humà, s'obriria la possibilitat d'utilitzar MSC al·logèniques immediatament després de l'IAM, fet que esdevindria una avantatge clínic sobre l'ús de cèl·lules autòlogues.

En resum, l'ús potencial de les MSC per reparar el teixit cardiovascular danyat és molt prometedor si fem cas als resultats de molts laboratoris. Però la majoria dels estudis que s'han discutit, s'han realitzat en el model animal murí o porcí. En relació als primers assaigs clínics basats en l'ús de MSC, Chen i col.²⁰⁹ van injectar 18 dies post-IAM al voltant de 10^{11} cèl·lules per via intracoronària i observaren una millora significativa de la funció cardíaca en els 6 mesos de seguiment. En un estudi posterior, es va observar una millora significativa en la fracció d'ejecció als 3 mesos en pacients amb ICC als quals s'havia injectat 5 milions de MSC per via intracoronària²¹⁰. El desembre de 2005 va iniciar-se a Dinamarca un assaig clínic en fase I/II per avaluar la seguretat i els efectes clínics de MSC autòlogues cultivades *ex vivo* injectades intramiocàrdicament en 46 pacients amb isquèmia miocàrdica crònica severa. Aquest assaig acabarà el novembre de 2009 i s'espera que aporti noves dades sobre la utilitat de les MSC en la teràpia cel·lular aplicada a la regeneració del cor. Per altra banda, diverses empreses biotecnològiques han apostat per desenvolupar teràpies basades en el trasplantament de MSC. Un exemple d'aquesta aposta és el de l'empresa Osiris Therapeutics que disposa de 3 productes en fase clínica basats en l'ús de les MSC, un

dels quals, encara en fase clínica I, amb l'objectiu de tractar el miocardi després d'un IAM.

En resum, es comença a disposar d'informació de les MSC humanes amb resultats interessants però aquesta encara és limitada i insuficient per assegurar definitivament que són les cèl·lules òptimes per a la cardiomioplàstia cel·lular. Per altra banda, i com veurem a continuació, s'han identificat altres fonts de MSC alternatives al moll de l'os, de les quals una de les més atractives i prometedores és el teixit adipós.

6.1. Cèl·lules mare derivades de teixit adipós

El teixit adipós ha estat considerat durant molt temps un teixit poc actiu que creixia de manera indesitjada. Aquest era estudiat per la seva implicació en el metabolisme energètic i en desordres com la diabetis i l'obesitat²¹¹. Més recentment, però, s'ha vist que les seves funcions endocrines juguen un paper clau en moltes situacions fisiològiques com la inflamació i la immunitat²¹².

El teixit adipós és un teixit d'origen mesenquimal, molt complex i format per adipòcits madurs, preadipòcits, fibroblasts, cèl·lules musculars llises de la vasculatura, cèl·lules endotelials, monòcits/macròfags residents^{213, 214} i limfòcits²¹⁵.

Les cèl·lules de la fracció estromal-vascular del teixit adipós, és a dir, les cèl·lules no-adipocítiques del teixit adipós²¹⁶, cada vegada són més protagonistes de l'escena de la recerca amb cèl·lules mare^{211, 217} perquè aquest compartiment conté una font rica de cèl·lules pluripotents, les cèl·lules progenitores del teixit adipós o de l'acrònim en anglès ATPC (*Adipose Tissue Progenitor Cells*)^{187, 218}.

Fins ara, les ATPC s'han obtingut a partir de greix subcutani. No tots els tipus de greix, però, contenen el mateix tipus de cèl·lules. Com a mínim en el model murí, hi ha una creixent evidència de que tan la composició cel·lular com la capacitat de diferenciació de les ATPC varien en funció de la localització del teixit adipós²¹⁷. En humans, encara no hi ha prou dades que suportin aquesta observació. No obstant això, degut a que les diferents localitzacions dels teixits grassos tenen les seves pròpies característiques metabòliques, activitat lipolítica, composició d'àcids grassos i perfil d'expressió gènica, la font de teixit adipós (subcutani abdominal, subcutani

perifèric o visceral) podria tenir una gran influència en les característiques de les ATPC.

6.1.1. ATPC derivades de greix subcutani

Les ATPC derivades de teixit adipós subcutani (subATPC) han emergit com un nou i prometedor tipus de cèl·lula mare amb tres propietats avantatjoses enfront dels anteriorment esmentats. La primera és la facilitat i la gran quantitat en la que es pot obtenir el teixit adipós en l'ésser humà adult mitjançant una tècnica quirúrgica mínimament invasiva: la liposucció (figura 15). La segona és la facilitat amb la que les subATPC poden ser aïllades d'aquest teixit mitjançant digestió enzimàtica^{187, 219, 220} i, per últim, la seva major velocitat de creixement *in vitro*. Això ha provocat que aquesta font de MSC esdevingui molt atractiva per als investigadors. Anàlisis comparatius entre les propietats de les MSC obtingudes de moll d'os i teixit adipós han demostrat que ambdós tipus cel·lulars no presenten diferències morfològiques, d'immunofenotip, d'èxit d'aïllament, patró d'expressió de marcadors de superfície, capacitat de diferenciació i menys d'un 1% de diferència en relació al patró d'expressió gènica^{184, 218, 221, 222}.

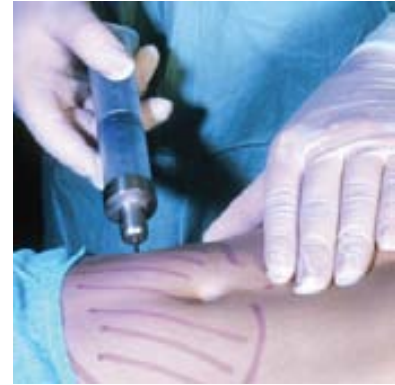


Fig. 15. Imatge d'un cirurgià realitzant una liposucció a l'abdomen.

En relació a la seva pluripotencialitat, les subATPC mostren capacitat de diferenciació cap a os, cartílag, tendons, múscul esquelètic i greix^{187, 220, 221, 223}. La diferenciació cardiomiogènica de les subATPC també s'ha demostrat basant-se en la seva morfologia, l'expressió de determinades proteïnes cardíaques i el batec espontani després de l'exposició a la 5-aza¹²⁶ o a extractes de cardiòcits de rata²²⁴. Un dels resultats més significatius però, és la demostració de que algunes de les ATPC obtingudes a partir de mostres de greix bru, poden diferenciar-se espontàniament vers cardiòcits²²⁵, fet que fins ara, semblava reservat exclusivament a les cèl·lules mare embrionàries. Sembla clar però, que aquestes cèl·lules eren força diferents de les subATPC ja que aquestes últimes no ho fan espontàniament i necessiten ser tractades.

Es disposa d'un nombre limitat d'estudis que hagin explorat l'ús, el comportament i l'efecte de les subATPC *in vivo* en models d'infart de miocardi. Kratz i col.²²⁶ van demostrar que el trasplantament de subATPC millorava l'estructura i la funció cardíaca en un model murí d'infart agut amb reperfusió. No obstant això, les cèl·lules injertades no van mostrar ni una morfologia ni l'expressió de proteïnes característiques d'un cardiòcit. De la mateixa manera, Mazo i col.²²⁷ van observar una millora funcional, augment de l'angiogènesi i reducció de la fibrosi en injectar subATPC en un model d'infart crònic en rata però no van detectar cèl·lules a les 4 setmanes postinjecció. Miyahara i col.²²⁸ van reportar una aplicació innovadora de les subATPC trasplantant-les com una matriu monocapa sobre el cor de rates 4 setmanes després d'induir l'infart. L'anàlisi histològic posterior va demostrar que la monocapa de subATPC va créixer i engruixir sobre la regió de múscul infartat incloent la formació de nous vasos i d'alguns cardiòcits.

Les subATPC també poden diferenciar-se cap a cèl·lules endotelials *in vitro*^{229, 230} i *in vivo*^{229, 230} i a més contribuir addicionalment a través de senyals paracrines. Les subATPC secreten multitud de factors proangiogènics i antiapoptòtics tals com el VEGF, el HGF o el TGF- β que podrien afavorir l'angiogènesi o conferir una certa protecció cardiovascular²³¹.

6.1.2. Greix epicàrdic

El teixit adipós epicàrdic és un greix visceral toràcic que envolta aproximadament el 80% de la superfície del cor²³² i constitueix al voltant d'un 20% del pes de la massa ventricular²³²⁻²³⁴. Malgrat no ha estat tan estudiat com el greix subcutani o el greix visceral abdominal²³⁵, es coneix que té el mateix origen que el greix mesentèric i el de l'oment o epipló, formant-se a partir del mesoderm esplagnoplèuric associat a l'intestí²³⁶. Anatòmicament es troba localitzat sobre la base del cor, la superfície de les artèries coronàries, a la base dels grans vasos i sobre el ventricle dret i l'àpex²³⁷. Per altra banda, el ventricle dret té de 3 a 4 vegades més de greix epicàrdic²³⁵.

El greix epicàrdic presenta característiques diferencials que inclouen entre d'altres, adipòcits de mida més petita, diferent composició d'àcids grassos, un contingut proteic més elevat i nivells més baixos de consum de glucosa que d'altres greixos viscerals²³⁸. S'hipotetitza que, com els altres greixos blancs, el greix

epicàrdic podria participar activament en l'emmagatzematge de lípids, la secreció d'hormones, citoquines i quemoquines²³⁹.

Al greix epicàrdic però, se li atribueixen moltes altres funcions. La proximitat anatòmica entre el teixit gras epicàrdic i el miocardi suggereix que podrien existir interaccions locals entre ambdós teixits. En condicions fisiològiques, el greix epicàrdic podria participar en l'homeòstasi dels àcids grassos de la microcirculació coronària actuant com un sistema tampó gràcies a les 2 vegades més de lipòlisi i lipogènesi observades^{240, 241}. De la mateixa manera, donat que el cor i el greix epicàrdic comparteixen el mateix aport de sang, i gràcies a l'alta capacitat de captació d'àcids grassos del greix epicàrdic²⁴¹, aquest podria protegir dels nivells excessivament alts que interfereixen en la generació i propagació del cicle contràctil al cor i que causen arítmies ventriculars i alteracions en la repolarització²⁴²⁻²⁴⁴. Per altra banda, la seva gran activitat lipolítica suggereix que podria servir com a font local d'energia en moments d'alta demanda, especialment en condicions isquèmiques²⁴¹. El greix epicàrdic podria secretar també productes vasoactius que poden regular el to coronari arterial, per exemple l'*adipocyte-derived relaxing factor*, una proteïna vasodilatadora recentment aïllada del greix periadventici arterial mesentèric i aòrtic^{245, 246}. Per últim, la recent demostració de la interacció entre el teixit adipós i el múscul esquelètic, on els factors secretats per els adipòcits poden influenciar en el metabolisme del múscul²⁴⁷, fa pensar que el greix epicàrdic podria afectar de forma similar al múscul cardíac provocant una alteració en la contractibilitat cardíaca²³⁵. Les característiques del greix epicàrdic, juntament amb les dels adipòcits de produir un ventall de citoquines que afecten a la vasculatura^{248, 249} i el contacte directe entre el greix i l'adventícia de les artèries coronàries sense capa fibrosa que impedeixi la difusió de les adipoquines i els àcids grassos, suggereix que el greix epicàrdic podria jugar un rol important en la gènesi i progressió de les malalties cardiovasculars²³⁵.

En resum, el greix epicàrdic és un teixit poc estudiat fins ara, però el seu contacte directe amb el cor i les evidents interaccions amb aquest, fan pensar que podria contenir una població de cèl·lules mesenquimals amb unes característiques úniques que podrien ser molt útils en el camp de la regeneració cardíaca.



Calvin i Hobbes de Bill Watterson

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Hipòtesi:

Les cèl·lules mare mesenquimals humanes tenen la capacitat de regenerar el teixit miocàrdic danyat, de manera parcial o completa, després d'un infart agut de miocardi.

Objectius:

- Principal:

Identificar el tipus de cèl·lula mare mesenquimal adulta òptim per a la regeneració de la cicatriu que s'origina després d'un infart agut de miocardi.

- Específics:

1. Aïllar i caracteritzar *in vitro* les cèl·lules mare adultes derivades de moll d'os, greix subcutani i epicàrdic.
 - 1.1. Caracterització del patró immunofenotípic.
 - 1.2. Determinació del temps de duplicació.
 - 1.3. Estudi de l'expressió basal de marcadors cardíacs a nivell gènic i proteic.
 - 1.4. Anàlisi de la pluripotencialitat cap a llinatge adipogènic i osteogènic.
2. Estudiar la diferenciació cap a cardiòcits mitjançant estímuls físics, químics i biològics.
3. Estudiar la diferenciació cap a cèl·lula endotelial del tipus cel·lular escollit als objectius 1 i 2.
4. Estudi de l'efecte del trasplantament del tipus cel·lular escollit als objectius 1 i 2 en un model animal d'infart agut de miocardi.
 - 4.1. Anàlisi morfològica.
 - 4.2. Anàlisi de la funció cardíaca.
 - 4.3. Determinació de la densitat vascular del teixit miocàrdic.
 - 4.4. Detecció de les cèl·lules implantades en el miocardi i anàlisi del seu grau de diferenciació cardiogènica i endotelial.

“La teoria és assassinada, tard o d’hora, per l’experiència”

Albert Einstein

MATERIALS I MÈTODES

EXPERIMENTACIÓ *IN VITRO*

1. Aïllament i cultiu cel·lular

1.1. Cèl·lules mare mesenquimals derivades de moll d'os

Les mostres de moll d'os de l'estern s'han obtingut de malalts que havien de ser sotmesos a cirurgia cardíaca a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. En tots els casos, sempre s'ha demanat prèviament el consentiment informat al pacient.

Les cèl·lules es van obtenir seguint el següent protocol descrit prèviament²⁵⁰ i amb més detall a continuació:

1. Aspirar la mostra de moll d'os d'estern amb una xeringa hipodèrmica de 14G de pas carregada amb 6000 U d'heparina.
2. Afegir tampó PBS suplementat amb 2% BSA (Sigma), 0,6% citrat sòdic i 1% penicil·lina-estreptomicina (P/S)(Gibco) fins un volum màxim de 35 ml, intentant disgregar els fragments més sòlids de moll d'os.
3. Dur a terme un gradient de densitat afegint la dilució cel·lular final sobre 15 ml de Lymphoprep (1,077 g/ml).
4. Centrifugar a 2500 rpm 20 min a 20°C.
5. Recuperar la interfase rica en cèl·lules mononucleades i rentar amb tampó PBS suplementat amb 2% BSA, 0,6% citrat sòdic i 1% P/S (Gibco).
6. Centrifugar a 1200 rpm 10 min a T^a ambient.
7. Finalment, resuspendre cèl·lules directament en 1 ml de medi de cultiu complet corresponent a α -MEM (medi mínim essencial d'alfa; Gibco) suplementat amb 10% (V/V) sèrum fetal boví (FBS; Gibco) inactivat per calor i 1% P/S.
8. Determinar la concentració i viabilitat de les cèl·lules aïllades segons el mètode d'exclusió amb blau de tripà.

Un cop s'han contat les cèl·lules mononucleades obtingudes, se sembren a una densitat de 10^6 cèl·lules viables/cm² en medi α -MEM + 10% FBS + 1% P/S i es cultiven entre 3 i 7 dies. Aquest període serveix per seleccionar les MSC ja que aquestes s'adhereixen al fons del flascó de cultiu mentre que la resta de tipus cel·lulars presents es mantenen en suspensió. Passat aquest temps es retira el medi de cultiu i es renta el flascó 2 cops amb PBS per eliminar les cèl·lules que puguin quedar en suspensió. Tot seguit s'afegeix medi de cultiu α -MEM + 10% FBS + 1% P/S i s'estableix el cultiu primari.

1.2. Cèl·lules derivades de teixit adipós

El greix epicàrdic (0,5 - 1 g) s'obté en cirurgies cardíaques rutinàries de la base de l'artèria aorta. En la mateixa cirurgia s'obté també, el greix subcutani (\approx 5 g) situat entre la pell i l'estern. En ambdós tipus de teixit adipós es segueix el mateix protocol d'aïllament cel·lular (protocol adaptat a partir del descrit per Martínez-Estrada i col²⁵¹):

1. Rentar repetidament el fragment de greix amb PBS per eliminar la sang del teixit.
2. Tallar en petits fragments eliminant tots els vasos possibles per reduir la contaminació amb cèl·lules endotelials.
3. Digerir durant 30 min a 37°C i agitació constant amb 10 ml de solució estèril 0,05% de col·lagenasa II (5 mg col·lagenasa / 10 ml α -MEM). Cada 10 min s'ajudarà a disgregar mecànicament pipetejant amb una pipeta de 25 ml.
4. Afegir 20 ml de medi α -MEM + 10% FBS + 1% P/S (medi complet) per inactivar la col·lagenasa.
5. Centrifugar la suspensió cel·lular durant 10 min a 1200xg.
6. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el botó amb 10 ml de medi complet.
7. Sembrar en un flascó de 25 cm² i cultivar a 37°C en atmosfera al 5% CO₂.
8. A les 24h retirar el medi per eliminar les cèl·lules que no s'han enganxat i afegir medi complet fresc.

1.3. Cultiu cel·lular

Un cop s'han establert els diferents cultius primaris el medi de cultiu es canvia cada 3-4 dies. Els cultius es mantenen fins a arribar a un 70% de confluència, es tripsinitzen i es ressemblen a un concentració, determinada com a òptima, de 1000 cèl·lules viables/cm² en medi fresc. El medi fresc proporciona de nou a les cèl·lules tots aquells nutrients que s'estaven exhaurint (glucosa, glutamina, altres aminoàcids, vitamines,...) i s'eliminen tots aquells subproductes cel·lulars que poden tenir un efecte tòxic per a la cèl·lula (amoni i lactat, per exemple).

Aquests cultius permeten disposar sempre d'un estoc de cèl·lules mare mesenquimals derivades de moll d'os (MSC) i cèl·lules mare derivades de teixit adipós subcutani (subATPC) i epicàrdic (epiATPC) a partir del qual es poden fer créixer els inòculs per dur a terme els diferents experiments.

Medi de cultiu

El medi base que s'utilitza pel cultiu dels diferents tipus de cèl·lules humanes utilitzades en aquesta tesi és l' α -MEM de Gibco. Aquest medi comercial conté les sals inorgàniques, aminoàcids i vitamines imprescindibles pel creixement de les cèl·lules. La seva formulació exacta es troba detallada a la següent pàgina web: http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.109.html

La presència de NaHCO₃ al medi permet mantenir el pH d'aquest a un valor inicial de 7,1 que és l'òptim requerit pel cultiu de cèl·lules. El control de pH es porta a terme mitjançant el tampó CO₂-NaHCO₃ que requereix la presència d'una atmosfera de 5-10% de CO₂ al cultiu en un incubador de CO₂.

És necessari complementar el medi base amb els components següents (quantitats per 500 ml de medi) per obtenir el medi complet (medi estàndard):

FBS (Gibco)	50 ml
Penicil·lina/Estreptomicina 100X (Gibco)	5 ml

Taula 1. Suplements per al medi α -MEM.

2. Assaig de clonogenicitat

L'assaig de clonogenicitat o de formació de colònies és un assaig *in vitro* basat en l'habilitat d'una sola cèl·lula de créixer i formar una colònia²⁵². El protocol està basat, amb petites modificacions, a l'anteriorment descrit^{253, 254} que consisteix en deixar créixer cèl·lules individuals (clons) a l'interior dels cilindres de clonatge.

1. Sembrar les cèl·lules a una densitat inicial de 400 cèl·lules en una placa de petri de 100 cm².
2. A les 24h localitzar clons individuals i marcar-los de manera que puguin ser localitzats a ull nu.
3. Retirar el medi de cultiu.
4. Ràpidament, posar els cilindres de clonatge d'un centímetre de diàmetre (Sigma; ref. C2059) als quals prèviament haurem aplicat grassa de silicona estèril (Sigma; ref. Z273554) per què esdevinguin estancs, envoltant cada un dels clons.
5. Afegir tant ràpid com es pugui, per evitar que s'assequin les cèl·lules, 200 µl de medi de clonatge (α -MEM + 20% FBS + 1% P/S).
6. Cultivar a 37°C en atmosfera al 5% CO₂.
7. Canviar el medi cada 48h i observar al microscopi per seguir-ne l'evolució.

3. Anàlisi d'expressió gènica

3.1. RT-PCR a temps real

Aïllament de l'RNA total de mostres de teixit i cèl·lules:

L'aïllament de l'RNA total, tant de cèl·lules com dels teixits, es va dur a terme amb el RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN) seguint el protocol del fabricant (http://www1.qiagen.com/HB/RNeasyPlusMicroKit_EN).

L'RNA obtingut va ser quantificat amb l'espectrofotòmetre GeneQuant Pro (Biochrom Ltd.).

Retrotranscripció:

La reacció de retrotranscripció per obtenir el cDNA es va dur a terme a partir de 2 µg de l'RNA obtingut amb l'*iScript One-Step RT-PCR kit* (Bio-Rad) seguint el protocol del fabricant i amb els volums següents:

- Volum final reacció: 50 µl
 - 25 µl *2X RT-PCR reaction*
 - (21,5-X) µl H₂O lliure de nucleases
 - X µl RNA (~2 µg)
 - 2,5 µl (≈250 nM) *Random hexamers* (50 µM) (Qiagen)
 - 1 µl *iScript Reverse Transcriptase* (50X)

i amb les següents condicions del termociclador (Bio-Rad):

- 10 min a 25°C (o T^a ambient) (anellament d'hexàmers)
- 10 min a 50°C (síntesi de cDNA)
- 5 min a 95°C (inactivació de la transcriptasa reversa)

PCR a temps real:

Les amplificacions es van dur a terme amb 2 µl de cDNA i en un volum final de 50 µl que contenia:

- 21 µl H₂O estèril
- 25 µl *TaqMan 2X Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems)
- 2 µl cDNA (directe o dilució corresponent)*
- 2 µl sonda (cebadors)**

*Banc de dilucions de cDNA utilitzat per quantificar pel mètode de la corba estàndard (6 punts):

- 1 (directe), 1/2, 1/5, 1/10, 1/50 i 1/100.

**Totes les sondes utilitzades estaven marcades amb FAM i van ser adquirides a Applied Biosystems:

- Gens d'expressió constitutiva:
 - gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH) (Hs99999905_ml)
 - 18s (Hs99999901_s1)
- Gens cardíacs:
 - GATA-4 (Hs00171403_ml)
 - Nkx2.5 (Hs00231763_ml)
 - α -actinina sarcomèrica (Hs00241650_ml)
 - cadena pesada de la β -miosina (β -MHC) (Hs00165276_ml)
 - connexina-43 (Cx-43) (Hs00748445_s1)
 - SERCA-2 (Hs00544877_ml)
 - troponina I cardíaca (cTnI) (Hs00165957_m1)
 - Tbx5 (Hs00361155_ml)
 - islet-1 (Hs00158126_m1)
- Gens endotelials:
 - VCAM-1 (Hs00365486_m1)
 - vWF (Hs00169795_m1)
 - VE-caderina (Hs00174344_m1)
 - CD34 (Hs00990732_m1)
 - EGR-3 (Hs00231780_m1)
 - CD102 (Hs00168384_m1)
 - CD36 (Hs00169627_m1)
 - VEGF-A (Hs00173626_m1)
 - EGR-1 (Hs00152928_m1)
 - CD31 (Hs00169777_m1)
 - SDF-1 (Hs00930455_m1)
 - CXCR-4 (Hs00237052_m1)

Anàlisi de dades

Les dades obtingudes es van analitzar amb el programa *ABI Prism 7000 Sequence Detection System*. La quantitat relativa obtinguda del gen diana va ser calculada amb el mètode de la corba estàndard utilitzant el gen GAPDH com a

referència endògena quan l'RNA provenia de cèl·lules en cultiu i el gen 18s quan l'RNA provenia de teixit. Les comparacions pel que fa als nivells d'expressió relativa entre diferents mostres es van fer amb el mètode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrit per Livak i col.²⁵⁵.

4. Anàlisi d'expressió proteica

4.1. Citometria de flux

Per analitzar el fenotip de les diferents cèl·lules mesenquimals s'utilitzà la tècnica de citometria de flux. El citòmetre de flux és un aparell que ens permet identificar cèl·lula a cèl·lula la presència o absència d'una determinada proteïna prèviament marcada amb un anticòs unit a una molècula fluorescent.

Es van estudiar un conjunt de marcadors o proteïnes de superfície. Els marcadors de superfície (sovint abreviats com CD, de *cluster of differentiation*) són proteïnes de membrana amb un domini extracel·lular, l'expressió o absència de les quals permet identificar un determinat estat o tipus cel·lular.

Els anticossos utilitzats, volums i isotip es troben resumits a la taula 2:

Antigen	Marcatge	Isotip	Volum	Casa comercial	Referència
CD105	FITC	IgG1	10 µl Ab/10 ⁶ cels. en 100 µl	Serotec	MCA 1557F
CD117	PE	IgG1 κ	10 µl Ab/ 100 µl	BD Pharmingen	555714
CD106	FITC	IgG1	20 µl Ab/10 ⁶ cels. en 100 µl	BD Pharmingen	551146
CD34	PE	IgG1	20 µl /100 µl	BD	345802
CD44	FITC	IgG2b κ	20 µl Ab/10 ⁶ cels. en 100 µl	BD Pharmingen	555478
CD45	FITC	IgG1	20 µl Ab /100 µl	BD	345808
CD14	FITC	IgG2b	20 µl Ab/100 µl	BD	345784
CD29	PE	IgG2a κ	20 µl Ab/10 ⁶ cels. en 100 µl	BD Pharmingen	556049
CD166	PE	IgG1 κ	20 µl Ab/10 ⁶ cels. en 100 µl	BD Pharmingen	559263
CD90	PE	IgG1	10 µl Ab/ 100 µl	BD Pharmingen	555596

Taula 2. Anticossos utilitzats per la determinació fenotípica de les cèl·lules per citometria de flux.

El protocol seguit va ser el següent:

1. Posar 100 µl de la suspensió cel·lular que conté entre $1-3 \cdot 10^5$ cèl·lules viables en tubs de propilè de fons rodó de 4 ml per a Coulter EPICS XL i rentar amb 2 ml de PBS-BSA (1% BSA (Sigma), 0.1% Azida (Sigma)). Totes les incubacions es realitzen en aquests tubs de fons rodó per optimitzar el contacte entre les cèl·lules i els anticossos.
2. Centrifugar 5 min a 1300 rpm a T^a ambient, decantar el sobrenedant i raspar els tubs sobre una gradeta per tal de disgregar les cèl·lules.
3. Resuspendre les cèl·lules en 100 µl de PBS-BSA per tal de realitzar la reacció immunològica.
4. Afegir entre 10 i 20 µl d'anticòs o control isotípic marcats amb fluorocroms i incubar 30 min a T^a ambient i protegit de la llum. Agitar lleugerament els tubs cada 10 min aproximadament. Veure taula 2 per determinar la quantitat d'anticòs a afegir.
5. Afegir 2 ml de PBS-BSA i passar pel vòrtex suaument.
6. Centrifugar 5 min a 1300 rpm, resuspendre en 400 µl de PBS-BSA.
7. Analitzar al més aviat possible (màxim 1h) amb el citòmetre (Coulter EPICS XL) utilitzant el protocol corresponent per cada parella de marcadors. S'analitzaran unes 10.000 cèl·lules viables per cada marcador.

4.2. *Western-blot*

4.2.1. Obtenció d'extractes proteics a partir d'un cultiu cel·lular

4.2.1.1. Proteïna total

Per dur a terme *western-blot*, primer, és necessari fer una extracció total de les proteïnes cel·lulars. Per extreure el contingut proteic total de cèl·lules en cultiu s'ha utilitzat el protocol següent:

1. Treure el medi de cultiu del flascó i rentar 3 vegades amb tampó PBS. A partir d'aquest punt es treballarà en fred (sobre gel).

2. Afegir el tampó de lisi (20mM HEPES, pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glicerol i 1% Tritó X-100) suplementat amb un còctel d'inhibidors de proteases (1mM PMSF, 1µg/ml leupeptina i 1µg/ml aprotinina). La quantitat de tampó de lisi a afegir dependrà de la quantitat de cèl·lules que es tingui. Preferiblement és millor que la mostra final estigui concentrada i si cal es pot diluir.
3. Rascar les cèl·lules amb un raspador i passar el volum recuperat en un eppendorf.
4. Deixar 30 min en gel i centrifugar a la microcentrífuga a 13.000 rpm a 4°C durant 20-30 min.
5. Guardar les mostres a -80°C o quantificar la concentració de proteïna.

4.2.1.2. Proteïnes nuclears

1. Tripsinitzar un mínim d' $1,5 \times 10^6$ cèl·lules.
2. Rentar les cèl·lules amb PBS 3 vegades i posar-les en un tub eppendorf.
3. Centrifugar 10 min a 4000 rpm.
4. Resuspendre les cèl·lules en 100 µl de solució A freda.
Solució A:
 - 10 mM HEPES, pH 7,9
 - 1 mM EDTA
 - 1 mM EGTA
 - 10 mM KCl
5. Afegir 1 mM DTT, 1 mM PMSF i el còctel d'inhibidors de proteases (descriu a 4.2.1.1).
6. Homogeneïtzar 15 min.
7. Deixar 10 min en gel.
8. Afegir NP-40 a 0,5%.
9. *Vortexar 15''*.
10. Centrifugar a 8000 rpm durant 15 min a 4°C. Els pèl·lets són la fracció nuclear, el sobrenedant la part citosòlica.

11. Retirar el sobrenedant i si es vol conservar afegir-hi 0,2 ml de glicerol i conservar a -80°C .
12. Resuspendre el pèl·let amb 50 μl de solució A + 20% glicerol + 0,4 M KCl.
13. Agitar suaument durant 30 min a 4°C .
14. Fer un *spin* i emmagatzemar a -80°C .

4.2.2. Obtenció d'extractes proteics totals a partir de mostres de teixit

1. Pesar el teixit sense que arribi a descongelar-se i afegir el tampó de lisi fred complementat amb el mateix còctel d'inhibidors de proteases de l'apartat anterior, segons la relació següent: 2 ml tampó de lisi per gram de teixit.
2. Homogeneïtzar la mostra, tallant primer, el màxim possible, amb el bisturí sobre un suport fred.
3. Tornar a col·locar els fragments a l'ependorf amb el tampó de lisi i acabar d'homogeneïtzar amb la mà de morter motoritzada (*pellet pestle*, Fisher Scientific), sempre amb l'ependorf en gel perquè no s'escalfi. Fer-ho ben a pop a poc per què no vessi i perquè el tampó de lisi vagi actuant.
4. Deixar en gel 15-30 min per acabar de lisar.
5. Centrifugar en la microcentrífuga a 13.200 rpm (màxima velocitat) durant 30 min a 4°C .
6. Recuperar el sobrenedant (on tenim les proteïnes dissoltes) i guardar-lo congelat a -80°C fins que es determini la concentració de proteïna total. Es pot guardar el pèl·let per si es vol realitzar un altre tipus d'assaig, com per exemple RT-PCR.
7. Si hi ha molt pèl·let, es pot afegir més tampó de treball, resuspendre i tornar a centrifugar en les mateixes condicions anteriors, tot i que, per norma general, no es recupera molta més quantitat de proteïna.

4.2.3. Quantificació de proteïna total d'una mostra

Un cop obtinguts els extractes proteics a partir de cèl·lules o teixit, s'ha de quantificar la proteïna total per igualar les quantitats de les diferents mostres que es carreguen al gel d'electroforesi.

1. Preparar el patró de concentracions conegudes a partir d'una solució de BSA (Sigma) a 2 mg/ml (= 2 µg/µl) en tampó de lisi (20mM HEPES, pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glicerol i 1% Tritó X-100).

– Patró:

- 0 µg/µl → 100 µl tampó de lisi
- 0,2 µg/µl → 1:10 → 10 µl BSA + 90 µl tampó de lisi
- 0,4 µg/µl → 1:5 → 20 µl BSA + 80 µl tampó de lisi
- 0,8 µg/µl → 1:2.5 → 40 µl BSA + 60 µl tampó de lisi
- 1,0 µg/µl → 1:2 → 50 µl BSA + 50 µl tampó de lisi
- 1,2 µg/µl → 1:1.7 → 58.8 µl BSA + 41.2 µl tampó de lisi
- 1,6 µg/µl → 1:1.125 → 80 µl BSA + 20 µl tampó de lisi
- 2,0 µg/µl → 100 µl BSA

La determinació es realitza amb el *kit Biorad D_C Protein Assay* (Bio-rad) de la manera següent:

2. Preparar la solució A' = 20 µl Solució S / ml solució A.
3. Afegir 500 µl de solució A' a cada tub del patró i de les mostres.
4. *Vortexar*.
5. Afegir 4 ml de solució B i *vortexar* el tub tot seguit.
6. Deixar 15 min a T^a ambient.
7. Llegir a l'espectrofotòmetre a 750 nm.

4.2.4. Western-blot

El *western-blot* és una tècnica que permet identificar la presència d'una proteïna específica en un extracte proteic.

Solucions necessàries:

- TBS (1X) a pH = 7,5
 - 20 mM Tris (TRIZMA BASE-Sigma)
 - 140 mM NaCl
- Tween 20 al 10%
 - Aigua milliQ
 - 10% Tween 20 (Sigma)
- Acrilamida/bisacrilamida 37,5/1 al 30%**
 - 146 g acrilamida
 - 4 g bisacrilamida
 - H₂O_{bd} fins a 500 ml

**Filtrar amb paper de filtre.

Nota: També es pot comprar ja preparada (Bio-Rad, ref. 161-0158).

Nota2: L'acrilamida i la bisacrilamida són potents neurotòxics quan no estan polimeritzats, així que s'han de manipular amb guants i sota campana o amb mascareta.

- Tris 1,5 M pH 8,8
 - 18,17 g Tris (TRIZMA BASE - Sigma)
 - 4 ml SDS al 10%
 - H₂O_{bd} fins a 100 ml
- Tris 0,5 M pH 6,8
 - 6,06 g Tris
 - 4 ml SDS al 10%
 - H₂O_{bd} fins a 100 ml
- Gel separador (volums en ml per omplir 2 gels de 0,75 mm (taula 3))

Solucions estoc	Concentració final d'acrilamida en el gel separador (%)								
	5	7	7,5	8	9	10	12	13	15
30% acrilamida/ 0,8% bisacrilamida	2,5	3,5	3,75	4,0	4,5	5,0	6,0	6,5	7,5
4X Tris/SDS pH = 8.8	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
Aigua mQ	8,75	7,75	7,5	7,25	6,75	6,25	5,25	4,75	3,75
10% Persulfat amònic*	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED**	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Taula 3. Productes i volums necessaris per la preparació del gel separador. *Persulfat amònic (Bio-Rad); **TEMED (Bio-Rad). El % utilitzat dependrà del pes molecular de la proteïna d'interès.

- Gel concentrador al 4% d'acrilamida (volums en ml per omplir dos gels (taula 4):

30% acrilamida/0,8% bisacrilamida	1,95
4X Tris/SDS pH = 6.8	3,75
Aigua mQ	9,15
10% Persulfat amònic	0,075
TEMED	0,03

Taula 4. Composició en ml del gel concentrador.

- Tampó d'electroforesi
 - 100 ml SDS 10%
 - 144 g glicina (USB corporation)
 - 30,25 g Tris
 - H₂O_{bd} fins a 1 litre.

Nota: Es guarda a 4°C i es pot reutilitzar.

- Tampó de transferència
 - 20 mM Tris
 - 150mM Glicina
 - 20% Metanol absolut
 - 80 % Aigua mQ

Nota: Refredar a 4°C.

- Tampó de bloqueig
 - TBS (1X) a pH = 7,5
 - 0,1% Tween 20 (Sigma)
 - 5% llet desnatada en pols (Sveltesse Calcio - plus Nestle)
- Tampó anticòs primari (per diluir l'anticòs primari)
 - TBS (1X) a pH = 7,5
 - 0,2% Tween 20
 - 5% llet desnatada en pols
 - 0,1% azida sòdica (Sigma)
- Tampó anticòs secundari (és amb el que farem la dilució de l'anticòs secundari)
 - TBS (1X) a pH = 7,5
 - 0,2% Tween 20
 - 3% llet desnatada en pols

Preparació de les mostres:

1. Descongelar la mostra i mantenir-la sempre en gel.
2. Calcular els μl de lisat cel·lular necessari per carregar la quantitat de proteïna total desitjada ($\sim 100 \mu\text{g}$).
3. Barrejar la mostra amb el tampó de càrrega en proporció 1 a 1.
4. Fer dos forats al tap de l'ependorff amb l'agulla d'una xeringa.
5. Desnaturalitzar les proteïnes escalfant els eppendorfs a 100°C durant 5 min.

Preparació dels gels:

1. Muntar sobre els suports amb el vidre més gran al darrere. La part inferior dels dos vidres ha d'estar a la mateixa alçada perquè no perdi líquid.
2. Preparar el gel separador segons la taula 3. Uns 15 ml dona per fer dos gels. El % de poliacrilamida dependrà del pes molecular de la proteïna que es vol estudiar. Per proteïnes d'elevat pes molecular es prepararà un gel amb un baix %, i al contrari per proteïnes petites. Com a exemple, s'utilitzarà un 10% de poliacrilamida i això ens permetrà separar proteïnes situades entre els 30 KDa i els 100 KDa de pes molecular.
3. A cada gel s'hi posen menys de 4 ml del gel separador, tot i que es calcula visualment. Ha de quedar espai per què hi càpiga la pinta i una mica de gel concentrador. Posar aigua a sobre del gel a poc a poc perquè la superfície polimeritzi completament recta. Deixar que el gel polimeritzi 30 min aprox.
4. Treure l'aigua abocant el muntatge a la pica i acabar de treure absorbint-la amb un tros de paper de laboratori.
5. Afegir el gel separador i posar ràpidament la pinta anant amb compte que no quedin bombolles.
6. Es carrega el gel o, si es vol, s'embolica amb paper aïllant i es guarda a 4°C O/N per continuar el protocol el dia següent.

Electroforesi:

1. Treure les pintes dels gels i col·locar-los a la cubeta d'electroforesi.
2. Afegir el tampó d'electroforesi de manera que cobreixi els pous i se submergeixi la base dels gels.
3. Carregar les mostres i el marcador de pes molecular als pous amb l'ajut d'una micropipeta. A cada pou caben uns 25 µl tot i que dependrà de la mida de la pinta utilitzada.
4. Córrer a un voltatge fixat de 80 V fins que les mostres entrin al gel separador i augmentar el voltatge a 150 V fins que la banda desitjada arribi al final del gel.

Preparació per fer la transferència a la membrana:

1. Preparar el tampó de transferència i submergir-hi les membranes de nitrocel·lulosa i les esponges uns minuts. Les membranes les submergim en un pot petit a part, per què no s'embrutin i es vagin hidratant amb el tampó de transferència.
2. Mesurar el gel i tallar el paper de filtre i les membranes a la mateixa mida que el gel.
3. Muntar el sandvitx de transferència. És important col·locar bé i amb l'ordre correcte la membrana i el gel perquè les proteïnes es transfereixin del gel a la membrana, tenint en compte, que les proteïnes migren cap a l'elèctrode negatiu, és a dir, el de color vermell.

Electrotransferència:

1. Col·locar el sandvitx d'electrotransferència a l'interior del mòdul d'electrotransferència.
2. L'electrotransferència es realitza a 70 V durant una hora.

Bloqueig de la membrana:

Bloquejar les unions inespecífiques de la membrana incubant 1h en agitació amb tampó de bloqueig.

Preparació dels anticossos:

L'anticòs primari es prepara a la dilució desitjada, que dependrà de cada anticòs, en tampó d'anticòs primari.

L'anticòs secundari es prepara el mateix dia d'utilització a la dilució indicada pel fabricant en tampó d'anticòs secundari.

Incubació amb l'anticòs primari i rentats:

1. Incubar amb l'anticòs primari durant 1 hora en agitació (\cong 80 rpm). També es pot guardar a 4°C O/N i l'endemà incubar 1 h en agitació a T^a ambient.
2. Retirar i escórrer el filtre.
3. Rentar amb uns 50 ml (dependrà de la mida del filtre i del recipient que utilitzem) de llet al 5% en TBS-0,2% Tween-20, 3 x 10 min en agitació.

Incubació amb l'anticòs secundari i rentats:

1. Incubar 45 min a T^a ambient i en agitació amb l'anticòs secundari marcat amb peroxidasa (HRP) que reconegui l'espècie de l'anticòs primari.
2. Rentar amb llet al 3% en TBS + 0,2% Tween-20, 2 x 10 min en agitació.
3. Rentar amb TBS + 0,2% Tween-20, 2 x 10 min en agitació.

Reacció de quimioluminescència i revelat:

La reacció de quimioluminescència es duu a terme amb el *kit ECL Western Blotting Analysis System* (Amersham Biosciences). El procediment s'ha de realitzar ràpidament i a les fosques.

1. Barrejar els dos components del kit en una proporció del 50% V/V fins el volum total desitjat (aprox. uns 6 ml tot i que dependrà de la mida del filtre).
2. Exposar la membrana 1 minut amb els reactius procurant que tota la membrana estigui coberta.
3. Retirar la membrana i escórrer molt bé per evitar soroll de fons.
4. Revelar amb una pel·lícula autoradiogràfica.

4.3. Immunocitofluorescència

Aquesta tècnica immunològica permet detectar si una proteïna s'expressa en cèl·lules en cultiu. Com que l'observació es realitza en el microscopi confocal de fluorescència (Leica TS1 SP2 o Leica SP5) les cèl·lules s'han de cultivar en plaques amb fons molt prim a fi que la distància òptica entre l'objectiu i les cèl·lules sigui la mínima possible i la qualitat de les imatges òptima. Aquesta tècnica també es pot dur a terme cultivant les cèl·lules sobre cobreobjectes.

Per la detecció de les proteïnes es necessiten anticossos primaris específics contra la proteïna que es vol detectar i un anticòs secundari específic contra l'espècie en la què s'ha generat l'anticòs primari que estigui marcat amb una molècula fluorescent per poder visualitzar-ho al microscopi de fluorescència.

El protocol seguit per fer les immunocitofluorescències és el següent:

1. Retirar el medi de cultiu de la placa de cultiu amb base de vidre (Fluorodish, WPI, Inc) o plàstic (μ -Dish^{35mm, low} (Ibidi)).
2. Rentar 3 x 5 min amb PBS.
3. Fixar durant 30 min amb 4% paraformaldehid fred a 4°C o 10 min a T^a ambient.
4. Rentar 3 x 5 min amb TBS.
5. Incubar 2h amb tampó de bloqueig (TBS + 0,5% Tritó X-100 + 10% sèrum (l'espècie dependrà de l'anticòs secundari)) a T^a ambient.
6. Incubar amb l'anticòs primari O/N a 4°C i 1 h a T^a ambient preparat en TBS + 0,1% Tritó X-100 + 10% sèrum. 100 μ l de solució per placa és suficient a la dilució corresponent que dependrà de cada anticòs.
7. Rentar 3 x 5 min amb TBS + 0,1% Tritó X-100 + 10% sèrum.
8. Incubar amb l'anticòs secundari 1h a 37°C.
9. Rentar 2 x 5 min amb TBS.
10. Es pot fer una tinció de 15 min a T^a ambient amb solució Hoescht 0,5 μ g/ml (Sigma) o DAPI (1:10.000) per contratenyir els nuclis.
11. Rentar 3 cops amb PBS i observar al microscopi de fluorescència.

4.4. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en les tècniques de *western-blot* i immunocitofluorescència

Antigen reconegut	Espècie hoste	Dilució IF	Dilució <i>Western-blot</i>	Casa comercial
GATA-4	Ratolí	1:100	1:100	Santa Cruz Biotech.
GATA-4	Conill	1:50	1:100	Santa Cruz Biotech.
Nkx2.5	Conill	1:100	1:100	Santa Cruz Biotech.
Nkx2.5	Cabra	1:20	1:100	R&D Systems
Tbx5	Cabra	1:50	-	Santa Cruz Biotech.
β -MHC	Ratolí	1:500	1:10	Santa Cruz Biotech.
cTnI	Conill	1:100	0,5 μ g/ml	Santa Cruz Biotech.
α -actinina s.	Ratolí	1:500	1:250	Sigma
SERCA-2	Cabra	1:50	0,4 μ g/ml	Santa Cruz Biotech.
Connexina-43	Ratolí	1:100	0,5 μ g/ml	Transduction lab.
Connexina-43	Ratolí (IgM)	1:200	-	Abcam
α -actina	Ratolí	-	1:1000	Santa Cruz Biotech.

Taula 5. Anticossos primaris i dilucions utilitzades en les tècniques d'immunocitofluorescència (IF) i *western-blot*.

Espècie reconeguda	Espècie hoste	Dilució	Marcatge	Casa comercial
Cabra	Ase	1:200	Cy2	Jackson Lab.
Ratolí	Cabra	1:1000	FITC	BD Pharmingen
Conill	Ase	1:1000	Alexa Fluor 488	Molecular Probes
Conill	Cabra	1:1000	Texas Red	Molecular Probes
Ratolí	Cabra	1:1000	HRP	BD Pharmingen
Conill	Cabra	1:2000	HRP	Dako Cytomation
Cabra	Conill	1:2000	HRP	Dako Cytomation
Cabra	Ase	1:100	Cy3	Jackson ImmunoResearch

Ratolí	Ase	1:100	Cy3	Jackson ImmunoResearch
Ratolí	Ase	1:100	Cy5	Jackson ImmunoResearch
Cabra	Ase	1:100	Cy5	Jackson ImmunoResearch
Conill	Ase	1:100	Cy5	Jackson ImmunoResearch

Taula 6. Anticossos secundaris i dilucions utilitzades en les tècniques d'immunocitofluorescència (IF) i *western-blot*.

4.5. Anàlisi de secreció de citocines en sobrenedants

Per analitzar les citocines secretades per les cèl·lules en cultiu es va utilitzar el *Procarta Cytokine Assay Kit* (Panomics). Aquest kit consisteix en un immunoassaig múltiple (assaig Luminex) basat en la tecnologia de detecció xMAP® que permet quantificar de manera simultània múltiples citocines amb una sensibilitat inferior a 1 pg/ml/citocina.

Recollida de medi condicionat en condicions de normòxia i hipòxia

Les cèl·lules van ser cultivades i expandides en flascons estàndards de cultiu amb medi complet (α -MEM + 10% FBS + 1% P/S). A passatge 2 es van sembrar al voltant de 10.000 cèl·lules/cm² en plaques de 6 pous. Al dia següent el medi va ser substituït per medi fresc i les cèl·lules es van posar en condicions de normòxia (21% O₂), hipòxia moderada (5% O₂) i hipòxia severa (1% O₂) durant 24h. Al final del període d'incubació el medi condicionat va ser recollit, filtrat i conservat a -20°C fins el posterior anàlisi. També es van determinar el número de cèl·lules viables tenyint-les amb blau de tripà i contades amb un hemocitòmetre.

Determinació de factors angiogènics en el medi condicionat

Dels diferents medis condicionats se'n va analitzar la concentració de: IL-1 β , IL-6, TNF- α , VEGF, PDGF_{BB} i bFGF amb el *Procarta Cytokine Assay Kit* (Panomics). Es va seguir el protocol descrit pel fabricant i, el podem trobar a http://www.panomics.com/downloads/35_4_CYTOKINE_2_V4.pdf. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SD dels picograms de factor secretat per 10⁶ cèl·lules en el moment de recollir el medi.

5. Assaigs de diferenciació

5.1. Diferenciació adipogènica

La diferenciació adipogènica es va induir tal com es troba descrit a la literatura¹⁹⁴. El mètode es basa en la utilització d'un medi (medi adipogènic) que conté un conjunt d'estímuls químics que indueixen la diferenciació de les cèl·lules mare en adipòcits. Aquest medi té com a base el medi α -MEM al qual se li afegixen els suplementes següents (taula 7):

Components	Concentració
FBS	10%
P/S	1%
Dexametasona (Sigma)	1 μ M
Isobutilmetilxantina (Sigma)	0,5 mM
Insulina (Sigma)	10 μ g/ml
Indometacina (Sigma)	100 μ M

Taula 7. Components i concentració del medi adipogènic.

Per induir la diferenciació adipogènica és parteix d'un cultiu subconfluent i se segueix el protocol següent:

1. Retirar el medi estàndard de cultiu.
2. Rentar 2 o 3 cops amb PBS.
3. Afegir el medi adipogènic.
4. Seguir el tractament durant 15 dies canviant el medi cada 3-4 dies.
5. Analitzar.

**Els cultius control es van dur a terme cultivant les mateixes cèl·lules en medi estàndard durant el mateix període de temps.

Anàlisi de la diferenciació adipogènica

L'anàlisi de la diferenciació adipogènica de les cèl·lules es duu a terme detectant la presència de vacuoles lipídiques intracel·lulars (característiques dels adipòcits²⁵⁶) mitjançant la tinció específica amb el colorant *Oil red O* (Sigma) i una posterior observació al microscopi de contrast de fases.

Per fer la tinció se segueix el protocol següent:

1. Retirar el medi adipogènic.
2. Rentar 3 cops amb PBS per eliminar les restes de medi i d'FBS.
3. Fixar amb paraformaldehid al 4% durant 10 min a T^a ambient.
4. Rentar 3 cops amb H₂O_{bd}.
5. Tenyir la solució de treball d'*Oil Red O** durant 1 h a T^a ambient.
6. Observar al microscopi de contrast de fases.

*Solució de treball d'*Oil Red O*: 60% de solució d'estoc** en H₂O_{bd}.

**Solució d'estoc d'*Oil Red O*: 0,5% d'*Oil Red O* en isopropanol (Panreac).

5.2. Diferenciació osteogènica

La diferenciació osteogènica s'indueix tal com s'ha descrit prèviament²⁵⁷. Aquest mètode es basa en la utilització d'un medi, que anomenarem medi osteogènic, que conté un conjunt d'estímuls químics que indueixen la diferenciació osteogènica de les MSC. El medi osteogènic té com a base el medi α -MEM al qual se li afegeixen els suplementes següents (taula 8):

Components	Concentració
FBS	10%
P/S	1%
Dexametasona	100 nM
β -glicerofosfat sòdic (Sigma)	10 mM
Àcid ascòrbic (Sigma)	0,05 mM

Taula 8. Components i concentració del medi osteogènic.

Per induir la diferenciació osteogènica és parteix d'un cultiu subconfluent de MSC humanes i se segueix el protocol següent:

1. Retirar el medi estàndard de cultiu.
2. Rentar 2 o 3 cops amb PBS.
3. Afegir el medi osteogènic.
4. Seguir el tractament durant 15 dies canviant el medi cada 3-4 dies.
5. Analitzar.

**Els cultius control es van realitzar cultivant les mateixes cèl·lules en medi estàndard durant el mateix període de temps.

Anàlisi de la diferenciació osteogènica

L'anàlisi de la diferenciació osteogènica de les cèl·lules es realitza detectant les deposicions en el cultiu de matriu extracel·lular calcificada, característica típica dels osteoblasts²⁵⁸, mitjançant la tinció específica amb el colorant vermell d'alizarina²⁵⁹ i posterior observació al microscopi de contrast de fases.

Per fer la tinció es segueix el protocol següent:

1. Retirar el medi osteogènic.
2. Rentar 3 cops amb PBS per eliminar les restes de medi i FBS.
3. Fixar amb paraformaldehid al 4% durant 10 min a T^a ambient.
4. Rentar 3 cops amb aigua destil·lada.
5. Tenyir amb una solució al 1% de vermell d'alizarina (Ferosa) en H₂O_{bd} durant 10 min.
6. Rentar 3 cops amb H₂O_{bd}.
7. Observar al microscopi de contrast de fases.

5.3. Diferenciació cardiomiogènica

5.3.1. Agent químic: 5-azacitidina

La diferenciació química de les cèl·lules mare humanes cap a cardiòcits s'indueix amb el mètode descrit a la literatura²⁶⁰. Es basa en la utilització del suplement 5-azacitidina (Sigma), que s'afegeix a una concentració final de 10 μ M al medi estàndard de cultiu (α -MEM + 10% FBS + 1% P/S), per formar el que anomenarem medi cardiomiogènica. La 5-aza és un anàleg químic del nucleòsid citosina que originalment va ser desenvolupat per tractar la leucèmia mielogènica aguda^{261, 262}. Aquest component és un efectiu desmetilant del DNA i és capaç d'alterar l'expressió de determinats gens^{263, 264} o de regular la diferenciació cel·lular^{265, 266}. Diversos estudis han trobat que diferents tipus de cèl·lules mare, tant embrionàries com adultes, poden ser diferenciades cap a cardiòcits exposant-les a la 5-aza^{124-126, 267}.

Per tal de realitzar la diferenciació cardiomiogènica d'un cultiu cel·lular és necessari que les cèl·lules estiguin a un 80% de confluència. El protocol seguit per induir la diferenciació de les MSC humanes cap a cardiòcits va ser el següent:

1. Retirar el medi estàndard de cultiu.
2. Rentar 2 o 3 cops amb PBS.
3. Afegir el medi cardiomiogènica.
4. Seguir el tractament durant 15 dies canviant el medi cada 3-4 dies.
5. Analitzar.

*Els cultius control es van dur a terme cultivant les mateixes cèl·lules en medi estàndard durant el mateix període de temps.

**L'anàlisi del grau de diferenciació cardiomiogènica de les MSC humanes aconseguit es realitza mitjançant la detecció de proteïnes cardioespecífiques amb les tècniques ja descrites d'immunocitoquímica i *western-blot*.

5.3.2. Cocultiu amb cardiòcits de rata nounada

L'evidència de diferenciació cardiomiogènica de diferents tipus cel·lulars *in vivo* suggereix l'existència de factors ambientals^{131, 133}. No obstant això, es desconeixen quins són aquests factors que, a més, podrien incloure interaccions cèl·lula-cèl·lula i estimulació elèctrica i mecànica. El cocultiu de cèl·lules amb cardiòcits de rata nounada és un mètode biològic de diferenciació que ha estat àmpliament utilitzat per comprovar la potencialitat cardiomiogènica d'unes cèl·lules, esperant que els factors secretats pels cardiòcits i el contacte directe amb aquests indueixi la diferenciació de les cèl·lules d'estudi^{143, 268, 269}.

1. Preparar els cardiòcits com es descriu en el protocol del següent apartat i sembrar a una concentració de 50.000-70.000 cèl·lules/cm² en plaques μ -Dish^{35mm, low} (Ibidi) pretractades amb gelatina 2%.
2. 48h més tard, retirar el medi de cultiu i sembrar les epiATPC-eGFP a passatge 2 (marcades seguint el protocol descrit més avall) a una concentració de 2000 cèl·lules/cm².
3. Incubar a 37°C i 5% CO₂ en aire.

*En els experiments de cocultiu també es van cultivar cardiòcits i epiATPC-eGFP individualment i en les mateixes condicions com a controls.

5.3.2.1. Extracció de cardiòcits de rata nounada

Aquest protocol d'extracció de cardiòcits de rata nounada és una adaptació del cedit per Carolina Gandia, Ana Armiñan i la Dra. Pilar Sepúlveda del "Centro de Investigación Príncipe Felipe" de València.

Material:

- Cries de rata Wistar d'1 a 3 dies
- 2X pinces estèrils
- 2X estisores estèrils (unes corbes per obrir el tòrax i extreure el cor, i unes petites, les de canular, per trossejar els cors)
- 2X safates estèrils
- HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*) 1X (Gibco)

- Penicil·lina/estreptomomicina (1:100) (Gibco)
- Medi de cultiu:
 - D-MEM: M199 (4:1) (Gibco)
 - FBS inactivat (5%)
 - Sèrum de cavall (HS) inactivat (10%)
 - P/S (1:100)
 - Citosin β -D-arabinofuranòsid (1 μ l/ml de medi) (estoc: 10 mg/ml) (Sigma)
 - Col·lagenasa tipus II (250 u/mg): 3 mg/ml en HBSS 1X + P/S (Gibco)
 - Dispasa II a 2,4U/ml (Roche)
 - DNAsa I (estoc: 10 mg/ml) (Roche)
 - Blau de tripà (Gibco)
 - Gelatina 2% (Sigma)

Procediment:

1. Desinfectar amb etanol 70° i decapitar els nounats fora de la campana.
2. A la campana, obrir el tòrax per l'obertura del coll. Amb unes pinces i tisores estèrils extreure el cor.
3. Col·locar els cors a una placa de petri de 60 mm de Ø (p60) sobre gel amb 5 ml de HBSS 1X +P/S.
4. Eliminar les aurícules i col·locar els ventricles en una altra p60 amb 5 ml de HBSS 1X + P/S.
5. En una altra p60 posar 5 ml de la solució de col·lagenasa a 37°C i trossejar els ventricles finament.
6. Incubar a 37°C en agitació suau (70-80 rpm) durant 30-40 min.
7. Passar el contingut de la p60 a un tub Falcon de 15 ml (tub 1). Rentar la p60 amb 1 ml de HBSS 1X + P/S i afegir-ho al tub 1. Deixar el tub en posició vertical per què els fragments no digerits es dipositin al fons del tub.
8. Recollir el sobrenedant i posar-lo en un altre tub de 15 ml (tub 2).
9. Centrifugar el tub 2 durant 10 min a 800 rpm.

10. Recollir el sobrenedant del tub 2 i afegir-lo al tub 1. Resuspendre el pèl·let del tub 2 amb 4 ml de medi sense sèrum (D-MEM: M199 (4:1) + P/S).
11. Recollir el contingut del tub 1 i passar-lo a la p60.
12. Incubar a 37°C en agitació suau durant 30 min.
13. Recollir el contingut de la p60 i passar-lo a un tub de 15 ml.
14. Centrifugar durant 10 min a 800 rpm.
15. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el pèl·let amb la solució del tub 2.
16. Afegir 4 ml de Dispasa II i 10 µl de DNAsa i passar el contingut a una p60.
17. Incubar a 37°C en agitació suau durant 20 min.
18. Recollir el contingut de la p60 i passar-lo a un tub de 15 ml.
19. Centrifugar 10 min a 800 rpm.
20. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el pèl·let amb medi complet de cultiu sense citosina β-D-arabinofuranòsid (D-MEM: M199 (4:1) + 5% FBS + 10% HS + P/S). Comptar les cèl·lules viables.
21. Sembrar 100.000 cèl·lules/cm² i incubar durant 90 min a 37°C (preplaqueig) per eliminar els fibroblasts (aquests s'adheriran al fons del flascó mentre que els cardiòcits es mantindran en suspensió). Utilitzar medi complet de cultiu **sense** citosina β-D-arabinofuranòsid.
22. Recollir el sobrenedant i centrifugar 10 min a 800 rpm.
23. Eliminar el sobrenedant i resuspendre amb medi complet de cultiu (D-MEM: M199 (4:1) + 5% FBS + 10% HS + P/S + citosina β-D-arabinofuranòsid). Comptar les cèl·lules viables.
24. Sembrar 50.000 cèl·lules/cm² amb medi complet de cultiu en plaques pretractades amb gelatina 2% durant 20 min a 37°C.

25. Mantenir el cultiu a 37°C i 5% CO₂ i no tocar-lo en un mínim de 24-48h posteriors a la sembra.
26. Canviar el medi cada 3-4 dies.

5.3.2.2. Transducció de les epiATPC amb lentivirus-eGFP

Per la transducció, es van utilitzar estocs de partícules víriques lentivirals concentrades (50 µl) que contenen el gen de l'eGFP sota el promotor del SV40²⁷⁰.

1. 24h abans, sembrar 5.000 cèl·lules/cm² en un T25 amb medi complet de cultiu (α-MEM + 10% FBS + 1% P/S).
2. Diluir la solució amb partícules víriques en 1 ml de medi complet de cultiu que contingui 10 µg/ml *polybrene* (Sigma). Afegir al T25 on tenim les cèl·lules, MOI = 21 (partícules/cèl·lula).
3. Incubar 48h a l'incubador.
4. Retirar el medi amb partícules víriques i substituir-lo per medi complet fresc.
5. Deixar créixer les cèl·lules fins el número desitjat.

5.4. Diferenciació endotelial

La diferenciació endotelial es va dur a terme cultivant les cèl·lules amb medi EGM-2 (Lonza Walkersville, Inc.; ref. CC-3162) durant 15 dies. Aquest medi conté una sèrie de factors com EGF, hidrocortisona, VEGF, bFGF, R³-IGF-1, àcid ascòrbic i heparina que s'ha demostrat que afavoreixen la diferenciació endotelial en diferents tipus cel·lulars²⁷¹⁻²⁷³. Com a controls es van utilitzar les mateixes cèl·lules cultivades en α-MEM + 10% FBS + P/S.

Anàlisi de la diferenciació endotelial

L'anàlisi del grau de diferenciació endotelial assolit es va comprovar al cap de 15 dies analitzant per PCR a temps real (veure apartat 3.1) un conjunt de gens que incloïen molècules d'adhesió de cèl·lules endotelials

(PECAM/CD31²⁷⁴, VE-caderina²⁷⁵, CD34^{276, 277}, VCAM-1²⁷⁸, vWF²⁷⁹ i CD102²⁸⁰), marcadors de superfície de cèl·lules progenitores vasculars/hematopoètiques (CD133²⁸¹), factors de transcripció (EGR-1^{282, 283}, EGR-3²⁸⁴), receptors (CD36²⁸⁵ i CXCR-4²⁸⁶) i citoquines (SDF-1²⁸⁶).

Per l'anàlisi del grau de diferenciació endotelial també es van estudiar característiques funcionals de les cèl·lules seguint els protocols que es descriuen a continuació:

- Incorporació de Dil-Ac-LDL

L'Ac-LDL és una lipoproteïna acetilada de baixa densitat que és incorporada de manera específica per les cèl·lules endotelials²⁸⁷. Aquesta LDL està marcada amb la sonda fluorescent Dil de manera que, quan la lipoproteïna és degradada per les enzimes lisosomals, s'acumula a les membranes intracel·lulars i pot ser detectada per microscòpia de fluorescència.

Protocol de marcatge:

1. Diluir la Dil-Ac-LDL (Biomedical Technologies, ref. BT-902) a 10 µg/ml en medi complet de cultiu.
2. Afegir a les cèl·lules en cultiu i incubar durant 4h a 37°C.
3. Retirar el medi.
4. Rentar amb 3 vegades amb PBS.
5. Fixar amb 4% PFA durant 10 min a T^a ambient.
6. Rentar amb 3 vegades amb PBS.
7. Observar al microscopi de fluorescència.

- Assaig de formació de tubs *in vitro*

Els assaigs d'angiogènesi *in vitro* es basen en el principi que les cèl·lules endotelials formen estructures tubulars quan són cultivades en una matriu de suport gelificada com les obtingudes a partir de proteïnes derivades de tumor

Engelbreth Holm-Swarm (EHS) de ratolí (ECMatrix™ o Matrigel™). L'ECMatrix™, o més conegut com Matrigel™, està considerada una membrana basal generada a partir d'un sarcoma de ratolí. El Matrigel™ no només conté els components de la membrana basal (col·lagen, laminina i proteoglicans) sinó també enzims proteolítics (plasminogen, tPA, MMPs) i els seus inhibidors, i factors de creixement (TGF- β , FGF).

Protocol:

****Important:** Tot el material utilitzat en aquest procediment ha d'estar fred, i treballarem sempre sobre gel per evitar que l'ECMatrix™ gelifiqui abans del moment desitjat!!.

1. Descongelar l'ECMatrix™ (Chemicon International; ref. ECM625) i el tampó (10X) a la nevera a 4°C O/N.
 2. Afegir 100 μ l del tampó (10X) a 900 μ l d'ECMatrix™ i barrejar a poc a poc evitant fer bombolles.
 3. Transferir 300 μ l a cada pou d'una placa de 24 pous freda.
 4. Incubar a 37°C un mínim d'una hora per permetre que la matriu gelifiqui.
 5. Resuspendre en medi de cultiu 50.000 cèl·lules viables/ml i tants mil·lilitres com pous vulguem sembrar.
 6. Afegir 1 ml de la suspensió cel·lular sobre l'ECMatrix™ polimeritzada.
 7. Incubar a 37°C a l'incubador.
 8. Seguir la formació de tubs sota el microscopi de contrast de fases.
- Tinció dels tubs en ECMatrix™ amb la isolectina GSLI B4

La isolectina GSLI B4 està considerada un bon marcador de les cèl·lules de llinatge endotelial²⁸⁸⁻²⁹¹. Aquesta característica ens permetria identificar si les cèl·lules havien adquirit un fenotip endotelial en formar aquestes estructures tubulars en l'ECMatrix™.

Per dur a terme aquesta tinció, la matriu i les cèl·lules es van disposar en les mateixes proporcions que en l'apartat anterior en plaques de confocal μ -Dish^{35mm, low} (Ibidi).

Protocol:

1. Retirar el medi de cultiu.
2. Rentar 3 vegades amb PBS.
3. Fixar amb 4% PFA 10 min a T^a ambient.
4. Rentar 3 vegades amb PBS.
5. Permeabilitzar 30 min a T^a ambient amb PBS + 0,1% saponina + 1% BSA.
6. Rentar 3 vegades amb PBS.
7. Incubar O/N a 4°C amb la isolectina GSLI B4 (1/100 en PBS + 1% BSA).
8. Rentar 3 vegades amb PBS.
9. Incubar 1h a T^a ambient amb estreptavidina Alexa 568 (1/1000 en PBS + 1% BSA).
10. Rentar 3 vegades amb PBS.
11. Contratenyir els nuclis amb Hoescht durant 10 min.
12. Rentar 3 vegades amb PBS.
13. Observar al microscopi confocal de fluorescència (làser 594 nm).

EXPERIMENTACIÓ *IN VIVO*

6. Models *in vivo* d'infart de miocardi

La generació dels models d'infart de miocardi en ratolí i rata va ser realitzada mitjançant la lligadura permanent de l'artèria coronària anterior esquerra descrita per primera vegada en el model de rata per Pfeffer i col. el 1979⁵³, i més endavant en el model de ratolí per Michael i col. el 1995²⁹². En aquests models, els canvis histològics després d'una oclusió total coronària són similars als observats en humans després d'un IAM no tractat, però en canvi, es desenvolupen en un marc temporal més breu i inclouen una menor infiltració de cèl·lules polimorfonucleades^{293, 294}.

El nostre estudi es va realitzar amb 17 ratolins femella C3H-SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) de 13 setmanes d'edat i d'un pes comprès entre els 20 i 25g (Jackson Laboratory); i en 18 rates mascle immunodeprimides (*nude*) NIH-Foxn1^{tmu} de 224g de mitjana a l'inici de l'estudi (Charles River laboratories inc.). Els animals van ser alimentats *ad libitum*. Les manipulacions i el procediment experimental van ser aprovats pel comitè ètic local. Els investigadors van seguir la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Research* (Publicació del NIH n° 86-23, Revisió de 1996), que pot ser consultada gratuïtament a <http://www.nap.edu/html/labrats>.

Material:

- 2X Pinces Adson rectes de 12 cm de llargada total, FST (Fine Science Tools), ref. 11006-12
- 2X Pinces Bishop-Harman serrades de 8,5 cm de llargada total, FST, ref. 11069-08
- 1X Pinces Supergrip (punta ampla), FST, ref. 00632-11
- 2X Portagulles Cohan – mini corbats, Bausch & Lomb, ref. E3836 CW
- Pinces Roboz, ref. RS-5101
- Tisores Roboz, ref. RS-5980
- Portagulles, Roboz, ref. RS-7117
- Pomada oftàlmica Puralube, Fougera, ref. K210351
- Sutura Ethicon Cardiovascular de 7-0 de seda negra amb dues agulles per sutura del tipus BV-1. ref. K809H

- Sutura monofilament de polipropilè de 6-0 no reabsorbible amb dues agulles Ethicon tipus C-1. ref. 8718H
- Sutura de seda de 3-0 Ethicon PERMA-HAND
- Lidocaïna injectable (2%), 100 ml, VEDCO, Ref. VINV-LIDO-100M
- Xeringa Hamilton sèrie 600
- Buprenorfina, Sigma, ref. B9275
- Dispensador d'isofluorà i tanc d'oxigen
- Lupa
- Respirador amb control de pressió, model TOPO, Kent Scientific Corporation (ratolí)
- Respirador Harvard Apparatus per a petits animals model 683 (rata)

6.1. Procediment quirúrgic per al model en ratolí

Anestesià el ratolí amb isoflurà amb el vaporitzador. Per fer-ho, col·locar l'animal en una cambra d'aïllament i realitzar la inducció durant 1 min aproximadament amb 5% d'isoflurà en 100% oxigen. Seguidament, subministrar un 2% d'isoflurà en 100% oxigen mitjançant un con nasal i mantenir l'anestèsia de l'animal per que respiri espontàniament.

Aplicar solució o pomada oftàlmica per evitar la sequedat als ulls. Rasurar el coll i el costat esquerre del pit del ratolí. Netejar les àrees amb solució iodada i etanol al 70%. Injectar buprenorfina (0,1-0,5 mg/Kg) subcutàniament com a analgèsic.

Per a la intubació, exposarem la tràquea amb la finalitat de visualitzar el correcte recorregut del tub per la mateixa i evitar introduir-lo a l'esòfag. Es fa una incisió de 0,5 cm al coll (0,5 cm per sota de la boca) i es separa la pell, les glàndules i la musculatura que envolta la tràquea amb els retractors. Subjectar la llengua del ratolí amb unes pinces corbades i moure-la cap a l'esquerra. Suaument introduir per la tràquea un catèter de 20G (amb la punta tallada) i connectar-lo al ventilador. En cas de dificultats per introduir el catèter, aplicar, amb un pinzell, una solució de lidocaïna 1% a la tràquea. Configurar el ventilador a 90 respiracions/min i a un volum total de 0,1 ml per a un ratolí de 30 g. Ventil·lar l'animal amb 2% d'isoflurà en 100% oxigen durant tot el procediment quirúrgic. Treure els retractors i hidratar la ferida amb solució salina per evitar la sequedat fins que se suturi al final de la cirurgia.

Dur a terme una incisió vertical de 1 cm paral·lela a l'estern en el costat esquerre de l'animal i retirar els músculs pectorals subjacents. Exposar el cor entrant a la cavitat pectoral a través del tercer espai intercostal retirant les costelles adjacents. Pessigar el pericardi amb els fórceps Bishop-Harman i realitzar un petit forat per retirar-lo. Administrar 2 gotes de lidocaïna 1% sobre el cor exposat per evitar arítmies. Localitzar l'artèria coronària descendent anterior esquerre i ocluir-la lligant-la amb una sutura de 7-0 (fer un doble nus i dos de simples) per provocar un infart de miocardi. El teixit per sota la lligadura esdevindrà pàl·lid. És important realitzar la lligadura a més d'un mil·límetre de l'aurícula, d'altra manera l'infart serà massa gran per què l'animal sobrevisqui.

Visualitzar l'àrea infartada situada després de la lligadura caracteritzada per un color pàl·lid a la zona distal del miocardi. Els ratolins, escollits de manera aleatòria, se'ls injecta intramiocàrdicament les epiATPC (10µl amb 10^5 cèl·lules resuspeses en α -MEM) a la zona del marge de l'infart amb una agulla de 30G.

Tancar el pit de l'animal primer, suturant les costelles adjacents entre elles i després la pell com a segona capa utilitzant prolene 6-0. De manera gradual, reduir el % d'isoflurà mentre es va tancant l'animal per què hi hagi una recuperació més ràpida. Injectar 0,5 ml de solució salina subcutàniament per prevenir la deshidratació de l'animal.

Després d'apagar l'anestèsia, retirar el catèter de la tràquea i ventilar l'animal oxigen al 100% fins que recuperi el coneixement. Per tal de contrarestar la possible hipotèrmia provocada per l'anestèsia mantenir l'animal calent amb una alfombreta calefactada per aigua calenta. És normal que sagni una mica però l'animal es recupera en 30 min. Realitzar un seguiment de la ferida, administrar analgèsia i tractar possibles infeccions amb un antibiòtic (administració parenteral d'enrofloxacina (Baytil) 85 mg/Kg durant 14 dies). Una possible o esperada complicació post-operatòria d'aquest procediment és la mort sobtada en els tres dies posteriors a la cirurgia a causa de l'infart de miocardi que li hem provocat.

6.2. Procediment quirúrgic per al model en rata

El procediment per provocar un infart de miocardi en el model de rata és similar al descrit anteriorment per al ratolí amb algunes diferències. La lligadura de l'artèria coronària esquerra va ser realitzada com s'havia descrit prèviament²⁹⁵. Breument, les rates van ser intubades i anestesiades amb una barreja de O₂/Sevorane i ventilades mecànicament. Després de la toracotomia es va induir l'infart agut de miocardi lligant de manera permanent l'artèria coronària descendent anterior esquerra amb prolene 6-0. La incisió va ser tancada amb sutura de seda de 3-0. Una setmana després les rates van ser anestesiades i reobertes per esternotomia i es va dur a terme el trasplantament de les cèl·lules (10⁶ cèl·lules resuspeses en solució salina o el mateix volum de solució salina per als controls) en 5 injeccions de 5µl en 5 punts de la zona del marge de l'infart amb una xeringa Hamilton.

6.3. Cirurgia aguda terminal

La cirurgia aguda terminal va ser realitzada 20 dies postinjecció per al ratolí i 30 dies en el cas del model de rata.

Per a la cirurgia aguda terminal, anestesià l'animal amb anestèsia inhalatòria isoflurà al 5% utilitzant el vaporitzador. Obrir la cavitat pectoral i arrestar el cor amb la solució hipercalcèmica d'arrest freda de Krebs-Henseleit modificada** (conté butanodiona monoxima (BDM) per bloquejar la contracció) injectant-la al ventricle esquerre a través de l'àpex. S'ha d'anar en compte per evitar la sobrecàrrega del ventricle esquerre (0,3-0,5 ml). Aquest mètode d'eutanàsia assegura que el cor estigui en l'estat fisiològic necessari per als estudis histològics del cor aïllat. Tot seguit, s'extreu el cor, es fixa en PFA al 4% durant un mínim de 24h a 4°C. Posteriorment, es mantenen en una solució de sucrosa al 30% en PBS (on el cor inicialment sura) fins que s'enfonsi. Per la seva conservació i posterior anàlisi histològic s'inclouen en OCT (Sakura) i es congelen de manera immediata en isopentà refredat amb nitrogen líquid. Ràpidament són emmagatzemats al congelador de -80°C.

****Solució d'arrest Krebs-Henseleit modificada (100ml):**

- NaCl 0,4g
- KCl 0,44g
- Glucosa 0,2g
- NaHCO₃ 0,01g
- BDM 0,3g
- Heparina (1000U/ml) 1ml

Nota: Mantenir la solució freda i preparar-la fresca cada vegada.

7. Anàlisi funcional: ecocardiografia

Per avaluar la funció cardíaca de les rates es va realitzar una ecocardiografia transtoràcica realitzada per un ecocardiografista “cec” mitjançant un ecocardiògraf (Vivid 7, General Electrics) equipat amb un transductor lineal de 10 MHz. Es van adquirir mesures basals (1 dia abans de l'IAM), postIAM (6 dies després de l'IAM, dia del trasplantament) i a 2 i 4 setmanes postIAM. Es van realitzar ecocardiografies mode M i bidimensionals a nivell dels músculs papil·lars en la visió paraesternal de l'eix curt. Els paràmetres funcionals es van calcular a partir de 5 cicles consecutius utilitzant mètodes estàndards²⁹⁶.

Es van quantificar les dimensions (volum (V), àrea (A) i diàmetre (D)) del ventricle esquerre en telesístole (VEs) i telediàstole (VEd) i els canvis en el gruix de la paret anterior (CGPA) en diàstole (PAd) i sístole (PAs).

Els canvis en el gruix de la paret anterior (CGPA) es van calcular seguint la fórmula següent:

$$CGPA = \left(\left(\frac{PAs}{PAd} \right) - 1 \right) \times 100$$

La fracció d'escurçament (FS) va ser calculada segons la fórmula següent:

$$FS = \left[\frac{(DVEd - DVEs)}{DVEd} \right] \times 100$$

La fracció d'ejecció (FE) es va calcular segons:

$$FE = \left[\left(\frac{VVEd - VVEs}{VVEd} \right) \right] \times 100$$

Es va realitzar un ANOVA de dos factors (Temps: 3 nivells; Tractament (mesures repetides): 2 nivells). Els càlculs estadístics es van fer sense la primera lectura ja que l'efecte d'interès que es vol observar és el que succeeix en posterioritat i podria emmascarar els resultats.

8. Anàlisi morfològica: tricròmica de Masson

8.1. Ratolí

Es van tallar els cors congelats en seccions de 20 µm de gruix des de l'apex fins la base del cor. Es van tnyir un total de 20 seccions per ratolí separades 300 µm, amb la tinció tricròmica de Masson (descrita més avall) per distingir entre cardiòcits i la matriu de col·lagen. Es van captar imatges amb una lupa Leica a 20 augments que permetia incloure la secció completa del cor. L'àrea fibròtica es podia identificar pel seu color blau clar. Això ens va permetre determinar la mida de l'infart (volum i superfície), el gruix de la paret de l'infart i la dilatació del ventricle esquerre (superfície interna del ventricle esquerre) mitjançant planimetria computeritzada utilitzant el programa d'anàlisi ImageJ (NIH). La distància de l'apex a cada secció va ser acuradament anotada per realitzar els càlculs de volum i superfície. Totes les seccions van ser examinades cegament i els càlculs dels valors expressats es van fer com es descriuen a continuació.

Per calcular la mida (en volum) de l'infart es van mesurar les àrees de teixit cicatricial de dos seccions consecutives, se'n va fer la mitjana, i es va multiplicar per la distància entre seccions. Això, es va fer per cada parella de seccions consecutives després, es va fer la suma de tots els volums obtenint així una extrapolació del volum total de la cicatriu. El volum total de la paret ventricle esquerre es va calcular de manera semblant al de la cicatriu de l'infart, però en aquest cas, es van mesurar la superfície del ventricle esquerre i se'n va restar l'àrea de la llum del ventricle abans de realitzar el càlcul del volum. El volum de cicatriu de l'infart es va expressar com un percentatge de la grandària de l'infart respecte el volum total de la paret del ventricle esquerre.

La superfície d'àrea infartada va ser calculada com la suma parcial de l'àrea infartada de les diferents seccions i els resultats van ser expressats com el

percentatge de la mida de l'infart respecte la superfície total de la paret del ventricle esquerre.

Per avaluar el gruix de la paret infartada, es van realitzar per una banda, mesures de la distància més curta entre l'endocardi i l'epicardi, i per l'altra també es van mesurar el gruix de les zones del marge de l'infart. El valor expressat final s'obté de fer la mitjana de 6 seccions separades per 200 µm.

La dilatació del ventricle esquerre es va expressar com la mitjana (6 seccions separades per 200 µm de distància) de la superfície interna del ventricle esquerre comparant animals tractats (injectats amb epiATPC) respecte els control (injectats amb solució salina).

8.2. Rata

Els cors de rata van ser tallats transversalment en tres segments: àpex, mig (que contenia la lligadura) i base. Es van realitzar seccions seriades de 10 µm de gruix (6 seccions separades 200 µm) del segment mig i es van tenyir amb la tinció tricròmica de Masson (com es descriu més avall) per poder determinar la mida de l'infart, el gruix de la paret de l'infart i la dilatació del ventricle esquerre. Les seccions van ser fotografiades amb una lupa Leica a 6,3 augments per incloure la secció completa del cor.

La mida de l'infart va ser expressada com un percentatge del valor de la superfície de la cicatriu respecte l'àrea total de la paret del ventricle esquerre.

El gruix de la paret de l'infart i la dilatació del ventricle esquerre van ser calculades tal com s'explica a la secció de ratolí descrita més amunt.

8.3. Tinció Tricròmica de Masson

La tricròmica de Masson és una tinció àmpliament utilitzada en diferents aplicacions específiques però, en la gran majoria de casos, amb l'objectiu comú de distingir les cèl·lules del teixit connectiu que les envolta. En el nostre cas concret ens permet visualitzar perfectament la cicatriu generada després de l'infart de miocardi i distingir-la del teixit viable restant.

Solucions necessàries:

- Àcid fosfomolibdic:
 - 1 g d'àcid fosfomolibdic
 - 100 ml H₂O_{dd}

 - Blau d'anilina:
 - Àcid acètic 2,5% (2,5 ml en 100 ml H₂O_{dd})
 - Solució de blau d'anilina saturada

 - Aigua acètica:
 - 1 ml d'àcid acètic
 - 99 ml de H₂O_{dd}

 - Fucsina de Ponceau:
 - Solució A:
 - 1 g de Ponceau Silidina
 - 100 ml H₂O acètica 0,5%

 - Solució B:
 - 1 g de Fucsina àcida
 - 100 ml H₂O acètica 0,5%
- ❖ Barrejar 2 parts de la Solució A + 1 part de la Solució B

Protocol:

1. Preparar els diferents colorants.
2. Desparafinar i rehidratar amb un protocol estàndard.
3. Rentar la mostra amb aigua corrent durant 5 min.
4. Tenyir amb hematoxilina durant 5 min.
5. Rentar amb aigua corrent.
6. Rentar amb aigua acètica.
7. Rentar amb aigua corrent.
8. Tenyir amb Fucsina de Ponceau durant 5 min.
9. Rentar amb aigua corrent durant aprox. 1 min.
10. Rentar amb aigua acètica durant aprox. 1 min.

11. Incubar en àcid fosfomolibdic.
12. Rentar amb aigua acètica durant 1 min.
13. Tenyir amb blau d'anilina durant 5 min.
14. Rentar amb aigua corrent.
15. Rentar amb aigua acètica.
16. Rentar amb aigua corrent.
17. Deshidratar:
 - 5 min en etanol 70°
 - 2 x 5 min en etanol 96°
 - 2 x 5 min en etanol 100°
 - 20 min xilè
18. Muntar.

Resultats esperats:

- Citoplasma, queratina, fibres musculars i eritròcits- Vermell
- Nuclis- Blau negrós
- Col·lagen- Blau

9. Densitat vascular: tinció amb lectina GSLI B4

Per determinar la densitat vascular a les zones del marge de l'infart i al miocardi distal de l'infart, les seccions de cor de ratolí van ser tenyides amb la lectina GSLI B₄ seguint el protocol descrit més avall. Com a sistema de detecció es va utilitzar l'Alexa Fluor 568 conjugat a estreptavidina (Moleculars Probes).

Es van comptar els capil·lars d'un mínim de 12 camps seleccionats aleatòriament (6 de la zona del marge de l'infart i 6 de zones distals) en 2 seccions per animal en un total de 9 animals (4 controls i 5 tractats). Es van captar 138 imatges de les mostres del marge de l'infart (61 dels controls i 77 dels tractats) i 138 imatges de la regió distal (60 dels controls i 78 dels tractats) amb el microscopi confocal de

fluorescència Leica SP5 a 630 augments. L'àrea del teixit va ser mesurada en cada camp amb el programa d'anàlisi d'imatges ImageJ (NIH). Dos observadors independents van realitzar recomptes doble cec de les imatges amb un coeficient de correlació intraclases de 0,821 ($p < 0,001$) per als recomptes de les imatges del marge de l'infart i de 0,743 ($p < 0,001$) per les imatges de la zona distal. Aquesta fiabilitat interobservador va permetre l'obtenció dels resultats a partir dels valors promig. Concretament, els valors finals es van obtenir a partir de la mitjana de les seccions per no sobredimensionar el tamany de la mostra.

9.1. Tinció amb lectina GSLI B4

La lectina I-isolectina B₄ de la *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* (GSL I o GSL I-B₄) és un bon marcador per identificar les cèl·lules de llinatge endotelial

288-291

Solucions necessàries:

- TBS 10x pH 7,4:
 - 87,66g NaCl
 - 60,57g Tris
 - 1000 ml H₂O_d

Ajustar a pH 7,4 i diluir a 1X

Mètode:

- 1- Assecar les seccions amb l'ajuda d'un ventilador durant 30 min.
- 2- Recuperació de l'antigen (*antigen retrieval*): 40 min a 90-100°C en DAKO *Antigen Retrieval Solution* pH 9. Després deixar refredar 20 min.
- 3- Rentar les seccions 3 X 5 min en TBS.
- 4- Rentar les seccions 3 X 10 min en TBS + 0,1% Tritó-X100 (0,1% TBS-T).
- 5- Incubació amb la lectina: Diluir la GSL I isolectina B4 biotilada (Vector, ref. B-1205) en 1% BSA en 0,1% TBS-T. Incubar O/N a 4°C en una cambra humida. Dilució 1:25.
- 6- Atemperar durant 1h a temperatura ambient.

- 7- Rentar les seccions 3 X 5 min en 0,1% TBS-T.
- 8- Incubar les seccions en estreptavidina conjugada amb Alexa568 (Invitrogen, ref. S11226) en 0,1% TBS-T durant 1h a 37°C en una cambra humida protegida de la llum. Dilució 1:500.
Protegir les seccions de la llum d'ara en endavant.
- 9- Rentar les seccions 3 X 5 min en TBS.
- 10- Incubar amb DAPI dilució 1:1000 (solució estoc: 2 µg/ml) durant 5 min en una cambra humida.
- 11- Muntar en medi Vectashield (Vector, ref. H-1000).
- 12- Observació al microscopi i recompte de vasos.

10. Immunohistoquímica en teixit cardíac de rata

Mètode:

- 1- Assecar les seccions amb l'ajuda d'un ventilador durant 30 min.
- 2- Fixar en acetona freda (-20°C) durant 10 min.
- 3- Rentar les seccions 3 X 10 min en TBS.
- 4- Rentar les seccions 3 X 10 min en TBS + 0, 5% Tritó-X100 (0, 5% TBS-T).
- 5- Bloquejar durant 1 h en solució de bloqueig (1% BSA + 5% NGS en TBS-T).
Posar les seccions a un cambra humida.
- 6- Incubar les seccions amb l'anticòs primari a la dilució necessària (taula 9) en solució de bloqueig O/N a 4°C en una cambra humida.
- 7- Temperar durant 1 h a temperatura ambient.
- 8- Rentar les seccions 3 X 10 min en 0,25% TBS-T.
- 9- Incubar les seccions amb l'anticòs secundari (taula 10) contra el primari conjugat amb un fluoròfor a la dilució necessària en TBS durant 1 h a temperatura ambient en una cambra humida protegida de la llum.

**Protegir les seccions de la llum d'ara en endavant.

- 10- Rentar les seccions 3 X 10 min en TBS.
- 11- Incubar amb DAPI dilució 1:1000 (solució estoc: 2µg/ml) durant 30 min en una cambra humida.
- 12- Rentar les seccions 2 X 5 min en TBS.
- 13- Muntar en medi Vectashield (Vector, ref. H-1000).

Anticossos primaris utilitzats:

Antigen reconegut	Espècie hoste	Dilució	Casa comercial
HNA	Ratolí	1:10	Chemicon
α-actinina sarcomèrica	Ratolí	1:500	Sigma
Troponina I cardíaca	Conill	2 µg/ml	Santa Cruz Bio.
CD31	Conill	1:50	Abcam

Taula 9. Anticossos primaris i dilucions utilitzades en la immunohistoquímica en teixit de rata.

Anticossos secundaris utilitzats:

Espècie reconeguda	Espècie hoste	Dilució	Marcatge	Casa comercial
Ratolí	Cabra	5 µg/ml	Alexa Fluor 568	Molecular Probes
Conill	Ase	5 µg/ml	Alexa Fluor 568	Molecular Probes

Taula 10. Anticossos secundaris i dilucions utilitzades en la immunohistoquímica en teixit de rata.

11. Tractament estadístic i anàlisi de dades

Tots els resultats mostrats als gràfics es presenten com la mitjana de duplicats amb la corresponent desviació estàndard (SD) o, on s'indiqui, l'error estàndard de la mitjana (SEM).

Per l'anàlisi estadístic d'un factor es va utilitzar el *t-test* i la variant *Mann-Whitney Rank Sum Test* amb el programa SigmaStat, versió 3.1. Per la comparació de grups amb múltiples factors es va utilitzar l'anàlisi de variància ANOVA multifactorial amb el programa SPSS versió 11.0. Es van considerar les diferències com a estadísticament significatives quan el valor de p era $<0,05$.

“No n’hi ha prou de saber,
també cal aplicar.
No n’hi prou de voler,
també s’ha de fer.”

Johann Wolfgang von Goethe

RESULTATS

El primer tipus cel·lular que hem estudiat, i que conforma el primer capítol d'aquesta tesi, van ser les cèl·lules mare mesenquimals humanes obtingudes a partir del cultiu primari de mostres de moll d'os humà. El moll d'os va ser la primera font on es va aïllar aquest tipus cel·lular¹⁹³ amb resultats variables entre els diferents laboratoris²⁹⁷. Aquestes diferències en les característiques cel·lulars s'han explicat per diferències en l'edat dels pacients, protocols d'obtenció, aïllament, cultiu, etc. Aquest fet ens ha obligat a dur a terme una sèrie de caracteritzacions prèvies que, a més, ens han servit posteriorment com a paràmetres de referència en l'elecció d'un model cel·lular aplicable en un model *in vivo* d'infart de miocardi. Aquesta caracterització fenotípica ha consistit en l'anàlisi de l'expressió de marcadors de superfície, l'avaluació del seu creixement *in vitro*, pluripotencialitat i l'expressió basal de marcadors cardíacs.

Aquest mateix esquema de treball, però amb tota l'experiència adquirida en les MSC derivades de moll d'os, es va seguir en els dos tipus cel·lulars més estudiats en aquesta tesi doctoral. Per una banda, les cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós subcutani (subATPC), que conforma el segon capítol, i amb les quals buscàvem solucionar algunes limitacions que havíem trobat amb les MSC derivades de moll d'os. Finalment, hem identificat un nou llinatge cel·lular derivat del greix epicàrdic, un teixit en contacte íntim amb el cor, i fins ara no descrit. Aquestes cèl·lules, que hem anomenat "cèl·lules progenitores derivades de greix epicàrdic" o epiATPC, conformen el tercer capítol i tenen el potencial per ser una bona alternativa cel·lular per a la teràpia regenerativa aplicada al cor.



CÈL·LULES MARE MESENQUIMALS DERIVADES DE MOLL D'OS

1.1. Aïllament i cultiu

Les mostres de moll d'os de l'estern van ser processades seguint el protocol descrit prèviament a l'apartat de materials i mètodes. A partir del dia 3 de cultiu es van observar les primeres cèl·lules adherents que presentaven una morfologia fibroblàstica (figura 1.1). Aquestes MSC inicials foren cultivades i enriquides realitzant repetits canvi de medi

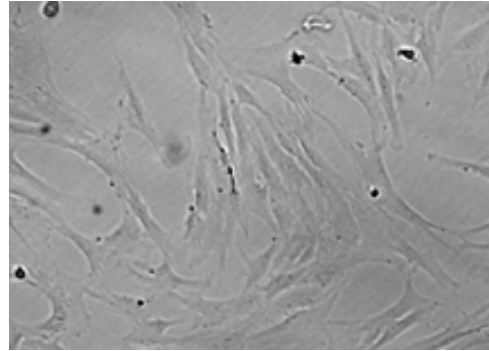


Fig. 1.1. Imatge al microscopi de MSC humanes en cultiu (20X).

per eliminar les cèl·lules en suspensió. Les cèl·lules van ser expandides fins a subconfluència i subcultivades mitjançant mètodes estàndards de tripsinització. Tot el conjunt d'experiments descrits a continuació es va realitzar amb cèl·lules mantingudes en cultiu durant un temps no superior a passatge 6 (\approx 3 mesos).

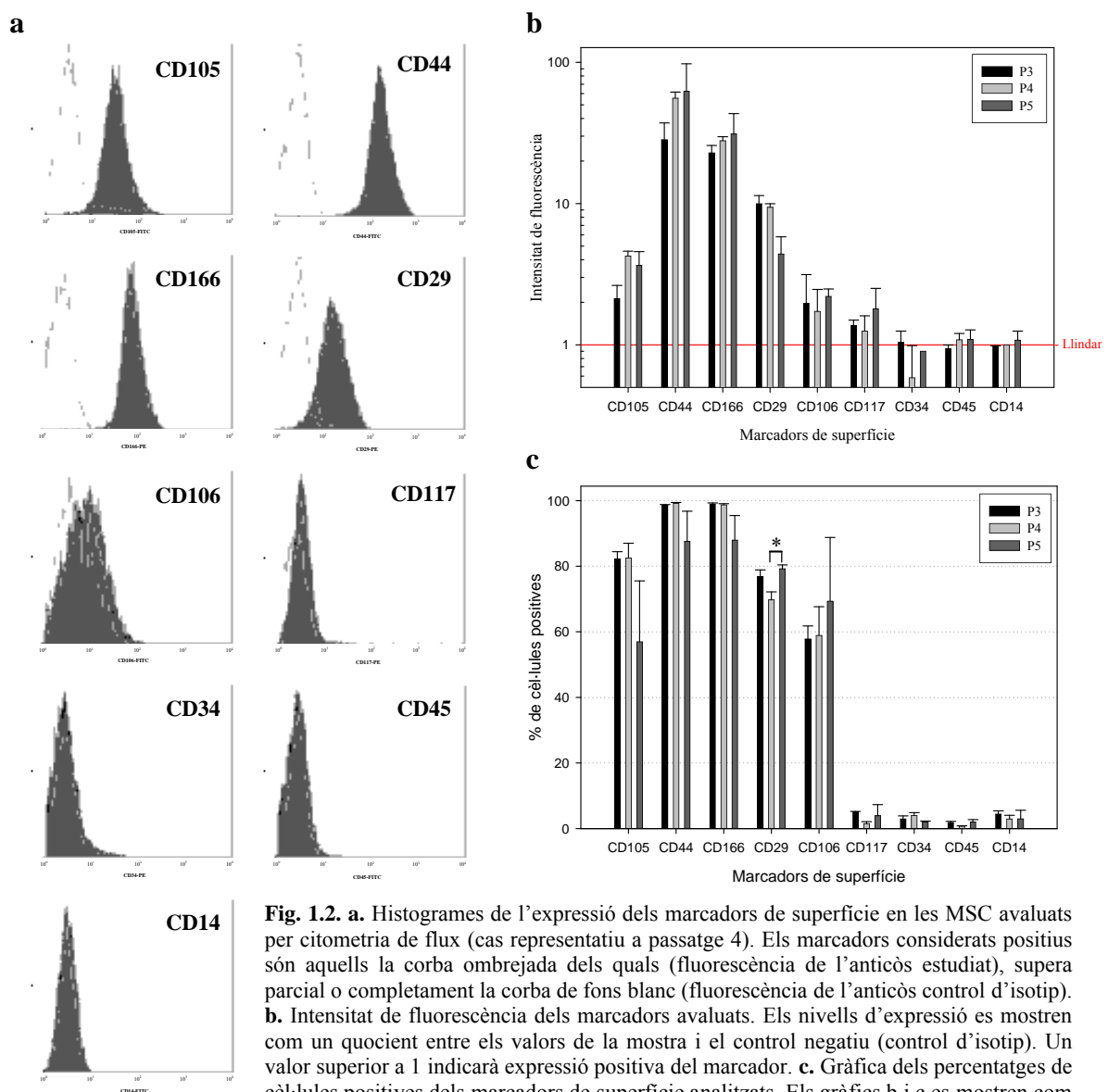
1.2. Anàlisi de marcadors de superfície mitjançant citometria de flux

Atesa l'alta heterogeneïtat de poblacions de MSC reportades segons el protocol de selecció i cultiu utilitzat²⁰⁸, es va caracteritzar l'expressió de marcadors de superfície mitjançant citometria de flux. Els marcadors seleccionats van ser CD105, CD106, CD44, CD45, CD166, CD29, CD34, CD14 i CD117 (veure descripció detallada a *Apèndix I*).

D'aquesta manera, s'observà que les MSC obtingudes eren positives per CD105, CD44, CD166, CD29 i CD106, i negatives per CD117, CD34, CD45 i CD14 (figura 1.2a). Aquest patró coincideix amb el descrit per altres grups per aquest tipus de cèl·lula mare^{194, 298}.

A més, es va observar com aquest patró d'expressió de marcadors de superfície es mantenia estable des del passatge 3 fins al 5. No es va detectar variabilitat en l'expressió dels marcadors entre individus (figura 1.2b)

A banda de la intensitat de fluorescència detectada per cada marcador, també es va avaluar el percentatge de cèl·lules que l'expressaven. La figura 1.2c mostra que no totes les cèl·lules del cultiu expressaven cadascun dels CDs en la mateixa proporció. Aquesta variava tot i que de manera estadísticament no significativa amb el temps de cultiu *in vitro*. CD29 va ser una excepció i la població de cèl·lules CD29⁺ es va reduir significativament entre P3 i P4, tot i que a P5 aquesta subpoblació va recuperar el percentatge observat a P3. Aquest anàlisi també ens va permetre observar que l'expressió de CD117 es limitava a només un 3,1% de les cèl·lules, valor que no és representatiu del conjunt de la població.



1.3. Determinació de la concentració cel·lular inicial òptima i del temps de duplicació

S'ha descrit en diversos treballs que les MSC derivades de moll d'os exhibeixen un potencial d'expansió *in vitro* molt variable²⁹⁹⁻³⁰¹. Aquesta variabilitat pot ser deguda a molts factors, entre el quals el procediment d'obtenció del moll d'os²⁹⁹⁻³⁰¹, la baixa freqüència de les MSC al moll d'os³⁰², l'edat i condició del donant^{300, 303, 304}. Un dels paràmetres clau, però, en l'establiment d'un cultiu primari és la densitat cel·lular inicial. Aquesta pot fer canviar el temps de duplicació i limitar-ne el nombre de duplicacions³⁰⁵.

Per conèixer quina era la concentració inicial que donava un creixement òptim i una velocitat màxima de creixement de les MSC humanes, es van dur a terme una sèrie d'experiments de proliferació cel·lular. D'aquesta manera, es van sembrar diferents concentracions inicials (1000, 2000, 4000 i 6000 cèl·lules viables/cm²) i es va analitzar la concentració de cèl·lules viables en els temps indicats fent servir la tinció amb blau de tripà i contades amb un hemocitòmetre.

La figura 1.3 mostra com el creixement de les MSC derivades de moll d'os és força limitat. Durant els primers 14 dies de cultiu, es pot observar un cert creixement exponencial que esdevé més pronunciat en aquells casos en què la concentració de cèl·lules inicial és baixa. La corba de creixement amb el pendent més pronunciat es correspon a la d'una concentració cel·lular inicial de 1000 cèl·lules/cm². Aquesta concentració permet arribar a la confluència en uns 15 dies.

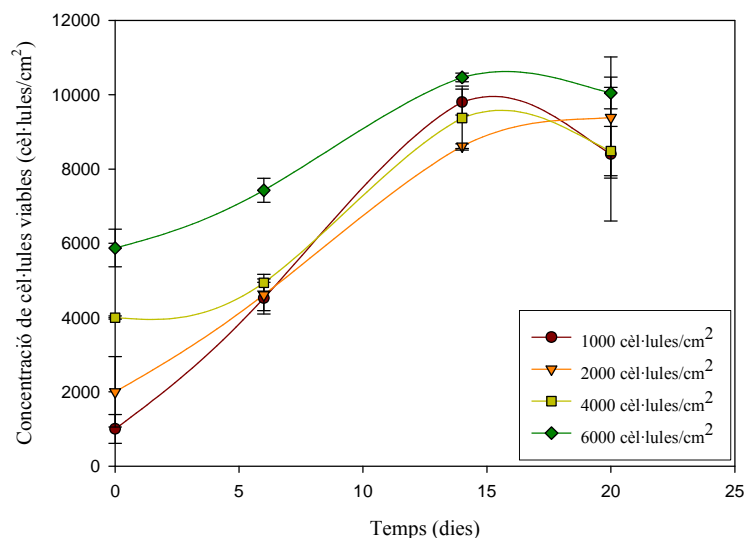


Fig. 1.3. Corbes de creixement de les MSC derivades de moll d'os a diferents densitats inicials. Les MSC van ser cultivades per duplicat a diferents densitats inicials, entre 1000 i 6000 cèl·lules/cm², i es van contar les cèl·lules viables als punts indicats. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM.

Aquesta concentració inicial de 1000 cèl·lules/cm² va permetre establir les condicions òptimes pel cultiu de les MSC i va ser utilitzada en el manteniment i en el conjunt d'experiments que conformen l'estudi de les cèl·lules mesenquimals utilitzades en aquesta tesi.

Per l'obtenció d'una estimació numèrica de la velocitat de creixement i el temps de duplicació de les MSC humanes en cada una de les concentracions inicials anteriors, es van linealitzar les parts de les corbes de creixement corresponents al creixement exponencial (1-14 dies) (figura 1.4).

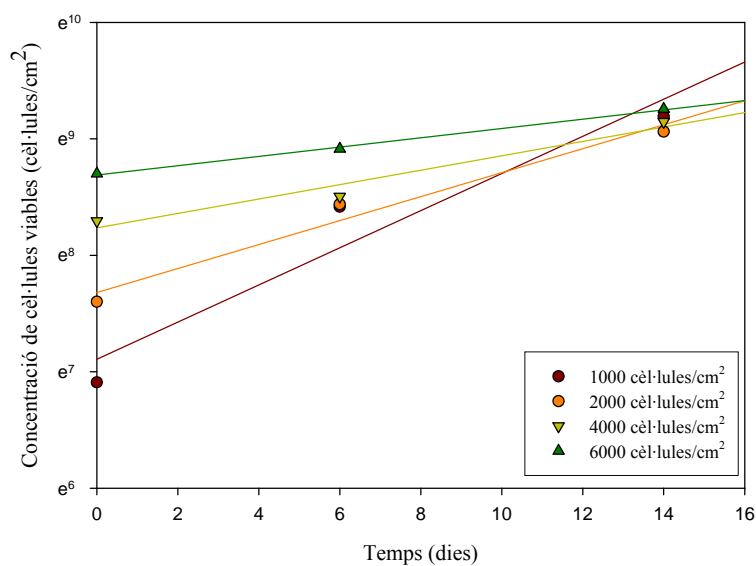


Fig. 1.4. Linealització de les corbes de creixement de MSC humanes en cultiu a partir de concentracions cel·lulars inicials diferents.

Les equacions obtingudes a partir de la linealització dels creixements foren les següents:

$$C_0 = 1000 \text{ cèl·lules viables/cm}^2 \rightarrow y = 7,108 + 0,159x \quad r^2 = 0,9307$$

$$C_0 = 2000 \text{ cèl·lules viables/cm}^2 \rightarrow y = 7,680 + 0,102x \quad r^2 = 0,9728$$

$$C_0 = 4000 \text{ cèl·lules viables/cm}^2 \rightarrow y = 8,236 + 0,062x \quad r^2 = 0,9598$$

$$C_0 = 6000 \text{ cèl·lules viables/cm}^2 \rightarrow y = 8,690 + 0,040x \quad r^2 = 0,9973$$

A partir del pendent de la recta de regressió de les equacions de linealització es va poder calcular la μ_m o velocitat màxima de creixement (equació 1.1).

$$\mu_m = \frac{\text{Ln}(\text{viables})}{\text{Temps}} = \text{Pendent de la recta de regressió} \quad \text{Eq. 1.1}$$

Les μ_m obtingues per cada concentració cel·lular inicial són les següents (taula 1):

C_0 (cèl·lules viables/cm ²)	μ_m (dies ⁻¹)
1000	0,159
2000	0,102
4000	0,062
6000	0,040

Taula 1. μ_m de les MSC derivades de moll d'os en funció de la concentració cel·lular inicial.

Aplicant l'equació 1.2 i amb la μ_m obtinguda anteriorment es va calcular el temps de duplicació de les MSC humanes en funció de la seva concentració inicial.

$$\text{Temps de duplicació (dies)} = t_d = \frac{\text{Ln } 2}{\mu_m} \quad \text{Eq. 1.2}$$

Els temps de duplicació obtinguts per cada concentració cel·lular inicial foren els següents (taula 2):

C_0 (cèl·lules viables/cm ²)	T_d (dies)
1000	4,36
2000	6,80
4000	11,18
6000	17,33

Taula 2. T_d de les MSC derivades de moll d'os en funció de la concentració cel·lular inicial.

Com es va poder observar, el temps de duplicació de les MSC humanes s'incrementava a mesura que augmentava la concentració cel·lular inicial. Així, la concentració cel·lular inicial de 1000 cèl·lules viables per centímetre quadrat tenia un temps de duplicació més baix ($t_d = 4,36$ dies). Novament, es confirmava que aquesta concentració cel·lular inicial era l'òptima per al cultiu *in vitro* de les MSC humanes derivades de moll d'os.

1.4. Anàlisi de la capacitat pluripotencial de les MSC humanes

En relació amb l'anàlisi de la pluripotencialitat de les MSC, els canvis morfològics induïts per la diferenciació adipogènica al cap dels 15 dies de tractament amb medi adipogènic foren evidents. Tal com es pot observar a la figura 1.5a i b, el citoplasma de les MSC tractades es tenyia de color vermell amb el colorant específic *Oil Red O* indicant l'acumulació de vacuoles lipídiques intracel·lulars. En canvi, les cèl·lules control, cultivades amb medi estàndard, no acumulaven vacuoles lipídiques (figura 1.5c).

Després d'incubar les cèl·lules amb el medi de diferenciació osteogènica, es va avaluar la deposició de matriu mineralitzada observant-se, una gran quantitat de nòduls mineralitzats que recobrien quasi per complet tota la superfície del cultiu (figura 1.5d i e).

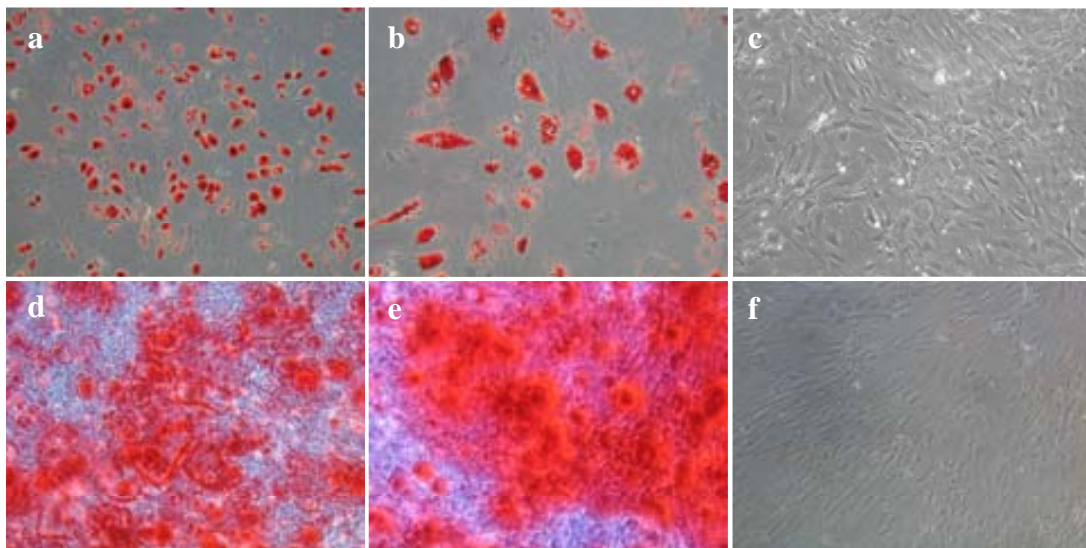


Fig. 1.5. Inducció de la diferenciació adipogènica i osteogènica de les MSCs a passatge 2, a les 4 setmanes de tractament. **a, b.** Imatges corresponents a la diferenciació adipogènica aconseguida tenyides amb *Oil red O*; **c.** Control negatiu de diferenciació adipogènica (cèl·lules no tractades). **d, e.** Imatges de diferenciació osteogènica. **f.** Control negatiu de diferenciació osteogènica (cèl·lules no tractades). a, c-f (10X); b (20X).

1.5. Estudi del potencial cardiogènic de les MSC humanes

1.5.1. Anàlisi de l'expressió basal de marcadors cardíacs

S'estudià l'expressió basal de proteïnes cardíques mitjançant immunocitofluorescència. S'utilitzaren anticossos específics contra dos factors de transcripció cardíacs: GATA-4 i Nkx-2.5; tres proteïnes del sarcòmer dels cardiòcits: cadena pesada de la β -miosina (β -MHC), troponina I cardíaca (cTnI) i α -actinina sarcomèrica; i dues proteïnes que participen en l'aparell electromecànic de les cèl·lules cardíques: connexina-43 (Cx-43) i SERCA-2 (veure descripció detallada a *Apèndix II*).

Com a resultat, es va observar que les MSC expressaven GATA-4 i que aquest important factor de transcripció cardíac es localitzava bàsicament al nucli de les cèl·lules (figura 1.6a). Per contra, es va observar l'absència de Nkx2.5 (figura 1.6b). La figura 1.6 també mostra com ambdós marcadors es troben altament expressats en els controls positius de l'experiment corresponents a cardiòcits humans aïllats (figura 1.6c i d).

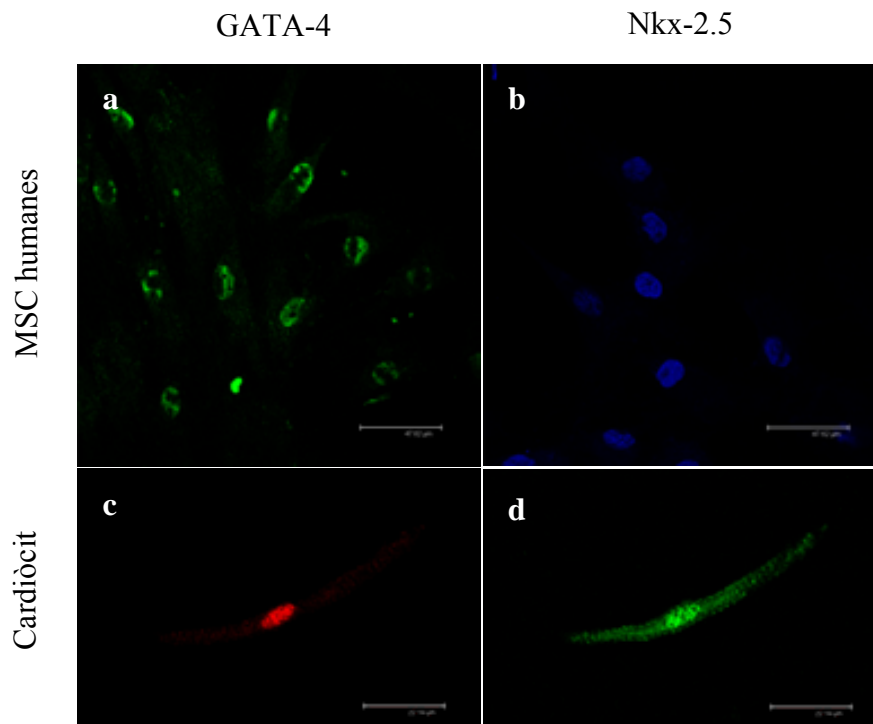


Fig. 1.6. Imatges de MSC, cultivades 7 dies en medi estàndard, al microscopi confocal de fluorescència (**a** i **b**) i d'un cardiòcit porcí neonatal aïllat com a control positiu d'expressió (**c** i **d**). Tinció contra GATA-4 en verd (**a**) i vermell (**c**). En el panell (**b**) s'observa, en verd, la tinció contra Nkx-2.5 i en blau tinció amb Hoescht de nuclis de les cèl·lules.

Seguidament, es va estudiar l'expressió de proteïnes claus en l'estructura sarcomèrica dels cardiòcits com són la β -MHC, la troponina I i la α -actinina per part de les MSC humanes. Com es pot veure a les figures 1.7a i e, no es va observar expressió ni de troponina I ni de β -MHC, però sí de α -actinina sarcomèrica (figura 1.7c). A més, en els cultius analitzats, es va observar que la localització subcel·lular de la α -actinina en les MSC no seguia el mateix patró de distribució que s'observa en un cardiòcit, on aquesta proteïna està integrada en l'estructura sarcomèrica (figura 1.7d).

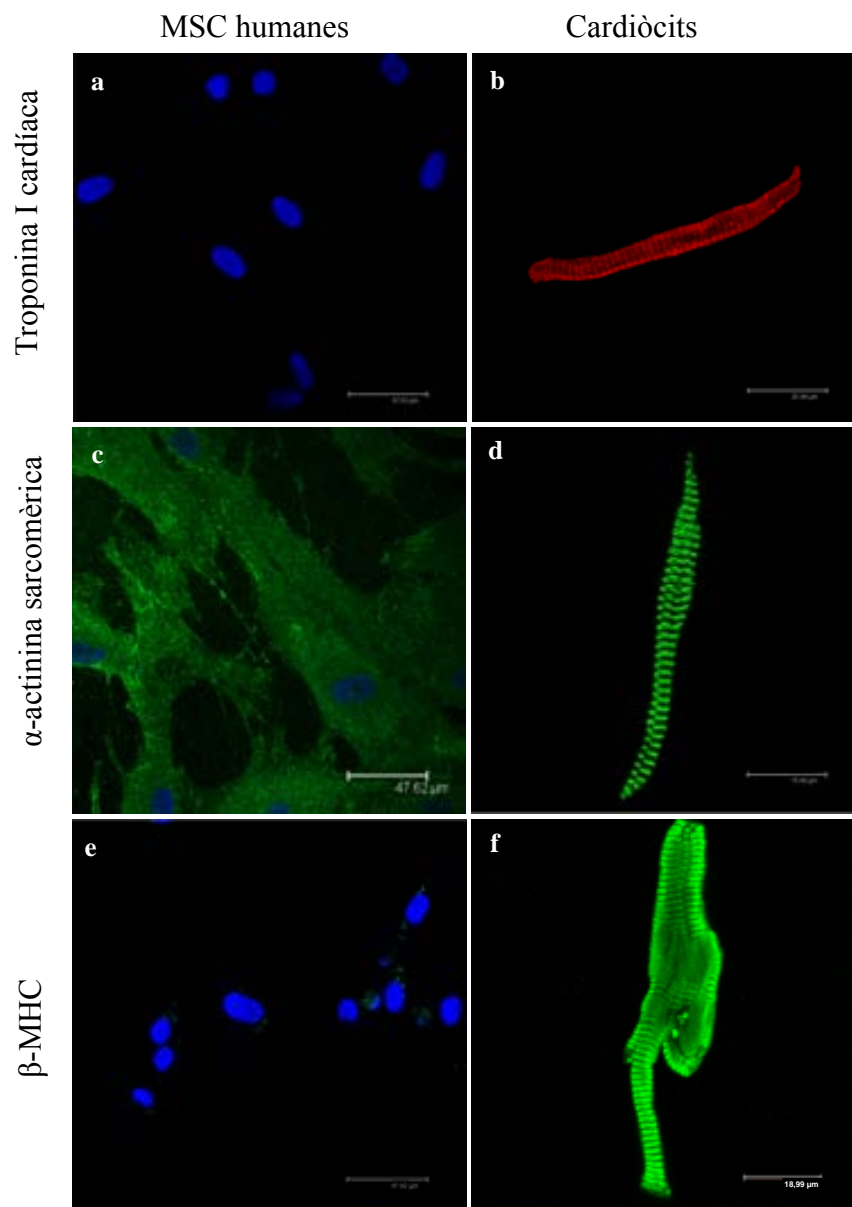


Fig. 1.7. Immunocitoquímiques de MSC (**a**, **c** i **e**) i cardiòcits (**b**, **d** i **f**) observades al microscopi confocal de fluorescència. **a** i **b**. Tinció contra troponina I cardíaca (vermell). **c** i **d**. Marcatge contra α -actinina sarcomèrica (verd). **e** i **f**. Tinció contra β -MHC (verd). En **a**, **c** i **e** el nucli de les MSC s'ha tenyit amb Hoescht (blau).

Pel que fa a SERCA-2 i Cx-43, dues proteïnes importants que formen part dels canals iònics i de les *gap junctions* dels cardiòcits, es va detectar expressió basal d'ambdues proteïnes per part de les MSC humanes (figura 1.8a i c). La seva distribució subcel·lular, però, era diferent a la mostrada pels cardiòcits (figura 1.8b i d). Així, la Cx-43 (figura 1.8a) s'expressava lleument i es distribuïa de manera difusa pel citoplasma de les MSC mentre que en els cardiòcits la proteïna es concentra als extrems de la cèl·lula, on s'hi localitzen principalment les *gap junctions* (figura 1.8b). En relació amb SERCA-2, aquesta es distribuïa de manera uniforme al citoplasma de les MSC humanes (figura 1.8c). En canvi en el cardiòcit, aquesta bomba de calci, es troba distribuïda seguint un patró estriat al llarg de tota la cèl·lula d'acord amb la seva localització a la membrana del reticle sarcoplasmàtic (figura 1.8d).

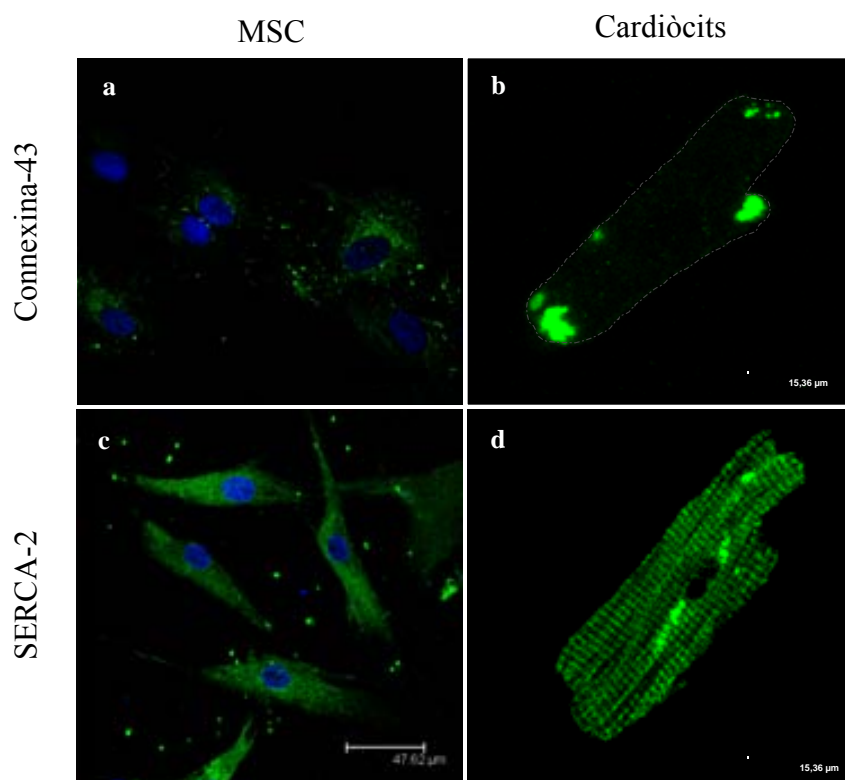


Fig. 1.8. Imatges de MSC (a i c) i cardiòcits (b i d) sota el microscopi confocal de fluorescència. a i b. Connexina-43 (verd). c i d. SERCA-2 (verd). En a i c el nucli de les MSC s'ha tenyit amb Hoescht (blau).

1.5.2. Diferenciació cardiogènica de les MSC humanes: tractament amb 5-aza

La diferenciació cardiomiogènica de les MSC es va induir afegint la 5-azacitidina al medi de cultiu durant 15 dies. Com a resultat, es va detectar un augment en l'expressió de connexina-43 i β -MHC (figura 1.9). Com s'ha descrit en l'apartat anterior, aquestes proteïnes no s'expressaven o ho feien de manera molt lleu en les MSC humanes en condicions basals. Aquest augment en l'expressió de la β -MHC, però, no va anar acompanyat d'una organització estructurada en forma sarcomèrica, i tampoc s'observà una clara distribució de la Cx-43 en els extrems de la cèl·lula com succeeix en els cardiòcits.

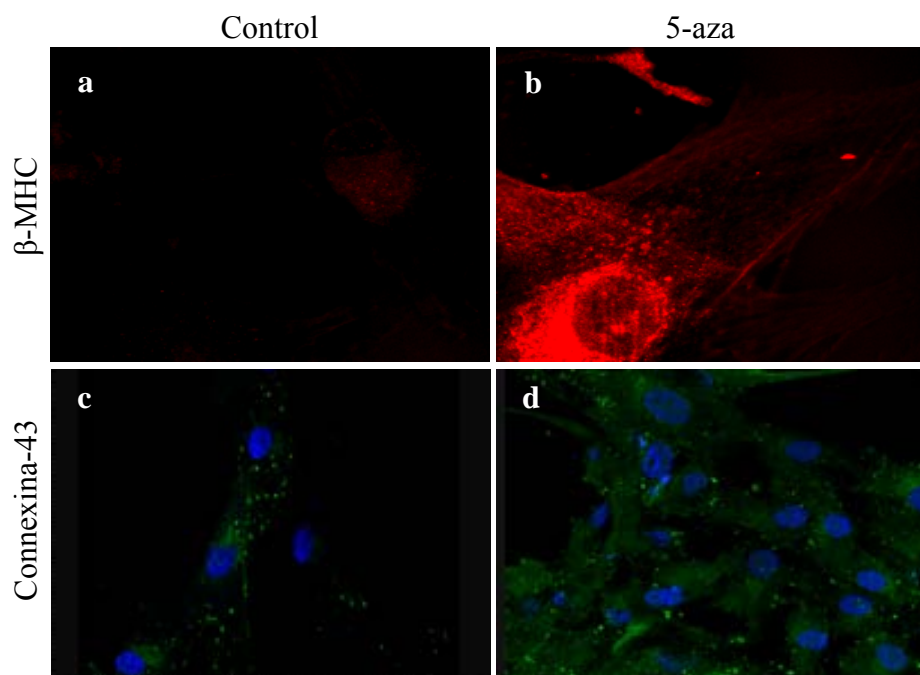


Fig. 1.9. Imatges de MSC control (a i c) i tractades amb 5-aza (b i d) al microscopi confocal de fluorescència. a i b. Tinció contra β -MHC en vermell. c i d. Tinció contra connexina-43 en verd. En c i d el nucli de les MSC s'ha teñit amb Hoescht (blau).

L'efecte observat de la 5-aza sobre l'expressió de la Cx-43 es va corroborar mitjançant *western-blot* (figura 1.10). En aquests mateixos experiments, no es va detectar canvis en l'expressió de la troponina I cardíaca.

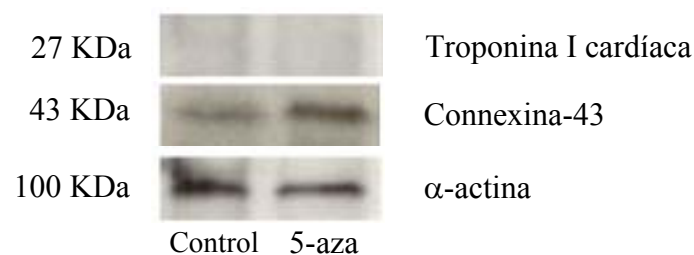


Fig. 1.10. Expressió de proteïnes cardíques en MSC humanes tractades amb 5-aza (10 μ M) i control analitzades per *western-blot*.

En conclusió, el grau de diferenciació cardiomiogènica assolit a les MSC després del tractament amb 5-aza va ser limitat i caracteritzat per un augment de les proteïnes Cx-43 i β -MHC. Aquestes dades, juntament amb la dificultat per obtenir grans quantitats de cèl·lules i la seva baixa velocitat de creixement, ens va portar a buscar fonts cel·lulars alternatives.



CÈL·LULES MARE DERIVADES DE TEIXIT ADIPÓS SUBCUTANI

El teixit adipós, com el moll d'os, deriva de la mesènquima embrionària. La seva obtenció, però, és més fàcil i a més, amb freqüència, es troba en grans quantitats en l'ésser humà adult. Altres grups han obtingut gran quantitat de cèl·lules amb unes característiques molt similars a les MSC derivades de moll d'os i amb resultats força prometedors quan aquestes s'utilitzen en el camp de la regeneració miocàrdica^{227, 306}.

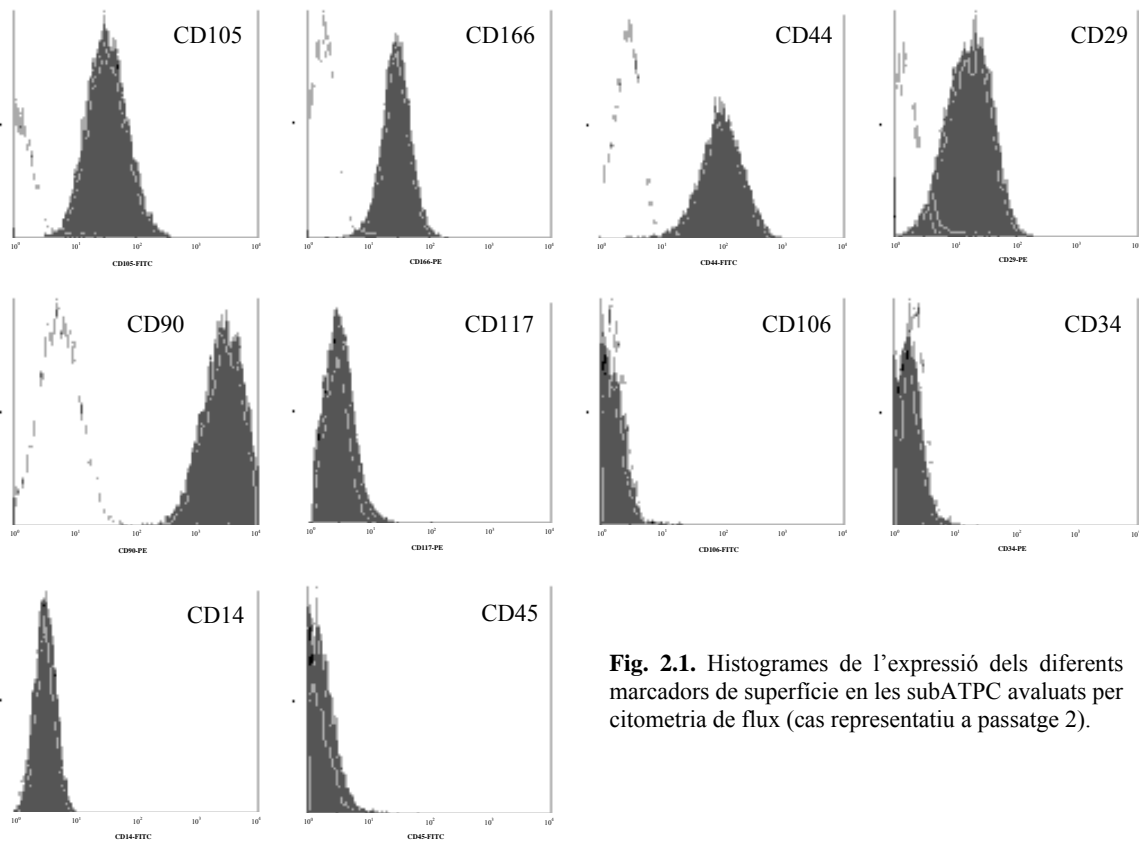
2.1. Aïllament i cultiu

Es van obtenir biòpsies del greix subcutani situat entre la pell i l'esternó d'un total de 118 pacients sotmesos a cirurgia cardíaca. La mitjana d'edat dels pacients va ser de $67,52 \pm 9,21$ anys.

Les cèl·lules mare derivades de teixit adipós subcutani (subATPC, *Subcutaneous Adipose Tissue Progenitor Cells*) es van aïllar per digestió amb col·lagenasa (veure *Materials i mètodes*). A les 24h, s'observaren cèl·lules fusiformes adherides que van ser rentades a les 48h per eliminar restes de teixit i cèl·lules en suspensió. Les cèl·lules seleccionades es cultivaren a 37°C i 5% CO₂ en medi complet de cultiu (α -MEM + 10% FBS + 1% P/S) i expandides fins a arribar a subconfluència i subcultivades mitjançant mètodes estàndards de tripsinització. El conjunt d'experiments es va dur a terme amb cèl·lules mantingudes en cultiu durant un temps no superior a passatge 5 (≈ 2 mesos).

2.2. Anàlisi de marcadors de superfície mitjançant citometria de flux

Com a resultat, es va observar que les subATPC expressaven els marcadors CD105, CD44, CD106, CD29 i CD90; i eren negatives per CD117, CD106, CD34, CD45 i CD14 (figura 2.1). La manca d'expressió de CD106 (marcador associat funcionalment amb l'hematopoesi) era un tret diferenciador del patró d'expressió obtingut per les MSC derivades de moll d'os. Aquest resultat és consistent amb el fet que aquestes cèl·lules resideixen en un teixit no hematopoètic²¹⁹.



A més, aquest patró d'expressió es va mantenir al llarg del temps de cultiu amb relació als valors d'intensitat de fluorescència (figura 2.2).

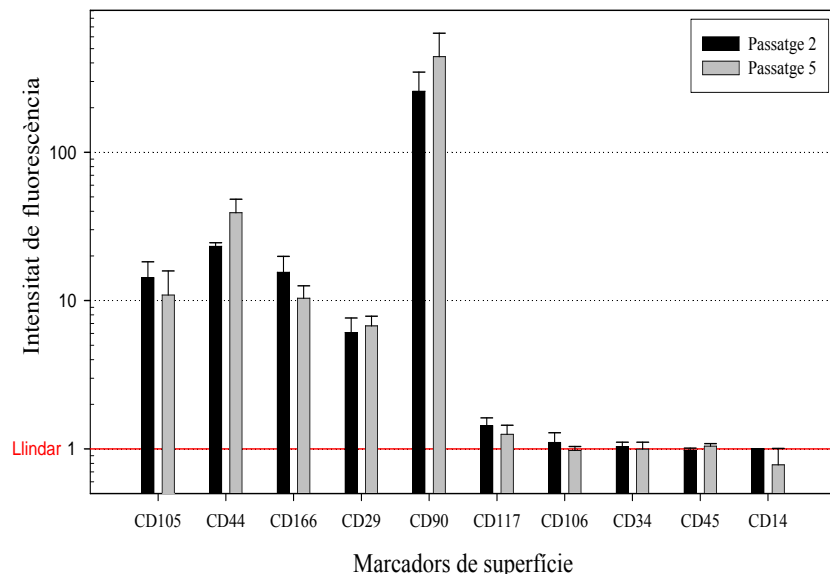


Fig. 2.2. Gràfica comparativa de la intensitat de fluorescència dels diferents marcadors de superfície analitzats en les subATPC a passatges 2 i 5. Els resultats es mostren com la mitjana de tres casos d'individus diferents \pm SD.

El percentatge de cèl·lules positives en la població també es va mantenir constant durant el temps de cultiu (figura 2.3) demostrant l'homogeneïtat fenotípica de les cèl·lules aïllades. El canvi d'expressió més destacat, tot i no ser estadísticament significatiu ($p = 0,057$), es corresponia al CD105 que es perdia lleugerament a temps llargs de cultiu.

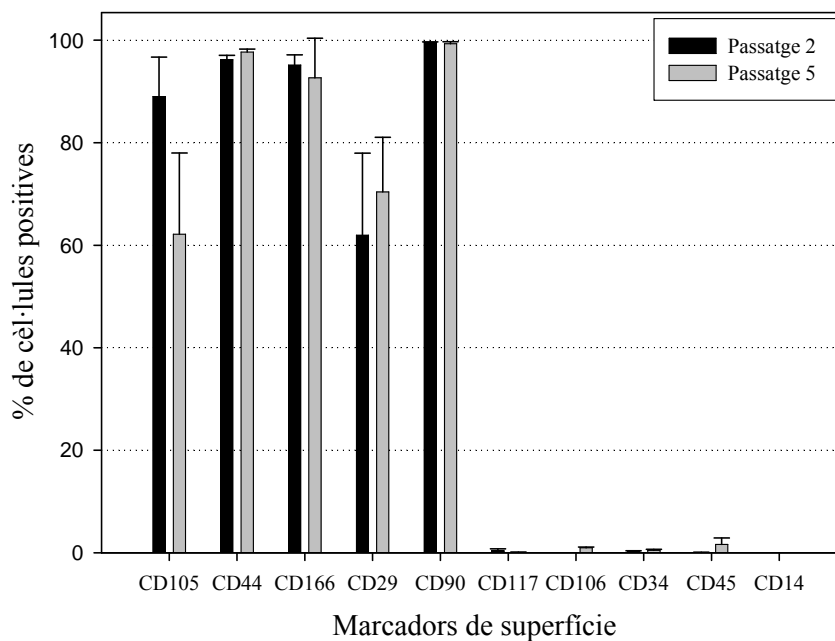


Fig. 2.3. Gràfica del percentatge de les subATPC positives pels diferents marcadors de superfície analitzats per triplicat a passatges 2 i 5.

2.3. Determinació del temps de duplicació

Les corbes de creixement obtingudes per les subATPC van permetre calcular el temps de duplicació d'aquesta població. Les subATPC a passatge 2 i a una concentració inicial de $1000 \text{ cèl·lules/cm}^2$ mostraven un temps de duplicació de $3,1 \pm 0,03$ dies (figura 2.4a). La morfologia fusiforme de les cèl·lules a l'inici del cultiu va evolucionar amb el temps cap a una forma més irregular i mida més gran (figura 2.4b).

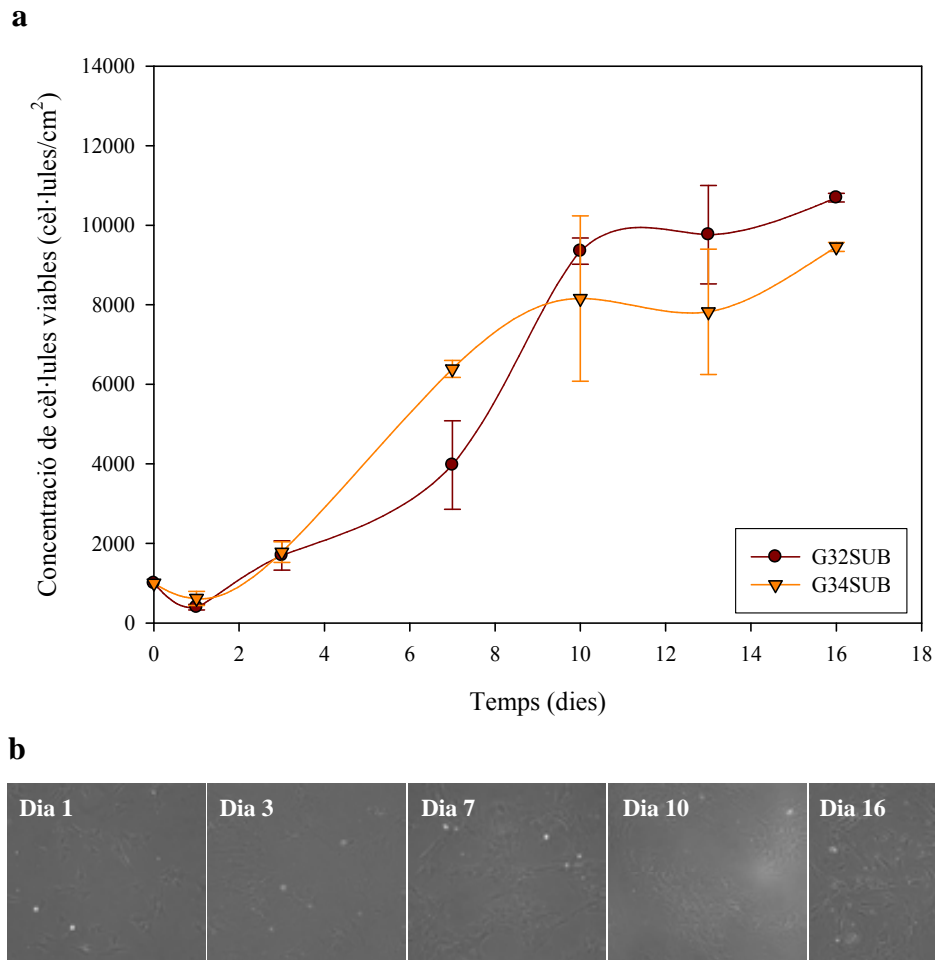


Fig. 2.4. a. Corbes de creixement de les subATPC aïllades a partir de mostres de dos individus. Les subATPC van ser cultivades per duplicat a una densitat inicial de 1000 cèl·lules/cm², i es van contar les cèl·lules viables als punts indicats mitjançant la tinció amb blau de tripà. Els resultats mostrats són de dos casos representatius i s'expressen com la mitjana ± SEM. **b.** Imatges representatives del creixement de les subATPC a diferents dies (10x).

2.4. Anàlisi de la pluripotencialitat de les subATPC

A la figura 2.5a podem observar com les subATPC, després de 15 dies de tractament amb medi adipogènic, es van ténir de vermell amb el colorant *Oil red O* indicant la presència de vacuoles lipídiques a l'interior de les cèl·lules, fet que evidenciava la diferenciació adipogènica de les cèl·lules seleccionades.

Per contra, les subATPC no van diferenciar cap a osteòcits. La figura 2.5c mostra subATPC després de 15 dies de tractament amb medi osteogènic i la seva posterior tinció amb vermell d'alizarina. Com es pot observar, tot i evidenciar-se un canvi en la

seva morfologia, no es van observar dipòsits de calci indicant un grau de diferenciació incomplet.

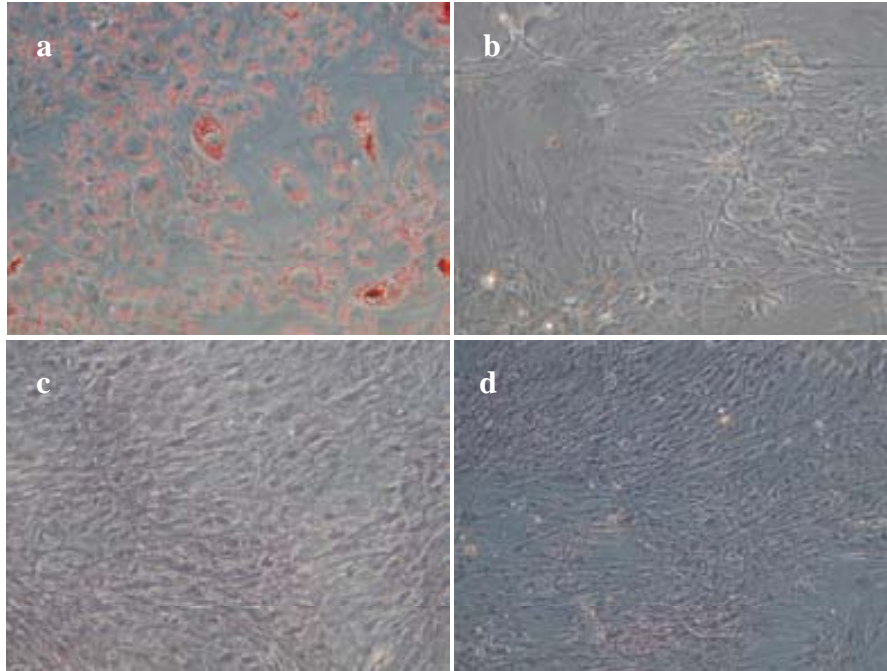


Fig. 2.5. Inducció de la diferenciació adipogènica i osteogènica de les cèl·lules progenitores derivades de greix subcutani a passatge 2, a les dues setmanes de tractament. **a.** Imatge de la diferenciació adipogènica aconseguida tenyides amb *Oil red O*; **b.** Control negatiu de diferenciació adipogènica (cèl·lules no tractades). **c.** Imatge de diferenciació osteogènica. **d.** Control negatiu de diferenciació osteogènica (medi control). a (10X); b-d (20X).

2.5. Anàlisi de l'expressió basal de marcadors cardíacs en les subATPC

Es va estudiar l'expressió de marcadors cardíacs en les subATPC a passatges 2 i 5 en condicions basals mitjançant PCR a temps real, *western blot* i immunocitofluorescència. Com es mostra a la figura 2.6a, les cèl·lules expressaven els transcrits pels gens de la α -actinina sarcomèrica, SERCA-2, connexina-43 i Tbx5, i per contra no mostraven expressió gènica de β -MHC, cTnI, Isl-1, GATA-4 i Nkx-2.5.

A nivell proteic, l'expressió de α -actinina sarcomèrica, SERCA-2 i Cx-43 només va ser detectada per *western blot* a passatge 5 (figura 2.6b). Aquests resultats es van confirmar per immunocitofluorescència (figura 2.6c-d), experiments en què també es va detectar molt lleument el factor de transcripció cardíac Tbx5 (figura 2.6c).

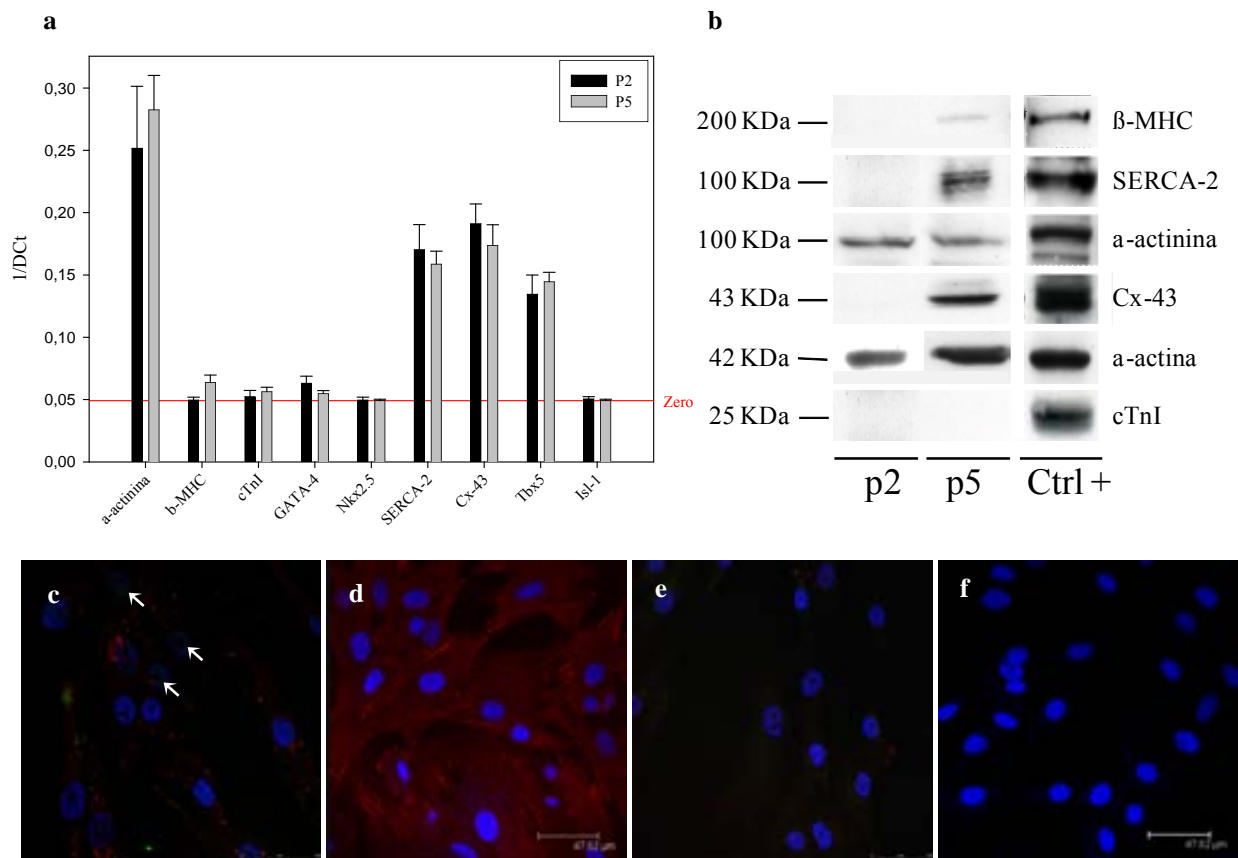


Fig. 2.6. Anàlisi de l'expressió basal de gens cardíacs de les subATPC. **a.** La PCR a temps real va ser utilitzada per determinar l'expressió a passatges 2 (P2) i 5 (P5) dels gens α -actinina sarcomèrica (a-actinina), cadena pesada de la β -miosina (b-MHC), troponina I cardíaca (cTnI), GATA-4, Nkx-2.5, SERCA-2, connexina-43 (Cx-43), Tbx-5 i islet-1 (isl-1) utilitzant el mètode Δ Ct (DCt). L'expressió gènica va ser normalitzada amb el gen GAPDH. Els valors corresponen a la mitjana de 4 experiments realitzats per duplicat \pm SEM. La línia llinar (Zero) equival a una expressió en un cicle igual o superior a 40, per sota d'aquesta línia l'expressió del gen es considera indetectable. **b.** *Western blot* de proteïnes cardíacques expressades per les subATPC a passatges 2 i 5. **c-d.** Expressió basal de gens cardíacs per immunocitoquímica de les subATPC en cultiu a passatge 5. **c.** Tbx-5 (puntejat verd nuclear, les fletxes blanques mostren nuclis on s'observa expressió) i connexina-43 (puntejat vermell). **d.** α -actinina sarcomèrica (vermell). **e.** SERCA-2 (verd) i GATA-4 (vermell). **f.** β -MHC (verd) i cTnI (vermell).

En conclusió, les subATPC malgrat mostrar una millor velocitat de creixement, no expressaven basalment ni GATA-4 ni Nkx-2.5, dos factors de transcripció cardíacs claus. A més, la seva pluripotencialitat es trobava limitada cap a llinatge adipogènic, demostrant una menor plasticitat que les MSC derivades de moll d'os i que probablement, la seva funció és la de mantenir l'homeòstasi del teixit adipós.



CÈL·LULES PROGENITORES DERIVADES DE TEIXIT ADIPÓS EPICÀRDIC

En l'anterior capítol, s'ha descrit com les subATPC mostren una millor velocitat de creixement en comparació amb les MSC derivades de moll d'os però una pobre capacitat de diferenciació (restringida unipotencialment a adipocits), la no expressió basal de factors de transcripció claus en la diferenciació cardíaca com GATA-4 o Nkx2.5, i la baixa expressió, en general, de la resta de gens cardíacs estudiats. En resum, el greix subcutani és un bon teixit per la seva abundància i millor capacitat proliferativa de les seves cèl·lules però els seus progenitors no mostren potencial cardiomiogènic *in vitro*.

Anteriorment, en alguns estudis tant *in vitro* (experiments de cocultiu amb cardiòcits neonatals) com *in vivo* (experiments de trasplantament de cèl·lules al cor), s'havia demostrat que l'ambient i el contacte amb cardiòcits, podia induir la diferenciació cardiomiogènica de diferents tipus de cèl·lules progenitores o mare.

Per aquestes raons es va buscar una nova font alternativa de cèl·lules: el teixit adipós epicàrdic. Com mostrarem a continuació, i a partir de mostres obtingudes dels mateixos pacients que en l'apartat anterior, es van aïllar, caracteritzar i descriure una nova població de cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós epicàrdic (epiATPC) amb unes propietats úniques que ens va permetre escollir-les com el tipus cel·lular ideal per ser implantades en dos models animals d'infart de miocardi. A més, aquest nou tipus cel·lular va donar lloc a una patent nacional (P200702205) i internacional (PCT/ES2008/000543).

3.1. Aïllament, cultiu i clonogenicitat

Es van obtenir mostres del teixit adipós epicàrdic situat a la base de l'aorta (figura 3.1a). Aquestes mostres procedien dels mateixos pacients i en el mateix moment dels quals es recollien les mostres de teixit adipós subcutani descrit en l'apartat anterior (n = 118; $67,52 \pm 9,21$ anys).

Les cèl·lules van ser obtingudes seguint el protocol descrit a *Materials i mètodes*. Aquestes eren cultivades *in vitro* i seleccionades per adherència a les 48h realitzant rentats per eliminar les cèl·lules en suspensió. Les cèl·lules adherides mostraven una morfologia fusiforme (figura 3.1b) i van ser cultivades i expandides per dur a terme tots els experiments durant un temps de cultiu no superior a passatge 5 (≈ 3 mesos).

En un assaig de clonogenicitat, 7 dels 9 clons obtinguts van créixer i formar colònies.

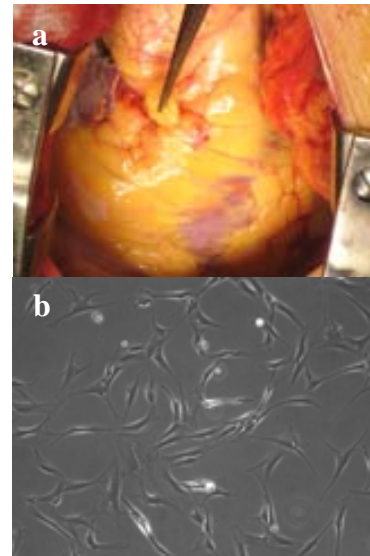


Fig. 3.1. a. Fotografia del greix epicàrdic envoltant el cor del qual se n'obtenia una biòpsia. b. Imatge de les epiATPC obtingudes en cultiu.

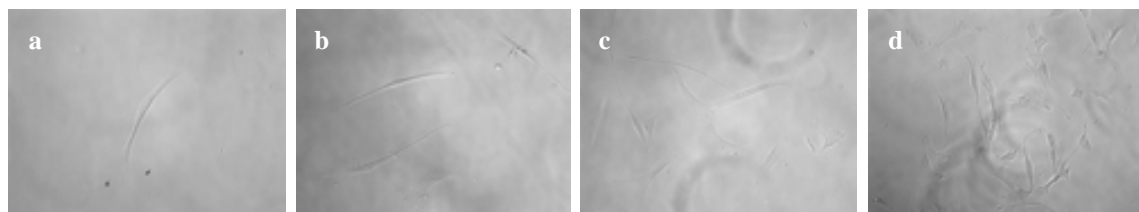


Fig. 3.2. Imatge d'un clon d'epiATPC a les 48h (a) i la seva evolució temporal (b-d); 20X.

3.2. Anàlisi de marcadors de superfície mitjançant citometria de flux

Es van analitzar les cèl·lules obtingudes a partir de tres casos diferents i el patró en tots els casos va seguir el cas representatiu mostrat a la figura 3.3a. Com a resultat, es va observar que les epiATPC eren marcadament positives per CD105 ($10,71 \pm 3,5$), CD44 ($26,29 \pm 2,0$), CD166 ($11,78 \pm 2,1$), CD29 ($8,5 \pm 2,6$) i CD90 ($289,5 \pm 77,7$), lleugerament per CD117 ($2,4 \pm 2,1$) i CD34 ($2,9 \pm 2,3$) i negatives per CD106 ($1,0 \pm$

0,0), CD45 ($1,0 \pm 0,0$) i CD14 ($1,0 \pm 0,0$) (figura 3.3b). L'expressió de CD117 i CD34 es limitava a només un 2,8 i un 11,1%, respectivament de la població cel·lular i aquesta expressió es reduïa notablement a passatge 5 respecte els valors obtinguts a passatge 2 (figura 3.3c). La resta del patró d'expressió dels marcadors de superfície en els epiATPC es mantenia estable al llarg del cultiu.

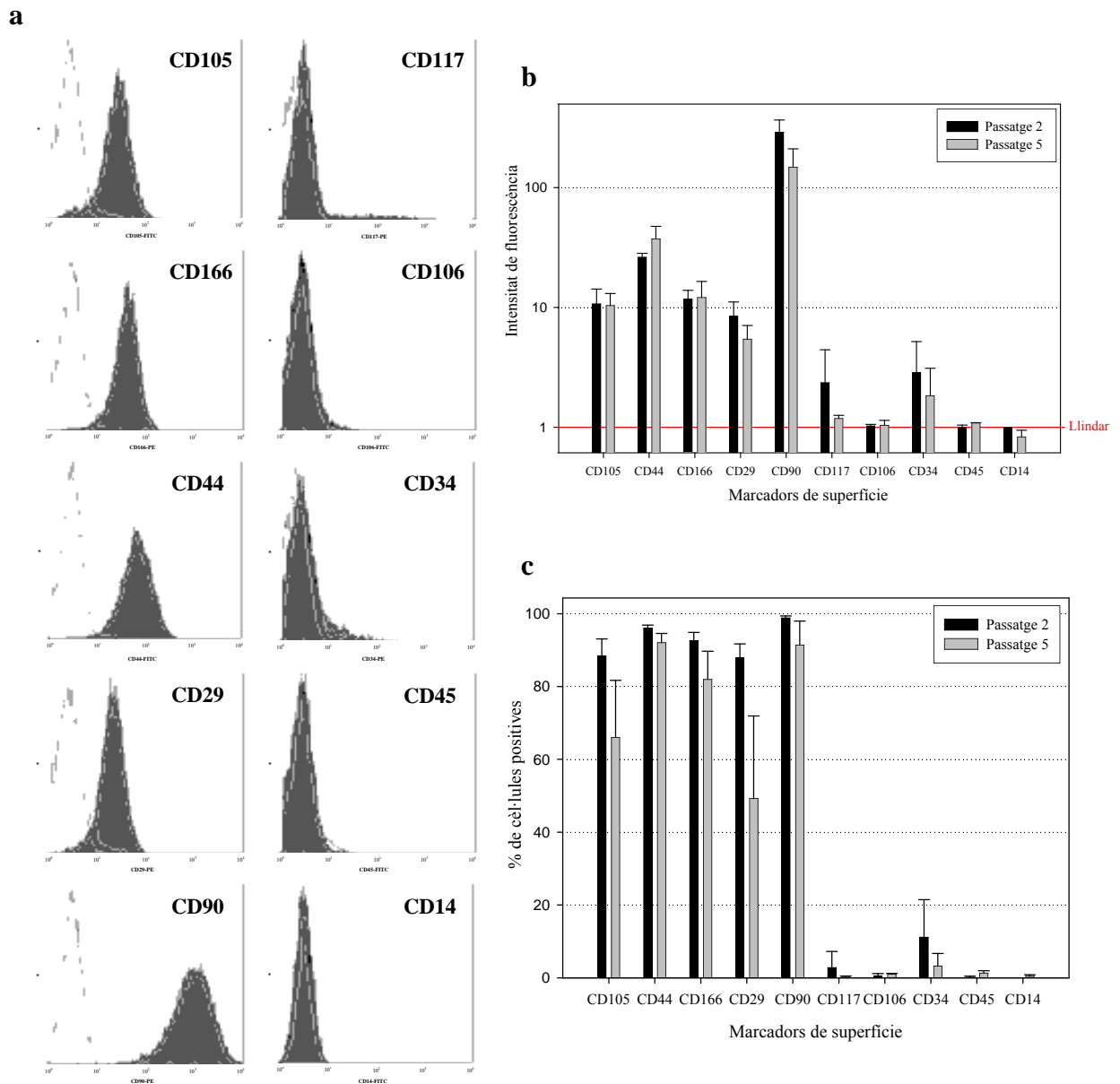


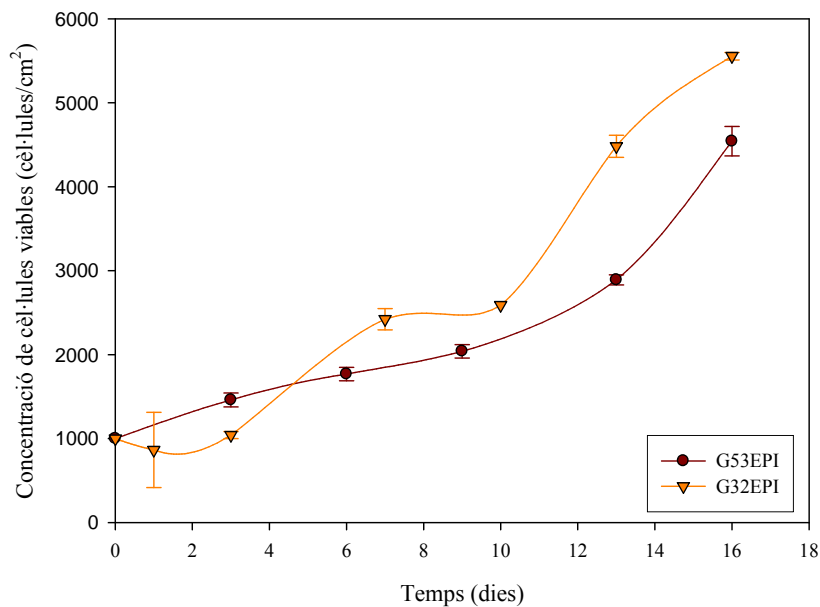
Fig. 3.3. a. Histogrames de l'expressió dels diferents marcadors de superfície en les epiATPC avaluats per citometria de flux (cas representatiu a passatge 2). b. Gràfica on es mostra la intensitat de fluorescència dels diferents marcadors de superfície avaluats a passatges 2 i 5. c. Gràfica comparativa dels percentatges de cèl·lules positives dels marcadors de superfície analitzats.

3.3. Determinació del temps de duplicació

El temps de duplicació va ser determinat, com en els casos anteriors, mitjançant una corba de creixement realitzada durant 16 dies a partir de 4 casos obtinguts d'individus diferents. Els recomptes de cèl·lules viables es van realitzar a diferents dies per duplicat mitjançant el mètode de tinció amb blau de tripà i comptant amb la cambra de Neubauer al microscopi òptic.

Com es pot observar a la figura 3.4a, les epiATPC mostraven una velocitat de creixement limitada que es va traduir en un temps de duplicació de $5,1 \pm 0,12$ dies. La seva morfologia es va mantenir fibroblàstica al llarg del temps de cultiu (figura 3.4b).

a



b

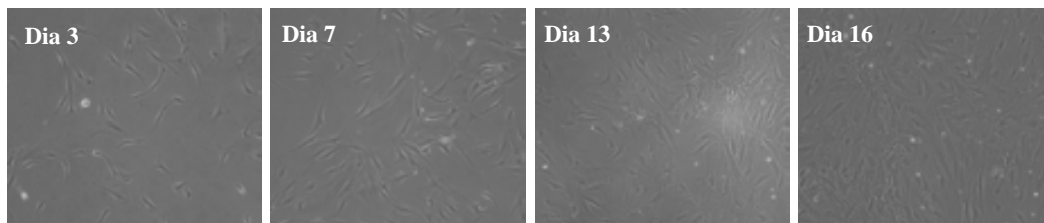


Fig. 3.4. a. Corbes de creixement representatives de 2 casos d'epiATPC. Les cèl·lules es van cultivar per duplicat a una densitat inicial de $1000 \text{ cèl·lules/cm}^2$, i es van contar les cèl·lules viables als punts indicats mitjançant la tinció amb blau de tripà. Els resultats mostrats corresponen a dos casos representatius i s'expressen com la mitjana \pm SEM. **b.** Imatges representatives del creixement de les epiATPC a diferents dies (10X).

3.4. Anàlisi de la pluripotencialitat de les epiATPC

Per tal d'estudiar la capacitat pluripotencial de les epiATPC, es va induir la seva diferenciació cap als llinatges adipogènic i osteogènic. Les epiATPC van ser tractades amb medi de diferenciació adipogènic durant 4 setmanes, moment en el qual es va analitzar l'acumulació de vacuoles lipídiques característica dels adipòcits mitjançant la tinció específica amb *Oil red O*. A les imatges a, b i c de la figura 3.5 es pot observar com les epiATPC no es van teyir de color vermell o ho van fer amb molt poca freqüència, evidenciant la no acumulació de lípids dins del seu citoplasma. El control negatiu, les mateixes cèl·lules però cultivades durant el mateix període de temps en condicions control, tampoc va mostrar signes de diferenciació adipogènica.

De la mateixa manera, es va afegir medi osteogènic a les epiATPC per induir-ne la seva diferenciació osteogènica. Al cap de 4 setmanes de tractament, les cèl·lules es van fixar i teyir amb el colorant vermell d'alizarina per detectar la presència de dipòsits de calci característics dels osteòcits. A la figura 3.5d, observem que les cèl·lules no es teyien de vermell, de la mateixa manera que el control negatiu (figura 3.5e), fet que indicava que les epiATPC no es diferenciaren tampoc cap a osteòcit.

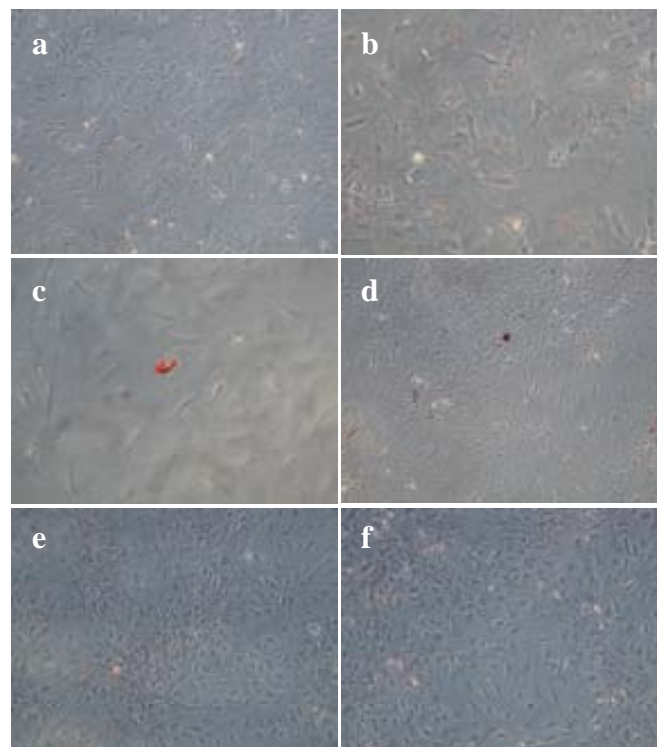


Fig. 3.5. Inducció de la diferenciació adipogènica i osteogènica de les epiATPC a passatge 2, a les 4 setmanes de tractament. **a-c.** Imatges de les epiATPC tractades amb medi adipogènic teyides amb *Oil red O*, **d.** Control negatiu de diferenciació adipogènica (medi complet). **e.** Imatge de les epiATPC tractades amb medi osteogènic. **f.** Control negatiu de diferenciació osteogènica (medi complet). a, d, e i f (10X); b i c (20X).

3.5. Estudi del potencial cardiogènic de les epiATPC

3.5.1. Anàlisi de l'expressió basal de marcadors cardíacs

L'expressió basal de proteïnes cardíques en les epiATPC va ser avaluada a nivell gènic per PCR a temps real i a nivell proteic per *western blot* i immunocitofluorescència a passatges 2 i 5.

Així, es va observar que les epiATPC expressaven transcrits pels gens cardíacs α -actinina sarcomèrica, GATA-4, SERCA-2, connexina-43 i Tbx5 a passatge 2 (figura 3.6a). A passatge 5 de cultiu, aquest patró d'expressió es mantenia i es començava a detectar expressió de la cadena pesada de la β -miosina i troponina I cardíaca.

A nivell de proteïna, es va confirmar l'expressió de α -actinina sarcomèrica, Cx-43 i GATA-4 a passatge 2 però no de SERCA-2 (figura 3.6b). En canvi, sí que es va corroborar l'expressió de la resta de proteïnes de les quals s'havia detectat el transcrit a passatge 5, tant per *western blot* com per immunocitofluorescència.

Mitjançant immunocitofluorescència, es va observar que l'expressió dels factors de transcripció GATA-4 i Tbx5 tenia una localització preferentment nuclear (figura 3.6c i d), l'expressió de Cx-43 exhibia el característic patró de distribució puntejat observat en les MSC i subATPC amb una distribució difusa d'aquesta proteïna al llarg de tota la membrana plasmàtica. β -MHC, SERCA-2 i α -actinina també es distribuïen predominantment pel citoplasma (figura 3.6d-f). No es va observar una organització sarcomèrica de cap de les proteïnes analitzades.

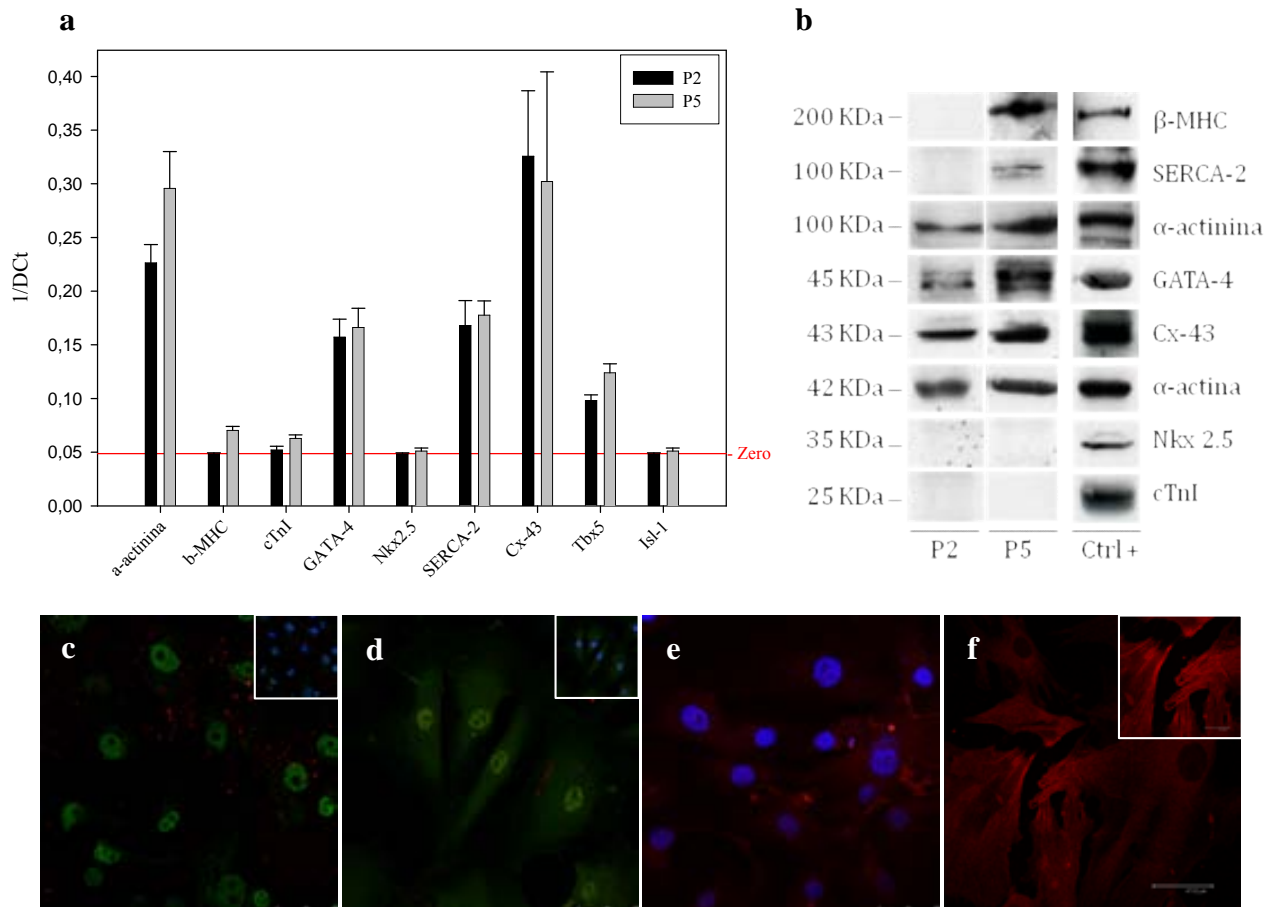


Fig. 3.6. a. Expressió gènica de les epiATPC analitzada per PCR a temps real a passatges 2 i 5 dels gens α -actinina sarcomèrica (α -actinina), cadena pesada de la β -miosina (b-MHC), troponina I cardíaca (cTnI), GATA-4, Nkx-2.5, SERCA-2, conexina-43, Tbx-5 i islet-1 (isl-1) utilitzant el mètode Δ Ct (DCt). L'expressió gènica va ser normalitzada amb el gen endogen GAPDH. Els valors es representen com la mitjana \pm SEM de quatre experiments amb casos diferents realitzats per duplicat. Zero indica el mínim nivell d'expressió detectable per l'aparell (40 cicles). **b.** Western blot de les proteïnes cardíaques estudiades a passatges 2 (P2) i 5 (P5) ordenades segons el seu pes molecular; el control positiu (Ctrl +) correspon a proteïnes de teixit cardíac ventricular. La quantitat de proteïna total carregada al gel s'ha normalitzat respecte α -actina. **c-f.** Imatges al microscopi confocal de fluorescència de les epiATPC a passatge 5 marcades amb els anticossos contra **c.** GATA-4 (verd) i Cx-43 (puntejat vermell). **d.** α -actinina sarcomèrica (verd) i Tbx5 (puntejat nuclear vermell). **e.** SERCA-2 (vermell). **f.** β -MHC (vermell), cantonada superior-esquerra: zoom. A les imatges c i d podem observar a les seves respectives cantonades superiors-esquerra la mateixa imatge però amb la tinció nuclear amb DAPI (blau).

3.5.2. Diferenciació cardiogènica de les epiATPC: cocultiu amb cardiòcits de rata neonatal

La diferenciació cardiogènica de les epiATPC a passatge 2 es va induir mitjançant el seu cocultiu amb cardiòcits neonatals de rata. Aquest mètode de diferenciació cardiogènica havia demostrat ser efectiu en altres tipus cel·lulars^{143, 268, 269}.

Per poder identificar les epiATPC dins els cocultius, van ser transfectades prèviament amb la proteïna verda fluorescent (GFP) mitjançant lentivirus recombinants.

Com a resultat, les epiATPC-GFP (fluorescència verda) expressaven α -actinina sarcomèrica, GATA-4, SERCA-2 i Cx-43 com ja s'havia descrit en condicions basals. Els nivells d'expressió de GATA-4 i SERCA-2 eren similars als observats en els cardiòcits adjacents. La Cx-43 va mostrar una distribució en un puntejat difús que és concentrava amb major densitat als marges de les cèl·lules epicàrdiques. Les epiATPC-GFP, al cap de 2 setmanes de cocultiu, també van mostrar expressió *de novo* de troponina I cardíaca (cTnI) i cadena pesada de la β -miosina (figura 3.7). L'expressió de totes les proteïnes es va mantenir fins al final de l'experiment (4 setmanes).

En conclusió, els factors secretats i el contacte directe amb els cardiòcits de rata neonatal van induir la diferenciació cardiomiogènica en les epiATPC evidenciada per un augment de l'expressió de les proteïnes cardioespecífiques ja expressades basalment per aquestes cèl·lules i per l'expressió de novo de proteïnes com la troponina I cardíaca i la cadena pesada de la β -miosina. A més, aquesta expressió va anar acompanyada d'un cert grau d'organització subcel·lular similar al sarcòmer estriat dels cardiòcits (figura 3.7q). També es va observar un augment de la mida de les cèl·lules i l'aparició d'epiATPC-GFP multinucleades (figura 3.7v).

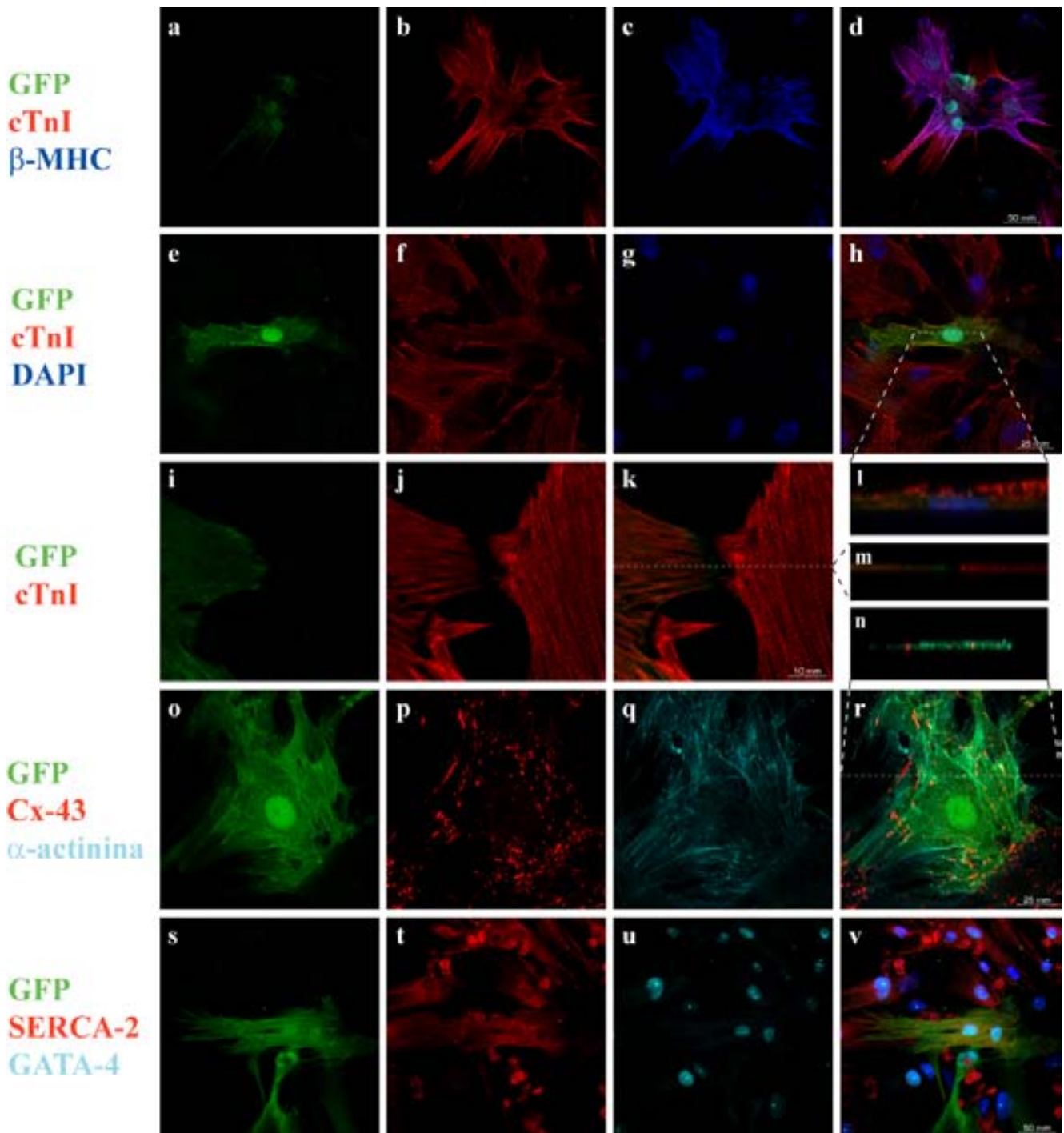


Fig. 3.7. Imatges al microscopi confocal de fluorescència de les epiATPC-eGFP a passatge 2 en cocultiu amb cardiòcits de rata neonatal. **a, e, i, o** i **s.** epiATPC-GFP (verd); **b, f** i **j.** Troponina I cardíaca (vermell); **c.** Cadena pesada de la β -miosina (β -MHC; vermell); **g.** Nuclis (DAPI, blau); **l, m** i **n.** Talls en z de la regió marcada amb una línia discontinua de les imatges **h, k** i **r**, respectivament; **p.** Connexina-43 (Cx-43, vermell); **q.** α -actinina sarcomèrica (α -actinina, cian); **t.** SERCA-2 (vermell); **u.** GATA-4 (cian); **d, h, k, r** i **v.** Superposicions de les imatges que tenen a la seva esquerra mostrant el grau de colocalització entre les proteïnes detectades en cada cas.

3.6. Diferenciació endotelial de les epiATPC:

En la isquèmia miocàrdica aguda no només es perden cardiòcits. S'ha observat també la degeneració, entre d'altres, de les estructures vasculares de la regió afectada del ventricle. La formació de nous vasos es restringeix al miocardi viable i la densitat capil·lar esdevé menor a la zona del marge de l'infart que a les zones distals del ventricle infartat³⁰⁷. Per tant, per reconstituir un miocardi sa és necessari potenciar la generació de nous vasos, integrats estructural i funcionalment amb el miocardi sa, per crear una circulació col·lateral en les àrees on el bloqueig de les artèries coronàries depriven al múscul cardíac d'un reg sanguini suficient.

Aquest apartat tenia com objectiu comprovar *in vitro* si les epiATPC en l'ambient adequat adquirien característiques pròpies de cèl·lula endotelial.

Les epiATPC en condicions basals mostraven una expressió limitada de marcadors endotelials (figura 3.8a). Per altra banda, no mostraven capacitat de captació i ràpida metabolització de la Dil-Ac-LDL, característica de les cèl·lules endotelials (figura 3.8b).

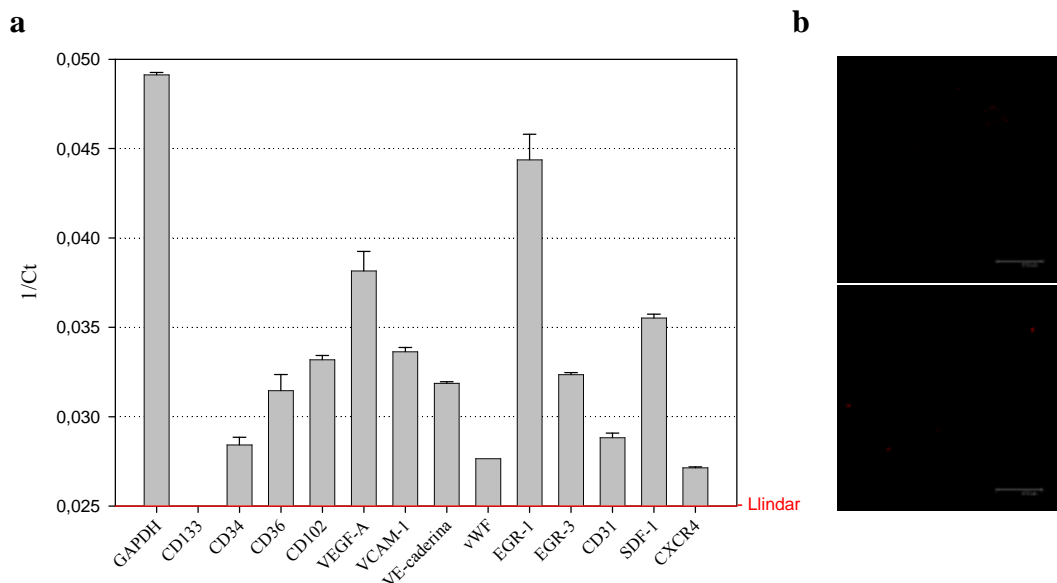


Fig. 3.8. a. Expressió basal de gens endotelials i proangiogènics analitzats per duplicat mitjançant PCR a temps real (veure descripció detallada a *Apèndix III*). Els resultats es mostren com la inversa del cicle llindar mitjà (Ct) per donar uns valors directament proporcionals al nivell d'expressió. La línia vermella marca el límit de detecció de l'aparell i que equival a 40 cicles. **b.** Imatges al microscopi confocal de fluorescència de epiATPC incubades durant 4h amb 10 µg/ml de Dil-Ac-LDL.

El cultiu de les epiATPC amb el medi EGM-2 (veure *Materials i mètodes*) induïa un augment de 120 vegades en l'expressió de SDF-1 (factor que promou la migració de les cèl·lules progenitores endotelials afavorint la vasculogènesi a la zona³⁰⁸⁻³¹⁰), augmentava la molècula d'adhesió CD31 (>15 vegades) i EGR-1 i 3 (10 i 16 vegades, respectivament). En menor quantitat, però, importants per la seva implicació funcional també van augmentar la seva expressió CD34, VEGF- α , VCAM-1 i VE-caderina (figura 3.9a).

A més, al cap de 15 dies de cultiu amb medi EGM-2, les epiATPC també van captar i metabolitzar gran quantitat de Dil-Ac-LDL, alliberant el Dil que s'acumula a les membranes intracel·lulars donant la fluorescència vermella, tal i com es pot observar a la figura 3.9b.

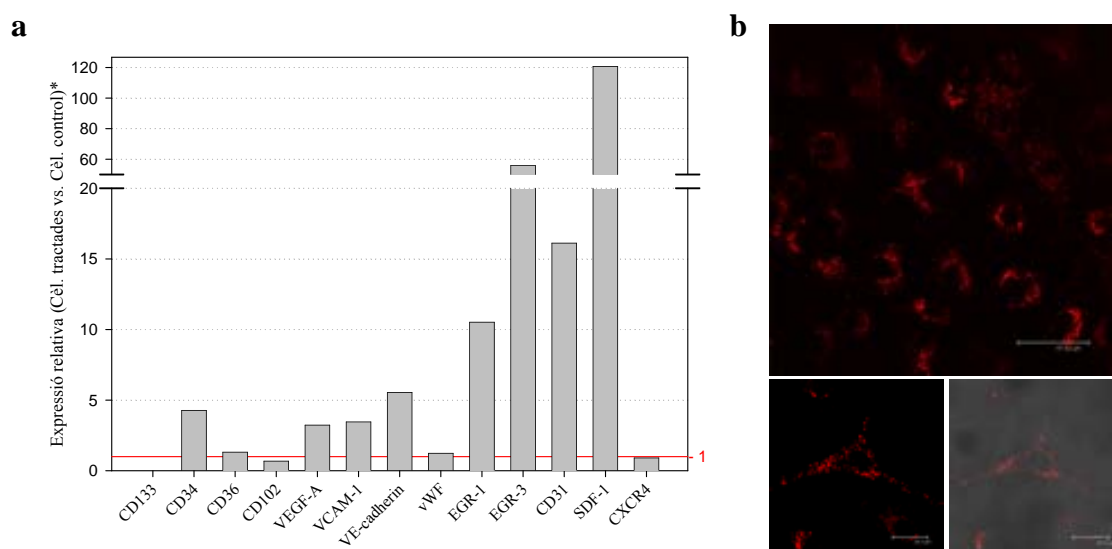


Fig. 3.9. **a.** Detecció per PCR a temps real dels canvis en l'expressió de gens característics de les cèl·lules endotelials en les epiATPC després de 15 dies de tractament amb el medi de diferenciació endotelial. **b.** Imatges de la captació per part de les epiATPC de la Dil-Ac-LDL observada al microscopi confocal de fluorescència al dia 15 de tractament. $*2^{-\Delta\Delta CT}$.

Seguidament, el patró d'expressió de gens endotelials i proangiogènics adoptat per les epiATPC va ser comparat amb el de les cèl·lules endotelials HUVEC (cèl·lules endotelials de la vena umbilical humana). Ambdós tipus cel·lulars presentaven en cultiu nivells similars d'expressió de CD34, CD36, VEGF- α , VCAM-1 i EGR-3. No obstant això, les cèl·lules HUVEC mostraven una major expressió de CD133, CD102, vWF i VE-caderina. Es va observar també, una major expressió del gen de resposta

primerenca EGR-1 per part de les epiATPC cultivades amb EGM-2 en comparació amb les HUVEC (figura 3.10).

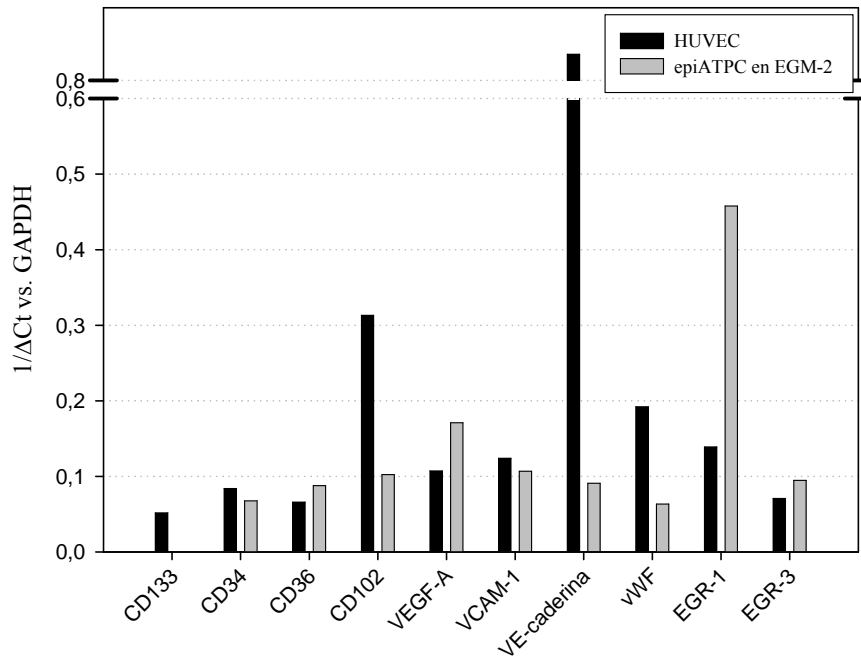


Fig. 3.10. Expressió comparativa de diferents gens endotelials en epiATPC en medi endotelial EGM-2 versus cèl·lules endotelials HUVEC. En ambdós casos s'ha utilitzat el gen endogen GAPDH per normalitzar els nivells d'expressió.

3.6.1. Assaig angiogènic funcional: tubulogènesi en Matrigel

Quan les cèl·lules endotelials es cultiven *in vitro* sobre determinats suports, com el Matrigel, aquestes tendeixen a formar estructures tubulars³¹¹. Basant-nos en aquest principi, vam fer aquest assaig funcional amb les epiATPC. El seguiment amb el microscopi de contrast de fases va revelar, com es pot observar al figura 3.11a, que al cap de dues hores de cultiu sobre aquest suport les epiATPC van començar a formar estructures tubulars connectades formant una malla. Aquestes estructures van anar creixent en mida i ordre a mesura que evolucionava el cultiu, deixant espais cada cop més grans i formant tubs de mida més gruixuda. Aquest comportament, característic de les cèl·lules endotelials, indicava l'adquisició per part de les epiATPC de propietats funcionals característiques de les cèl·lules endotelials.

El fenotip endotelial de les estructures tubulars derivades de les epiATPC es va veure corroborat amb la unió específica d'aquestes a la lectina GSLI B4

(fluorescència vermella) com es pot observar a les imatges al microscopi confocal de fluorescència (figura 3.11b).

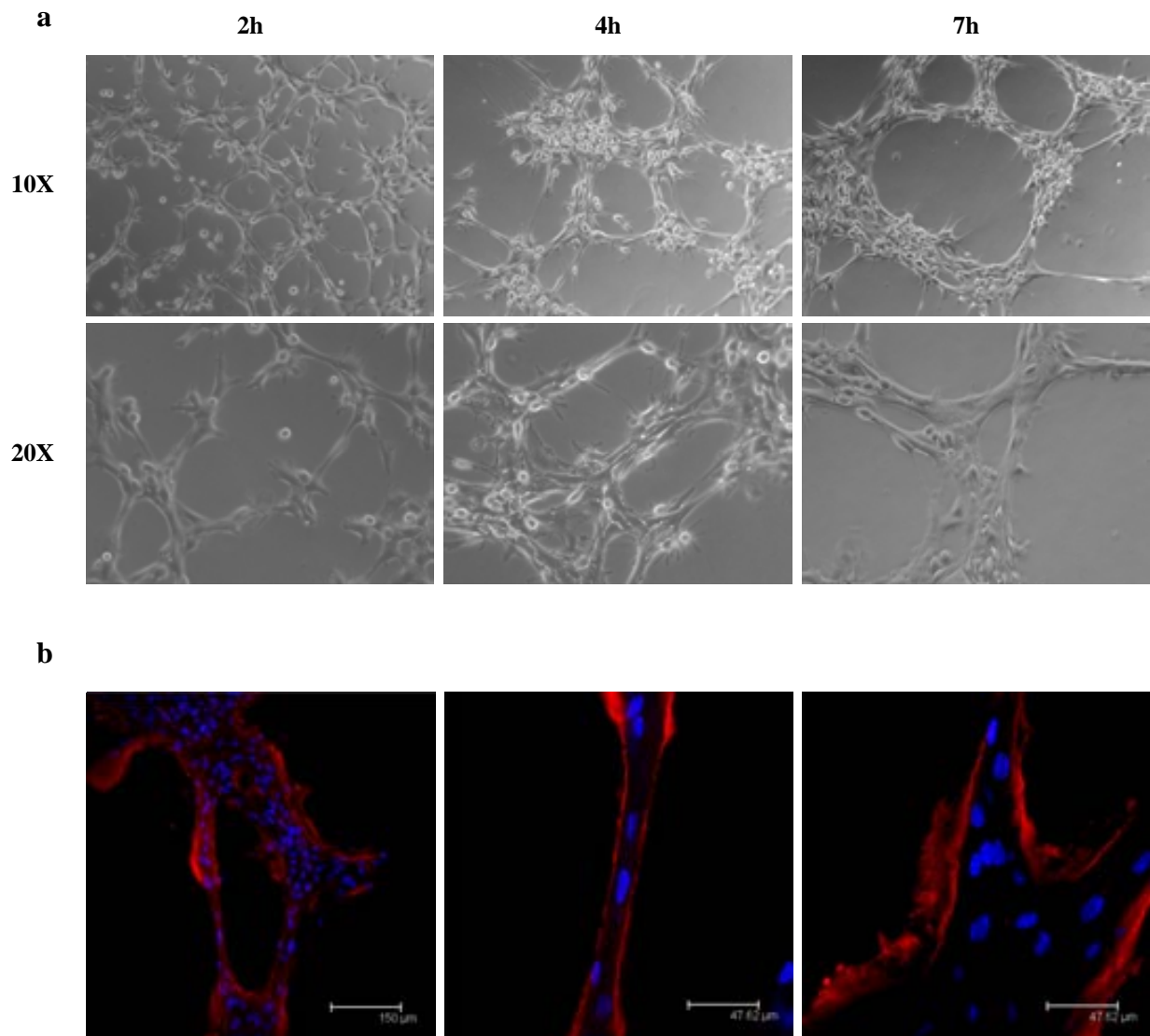


Fig. 3.11. a. Les epiATPC formen estructures tubulars quan son sembrades sobre Matrigel. **b.** Els tubs formats per les epiATPC es tenyien amb la lectina GSLI B4 (vermell). Els nuclis de les cèl·lules es van tenyir amb Hoescht (blau)

3.7. Anàlisi de la secreció de factors proangiogènics

Una important resposta compensatòria quan s'esdevé una obstrucció arterial és el desenvolupament de vasos col·laterals. Aquest és un procés complex que requereix de l'expressió combinada de múltiples gens en una seqüència molt determinada^{312, 313}. No obstant això, la capacitat natural de generar nous vasos col·laterals per compensar la pèrdua de flux després de l'oclusió d'una artèria major poques vegades és suficient per restaurar els nivells de flux sanguinis necessaris.

Aquest estudi es va dur a terme amb l'objectiu de caracteritzar l'espectre de factors proangiogènics que secretaven les epiATPC i així determinar els possibles efectes paracrins que podrien potenciar un augment de la densitat vascular. Els factors analitzats van ser FGFb, IL-1b, IL-6, PDGF_{BB}, TNF- α i VEGF (veure descripció detallada a *Apèndix IV*).

Les epiATPC a passatge 2 van ser cultivades en condicions de normòxia, hipòxia moderada (5% O₂)³¹⁴⁻³¹⁶ i hipòxia severa (1% O₂)³¹⁷ durant 24h i es van quantificar els nivells dels factors presents al medi de cultiu de les cèl·lules.

Durant el període de 24 h en condicions de normòxia, les epiATPC a passatge 2 van secretar quantitats significatives de IL-6 (53.677,25 \pm 24.613,29 pg/ml/10⁶ cèl·lules) i VEGF (3200,77 \pm 1011,14 pg/ml/10⁶ cèl·lules), i menors quantitats de FGFb (160,97 \pm 31,19 pg/ml/10⁶ cèl·lules) i TNF- α (59,15 \pm 16,00 pg/ml/10⁶ cèl·lules). En aquestes condicions, no es va detectar expressió ni d'IL-1 β ni PDGF_{BB} (figura 3.12).

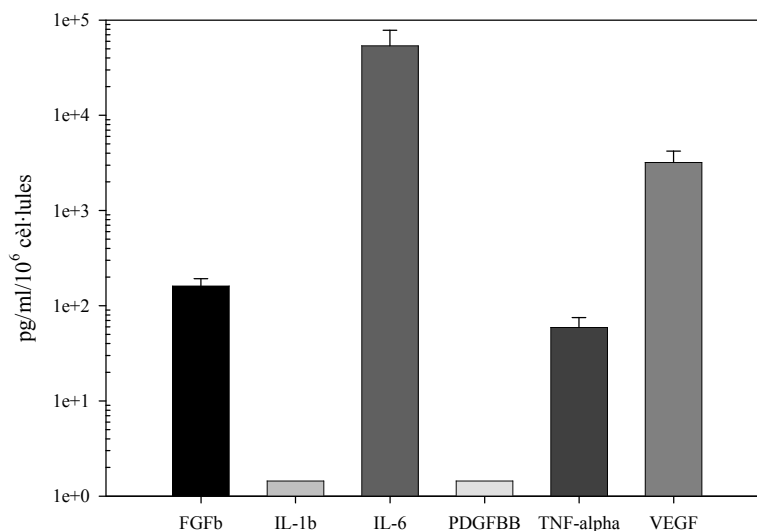


Fig. 3.12. Citoquines alliberades per les epiATPC (passatge 2) al medi de cultiu normalitzades per 10⁶ cèl·lules viables. Mitjana \pm SD de mostres obtingudes de 4 individus i analitzades per duplicat.

Quan les epiATPC van ser cultivades en condicions d'hipòxia moderada i hipòxia severa es va observar un augment general (al voltant d'un 20%) de les concentracions dels factors angiogènics alliberats (figura 3.13). Però en el cas del VEGF l'augment en la condició d'hipòxia severa arriba a ser del 92% ($p = 0,04$).

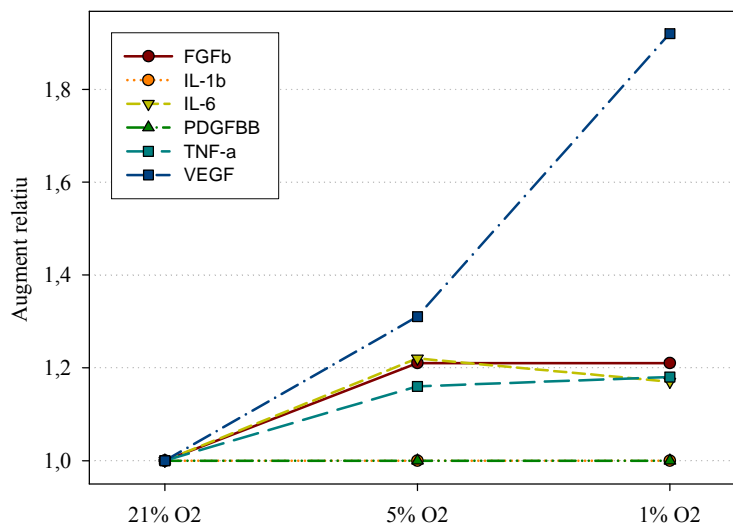


Figura 3.13. Nombre de vegades que augmenta la secreció dels diferents factors proangiogènics en condicions d'hipòxia moderada (5% O₂) i severa (1% O₂) respecte als valors obtinguts en normòxia (21% O₂).

En conclusió, l'administració d'un únic factor angiogènica per augmentar la neovascularització en els pacients amb malaltia ateroscleròtica ha mostrat resultats modestos^{318, 319}. Una possible raó podria ser que processos complexos com l'angiogènesi i el creixement col·lateral requereixen múltiples factors actuant conjuntament³²⁰. La secreció de factors que actuen de manera sinèrgica, com el VEGF i el FGFb³²¹, per part de les epiATPC les podria convertir en una bona font cel·lular per a la regeneració miocàrdica. A més, l'habilitat d'adaptar-se a estímuls com la hipòxia, els permet adaptar-se a ambients hostils com el miocardi isquèmic mitjançant l'augment de producció de VEGF.

3.8. Injecció de les epiATPC en dos models d'infart *in vivo*

Les epiATPC van ser transplantades en dos models animals immunodeficients d'infart de miocardi, ratolí (C3H-SCID) i rata (NIH-Foxn1^{tmu}), per comprovar l'efecte a nivell histològic i funcional d'aquestes cèl·lules sobre el cor infartat. Aquests models, basats en la lligadura de l'artèria coronària descendent anterior esquerra per a la inducció d'un IAM, van ser seleccionats pel seu ampli ús i provada eficàcia, el seu fàcil maneig i estabulació, la disponibilitat d'eines moleculars pel seu anàlisi posterior, però també, per les 10 vegades de diferència de mida existents entre els cors dels dos models.

3.8.1. Model d'infart en ratolí C3H-SCID

El model d'infart en ratolí immunodeprimit ens va servir per fer una valoració inicial de l'eficàcia del trasplantament de les epiATPC en la regeneració del cor després d'un IAM. Es va valorar l'efecte a nivell histològic, tant a nivell de canvis morfològics com de densitat vascular dels cors control i tractats postIAM.

3.8.1.1. Anàlisi morfomètrica

Mitjançant la tinció tricròmica de Masson i l'anàlisi morfomètrica dels cors control i tractats es van obtenir 3 paràmetres indicatius de l'estat del teixit miocàrdic ventricular. El primer paràmetre va ser la mida de l'infart, calculat respecte el total del ventricle esquerre (VE) que ens permetria valorar quanta àrea de teixit fibròtic quedava als 20 dies després del trasplantament de les epiATPC (tractats) o de la injecció de medi de cultiu sense cèl·lules (control). El segon va ser el gruix de la paret del VE en la zona infartada utilitzat per estimar el grau de millora/empitjorament del teixit miocàrdic infartat entre els dos grups. Per últim, es va calcular el volum intern del VE que ens permetria valorar les diferències en la dilatació del VE entre els animals tractats i els control.

A la figura 3.14 podem observar les diferències morfològiques entre el cor d'un animal tractat (a) i un de control (b). L'anàlisi morfomètrica mostra una reducció estadísticament significativa del 33,1% de l'àrea de la cicatriu de

l'infart en els animals tractats amb 10^5 epiATPC respecte els control ($22,96 \pm 3,65\%$ control vs. $15,36 \pm 6,8\%$ tractats; $p = 0,033$) (figura 3.14c). El gruix de la paret infartada del VE va ser un 50% superior en els animals tractats ($0,41 \pm 0,06$ mm controls vs. $0,6 \pm 0,16$ mm tractats; $p = 0,055$) (figura 3.14d). Per últim, la dilatació del VE va ser un 34,2% menor en els animals tractats respecte els controls. Aquesta diferència, però, no va ser estadísticament significativa ($365,84 \pm 176,4$ mm³ control vs. $240,76 \pm 89,77$ mm³ tractats; $p = 0,135$).

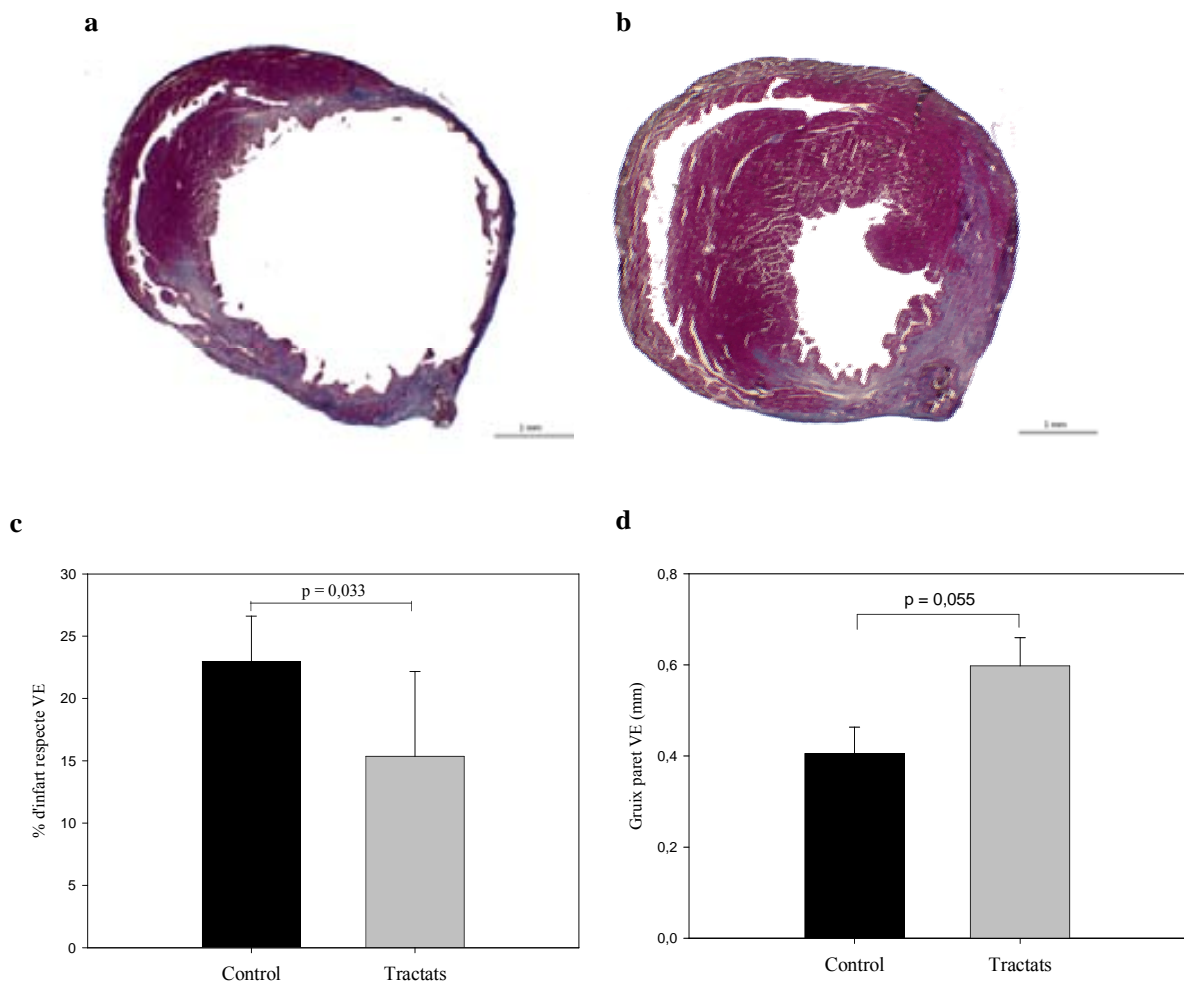


Fig. 3.14. Seccions d'un cor de ratolí control (a) i un tractat (b) tenyits amb la tinció tricròmica de Masson. c. Mida de l'àrea infartada respecte la total del ventricle esquerre. d. Gruix de la paret del ventricle esquerre. Els valors es representen com la mitjana \pm SD.

3.8.1.2. Anàlisi de la densitat vascular

Es va avaluar el nombre de vasos presents per unitat de superfície de teixit miocàrdic del ventricle esquerre tant en els ratolins control com tractats (figura 3.15a i b). Els resultats obtinguts, van mostrar un augment significatiu de la densitat vascular a la regió del marge de l'infart en els individus tractats amb epiATPC respecte els individus control ($p = 0,003$). A la regió distal a la cicatriu de l'infart també es va trobar un clar augment del nombre de capil·lars per superfície de teixit, encara que no era estadísticament significatiu ($p = 0,057$) (figura 3.15c).

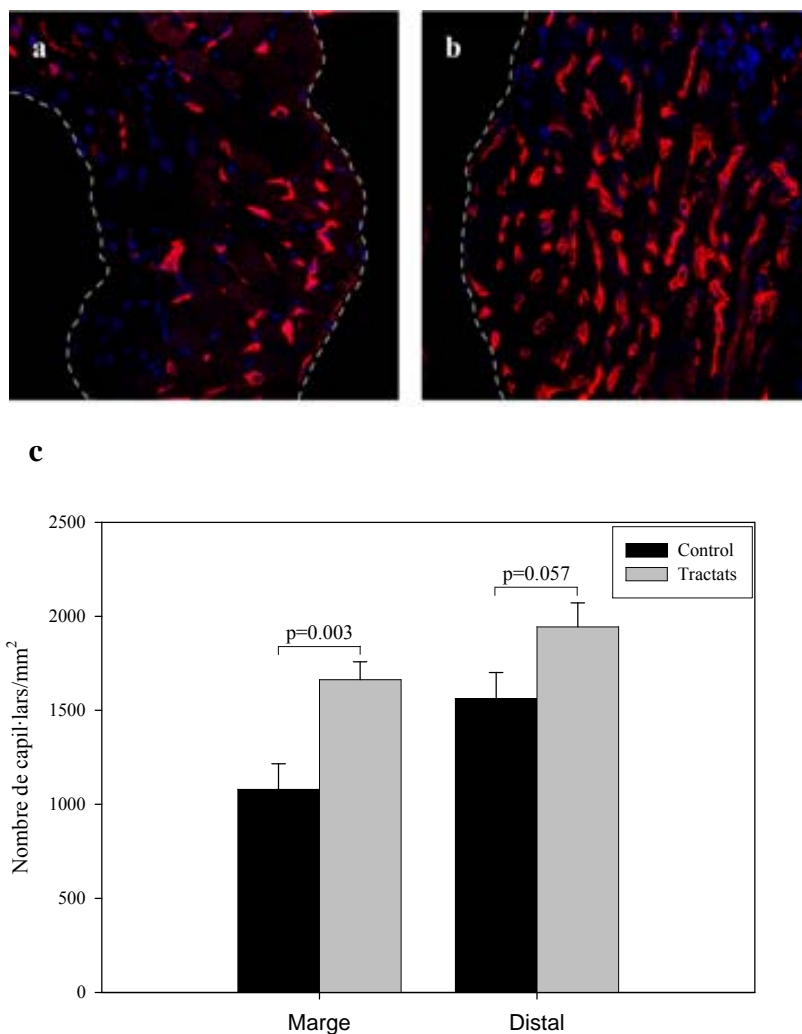


Fig. 3.15. a, b. Imatges al microscopi confocal de fluorescència d'una secció corresponent a un cor control (a) i un tractat (b). Els vasos es van marcar amb lectina GSL1 B4 (vermell) i el nuclis amb DAPI (blau) (63X). c. Densitat capil·lar en el teixit miocàrdic del marge de l'infart (Marge) i de la zona distal (Distal) d'animals control i tractats amb epiATPC. Els valors es representen com la mitjana \pm SD.

3.8.2. Model d'infart en rata NIH-Foxn1^{tmu}

El model de rata, amb l'experiència adquirida en el model de ratolí, va ser utilitzat per analitzar els canvis morfològics, funcionals i per esbrinar si les epiATPC trasplantades s'havien injectat al teixit miocàrdic i quin n'era el seu fenotip.

3.8.2.1. Anàlisi morfomètrica

En el model de rata, també es va utilitzar la tinció tricròmica de Masson per visualitzar i distingir la zona infartada de la resta del teixit miocàrdic sa (figura 3.16a i b). L'extensió de teixit miocàrdic infartat en els animals injectats amb 10^6 epiATPC va ser un 42,9% menor a la dels animals control ($18,59 \pm 1,17\%$ control vs. $10,62 \pm 1,29\%$ tractats; $p < 0,001$) (figura 3.16c). La dilatació del VE també era un 11,2% menor en els animals tractats ($17,8 \pm 0,75 \text{ mm}^2$ control vs. $15,8 \pm 1,07 \text{ mm}^2$ tractats; $p = 0,163$) mentre que el gruix de la paret del VE era un 50% superior en els animals tractats ($1,12 \pm 0,04 \text{ mm}$ control vs. $1,61 \pm 0,23 \text{ mm}$ tractats; $p = 0,029$) (figura 3.16d).

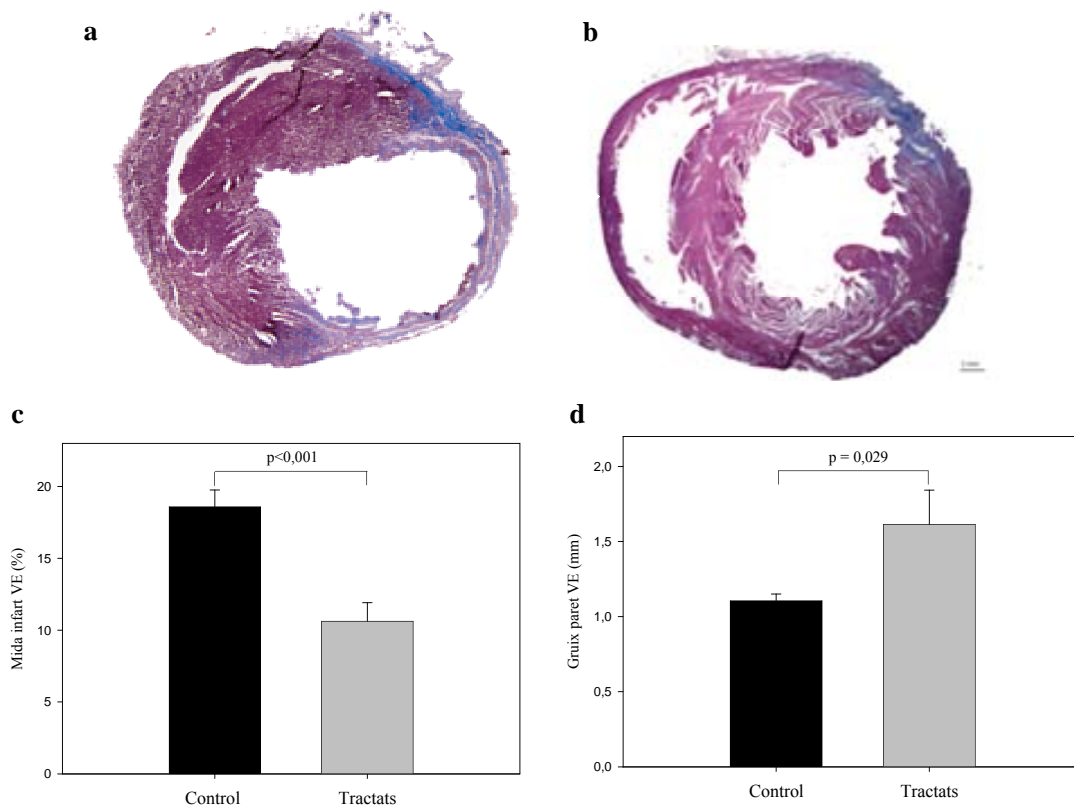


Fig. 3.16. Seccions d'un cor de rata control (a) i tractat (b) tenyits amb la tinció tricròmica de Masson. c. Mida de l'àrea infartada respecte la total del VE. d. Gruix de la paret del VE. Els valors es representen com la mitjana \pm SD.

3.8.2.2. Estudi de la funció cardíaca mitjançant ecocardiografia

Es van avaluar paràmetres geomètrics i de funció cardíaca a diferents temps pre i postIAM incloent, els canvis en el gruix de la paret anterior durant la contracció (CGPA), indicador d'anormalitats en la mobilitat regional de la paret anterior, la fracció d'ejecció (FE) i la fracció d'escurçament (FES).

Com a resultat, es va observar una millora funcional dels animals tractats respecte els animals control estadísticament significativa en els tres paràmetres estudiats (figura 3.17). La FE va ser un 10,3% superior en els animals tractats als 30 dies postIAM, la FES un 13,2% i en el CGPA va ser un 53% superior respecte la dels animals control.

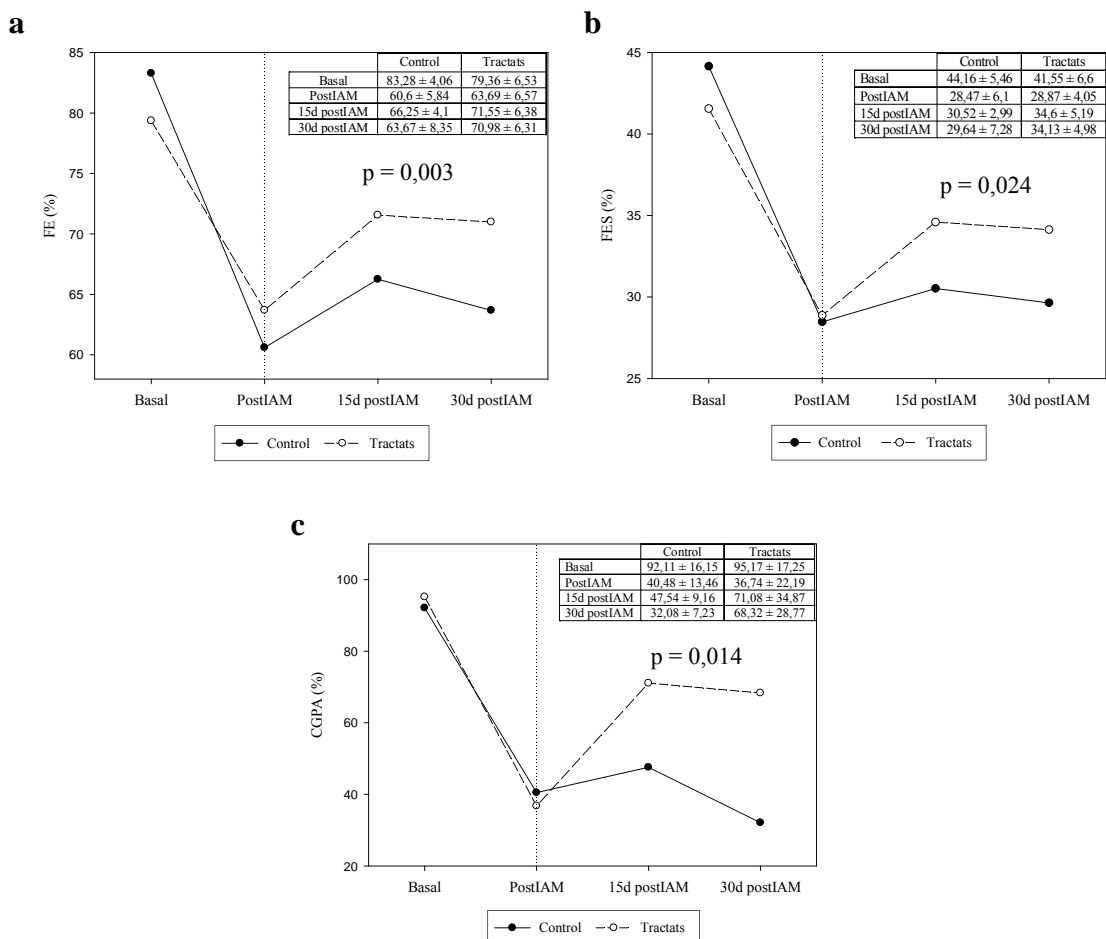
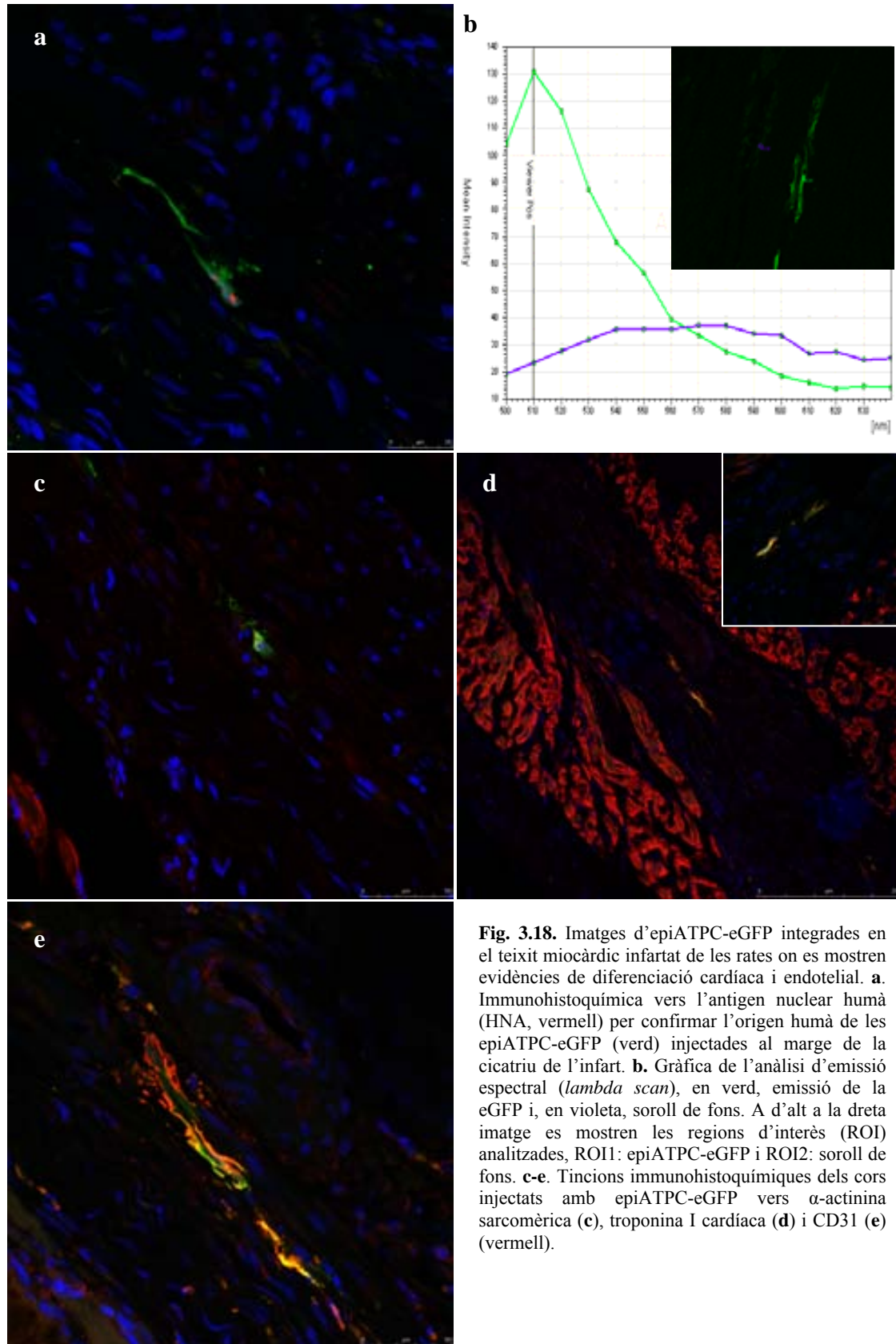


Fig. 3.17. Evolució temporal dels paràmetres ecocardiogràfics FE (a), FES (b) i CGPA (c) en animals control i tractats. Basal: 1 dia abans IAM; PostIAM: 6 dies després l'IAM i dia del trasplantament de les epiATPC; 15d postIAM: 15 dies després l'IAM; 30d postIAM: 30 dies després de l'IAM. Els càlculs estadístics s'han realitzat amb una ANOVA de dos factors sense la primera lectura (temps: Basal) ja que l'efecte d'interès que es vol observar és el que succeeix en posterioritat.

3.8.2.3. Identificació intramiocàrdica de les cèl·lules injectades

Es van detectar cèl·lules epiATPC-eGFP integrades al cor de les rates 30 dies després del seu trasplantament al marge de l'infart. Aquestes es van localitzar uniformement al llarg de la cicatriu de l'infart indicant la seva capacitat de migració. Es va confirmar que les cèl·lules eGFP observades per fluorescència en les seccions eren d'origen humà mitjançant la detecció de l'antigen nuclear humà (HNA) (figura 3.18a). A més, es va confirmar l'especificitat de la senyal eGFP obtinguda mitjançant un anàlisi de l'espectre d'emissió de les senyals obtingudes (figura 3.18b).

Per analitzar el grau de diferenciació cardíaca i endotelial aconseguit de les cèl·lules injectades, es van fer tincions immunohistoquímiques contra els marcadors cardíacs α -actinina sarcomèrica i troponina I cardíaca i, contra el marcador endotelial, CD31. Les epiATPC-eGFP eren positives per α -actinina (figura 3.18c) i van mostrar expressió *de novo* de troponina I (figura 3.18d). També es va observar expressió de CD31 en les epiATPC-eGFP, les quals es van trobar al llarg del teixit formant estructures tubulars (figura 3.18e).



E pur si muove!
Galileo Galilei

DISCUSSIONE

El repte de reparar o regenerar el cor quan aquest falla és, si més no, apassionant. No obstant això, l'emergent tecnologia que ofereixen les cèl·lules mare obre noves possibilitats amb les quals poder afrontar aquesta i d'altres malalties que, fins ara, no disposen de tractament. Les aplicacions clíniques totalment controlades i efectives queden encara lluny, però el coneixement sobre les propietats i les capacitats de les cèl·lules mare/progenitores avancen dia rere dia i apunten cap a futures teràpies realment viables.

L'objectiu principal d'aquesta tesi era identificar un tipus de cèl·lula mare/progenitora mesenquimal adulta humana que permetés regenerar el cor després d'un infart agut de miocardi. Es desconeix en l'actualitat quin podria ser el tipus de cèl·lula progenitora òptima per a la regeneració del cor. Per això, es van estudiar i caracteritzar *in vitro* tres tipus cel·lulars potencialment atractius: les MSC derivades de moll d'os, les subATPC derivades de greix subcutani i les epiATPC que derivaven del greix epicàrdic, les quals, han estat descrites per primera vegada en el marc d'aquest treball. L'estudi *in vitro* ens va permetre determinar i comparar el seu immunofenotip, la seva velocitat de creixement, la seva plasticitat vers els llinatges osteogènic i adipogènic, i la seva potencialitat cardíaca basant-nos per una banda, en la seva expressió basal de gens i proteïnes característicament cardíacs i, per l'altra, en la capacitat de diferenciació cap a cèl·lules d'un llinatge cardiomiogènic. Tot aquest conjunt de dades obtingudes ens va permetre determinar, a priori, que les cèl·lules que presentaven un major potencial cardiovascular eren les epiATPC. Aquestes es van estudiar amb més profunditat abordant les seves propietats endotelials: per una banda la capacitat de diferenciació cap a aquest tipus cel·lular i per l'altra, analitzant els factors i citoquines proangiogèniques secretades que podrien induir la generació de nous vasos al miocardi. En una segona etapa, les epiATPC van ser trasplantades en dos models animals d'infart de miocardi que servien per observar la capacitat sobre el terreny real d'aquestes cèl·lules en la regeneració i millora de la funció cardíaca després d'un IAM.

Comparació *in vitro* de les propietats bàsiques de les MSC derivades de moll d'os, les subATPC i les epiATPC

Les MSC derivades de moll d'os es poden obtenir mitjançant aspirats de moll d'os o en el transcurs d'una cirurgia ortopèdica (p. ex. recanvi de cap de fèmur). En ambdós casos es tracta d'un procés molt invasiu pel pacient que requereix d'anestèsia local o general. Per contra, l'obtenció de greix subcutani, un teixit no innervat, s'aconsegueix per un procés molt més senzill, el lipoaspirat. Ara bé, l'obtenció de greix epicàrdic és més complex i requereix d'una intervenció quirúrgica ja que aquest teixit es troba recobrint el 80% de la superfície del cor.

El moll d'os és un òrgan hematopoètic que conté majoritàriament cèl·lules precursors com proeritroblasts i promielòcits en processos altament proliferatius per cobrir la gran demanda diària de cèl·lules sanguínies madures. Les MSC del moll d'os donen suport a aquest procés però representen una petita fracció del total de cèl·lules d'aquest teixit. Estudis que han aplicat cultius basats en assaigs clonals han estimat que la freqüència d'aquestes cèl·lules és tan sols d'1 entre 50.000 cèl·lules nucleades en l'adult^{322, 323}. El teixit adipós, a diferència del moll d'os i la majoria de teixits, té la capacitat d'augmentar dramàticament de volum en l'adult. Aquest gran increment de volum està associat a un augment del nombre d'adipòcits que deriven d'unes cèl·lules, els preadipòcits, amb un potencial que Zuk i col. van demostrar que anava més enllà del llinatge adipocític¹⁸⁷. Per altra banda, està descrit que el greix conté una freqüència de cèl·lules progenitores 600 vegades superior al moll d'os³²⁴. Aquests dos fets fan que les subATPC s'hagin considerat una alternativa a les MSC derivades de moll d'os en el camp de la medicina regenerativa. Les epiATPC provenen del greix epicàrdic, un teixit molt atractiu pel seu contacte íntim amb el cor.

Els tres tipus cel·lulars estudiats van ser cultivats exactament en les mateixes condicions (medi de cultiu, temperatura, concentració de gasos, humitat, subcultiu, etc.) i van mostrar una morfologia fibroblàstica característica de les cèl·lules de llinatge mesenquimal.

La caracterització fenotípica, basada en l'anàlisi de l'expressió de marcadors de superfície, ens va permetre obtenir el patró d'expressió dels tres tipus cel·lulars estudiats (figura 1). Aquest patró d'expressió, que va resultar similar per les MSC, subATPC i epiATPC, es caracteritzava per la positivitat de les cèl·lules per CD105, CD44, CD166, CD29 i CD90 (no

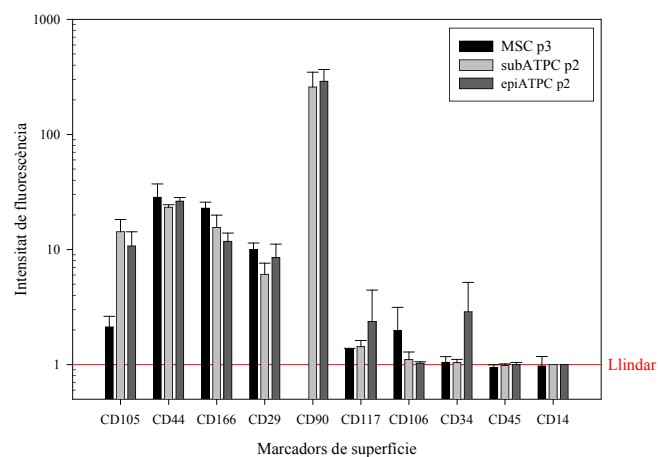


Fig. 1. Expressió comparativa dels marcadors de superfície expressats per les MSC, subATPC i epiATPC.

caracteritzat en les MSC) i la negativitat per CD117, CD34, CD45 i CD14. Aquest patró coincidia amb el descrit anteriorment per altres grups, tant per les MSC com per les subATPC^{194, 219}. En canvi, les MSC de moll d'os eren positives per CD106, mentre que les subATPC i epiATPC no. Està confirmat que CD106 és un marcador que s'expressa a l'estroma del moll d'os on està funcionalment implicat en el procés d'hematopoesi³²⁵. Per tant, la no expressió d'aquest marcador per part de les subATPC i les epiATPC és totalment consistent amb la seva localització en un teixit no hematopoètic²¹⁹. Per un altre costat, les epiATPC a passatge 2 van mostrar una minsa expressió dels marcadors, típicament de llinatge hematopoètic, CD117 i CD34 que no era no representatiu del total de la població. Aquesta expressió encara es veia més reduïda a passatge 5. L'origen mesodèrmic del teixit epicàrdic sumat a un patró d'expressió característic indicaven la naturalesa mesenquimal de les epiATPC.

Freqüentment, els tractaments basats en la teràpia cel·lular requereixen la utilització d'una quantitat de cèl·lules progenitores molt superior a l'obtinguda dels donants, i fan necessària l'expansió *in vitro* d'aquestes cèl·lules abans de la seva aplicació terapèutica. Per això, la seva velocitat de creixement o temps de duplicació *in vitro* és un paràmetre important en l'elecció d'un tipus cel·lular.

Es va obtenir el temps de duplicació (t_d), un valor inversament proporcional a la velocitat de creixement d'un cultiu, dels tres tipus cel·lulars estudiats (figura 2). Partint de la mateixa concentració inicial, 1000 cèl·lules/cm², les subATPC van mostrar el temps de duplicació més baix, 3,1 dies, seguides per les MSC, amb 4,36 dies. Aquests

valors són similars als obtinguts per De Ugarte i col. en un estudi comparatiu realitzat amb MSC derivades de moll d'os ($t_d = 3,6$ dies) i subATPC ($t_d = 3,3$ dies) en unes condicions similars d'edat dels donants, cultiu i densitat cel·lular inicial³²⁶. La major capacitat proliferativa de les subATPC també ha estat descrita per altres grups²²². Les epiATPC van mostrar el temps de duplicació més elevat, 5,1 dies. Aquesta dada podria indicar que les epiATPC estan en un estat de diferenciació més avançat (progenitors tardans), ja que el mecanisme que regula la proliferació, el punt de control G1, està associat amb la diferenciació en les cèl·lules mare³²⁷.

Per altra banda, està ben descrit que hi ha una correlació positiva entre el temps de duplicació de les MSC i l'edat del donant³²⁸⁻³³⁰. La mitjana d'edat dels pacients dels que s'han obtingut les mostres superava els 60 anys. Això podria explicar la menor velocitat de creixement que hem observat respecte a la descrita per altres grups³³¹. En un estudi realitzat pel nostre grup es va demostrar que la velocitat de creixement de les MSC derivades de moll d'os es pot duplicar mitjançant l'addició al medi de cultiu del factor de creixement FGF-4 sense alterar ni el fenotip cel·lular ni la pluripotencialitat de les cèl·lules¹⁸⁵.

La inducció de la diferenciació dels tres tipus cel·lulars estudiats cap a adipòcits i osteòcits ens va permetre determinar-ne la capacitat pluripotencial. Les MSC van diferenciar-se completament cap als dos llinatges cel·lulars, com ho va evidenciar l'acumulació de vacuoles lipídiques intracel·lulars característiques dels adipòcits²⁵⁶ i la formació d'agregats o nòduls amb una acumulació de calci en el temps per part dels osteòcits²⁵⁸. Aquesta plasticitat és característica de les MSC i va ser descrita per primera vegada per Pittenger i col.¹⁹⁴. Les subATPC van diferenciar-se cap a adipòcits però no cap a osteòcits, tot i que alguns grups ho han reportat²¹⁹. Està demostrat, però, que la capacitat osteogènica de les ATPC és significativament inferior a la de les MSC^{332, 333}. Per altra banda, aquesta pèrdua de capacitat de diferenciació observada podria estar relacionada amb l'edat dels pacients. La relació entre l'edat i la capacitat

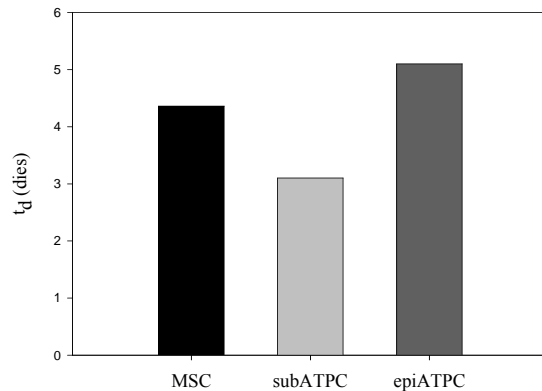


Fig. 2. Temps de duplicació (t_d) mitjans de les MSC, subATPC i epiATPC a passatge 2.

osteogènica de les cèl·lules mare mesenquimals adultes ha estat molt estudiada com a possible mecanisme responsable de fenòmens patofisiològics com l'osteoporosi, que es caracteritza per una reducció de la formació d'os. Hi ha resultats contradictoris pel que fa a aquesta relació entre l'edat i la capacitat osteogènica de les cèl·lules mesenquimals: si bé que hi ha autors que defensen que es redueix^{304, 322, 334-336}, altres demostren que es manté³³⁷⁻³³⁹.

Les epiATPC no van diferenciar-se ni cap a osteòcit ni cap a adipòcit. És interessant que tot i que les epiATPC resideixen en un teixit adipós, aquestes, no es diferenciïn cap a adipòcits com les subATPC. Aquesta pèrdua de capacitat de diferenciació juntament amb l'expressió basal de GATA-4 i Tbx5 entre d'altres marcadors cardíacs i l'evident diferenciació cardiogènica i endotelial que van mostrar aquestes cèl·lules, sumat a la seva reduïda velocitat de creixement podria indicar que es tracten d'unes cèl·lules progenitores que es troben en un estat de diferenciació més compromès cap a un llinatge cardiovascular.

Les epiATPC mostren un major potencial cardiomiogènic *in vitro*

Diversos investigadors han publicat dades suggerint que les MSC de moll d'os tenen l'habilitat de diferenciar-se *in vitro* cap a cèl·lules amb propietats cardíques^{260, 267, 268}. Com a mínim, quatre grups d'investigadors han demostrat que les subATPC també exhibeixen les mateixes propietats^{126, 224, 225}. En el nostre estudi, es va caracteritzar primerament l'expressió basal de diverses proteïnes característicament cardíques. D'aquesta manera, vam observar que les tres poblacions cel·lulars estudiades expressaven basalment marcadors característics del llinatge cardiomiogènic. Així, les MSC i les epiATPC expressen GATA-4, un important factor de transcripció cardíac responsable de l'activació de nombrosos promotors de gens cardíacs com la cadena lleugera de la miosina, les troponines cardíques T i I, la cadena pesada de la α -miosina i el pèptid natriurètic auricular. Aquesta expressió també s'ha observat en cèl·lules mesenquimals d'altres fonts com la membrana amniòtica³⁴⁰ i la sang menstrual³⁴¹. És destacable que l'expressió gènica de GATA-4 detectada en les epiATPC a passatge 5 va ser més de 1400 vegades superior a la de les MSC¹⁸⁵. Les subATPC, en canvi, no expressen aquest important factor de transcripció cardíac. Per altra banda, tant les subATPC com les epiATPC expressen Tbx-5. Per contra, cap dels tres tipus cel·lulars

estudiats expressa de manera basal el factor de transcripció Nkx-2.5. Nkx-2.5, GATA-4 i Tbx-5 són factors de transcripció essencials per la cardiogènesi que també interactuen entre ells, activant de manera sinèrgica l'expressió de múltiples gens cardíacs i promovent la diferenciació cardíaca³⁴²⁻³⁴⁴.

De les 3 proteïnes del sarcòmer estudiades, la α -actinina és l'única expressada de manera basal per tots tres tipus cel·lulars. Només les epiATPC i en menor grau les subATPC, expressen també la cadena pesada de la β -miosina a passatge 5. Ni la α -actinina ni la β -MHC s'organitzen de manera estriada en cap dels tres tipus cel·lulars, demostrant la manca d'una estructura sarcomèrica. No es va trobar expressió basal de troponina I cardíaca en cap dels tipus cel·lulars estudiats.

Tots tres tipus cel·lulars expressen connexina-43, una proteïna considerada clau per a l'establiment de *gap junctions* funcionals entre les cèl·lules mare i els cardiòcits adjacents que sembla que podrien servir com a conductes a través dels quals les cèl·lules mare podrien rebre senyals dels miòcits, importants per l'adquisició d'un fenotip cardíac de les cèl·lules mare en cocultiu^{345, 346}. A més, la no expressió d'aquesta proteïna podria ser la raó del potencial arítmic observat en d'altres tipus cel·lulars, com els miòcits esquelètics quan s'implanten al cor³⁴⁷. A passatge 5, l'expressió de Cx-43 en les epiATPC va ser significativament superior a les subATPC ($p = 0,031$).

Per altra banda, també es va detectar l'expressió de SERCA-2 en les MSC i les ATPC. Aquesta bomba de calci és imprescindible per què el calci alliberat pel sarcòmer al citoplasma retorni en contra de gradient³⁴⁸.

És interessant que, tot i que les subATPC s'obtenien dels mateixos pacients i els assaigs es realitzaven en paral·lel amb les epiATPC, les primeres mostressin nivells molt més baixos d'expressió proteica de α -actinina i no expressessin nivells detectables de β -MHC, GATA-4, Cx-43 o cTnI suggerint que els alts nivells de α -actinina i β -MHC presents en les epiATPC depenen d'una regulació posttranscripcional³⁴⁹.

La detecció d'expressió de marcadors cardíacs en les MSC derivades de moll d'os i les ATPC semblava indicar que sota els estímuls i l'ambient adequats aquestes cèl·lules podrien diferenciar-se cap a cardiòcits. A més, l'expressió basal de GATA-4 per part de les MSC i les epiATPC ens indicava un major potencial cardiogènic d'aquestes cèl·lules en comparació amb les subATPC i per això es van escollir per continuar l'estudi. Calia doncs, realitzar la prova de concepte i comprovar si les MSC i les epiATPC podien

diferenciar-se cap a cardiòcits *in vitro* fet que ens indicaria que potencialment podrien fer-ho *in vivo* quan fossin trasplantades.

La inducció de la diferenciació cardiogènica de les MSC es va dur a terme mitjançant l'addició de 5-azacitidina al medi de cultiu. Aquest compost és un desmetilant del DNA i l'RNA que és capaç d'alterar l'expressió de determinats gens^{263, 264} o regular la diferenciació^{265, 266}. Recentment, molts estudis han demostrat que les MSC poden diferenciar-se cap a cardiòcits després de l'exposició a la 5-aza^{125, 126, 267, 350}. Tot i així, encara no estan clars els mecanismes d'acció de la 5-aza per induir tal diferenciació. Després del tractament amb 5-aza, l'únic efecte observat va ser un lleu increment de l'expressió de la β -MHC i la Cx-43 en les MSC. L'augment de l'expressió de β -MHC, però, no va anar acompanyat d'una organització sarcomèrica. Aquesta dada i la falta d'expressió de cTnI indicaven l'absència d'un aparell contràctil madur. Resumint, l'eficiència de la inducció de diferenciació cardiogènica mitjançant 5-aza és molt limitada i les MSC no van adquirir un fenotip cardíac gaire diferent al que ja tenien de manera basal. Es desconeix el motiu d'aquest resultat contradictori, tot i que altres investigadors també han demostrat la no diferenciació cardiomiogènica de les MSC tractades amb 5-aza^{351, 352}. L'especificitat i la fiabilitat de les tècniques de detecció en el nostre estudi van ser confirmades utilitzant cardiòcits humans com a controls positius. Els mètodes utilitzats per l'aïllament i els components del medi de cultiu s'utilitzen rutinàriament en els estudis amb MSC. La concentració de 5-aza utilitzada, 10 μ M, ha demostrat ser efectiva per nombrosos autors^{350, 353, 354}. Per tant, sembla difícil interpretar les discrepàncies només per diferències tècniques. Això, no exclou la possibilitat que repetits tractaments amb 5-aza puguin reprogramar la diferenciació cel·lular en línies de MSC immortalitzades^{260, 267}. No obstant això, si això fos així evidenciaria que la diferenciació cardiomiogènica induïda per la 5-aza no és específica sinó deguda a una reprogramació aleatòria i no al propi potencial cardíac de les cèl·lules.

Els pobres resultats obtinguts amb la 5-aza van fer que l'estudi de la inducció de la diferenciació cardiogènica de les epiATPC es dugués a terme mitjançant el cocultiu d'aquestes amb cardiòcits neonatals, un mètode que havia demostrat ser efectiu amb les MSC en nombrosos treballs³⁵⁵⁻³⁵⁷. L'evidència de diferenciació cardiomiogènica de diferents tipus cel·lulars *in vivo* suggereix l'existència de factors ambientals^{131, 133}. No obstant això, es desconeixen quins són aquests factors que, a més, podrien incloure interaccions cèl·lula-cèl·lula i estimulació elèctrica i mecànica. El sistema de cocultiu

amb cardiòcits neonatals es basa en la hipòtesi que tant les senyals secretades pels cardiòcits com el contacte directe amb aquests poden induir la diferenciació cardiomiogènica de les cèl·lules mare o progenitores simulant *in vitro* el fenomen observat *in vivo*. Alguns estudis havien demostrat que cèl·lules progenitores endotelials humanes³⁵⁸, mioblasts³⁵⁹ i MSC^{268, 360} poden transdiferenciar-se en cardiòcits quan es cocultiven amb cardiòcits de rata neonatal i que la contracció dels cardiòcits³⁵⁹ i el contacte directe^{268, 360} eren essencials per aquest procés.

El cocultiu de les epiATPC a passatge 2 amb els cardiòcits de rata nounada va induir l'augment de l'expressió de α -actinina sarcomèrica, GATA-4, SERCA-2 i Cx-43 ja expressades basalment, i l'expressió *de novo* de cTnI i β -MHC. A més, les proteïnes estructurals detectades s'organitzaven amb una estructura similar a la d'un sarcòmer. També es van trobar algunes epiATPC multinucleades, un segell característic d'un 25% dels cardiòcits humans³⁶¹. Aquests resultats demostraven que les epiATPC poden diferenciar-se *in vitro* en cèl·lules semblants tant, morfològicament com molecularment, als cardiòcits neonatals en cultiu. Per tant, tot i residir en un ambient adipogènic, les epiATPC tenen un inherent fenotip cardíac i podrien estar destinades a l'homeòstasi del cor, potser, com a reservori cel·lular per a la regeneració del teixit miocàrdic.

En aquest punt, però, no es pot descartar que part de la diferenciació observada sigui fruit de la fusió entre cardiòcits i epiATPC, com s'ha observat en d'altres tipus cel·lulars en freqüències que oscil·len entre el 0,0065% i 0,16%, i en algun estudi de fins el 50%^{123, 136, 341}. Però aquest fenomen podria no ser negatiu, ja que està demostrat que quan els cardiòcits es fusionen amb cèl·lules no cardíques reentren en el cicle cel·lular mantenint les seves propietats i funcions bàsiques, fet que podria afavorir la regeneració del miocardi³⁶².

Inducció de propietats i funcions de cèl·lula endotelial en les epiATPC

El potencial cardiogènic mostrat per les epiATPC *in vitro* ens va fer aprofundir en la seva plasticitat. Millorar la neovascularització després d'una isquèmica crítica és un dels objectius terapèutics principals de la medicina cardiovascular. Hi ha molts estudis que han mostrat que diverses poblacions cel·lulars poden augmentar la neovascularització i incrementar l'aportació de sang al teixit isquèmic^{201, 231, 363}. Amb aquestes premisses es va estudiar si les epiATPC podien estimular la formació de nous vasos per dos

mecanismes diferents: diferenciant-se cap a cèl·lules endotelials que es poguessin incorporar als capil·lars o alliberant factors proangiogènics que afavorissin de forma paracrina la neovascularització.

El cultiu de les epiATPC amb el medi EGM-2 va induir un increment de l'expressió dels gens SDF-1, CD31, EGR-1 i 3, CD34, VEGF- α , VCAM-1 i VE-caderina. Es va observar que aquest patró era molt similar al mostrat pel model de cèl·lula endotelial per excel·lència, les cèl·lules endotelials obtingudes a partir de la vena del cordó umbilical humà o cèl·lules HUVEC. Per altra banda, les cèl·lules diferenciades a partir de les epiATPC van captar el LDL diacetilat (DiI-Ac-LDL) característic de les cèl·lules progenitores endotelials (EPC)^{162, 364} i les cèl·lules endotelials²⁸⁷. A més, les cèl·lules endotelials tenen la capacitat de formar estructures tubulars en matrius de 3 dimensions com el Matrigel³⁶⁵. En el nostre assaig funcional amb Matrigel, les epiATPC també formaven tubs i a més, aquests unien la isolectina GSLI B4, un marcador específic de cèl·lula endotelial²⁸⁸⁻²⁹¹.

Hi ha una creixent apreciació que una proporció significativa dels efectes beneficiosos de la teràpia cel·lular cardíaca podrien estar causats per la secreció per part de les cèl·lules trasplantades de múltiples factors de creixement angiogènics i antiapoptòtics^{363, 366}. Estudis *in vitro* han demostrat que tant les MSC com les subATPC secreten una gran varietat de factors angiogènics, antiapoptòtics i mitògens^{231, 367, 368}. En el nostre treball, hem demostrat que les epiATPC també secreten *in vitro* múltiples factors com FGFb, IL-6, TNF- α i VEGF que podrien potenciar l'angiogènesi de forma paracrina. És més, la secreció d'aquests factors augmentava entre un 20 i un 90% quan les cèl·lules es van sotmetre a condicions d'hipòxia moderada i severa com les que es podrien trobar al miocardi isquèmic. Comparat amb les MSC i les subATPC, les epiATPC secreten entre 3 i 4 vegades més de VEGF^{231, 369}. Aquests resultats suggereixen que les epiATPC podrien induir la neovascularització dins el miocardi infartat no només a partir de la seva capacitat de diferenciació cap a cèl·lules endotelials sinó també, a través de l'efecte paracrí fruit de la secreció de tots aquests factors. A més, està demostrat que VEGF i IL-6 tenen un efecte antiapoptòtic sobre els cardiòcits^{202, 370-372}. Estudis previs han observat que el dany isquèmic promou la mort dels cardiòcits per apoptosi^{373, 374}, la qual, eventualment tendeix cap al remodelat ventricular caracteritzat per una pèrdua de cardiòcits hipertrofiats, expansió de l'àrea d'infart inicial, aprimament de la paret i insuficiència cardíaca congestiva^{375, 376}. En

resum, segons els nostres resultats les epiATPC podrien exercir una acció angiogènica i cardioprotectora sobre el miocardi que podria ser important en la reconstrucció de la massa cardíaca.

Les dades obtingudes *in vitro* ens van fer determinar que les epiATPC tenien el potencial per regenerar el miocardi després d'un IAM per: 1) la seva clonogenicitat i capacitat de proliferar *in vitro*; 2) el fet de mostrar un fenotip estable durant 3 mesos de cultiu i expansió; 3) la seva expressió basal de gens cardíacs, en especial el factor de transcripció GATA-4, mostra un caràcter cardiogènic innat; 4) l'alt grau de diferenciació cardíaca induïda en el cocultius amb cardiòcits de rata neonatal; 5) la seva capacitat de diferenciació endotelial; 6) per la seva secreció de factors que els atorga la potencial capacitat d'induir neoangiogènesi i reduir l'apoptosi al miocardi. Per aquests motius i pel seu caràcter innovador, les epiATPC va ser les seleccionades com a model cel·lular per a la regeneració de miocardi en dos models animals d'IAM.

El trasplantament d'epiATPC millora el teixit miocàrdic a nivell histològic i funcional en el model d'IAM en rata

Les epiATPC es van injectar al marge de la cicatriu de l'infart de dos models, rata i ratolí, immunodeficients per evitar un possible rebuig immunitari de les cèl·lules d'origen humà. Ambdós models han estat àmpliament utilitzats i caracteritzats, i la tècnica de lligar l'artèria coronària descendent anterior esquerra per induir l'IAM és la més comuna^{377, 378}. La quantitat de cèl·lules injectades en els dos models (10^5 cèl·lules en el ratolí i 10^6 en la rata) havia estat utilitzada en d'altres estudis anteriorment descrits³⁷⁹⁻³⁸¹ i era proporcional a la diferència de mida del cor: el de rata és 10 vegades més gros.

El model de ratolí, utilitzat per realitzar una valoració inicial, va permetre constatar una millora significativa, a nivell histològic, del miocardi dels animals tractats respecte el dels control. La mida de la cicatriu de l'infart es va reduir i el gruix de la paret de la regió infartada va resultar superior en els animals tractats. La dilatació del ventricle esquerre dels animals tractats també va ser menor en comparació amb la dels animals control. Totes aquestes dades indiquen un efecte positiu sobre el miocardi danyat per part de les epiATPC.

El trasplantament de les epiATPC en el model d'IAM en rata va confirmar els anteriors resultats. Així, es va observar una reducció més gran, un 43%, de la mida de la cicatriu de l'infart en el grup d'animals tractats. La paret infartada del VE també va mostrar un gruix significativament superior, mentre que el ventricle dels animals tractats no va patir una dilatació tan gran com la dels control. Múltiples estudis han demostrat la influència positiva de diversos tipus cel·lulars quan són administrats al miocardi de diferents models animals d'infart de miocardi. Ara bé, si comparem el nostre treball amb d'altres realitzats amb procediments experimentals similars, l'efecte beneficiós de les epiATPC en relació amb la mida de l'infart és millor que l'observa't en cèl·lules mare derivades de moll d'os³⁷¹, cèl·lules mare cardíques adultes¹²² o cèl·lules mare derivades de teixit adipós²²⁷. La reducció de l'infart induïda per aquestes cèl·lules va ser del 6,7%, 21% i 14%, respectivament.

La principal troballa del nostre estudi, doncs, és que el trasplantament de les epiATPC està associat amb un augment significatiu de la funció contràctil del ventricle esquerre. En els animals tractats, la fracció d'ejecció, la fracció d'escurçament i el canvi en el gruix de la paret anterior són significativament superiors al cap de 15 dies del tractament i es mantenen al cap d'un mes. Aquests resultats corroboraven a nivell funcional la millora del miocardi observada a nivell histològic. A més, la millora en la funció cardíaca observada en el nostre model és inclús superior a les publicades en models animals similars injectant cèl·lules progenitores endotelials^{173, 382} o MSC^{143, 383}.

Per altra banda, el miocardi dels animals tractats amb epiATPC presentava una major densitat vascular, tant al marge de l'infart com a la regió distal d'aquest (miocardi sa). L'augment de densitat vascular en teixits isquèmics després del trasplantament de cèl·lules d'origen mesenquimal és un fet que ha estat observat en molts estudis^{201, 202, 384-386}. Per una banda, aquest augment de la densitat vascular podria ser degut a la inducció de nous processos d'angiogènesi i/o vasculogènesi induïda de forma paracrina pels factors i citoquines secretades per les epiATPC, descrit més amunt. Per altra banda, les epiATPC CD31⁺ detectades en el teixit miocàrdic i la seva capacitat de diferenciació cap a llinatge endotelial demostrada *in vitro* constataria que les epiATPC podrien incorporar-se a la vasculatura i, per tant, que fossin un responsable directe de la millora en la densitat de vasos observada.

Al cap de 30 dies del trasplantament, també es van detectar epiATPC-eGFP empeltades que havien adquirit un fenotip cardiogènic com ho demostrava l'expressió *de novo* de la troponina I cardíaca mantenint l'expressió de α -actinina sarcomèrica ja detectada basalment *in vitro*. Les interaccions cel·lulars, juntament amb la influència mecànica i elèctrica del teixit cardíac, haurien estimulat la seva diferenciació^{131, 133, 387}. Sorprenentment, tot i que les epiATPC havien estat injectades al marge de l'infart, les cèl·lules es van localitzar dins de la cicatriu fibròtica. Aquest fet indica la seva capacitat de migrar des del lloc de la injecció fins a les àrees isquèmiques. Aquest fenomen, ja descrit en treballs previs^{384, 388}, podria reflectir una resposta quimiotàctica al VEGF, sobreexpressat en aquest teixit a causa de la hipòxia, i el qual s'ha demostrat en d'altres tipus cel·lulars que actua com un quimiotàctic dosiddependent³⁸⁹. A més, en un estudi realitzat en embrions de pollastre es va observar que les lesions cardíques són un potent estímul per l'atracció de les cèl·lules mare derivades de sang de cordó umbilical⁵¹⁶.

En conclusió, s'ha identificat una nova població cel·lular, les epiATPC, unes cèl·lules amb capacitat clonogènica i d'expansió *in vitro*. Aquestes cèl·lules mostren un immunofenotip similar al de les MSC amb una expressió basal de múltiples proteïnes cardíques superior a les subATPC. A més, tot i no mostrar capacitat de diferenciació adipogènica ni osteogènica, sota l'ambient adequat mostren la capacitat de diferenciació cap a cèl·lules amb característiques dels cardiòcits i de les cèl·lules endotelials *in vitro*. En cultiu normòxic, les epiATPC expressen i secreten nombrosos factors proangiogènics i antiapoptòtics; en hipòxia, aquesta secreció augmenta entre un 20% i un 90%. A més, s'ha demostrat que la teràpia cel·lular amb epiATPC en dos models animals d'IAM va millorar la histologia i la funció cardíaca. Aquesta millora es pot atribuir, per una banda, a l'adquisició de les cèl·lules trasplantades d'un fenotip del teixit receptor danyat, que regeneren parcialment, ja que s'han localitzat epiATPC empeltades al teixit cardíac al cap de 30 dies de la injecció positives per troponina I cardíaca i d'altres per CD31. Per altra banda, la secreció de factors i citoquines per part de les epiATPC pot haver potenciat la protecció i reparació del miocardi creant un microambient que promogué la regeneració regional del miocardi mitjançant cèl·lules endògenes.

Perspectives futures

Una possible limitació en la utilització de les epiATPC en la pràctica clínica de forma generalitzada podria ser que, aquestes es troben localitzades en el teixit adipós cardíac que envolta el cor, el qual, no és fàcilment accessible. Tot i que seria fàcil realitzar una toracotomia lateral prèvia a una cirurgia de bypass en pacients isquèmics estables, per obtenir biòpsies de greix epicàrdic de on aïllar les epiATPC per un trasplantament autòleg, també s'han de tenir en compte altres possibilitats terapèutiques. Per exemple, als principals hospitals, es realitzen rutinàriament un gran nombre d'intervencions cardíques en les quals es podrien obtenir fàcilment biòpsies de greix epicàrdic sense un risc afegit per al pacient ni cost per al sistema de salut. Les epiATPC aïllades d'aquestes biòpsies podrien ser expandides i emmagatzemades per al seu posterior ús al·logènic. Aquesta possibilitat, es veuria afavorida per la capacitat immunosupressora de les epiATPC³⁹⁰.

¿De dónde venían y adónde iban esas gentes, arrastrando a través de los siglos el pesado fardo de su piel quemada? ¿Adónde encontrarían su tierra de promisión? Huyeron en la jungla africana de los cazadores de esclavos; tiñeron con sangre las argollas en las profundas bodegas de los barcos negreros; gimieron y se internaron en la manigua tropical como alzados, perseguidos por los perros del patrón. Pareciera que para los negros se ha detenido la rueda de la Historia: para ellos no floreció la Revolución francesa, ni existió Lincoln, ni combatió Bolívar, ni se cubrió de gloria el negro Maceo. Y ahora, los pobres negros costarricenses, después de haber enriquecido con su sangre a los potentados del banano, tenían que huir de noche a través de las montañas, arrastrando su prole y los bártulos. No los perseguía el perro del negrero: los perseguía el fantasma de la miseria. ¿Qué les esperaba al otro lado de la frontera? ¿Adónde irían a dejar sus huesos?

Mamita Yunai,

Carlos Luís Fallas

“Cadascú de nosaltres té més poder sobre el món del que s’imagina”

Margarita Yourcenar

CONCLUSIONS

La realització del treball descrit en la present memòria ha permès assolir les conclusions següents:

- 1.** L'estimulació de les MSC derivades de moll d'os amb 5-azacitidina incrementa l'expressió de β -MHC i de Cx-43 però no s'assoleix un grau superior de diferenciació cardiogènica.
- 2.** S'ha identificat, aïllat i caracteritzat un nou tipus de cèl·lula progenitora procedent del greix epicàrdic anomenat epiATPC.
- 3.** Les epiATPC presenten una major expressió basal de marcadors de llinatge cardiomiogènic (GATA-4 i Cx-43) que les MSC derivades de moll d'os i les subATPC i, no diferencien cap a osteòcits ni adipòcits malgrat que deriven del teixit adipós.
- 4.** Les propietats de les epiATPC *in vitro* són:
 - a.** Clonogenicitat.
 - b.** Cardiodiferenciació en cocultiu amb cardiòcits de rata nounada.
 - c.** Capacitat d'adquirir característiques de cèl·lula endotelial.
 - d.** Secreció de factors proangiogènics (VEGF, FGFb, IL-6 i TNF- α) incrementada en condicions d'hipòxia.
- 5.** Les epiATPC trasplantades en els models de rata i ratolí es diferencien cap a cèl·lules de llinatge cardíac i endotelial, i produeixen els següents efectes:
 - a.** Reducció de l'àrea de la cicatriu de l'infart i augment del gruix de la paret del ventricle esquerre.
 - b.** Increment de la densitat vascular al marge de la cicatriu.
 - c.** Augment de la funció cardíaca (fracció d'ejecció i fracció d'escurçament) avaluada ecocardiogràficament.

“M’entristeix molt pensar que la natura
parla mentre l’home no escolta”

Victor Hugo

APÈNDIX I

Descripció dels marcadors de superfície analitzats

CD105:

És una glicoproteïna homodimèrica transmembrana de 180 KDa de pes molecular. Forma part del complex receptor TGF- β (*transforming growth factor beta*) implicat en la proliferació cel·lular, la diferenciació i la migració, tot i que les seves funcions en les interaccions receptor-lligand encara són poc conegudes^{391, 392}. S'expressa principalment en cèl·lules endotelials i també en les cèl·lules mare mesenquimals.

CD106:

La *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1, CD106, o INCAM-110) està implicada de manera crítica en les interaccions endotelials en teixit connectiu^{393, 394}. S'expressa principalment en cèl·lules endotelials, i en general aquestes molècules regulen la migració dels leucòcits a través de les parets dels vasos sanguinis i proveeixen punts d'ancoratge per al desenvolupament d'endoteli durant l'angiogènesi³⁹⁴⁻³⁹⁶. La VCAM-1 és una glicoproteïna transmembrana tipus I de 715 aminoàcids que es caracteritza per la presència de set dominis immunoglobulina tipus C2. VCAM-1 té un modest número d'activitats totes relacionades amb la seva expressió com molècula d'adhesió unida a membrana.

CD44:

És una molècula expressada ubiquament tant en cèl·lules hematopoètiques com en no hematopoètiques. El CD44 és una glicoproteïna transmembrana tipus I que té entre 80 i 250 KDa. CD44 és la principal molècula d'adhesió per l'àcid hialurònic³⁹⁷, a més és un important mediador en regular la interacció entre la matriu extracel·lular i el citoesquelet d'actina. CD44 s'expressa en la majoria de tipus cel·lulars humans i està implicat en una gran varietat de processos fisiològics i patològics, tals com el reclutament dels limfòcits i la seva activació, la cicatrització, la migració cel·lular i també el creixement de les cèl·lules tumorals i la metàstasi³⁹⁸.

CD166:

És un membre de la superfamília de les immunoglobulines amb cinc dominis extracel·lulars tipus immunoglobulina³⁹⁹. També es coneix amb l'acrònim d'ALCAM (*activated leukocyte cell adhesion molecule*). Tot i que s'expressa en una gran varietat de teixits, normalment està restringida a aquelles cèl·lules involucrades amb creixement dinàmic i/o migració, incloent desenvolupament neuronal, hematopoesi, resposta immunitària i progressió de tumors. Diversos estudis d'estructura-funció de CD166 han determinat que el seu ancoratge amb el citoesquelet i la integritat dels seus dominis extracel·lulars tipus immunoglobulina podrien regular propietats cel·lulars relacionades amb l'adhesió cel·lular, el creixement i la migració⁴⁰⁰.

CD29:

Són cadenes Integrina beta-1 que s'expressen com a heterodímers que s'associen de manera no covalent amb cadenes alfa específiques de la família CD49 (CD49a-f). El CD29 s'expressa en leucocits en repòs i activats⁴⁰¹.

CD45:

És una proteïna transmembrana d'entre 1100 i 1300 aminoàcids amb activitat tirosina quinasa que es troba a totes les cèl·lules hematopoètiques humanes excepte els eritròcits, les plaquetes i els seus precursors. Aquesta molècula és necessària per a l'activació de les cèl·lules T i B i s'expressen un mínim de 5 isoformes depenent de l'estat d'activació de la cèl·lula^{402, 403}.

CD34:

És una proteïna transmembrana altament glicosilada de 385 aminoàcids que s'expressa en cèl·lules mare limfohematopoètiques, cèl·lules endotelials de petits vasos, fibroblasts embrionaris i en algunes cèl·lules del teixit nerviós fetal i adult⁴⁰⁴. La seva funció no està clara, tot i que es creu que podria està implicat en el manteniment del fenotip de cèl·lula progenitora/mare hematopoètica⁴⁰⁵.

CD117:

També conegut com c-Kit o *stem cell factor receptor* (SCFR), és el receptor del factor de creixement *stem cell factor* (SCF). És un receptor transmembrana amb activitat tirosina quinasa de 976 aminoàcids. S'expressa principalment en cèl·lules mare hematopoètiques i cèl·lules progenitores⁴⁰⁶, en cèl·lules de leucèmia mieloide aguda⁴⁰⁷, en mastòcits⁴⁰⁸ i en melanòcits, sistema reproductiu i cervell embrionari⁴⁰⁹.

CD14:

És una proteïna de 365 aminoàcids amb un alta afinitat pels lipopolisacàrids de la paret dels bacteris gram positius i negatius. El CD14 s'expressa fortament en humans en la majoria dels monòcits i macròfags en sang perifèrica i en altres fluids i teixits com els nòduls limfàtics i la melsa. També s'expressa en menor grau en subpoblacions de neutròfils i cèl·lules dendrítiques⁴¹⁰. El CD14 és una de les proteïnes clau en la resposta immunitària innata en humans⁴¹¹.

CD90:

També anomenat Thy-1 a causa de la seva prèvia identificació en timòcits, és una proteïna de 25KDa molt conservada en tots els vertebrats. La seva expressió varia entre les espècies, però generalment s'expressa en timòcits, neurones, cèl·lules mare mesenquimals i hematopoètiques, cèl·lules NK, endoteli i una fracció dels fibroblasts; en humans, només s'expressa a neurones⁴¹² i en alguns tipus de cèl·lules mare^{413, 414}. La seva funció no es coneix exactament, però s'especula que podria participar en les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu, i participar en la regeneració nerviosa, apoptosi, supressió de tumors⁴¹⁵, metàstasi, inflamació i fibrosi.

“L’avantatge de tenir mala memòria és que es
gaudeix moltes vegades amb les mateixes coses”

Friedrich Wilhelm Nietzsche

APÈNDIX II

Descripció dels marcadors cardíacs analitzats

GATA-4:

GATA-4 forma part d'una família de factors de transcripció formada per sis proteïnes (GATA-1-6), totes implicades en el desenvolupament embrionari i la generació de tipus cel·lulars específics⁴¹⁶. GATA-4 és un dels primers factors expressats en el desenvolupament de les cèl·lules cardíques⁴¹⁷ i continua present en els cardiòcits durant la vida adulta^{417, 418}, on regula l'expressió de gens cardíacs⁴¹⁹⁻⁴²¹ i és necessari per a la viabilitat dels miòcits⁴²². En el cor adult, GATA-4 juga un paper important en la regulació de l'expressió gènica per al manteniment de l'homeòstasi cardíaca, ja que promou la supervivència cel·lular i inhibeix l'apoptosi^{422, 423}, i també en la regulació del creixement hipertròfic⁴²⁴. GATA-4 regula la transcripció de nombrosos gens cardíacs, incloent-hi el factor natriurètic auricular (ANF), pèptid natriurètic tipus b (BNP), cadena pesada de la α -miosina, β -MHC, cTnI i molts d'altres^{424, 425}. Es creu que GATA-4 podria ser un mediador de l'angiogènesi al cor després d'una lesió⁴²⁶.

Nkx2.5:

Factor de transcripció també conegut com a Csx, és un regulador crític de l'expressió gènica cardíaca i del desenvolupament del cor⁴²⁷. Nkx2.5 és altament expressat per les cèl·lules progenitores del cor primerenc quan es comprometen cap al llinatge cardíac durant l'embriogènesi i es continua expressant al cor a l'edat adulta⁴²⁷⁻⁴²⁹. A l'edat adulta, s'ha vist que Nkx-2.5 regula l'organització sarcomèrica en els cardiòcits⁴³⁰ i l'expressió de proteïnes cardíques clau, com la connexina-43⁴³¹. El seu paper al cor adult només es coneix parcialment, i s'hipotetitza que també podria participar en la resposta hipertròfica cardíaca⁴³². Per altra banda hi ha evidències que podria actuar com un factor de supervivència i cardioprotecció⁴³³.

Tbx5:

Tbx5 o T-Box 5 forma part de la família dels gens T-box que codifiquen per factors de transcripció implicats en diversos aspectes dels patrons de formació en els embrions, tant vertebrats com invertebrats, i que es caracteritzen per un domini d'unió al DNA molt conservat⁴³⁴. Té un paper clau en el desenvolupament cardíac primerenc⁴³⁵. Tbx5 s'associa amb Nkx2.5 i sinèrgicament promouen la diferenciació cardiomiogènica⁴³⁶. Ambdós s'uneixen directament al promotor del gen per la proteïna cardioespecífica, anomenada precursor del pèptid natriurètic tipus A (NPPA). Tbx5 també interacciona amb GATA4 i, fins i tot, sembla que forma un triple complex amb Nkx2.5 que seria el que regularia un seguit de gens cardíacs específics⁴³⁷.

Islet-1:

És un factor de transcripció expressat a les cèl·lules dels illots pancreàtics. Recentment, però, s'ha demostrat que Islet-1 (Isl-1) identifica les cèl·lules progenitores cardiovasculars, les quals donen lloc a cardiòcits, cèl·lules endotelials i cèl·lules musculars llises *in vitro*^{438, 439}. Durant el desenvolupament del cor s'ha vist que Isl-1 és necessari per la proliferació, la supervivència, i la migració dels recentment descrits progenitors de la segona cresta cardíaca¹²⁷. En l'adult, aquest factor de transcripció també identifica cèl·lules progenitores cardíques¹²⁸. S'ha demostrat que la seva expressió està regulada directament per la β -catenina⁴⁴⁰.

 α -actinina sarcomèrica:

És una proteïna de 100 KDa que forma part del citoesquelet d'actina de les cèl·lules musculars. Concretament, la α -actinina sarcomèrica uneix els filaments d'actina entre si en zig-zag, un patró conegut com a filaments Z^{441, 442}.

Cadena pesada de la β -miosina (β -MHC):

És la principal proteïna contràctil, converteix l'energia química en força mecànica mitjançant la hidròlisi de l'ATP. La miosina està organitzada a l'interior de la cèl·lula en

parelles de dos cadenes pesades d'uns 200 KDa cada una i dos parelles de cadenes lleugeres. La β -MHC s'expressa tant en múscul cardíac com en esquelètic⁴⁴³.

Troponina I cardíaca:

La troponina I és la subunitat inhibidora del complex de tres proteïnes implicat en la regulació mitjançant el calci de l'actomiosina ATPasa durant la contracció muscular⁴⁴³. Concretament, el paper de la troponina I és la d'unir-se a l'actina per mantenir el complex troponina-tropomiosina al lloc correcte. La isoforma cardíaca de la troponina I es diferencia de les altres dues presents al múscul esquelètic per una cua d'uns 30 aminoàcids que conté uns residus de serina que en ser fosforilats faciliten la relaxació muscular miocàrdica⁴⁴⁴.

SERCA2 (*sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺*):

És una bomba de calci la funció de la qual és transportar el calci des del citoplasma al reticle sarcoplasmàtic. SERCA2 és una proteïna transmembrana d'uns 100 KDa que forma part d'una família d'isoenzimes molt conservada⁴⁴⁵. SERCA2 té 2 isoformes fruit de l'*splicing* alternatiu, SERCA2a s'expressa predominantment al cor i al múscul esquelètic⁴⁴⁶, i SERCA2b que s'expressa a la musculatura llisa i a la majoria de teixits no musculars⁴⁴⁷⁻⁴⁴⁹.

Connexina-43 (Cx-43):

És una proteïna de 43 KDa que forma part d'una família de proteïnes estructurals transmembrana. A partir de la unió de 6 molècules de connexina formen unes estructures anomenades *gap junctions* essencials per a molts processos fisiològics, com la despolarització coordinada del múscul cardíac⁴⁵⁰. Cx-43 també s'expressa a les cèl·lules de l'estroma del moll d'os, on s'ha vist que podria ser crucial en el desenvolupament d'una resposta eficient davant d'un estrès hematopoètic⁴⁵¹. Aquesta connexina s'expressa a la superfície dels vasos amb aterosclerosi, al cervell i la més abundant al cor, tant a la membrana citoplasmàtica dels cardiòcits com a les seves mitocòndries⁴⁵².

“Fora d'un gos, un llibre és el millor amic de l'home,
i dintre d'un gos és massa fosc per a llegir”

Groucho Marx

APÈNDIX III

Descripció dels marcadors endotelials analitzats

EGR-1:

El *early growth response factor 1* (EGR-1) és un factor de transcripció clau en l'expressió gènica després d'una lesió vascular. EGR-1 també podria ser un mediador de la inflamació i l'apoptosi en les cèl·lules vasculares⁴⁵³. Aquest factor regula l'expressió de gens implicats en el control del creixement o supervivència, i la seva expressió promou o reprimeix la proliferació o la regressió cel·lular en funció del tipus de cèl·lula i l'ambient⁴⁵⁴. És sobreexpressat per les cèl·lules vasculares per multitud d'estímuls com l'estrès mecànic, la hipòxia, l'angiotensina II,...⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁷. S'hipotetitza que podria estar implicat en la patologia vascular⁴⁵⁶.

EGR-3:

L'*early growth response factor 3* (EGR-3) forma part de la família Egr, que fan de mitjancers de respostes primerenques o immediates, desencadenades per l'activació de receptors de superfície, en una àmplia varietat de tipus cel·lulars. És un candidat com a mediador primerenc de l'angiogènesi induïda per VEGF⁴⁵⁸.

VCAM-1 (CD106):

La *vascular cell adhesion molecule-1* és una glicoproteïna de superfície que s'expressa només quan les cèl·lules endotelials són estimulades per citoquines. VCAM-1 s'indueix en cèl·lules endotelials en els teixits inflamats⁴⁵⁹⁻⁴⁶¹ i participa en la extravasació dels leucòcits⁴⁶². La unió dels leucòcits a VCAM-1 en cèl·lules endotelials activa la senyalització necessària per a la migració limfocitària^{463, 464}.

VE-caderina:

Les caderines són una família de molècules d'adhesió. Les cèl·lules endotelials expressen com a mínim tres tipus de caderines, entre les quals, la VE-caderina (*vascular endothelial cadherin*), que s'expressa de manera específica a les unions entre les

cèl·lules endotelials⁴⁶⁵. Sembla que és important en el manteniment de la permeabilitat endotelial i, per tant, es creu que també en el control de la transmigració^{465, 466}. La VE-caderina també regula diversos processos com la proliferació cel·lular i l'apoptosi, i també modula les funcions del receptor del VEGF⁴⁶⁷.

Factor von Willebrand (vWF):

És una glicoproteïna imprescindible per a una homeòstasi normal. Està sintetitzat per les cèl·lules endotelials, els megacariocits i el teixit connectiu subendotelial⁴⁶⁸⁻⁴⁷⁰. vWF procura l'adhesió de les plaquetes al subendoteli després d'una lesió vascular⁴⁷⁰ i també té un paper important en la interacció entre les cèl·lules endotelials i la seva matriu⁴⁷¹. La manca o deficiència d'aquest factor desencadena la malaltia de von Willebrand i està implicat en un gran nombre d'altres malalties⁴⁷⁰.

CD34:

És una molècula present en diversos tipus cel·lulars. És una glicoproteïna de superfície que té funcions en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula⁴⁷². També participa en la unió entre les cèl·lules mare i la matriu extracel·lular del moll d'os o directament amb les cèl·lules estromals⁴⁷³. CD34 és expressat per cèl·lules hematopoètiques del cordó umbilical i del moll d'os, cèl·lules progenitores endotelials i cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis, entre d'altres⁴⁷⁴⁻⁴⁷⁶.

CD31:

També anomenat PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*), té un paper clau en l'eliminació dels neutròfils vells de l'organisme. S'expressa en gran quantitat en cèl·lules endotelials, però també en plaquetes, macròfags, fibroblasts i osteoclasts, entre d'altres. CD31 participa en les unions cèl·lula-cèl·lula, en la migració transendotelial dels neutròfils i està implicat en l'angiogènesi^{274, 477, 478}.

CD102 (ICAM-2):

És una proteïna transmembrana que s'expressa de forma constitutiva en cèl·lules de l'endoteli vascular i també en algunes poblacions de limfòcits i monòcits. CD102 té un paper clau en l'adhesió de les cèl·lules endotelials a integrines⁴⁷⁹. També participa en la transmigració i activació limfocitària.

CD133:

És una glicoproteïna transmembrana que es localitza específicament a les protrusions cel·lulars. S'expressa en cèl·lules mare hematopoètiques, cèl·lules progenitores endotelials, cèl·lules mare de la glia entre d'altres tipus cel·lulars^{480, 481}. Tot i que és un bon marcador de cèl·lules mare es desconeix si té algun paper en les seves característiques funcionals⁴⁸¹.

CD36:

És una proteïna de superfície, membre de la família de receptors *scavenger*. S'expressa en molts tipus cel·lulars i interactua amb un gran nombre de lligands, incloent-hi el col·lagen⁴⁸², LDL oxidada⁴⁸³, lipoproteïnes natives⁴⁸⁴,... CD36 està implicat en l'homeòstasi, trombosi, inflamació, metabolisme dels lípids i de la glucosa^{485, 486}, i aterogènesi⁴⁸⁷.

CXCR4:

També anomenat fusina. És el receptor de quemoquines específic per al SDF-1. La seva interacció amb SDF-1 té un paper important en el manteniment de les cèl·lules mare hematopoètiques al moll d'os. CXCR4 s'expressa en una gran varietat de cèl·lules del moll d'os i el seu endoteli, de la circulació fetal i del cordó umbilical⁴⁸⁸.

SDF-1 (CXCL12):

L'*stromal derived factor-1* és una potent molècula quimiotàctil per als limfòcits⁴⁸⁹. La interacció de SDF-1 amb CXCR4 activa diferents vies implicades en la

supervivència, proliferació, adhesió i migració⁴⁸⁸. En l'adult té un paper important en l'angiogènesi reclutant les cèl·lules progenitores endotelials del moll d'os en un mecanisme dependent de CXCR4⁴⁹⁰.

“Per a veure-hi clar, només cal canviar
la direcció de la mirada”

Antoine de Saint Exupery

APÈNDIX IV

Descripció dels factors proangiogènics analitzats

VEGF:

Entre els inductors de l'angiogènesi, el VEGF (*vascular endothelial growth factor*) és el més ben caracteritzat i segurament la molècula més important. El VEGF està implicat en la regulació de múltiples passos l'angiogènesi. Afavoreix la vasodilatació inicial augmentant la permeabilitat de les cèl·lules endotelials i afavorint el transport de proteïnes plasmàtiques⁴⁹¹. El VEGF també augmenta els activadors del plasminogen i MMP-1 en les cèl·lules endotelials⁴⁹² així com la seva proliferació i migració i a més, en redueix l'apoptosi⁴⁹³⁻⁴⁹⁵.

TNF- α :

El TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*) és una citoquina que promou la proliferació i migració de les cèl·lules endotelials i la formació de tubs *in vitro*. El TNF- α indueix la formació de nous vasos *in vivo* mitjançant les seves propietats proinflamàtores⁴⁹⁶.

PDGF_{BB}:

El PDGF_{BB} (*platelet-derived growth factor BB*) afavoreix la proliferació de les cèl·lules endotelials i la formació de tubs *in vitro*⁴⁹⁷ i *in vivo*⁴⁹⁸. També augmenta la proliferació de les cèl·lules musculars llises i dels pericits⁴⁹⁹.

FGFb:

El FGFb o FGF-2 (*fibroblast growth factor basic/2*) és una molècula quimiotàctil i mitogènica per les cèl·lules endotelials, fibroblasts i molts altres tipus cel·lulars⁵⁰⁰. A més, el FGFb augmenta l'expressió de VEGF, proteases i molècules d'adhesió en les cèl·lules endotelials⁵⁰¹. En l'àmbit cardíac nombrosos estudis on s'ha aplicat el FGFb per tractar l'infart agut de miocardi han demostrat un augment en el número de vasos⁵⁰²⁻⁵⁰⁴.

IL-6:

La IL-6 estimula la proliferació, migració i formació de tubs en Matrigel de les cèl·lules progenitores endotelials *in vitro*⁵⁰⁵. Per altra banda un nombre creixent de treballs experimentals semblen indicar que la IL-6 confereix cardioprotecció i promou la neovascularització quan el cor pateix un estrès⁵⁰⁶⁻⁵¹¹.

IL-1β:

La IL-1β és una citoquina proinflamatòria que s'ha demostrat que participa en l'angiogènesi tan *in vitro* com *in vivo*^{512, 513}. També s'ha vist que IL-1β augmenta l'expressió de VEGF en diferents tipus cel·lulars⁵¹⁴, entre d'altres, els cardiòcits⁵¹⁵.

"Per crear alguna cosa, has de sacrificar
quelcom del mateix valor"

Alphonse Elric, l'alquimista d'acer

BIBLIOGRAFIA

1. Mackay, J. & Mensah, G.A. The Atlas of Heart Disease and Stroke. *1st edn. Geneva: World Health Organization*, 1-112 (2004).
2. Anversa, P. & Kajstura, J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 83, 1-14 (1998).
3. Kajstura, J. et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8801-8805 (1998).
4. Bruneau, B.G. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res* 90, 509-519 (2002).
5. Bruneau, B.G. Developmental biology: tiny brakes for a growing heart. *Nature* 436, 181-182 (2005).
6. Schultheiss, T.M., Burch, J.B. & Lassar, A.B. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* 11, 451-462 (1997).
7. Molkentin, J.D., Lin, Q., Duncan, S.A. & Olson, E.N. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11, 1061-1072 (1997).
8. Kuo, C.T. et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 11, 1048-1060 (1997).
9. Bruneau, B.G. et al. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 106, 709-721 (2001).
10. Brand, T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* 258, 1-19 (2003).
11. Moorman, A.F.M. & Lamers, W.H. Molecular anatomy of the developing heart. *Trends in Cardiovascular Medicine* 4, 257-264 (1994).
12. Franco, D., Lamers, W.H. & Moorman, A.F. Patterns of expression in the developing myocardium: towards a morphologically integrated transcriptional model. *Cardiovasc Res* 38, 25-53 (1998).
13. Franco, D., Dominguez, J., de Castro Md Mdel, P. & Aranega, A. [Regulation of myocardial gene expression during heart development]. *Rev Esp Cardiol* 55, 167-184 (2002).
14. Iuzzio, P.A. Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices. (Humana Press, Totowa, New Jersey; 2005).
15. Reconditi, M. et al. Structure-function relation of the myosin motor in striated muscle. *Ann N Y Acad Sci* 1047, 232-247 (2005).
16. Ganong, W.F. Review of medical physiology, Edn. 21st. (Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2003).
17. Braunwald, E. Braunwald: Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, Edn. 6th. (W. B. Saunders Company, 2001).
18. Guyton, A.C. & Hall, J.E. Textbook of medical physiology. (Elsevier Saunders, Philadelphia, Pennsylvania; 2006).
19. Gros, D.B. & Jongsma, H.J. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 18, 719-730 (1996).
20. Oberpriller, J.O. & Oberpriller, J.C. Response of the adult newt ventricle to injury. *J Exp Zool* 187, 249-253 (1974).
21. Becker, R.O., Chapin, S. & Sherry, R. Regeneration of the ventricular myocardium in amphibians. *Nature* 248, 145-147 (1974).
22. Poss, K.D., Wilson, L.G. & Keating, M.T. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298, 2188-2190 (2002).
23. Urbanek, K. et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8692-8697 (2005).
24. Limana, F. et al. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit+ cell proliferation and differentiation. *Circ Res* 97, e73-83 (2005).
25. Bayes-Genis, A. et al. Chimerism and microchimerism of the human heart: evidence for cardiac regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4 Suppl 1, S40-45 (2007).
26. Quaini, F. et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 346, 5-15 (2002).
27. Laflamme, M.A., Myerson, D., Saffitz, J.E. & Murry, C.E. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res* 90, 634-640 (2002).
28. Deb, A. et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 107, 1247-1249 (2003).
29. Bayes-Genis, A. et al. Cardiac chimerism in recipients of peripheral-blood and bone marrow stem cells. *Eur J Heart Fail* 6, 399-402 (2004).

30. Packer, M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 20, 248-254 (1992).
31. Mann, D.L. Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach. *Circulation* 100, 999-1008 (1999).
32. Beltrami, A.P. et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344, 1750-1757 (2001).
33. Braunwald, E. & Bristow, M.R. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation* 102, IV14-23 (2000).
34. Towbin, J.A. & Bowles, N.E. The failing heart. *Nature* 415, 227-233 (2002).
35. Siepe, M., Heilmann, C., von Samson, P., Menasche, P. & Beyersdorf, F. Stem cell research and cell transplantation for myocardial regeneration. *Eur J Cardiothorac Surg* 28, 318-324 (2005).
36. Hou, D. et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation* 112, I150-156 (2005).
37. Genentech The National Registry of Myocardial Infarction (NRMI). (2005).
38. A.D.A.M. http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/17004.htm.
39. (AHA), A.H.A. Heart Disease and Stroke Statistics — 2002 Update.
40. Rosamond, W. et al. Heart Disease and Stroke Statistics--2008 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 117, e25-146 (2008).
41. Defunciones según la Causa de Muerte 2005. Instituto Nacional de Estadística (INE). <http://www.ine.es/prensa/np444.pdf>. (2005).
42. Tunstall-Pedoe, H. et al. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet* 353, 1547-1557 (1999).
43. Fiol, M. et al. [Variability in the in-hospital management of acute myocardial infarction in Spain. IBERICA Study (Investigacion, Búsqueda Especifica y Registro de Isquemia Coronaria Aguda)]. *Rev Esp Cardiol* 54, 443-452 (2001).
44. Marrugat, J., Elosua, R. & Marti, H. [Epidemiology of ischaemic heart disease in Spain: estimation of the number of cases and trends from 1997 to 2005]. *Rev Esp Cardiol* 55, 337-346 (2002).
45. Shim, W. & Wong, P. Stem cell cardiomyoplasty: state-of-the-art. *Ann Acad Med Singapore* 33, 451-460 (2004).
46. Kocher, A.A. et al. Stem cells and cardiac regeneration. *Transpl Int* 20, 731-746 (2007).
47. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Department of Health and Human Services. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport>. (2001).
48. Torres, M.A.M. Avances en la regeneración del miocardio infartado. <http://www.encuentros.uma.es/encuentros72/miocardio.htm> (2004).
49. Eccles Health Sciences of Medicine. <http://library.med.utah.edu/WebPath/ATHHTML/ATH005.html> (Occlusive coronary atherosclerosis).
50. Lendon, C., Born, G.V., Davies, M.J. & Richardson, P.D. Plaque fissure: the link between atherosclerosis and thrombosis. *Nouv Rev Fr Hematol* 34, 27-29 (1992).
51. Sun, Y. & Weber, K.T. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 46, 250-256 (2000).
52. Feiring, A.J. et al. The importance of the determination of the myocardial area at risk in the evaluation of the outcome of acute myocardial infarction in patients. *Circulation* 75, 980-987 (1987).
53. Pfeffer, M.A. et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44, 503-512 (1979).
54. Nucleus medical art, Angioplasty:Balloon Placement. <http://catalog.nucleusinc.com/nucleusindex.php?>
55. Nucleus Medical Art/Getty Images, Stent procedure. <http://catalog.nucleusinc.com/nucleusindex.php?>
56. A.D.A.M.-NIH Insuficiencia cardiaca. (2004). <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000158.htm>.
57. Institute, T.H. Congestive Heart Failure. (2005). <http://www.texasheartinstitute.org/HIC/Topics/Cond/CHF.cfm>.
58. Hunt, S.A. et al. ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to

- Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation; Endorsed by the Heart Failure Society of America. *Circulation* 104, 2996-3007 (2001).
59. Stewart, S., MacIntyre, K., Hole, D.J., Capewell, S. & McMurray, J.J. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail* 3, 315-322 (2001).
 60. Association, A.H. Coronary Artery Bypass Grafting (CABG). <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4484> (2007).
 61. Taylor, D.O. et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult heart transplantation report--2006. *J Heart Lung Transplant* 25, 869-879 (2006).
 62. Organización Nacional de Trasplantes. Dossier Corazón 2007. www.ont.es (2007).
 63. Alberto Juffé, V.G., José Cuenca, Marisa Crespo, Luis Hermida, Claudio Zavarella DONACIÓN Y TRANSPLANTE CARDÍACO. *REVISTA ARGENTINA DE CIRUGÍA CARDIOVASCULAR* II (2004).
 64. Mimeault, M., Hauke, R. & Batra, S.K. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther* 82, 252-264 (2007).
 65. Dib, N., Taylor, D.A. & Diethrich, E.B. STEM CELL THERAPY AND TISSUE ENGINEERING FOR CARDIOVASCULAR REPAIR. From Basic Research to Clinical Applications, Edn. 1st. (Springer, New York; 2006).
 66. Ford-Martin, A. in *The Gale Encyclopedia of Medicine*. (ed. D. Olendorf, C. Jeryan & K. Boyden) (Thomson Gale, 1999).
 67. Jacobsen, L.O., Marks, E.K., Gaston, E.O. & Zirkle, R.E. Effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J Lab Clin Med* 34, 1538-1543 (1949).
 68. Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T.R. & Shelton, E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 12, 197-201 (1951).
 69. Gengozian, N., Urso, I.S., Congdon, C.C., Conger, A.D. & Makinodan, T. Thymus specificity in lethally irradiated mice treated with rat bone marrow. *Proc Soc Exp Biol Med* 96, 714-720 (1957).
 70. Ford, C.E., Hamerton, J.L., Barnes, D.W. & Loutit, J.F. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 177, 452-454 (1956).
 71. Nowell, P.C., Cole, L.J., Habermeyer, J.G. & Roan, P.L. Growth and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice. *Cancer Res* 16, 258-261 (1956).
 72. Orlic, D. et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10344-10349 (2001).
 73. Koh, G.Y., Klug, M.G., Soonpaa, M.H. & Field, L.J. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *J Clin Invest* 92, 1548-1554 (1993).
 74. Chiu, R.C., Zibaitis, A. & Kao, R.L. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* 60, 12-18 (1995).
 75. Taylor, D.A. et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 4, 929-933 (1998).
 76. Evans, M.J. & Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156 (1981).
 77. Martin, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638 (1981).
 78. Smith, A.G. Mouse embryo stem cells: their identification, propagation and manipulation. *Semin Cell Biol* 3, 385-399 (1992).
 79. Thomson, J.A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147 (1998).
 80. Smits, A.M., van Vliet, P., Hassink, R.J., Goumans, M.J. & Doevendans, P.A. The role of stem cells in cardiac regeneration. *J Cell Mol Med* 9, 25-36 (2005).
 81. Thompson, J. (University of Wisconsin-Madison, Wisconsin; 1998).
 82. Boheler, K.R. et al. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 91, 189-201 (2002).
 83. Gepstein, L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ Res* 91, 866-876 (2002).
 84. Mery, A. et al. Commitment of embryonic stem cells toward a cardiac lineage: molecular mechanisms and evidence for a promising therapeutic approach for heart failure. *J Muscle Res Cell Motil* 24, 269-274 (2003).

85. Sachinidis, A. et al. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* 58, 278-291 (2003).
86. He, J.Q., Ma, Y., Lee, Y., Thomson, J.A. & Kamp, T.J. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 93, 32-39 (2003).
87. Meyer, N., Jaconi, M., Landopoulou, A., Fort, P. & Puceat, M. A fluorescent reporter gene as a marker for ventricular specification in ES-derived cardiac cells. *FEBS Lett* 478, 151-158 (2000).
88. Perez-Terzic, C. et al. Structural adaptation of the nuclear pore complex in stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res* 92, 444-452 (2003).
89. Xu, C., Police, S., Rao, N. & Carpenter, M.K. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 91, 501-508 (2002).
90. Mummery, C. et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107, 2733-2740 (2003).
91. Kehat, I. et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108, 407-414 (2001).
92. Kehat, I. et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22, 1282-1289 (2004).
93. Xue, T. et al. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation* 111, 11-20 (2005).
94. Klug, M.G., Soonpaa, M.H., Koh, G.Y. & Field, L.J. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98, 216-224 (1996).
95. Min, J.Y. et al. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* 92, 288-296 (2002).
96. Min, J.Y. et al. Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125, 361-369 (2003).
97. Hodgson, D.M. et al. Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H471-479 (2004).
98. Swijnenburg, R.J. et al. Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation* 112, 1166-1172 (2005).
99. Cao, F. et al. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation* 113, 1005-1014 (2006).
100. Laflamme, M.A. & Murry, C.E. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol* 23, 845-856 (2005).
101. Revazova, E.S. et al. HLA Homozygous Stem Cell Lines Derived from Human Parthenogenetic Blastocysts. *Cloning Stem Cells* (2007).
102. BOE REAL DECRETO 2132/2004. <http://www.boe.es/boe/dias/2004-10-30/pdfs/A35905-35907.pdf> (2004).
103. BOCG PROYECTO DE LEY 121/000104 Investigación biomédica. <http://www.congreso.es/portal/page/portal/Congreso/PopUpCGI?CMD=VERLST&CONF=BRS/PUB.cnf&BASE=PUW8&DOCS=1-1&FMT=PUWTXDTS.fmt&OPDEF=Y&QUERY=CDA20060922010401.CODI> (2006).
104. Chou, S.M. & Nonaka, I. Satellite cells and muscle regeneration in diseased human skeletal muscles. *J Neurol Sci* 34, 131-145 (1977).
105. Reinecke, H., Poppa, V. & Murry, C.E. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol* 34, 241-249 (2002).
106. Murry, C.E., Wiseman, R.W., Schwartz, S.M. & Hauschka, S.D. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 98, 2512-2523 (1996).
107. Reinecke, H., MacDonald, G.H., Hauschka, S.D. & Murry, C.E. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol* 149, 731-740 (2000).
108. Rubart, M., Soonpaa, M.H., Nakajima, H. & Field, L.J. Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation. *J Clin Invest* 114, 775-783 (2004).
109. Leobon, B. et al. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7808-7811 (2003).
110. Menasche, P. Skeletal myoblast transplantation for cardiac repair. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2, 21-28 (2004).
111. Chiu, R.C. Cardiac cell transplantation: the autologous skeletal myoblast implantation for myocardial regeneration. *Adv Card Surg* 11, 69-98 (1999).

112. Pouzet, B. et al. Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: can tissue processing be optimized? *Circulation* 102, III210-215 (2000).
113. Scorsin, M. et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119, 1169-1175 (2000).
114. Ghostine, S. et al. Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* 106, I131-136 (2002).
115. Tambara, K. et al. Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers. *Circulation* 108 Suppl 1, II259-263 (2003).
116. Jain, M. et al. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* 103, 1920-1927 (2001).
117. Menasche, P. et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357, 279-280 (2001).
118. Test-Tube T-Bones on the Horizon Say Researchers. *SPIEGEL ONLINE INTERNATIONAL* <http://www.spiegel.de/international/spiegel/0,1518,373796,00.html>.
119. Menasche, P. et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 41, 1078-1083 (2003).
120. Hagege, A.A. et al. Skeletal Myoblast Transplantation in Ischemic Heart Failure: Long-Term Follow-Up of the First Phase I Cohort of Patients. *Circulation* 114, I-108-113 (2006).
121. Hierlihy, A.M., Seale, P., Lobe, C.G., Rudnicki, M.A. & Megey, L.A. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett* 530, 239-243 (2002).
122. Beltrami, A.P. et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763-776 (2003).
123. Oh, H. et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12313-12318 (2003).
124. Choi, S.C., Yoon, J., Shim, W.J., Ro, Y.M. & Lim, D.S. 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells. *Exp Mol Med* 36, 515-523 (2004).
125. Hakuno, D. et al. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 105, 380-386 (2002).
126. Rangappa, S., Fen, C., Lee, E.H., Bongso, A. & Sim, E.K. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg* 75, 775-779 (2003).
127. Cai, C.L. et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 5, 877-889 (2003).
128. Laugwitz, K.L. et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433, 647-653 (2005).
129. Ferrari, G. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530 (1998).
130. Bittner, R.E. et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 199, 391-396 (1999).
131. Jackson, K.A. et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107, 1395-1402 (2001).
132. Alvarez-Dolado, M. et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-973 (2003).
133. Orlic, D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705 (2001).
134. Balsam, L.B. et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428, 668-673 (2004).
135. Murry, C.E. et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428, 664-668 (2004).
136. Nygren, J.M. et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 10, 494-501 (2004).
137. Mosca, J.D. et al. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Clin Orthop Relat Res*, S71-90 (2000).
138. Devine, S.M. et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 29, 244-255 (2001).
139. Devine, M.J., Mierisch, C.M., Jang, E., Anderson, P.C. & Balian, G. Transplanted bone marrow cells localize to fracture callus in a mouse model. *J Orthop Res* 20, 1232-1239 (2002).
140. Wang, L. et al. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp Hematol* 30, 831-836 (2002).

141. Saito, T., Kuang, J.Q., Bittira, B., Al-Khalidi, A. & Chiu, R.C. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. *Ann Thorac Surg* 74, 19-24; discussion 24 (2002).
142. Martin, B.J., Meyers, J., Kuang, J.-K. & Smith, A. Allogeneic mesenchymal stem cell engraftment in the infarcted myocardium: timing and delivery route. *Bone Marrow Transplantation* 29, S144-P577 (2002).
143. Yoon, Y.S. et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 115, 326-338 (2005).
144. Kamihata, H. et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 104, 1046-1052 (2001).
145. Strauer, B.E. et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106, 1913-1918 (2002).
146. Assmus, B. et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106, 3009-3017 (2002).
147. Schachinger, V. et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 44, 1690-1699 (2004).
148. Britten, M.B. et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 108, 2212-2218 (2003).
149. Wollert, K.C. et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364, 141-148 (2004).
150. Meyer, G.P. et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOW transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 113, 1287-1294 (2006).
151. Fernandez-Aviles, F. et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 95, 742-748 (2004).
152. Janssens, S. et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367, 113-121 (2006).
153. Schachinger, V. et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355, 1210-1221 (2006).
154. Lunde, K. et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355, 1199-1209 (2006).
155. Meluzin, J. et al. Three-, 6-, and 12-month results of autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology* In Press, Corrected Proof.
156. Tse, H.F. et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 361, 47-49 (2003).
157. Fuchs, S. et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 41, 1721-1724 (2003).
158. Perin, E.C. et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 107, 2294-2302 (2003).
159. Perin, E.C. et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 110, II213-218 (2004).
160. Hendriks, M. et al. Recovery of Regional but Not Global Contractile Function by the Direct Intramyocardial Autologous Bone Marrow Transplantation: Results From a Randomized Controlled Clinical Trial. *Circulation* 114, I-101-107 (2006).
161. Mocini, D. et al. Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *American Heart Journal* 151, 192-197 (2006).
162. Asahara, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967 (1997).
163. Shintani, S. et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103, 2776-2779 (2001).
164. Asahara, T. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85, 221-228 (1999).

165. Takahashi, T. et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5, 434-438 (1999).
166. Kalka, C. et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3422-3427 (2000).
167. Ingram, D.A. et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104, 2752-2760 (2004).
168. Ingram, D.A. et al. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* 105, 2783-2786 (2005).
169. Asahara, T. & Kawamoto, A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C572-579 (2004).
170. Hristov, M., Erl, W. & Weber, P.C. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1185-1189 (2003).
171. Valgimigli, M. et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 110, 1209-1212 (2004).
172. Roura, S. et al. Idiopathic dilated cardiomyopathy exhibits defective vascularization and vessel formation. *Eur J Heart Fail* 9, 995-1002 (2007).
173. Kawamoto, A. et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 107, 461-468 (2003).
174. Isner, J.M., Kalka, C., Kawamoto, A. & Asahara, T. Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair. *Ann N Y Acad Sci* 953, 75-84 (2001).
175. Kocher, A.A. et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7, 430-436 (2001).
176. Bartunek, J. et al. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation* 112, 1178-1183 (2005).
177. Stamm, C. et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 133, 717-725 (2007).
178. Li, Z.Q. et al. The clinical study of autologous peripheral blood stem cell transplantation by intracoronary infusion in patients with acute myocardial infarction (AMI). *Int J Cardiol* 115, 52-56 (2007).
179. Tatsumi, T. et al. Intracoronary transplantation of non-expanded peripheral blood-derived mononuclear cells promotes improvement of cardiac function in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 71, 1199-1207 (2007).
180. Kang, H.J. et al. Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial. *Circulation* 114, 1145-1151 (2006).
181. Dimmeler, S., Koyanagi, M., Urbich, C. & Zeiher, A.M. in *Cardiovascular Regeneration and Stem Cell Therapy*, Edn. 1st. (eds. A. Leri, P. Anversa & W.H. Frisman) (Blackwell Futura, Massachusetts; 2007).
182. Vasa, M. et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89, E1-7 (2001).
183. Hill, J.M. et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348, 593-600 (2003).
184. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H. & Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294-1301 (2006).
185. Farre, J. et al. FGF-4 increases in vitro expansion rate of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Growth Factors* 25, 71-76 (2007).
186. Zvaifler, N.J. et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2, 477-488 (2000).
187. Zuk, P.A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-228 (2001).
188. Toma, J.G., McKenzie, I.A., Bagli, D. & Miller, F.D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 23, 727-737 (2005).
189. Sottile, V., Halleux, C., Bassilana, F., Keller, H. & Seuwen, K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 30, 699-704 (2002).

190. Seeberger, K.L. et al. Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. *Lab Invest* 86, 141-153 (2006).
191. Gandia, C. et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells* 26, 638-645 (2008).
192. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C. & Nardi, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119, 2204-2213 (2006).
193. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-650 (1991).
194. Pittenger, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147 (1999).
195. Jiang, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49 (2002).
196. Reyes, M. et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98, 2615-2625 (2001).
197. D'Ippolito, G. et al. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 117, 2971-2981 (2004).
198. Shake, J.G. et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 73, 1919-1925; discussion 1926 (2002).
199. Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J. & Kessler, P.D. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105, 93-98 (2002).
200. Caparrelli DJ, C.S., Shake JG, Flynn EC, Meyers J, Baumgartner WA, Martin BJ. Cellular myoplasty with mesenchymal stem cells results in improved cardiac performance in a swine model of myocardial infarction. *Circulation*. 104: II-599 Abstract (2001).
201. Silva, G.V. et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 111, 150-156 (2005).
202. Tang, Y.L. et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept* 117, 3-10 (2004).
203. Tang, Y.L. et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg* 80, 229-236; discussion 236-227 (2005).
204. Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Mosca, J.D., Moorman, M. & Gerson, S.L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176, 57-66 (1998).
205. Devine, S.M., Peter, S., Martin, B.J., Barry, F. & McIntosh, K.R. Mesenchymal stem cells: stealth and suppression. *Cancer J* 7 Suppl 2, S76-82 (2001).
206. Bartholomew, A. et al. Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin in vivo. *Hum Gene Ther* 12, 1527-1541 (2001).
207. Liechty, K.W. et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6, 1282-1286 (2000).
208. Pittenger, M.F. & Martin, B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 95, 9-20 (2004).
209. Chen, S.L. et al. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 117, 1443-1448 (2004).
210. Chen, S. et al. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *J Invasive Cardiol* 18, 552-556 (2006).
211. Casteilla, L. et al. Plasticity of adipose tissue: a promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases? *Arch Mal Coeur Vaiss* 98, 922-926 (2005).
212. Calabro, P. & Yeh, E.T. Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem* 42, 63-91 (2007).
213. Weisberg, S.P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808 (2003).
214. Xu, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112, 1821-1830 (2003).
215. Caspar-Bauguil, S. et al. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett* 579, 3487-3492 (2005).

216. Fain, J.N. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm* 74, 443-477 (2006).
217. Prunet-Marcassus, B. et al. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res* 312, 727-736 (2006).
218. Katz, A.J., Tholpady, A., Tholpady, S.S., Shang, H. & Ogle, R.C. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 23, 412-423 (2005).
219. Zuk, P.A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13, 4279-4295 (2002).
220. Dicker, A. et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 308, 283-290 (2005).
221. Lee, R.H. et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 14, 311-324 (2004).
222. Izadpanah, R. et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 99, 1285-1297 (2006).
223. Wagner, W. et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33, 1402-1416 (2005).
224. Gaustad, K.G., Boquest, A.C., Anderson, B.E., Gerdes, A.M. & Collas, P. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 314, 420-427 (2004).
225. Planat-Benard, V. et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 94, 223-229 (2004).
226. Katz, A.J. et al. Serial MRI assessment of human adipose-derived stem cells (HASCS) in a murine model of reperfused myocardial infarction. *Adipocytes* (In press).
227. Mazo, M. et al. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *European Journal of Heart Failure* 10, 454-462 (2008).
228. Miyahara, Y. et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 12, 459-465 (2006).
229. Cao, Y. et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 370-379 (2005).
230. Planat-Benard, V. et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109, 656-663 (2004).
231. Rehman, J. et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109, 1292-1298 (2004).
232. Shirani, J., Berezowski, K. & Roberts, W.C. Quantitative measurement of normal and excessive (cor adiposum) subepicardial adipose tissue, its clinical significance, and its effect on electrocardiographic QRS voltage. *Am J Cardiol* 76, 414-418 (1995).
233. Sons, H.U. & Hoffmann, V. Epicardial fat cell size, fat distribution and fat infiltration of the right and left ventricle of the heart. *Anat Anz* 161, 355-373 (1986).
234. Corradi, D. et al. The ventricular epicardial fat is related to the myocardial mass in normal, ischemic and hypertrophic hearts. *Cardiovasc Pathol* 13, 313-316 (2004).
235. Rabkin, S.W. Epicardial fat: properties, function and relationship to obesity. *Obes Rev* 8, 253-261 (2007).
236. Ho, E. & Shimada, Y. Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. *Dev Biol* 66, 579-585 (1978).
237. Sacks, H.S. & Fain, J.N. Human epicardial adipose tissue: a review. *Am Heart J* 153, 907-917 (2007).
238. Iacobellis, G., Corradi, D. & Sharma, A.M. Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2, 536-543 (2005).
239. Mazurek, T. et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 108, 2460-2466 (2003).
240. Marchington, J.M. & Pond, C.M. Site-specific properties of pericardial and epicardial adipose tissue: the effects of insulin and high-fat feeding on lipogenesis and the incorporation of fatty acids in vitro. *Int J Obes* 14, 1013-1022 (1990).
241. Marchington, J.M., Mattacks, C.A. & Pond, C.M. Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: structure, foetal development and biochemical properties. *Comp Biochem Physiol B* 94, 225-232 (1989).

242. Manzella, D., Grella, R., Marfella, R., Giugliano, D. & Paolisso, G. Elevated post-prandial free fatty acids are associated with cardiac sympathetic overactivity in Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45, 1737-1738 (2002).
243. Manzella, D. et al. Role of free fatty acids on cardiac autonomic nervous system in noninsulin-dependent diabetic patients: effects of metabolic control. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2769-2774 (2001).
244. Paolisso, G. et al. Association of fasting plasma free fatty acid concentration and frequency of ventricular premature complexes in nonischemic non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Cardiol* 80, 932-937 (1997).
245. Gollasch, M. & Dubrovskaja, G. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. *Trends Pharmacol Sci* 25, 647-653 (2004).
246. Lohn, M. et al. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J* 16, 1057-1063 (2002).
247. Dietze, D. et al. Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes. *Diabetes* 51, 2369-2376 (2002).
248. Kougiyas, P. et al. Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: implication of vascular disease. *J Surg Res* 126, 121-129 (2005).
249. Lau, D.C., Dhillon, B., Yan, H., Szmitko, P.E. & Verma, S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H2031-2041 (2005).
250. Bayes-Genis, A. et al. Identification of cardiomyogenic lineage markers in untreated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 37, 4077-4079 (2005).
251. Martinez-Estrada, O.M., Munoz-Santos, Y., Julve, J., Reina, M. & Vilaro, S. Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion. *Cardiovasc Res* 65, 328-333 (2005).
252. Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1, 2315-2319 (2006).
253. Minshall, R.D., McFarland, D.C. & Doumit, M.E. Interaction of insulin-like growth factor I with turkey satellite cells and satellite cell-derived myotubes. *Domest Anim Endocrinol* 7, 413-424 (1990).
254. McFarland, D.C. Preparation of pure cell cultures by cloning. *Methods Cell Sci* 22, 63-66 (2000).
255. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408 (2001).
256. Ailhaud, G. Molecular mechanisms of adipocyte differentiation. *J Endocrinol* 155, 201-202 (1997).
257. Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I. & Bruder, S.P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64, 295-312 (1997).
258. Moon, S.H. et al. Biologic modification of ligamentum flavum cells by marker gene transfer and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine* 29, 960-965 (2004).
259. Phillips, B.W., Belmonte, N., Vernochet, C., Ailhaud, G. & Dani, C. Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 478-484 (2001).
260. Fukuda, K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs* 25, 187-193 (2001).
261. Sorm, F., Piskala, A., Cihak, A. & Vesely, J. 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* 20, 202-203 (1964).
262. Cihak, A. Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology* 30, 405-422 (1974).
263. Mohandas, T., Sparkes, R.S. & Shapiro, L.J. Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* 211, 393-396 (1981).
264. Branch, S., Francis, B.M., Brownie, C.F. & Chernoff, N. Teratogenic effects of the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in the Swiss Webster mouse. *Toxicology* 112, 37-43 (1996).
265. Jones, P.A. & Taylor, S.M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20, 85-93 (1980).
266. Bartolucci, S. et al. Effect of cytidine analogs on cell growth and differentiation on a human neuroblastoma line. *Cell Biophys* 15, 67-77 (1989).
267. Makino, S. et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103, 697-705 (1999).

268. Fukuhara, S. et al. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125, 1470-1480 (2003).
269. Nishiyama, N. et al. The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells* 25, 2017-2024 (2007).
270. Degano, I.R. et al. Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 29, 427-437 (2008).
271. Liu, J.W. et al. Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5, 826-834 (2007).
272. Heydarkhan-Hagvall, S. et al. Human adipose stem cells: a potential cell source for cardiovascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs* 187, 263-274 (2008).
273. Levenberg, S., Golub, J.S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J. & Langer, R. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 032074999 (2002).
274. DeLisser, H.M., Newman, P.J. & Albelda, S.M. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 15, 490-495 (1994).
275. Lampugnani, M.G. et al. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 118, 1511-1522 (1992).
276. Young, P.E., Baumhueter, S. & Lasky, L.A. The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood* 85, 96-105 (1995).
277. Lin, G., Finger, E. & Gutierrez-Ramos, J.C. Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues. *Eur J Immunol* 25, 1508-1516 (1995).
278. Abdala-Valencia, H. & Cook-Mills, J.M. VCAM-1 signals activate endothelial cell protein kinase Alpha via oxidation. *J Immunol* 177, 6379-6387 (2006).
279. de Groot, P.G. et al. von Willebrand factor synthesized by endothelial cells from a patient with type IIB von Willebrand disease supports platelet adhesion normally but has an increased affinity for platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3793-3797 (1989).
280. Melero, I. et al. An anti-ICAM-2 (CD102) monoclonal antibody induces immune-mediated regressions of transplanted ICAM-2-negative colon carcinomas. *Cancer Res* 62, 3167-3174 (2002).
281. Peichev, M. et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952-958 (2000).
282. Hasan, R.N., Phukan, S. & Harada, S. Differential regulation of early growth response gene-1 expression by insulin and glucose in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 988-993 (2003).
283. Khachigian, L.M. Early growth response-1: blocking angiogenesis by shooting the messenger. *Cell Cycle* 3, 10-11 (2004).
284. Liu, D., Jia, H., Holmes, D.I., Stannard, A. & Zachary, I. Vascular endothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells: KDR-mediated induction of Egr3 and the related nuclear receptors Nur77, Nurr1, and Nor1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2002-2007 (2003).
285. Primo, L. et al. Identification of CD36 molecular features required for its in vitro angiostatic activity. *FASEB J* 19, 1713-1715 (2005).
286. Kanda, S., Mochizuki, Y. & Kanetake, H. Stromal cell-derived factor-1alpha induces tube-like structure formation of endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 278, 257-262 (2003).
287. Voyta, J.C., Via, D.P., Butterfield, C.E. & Zetter, B.R. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99, 2034-2040 (1984).
288. Augustin-Voss, H.G., Smith, C.A. & Lewis, R.M. Phenotypic characterization of normal and neoplastic canine endothelial cells by lectin histochemistry. *Vet Pathol* 27, 103-109 (1990).
289. Christie, K.N. & Thomson, C. Bandeiraea simplicifolia lectin demonstrates significantly more capillaries in rat skeletal muscle than enzyme methods. *J Histochem Cytochem* 37, 1303-1304 (1989).
290. Asahara, T. et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 91, 2793-2801 (1995).
291. Takeshita, S. et al. Time course of increased cellular proliferation in collateral arteries after administration of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of lower limb vascular insufficiency. *Am J Pathol* 147, 1649-1660 (1995).

292. Michael, L.H. et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 269, H2147-2154 (1995).
293. Fishbein, M.C., Maclean, D. & Maroko, P.R. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 90, 57-70 (1978).
294. Fishbein, M.C., Maclean, D. & Maroko, P.R. The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest* 73, 843-849 (1978).
295. Friedrich, J., Apstein, C.S. & Ingwall, J.S. 31P nuclear magnetic resonance spectroscopic imaging of regions of remodeled myocardium in the infarcted rat heart. *Circulation* 92, 3527-3538 (1995).
296. Litwin, S.E., Katz, S.E., Morgan, J.P. & Douglas, P.S. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation* 89, 345-354 (1994).
297. Phinney, D.G. & Prockop, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 25, 2896-2902 (2007).
298. Kolf, C.M., Cho, E. & Tuan, R.S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9, 204 (2007).
299. Bruder, S.P., Jaiswal, N. & Haynesworth, S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64, 278-294 (1997).
300. DiGirolamo, C.M. et al. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 107, 275-281 (1999).
301. Phinney, D.G. et al. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 75, 424-436 (1999).
302. Koc, O.N. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol* 27, 1675-1681 (1999).
303. Galotto, M. et al. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* 27, 1460-1466 (1999).
304. Roura, S. et al. Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105+ mesenchymal stem cells. *Eur J Heart Fail* 8, 555-563 (2006).
305. Colter, D.C., Class, R., DiGirolamo, C.M. & Prockop, D.J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3213-3218 (2000).
306. Meliga, E., Strem, B.M., Duckers, H.J. & Serruys, P.W. Adipose-derived cells. *Cell Transplant* 16, 963-970 (2007).
307. Epstein, S.E. Influence of stenosis severity on coronary collateral development and importance of collaterals in maintaining left ventricular function during acute coronary occlusion. *Am J Cardiol* 61, 866-868 (1988).
308. Yamaguchi, J.-i. et al. Stromal Cell-Derived Factor-1 Effects on Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cell Recruitment for Ischemic Neovascularization. *Circulation* 107, 1322-1328 (2003).
309. Zhang, M. et al. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J* 21, 3197-3207 (2007).
310. Askari, A.T. et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 362, 697-703 (2003).
311. Donovan, D., Brown, N.J., Bishop, E.T. & Lewis, C.E. Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis* 4, 113-121 (2001).
312. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389-395 (2000).
313. Schaper, W. & Ito, W.D. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 79, 911-919 (1996).
314. Blanco, S., Santos, C. & Lazo, P.A. Vaccinia-related kinase 2 modulates the stress response to hypoxia mediated by TAK1. *Mol Cell Biol* 27, 7273-7283 (2007).
315. Liu, J. et al. Mild hypoxia promotes survival and proliferation of SOD2-deficient astrocytes via c-Myc activation. *J Neurosci* 26, 4329-4337 (2006).
316. Seta, K.A., Spicer, Z., Yuan, Y., Lu, G. & Millhorn, D.E. Responding to hypoxia: lessons from a model cell line. *Sci STKE* 2002, RE11 (2002).

317. Silverman, H.S., Wei, S., Haigney, M.C., Ocampo, C.J. & Stern, M.D. Myocyte adaptation to chronic hypoxia and development of tolerance to subsequent acute severe hypoxia. *Circ Res* 80, 699-707 (1997).
318. Simons, M. et al. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 105, 788-793 (2002).
319. Henry, T.D. et al. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 107, 1359-1365 (2003).
320. Semenza, G.L. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med* 54, 17-28 (2003).
321. Asahara, T. et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 92, II365-371 (1995).
322. D'Ippolito, G., Schiller, P.C., Ricordi, C., Roos, B.A. & Howard, G.A. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 14, 1115-1122 (1999).
323. George F. Muschler, H.N.C.A.B.K.A.E. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *Journal of Orthopaedic Research* 19, 117-125 (2001).
324. Fraser, J.K. et al. Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3 Suppl 1, S33-37 (2006).
325. Levesque, J.-P., Takamatsu, Y., Nilsson, S.K., Haylock, D.N. & Simmons, P.J. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 98, 1289-1297 (2001).
326. De Ugarte, D.A. et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174, 101-109 (2003).
327. Mullard, A. Proliferation without differentiation. (2008).
328. Zhou, S. et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell* 7, 335-343 (2008).
329. Shamsul, B.S., Aminuddin, B.S., Ng, M.H. & Ruszymah, B.H. Age and gender effect on the growth of bone marrow stromal cells in vitro. *Med J Malaysia* 59 Suppl B, 196-197 (2004).
330. Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C. & Kassem, M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33, 919-926 (2003).
331. Roubelakis, M.G. et al. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 16, 931-952 (2007).
332. Im, G.I., Shin, Y.W. & Lee, K.B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 13, 845-853 (2005).
333. Wang, L.-P., Liu, Ya-Ling., Kalajzic, Ivo. and Rowe, David Comparing the in vivo osteogenic potential of different progenitor cell populations. *Paper presented at the annual meeting of the Connecticut's Stem Cell Research International Symposium, TBA, Hartford Connecticut, Mar 27 (2007).*
334. Nishida, S., Endo, N., Yamagiwa, H., Tanizawa, T. & Takahashi, H.E. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab* 17, 171-177 (1999).
335. Stefan M. Mueller, J.G. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Journal of Cellular Biochemistry* 82, 583-590 (2001).
336. Elena, J.M., Kui, T., David, A.L. & Beata, L.-C. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell* 3, 379-389 (2004).
337. Stenderup, K., Justesen, J., Eriksen, E.F., Rattan, S.I. & Kassem, M. Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 16, 1120-1129 (2001).
338. Shi, Y.Y., Nacamuli, R.P., Salim, A. & Longaker, M.T. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg* 116, 1686-1696 (2005).

339. Weinzierl, K., Hemprich, A. & Frerich, B. Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. *J Craniomaxillofac Surg* 34, 466-471 (2006).
340. Moon, J.H. et al. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum Reprod* (2008).
341. Hida, N. et al. Novel Cardiac Precursor-Like Cells from Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Cells. *Stem Cells* (2008).
342. Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R.J. & Nemer, M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J* 16, 5687-5696 (1997).
343. Hiroi, Y. et al. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* 28, 276-280 (2001).
344. Packham, E.A. & David Brook, J. Interaction makes the heart grow stronger. *Trends Mol Med* 9, 407-409 (2003).
345. Xu, M. et al. Differentiation of bone marrow stromal cells into the cardiac phenotype requires intercellular communication with myocytes. *Circulation* 110, 2658-2665 (2004).
346. Muller-Borer, B.J. et al. Mechanisms controlling the acquisition of a cardiac phenotype by liver stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3877-3882 (2007).
347. Murry, C.E., Reinecke, H. & Pabon, L.M. Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol* 47, 1777-1785 (2006).
348. Misquitta, C.M., Mack, D.P. & Grover, A.K. Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium* 25, 277-290 (1999).
349. Ojamaa, K., Petrie, J.F., Balkman, C., Hong, C. & Klein, I. Posttranscriptional modification of myosin heavy-chain gene expression in the hypertrophied rat myocardium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3468-3472 (1994).
350. Xu, W. et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)* 229, 623-631 (2004).
351. Balana, B. et al. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Cell Res* 16, 949-960 (2006).
352. Liu, Y. et al. Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? *Cardiovasc Res* 58, 460-468 (2003).
353. Tomita, S. et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100, II247-256 (1999).
354. Antonitsis, P., Ioannidou-Papagiannaki, E., Kaidoglou, A. & Papakonstantinou, C. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interact CardioVasc Thorac Surg* 6, 593-597 (2007).
355. Zeng, J. et al. Co-culture with cardiomyocytes induces mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocyte-like cells and express heart development-associated genes. *Cell Res* 18, S62-S62.
356. Rangappa, S., Entwistle, J.W., Wechsler, A.S. & Kresh, J.Y. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126, 124-132 (2003).
357. Takeda, Y. et al. Can the life span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *The Journal of Gene Medicine* 6, 833-845 (2004).
358. Badorff, C. et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 107, 1024-1032 (2003).
359. Iijima, Y. et al. Beating is necessary for transdifferentiation of skeletal muscle-derived cells into cardiomyocytes. *FASEB J* 17, 1361-1363 (2003).
360. Yoon, J., Shim, W.J., Ro, Y.M. & Lim, D.S. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes. *Ann Hematol* 84, 715-721 (2005).
361. Olivetti, G. et al. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* 28, 1463-1477 (1996).
362. Matsuura, K. et al. Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J. Cell Biol.* 167, 351-363 (2004).
363. Fuchs, S. et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 37, 1726-1732 (2001).
364. Dimmeler, S. et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 108, 391-397 (2001).

365. Crabtree, B. & Subramanian, V. Behavior of endothelial cells on Matrigel and development of a method for a rapid and reproducible in vitro angiogenesis assay. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 43, 87-94 (2007).
366. Rehman, J., Li, J., Orschell, C.M. & March, K.L. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107, 1164-1169 (2003).
367. Kinnaird, T. et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 94, 678-685 (2004).
368. Schinkothe, T., Bloch, W. & Schmidt, A. In vitro secreting profile of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 17, 199-206 (2008).
369. Nagaya, N. et al. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in a Rat Model of Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 112, 1128-1135 (2005).
370. Sadat, S. et al. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 674-679 (2007).
371. Uemura, R., Xu, M., Ahmad, N. & Ashraf, M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res* 98, 1414-1421 (2006).
372. Alten, J.A. et al. Prevention of hypovolemic circulatory collapse by IL-6 activated Stat3. *PLoS ONE* 3, e1605 (2008).
373. Saitoh, T., Nakajima, T. & Kawahara, K. Possible involvement of apoptotic death of myocytes in left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Jpn J Physiol* 53, 247-252 (2003).
374. Cheng, W. et al. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res* 226, 316-327 (1996).
375. Colucci, W.S. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol* 80, 15L-25L (1997).
376. Swynghedauw, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 79, 215-262 (1999).
377. Chimenti, S., Carlo, E., Masson, S., Bai, A. & Latini, R. Myocardial infarction: animal models. *Methods Mol Med* 98, 217-226 (2004).
378. Selye, H., Bajusz, E., Grasso, S. & Mendell, P. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* 11, 398-407 (1960).
379. Orlic, D. et al. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci* 938, 221-229; discussion 229-230 (2001).
380. Kawamoto, A. et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103, 634-637 (2001).
381. Etzion, S. et al. Cellular cardiomyoplasty of cardiac fibroblasts by adenoviral delivery of MyoD ex vivo: an unlimited source of cells for myocardial repair. *Circulation* 106, 1125-1130 (2002).
382. Agbulut, O. et al. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol* 44, 458-463 (2004).
383. Hou, M. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells from human bone marrow improves damaged heart function in rats. *Int J Cardiol* 115, 220-228 (2007).
384. Gandia, C. et al. Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction. *Stem Cells* 26, 638-645 (2008).
385. Miranville, A. et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110, 349-355 (2004).
386. Tang, J., Xie, Q., Pan, G., Wang, J. & Wang, M. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg* 30, 353-361 (2006).
387. Wang, X. et al. The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells* 24, 1779-1788 (2006).
388. Jaquet, K. et al. Reduction of myocardial scar size after implantation of mesenchymal stem cells in rats: what is the mechanism? *Stem Cells Dev* 14, 299-309 (2005).
389. Matsushita, K. et al. The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *J Dent Res* 79, 1596-1603 (2000).
390. Buscher, D., Bayes-Genis, A., Roura, S., Farre, J. & Prat-Vidal, C. Población de células madre adultas derivadas de tejido adiposo cardíaco y su uso en regeneración cardíaca in Oficina Española de Patentes y Marcas. (Genetrix S.L. & Fundació Privada Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) P200702205 Spain; 2007).

391. Pierelli, L. et al. CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells. *Leuk Lymphoma* 42, 1195-1206 (2001).
392. Fonsatti, E. & Maio, M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* 2, 18 (2004).
393. Brummendorf, T. & Rathjen, F.G. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile* 2, 963-1108 (1995).
394. Imhof, B.A. & Dunon, D. Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol* 58, 345-416 (1995).
395. Watt, S.M., Gschmeissner, S.E. & Bates, P.A. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma* 17, 229-244 (1995).
396. Patey, N. et al. Intercellular adhesion molecule-3 on endothelial cells. Expression in tumors but not in inflammatory responses. *Am J Pathol* 148, 465-472 (1996).
397. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B. & Seed, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303-1313 (1990).
398. Lesley, J. & Hyman, R. CD44 structure and function. *Front Biosci* 3, d616-630 (1998).
399. Piazza, T. et al. Internalization and recycling of ALCAM/CD166 detected by a fully human single-chain recombinant antibody. *J Cell Sci* 118, 1515-1525 (2005).
400. Swart, G.W. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol* 81, 313-321 (2002).
401. Neil A. Barclay, S.K.A.L., Andrew J. McKnight The Leucocyte Antigen Factsbook, Edn. 1st. (1993).
402. Trowbridge, I.S. & Thomas, M.L. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12, 85-116 (1994).
403. Barclay, A.N. & McCall, M.N. CD45; from alloantigen to mapping of restricted epitopes using recombinant soluble CD45 isoforms. *Biochem Soc Trans* 20, 161-164 (1992).
404. Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I. & May, W.S. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13 (1996).
405. Fackler, M.J., Krause, D.S., Smith, O.M., Civin, C.I. & May, W.S. Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood* 85, 3040-3047 (1995).
406. Ashman, L.K., Cambareri, A.C., To, L.B., Levinsky, R.J. & Juttner, C.A. Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* 78, 30-37 (1991).
407. Lerner, N.B. et al. Monoclonal antibody YB5.B8 identifies the human c-kit protein product. *Blood* 77, 1876-1883 (1991).
408. Mayrhofer, G., Gadd, S.J., Spargo, L.D. & Ashman, L.K. Specificity of a mouse monoclonal antibody raised against acute myeloid leukaemia cells for mast cells in human mucosal and connective tissues. *Immunol Cell Biol* 65 (Pt 3), 241-250 (1987).
409. Galli, S.J., Zsebo, K.M. & Geissler, E.N. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* 55, 1-96 (1994).
410. Landmann, R., Muller, B. & Zimmerli, W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes Infect* 2, 295-304 (2000).
411. Kim, J.I. et al. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *J Biol Chem* 280, 11347-11351 (2005).
412. Mestas, J. & Hughes, C.C.W. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol* 172, 2731-2738 (2004).
413. Masson, N.M. et al. Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291, G45-54 (2006).
414. Nakamura, Y. et al. Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *British Journal of Dermatology* 154, 1062-1070 (2006).
415. Abeyasinghe, H.R. et al. THY1 expression is associated with tumor suppression of human ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 143, 125-132 (2003).
416. Brivanlou, A.H. & Darnell, J.E., Jr. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295, 813-818 (2002).
417. Heikinheimo, M., Scandrett, J.M. & Wilson, D.B. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Dev Biol* 164, 361-373 (1994).
418. Arceci, R.J., King, A.A., Simon, M.C., Orkin, S.H. & Wilson, D.B. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 13, 2235-2246 (1993).
419. Di Lisi, R. et al. Combinatorial cis-Acting Elements Control Tissue-specific Activation of the Cardiac Troponin I Gene in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 25371-25380 (1998).

420. He, Q., Mendez, M. & LaPointe, M.C. Regulation of the human brain natriuretic peptide gene by GATA-4. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E50-57 (2002).
421. Molkentin, J.D., Kalvakolanu, D.V. & Markham, B.E. Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4947-4957 (1994).
422. Oka, T. et al. Cardiac-Specific Deletion of Gata4 Reveals Its Requirement for Hypertrophy, Compensation, and Myocyte Viability. *Circ Res* 98, 837-845 (2006).
423. Kobayashi, S. et al. GATA4 plays as a regulator of gene expression to maintain normal cardiac homeostatic remodeling in the unstressed adult heart by promoting cell survival and inhibiting programmed cell death. *Faseb J.* (2008).
424. Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkela, R. & Ruskoaho, H. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res* 63, 196-207 (2004).
425. Molkentin, J.D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 275, 38949-38952 (2000).
426. Heineke, J. et al. Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart. *J Clin Invest* 117, 3198-3210 (2007).
427. Lints, T.J., Parsons, L.M., Hartley, L., Lyons, I. & Harvey, R.P. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119, 969 (1993).
428. Kasahara, H., Bartunkova, S., Schinke, M., Tanaka, M. & Izumo, S. Cardiac and extracardiac expression of Csx/Nkx2.5 homeodomain protein. *Circ Res* 82, 936-946 (1998).
429. Stanley, E.G. et al. Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene Nkx2-5. *Int J Dev Biol* 46, 431-439 (2002).
430. Kasahara, H. et al. Nkx2.5 homeoprotein regulates expression of gap junction protein connexin 43 and sarcomere organization in postnatal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 35, 243-256 (2003).
431. Teunissen, B.E. et al. Analysis of the rat connexin 43 proximal promoter in neonatal cardiomyocytes. *Gene* 322, 123-136 (2003).
432. Oka, T., Xu, J. & Molkentin, J.D. Re-employment of developmental transcription factors in adult heart disease. *Semin Cell Dev Biol* 18, 117-131 (2007).
433. Toko, H. et al. Csx/Nkx2-5 is required for homeostasis and survival of cardiac myocytes in the adult heart. *J Biol Chem* 277, 24735-24743 (2002).
434. Takeuchi, J.K. et al. Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis. *Development* 130, 5953-5964 (2003).
435. Horb, M.E. & Thomsen, G.H. Tbx5 is essential for heart development. *Development* 126, 1739-1751 (1999).
436. Hiroi, Y. et al. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* 28, 276-280 (2001).
437. Hatcher, C.J., Diman, N.Y., McDermott, D.A. & Basson, C.T. Transcription factor cascades in congenital heart malformation. *Trends Mol Med* 9, 512-515 (2003).
438. Moretti, A. et al. Multipotent embryonic islet1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 127, 1151-1165 (2006).
439. Sun, Y. et al. Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Dev Biol* 304, 286-296 (2007).
440. Lin, L. et al. Beta-catenin directly regulates Islet1 expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9313-9318 (2007).
441. Young, P., Ferguson, C., Banuelos, S. & Gautel, M. Molecular structure of the sarcomeric Z-disk: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of alpha-actinin. *EMBO J* 17, 1614-1624 (1998).
442. Luther, P.K. Three-dimensional reconstruction of a simple Z-band in fish muscle. *J. Cell Biol.* 113, 1043-1055 (1991).
443. López, L.L. & Fickett, J.W. in *Muscle-specific regulation of transcription: Catalogue of Regulatory Elements* (University of Pennsylvania, 1998).
444. Barbato, J.C., Huang, Q.-Q., Hossain, M.M., Bond, M. & Jin, J.-P. Proteolytic N-terminal Truncation of Cardiac Troponin I Enhances Ventricular Diastolic Function. *J. Biol. Chem.* 280, 6602-6609 (2005).

445. Baker, D.L., Dave, V., Reed, T., Misra, S. & Periasamy, M. A novel E box/AT-rich element is required for muscle-specific expression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA2) gene. *Nucleic Acids Res* 26, 1092-1098 (1998).
446. Arai, M., Otsu, K., MacLennan, D.H. & Periasamy, M. Regulation of sarcoplasmic reticulum gene expression during cardiac and skeletal muscle development. *Am J Physiol* 262, C614-620 (1992).
447. Genteski-Hamblin, A.M., Greeb, J. & Shull, G.E. A novel Ca²⁺ pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase gene. Identification of cDNAs encoding Ca²⁺ and other cation-transporting ATPases using an oligonucleotide probe derived from the ATP-binding site. *J Biol Chem* 263, 15032-15040 (1988).
448. Lytton, J., Zarain-Herzberg, A., Periasamy, M. & MacLennan, D.H. Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* 264, 7059-7065 (1989).
449. Zarain-Herzberg, A., MacLennan, D.H. & Periasamy, M. Characterization of rabbit cardiac sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene. *J Biol Chem* 265, 4670-4677 (1990).
450. Lodish, H.F. et al. Molecular cell biology. (W.H. Freeman and Company, 2004).
451. Presley, C.A. et al. Bone Marrow Connexin-43 Expression Is Critical for Hematopoietic Regeneration After Chemotherapy. *Cell Communication & Adhesion* 12, 307 - 317 (2005).
452. Boengler, K., Schulz, R. & Heusch, G. Connexin 43 signaling and cardioprotection. *Heart*, hrt.2005.066878 (2005).
453. Fu, M. et al. Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene* 315, 33-41 (2003).
454. Baron, V., Duss, S., Rhim, J. & Mercola, D.A.N. Antisense to the Early Growth Response-1 Gene (Egr-1) Inhibits Prostate Tumor Development in TRAMP Mice. *Ann NY Acad Sci* 1002, 197-216 (2003).
455. Khachigian, L.M. et al. Egr-1 is Activated in Endothelial Cells Exposed to Fluid Shear Stress and Interacts With a Novel Shear-Stress-Response Element in the PDGF A-Chain Promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2280-2286 (1997).
456. Khachigian, L.M. & Collins, T. Inducible expression of Egr-1-dependent genes. A paradigm of transcriptional activation in vascular endothelium. *Circ Res* 81, 457-461 (1997).
457. Khachigian, L.M., Lindner, V., Williams, A.J. & Collins, T. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* 271, 1427-1431 (1996).
458. Liu, D., Jia, H., Holmes, D.I.R., Stannard, A. & Zachary, I. Vascular Endothelial Growth Factor-Regulated Gene Expression in Endothelial Cells: KDR-Mediated Induction of Egr3 and the Related Nuclear Receptors Nur77, Nurr1, and Nor1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2002-2007 (2003).
459. Iiyama, K. et al. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* 85, 199-207 (1999).
460. Mueller, J.P. et al. Porcine vascular cell adhesion molecule (VCAM) mediates endothelial cell adhesion to human T cells. Development of blocking antibodies specific for porcine VCAM. *Transplantation* 60, 1299-1306 (1995).
461. Chin, J.E. et al. Airway recruitment of leukocytes in mice is dependent on alpha4-integrins and vascular cell adhesion molecule-1. *Am J Physiol* 272, L219-229 (1997).
462. Wu, T.C. The Role of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Tumor Immune Evasion. *Cancer Res* 67, 6003-6006 (2007).
463. Cook-Mills, J.M. & Deem, T.L. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol* 77, 487-495 (2005).
464. Matheny, H.E., Deem, T.L. & Cook-Mills, J.M. Lymphocyte migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 signaling via endothelial cell NADPH oxidase. *J Immunol* 164, 6550-6559 (2000).
465. Lampugnani, M.G. et al. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* 118, 1511-1522 (1992).
466. Gotsch, U. et al. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci* 110, 583-588 (1997).
467. Vestweber, D. VE-Cadherin: The Major Endothelial Adhesion Molecule Controlling Cellular Junctions and Blood Vessel Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 223-232 (2008).
468. Jaffe, E.A., Hoyer, L.W. & Nachman, R.L. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 52, 2757-2764 (1973).

469. Nachman, R.L., Jaffe, E.A. & Weksler, B.B. Immunoinhibition of ristocetin-induced platelet aggregation. *J Clin Invest* 59, 143-148 (1977).
470. Sadler, J.E. Biochemistry and genetics of Von Willebrand factor. *Annual Review of Biochemistry* 67, 395-424 (1998).
471. Cheresch, D.A. Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6471-6475 (1987).
472. Gangenahalli, G.U. et al. Hematopoietic Stem Cell Antigen CD34: Role in Adhesion or Homing. *Stem Cells and Development* 15, 305-313 (2006).
473. Healy, L. et al. The Stem Cell Antigen CD34 Functions as a Regulator of Hemopoietic Cell Adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 12240-12244 (1995).
474. Fina, L. et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75, 2417-2426 (1990).
475. Satterthwaite, A.B., Burn, T.C., Le Beau, M.M. & Tenen, D.G. Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics* 12, 788-794 (1992).
476. Uchida, N. et al. The Characterization, Molecular Cloning, and Expression of a Novel Hematopoietic Cell Antigen From CD34+ Human Bone Marrow Cells. *Blood* 89, 2706-2716 (1997).
477. DeLisser, H.M. et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 151, 671-677 (1997).
478. Newman, P.J. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 99, 3-8 (1997).
479. Li, R. et al. A peptide from ICAM-2 binds to the leukocyte integrin CD11a/CD18 and inhibits endothelial cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 268, 17513-17518 (1993).
480. Corbeil, D. et al. The Human AC133 Hematopoietic Stem Cell Antigen Is also Expressed in Epithelial Cells and Targeted to Plasma Membrane Protrusions. *J. Biol. Chem.* 275, 5512-5520 (2000).
481. Shmelkov, S.V., St Clair, R., Lyden, D. & Rafii, S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 715-719 (2005).
482. Tandon, N.N., Kralisz, U. & Jamieson, G.A. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J. Biol. Chem.* 264, 7576-7583 (1989).
483. Nicholson, A.C., Frieda, S., Pearce, A. & Silverstein, R.L. Oxidized LDL Binds to CD36 on Human Monocyte-Derived Macrophages and Transfected Cell Lines : Evidence Implicating the Lipid Moiety of the Lipoprotein as the Binding Site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 269-275 (1995).
484. Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Suarez, Y., Lasuncion, M.A. & Vega, M.A. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J. Lipid Res.* 39, 777-788 (1998).
485. Hajri, T., Han, X.X., Bonen, A. & Abumrad, N.A. Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *J Clin Invest* 109, 1381-1389 (2002).
486. Pravenec, M. et al. Transgenic expression of CD36 in the spontaneously hypertensive rat is associated with amelioration of metabolic disturbances but has no effect on hypertension. *Physiol Res* 52, 681-688 (2003).
487. Febbraio, M. et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 105, 1049-1056 (2000).
488. Watt, S.M. & Forde, S.P. The central role of the chemokine receptor, CXCR4, in haemopoietic stem cell transplantation: will CXCR4 antagonists contribute to the treatment of blood disorders? *Vox Sang* 94, 18-32 (2008).
489. Bleul, C.C., Fuhlbrigge, R.C., Casasnovas, J.M., Aiuti, A. & Springer, T.A. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184, 1101-1109 (1996).
490. Zheng, H., Fu, G., Dai, T. & Huang, H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 50, 274-280 (2007).
491. Kohn, S., Nagy, J.A., Dvorak, H.F. & Dvorak, A.M. Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest* 67, 596-607 (1992).
492. Pepper, M.S., Ferrara, N., Orci, L. & Montesano, R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 902-906 (1991).

493. Gerber, H.P. et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5, 623-628 (1999).
494. Dimmeler, S., Dernbach, E. & Zeiher, A.M. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 477, 258-262 (2000).
495. Connolly, D.T. et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84, 1470-1478 (1989).
496. Frater-Schroder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P. & Bohlen, P. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5277-5281 (1987).
497. Battagay, E.J., Rupp, J., Iruela-Arispe, L., Sage, E.H. & Pech, M. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol* 125, 917-928 (1994).
498. Hsieh, P.C., Davis, M.E., Gannon, J., MacGillivray, C. & Lee, R.T. Controlled delivery of PDGF-BB for myocardial protection using injectable self-assembling peptide nanofibers. *J Clin Invest* 116, 237-248 (2006).
499. Edelberg, J.M. et al. PDGF mediates cardiac microvascular communication. *J Clin Invest* 102, 837-843 (1998).
500. Gospodarowicz, D., Abraham, J.A. & Schilling, J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7311-7315 (1989).
501. Gualandris, A. & Presta, M. Transcriptional and posttranscriptional regulation of urokinase-type plasminogen activator expression in endothelial cells by basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 162, 400-409 (1995).
502. Hasegawa, T., Kimura, A., Miyataka, M., Inagaki, M. & Ishikawa, K. Basic fibroblast growth factor increases regional myocardial blood flow and salvages myocardium in the infarct border zone in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Angiology* 50, 487-495 (1999).
503. Miyataka, M., Ishikawa, K. & Katori, R. Basic fibroblast growth factor increased regional myocardial blood flow and limited infarct size of acutely infarcted myocardium in dogs. *Angiology* 49, 381-390 (1998).
504. Watanabe, E. et al. Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis in the infarcted porcine heart. *Basic Res Cardiol* 93, 30-37 (1998).
505. Fan, Y. et al. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 90-98 (2008).
506. Hirota, H. et al. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* 97, 189-198 (1999).
507. Hilfiker-Kleiner, D. et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circ Res* 95, 187-195 (2004).
508. Yamauchi-Takahara, K. Gp130-mediated pathway and left ventricular remodeling. *J Card Fail* 8, S374-378 (2002).
509. Yamauchi-Takahara, K. & Kishimoto, T. A novel role for STAT3 in cardiac remodeling. *Trends Cardiovasc Med* 10, 298-303 (2000).
510. Matsushita, K. et al. Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. *Lab Invest* 85, 1210-1223 (2005).
511. Smart, N. et al. IL-6 induces PI 3-kinase and nitric oxide-dependent protection and preserves mitochondrial function in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 69, 164-177 (2006).
512. Cozzolino, F. et al. Interleukin 1 is an autocrine regulator of human endothelial cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6487-6491 (1990).
513. Voronov, E. et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2645-2650 (2003).
514. Kawaguchi, M. et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human gastric cancer cells by interleukin-1beta. *Surgery* 136, 686-692 (2004).
515. Tanaka, T. et al. Induction of VEGF gene transcription by IL-1 beta is mediated through stress-activated MAP kinases and Sp1 sites in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32, 1955-1967 (2000).
516. Torre-Perez, N. et al. Migration and differentiation of human umbilical cord stem cells after heart injury in chicken embryos. *Stem Cells and Development* (Epub ahead of print).

“Una de les supersticions de l’èsser humà
és creure que la virginitat és una virtut”

Voltaire

AGRAÏMENTS

Primer de tot m'agradaria agrair als meus pares per haver-m'ho donat tot i més en aquesta vida. A la iaia Nati (en pau descansi) i a la iaia Dolors les millors iaies del món. Als meus directors de tesi, Francesc Gòdia, Toni Bayés i Santi Roura per ajudar-me en tot el que he necessitat en aquesta tesi i complementar-se tan bé en la meva formació, en aquest aspecte estic segur que he sigut el becarí més afortunat.

Als companys i amics del grup Cris (ara empresària, espero que la fama en el món de l'art no et canviï, ets un sol), Santi (per fi m'has fet tiet!!ja era hora!!!jeje), Càrol Gálvez (aiiii trugeta) i Càrol Soler, que es pot dir quan estàs envoltat de tres post-docs i una veterinària collonuda que a sobre m'han fet passar les millors estones al laboratori? Gràcies, de veritat.

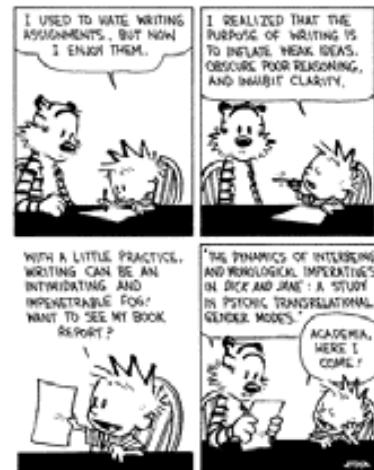
A l'Anna, Cristina i Leif per compartir molt més que un espai reduït. Roseeeerrrr no, no m'oblido de tu, sobretot no canviïs mai, el poc que conec de tu fa caure la baba!!

A en Juli "bésame mucho", les nostres vides no paren de creuar-se, universitat i dos laboratoris, i espero tenir-te sempre a prop, divagar, ajudar-nos tant dins com fora del labo, parlar de... bé, tot allò que ja saps.

kurta, rutzzi, dani "papichulo", joani, david padró "el buyas", monta "mr. güevos", joan "mi reino por un gramo de caballo" i xavi "terminator" amb els qui fa més de 20 anys que comparteixo... bé tot, amb vosaltres un es sent a lo Liverpool, "you'll never walk alone!". A la resta del "grupi", thaïs (felicitats mare! la Mia és preciosa!), gise ("la perla"), cris, jana, mariona, toni, clareta, canals, txipi, astrid, jouni (llumi pels profans), eli, ricard, ricardito per tants i tants moments en tot aquest temps i pels que queden!!! roger santmiquel (gran amic, millor persona i l'espanyol a segona), lídia, poyo, Agnès (holeeee!!!), montse mercader, ruth, nathalie "glowing girl", Iñaki Landa (tengo tu vespa en mi garage!), Borja, Palu, Anna, Amaia Torrealday (gràcies per ser com ets, per ensenyar-me tant, gràcies pels cops de mà amb la bibliografia, per sacrificar tant per cuidar la boiri i mil coses més!!), Angelines (per acollir-me a casa com si fos la meva i tractar-me com un fill més).

A Massive Party, de les poques activitats lúdiques que he tingut durant la redacció d'aquesta tesi, i al Samba Brasil, pels millors mojitos i altres coses no tan bones, però igual d'espectaculars! Gràcies als senyors Bacardi, Barceló, Negrita, Cacique, M i F per distorsionar la realitat i fer-la tant divertida!! ahhhhhh i al senyor Heinz, per fer un invent collonut!!!

Angelo Perani i Mary Anne McEvoy, el primer per donar-me l'oportunitat de fer les pràctiques a Lonza Biologics, acollir-me entre els anglesos i permetre'm fer els meus primers experiments i la segona, per ensenyar-me quasi tot el que se sobre cultius



cel·lulars, la seva rigurositat (fins i tot em feia exàmens de treball a la campana amb cronòmetre) em va arribar a desesperar, ara l'agraeixo.

A JJ Cairó, per donar-me l'oportunitat d'entrar a formar part de MAbs, algunes de les seves crítiques encara em ressonen al cap. A l'Albert Soley amb qui vaig compartir taula i el meu primer projecte (te'n recordes quan fèiem les minisondes d'oxigen a ma!!), al Martí (espero que estiguis bé allà Singapur), Sandra Juanola, Joan, Rosi Tello (una mama al labo!), Enric Sarró (home casat, home...), Ernyyyyyy (a veure quan em deixes jugar a la wii!tu ja tens el mando de sèrie!).

A Mercé Martí per iniciar-me en el confo, la seva dolçor i tota l'ajuda tant a l'autònoma com ara al PRBB, i a les seves nenes (esther, lola i cristina) per donar-me tants cops de ma com consells he necessitat, sou unes màquines de les immunos!

A Esther Peña, per ser una gran investigadora (n'hi ha molts que si més no s'ho creuen) i barallar-nos amb l'SP2, però sobretot per ser íntegre i una gran persona (no n'hi ha gaires!). A Berta Raposo, per convertir les citometries en un moment esperat, desitjo que tot et vagi de conya per los madriles. A la Marta, Judith, Blanca, Xevi, Sílvia, Paula, Javier, Pablo, Àngel, Laura, Olivier, Anna, Sandra, Nia, Montse... i a tots aquells que ens anem creuant per l'ICCC, gràcies per aquests petits moments.

A Ana Armiñan, Càrol Gandia (sort amb les tesis!!!), Elisa Lledó i Pilar Sepúlveda del Centre d'investigació Príncipe Felipe de València per tot el suport en el model de rata, ecocardiografies i els cocultius, sense vosaltres hagués estat literalment impossible!

Un altre cop a Càrol Soler, gràcies per les immunos, per la paciència, per la famosa frase del Pau que fa que tot el que s'hagi d'entregar a un jefe sigui més fàcil, per ser tan maca i tot bondat, per compartir un parell de raids, per deixar-me el Patxi, i sobretot i ningú ho sap millor que tu, gràcies per tot el que envolta els ratolins!

A la meva cosina Laia, ens veiem poc però sempre se que estàs allà per molt més que per descontracturar-me l'esquena o el cap, molta sort en la teva nova vida a Tailàndia (vull un vídeo de l'espectacle amb les pilotes de pingpong!!).

Marta i Javi gràcies per estar al meu costat sempre que ho he necessitat! i als wizards of light, no podíem tenir millors veïns!

Sòniaaaaaaa gràcies per les llargues converses a cultius, compartir al campana per que se m'havia oblidat reservar-la (vaja sempre),...algun dia trobaràs al teu currele!

A la biblioteca virtual de la universitat d'Utrecht i al PAPIS, gràcies per la seva generositat proporcionant tot tipus de bibliografia de forma tant generosa (encara que ells no ho sàpiguen!jeje)

Però sobretot a TU, sí, TU, la petita per donar-me tot l'amor que un pot sentir, per estar al meu costat, per ser complicada, per fer-me riure, per aguantar-me (que no és fàcil), pels viatges, pels somnis, per no saber cuinar que em permet fer-ho a mi i escaquejar-me de tantes altres coses! Moltes, moltes gràcies, sempre creuré en tu, por que tu lo vales!!

A tots, fer-vos un favor...

somrieu!!!!



... vaaa, que ningú mira!!!

Us estimo!!!

Boira i Elliot, sigueu on sigueu, sempre us tinc al cap!

Si m'he deixat algú, ho sento, això és més complicat que fer una tesi!!

“Hauríem d'utilitzar el passat
com a trampolí i no com a sofà”

Harold McMillan

PUBLICACIONS

Les publicacions han sigut substituïdes per les referències per evitar conflictes relacionats amb la seva difusió gratuïta:

- Hemosiderin deposits confounds tracking of iron-oxide-labeled stem cells: an experimental study.
Rigol M, Solanes N, Roqué M, Farré J, Batlle M, Roura S, Bellera N, Prat-Vidal C, Sionis A, Ramírez J, Sitges M, Sanz G, Bayés-Genís A, Heras M.
Transplant Proc. 2008 Dec;40(10):3619-22.
- Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits.
Prat-Vidal C, Roura S, Farré J, Gálvez C, Llach A, Molina CE, Hove-Madsen L, Garcia J, Cinca J, Bayes-Genis A.
Transplant Proc. 2007 Sep;39(7):2434-7.
- FGF-4 increases in vitro expansion rate of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells.
Farré J, Roura S, Prat-Vidal C, Soler-Botija C, Llach A, Molina CE, Hove-Madsen L, Cairó JJ, Gòdia F, Bragós R, Cinca J, Bayes-Genis A.
Growth Factors. 2007 Apr;25(2):71-6.
- Idiopathic dilated cardiomyopathy exhibits defective vascularization and vessel formation.
Roura S, Planas F, Prat-Vidal C, Leta R, Soler-Botija C, Carreras F, Llach A, Hove-Madsen L, Pons Lladó G, Farré J, Cinca J, Bayes-Genis A.
Eur J Heart Fail. 2007 Oct;9(10):995-1002. Epub 2007 Aug 27.
- Chimerism and microchimerism of the human heart: evidence for cardiac regeneration.
Bayes-Genis A, Roura S, Prat-Vidal C, Farré J, Soler-Botija C, de Luna AB, Cinca J.
Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2007 Feb;4 Suppl 1:S40-5.
- The proarrhythmic antihistaminic drug terfenadine increases spontaneous calcium release in human atrial myocytes.
Hove-Madsen L, Llach A, Molina CE, Prat-Vidal C, Farré J, Roura S, Cinca J.
Eur J Pharmacol. 2006 Dec 28;553(1-3):215-21. Epub 2006 Sep 23.
- Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105+ mesenchymal stem cells.
Roura S, Farré J, Soler-Botija C, Llach A, Hove-Madsen L, Cairó JJ, Gòdia F, Cinca J, Bayes-Genis A.
Eur J Heart Fail. 2006 Oct;8(6):555-63. Epub 2006 Feb 28.
- Identification of cardiomyogenic lineage markers in untreated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.
Bayes-Genis A, Roura S, Soler-Botija C, Farré J, Hove-Madsen L, Llach A, Cinca J.
Transplant Proc. 2005 Nov;37(9):4077-9.