

f-FC
tecnología
79
1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICA
DURANTE EL INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO**

Memoria de Título
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular



por

Patricia Alejandra Luz Crawford

Mayo, 2007
Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dra. Paulette Conget
Patrocinante: Dr. Miguel Allende

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
MEMORIA DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Ciencias de la Facultad de Ciencias que la Memoria de Título presentada por la candidata.

PATRICIA ALEJANDRA LUZ CRAWFORD

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Memoria de Título como requisito para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa de la Memoria rendido el día 16 de 11 de 2007.

Director de Memoria de Título:

Dr. (a) PAULETE COMGET

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. (a) Dr. Z. Linares

Dr. (a) María Rosa Bono

Dr. (a)

Dr. (a)



AGRADECIMIENTOS

Es difícil comenzar las líneas que irán forjando el término de una etapa, de lo que nació como un sueño y finalmente se concreto aquí en las líneas que seguirán este escrito. El pensar en todas las personas que pasaron, quienes quedaron y quienes me apoyaron incondicionalmente durante mi vida en la Universidad me recuerda que pese a los malos momentos que pasamos, las buenas y malas personas que conocimos siempre valieron la pena, por que durante estos años aprendí y conocí a personas maravillosas que hicieron que tanto la memoria, estudios maratónicos y los momentos de mayor angustia siempre valieran la pena.

No puedo dejar de nombrar dentro de ellas al principal gestor de mi tesis Felipe Apablaza alias el "gurú", no tengo palabras para agradecer todo lo que hiciste por mí, por mi memoria y por ser siempre tan leal, buen compañero, buen cumbianchero, regetonero y por sobre todas las cosas un EXCELENTE amigo.

Carolin Cortes, eres una de mis amigas mas queridas y una de las más importantes que conocí en la Universidad, nunca olvidaré todas las noches maratónicas de físico-química, los laboratorios e inclusive de la memoria de título...gracias por tu apoyo durante la realización de mi tesis y por estar conmigo en buenos y malos momentos.

Somozin, Daniel, July, Ara, Nico...con quienes me reí, lloré y compartí la mayor parte del tiempo en el laboratorio realizando mi tesis...Daniel me debes un kumite y Somozin felicidades por tu hijo...

Karincilla, amiga gracias por estar ahí siempre conmigo, por ser la leal amiga que eres, por todos los jugos que hemos dado y por que siempre estuviste conmigo y me apoyaste en los momentos más difíciles...



Karinita, Ivonne, Danielito A, Erikita, Juanu, Fredito y en general a todos mis amigos de la U...gracias por ser los buenos amigos que siempre han sido, Daniel...los patiazos seguirán pasando, cosas que a nadie mas que a mi le pueden suceder jiji.

Taty, las primas, Heikel, Naty, Lore, Maty , Pipe, Pablo y a todos mis amigos gracias...los quiero mucho.

A la Dra Paulette Conget que me apoyó y me ayudó durante la realización de la memoria de título.

Y en especial el agradecimiento mas grande es para mi familia, tíos, Mama Yola, Pito, Benja, Pablo, Andy mi mamita querida y a mi papá...que es a quien más le dedico este título, todo lo que soy, sé y tengo es gracias a él...la persona más sabia y a quien más admiro en la vida.

Y desde las estrellas a Dios y a quien siempre me apoyo en todo momento desde más allá de los sentidos...

Lo difícil no es imposible...só<lo basta intentarlo y pensar que los fracasos no existen sino que los pequeños y grandes desafíos.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	10
Objetivo General	10
Objetivos Específicos	10
CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO	11
Tipo estudio	11
Modelo animal	11
Diseño experimental	11
Grupos experimentales y tamaño muestral	13
Consideraciones bioéticas	13
MATERIALES Y EQUIPOS	14
REACTIVOS	15
METODOLOGÍA	17
Obtención y cultivo de MSC a partir de médula ósea de rata	17
Criopreservación de MSC de rata	18
Recuentos celulares	18
Número de células nucleadas	18
Número de células totales	19
Infarto agudo al miocardio	19
Obtención y cultivo de células mononucleadas a partir de sangre periférica de rata	20
Diferenciación <i>in vitro</i> de MSC de rata	21
Diferenciación adipogénica	21



Inducción de la diferenciación adipogénica	21
Tinción con Oil Red O	21
Diferenciación osteogénica	22
Inducción diferenciación osteogénica	22
Tinción Alizarin Red	22
Análisis molecular de MSC de rata	23
Extracción de RNA	23
Cuantificación de RNA	24
Tratamiento con DNAsa	24
Transcripción reversa	25
PCR tiempo real	25
Análisis de amplicones	27
Análisis de Tm	27
Electroforesis en gel de agarosa	27
Análisis estadístico	28
RESULTADOS	
Caracterización molecular y celular de MSC derivadas de médula ósea de rata	29
Evaluación de la presencia de MSC en sangre periférica de ratas infartadas quirúrgicamente	33
Realización de IAM quirúrgico	33
Obtención y caracterización de células mononucleadas provenientes de sangre periférica de ratas sanas, sham e infartadas	35
Evaluación de la presencia de MSC a diferentes tiempos post IAM	37
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	42
PROYECCIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44



ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Esquematización del potencial de autorrenovación, diferenciación y plasticidad de las MSC	3
FIGURA 2: Estrategias de cardiomioplastia en función de las rutas de administración de las células	4
FIGURA 3: Esquematización de la movilización de células desde la médula ósea	7
FIGURA 4: Diseño experimental	12
FIGURA 5: Morfología de MSC	29
FIGURA 6: MSC expresan ASMA y GAPDH	30
FIGURA 7: Diferenciación adipogénica de MSC	31
FIGURA 8: Diferenciación osteogénica de MSC	32
FIGURA 9: Cirugía para generar un IAM	34
FIGURA 10: Macroscopía de corazón de una rata infartada y de una rata sham	34
FIGURA 11: Movilización de MSC post IAM	36
FIGURA 12: Temporalidad de la movilización de MSC post IAM	38



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1:	Grupos experimentales	13
TABLA 2:	Partidores para fenotipificación de MSC	26
TABLA 3:	Condiciones de amplificación de los genes ASMA y GAPDH	26



ABREVIATURAS



ASMA:	α -actina de músculo liso
α -MEM:	Medio mínimo esencial alfa
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DTT:	1,4-Dithiothreitol
EPC:	Células precursoras endoteliales
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
GAPDH:	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
GCS-F	Factor de crecimiento Granulocítico
HSC:	Células troncales hematopoyéticas
IAM:	Infarto agudo al miocardio
M-MLV:	Virus de leucemia murina moloney
MSC :	Células troncales mesenquimáticas
pb:	pares de bases
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA:	Ácido ribonucleico
RT:	Transcriptasa reversa
SFB:	Suero fetal bovino
TA:	Temperatura ambiente
Tm:	Temperatura de fusión

RESUMEN

Las células troncales mesenquimáticas (MSC) se caracterizan por ser indiferenciadas, multipotentes, capaces de dar origen a linajes celulares de estirpe mesenquimático como adipocitos, condrocitos y osteoblastos; pero también de diferenciarse a células de origen no mesenquimático como neuronas, hepatocitos, neumocitos y células endoteliales entre otras, por lo que tendrían un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis tisular en los organismos adultos. Dada su multipotencialidad, plasticidad y propiedades inmunomoduladoras, las MSC representan una potencial alternativa terapéutica para el tratamiento de patologías donde, dada la etiología de la enfermedad, se requiera regeneración de tejido, como es el caso del infarto agudo al miocardio (IAM). Se ha descrito que tanto la inyección directa como la infusión intravenosa de MSC, tienen efectos positivos en la función cardíaca post IAM, lo que indica que las MSC son capaces de migrar y hacer "homing" en el corazón infartado para reemplazar funcionalmente a los cardiomiocitos. En consecuencia las MSC administradas en forma sistémica deberían circular por vía hematogena hasta alcanzar el corazón infartado.

Basado en estos antecedentes, la hipótesis de la presente tesis es que: después de un IAM, MSC endógenas se movilizan al torrente sanguíneo. Para demostrar dicha hipótesis, se obtuvieron muestras de sangre periférica de ratas sanas, operadas pero no infartadas (sham) y de ratas infartadas quirúrgicamente, ligando la arteria coronaria descendente. Las células nucleadas obtenidas de cada animal, fueron cultivadas bajo condiciones preestablecidas para el aislamiento de MSC. Entre los días 8 y 10 después de establecidos los cultivos fue posible identificar células adherentes. Sin embargo, sólo aquellas obtenidas 3, 5 ó 7 días post IAM, presentaron morfología fibroblastoide, proliferaron en presencia de suero fetal bovino (SFB), expresaron el gen alfa actina de músculo liso (ASMA) y se diferenciaron a adipocitos y osteoblastos. Dado que estas

características fenotípicas definen a una MSC, en la presente tesis se demuestra que efectivamente las MSC endógenas se movilizan durante el IAM. Además, se sugiere que las MSC se movilizan con una temporalidad definida, debido a que se observa una dependencia entre los días transcurridos después del infarto y la cantidad de animales que moviliza MSC.

La inducción de la movilización de MSC endógenas, durante un IAM, podría proyectarse como una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento del IAM.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are adult undifferentiated, multipotent cells, that give rise to different mesenchymal cell lineage like adipocytes, chondrocytes and osteoblast. They can also transdifferentiate into non-mesodermal cells like neurons, hepatocytes, pneumocytes and endothelial cells. Thus, during adult life, MSC seem to be a key factor in the maintenance of tissue homeostasis.

Due to their multipotential, plasticity and immunomodulatory properties, MSC represent a perfect tool for the treatment of pathologies that require tissue regeneration, such as myocardial infarction (MI). It has been described that direct infusion and intravenous administration of MSC can improve cardiac function after a MI, suggesting that MSC might migrate into the site of the infarction contributing to the regeneration of cardiac tissue. To reach the infarcted heart, it is expected that intravenously administered MSC, circulate into de bloodstream. Based on this observation, the hypothesis of this thesis is that, after an MI, MSC leave their niche and mobilize through the peripheral blood. To test this hypothesis, peripheral blood samples were obtained from untreated, sham-operated and surgically infarcted rats after descendent coronary ligation. Nucleated blood cells from each animal were cultured under conditions routinely used to isolate bone marrow-derived MSC. Between 8 to 10 days after cell seeding it was possible to identify adherent cells. However, only those cells that originated from blood samples obtained at day 3, 5 or 7 post-MI exhibited fibroblast-like morphology, proliferated under the stimulus of fetal bovine serum (FBS), expressed alpha smooth muscle actin (ASMA) and differentiated into adipocytes and osteoblasts. As these phenotypical characteristics are considered indicative of MSC, the present thesis concludes that endogenous MSC do mobilize in response to MI. Besides, we suggest that MSC mobilization after MI is temporally regulated as there is a dependence between days after infarction and number of animals that mobilize MSC.

Thus the induction of endogenous MSC mobilization might be envisioned as a new
a new therapeutic strategy for MI treatment.

INTRODUCCIÓN

Las MSC presentes tanto en la médula ósea como en los tejidos mesenquimáticos (hueso, músculo esquelético, grasa) de los individuos adultos, se caracterizan por ser células indiferenciadas, que se autorrenuevan y tienen el potencial de diferenciarse tanto *in vitro* como *in vivo* a adipocitos, osteoblastos, condrocitos, tenocitos, miocitos, estroma hematopoiético (Caplan, 1994; Pittenger, y Col, 1999; Conget y Minguell, 1999; Minguell, y Col, 2001). Además poseen plasticidad, es decir capacidad de diferenciarse a células de origen no mesenquimático como neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células endoteliales, neumocitos, hepatocitos entre otros (Hermann y Col, 2004; Chen y Col, 2004; Silva, y Col, 2005; Rojas y Col, 2005) (Figura 1).

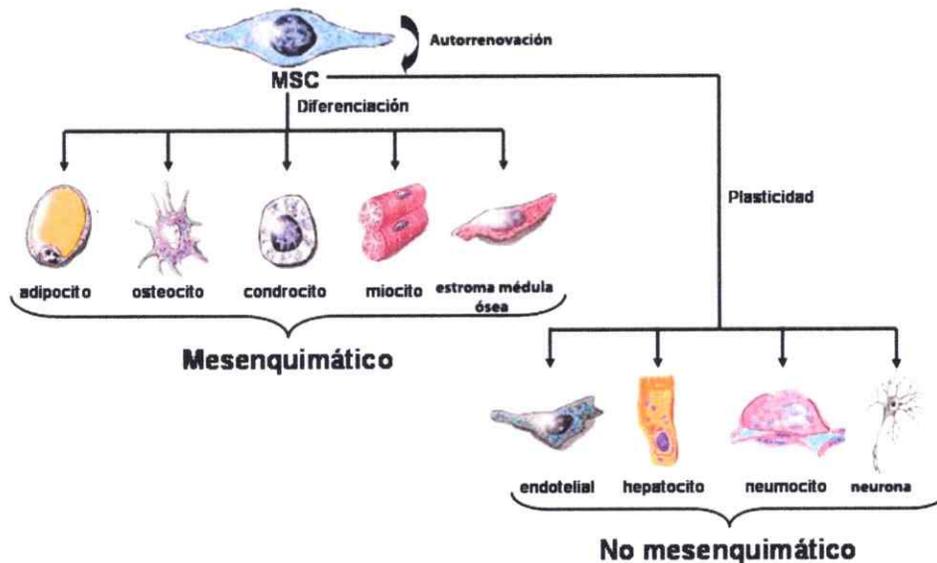


Figura 1. Esquemización del potencial de autorrenovación, diferenciación y plasticidad de las MSC. La autorrenovación corresponde al proceso mediante el cual una célula es capaz de dar origen a otras células indiferenciadas idénticas a la original. La diferenciación, es el mecanismo mediante el cual una célula se compromete y da origen a células maduras y funcionales de origen mesenquimático como adipocitos, osteocitos y condrocitos, mientras que la plasticidad se conoce como el fenómeno en que una MSC genera células de origen no mesenquimático como hepatocitos, neumocitos y neuronas.

Fenotípicamente las MSC se caracterizan por ser células adherentes; con morfología fibroblastoide; que proliferan en presencia de SFB; expresan marcadores moleculares como CD105, CD29, CD44, ASMA, entre otros, pero no expresan marcadores de células hematopoyéticas como CD45, CD34 ó CD14. Son capaces de sintetizar elementos de matriz extracelular como fibronectina, versican y colágeno 1, así como también citoquinas entre ellas G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-7, IL-11, SDF-1 (Lamoury y Col, 2007). Sin embargo, dada la ubicuidad de los marcadores recién nombrados, lo que definitivamente identifica a una MSC es su capacidad de diferenciarse *in vitro* al menos a los linajes de origen mesenquimáticos: adipogénico y osteogénico. (Conget y Minguell, 1999; Horwitz y Col, 2006; Pittenger y Col, 1999). Su fácil aislamiento y expansión *ex vivo*, su multipotencialidad y su plasticidad, así como su baja inmunogenicidad y sus propiedades inmunomoduladoras (capacidad de inhibir la proliferación de los linfocitos T) (Le Blanc y Ringdén, 2005), hacen de ellas una potencial alternativa terapéutica para el tratamiento de patologías donde las células del parénquima del tejido afectado no son funcionales o se pierden (Caplan y Bruder, 2001). Por ejemplo, se ha descrito que el trasplante alogénico de MSC en 3 niños diagnosticados con Osteogénesis Imperfecta provocó nuevas estructuras óseas y redujo la tasa de fracturas en estos niños (Horwitz y Col, 1999). Por otra parte, se han realizado cotrasplantes de MSC con células troncales hematopoyéticas (HSC) para regenerar el microambiente de la médula después de una quimioterapia, en pacientes con cáncer mamario avanzado, observándose una reconstitución hematológica más acelerada (Koc y Col, 2000).

El IAM es una patología degenerativa ya que los cardiomiocitos, que son las células que componen el tejido miocárdico, no se regeneran después de un infarto y son reemplazados rápidamente por fibroblastos que proliferan y producen masivamente elementos de la matriz extracelular que constituyen una escara fibrosa no miocítica la

cual produce una disfunción contráctil regional de la zona infartada (Mark y Col, 2004). Los tratamientos actuales del IAM consisten en: reperfusión precoz, trombólisis y/o angioplastia coronaria percutánea, todas ellas tienen por objetivo el volver a irrigar el tejido isquémico para evitar la muerte masiva de cardiomiocitos (Futterman .y Lemberg, 2000). El problema radica en que las células que murieron no se regeneran naturalmente, ni existe una estrategia terapéutica capaz de regenerar las zonas infartadas. Sin embargo, a nivel experimental, la cardiomioplastia o implante de células en el miocardio infartado, parece ser una estrategia promisoría (Dimmeler y Col, 2005).

Los resultados reportados de la cardiomioplastia varían dependiendo de la vía de administración y de la fuente de células a trasplantar. Así, dentro de las vías de administración de células que existen hoy en día, se encuentran: la vía epicárdica quirúrgica, que consiste en implantar células por múltiples punciones realizadas directamente en el miocardio infartado. La vía intravenosa coronaria, que consiste en introducir un catéter especial en el seno coronario para realizar microinfusiones de células a través de múltiples punciones en el espesor del miocardio infartado y la vía intracoronaria que consiste en la inyección de células en la arteria coronaria y se basa en el potencial migratorio de las células, las que son retenidas a través de la membrana basal (Bigalli y Col, 2005) (Figura 2).

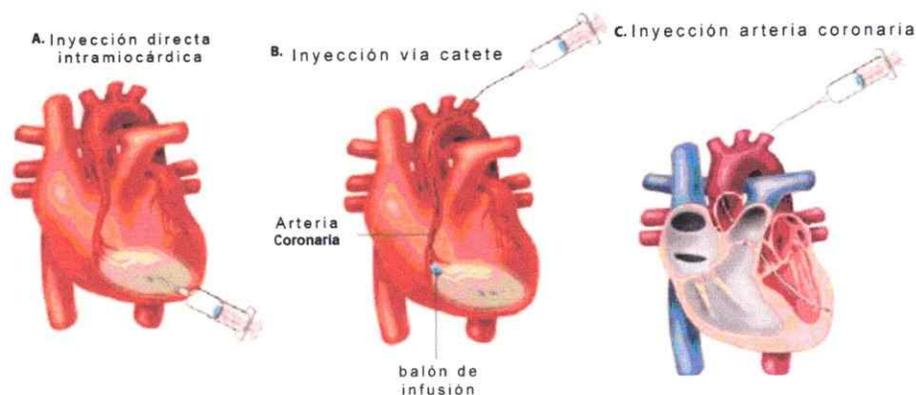


Figura 2. Estrategias de cardiomioplastia en función de las rutas de administración de las células. Por las diferentes rutas mostradas en la figura se han administrado HSC, EPC, precursores cardiomiogénicos o MSC en el corazón infartado: Vía epicárdica quirúrgica o inyección directa intramiocárdica; Vía intravenosa a través de un catete o vía intracoronaria (Dimmeler y Col, 2005).

Con respecto a las células a implantar encontramos que en modelos animales, el implante alogénico de células embrionarias o fetales diferenciadas a cardiomiocitos y mioblastos esqueléticos han mostrado un mejoramiento en la función ventricular (Bigalli y Col, 2005). Por otra parte la utilización de células troncales ya sean embrionarias (ESC), HSC, células precursoras endoteliales (EPC) o MSC provenientes de médula ósea o tejidos extramedulares han producido la regeneración de cardiomiocitos y estructuras vasculares incluyendo células endoteliales y musculares lisas, hecho demostrado tanto en modelos animales (Shang y Col, 2006; Orlic y Col, 2001; Goette y Col, 2006; Dimmeler y Col, 2005), como en humanos (Chen y Col, 2004).

La principal limitación del trasplante de ESC y de cardiomiocitos en la práctica clínica, es que estas células se obtienen de embriones y fetos, respectivamente, lo que implica un potencial rechazo inmunológico y levanta serios cuestionamientos bioéticos (Bigalli y Col, 2005).

Como alternativa a la utilización de cardiomiocitos se han usado HSC, pues hay estudios que muestran su capacidad de transdiferenciar a cardiomiocitos (Orlic y Col, 2001). Sin embargo las evidencias *in vivo* son controversiales, pues hay estudios que demuestran su capacidad de dar origen a cardiomiocitos y regenerar el tejido miocárdico (Orlic y Col, 2001), mientras que otros muestran que al inyectar HSC en el lugar del infarto, dichas células sólo se diferencian a células de linajes sanguíneos no contribuyendo en la regeneración del miocardio (Murry y Col, 2004). Las EPC, derivadas de sangre periférica, también son una posible fuente de células para cardiomioplastia dado que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos y disminuyen el remodelamiento (Hattan y Col, 2004). Además, *in vitro* se ha demostrado que son capaces de transdiferenciar a cardiomiocitos (Ashara y Col, 1997). Sin embargo, hay estudios *in vivo* que muestran que las EPC no se diferencian a cardiomiocitos y sólo participarían en la neovascularización del miocardio infartado (Ausoni y Col, 2005).

Por su parte, *in vitro* las MSC cocultivadas con cardiomiocitos o expuestas a 5-azacitidina, bFGF y amfotericina, se diferencian al linaje cardiomiogénico (Hattan y Col, 2004; Hidemasa y Col, 2003). Además en modelos animales se ha mostrado que implantes de MSC humanas en el miocardio de ratas infartadas quirúrgicamente e inmunosuprimidas, son capaces de injertarse en el tejido infartado, diferenciándose a cardiomiocitos funcionales (Grinnemo y Col, 2004). De igual forma se observó que el trasplante alogénico de MSC en conejos infartados quirúrgicamente, promueve la recuperación funcional y baja la mortalidad post IAM en comparación con los animales sin implante celular (Jian y Col, 2004). También se han descrito trasplantes de MSC en el corazón infartado de humanos donde, al igual que en los modelos animales, se ha demostrado recuperación funcional del tejido miocárdico infartado con respecto al grupo control que sólo recibió vehículo de inyección (Chen y Col, 2004). En general,

todos estos estudios muestran que las MSC se injertan en el tejido miocárdico y atenúan las disfunciones que produce la formación de la escara en el corazón infartado, mejorando la función contráctil. Los mecanismos propuestos para los efectos terapéuticos asociados a las MSC se deben a su diferenciación en cardiomiocitos, pero también a que generan células endoteliales (Nagaya y Col, 2004), los que darían cuenta de la neovascularización observada. Además, hay estudios donde se demuestra que MSC indiferenciadas presentes en el tejido infartado producen factores tróficos que promoverían la supervivencia de los cardiomiocitos endógenos (Tang y Col, 2005). Por lo tanto, las MSC son la población celular ideal para realizar cardiomioplastías, debido a que contribuirían a la regeneración anatómica y funcional del tejido cardíaco infartado en forma pleiotrópica.

Aunque promisorio, la cardiomioplastia con MSC presenta algunas complicaciones. Entre ellas, la necesidad de aislar *ex vivo* las MSC, lo que conlleva un tiempo considerable entre el infarto y la cardiomioplastia, durante el cual se consolida la remodelación cardíaca, hay riesgo de contaminación durante el cultivo, las células se exponen a proteínas xenogénicas (SFB) e *in vitro* ocurra envejecimiento celular, que implica una disminución en el potencial de diferenciación a los diferentes linajes (Bonab y Col, 2006.). Por otro lado, la cardiomioplastia es una técnica muy invasiva pues requiere de 2 intervenciones quirúrgicas, una para aspirar la médula ósea y otra para implantar las MSC. Además, hay complicaciones asociadas a ella, ya que hay estudios que demuestran la producción de microembolias durante la infusión intracoronaria con la consecuente disminución del aporte sanguíneo al miocardio (Bigalli y Col, 2005). Por lo tanto sería interesante lograr una cardiomioplastia *in vivo* para lo cual se requeriría movilizar las células desde su nicho al tejido infartado (Figura 3).

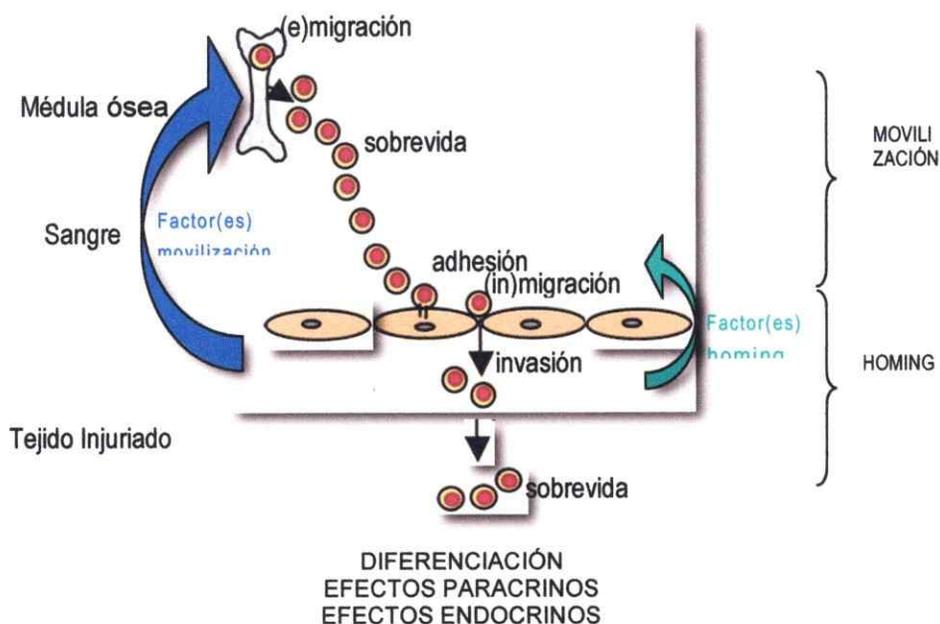


Figura 3. Representación esquemática de la movilización celular.

La movilización es un proceso activo y dinámico en el que las células abandonan su nicho y transitan a través de la circulación sanguínea hacia un tejido blanco (Roufousee y Col, 2004) (Figura 3). Tanto células diferenciadas como células troncales presentan esta capacidad (Ratajczak y Col, 2004). El mecanismo por el cual ocurre este proceso no está esclarecido pero debiera implicar eventos migratorios, tal que la célula sea capaz de atravesar distintos tejidos (Wu y Col, 2003). También se ha asociado a la proliferación masiva de una población celular, lo que se ha descrito haría el factor estimulador de colonias granulocíticas macrofágicas (G-CSF) sobre las HSC, resultando en la salida de dichas células desde la médula ósea y en consecuencia, su aparición en el torrente sanguínea (Uchida y Col, 1997).

El hecho de que las MSC circulen en individuos adultos sanos aún es un tema controversial (Zvaifler y Col, 2000; Wexler. y Col, 2003). Pareciera ser que las MSC circulan en el torrente sanguíneo de individuos sanos pero a muy bajas concentraciones (He y Col; 2007). Aparentemente, la movilización endógena de MSC se induciría frente a algún tipo de daño tisular, como el producido por las quimioterapias en el tratamiento de cáncer (Fernández y Col, 1997) o por un daño hipóxico severo (Rochefort y Col, 2006).

En el caso particular del IAM, no ha sido demostrado que promueva la movilización de MSC, sin embargo las siguientes evidencias indirectas lo sugieren:

- i) Las MSC pueden integrarse en el corazón cuando se infunden por vía endovenosa (Nagaya y Col, 2004).
- ii) Durante un rechazo crónico de un corazón trasplantado, las MSC son capaces de migrar desde su tejido de residencia en el receptor hacia el corazón del donante en respuesta al proceso inflamatorio asociado al rechazo del órgano trasplantado (Wu y Col, 2003).
- iii) Kawada y colaboradores demostraron que al inyectar una línea inmortalizada de células mesenquimática en ratones irradiados antes de realizar un infarto quirúrgico y después de la administración del factor estimulador de colonias granulocíticas-macrofágicas (G-CSF), las células eran capaces de hacer "engraftment", es decir permanecer e incorporarse funcionalmente en el miocardio dañado (Kawada y Col, 2004).

En todos estos casos, las MSC primero debieron salir de su tejido de residencia, movilizarse y finalmente establecerse en el tejido blanco.

Considerando los antecedentes expuestos, en la presente tesis se propone que después de un IAM ocurre movilización por el torrente sanguíneo de MSC endógenas.

HIPÓTESIS

MSC endógenas se movilizan por el torrente sanguíneo en respuesta a un IAM.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Determinar, en un modelo animal, si las MSC circulan por el torrente sanguíneo después de un IAM.

Objetivos específicos.

1. Implementar las técnicas de cultivo celular y biología molecular para aislar y caracterizar MSC derivadas de médula ósea de ratas *Sprawley Dowley* adultas sanas.
2. Implementar la técnica de IAM quirúrgico en ratas *Sprawley Dowley* adultas.
3. Evaluar la presencia de MSC en sangre periférica de ratas *Sprawley Dowley* adultas sanas, sham e infartadas.
4. Comparar los resultados obtenidos para los distintos grupos experimentales y a distintos tiempos post IAM para comprobar o refutar la hipótesis de trabajo.

CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

Tipo estudio

El presente trabajo corresponda a un estudio experimental, en modelo animal, de controles y casos.

Modelo animal

Se usaron ratas *Sprawley Dowley* machos de aproximadamente 3 meses de edad, con un peso de entre 350-450 grs. provenientes del bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Durante todo el estudio, los animales se alimentaron y se mantuvieron con agua potable a voluntad, dentro de jaulas especiales para rata en una pieza a temperatura controlada, con fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Diseño experimental

Quirúrgicamente, se generó un IAM ligando la arteria coronaria descendente que irriga parte del ventrículo izquierdo del corazón. Uno, 3, 5 y 7 días después del infarto, se extrajo sangre periférica de estos individuos, que se cultivó en condiciones estándares para aislar MSC. Las células aisladas se caracterizaron de acuerdo a su morfología, expresión génica y potencial de diferenciación a los linajes mesenquimáticos

Como control positivo se utilizaron MSC aisladas de médula ósea de ratas sanas. Como control negativo se usó sangre periférica de individuos sanos y sham (individuos operados pero no infartados) (Figura 4).

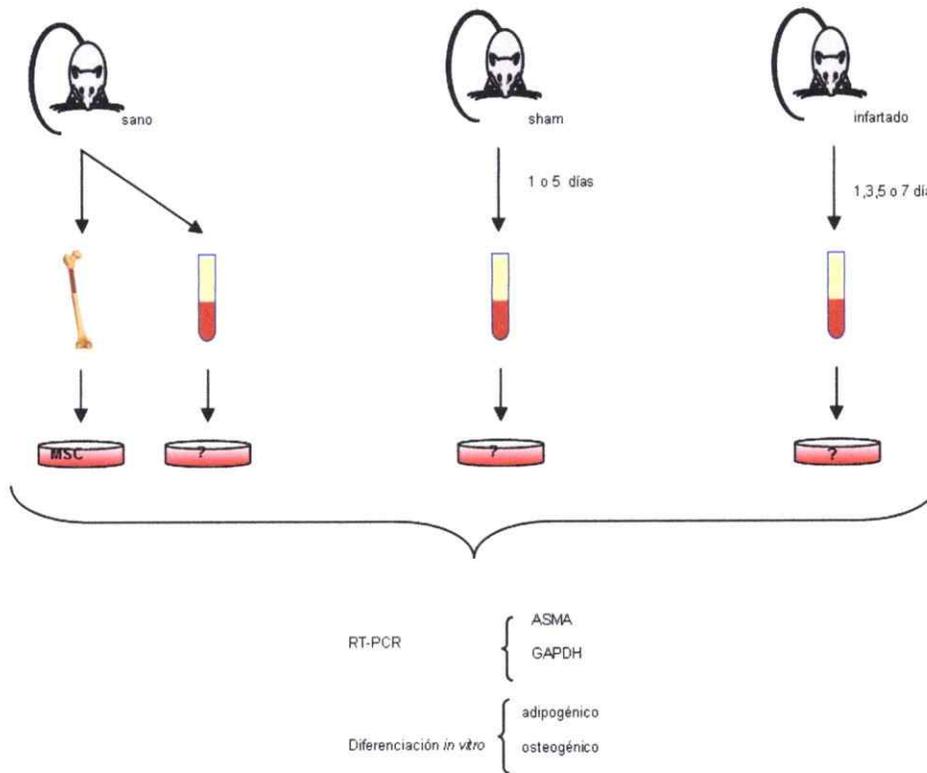


Figura 4. Diseño experimental. Se extrajo sangre periférica 1, 3, 5 y 7 días post IAM a partir de la cual se establecieron cultivos de células adherentes y luego se caracterizaron. Como control positivo se utilizaron MSC aisladas de médula ósea de ratas sanas y como control negativo, sangre periférica de ratas sanas y sham.

Grupos experimentales y tamaño muestral

El presente estudio es de controles y casos, siendo controles los animales de los grupos sano y sham. Los casos corresponden a los animales infartados quirúrgicamente analizados a diferentes días post IAM. Los tamaños muestrales fueron determinados tomando en cuenta que para encontrar una diferencia estadísticamente significativa $p < 0,05$, entre los grupos experimentales, se requieren como mínimo 3 animales por grupo experimental, esto en conjunto con las consideraciones bioéticas y de acuerdo al criterio utilizado por Nagaya y colaboradores (Nagaya y Col, 2004). Así, los grupos experimentales quedaron constituidos por el número de animales que se muestra en la Tabla 1.

días post IAM	0	1	3	5	7
Número de individuos					
sano	12	-	-	-	-
sham	-	4	-	6	-
infartado	-	5	6	6	6

Tabla 1. Se señala el número de ratas que entraron al estudio y los días después del infarto analizados.

Consideraciones bioéticas

Los procedimientos experimentales realizados en los animales utilizados en este trabajo, fueron aprobados por el Comité de Bioética, Facultad de Medicina, Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo, y se realizaron de acuerdo a las normas bioéticas internacionales establecidas por la UNESCO/OMS/CIOMS en 1949 sobre los principios éticos internacionales para la investigación biomédica con animales.

EQUIPOS

Baño termostático, Haake, Alemania.

Cámara de Neubauer, Boeco. Alemania.

Cámara de electroforesis horizontal. Horizon 58, Gibco. USA.

Cámara fotográfica, Olimpos, EEUU.

Centrífuga Mikro 20, Hettich, Alemania.

Centrífuga 15720. Eppendorf, EEUU.

Espectrofotómetro. Biomate 3, Thermo Spectronic. USA.

Filtro de 0,2 μm , Orange scientific, Bélgica.

Gabinete. NU-425-400E, Labgard class II, EEUU.

Microscopio de luz invertido, Eclipse TS100, Nikon, Japon.

Papel filtro. Macherey-Nagel. Alemania.

Placa de 20 cm^2 (p60). Easy grip tissue culture dish, Falcon. Inglaterra.

Placa de 56,7 cm^2 (p100). Tissue culture dish, Falcon. Inglaterra.

Placa de 24 pozos (p24). Orange Scientific, Bélgica.

Sutura 2-0. Vicryl, Ethicon. Brasil.

Sutura 6-0. seda, Ethicon, Brasil.

Termociclador LightCycler. Roche. Alemania.

Termociclador Mastercycler personal, Eppendorf. Alemania.

Tubo cónico 15 mL. Blue max, Falcon. USA.

Tubo cónico 50 mL. Blue max, Falcon. USA.

Transiluminador, M-20, Arquimed, USA.

REACTIVOS

- Acido acético glacial. Merck. Darmstadt, Alemania.
- Agarosa. Bio-Rad. Hercules. CA, USA.
- Agua bidestilada inyectable. Laboratorio Sanderson. Santiago, Chile.
- Agua LIBRE DE NUCLEASAS, Sigma-Aldrich. Steinheim, Alemania.
- Alfa-MEM. Gibco. Grand Island, NY, USA.
- Alizarin red. Sigma-Aldrich. Steinheim, Alemania.
- Ascorbato-2-fosfato. Sigma-Aldrich. Steinheim, Alemania.
- Azul tripán. Gibco. Grand Island, NY, USA.
- β -glicerol fosfato. Sigma-Aldrich. Steinheim, Alemania.
- Cloruro de Amonio, Merck. Darmstadt, Alemania.
- Cristal violeta. Merck. Darmstadt, Alemania.
- Dexametasona. Sigma-Aldrich. Steinheim, Alemania.
- DNase I Amplification Grade. Invitrogen. Carlsbad, CA, USA.
- dNTPs. Fermentas Life Sciences, Hanover, MD, USA.
- Etanol absoluto. Merck. Darmstadt, Alemania.
- Etanol 70 % .TCL. Santiago, Chile.
- FastStart DNA Master SYBR Green I. Roche. Penzberg, Alemania.
- GeneRuler™ DNA Ladder 100 pb. Fermentas Life Sciences. Hanover, MD, USA.
- Gentamicina 40 mg/mL. Laboratorio Biosano. Santiago, Chile.
- Heparina 5000 U/mL. Laboratorio Chile. Santiago, Chile.
- Indometacina. Sigma-Aldrich. Steinheim, Alemania.
- Inhibidor de RNasa 1x. Promega. Madison, WI, USA.
- Insulina 100 U/mL. Humalog. Indianapolis, IN, USA.
- Isobutilmetilxantina. Calbiochem. San Diego, CA, USA.

Isopropanol. Merck. Darmstadt, Alemania.

Ketamina 50 mg/mL. Laboratorio Biosano. Santiago, Chile.

MgCl₂. Merck. Darmstadt, Alemania.

NaCl. Merck. Darmstadt, Alemania.

Oil Red O. Sigma-Aldrich. Steinheim, Alemania.

OligodT. Tib Molbiol. Berlin, Alemania.

Partidores. Genética y Tecnología Ltda. Santiago, Chile.

PBS 10x. Gibco. Grand Island, NY, USA.

Povidona yodada 10 %. Volta pharmaceuticals. Santiago, Chile.

Suero fetal bovino. Gibco. Grand Island, NY, USA.

Suero fisiológico isotónico (NaCl 0,9 %). Laboratorio Sanderson. Santiago, Chile.

Tampón de carga 6x. Fermentas Life Sciences. Hanover, MD, USA.

Tiopental. Laboratorios Richmond. Buenos Aires, Argentina.

Transcriptasa reversa M-MLV 200 U/μl. Promega. Madison, WI, USA.

Tripsina 0,25 % p/v, EDTA 2,65 mM. Gibco. Burlington, ON, Canadá.

Tris. Merck. Darmstadt, Alemania.

Trizol. Invitrogen. Carlsbad, CA, USA.

Xilazina 20 mg/mL. Alfasan. Woerden, Holanda.

MÉTODOLOGÍAS

1. Obtención y cultivo de MSC a partir de médula ósea de rata

Las MSC fueron aisladas a partir de la médula ósea de ratas machos *Sprague-Dawley* adultas de 350-450 grs. Dichas ratas fueron sedadas con vapores de seboflorano, y luego se les inyectó intraperitonealmente una mezcla del relajante muscular xilazina 10 mg/kg y del anestésico general clorhidrato de ketamina 100 mg/kg. Una vez que se encontraban profundamente anestesiadas, fueron sacrificadas con una sobredosis de tiopental 100 mg/kg inyectado directamente en el corazón, dado que produce a los pocos segundos un paro cardíaco y respiratorio. Luego, se obtuvieron fémures y tibia, de donde se extrajeron las células de la médula. Para ello, se cortaron las epífisis las que se perfundieron con 2 mL de α -MEM, se centrifugó a 400 x g por 10 min. a temperatura ambiente (TA). Las células mononucleadas se resuspendieron en α -MEM + SFB 20% (v/v) + gentamicina 80 mg/mL y se sembraron a una densidad de 1×10^6 células/cm². Al día siguiente, la placa se lavó 2 veces con PBS para eliminar las células no adheridas y se cambió el medio por α -MEM + SFB 10% (v/v) + gentamicina 80 mg/mL (en adelante α -10). El medio de cultivo fue reemplazado cada 2-3 días. Cuando se observaron focos de células adherentes confluentes (entre los días 5 y 7), se subcultivaron. Para ello, se lavó 1 vez con PBS y se incubó con tripsina 0,25% (p/v) + EDTA 2,65 mM en tampón fosfato salino (PBS) (50 μ l/cm²) por 5 min. a 37°C. Luego, la tripsina se inactivó agregando 1 volumen de α -10 y se eliminó centrifugando las células a 400 x g por 5 min. a TA. Los subcultivos de MSC se establecieron a partir de estas células, las cuales se resuspendieron en α -10 y se sembraron a una densidad de 7×10^3 células/cm², lo que correspondía al subcultivo 1. Las MSC fueron subcultivadas cada 4-6 días evitando que alcanzaran confluencia. Las células que no se utilizaron para los experimentos, se criopreservaron después del subcultivo 1 para evitar su

envejecimiento *in vitro*. Todos los cultivos celulares se mantuvieron bajo atmósfera aire/CO₂ 95% a 37°C.

2. Criopreservación de MSC de rata

Las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 400 x g por 5 min. y se resuspendieron en SFB frío 90% (v/v) + dimetil sulfoxido 10% (v/v) a una densidad de 1×10^6 células/mL. Luego, se alicuotaron en criotubos y se enfriaron en vapores de nitrógeno líquido por 20 min. en posición 4 de ascensor Taylor-Wharton (velocidad de enfriamiento = - 3,5 °C/min.) y luego por 20 min. en posición 1 (velocidad de enfriamiento = - 8 °C/min). Finalmente, se almacenaron sumergidas en nitrógeno líquido a - 196 °C.

3. Recuentos celulares

3.1 Número de células nucleadas

El número de células nucleadas provenientes tanto de la médula como de sangre periférica, se determinó en cámara de Neubauer. Para ello una alícuota representativa de la muestra fue diluida 10 veces con Cristal Violeta 0,05% (p/v) + ácido acético 5% (v/v) y se contaron al microscopio óptico (x10) en 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer. La densidad celular se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

Densidad celular [células/mL] = recuento promedio $\times 10^4 \times 10$

3.2 Número de células totales

El número de células totales se determinó utilizando una cámara de Neubauer y Azul Tripán 0,4%. (p/v). Para ello una alícuota representativa de la muestra fue diluida 2 veces con Azul Tripán y se contaron las células al microscopio óptico (x10) en 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer. La densidad celular se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: Densidad celular [células/ml] = recuento promedio $\times 10^4 \times 2$.

4. Infarto agudo al miocardio quirúrgico

El IAM se indujo por ligación de la rama descendente anterior de la arteria coronaria izquierda (Piddo y Col, 1996; Hu y Col, 1996). Brevemente, ratas *Sprague Dawley* macho de 350-450 gramos de peso fueron anestesiadas con una mezcla de xilazina 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y clorhidrato de ketamina 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por inyección intraperitoneal, luego fueron intubadas con una bránula de teflón 16G y posteriormente conectadas a ventilador mecánico. Los animales fueron ventilados con una presión inspiratoria de 35 cmH_2O y una frecuencia de 70 ciclos/minuto durante el procedimiento. Luego de cortar la piel con bisturí se continuó con disección roma divulsionando los músculos pectorales hasta acceder a la parrilla costal. A continuación, para acceder a la cara anterior del corazón, se efectuó una toracotomía izquierda por el 4º espacio intercostal izquierdo y se realizó el reconocimiento y la ligación de la rama descendente anterior de la arteria coronaria izquierda con sutura de seda 6-0. El tórax fue cerrado por planos mediante sutura y luego las ratas fueron dejadas en recuperación. Se consideraron infartados los animales que, luego de ser sacrificados con una inyección cardiaca de tiopental 100 mg/Kg , se les extrajo el corazón y se observó la formación de una escara blanca fibrosa producto del infarto alrededor del ventrículo izquierdo. En el caso de las ratas operadas pero no infartadas (sham), se procedió de igual manera que en el caso anterior pero sin realizar la ligación de la coronaria luego de su reconocimiento.

5. Obtención y cultivo de células mononucleadas a partir de sangre periférica de rata

Las ratas fueron sedadas con vapores de seboflorano, y luego se les inyectó intraperitonealmente una mezcla de xilazina 10 mg/kg y clorhidrato de ketamina 100 mg/kg. Cuando se encontraban profundamente anestesiadas, se extrajeron 3 mL de sangre periférica realizando una punción cardíaca con una aguja de 21G y jeringa de 6mL, utilizando como anticoagulante heparina 40 U/mL.

A partir de la sangre se obtuvieron las células nucleadas, para ello, las muestras fueron colocadas en un tubo falcon de 50 mL y diluidas 5 veces en PBS, para luego centrifugar a 400 x g por 15 min. a TA. Para eliminar los glóbulos rojos, las muestras fueron tratadas 2 veces con una solución de NH_4Cl 75 mM, incubando cada vez por 10 minutos e invirtiendo el tubo cada 2 min. Finalizado este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 400 x g por 10 min. a TA. Las células nucleadas se sembraron a una densidad de $4 - 7,5 \times 10^5$ células/cm² en α -10 y cultivadas bajo atmósfera aire/CO₂ 95% a 37°C.

Las células no adherentes fueron eliminadas durante los cambios de medios realizados cada 2 ó 3 días y las células adherentes fueron caracterizadas de acuerdo a su morfología, expresión génica y potencial de diferenciación a los linajes mesenquimáticos: adipogénico y osteogénico.

6. Diferenciación *in vitro* de MSC de rata

El potencial de diferenciación adipogénico y osteogénico de las MSC se determinó de acuerdo a su capacidad para generar *in vitro* adipocitos u osteoblastos (Conget y Minguell, 1999).

6.1. Diferenciación adipogénica

6.1.1 Inducción de diferenciación adipogénica

Las MSC se sembraron a una densidad celular de $2,5 \times 10^4$ células/cm² en α -MEM + SFB 10% (v/v). Al día siguiente, el medio fue reemplazado por el medio de estimulación adipogénico que contenía α -10 suplementado con dexametasona 1 μ M + 3-isobutil-1-metilxantina 100 μ g/mL + indometacina 100 μ M + insulina 0,2 U/mL, reemplazando dicho medio cada 4 días.

La aparición de adipocitos fue monitoreada con un microscopio de luz invertido y las gotas de grasa, propias de los adipocitos, fueron teñidas a los 10 días después de iniciada la diferenciación mediante tinción con Oil Red O.

6.1.2 Tinción con Oil Red O

Para confirmar la diferenciación adipogénica, se utilizó el colorante Oil Red O, que se une específicamente a los triglicéridos. Para ello, se preparó una solución de isopropanol 60% v/v a la que se agregó Oil Red O hasta generar una solución saturada. Luego se entibió por 20 min. a 37 °C y se filtró por filtro de poros de 0,2 μ m para eliminar el exceso de cristales de Oil Red O. Las células en las placas fueron lavadas 2 veces con 0,25 mL/cm² de PBS. Luego se agregó 0,25 mL/cm² de Oil Red O y se incubó por 1 hora a TA. A continuación, se lavó 2 veces con 0,25 mL/cm² de PBS y se observaron y fotografiaron las células que presentaban gotas de grasa teñidas color rojo en el microscopio de luz invertido con contraste de fase.

6.2 Diferenciación osteogénica

6.2.1 Inducción diferenciación osteogénica

Las MSC se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/cm² en α -10. Al día siguiente, el medio de cultivo fue reemplazado por el medio de estimulación osteogénica que contenía dexametasona 0,1 μ M + β -glicerofosfato 10 mM + ascorbato-2-fosfato 50 μ M. El medio de diferenciación se cambió cada 4 días, mientras que el ascorbato-2-fosfato era agregado día por medio.

La aparición de cristales de hidroxipatita fue monitoreado con un microscopio de luz invertido a los 21 días después de iniciada la diferenciación y fue confirmada con la tinción Alizarin Red.

6.2.2 Tinción Alizarin Red

Cuando se observaron acumulaciones de minerales y cristales birrefringentes al microscopio de luz invertido con contraste de fase (21 días), se realizó la tinción Alizarin Red. Para ello, se preparó una solución de Alizarin Red 40 mM en NaH₂PO₄ 0,1 M pH 4,3. Las células en las placas fueron lavadas 2 veces con 0,25 mL/cm² de PBS y fijadas con 0,25 mL/cm² de etanol 70% (v/v) por 30 min a TA. Luego, se lavaron 2 veces con 0,15 mL/cm² de PBS, se agregó 0,25 mL/cm² de Alizarin Red 40 mM y se incubó por 10 min a TA. Las células en las placas fueron lavadas 2 veces con 0,25 mL/cm² de PBS luego se fijaron con etanol 70% durante 30 min a TA, después se lavaron nuevamente con 0,25 mL/cm² de PBS, se agregó 0,25 mL/cm² de una solución de Alizarin Red 40 mM y se incubó 10 min. a TA. Después se lavó 5 veces con agua bidestilada (0,5 mL/cm²) y se incubaron las células en PBS durante 15 min. a TA. Finalmente, se observaron y fotografiaron en microscopio óptico de luz invertido con contraste de fase.

7. Análisis Molecular de MSC de rata

La expresión del gen ASMA, característico de las MSC y no de otras poblaciones celulares que se encuentran normalmente en la sangre periférica de los individuos adultos (Qiling y Col, 2007), se evaluó mediante transcripción reversa y por PCR en tiempo real. Como control de la integridad y amplificabilidad de los cDNA analizados, se amplificó el mRNA del gen constitutivo GAPDH.

7.1 Extracción de RNA

El RNA total fue extraído a partir de MSC o de células adherentes confluentes proveniente de sangre periférica de ratas adultas. Para ello, a cada placa se le retiró el medio de cultivo y se lavó una vez con PBS. Luego, se agregó 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ del reactivo Trizol y se dejó incubando 5 min. a TA. Posteriormente se traspasó a un tubo eppendorf libre de RNAsa de 1,5 mL y se agregaron 30 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de cloroformo, se agitó enérgicamente durante 15 s y se incubó durante 3 min. a TA. Pasados los 3 min., la muestra se centrifugó a 13.500 x g durante 15 min a 4°C. La fase acuosa se traspasó a un tubo eppendorf nuevo libre de RNAsa, al que se agregó 50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de isopropanol. El RNA se dejó precipitando en isopropanol durante 72 h a -20°C. Una vez precipitado el RNA, la muestra se centrifugó a 13.500 x g durante 10 min a 4°C. El precipitado de RNA se lavó con 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de etanol 75% (v/v) preparado en agua libre de nucleasa (dimetilpirocarbonato 0,1% (p/v)) y se centrifugó a 13.500 x g durante 10 min a 4°C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante, dejando evaporar los restos de etanol, para resuspender el pellet de RNA en 20 μl de agua libre de nucleasas. El RNA aislado se almacenó a - 80 °C para su posterior análisis.

7.2 Cuantificación de RNA

La cuantificación de RNA se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro BioMath. Para ello, una alícuota de cada muestra se diluyó 100 veces en agua libre de nucleasas y la concentración de RNA total se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: $ssRNA [ng/\mu l] = A_{260} \times 40 \times 100$

7.3 Eliminación de DNA contaminante

Con el propósito de eliminar el posible DNA genómico remanente en la muestra de RNA, ésta se trató con DNasa I. Para ello, a un volumen de muestra que contenía 1 μg de RNA total se le agregó 1 μl de tampón de reacción DNasa I (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, MgCl₂ 20 mM, KCl 500 mM), 1 μl de DNasa I 1 U/ μl y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 10 μl . La reacción se realizó incubando 15 min a TA. Pasado este tiempo, la enzima se inactivó agregándole 1 μl de EDTA 25 mM para finalmente incubar durante 10 min a 65°C. Finalizado el tratamiento, el RNA tratado con DNasa fue nuevamente cuantificado espectrofotométricamente.

7.4 Transcripción reversa

El cDNA se obtuvo por una retrotranscripción partiendo de 1 μg de RNA total, que se incubó 10 min a 70 °C con 0,5 μg de oligodT en un volumen final de 12 μl en agua libre de nucleasas. A continuación, se agregaron 8 μl de una mezcla que contenía 1 μl de dNTPs 10 mM, tampón enzima Transcriptasa Reversa (RT) M-MLV (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 7 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM), 1 μl de enzima RT-(M-MLV) 200 U/ μl , inhibidor de RNasa y agua libre de nucleasas, de tal manera que la reacción de retrotranscripción ocurriera en un volumen final de 20 μl . El cDNA se sintetizó incubando 50 min a 42 °C. Finalmente, la enzima se inactivó 15 min a 70 °C. El cDNA se almacenó a -20 °C para su posterior amplificación.

7.4 PCR en tiempo real

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador LightCycler utilizando el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I. Para ello se preparó una mezcla que contenía PCR LightCycler-DNA Máster SYBR Green (*Taq* DNA polimerasa + tampón de reacción + dATP + dUTP + dCTP + dGTP + SYBR Green I) + MgCl₂ 3 mM + partidores sentido 0,5 μM y antisense 0,5 μM + 0,2 μg de cDNA. Las secuencias de los partidores utilizados, las temperaturas de denaturación (T_m) y el tamaño esperado de los amplicones generados, al igual que las condiciones de amplificación de los genes analizadas se muestran en las Tablas 2 y 3. En todos los casos, las concentraciones de enzima, tampón de reacción y dNTPs corresponden a las recomendadas para el kit LightCycler-DNA Máster SYBR Green I de Roche.

Marcador	N° acceso gene-bank	Secuencia partidores sense antisense	Amplicón		Referencia
			T _m (°C)	Tamaño (pb)	
ASMA	<u>4501882</u>	5'-gatcaccatcggaatgaacg-3' 5'-cttagaagcatttgcggtgga-3'	88±0.3	407	Park y Col, 2004.
GAPDH	<u>31377487</u>	5'attgctctcaatgacaact 3' 5'gaactttattgatggtattcg 3'	89±0.3	295	Chu y Col, 2005.

Tabla 2. Partidores y características de los amplicones de ASMA y GAPDH. En la 1^a columna se muestra el gen analizado. En la 2^a, su número de acceso en la base de datos genebank. En la 3^a, la secuencia de los partidores utilizados. En la 4^a y 5^a, la T_m y el tamaño del amplicón que se genera utilizando controles positivos, que coinciden con los valores teóricos esperados. En la 6^a, la referencia de donde fueron obtenidos los partidores.

Marcador	Denaturación		Apareamiento		Extensión		Ciclos (Número)
	T (°C)	t (s)	T(°C)	t (s)	T(°C)	t (s)	
ASMA	95	5	50	10	72	10	35
GAPDH	95	5	49	1	72	5	35

Tabla 3. Condiciones de amplificación de los genes ASMA y GAPDH. En la 1ª columna se muestran los genes. En la 2ª y 3ª, la temperatura y el tiempo de denaturación. En la 4ª y 5ª, la temperatura y el tiempo de apareamiento. En la 6ª y 7ª, la temperatura y el tiempo de extensión. En la 8ª, el número de ciclos de PCR realizados.

7.5 Análisis de amplicones

Las T_m y tamaños teóricos de los amplicones, se calcularon con el programa BioMath Calculators (Promega, <http://www.promega.com/biomath/calc11.htm>) y Nucleotide-Nucleotide Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), respectivamente. Las T_m teóricas fueron comparadas con las T_m experimentales obtenidas por el análisis de T_m en el termociclador LightCycler, mientras que el tamaño teórico fue comparado con el tamaño experimental obtenido por electroforesis en gel de agarosa 1,5% (p/v).

7.5.1 Análisis de T_m

Se determinó la T_m empírica de los amplicones utilizando el programa Roche Molecular Biochemicals LightCycler Software versión 3.5 en el termociclador LightCycler programado con un ciclo que consta de:

- Denaturación total, elevando la temperatura a 95 °C a una velocidad de 20 °C/s.
- Renaturación total, bajando la temperatura a 65 °C a una velocidad de 20 °C/s.
- Denaturación gradual, elevando la temperatura hasta 95 °C a una velocidad de 0,1 °C/s, registrando la fluorescencia de la muestra cada 0,1 °C.

7.5.2 Electroforesis en gel de agarosa

El tamaño teórico de los amplicones fue calculado en el programa Nucleotide-Nucleotide Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). El tamaño experimental del amplicón se obtuvo por electroforesis en geles de agarosa 1,5% (p/v). Para ello, se mezclaron 15 µl de amplicón con 3 µl de tampón de carga 6x (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, azul de bromofenol 0,03% (p/v), xilencianol 0,03% (p/v), glicerol 60% (p/v), EDTA 60 mM). Las muestras se cargaron en un gel al 1,5% (p/v), que se preparó mezclando 30 mL de Tris-acetato 40 mM, pH 7,6, EDTA 2 mM (TAE) con 0,45 grs. de agarosa. En todos los geles realizados, se incluyó en un carril 6 µl de estándar 100 pb GeneRuler™ DNA Ladder 0,5 µg/µl. A continuación, se realizó una electroforesis a 95 V y 65 mA en una cámara horizontal de electroforesis, utilizando tampón TAE. Finalizada la electroforesis, el gel se incubó por 10 min. en una solución de bromuro de etidio 10µg/mL y luego, se retiró de dicha solución y se incubó por 10 minutos en TAE para eliminar el exceso de bromuro de etidio. Finalmente, se observó y fotografió bajo un transiluminador de luz ultravioleta.

8. Análisis estadístico

Dado que en ninguno de los animales provenientes de los grupos controles (sham y sanos) se detectaron MSC en la sangre periférica, no fue necesario aplicar un análisis estadístico para comparar los resultados obtenidos. Para determinar si la temporalidad de la movilización era significativa, los datos se analizaron con el programa estadístico Statistica versión 6.0, utilizando el test χ^2 . El nivel de significancia se asignó en $p = 0,05$.

RESULTADOS

1. Implementación de las técnicas de cultivo celular y biología molecular para aislar y caracterizar MSC, derivadas de médula ósea de ratas *Sprawley Dowley* adultas sanas.

A partir de la médula ósea de 3 individuos sanos adultos, se aislaron MSC las que fueron caracterizadas de acuerdo a su capacidad de adhesión al plástico, morfología, expresión del gen ASMA y potencial de diferenciación a los linajes mesenquimáticos: adipogénico y osteogénico. Como se observa en la Figura 5, las MSC presentan morfología fibroblastoide y cuando están confluentes se organizan en monocapas.

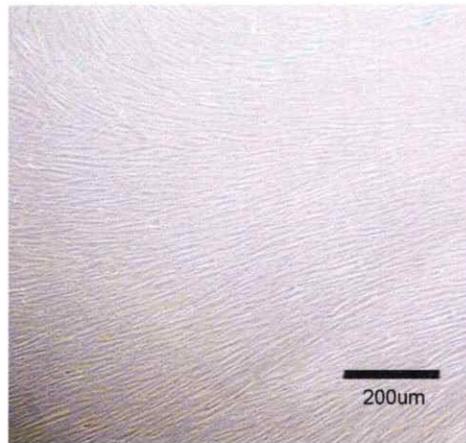
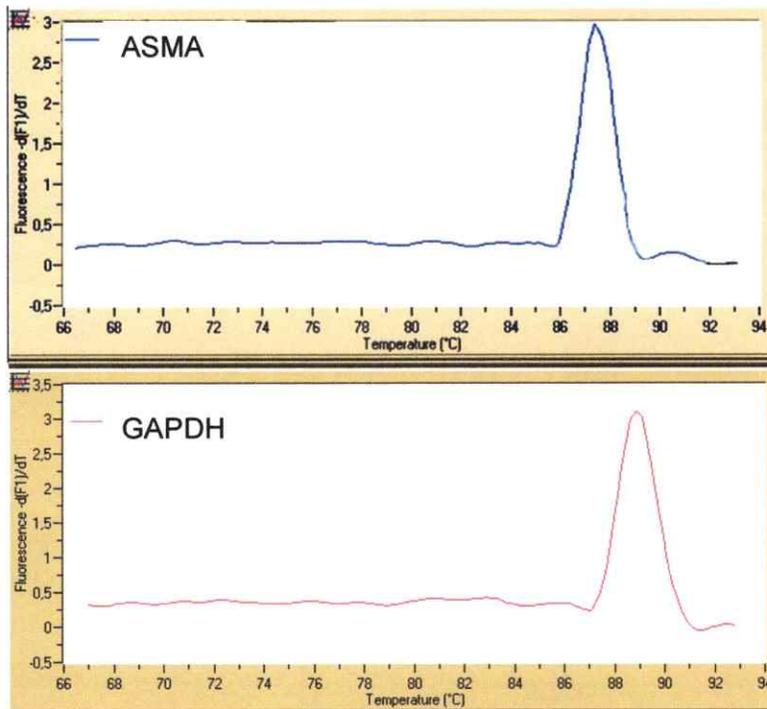


Figura 5. Morfología de MSC en cultivo confluyente. Fotografía tomada en microscopio de luz invertido con contraste de fase.

Como era de esperar, estas células efectivamente expresan ASMA y GAPDH, dado que tanto la T_m experimental como el tamaño obtenido en el análisis electroforético de los amplicones generados a partir de RNA aislado de estas células, coinciden con los valores teóricos esperados para éstos genes (Figura 6).

A



B

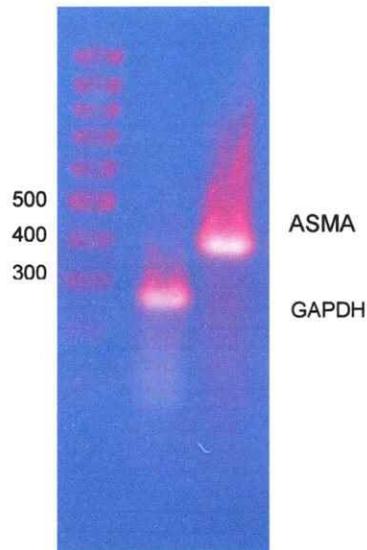


Figura 6. MSC expresan ASMA y GAPDH **A:** Análisis de T_m de los amplicones obtenidos para ASMA y GAPDH. La T_m empírica del amplicón de ASMA corresponde a $88 \pm 0,3$ °C mientras que la T_m del amplicón de GAPDH corresponde a $89 \pm 0,3$. **B:** Análisis electroforético de tamaño de los amplicones obtenidos para ASMA y GAPDH. Se observa que el tamaño empírico para gen GAPDH corresponde aproximadamente a 300pb, mientras que el tamaño empírico para ASMA corresponde aproximadamente a 400pb.

No se realizaron análisis cuantitativos, dado que la caracterización molecular se realizó en función de la expresión del gen ASMA y no de la cantidad de templado existente. Se utilizó PCR de tiempo real y análisis por Tm ya que ésta técnica es más sensible que el PCR convencional.

Cuando las células aisladas por la metodología aquí descrita se expusieron por 10 días al medio de diferenciación adipogénico, se observó la aparición de células en cuyo citoplasma se encuentran gotas de triglicéridos, los que se teñían específicamente con el colorante Oil Red O (Figura 7). En cambio las células sin estímulo de diferenciación no presentan gotas de triglicéridos, conservando su morfología fibroblastoide.

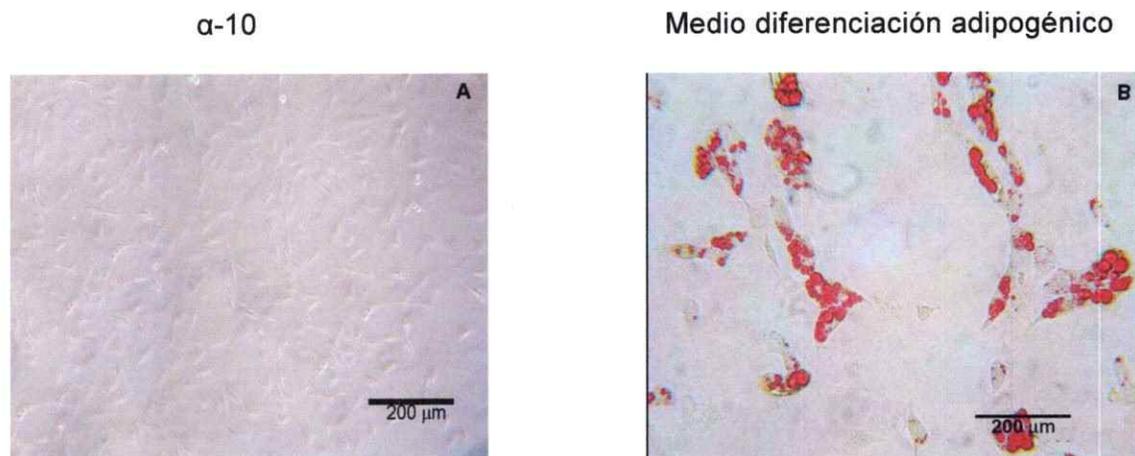


Figura 7. Diferenciación adipogénica de MSC. A: MSC cultivadas por 10 días sin estímulo de diferenciación y teñidas con el colorante Oil Red O (n=3). B: MSC cultivadas por 10 días con estímulo de diferenciación adipogénico y teñidas con el colorante Oil Red O (n=3). Fotografía tomada en microscopio de luz invertido con contraste de fase.

Estos resultados indican que células aisladas de médula ósea efectivamente tienen potencial de diferenciación adipogénico ya que *in vitro*, bajo las condiciones de diferenciación utilizadas, generan adipocitos.

Para evaluar el potencial de diferenciación al linaje osteogénico, las células se expusieron por 21 días al medio osteogénico y se evaluó la mineralización de la matriz extracelular. Efectivamente, bajo estas condiciones de cultivo fue posible generar osteoblastos que producen cristales de hidroxipatita observables al microscopio de luz invertido, los que se tiñen específicamente por el colorante Alizarin Red (Figura 8). Por su parte, las células mantenidas en α -10 no se tiñeron o lo hicieron discretamente, ya sea porque largo tiempo en cultivo a alta confluencia induce diferenciación espontánea o bien, muerte de algunas células (Figura 8).

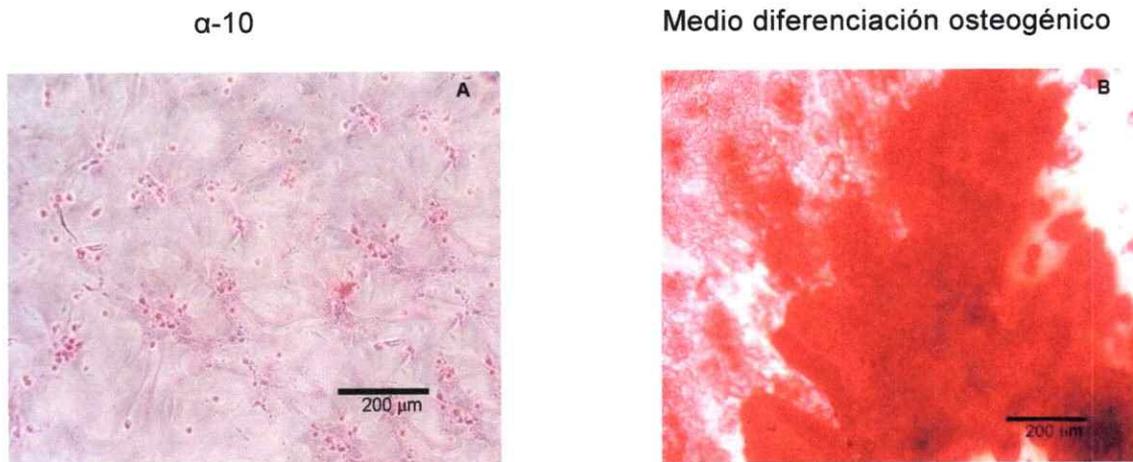


Figura 8. Diferenciación osteogénica de MSC.

A: MSC cultivadas durante 21 días sin estímulo de diferenciación teñidas con el colorante Alizarin Red (n=3). **B:** MSC cultivadas durante 21 días con estímulo de diferenciación osteogénico teñidas con el colorante Alizarin Red (n=3) Fotografías tomadas con el microscopio de luz invertido con contraste de fase.

Por lo tanto, las condiciones de cultivo implementadas en esta tesis permiten aislar MSC a partir de médula ósea de rata *Sprawley Dowley* adultas sanas.

2. Implementación de la técnica de IAM quirúrgico en ratas Sprawley Dowley adultas

En la presente tesis, el IAM se produjo mediante el ligamiento de la arteria coronaria izquierda descendente que irriga el ventrículo izquierdo siguiendo la técnica descrita por Piddo y colaboradores (Piddo y Col, 1996) (Figura 9), ya que está reportada como una técnica de baja mortalidad en ratas y tal que la mantención de los animales infartados no requiere soportes adicionales, lo que permite realizar estudios a diferentes tiempos post IAM. Además, es proclamada como altamente reproducible (Piddo y Col, 1996; Hu y Col, 1996).

En esta tesis, la sobrevivencia post-cirugía de las ratas infartadas fue de un 80% mientras que la sobrevivencia de ratas sham fue de un 85%. La muerte de las ratas se produjo principalmente durante la operación, siendo la principal causa insuficiencia respiratoria peri-operatoria. Al realizar la necropsia, se observó que 5/6 animales fallecidos mostraban evidencias de infección pulmonar por *Mycoplasma Pulmoni*.

En nuestras manos, la ligación de la arteria coronaria descendente resultó en un IAM en 87% de los animales operados, encontrándose en todos ellos una zona isquémica en el corazón (Figura 10.A y C). Además al realizar un corte transversal del ventrículo izquierdo, era posible observar un adelgazamiento de la pared ventricular producto del infarto (Figura 10.B y D). Ambas observaciones muestran que la intervención quirúrgica realizada efectivamente produjo un IAM en los animales de experimentación.

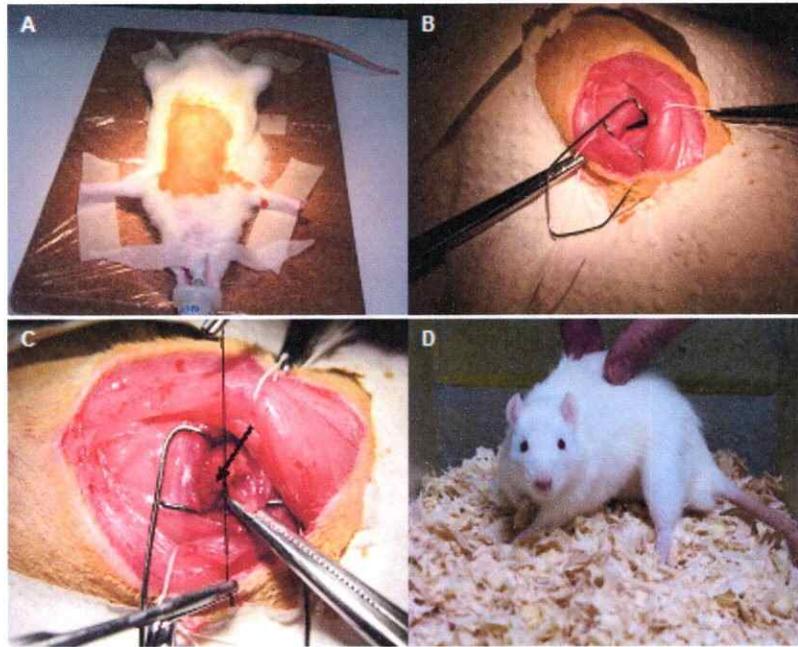


Figura 9. Intervención quirúrgica para producir un IAM. A: Rata anestesiada e intubada antes de ser intervenida. B: Pared intercostal antes de la ligación. C: Identificación y ligamiento de la arteria coronaria descendente, la flecha indica la rama coronaria izquierda descendente que se liga para producir el infarto quirúrgico en el ventrículo izquierdo. D: Rata 5 días después del procedimiento quirúrgico.

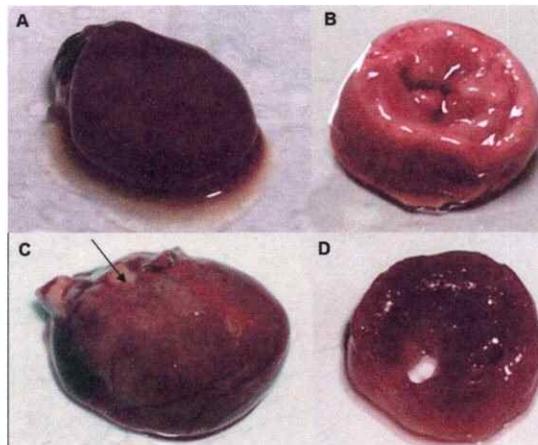


Figura 10. Macroscopía del corazón de una rata sham y de una infartada. A: Corazón de una rata sham. B: Corte transversal de ventrículo izquierdo de una rata sham. C: Corazón de una rata infartada. La flecha indica la escara blanca fibrosa producto del infarto. D: Corte transversal de ventrículo izquierdo de una rata infartada. Fotos obtenidas de corazones extraídos 7 días después del procedimiento quirúrgico.

3. Evaluación de la presencia de MSC en sangre periférica de ratas *Sprawley Dowley* adultas sanas, sham e infartadas.

Se obtuvo sangre periférica de ratas sanas, sham (1 y 5 días post operación) e infartadas (1, 3, 5 y 7 días post IAM). A partir de ella se separaron las células mononucleadas y se cultivaron en α -10. Entre los días 8-10 después de establecidos los cultivos, fue posible observar focos de células adherentes con diferentes grados de confluencia (Figura 11, 2da columna). Dado que, en la sangre periférica de individuos adultos se ha reportado la existencia de otras poblaciones celulares cultivables en particular HSC (Orlic y Col, 2001), osteoclastos (Yuasa y Col, 2007) y EPC (Asahara y Col, 1997), empíricamente se descartó su presencia en los cultivos analizados. Las HSC son células no adherentes, por lo tanto se eliminaron durante los cambios de medio. Los osteoclastos presentan una morfología característica observable al microscopio de luz invertido como células adherentes con forma "aplanada", por lo que las placas que presentaban dicho tipo de células fueron descartadas. Las EPC para poder sobrevivir y proliferar *in vitro* requieren de factores de crecimiento adicionales al SFB, por ejemplo VEGF (Quirici y Col, 2001), que no se incluyeron en los medios de cultivo utilizados.

La Figura 11 muestra que las células adherentes derivadas de la sangre periférica de individuos sanos, sham o 1 día post IAM no expresan ASMA, ni se diferencian a los linajes adipogénico y osteogénico. Por lo tanto, en estas situaciones no es posible detectar MSC en el torrente sanguíneo. En cambio, las células aisladas 5 días post IAM proliferan significativamente en presencia de SFB, expresan ASMA y se diferencian tanto a adipocitos como a osteoblastos, características necesarias y suficientes para fenotipificar a una célula como MSC (Horwitz y Col, 2006). En

consecuencia, en la presente tesis se muestra que las MSC endógenas efectivamente se movilizan después de un IAM.

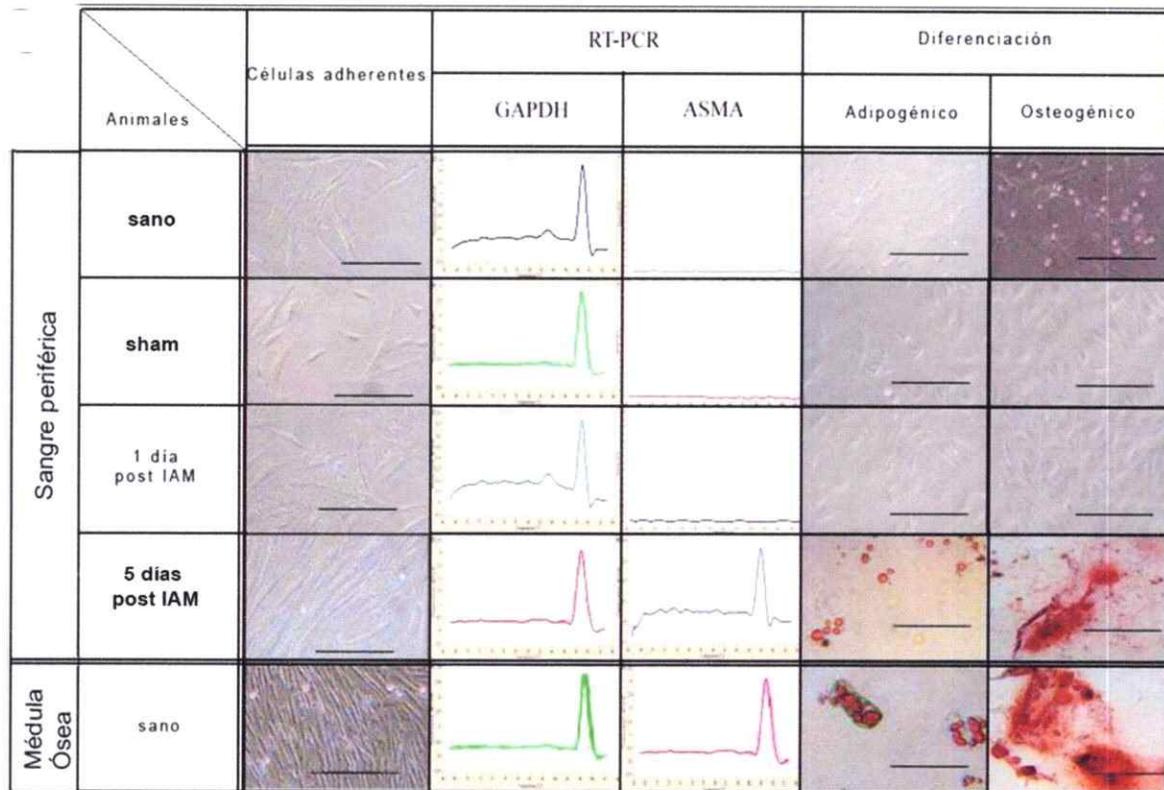


Figura 11. Movilización de MSC post IAM. Células adherentes provenientes de sangre periférica de ratas sanas (n=12), sham (n=10), 1 día post IAM (n=5) o 5 días (n=5) y MSC derivadas de médula ósea (n=3) de ratas las que fueron cultivadas sobre plástico en medio α -10 (2a columna), aislado su RNA y evaluada la expresión de los genes GAPDH y ASMA (3a y 4a columna, respectivamente), expuestas al medio de diferenciación adipogénico (5a columna) u osteogénico (6a columna) y teñidas con los colorantes Oil Red O o Alizarin Red, respectivamente. La barra corresponde a 100 μ m.

4. Comparación de la movilización de MSC a diferentes tiempos post IAM

Para evaluar la temporalidad de la movilización de MSC, se comparó el porcentaje de animales que efectivamente movilizaron MSC al día 1, 3, 5 y 7 post IAM. Como se observa en la Figura 12, los resultados muestran que la detección de MSC en la sangre de los animales infartados se hace significativa a partir del día 3 post IAM, aumenta al día 5, donde todos los animales excepto 1 (87%) movilizaron MSC y luego, disminuye al día 7. Existiendo una asociación entre el tiempo post IAM y la movilización de MSC ($\chi^2_3 = 8,6$; $p=0,03$).

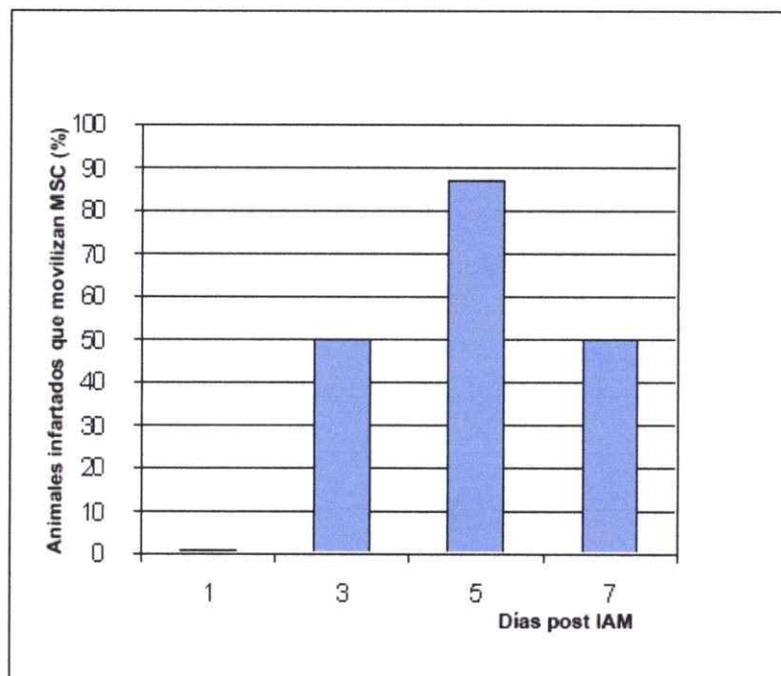


Figura 12. Temporalidad de la movilización de MSC. El gráfico muestra la frecuencia de animales infartados que movilizaron MSC a diferentes días post IAM. Se observa una asociación entre el tiempo post IAM y la detección de MSC en la sangre periférica de los individuos ($\chi^2_3 = 8,6$; $p=0,03$).

DISCUSIÓN

En la presente tesis se evaluó la movilización de MSC en ratas sanas, sham e infartadas. Para poder realizar este estudio, fue necesario implementar la técnica de IAM quirúrgico, la que se llevó a cabo mediante el ligamiento de la arteria coronaria descendente siguiendo el protocolo descrito por Piddo y colaboradores (Piddo y Col, 1996). Además se incluyó como grupo control de la operación, animales operados pero no infartados (sham), para poder descartar los posibles efectos de daño tisular en la movilización de MSC producto del procedimiento quirúrgico.

La ligación de la arteria coronaria fue exitosa en un 87% de los animales infartados, donde era observable la escara blanca fibrosa en el corazón infartado. Con respecto a la viabilidad de los animales post-cirugía, en el caso de las ratas infartadas fue de un 80% mientras que la sobrevivencia de las ratas sham fue de un 85%. La muerte de las ratas que eran sometidas a procedimientos quirúrgicos se produjo principalmente durante la operación, debido a una insuficiencia respiratoria producida por *Mycoplasma Pulmoni* y no por el infarto o de la operación en sí.

El hecho de que las ratas infartadas no mueran producto del IAM, se explica por el hecho de que las ratas adultas sanas, presentan una mayor anastomosis (mayor irrigación sanguínea) en el corazón que el ser humano, por lo que son capaces de sobrellevar mucho mejor un IAM (Anversa y Col, 1985).

Para determinar la presencia de MSC en el torrente sanguíneo, se realizaron cultivos primarios de sangre periférica de ratas infartadas, sham y sanas y las células adherentes obtenidas se caracterizaron de acuerdo a su capacidad de adhesión al plástico, proliferación en presencia de SFB, expresión del gen ASMA y diferenciación a adipocitos y osteoblastos (Minguell y Col, 2001; Stute y Col, 2004; Horwitz y Col, 2006).

Las condiciones de cultivo utilizadas permitieron eliminar HSC, osteoblastos y EPC. Ya que todas ellas requieren factores de crecimiento adicionales al SFB para poder sobrevivir y proliferar *in vitro* (Yuasa y Col, 2007; Quirici y Col, 2001). Descartar la contaminación de los cultivos por estas células era necesario debido a que se ha demostrado que las HSC se movilizan al torrente sanguíneo en respuesta a un IAM (Orlic y Col, 2001; Massa y Col, 2005). Además, los precursores de osteoblastos están presentes normalmente en el torrente sanguíneo de los individuos adultos (Yuasa y Col, 2007) y las EPC se movilizan en respuesta a situaciones de isquemia (Rosenzweig y Col, 2003; Massa y Col, 2005; Murasawa y Col, 2005).

A pesar que en todos los cultivos de sangre periférica se encontraron células adherentes con morfología fibroblastoide, sólo en aquellos provenientes de individuos infartados fue posible fenotipificar dichas células como MSC. En consecuencia, es posible afirmar que las MSC no circulan significativamente en individuos sanos y tampoco en individuos operados pero no infartados (sham) pero si, infartados. Dado que la detección de MSC en esta tesis, depende del establecimiento de un cultivo celular a partir de un volumen finito de sangre, no se puede descartar que algunas MSC circulen antes del día 3 o en individuos sanos o sham. De ocurrir sería en muy baja concentración, tal vez detectable con técnicas invasivas como la elutriación descrita por Zvaifler y Colaboradores (Zvaifler y Col, 2000). Así, en la presente tesis se muestra que sólo después de 3 post IAM se movilizan las MSC endógenas. Por lo tanto, sólo algunas señales de daño son capaces de inducir la movilización de MSC. En particular, aquellas producidas por el corazón isquémico y no por la piel mecánicamente dañada. En consecuencia, las señales que inducen la movilización de MSC hacia la sangre son específicas y el corazón es fuente de ellas (Vandervelve y Col, 2005). Aunque la identidad de estas señales es desconocida, es esperable que correspondan a moléculas de naturaleza proteica como: citoquinas, quimioquinas, proteasas o

moléculas de adhesión, involucradas en la movilización de las HSC dado que ambas células comparten el mismo nicho: la médula ósea (Papayannopoulou, 2004), siendo el principal candidato G-CSF (Kawada y Col, 2004). Sin embargo, durante el desarrollo de esta tesis se evaluó la presencia de MSC en la sangre de ratas sanas que recibieron G-CSF en un régimen que efectivamente moviliza HSC y no fue posible detectar MSC en ningún animal (datos no mostrados). Por lo tanto, se requieren de factores adicionales al G-CSF para promover la movilización de MSC. Los mecanismos propuestos que darían cuenta de la movilización celular incluyen la inducción de un proliferación masiva que resulta en el rebalse de las células o bien, la modificación de la matriz extracelular que permite la salida simultánea de distintos tipos celulares: HSC, EPC y MSC (Uchida y Col, 1997; Papayannopoulou, 2004; Kawada y Col, 2004; Vandervelve y Col, 2005; Vandervelve y Col, 2005).

Los estudios de temporalidad de la movilización de MSC post IAM, muestran un aumento en el porcentaje de individuos que movilizan MSC del día 1 al 5, que disminuyen al día 7; sugiriendo que existe una asociación entre el tiempo transcurrido después del daño isquémico y la aparición de MSC en la circulación periférica. Explicaría esta observación el hecho que los eventos involucrados en la movilización de MSC necesiten un tiempo relativamente largo para inducir la salida de un número significativo de MSC al torrente sanguíneo. La temporalidad mostrada en la presente tesis concuerda con lo documentado por Cancelas y colaboradores para la movilización de HSC, quienes observan que la administración de G-CSF produce un aumento en la cantidad de HSC en el torrente sanguíneo entre los días 4-6 después de suministrada la citoquina (Cancelas y Col, 2006).

Así, en la presente tesis, y por primera vez, se demuestra que las MSC endógenas son capaces de salir de su nicho y circular por vía hematológica. A la fecha, no se sabe si estas células contribuyen a la regeneración del miocardio infartado pero ha sido descrito que, incluso en humanos, que MSC exógenas si lo hacen (Chen y Col, 2004). Por lo tanto, puede vislumbrarse la movilización de MSC endógenas mediante la administración de los factores involucrados en dicho proceso, inmediatamente después del infarto, como una estrategia terapéutica que evitaría el remodelamiento y contribuiría a la regeneración del corazón infartado.

CONCLUSIONES

1. En individuos adultos, después de un IAM se movilizan MSC endógenas.
2. La movilización de MSC endógenas es inducida por el daño isquémico y no mecánico.
3. Existe una asociación entre el tiempo post IAM y el porcentaje de animales que movilizan MSC endógenas, sugiriendo que la movilización de MSC ocurre en una ventana temporal discreta.

PROYECCIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis, en conjunto con aquellos obtenidos en la tesis de pregrado de Carolina Cortés, donde se realizó proteómica diferencial de muestras de corazón y plasma obtenidos de ratas sanas, sham e infartadas, permitirá identificar los putativos factores que produce la movilización de las MSC después de un IAM. Si alguno de estos factores efectivamente promueve la movilización de MSC, podría utilizarse en una estrategia terapéutica para el IAM que consistiría en administrarlos inmediatamente después de producido el IAM, promoviendo así una cardiomioplastia *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- Anversa, P y Col, 1985. Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy, *Am. J. Pathol.* 118: 484-492.
- Ashara T. y Col, 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 275: 964-967.
- Ausoni S. y Col, 2005. Host derived circulating cells do not significantly contribute to cardiac regeneration in heterotopic rat heart transplants. *Card. Res.* 68: 394-404.
- Bigalli, D y Col., 2005. Cardiomioplastía celular para reparar tejido cardíaco: ¿un nuevo concepto terapéutico?. *Rev. Urug: Cardiol.* 20:158-170.
- Bonab, M. y Col, 2006. Aging of mesenchymal stem cell in Vitro. *BMC Cell Biol.* 10: 7-14.
- Cancelas, J. y Col, 2006. Stem cells mobilization by B2-agonists. *Nat Med.* 12: 278-279.
- Caplan A. Bruder S, 2001. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol. Med.* 7: 259-264.
- Caplan, I. 1994. The mesengenic process. *Clin Plast Surg.* 3: 429-435.
- Chen, L.B. y Col, 2004. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-Cells. *World J. Gastroenterol.* 10: 3016-3020.
- Chen, S. y Col, 2004. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 94: 92-95.
- Chu, S. y Col, 2005. Sex differences in expression of calcium-handling proteins and beta-adrenergic receptors in rat heart ventricle. *Life Sci.* 76: 2735-2749.
- Conget, P. Minguell, J. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 181: 67-73.
- Dimmeler, S. y Col, 2005. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J. Clin. Invest.* 115: 572-583.
- Fernandez, M. y Col, 1997. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transp.* 20: 265-271
- Futterman L. y Lemberg L, 2000. Update on management of acute myocardial infarction: facilitated percutaneous coronary intervention. *Am J Crit.* 9:70-76.

Grinnemo, H. y Col, 2004. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 127: 1293-1300.

Goette A y Col, 2006. Cardiac uptake of progenitor cells in patients with moderate-to-severe left ventricular failure scheduled for cardiac resynchronization therapy. *Eurospace.* 8: 157-160.

Hattan, N. y Col, 2004. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac graft in mice; *Card. Res:* 64: 334-344.

He Q, Wan Ch, LI G. 2007. Concise review: Multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem cells.* 25: 69-77.

Hermann, A. y Col, 2004. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci.* 117:4411-4422.

Hidemasa, H. y Col, 2003. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation and fusion after infarction. *Med Sci.* 100: 12313-12318.

Horwitz, E y Col, 2006. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 5: 5393 - 395

Horwitz, E. y Col, 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 5 : 309-313.

Hu, K. y Col, 1996. Changes of atrial natriuretic peptide in brain areas of rats with chronic myocardial infarction. *Am J Physiol.* 270:H312-h316.

Jian, W. y Col, 2004. Allograftic bone marrow derived mesenchymal stem cells transplanted into heart infarcted model of rabbit to renovate infarcted heart. *J. Zhejiang univ. Sci.* 10: 1279-1285.

Kawada, H. y Col, 2004. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood.* 104:3581-3587.

Koc, O.N.y Col, 2000. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 18: 307-316.

Lamoury, J. y Col, 2007. Human Mesenchymal Stem Cells Constitutively Express Chemokines and Chemokine Receptors That Can Be Upregulated by Cytokines, IFN-beta, and Copaxone. *J Interferon Cytokine Res.* 27: 53-64.

Le Blanc, K. Ringdén O, 2005. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cells transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 11: 321-334.

- Liu, C. y Col, 2006. Characteristics of ex vivo expansion of endothelial progenitor cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 26: 411-413.
- Mark F y Col, 2004. Mesenchymal Stem cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics. *Circ Res.*95: 9-20.
- Massa, M.y Col, 2005. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood.*105: 199-206.
- Minguell, J y Col, 2001. Mesenchymal Stem Cells. *Exp Biol Med.* 226: 507-520.
- Murry, C. y Col, 2004. Haematopoietic stem cells do not trasndifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts; *Nature.* 428: 664-668.
- Murasawa, S. and Asahara, T. 2005. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology.* 20: 36-42.
- Nagaya, N. y Col, 2004. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol.* 287: H2670-H2676.
- Orlic, D. y Col, 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 410: 701-705.
- Papayannopoulou, T. 2004. Current mechanistic scenarios in hematopoietic
- Park, F. y Col, 1997. Evidence for the presence of smooth muscle α -actin within perycytes of the renal medulla. *Am J Physiol* 42: 1742-1748.
stem/progenitor cell mobilization. *Blood.* 103: 1580-1585.
- Piddo, A. y Col, 1996. Cyclic AMP-dependent protein kinase and mechanical heart function in ventricular hypertrophy induced by pressure overload or secondary to myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 28:1073-1083.
- Pittenger, M. y Col, 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284: 143-147.
- Ratajczak, M. y Col, 2004. Heterogeneous populations of bone marrow stem cells--are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochem. Cytobiol.* 42: 139-146.
- Rochefort, G. y Col, 2006. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells.* 24: 2202-2208.
- Rojas, M. y Col, 2005. Bone marrow derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 33: 145-152.
- Rosenzweig, A. 2003. Endothelial progenitor cells. *New Engl J Med.* 348: 581-582.
- Stute, N. y Col, 2004. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol.* 32: 1212-1225.

Roufousee, C. y Col, 2004. Circulating mesenchymal stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 585-597.

Shang LL y Col, 2006. Analysis of arrhythmic potential of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes *Methods Mol Biol.* 330: 221 -231.

Silva, G. y Col, 2005. 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.

Quiling, H. y Col, 2007. Concise review: Multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells.* 25:69-77.

Quirici, N. y Col, 2001. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133⁺ cells. *Brit J Haematol.* 115: 186-194.

Tang, Y. y Col, 2005. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Am Thorac Surg.* 80: 229-236.

Uchida, N. y Col, 1997. The unexpected G0/G1 cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood. *Blood.* 89: 465-472.

Vandervelde, S. y Col, 2005. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 9: 363-376.

Yuasa, K y Col, 2007. Characterization of two types of osteoclasts from human peripheral blood monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 356: 354-360.

Wexler, S. y Col, 2003. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br. J. Haematol.* 121: 368-374.

Wu, G. y Col, 2003. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation.* 75: 679-685.

Zvaifler, N. y Col, 2000. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 6: 477-488.