

CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

Universidad Cardenal Herrera- CEU
Facultad de Ciencias de la Salud
Departamento de Ciencias Biomédicas

**Efecto de la citoquina pro-inflamatoria
Interleuquina-1 β (IL-1 β) y del factor de
transcripción inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α)
en la supervivencia y potencial terapéutico de
las células madre mesenquimales**

Tesis Doctoral

Realizada por: Inmaculada Cerrada Serra

**Dirigida por: Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis
Dra. Amparo Ruiz Saurí**

Tutor: Dr. Ignacio Pérez Roger



CEU
*Universidad
Cardenal Herrera*

Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis, Investigadora de la Fundación para la Investigación Hospital Universitario La Fe.

Dra. Amparo Ruiz Saurí, Servicio de Histología de la Universidad de Valencia.

Informan:

Que el trabajo de Tesis Doctoral realizado por Inmaculada Cerrada Serra que lleva por título “Efecto de la citoquina pro-inflamatoria Interleuquina-1 β (IL-1 β) y del factor de transcripción inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α) en la supervivencia y potencial terapéutico de las células madre mesenquimales” ha sido realizado en el laboratorio de regeneración y trasplante cardiaco de la Fundación para la Investigación del Hospital La Fe de Valencia bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia, a 10 de Septiembre de 2012.

Fdo: Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis

Fdo: Dra. Amparo Ruiz Saurí

V^oB^o Tutor: Dr. Ignacio Pérez Roger

AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado este momento tan esperado desde hace algún tiempo. Camino recorrido, trabajo realizado y experiencia adquirida. Y es que la tesis (bien lo sabe el que ha pasado la experiencia), más que de un camino se trata de una dura cuesta. Se disfruta “el mientras”, pero al final uno ya tiene ganas de llegar y poder mirar con perspectiva de nuevo. No en vano en Segovia hay una calle dedicada a todos los doctorandos...



Quisiera aprovechar estas líneas para agradecer a mis directoras de tesis Pilar Sepúlveda y Amparo Ruiz, la paciencia mostrada en mis momentos de aprendizaje y su confianza más tarde. Por ser un ejemplo a seguir mostrando constancia, perseverancia y lucha diarios. Por creer en la ciencia y no tirar nunca la toalla a pesar de los duros momentos, reafirmando algo que ya sabía: con pasión, lo difícil merece la pena y compensa.

A mi tutor, Ignacio Pérez Roger por sus valiosas críticas constructivas y hacerme comprender que la paciencia es una virtud.

A Cesar Trigueros y Akaitz Dorronsoro de la Fundación Inbiomed, por facilitarnos las células con las que se realizaron los experimentos de este trabajo.

A María Blanes, Bruno y el equipo del Instituto Tecnológico Textil Aitex por facilitarnos los biomateriales utilizados.

Quisiera dar las gracias al Dr. Felipe Prosper y a su equipo, por su colaboración en el modelo de adherencias pericárdicas.

Mi más sincero agradecimiento a Carlos Vila, sin el cual los experimentos en mamífero inferior habrían sido imposibles de realizar.

Amparo Hernandez, mi Amparito... esas horas de quirófano, no las cambio por nada. Gracias por saber escuchar, por tu ayuda, por enseñarme tus conocimientos sin reservas.

A mis compis de labo, Laura, Rubén, Nahuel, Esperanza, Mari Paz, Javi... hemos sufrido ERES, cambios de labo, momentos difíciles, pero también buenos ratos. Gracias por el trabajo en equipo, por vuestra ayuda y por haberme “soportado estoicamente”, especialmente los últimos meses.

A nuestros vecinos de Circulación Cerebral en La Fe, que supieron entender que los comienzos son difíciles y nos prestaron su ayuda desde el principio. Pasamos de ser vecinos a ser amigos.

A Fani, Bene, Susana, porque vuestro trabajo hizo más sencillo y agradable el mío. Gracias por vuestra buena voluntad y predisposición.

Delia, "mi última adquisición", has tenido que esperar tu turno... el de amigos. Has sido uno de los pilares fuertes durante estos años. No voy a explayarme porque bien lo sabes todo... Gracias.

Torpedos, Pitu, Nicola, Jenny, Anne, Alometa, María... sólo estando ahí y siendo vosotros me cambia el humor. Recordarme que la vida también es disfrutar de una cervecita al sol con los amigos, por evidente que parezca, se agradece.

Meri, a pesar de tantos años y tan lejos, siempre encontramos un hueco para estar juntas en los mejores y en los peores momentos. Este lazo ya no lo rompe nada. Gracias.

A mi nueva familia "Noon-Barlow", porque me siento como una más entre vosotros; os interesáis por cada paso que voy dando. Sois estupendos y me siento muy afortunada de formar parte de vuestro clan.

Padres, sois mi faro, mi punto de referencia; la estabilidad y seguridad que necesito cada vez que me lanzo en una nueva singladura. Sé que estáis cerca, aunque vuele libre. GRACIAS.

Pedro, Irene, os tengo cerca y sé que puedo contar con vosotros en cualquier circunstancia. Ya os lo dije antes... somos una piña y eso nos hace más fuertes. Así seguimos y para siempre.

Siempre presentes, los que ya no están y desearía con todas mis fuerzas que estuvieran. Formastéis parte de mi pasado y estaréis siempre conmigo.

Luke, me has llevado de la mano por tu mundo, el de la investigación, y has sabido transmitirme tu pasión por él. Gracias por tu ayuda, por tu ánimo, por tu paciencia, por tu serenidad y por tu risa. Eres lo mejor que me ha pasado.

No camines delante de mí,
porque no podría seguirte.

No camines detrás de mí,
porque podría perderte.

No camines debajo de mí,
porque podría pisarte.

No camines encima de mí,
porque podría sentir que me pesas.

Camina a mi lado, porque somos iguales.

Jorge Bucay

A Luke,
la suerte de mi vida

Y a todas las personas que padecen del corazón,
pues ellos son el motivo de este estudio



ÍNDICE

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	3
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL CORAZÓN.....	9
2.1.1 ANATOMÍA DEL CORAZÓN	9
2.1.2 EL CICLO CARDÍACO	10
2.1.3 EL RIEGO CORONARIO.....	10
2.2 EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO.....	11
2.2.1 EPIDEMIOLOGÍA	11
2.2.2 FISIOPATOLOGÍA DEL INFARTO DE MIOCARDIO	12
2.2.3 EL METABOLISMO DEL MIOCARDIO.....	13
2.2.4 FASES DEL INFARTO Y REMODELADO MIOCÁRDICO	13
2.3 DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO CONVENCIONAL DEL IAM.....	15
2.4 TERAPIAS AVANZADAS PARA EL TRATAMIENTO DEL IAM MEDIANTE EL USO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC)	16
2.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS MSC.....	16
2.4.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS MSC	17
2.4.3 INFLUENCIA DE LA HIPOXIA EN LOS MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA CELULAR.....	18
2.4.4 ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA EFICACIA TERAPÉUTICA DE LAS MSC	20
2.5 BIOMATERIALES Y TERAPIA CARDIOVASCULAR.....	21
2.5.1 INTRODUCCIÓN A LA INGENIERÍA TISULAR.....	21
2.5.2 ADHERENCIAS PERICÁRDICAS	22
2.5.3 TIPOS DE POLÍMEROS Y CARACTERÍSTICAS NECESARIAS PARA SU USO TERAPÉUTICO.....	23
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
4.1 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR	31
4.1.1 CULTIVO CELULAR.....	31
4.1.2 RECUENTO DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	32
4.1.3 MARCAJE CELULAR MEDIANTE TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL	32
4.1.4 TRATAMIENTO CON FACTORES.....	32
4.1.5 ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR.....	33

4.1.5.1 Migración frente a factores	33
4.1.5.2 Migración de Polimorfonucleares (PMNs)	33
4.1.5.3 <i>Ensayo de "Wound healing"</i>	34
4.1.6 ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR	34
4.1.7 CITOMETRÍA DE FLUJO	34
4.1.8 ENSAYO DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR	34
4.2 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES	35
4.2.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS	35
4.2.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	35
4.2.3 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	36
4.2.4 TRANSFERENCIA MEDIANTE WESTERN BLOT	36
4.2.5 EXTRACCIÓN DE ARN	38
4.2.6 CUANTIFICACIÓN DEL ARN	38
4.2.7 RT (TRANSCRIPCIÓN REVERSA) Y PCR EN TIEMPO REAL	39
4.2.7.1 Síntesis de ADNc: Transcripción reversa	39
4.2.7.2 Amplificación del ADNc en tiempo real (qPCR)	39
4.2.7.3 Análisis del producto de la qPCR	41
4.3 MICROARRAYS DE EXPRESIÓN	41
4.4 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	42
4.4.1 FIJACIÓN	42
4.4.2 OBTENCIÓN DEL BLOQUE PARA CRIOSTATO Y CORTE DEL TEJIDO	43
4.4.3 INCLUSIÓN EN PARAFINA Y CORTE DEL TEJIDO	43
4.4.4 TINCIONES DE TEJIDO CARDÍACO	44
4.4.4.1 Tinción de Hematoxilina-Eosina	44
4.4.4.2 Tinción de Tricrómico de Masson	44
4.4.4.3 Tinción de Tetrazolio	45
4.4.5 INMUNOCITOQUÍMICA	45
4.4.6 INMUNOHISTOQUÍMICA	46
4.4.6.1 Antígenos citoplasmáticos	47
4.4.6.2 Antígenos de citoesqueleto	48
4.4.7 REACCIONES ENZIMÁTICAS	49
4.4.7.1 EdU	49
4.4.7.2 TUNEL	49
4.4.7.3 Detección de fibras de actina mediante el ensayo de unión a Faloidina	49

4.5 TÉCNICAS DE IMAGEN.....	50
4.5.1 MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA	50
4.5.2 MICROSCOPIA CONFOCAL.....	50
4.6 TÉCNICAS MORFOMÉTRICAS	50
4.6.1 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL ÁREA INFARTADA.....	50
4.6.2 MEDIDA DE LA DENSIDAD VASCULAR	51
4.6.3 ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LOS CARDIOMIOCITOS	51
4.7 FABRICACIÓN DE LOS BIOMATERIALES.....	51
4.8 PROCEDIMIENTOS CON ANIMALES	52
4.8.1 MAMÍFERO INFERIOR	53
4.8.1.1 Modelo de infarto de miocardio	53
4.8.1.2 Parámetros de función cardíaca.....	54
4.8.1.3 Tratamiento con 5-Etínil-2'-deoxiuridina (EdU).....	55
4.8.1.4 Modelo de implante de biomaterial.....	56
4.8.1.5 Modelo de inducción de adherencias pericárdicas	56
4.8.2 MAMÍFERO SUPERIOR.....	57
4.8.2.1 Modelo agudo de infarto de miocardio.....	57
4.8.2.2 Modelo crónico de infarto y adherencias pericárdicas.....	59
4.8.2.3 Parámetros de función cardíaca.....	60
4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	61
5. RESULTADOS.....	65
CAPÍTULO 5.1: ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA IL-1β EN LAS MSC.....	65
5.1.1 REPERCUSIÓN DE LAS CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR DE LAS MSC.....	65
5.1.2 PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS MSC CULTIVADAS CON IL-1 β ..	66
5.1.3 EXPRESIÓN DE QUIMIOQUINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO POR LAS MSC.....	67
5.1.4 LA IL-1 β NO INDUCE PROLIFERACIÓN EN LAS MSC	71
5.1.5 LA MIGRACIÓN Y ADHESIÓN INDUCIDAS POR LA IL-1 β ESTÁ MEDIADA PRINCIPALMENTE POR LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NF-KB71	
5.1.5.1 La IL-1 β activa la molécula NF-kB.....	71
5.1.5.2 La IL-1 β induce la migración de las MSC	71
5.1.5.3 La IL-1 β induce la adhesión de las MSC	73
5.1.6 LAS MSC TRATADAS CON IL-1 β INDUCEN MAYOR RECLUTAMIENTO DE LEUCOCITOS <i>IN VITRO</i>	74

CAPÍTULO 5.2: ESTUDIO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL HIF-1 α EN MSC PARA POTENCIAR SU EFECTO TERAPÉUTICO 76

5.2.1 LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL HIF-1 α INDUCE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA Y EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MSC.....	76
5.2.2 EL HIF-1 α INDUCE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.....	79
5.2.3 LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL HIF-1 α INCREMENTA LA MIGRACIÓN Y LA ADHESIÓN CELULAR	79
5.2.4 EL HIF-1 α PROMUEVE LA MIGRACIÓN EN RESPUESTA A SEÑALES TRÓFICAS	81
5.2.5 LAS MSC-HIF MEJORAN LA FUNCIÓN CARDÍACA EN UN MODELO DE INFARTO DE MIOCARDIO	82
5.2.6 LAS MSC-HIF REDUCEN EL ÁREA DE TEJIDO FIBRÓTICO	87
5.2.7 LAS MSC-HIF INDUCEN ANGIOGÉNESIS.....	87
5.2.8 EL TRATAMIENTO CON MSC-HIF PROMUEVE LA REGENERACIÓN DE TEJIDO MIOCÁRDICO.....	88

CAPÍTULO 5.3: ESTUDIO DEL BIOMATERIAL ÁCIDO POLILÁCTICO COMO SOPORTE DE MSC PARA FAVORECER SU EFECTO TERAPÉUTICO 92

5.3.1 ESTUDIO DE BIOCOPATIBILIDAD DEL ÁCIDO POLILÁCTICO <i>IN VITRO</i> 92	
5.3.1.1 Análisis de la viabilidad celular sobre el biomaterial.....	92
5.3.1.2 Cuantificación celular sobre los biomateriales.....	93
5.3.2 ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL BIOMATERIAL <i>IN VIVO</i>	94
5.3.2.1 Técnica quirúrgica para la fijación del biomaterial	94
5.3.2.2 Estudio de biodegradabilidad del PLA.....	95
5.3.2.3 Estudio de la infiltración y biocompatibilidad <i>in vivo</i>	96
5.3.2.4 Estudio de la neovascularización <i>in vivo</i>	97

CAPÍTULO 5.4: ESTUDIO DE PREVENCIÓN DE ADHERENCIAS PERICÁRDICAS 98

5.4.1 MODELO MURINO DE INDUCCIÓN DE ADHERENCIAS PERICÁRDICAS..	98
5.4.2 MODELO PORCINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO	100
5.4.2.1 Cambios macroscópicos.....	101
5.4.2.2 Función cardíaca global.....	102
5.4.2.3 Función cardíaca regional	103
5.4.2.4 Marcadores bioquímicos de necrosis miocárdica	105
5.4.2.5 Análisis morfométrico del tejido infartado	105
5.4.2.6 Tinción de Hematoxilina-Eosina	106
5.4.2.7 Evaluación de la apoptosis	107
5.4.3 MODELO CRÓNICO DE INFARTO Y DE ADHERENCIAS PERICÁRDICAS	108
5.4.3.1 Función cardíaca global.....	109

5.4.3.2 Evaluación de la función cardíaca mediante ecocardiografía.....	109
5.4.3.3 Marcadores bioquímicos de necrosis miocárdica	112
5.4.3.4 Valoración macroscópica de las adherencias pericárdicas	113
5.4.3.5 Estudio del remodelado ventricular	113
5.4.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOMATERIALES PARA PREVENIR LA GENERACIÓN DE ADHERENCIAS PERICÁRDICAS	116
5.4.4.1 Función cardíaca global.....	116
5.4.4.2 Evaluación de la función cardíaca mediante ecocardiografía.....	117
5.4.4.3 Marcadores bioquímicos de necrosis miocárdica	118
5.4.4.4 Valoración macroscópica de las adherencias pericárdicas	118
5.4.4.5 Estudio del remodelado ventricular	119
6. ANEXOS	125
6.1: MICROARRAYS	125
6.2 USO DE CÉLULAS MADRE.....	139
7. DISCUSIÓN.....	143
7.1 COMPORTAMIENTO DE LAS MSC EN ENTORNOS INFLAMATORIOS	143
7.2 MECANISMOS TERAPÉUTICOS DE LAS MSC.....	144
7.3 POTENCIACIÓN DE LAS MSC EN EL TRATAMIENTO DEL IAM.....	145
7.4 ELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL	148
7.5 BIOMATERIALES.....	150
7.6 ADHERENCIAS PERICÁRDICAS.....	152
8. CONCLUSIONES.....	157
9. BIBLIOGRAFÍA.....	161
10. PUBLICACIONES.....	175



ABREVIATURAS

1. ABREVIATURAS

1^{ario}: Primario

2^{ario}: Secundario

ACDAI: Arteria coronaria descendente anterior izquierda

ACTB: Actinomicina beta

AD: Aurícula derecha

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AG: Anestesia general

AI: Aurícula izquierda

ANGPT1: Angiopoyetina 1

ANGPT2: Angiopoyetina 2

APLN: Apelina

ARN: Ácido ribonucleico

AVId: Área del ventrículo izquierdo al final de la diástole

AVIs: Área del ventrículo izquierdo al final de la sístole

BCA: Ácido bicinconínico

bHLH: Basic helix-loop-helix

BM: Biomaterial

BSA: Albúmina del suero bovino

CEBA: Comité de ética y de bienestar animal

CK-MB: Creatinina Quinasa (Isoenzima MB)

CM: Cardiomiocitos

COL: Colágeno

CPA: Cambio porcentual de área

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo

D.O.: Densidad óptica

D: Derivada

DAPI: 4',6 Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

DVId: Diámetro del ventrículo izquierdo al final de la diástole

DVIs: Diámetro del ventrículo izquierdo al final de la sístole

DMEM: Medio de Eagle Modificado de Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

dP/dt-: Derivada de la presión con respecto al tiempo mínima negativa

dP/dt+: Derivada de la presión con respecto al tiempo máxima positiva

DS: Desviación estándar

ECG: Electrocardiograma

ECM: Matriz extracelular
EDTA: Ácido etilendiaminotetracético
EdU: 5-etinil-2'-deoxiuridina
EPA: Engrosamiento de la pared anterior
ERK $\frac{1}{2}$: Quinasas reguladas por señal extracelular $\frac{1}{2}$
ES: Error estándar
FA: Fracción de acortamiento
FBS: Suero bovino fetal
FC: Frecuencia cardíaca
FE: Fracción de eyección
FGF: Factor de crecimiento fibroblástico
FGF-2: Factor de crecimiento fibroblástico-2
FI Ao: Flujo de aorta
FN: Fibronectina
G: Gauge
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC: Gasto cardíaco
GFP: Proteína verde fluorescente
GPAd: Grosor de la pared anterior al final de la diástole
GPAs: Grosor de la pared anterior al final de la sístole
GPER: Receptor 30 de la proteína de acoplamiento G
GPPd: Grosor de la pared posterior al final diástole
GPPs: Grosor de la pared posterior al final sístole
H-E: Hematoxilina-Eosina
HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia-1 α
HREs: Elementos de respuesta a hipoxia
HRP: Peroxidasa de rábano picante
HSCs: Células progenitoras hematopoyéticas
I/R: Isquemia/reperfusión
IAM: Infarto agudo de miocardio
IBSP: Sialoproteína de unión a integrina
ICAMs: Moléculas de adhesión intracelular
IGF: Factor de crecimiento insulínico
IKK β : Quinasa inhibidora de I kappa β
IL-1 β : Interleuquina-1 β
IL-6: Interleuquina-6
IL-8: Interleuquina-8

IP: Intraperitoneal
Isq: Isquemia
IV: Intravenoso
Izq: Izquierda
JNK: Quinasas N-terminal Jun
Kg: Kilogramos
Lat: Lateral
LN: Laminina
lpm: Latidos por minuto
LTd: Longitud telediastólica
LTs: Longitud telesistólica
M: Molar
MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
mmHg: Milímetros de mercurio
MSC: Células madre mesenquimales
MSC-HIF: Células madre mesenquimales que sobre-expresan el factor inducible por hipoxia-
1 α
MSC-shIKK β : Células madre mesenquimales con silenciamiento para la quinasa inhibidora
de Ikappa β
MTT: 3-(4, 5-Dimetil tiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
N₂: Nitrógeno
NGS: Suero de cabra normal
Nº: Número
NT-ProBNP: Fragmento N terminal del precursor del péptido natriurético cerebral
Oligo: Oligonucleótido
P/E: Penicilina/ Estreptomycinina
P: Pared
P100: Placas de 10 centímetros de diámetro
p38MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos p38
PAI: Presión de la aurícula izquierda
PB: Tampón fosfato
PBS: Tampón fosfato salino
PC: Punto de corte
PDGFB: Factor de crecimiento derivado de plaquetas beta
PFA: Paraformaldehído
PHD: Proil hidroxilasas

PLA: Ácido L-Poliláctico
PLGF: Factor de crecimiento placentario
PMNs: Polimorfonucleares
PsVI: Presión sistólica del ventrículo izquierdo
PTdVI: Presión telediastólica del ventrículo izquierdo
PVDF: Fluoruro de polivinilideno
pVHL: Proteína de supresión tumoral von Hippel-Lindau
Repf: Reperfusión
rpm: Revoluciones por minuto
RT-qPCR: Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SALINO: Suero salino fisiológico
SAPK: Proteínas quinasas activadas por estrés
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida-sodiododecilsulfato
Seg: Segundo
shRNA: ARN de silenciamiento
SPF: Libre de patógenos específicos
T/E: Tripsina/EDTA
TBS: Tampón tris salino
TBST: Tampón tris salino con tween-20
TdT: Transferasa deoxinucleotídica Terminal
TGF β : Factor de crecimiento transformante β
TIV: Tabique interventricular
TLRs: Receptores de tipo Toll
Tn T: Troponina T cardíaca
Tn I: Troponina I cardíaca
TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α
TTZ: Cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio
U: Unidades
V: Voltios
VCAMs: Moléculas de adhesión vascular
VD: Ventrículo derecho
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR-2: Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
VI: Ventrículo izquierdo
Vol: Volumen
vs: Versus
WB: Western-blot



INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL CORAZÓN

2.1.1 ANATOMÍA DEL CORAZÓN

La función del corazón es bombear la sangre hacia el organismo para aportar oxígeno y nutrientes a los tejidos.

El corazón está formado por 4 cámaras (2 aurículas y 2 ventrículos). El lado izquierdo y derecho del corazón están completamente separados por un tabique compuesto por una zona interauricular y otra interventricular. El corazón derecho recibe a través de la aurícula derecha (AD) sangre venosa procedente del organismo, que a su vez es impulsada al ventrículo derecho (VD) a través de la válvula tricúspide. El VD propulsa la sangre a través de la válvula pulmonar por la arteria pulmonar a los pulmones; la sangre es oxigenada y pasa a la aurícula izquierda (AI) donde es impulsada al ventrículo izquierdo (VI) a través de la válvula mitral. Una vez el VI ha recibido la sangre, ésta es impulsada a la circulación periférica por la aorta para cubrir las necesidades de oxígeno y nutrientes del organismo (Figura 1).

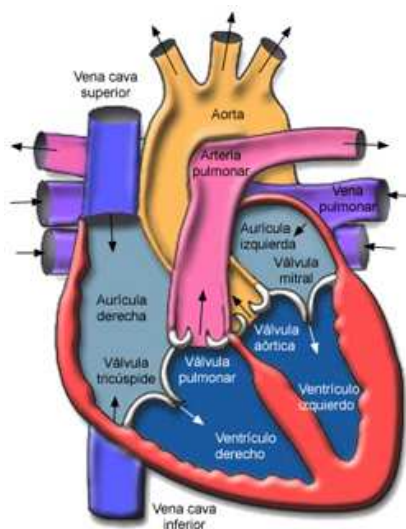


Figura 1. Morfología cardíaca. Las flechas indican la dirección del flujo sanguíneo a su paso por los vasos, las cavidades cardíacas y las válvulas. (Tomado de <http://imagenes.mailxmail.com/>).

A nivel histológico, el corazón está formado por varias capas. De dentro a fuera se sitúa en primer lugar el endocardio; se trata de una membrana serosa de endotelio y tejido conectivo, que recubre las cavidades y válvulas del corazón. A continuación encontramos el miocardio, que está formado principalmente por músculo estriado y cuya función principal es impulsar la sangre hacia el torrente circulatorio. La contracción del miocardio está controlada por la descarga espontánea de unas células musculares modificadas denominadas células

marcapasos. En la parte más externa se localiza el epicardio, una capa fina serosa de naturaleza mesotelial. Finalmente, el pericardio es una bolsa membranosa que envuelve al corazón y lo mantiene en una posición fija y además evita o minimiza la fricción en cada latido cardíaco (Kierszenbaum 2002).

2.1.2 EL CICLO CARDÍACO

El ciclo cardíaco consta de dos fases: la diástole, en la cual se produce el llenado del corazón y la sístole, período de contracción activa. Cada ciclo es activado por un potencial de acción que se inicia en el nodo sinusal, localizado en la AD, el cual viaja rápidamente a través de ambas aurículas y continúa por el Haz de Hiss y las fibras de Purkinje (Figura 2). De este modo, las aurículas se contraen antes que los ventrículos teniendo una función de “bombas cebadoras” de éstos, mientras que los ventrículos son la principal potencia para producir la circulación de la sangre por el organismo.

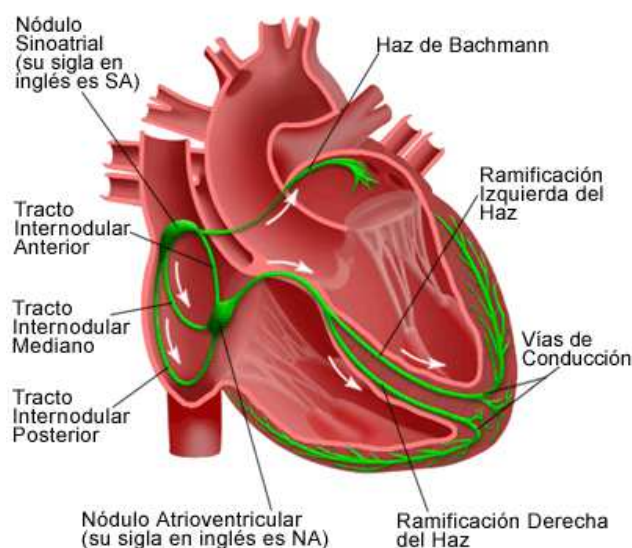


Figura 2. Sistema eléctrico del corazón. Diagrama del patrón de la actividad eléctrica del corazón con cada latido. (Tomado de <http://www.childrenscentralcal.org>).

2.1.3 EL RIEGO CORONARIO

Los vasos coronarios son los encargados de asegurar la irrigación del corazón. La arteria coronaria izquierda cubre el aporte nutritivo y de oxígeno de la parte anterior y lateral del ventrículo izquierdo (VI) y se ramifica en dos arterias principales, la arteria circunfleja y la arteria descendente anterior izquierda (ADAI). Por otra parte, la arteria coronaria derecha irriga prácticamente todo el ventrículo derecho (VD) además de la parte posterior del VI. El seno coronario recibe la mayor parte de la sangre venosa del VI, mientras que la sangre venosa del VD es drenada a través de las venas cardíacas anteriores (Figura 3).

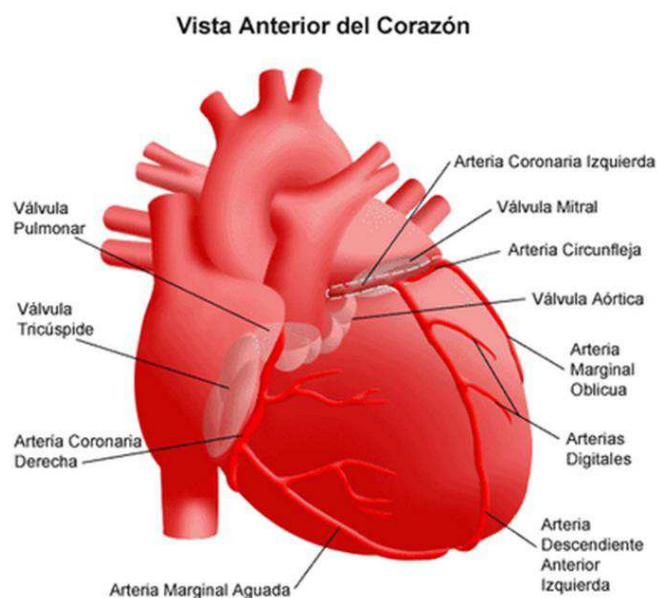


Figura 3. Irrigación coronaria del corazón. (Tomado de <http://www.rush.edu>).

La regulación del flujo sanguíneo coronario depende principalmente de la necesidad de oxígeno por parte del miocardio, de modo que el flujo sanguíneo aumentará en proporción al consumo metabólico de oxígeno por el corazón. Por otra parte el sistema nervioso autónomo también tiene un efecto directo sobre la vascularización coronaria, siendo las fibras nerviosas parasimpáticas (vagales) vasodilatadoras, mientras que la inervación simpática (adrenalina y noradrenalina) puede tener efecto vasoconstrictor o vasodilatador (Armour 1999).

2.2 EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

2.2.1 EPIDEMIOLOGÍA

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte y de hospitalización en los países desarrollados. En España, el 31% del total se debe a la cardiopatía isquémica, siendo el infarto agudo de miocardio (IAM) la principal causa de muerte. En el mundo, cada año más de 7 millones de personas sufren infarto de miocardio (Lloyd-Jones *et al.* 2009).

Debido a la mayor supervivencia gracias a los avances en el campo de la cirugía cardíaca, el número de pacientes crónicos con patología cardiovascular ha aumentado. Por otra parte, la mortalidad continúa siendo del 50% en aquellos pacientes en los que han transcurrido 5 años tras haber sufrido un fallo cardíaco congestivo. Así pues estas cifras, además de suponer un drama para la sociedad, conllevan un gasto sanitario directo importante así como un gasto colateral derivado del absentismo laboral. Por tanto, encontrar

una solución definitiva para el tratamiento del IAM sería muy beneficioso para la sociedad, además de muy ventajoso económicamente (Monnet y Chachques 2005).

2.2.2 FISIOPATOLOGÍA DEL INFARTO DE MIOCARDIO

La cardiopatía isquémica se produce como consecuencia de un flujo coronario insuficiente, con el consiguiente déficit en el aporte de oxígeno para cubrir las necesidades metabólicas del miocardio. Las dos principales causas que reducen el flujo coronario originando como consecuencia cardiopatías isquémicas son: la aterosclerosis y la oclusión coronaria aguda (Libby y Theroux 2005).

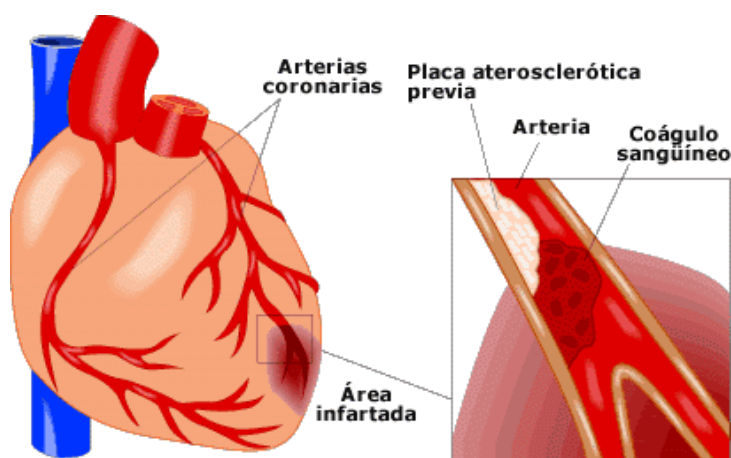


Figura 4. Infarto de miocardio provocado por el depósito de una placa de ateroma con posterior formación de un trombo en la arteria coronaria. (Tomado de <http://saludbio.com/sites/default/files/images/infarto%20de%20miocardio>).

La aterosclerosis es una patología que se produce por el depósito progresivo de colesterol en la zona subendotelial de las arterias, principalmente de las coronarias. Posteriormente el tejido fibroso invade esa zona y se forman placas de ateroma, provocando una obstrucción total o parcial del flujo sanguíneo (Figura 4) (Glass y Witztum 2001).

La oclusión coronaria aguda ocurre frecuentemente en personas con una cardiopatía aterosclerótica coronaria grave subyacente y se debe a varios procesos. Entre ellos a la obstrucción de la arteria por la formación de un coágulo (trombo) originado por el depósito de células sanguíneas y fibrina sobre la superficie rugosa de las placas de ateroma, que crece hasta provocar la obstrucción de la luz del vaso. En ocasiones el trombo se desprende (pasando a denominarse émbolo) y circula por la sangre hasta obstruir un vaso cuyo diámetro es menor que el suyo propio (Furie y Furie 2008).

2.2.3 EL METABOLISMO DEL MIOCARDIO

El miocardio sano, en condiciones normales y de reposo, obtiene el 70% de la energía que necesita del metabolismo de los ácidos grasos. Sin embargo, la oclusión de una arteria coronaria origina el cese brusco de la perfusión regional dejando dicha zona sin aporte de oxígeno ni nutrientes e impidiendo el lavado de metabolitos provenientes de la respiración celular (Karlstaedt *et al.* 2012). A medida que las mitocondrias van consumiendo el oxígeno disponible para generar ATP (molécula de alto contenido energético que impulsa la mayoría de las reacciones celulares que requieren energía), va dando lugar a condiciones anaerobias o isquémicas con el consiguiente cambio en la vía de obtención de la energía. Así pues, se produce el cese del metabolismo de ácidos grasos y comienza la glucólisis anaerobia, que conlleva la acumulación de iones hidrógeno y la producción de lactato, provocando acidosis tisular.

La pérdida de adenina (compuesto obtenido a través de la degradación del ATP) conlleva una alteración celular grave y es una de las causas principales de muerte de cardiomiocitos tras la isquemia (Rosano *et al.* 2008). Funcionalmente estos cambios se acompañan de una rápida pérdida de contractilidad de la región afectada y anomalías eléctricas que pueden conducir a arritmias graves. Si estos cambios no son revertidos a tiempo, se producirá finalmente la necrosis del tejido hipóxico.

2.2.4 FASES DEL INFARTO Y REMODELADO MIOCÁRDICO

La pérdida de viabilidad celular se produce entre 20 y 40 minutos después de ocurrir el cese del flujo sanguíneo por la oclusión coronaria. Este proceso conlleva la muerte celular, lo que se denomina infarto agudo de miocardio (IAM).

Durante su fase inicial, el descenso de los niveles de oxígeno desencadena una liberación de contenidos celulares por parte de los miocitos dañados. Esto provoca una respuesta inflamatoria aguda mediada, entre otros, por la liberación de Interleuquina-1 β (IL-1 β) y del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), principalmente por parte de macrófagos residentes y neutrófilos.

La IL-1 β es un importante mediador en la respuesta inflamatoria, además de jugar un papel significativo en actividades celulares tales como apoptosis. Tanto la IL-1 β como el TNF- α inducen la expresión de moléculas de adhesión y de otras citoquinas que atraen a células inflamatorias hacia el sitio de la lesión; además estimulan la proliferación de células endoteliales y fibroblastos, que aumentan el aporte sanguíneo en la zona isquémica y contribuyen a la formación del tejido cicatricial respectivamente.

Durante el IAM, se produce la muerte de las fibras musculares de la zona central del área donde no hay flujo sanguíneo. Así pues, el tejido miocárdico de esta zona no es funcional (aquínético/disquínético) puesto que no es capaz de contraerse adecuadamente y

además hay fallo del impulso nervioso. Alrededor de esta zona existe una franja en la que el músculo cardíaco se contrae con debilidad (hipoquinético o aturdido), debido a la isquemia leve. A medida que va pasando el tiempo (entre unos días y tres semanas) la aparición de circulación colateral hace que parte de las fibras localizadas en el perímetro exterior de esta zona se recupere, mientras que las fibras musculares localizadas en el interior, que sufren isquemia prolongada, acaban muriendo aumentando así el área de la zona necrótica.

La reabsorción del tejido necrótico y por tanto el remodelado ventricular, se ve favorecida por la sobre-expresión de IL-1 β , junto con IL-6 (cuya secreción se ve inducida por TNF- α) en la fase aguda del IAM. Este tejido necrótico va siendo reemplazado progresivamente por tejido conectivo fibrótico, que se va contrayendo hasta convertirse en una cicatriz fibrosa más pequeña a lo largo del tiempo (meses o años).

Por el contrario, las zonas sanas del miocardio se hipertrofian para compensar en la medida de lo posible la pérdida de músculo cardíaco. A pesar de ello se produce una disminución del gasto cardíaco, ya que la capacidad de bombeo del ventrículo afectado disminuye. Este efecto se ve exacerbado por la distensión sistólica (Figura 5). Este fenómeno consiste en que en cada sístole el tejido miocárdico sano se contrae, mientras que la zona isquémica, que ha perdido su capacidad contráctil, es incapaz de soportar la presión interna del ventrículo y es empujada al exterior, disipando parte de la fuerza de bombeo para impulsar la sangre desde el ventrículo hacia la circulación (Prinzmetal *et al.* 1949).

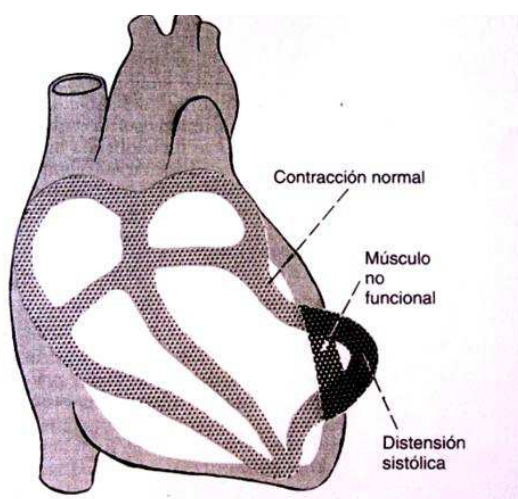


Figura 5. Distensión sistólica en una zona isquémica del miocardio. (Tomado de Guyton (1996)).

Así, la sobrecarga sobre la zona sana va provocando en las zonas adyacentes cambios como hipertrofia celular y dilatación ventricular, con el consiguiente deterioro de la función cardíaca. Al conjunto de estos cambios estructurales junto con el adelgazamiento de la pared ventricular infartada, se le denomina remodelado ventricular. Además, la cicatriz

miocárdica es un factor de riesgo para padecer arritmias, ya que la conducción del impulso eléctrico en esta zona es más lenta que en el tejido sano o incluso se encuentra bloqueada (Sutton y Sharpe 2000; Frantz *et al.* 2009).

Con el tiempo, la afectación de la función cardíaca desencadena una insuficiencia cardíaca, que se define como la incapacidad del corazón para bombear la cantidad de sangre necesaria para cubrir las demandas de oxígeno y nutrientes del organismo.

2.3 DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO CONVENCIONAL DEL IAM

Para diagnosticar un IAM es importante integrar la historia clínica con el examen físico del paciente. Además de esto son esenciales las siguientes pruebas complementarias: el electrocardiograma (ECG), los marcadores enzimáticos y la ecocardiografía.

Los principales signos clínicos que aparecen en un IAM son: dolor en el pecho que se puede irradiar o proyectar al brazo izquierdo y/o zona izquierda del cuello, disnea (dificultad respiratoria), náuseas, vómitos, palpitaciones, sudor y ansiedad. No obstante, hay que señalar que aproximadamente una cuarta parte de los IAM son asintomáticos (Alpert *et al.* 2000).

El ECG consiste en un examen no invasivo mediante el cual se obtiene en papel la actividad eléctrica del corazón. En caso de infarto se podrán observar cambios en el trazado; típicamente se produce una elevación o depresión del segmento ST (Channer y Morris 2002; Morris y Brady 2002).

Además, es fundamental la toma de muestras sanguíneas para medir los marcadores enzimáticos de daño miocárdico; se trata de proteínas que pasan a sangre desde el cardiomiocito a través de su membrana celular dañada. En la actualidad se utilizan CK-MB (un subtipo de la enzima Creatinina Quinasa) y Troponinas cardíacas T e I, ya que son las más específicas para el diagnóstico de daño miocárdico (Babuín y Jaffe 2005; Jiang *et al.* 2011).

Por último, la ecocardiografía nos dará una información muy valiosa sobre el estado del parénquima miocárdico y su función contráctil (Sabia *et al.* 1991; Gao *et al.* 2000).

Las modalidades terapéuticas actuales para el tratamiento del infarto agudo de miocardio son limitadas y van desde el tratamiento médico en la fase aguda, hasta la aplicación de dispositivos de asistencia mecánica al ventrículo izquierdo y el trasplante de corazón (Anderson *et al.* 2011).

Los objetivos del tratamiento en la fase aguda del infarto son detener la progresión del infarto, reducir las demandas al corazón, controlar el dolor y evitar complicaciones. El tratamiento convencional se basa en el uso de ácido acetilsalicílico, oxígeno, analgésicos, nitroglicerina y β -bloqueantes (Kjekshus 1986; Alhaddad *et al.* 1995; Mahmarian *et al.* 1998).

El siguiente paso tras estas medidas iniciales, es la reperfusión de la arteria coronaria bloqueada, ya sea de manera farmacológica (trombolisis) o de forma mecánica (angioplastia) o ambas (Jeremy *et al.* 1987; Sakai *et al.* 2003).

El trasplante de corazón es hoy en día el único método realmente eficaz para tratar la insuficiencia cardíaca descompensada producida como consecuencia de un IAM. Sin embargo, este procedimiento está limitado por la escasez de órganos y las complicaciones que la necesaria terapia inmunosupresora crónica conlleva (Lindenfeld *et al.* 2005). Así, el desarrollar estrategias terapéuticas alternativas al trasplante constituye un importante reto y cualquier método capaz de reparar o regenerar el miocardio dañado o isquémico, contribuiría de forma muy significativa al tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

2.4 TERAPIAS AVANZADAS PARA EL TRATAMIENTO DEL IAM MEDIANTE EL USO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC)

Recientemente se ha demostrado que el corazón no es un órgano post-mitótico sino que es capaz de auto-regenerarse, aunque de una manera muy limitada e insuficiente (Beltrami *et al.* 2003; Bergmann *et al.* 2009). Para promover una mayor recuperación es necesario un aporte externo, en el que además de restaurar el flujo sanguíneo para limitar el área afectada, se propicie la regeneración del tejido dañado.

Así, viendo la limitada capacidad de regeneración del corazón, surgió la idea de las llamadas terapias avanzadas, que han consistido en el uso de células madre autólogas para reparar y regenerar el miocardio dañado. Sin embargo, en la mayoría de ocasiones, bajo esta denominación se han utilizado poblaciones heterogéneas poco enriquecidas en células troncales adultas, como es el caso de las células de médula ósea mononucleadas y los mioblastos esqueléticos autólogos. Esto se debe a que los estudios clínicos han tratado de utilizar poblaciones celulares poco manipuladas en el laboratorio, asumiendo que el bajo porcentaje de células madre infundidas (alrededor del 3% de MSC en una muestra de médula total) sería capaz de reparar el infarto (Menasche 2011).

2.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS MSC

Las MSC son células adultas multipotenciales identificadas por primera vez por Friedenstein y colaboradores (Friedenstein *et al.* 1974) y aisladas del estroma de médula ósea por Pittenger y colaboradores (Pittenger *et al.* 1999). Estas células pueden aislarse a partir de médula ósea, sangre periférica adulta, piel, pulpa dental, membrana sinovial, músculo esquelético, hígado, pulmón, sangre de cordón umbilical, líquido amniótico y placenta, tejido adiposo, tejido óseo y tejido osteocondral, entre otros (Williams *et al.* 1999; Erices *et al.* 2000; Gronthos S 2000; De Bari *et al.* 2001; Kuznetsov *et al.* 2001; Toma *et al.*

2001; Zuk *et al.* 2001; In 't Anker *et al.* 2003; In 't Anker *et al.* 2004; Lama *et al.* 2007; Najimi *et al.* 2007; Hass *et al.* 2011).

Las células troncales adultas de tipo mesenquimatoso han suscitado interés como adyuvante para el tratamiento del IAM ya que son relativamente fáciles de aislar y expandir y pueden obtenerse del propio paciente. Además, las MSC son poco inmunogénicas ya que presentan bajo nivel de expresión en su superficie de moléculas MHC clase Ia y MHC clase II, con ausencia de respuesta de células T en entorno alogénico. Además son capaces de ejercer mecanismos de inmunosupresión por modulación de la respuesta inmune innata y celular.

Características fenotípicas

Los marcadores de superficie aislados que identifican a las MSC son CD13, CD29, CD31, CD44, CD63, CD73, CD140, CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD71, CD90 (Thy-1) y Stro-1 y las moléculas de adhesión, CD106 (VCAM-1), CD166 (ALCAM), ICAM-1 y CD29. Estas células no expresan marcadores de superficie hematopoyéticos como CD34, CD45, CD14 y CD11 (Garcia-Castro *et al.* 2008). Este fenotipo celular suele mantenerse en la mayoría de poblaciones de tipo mesenquimatoso independientemente del tejido del que fueran aislados, aunque estudios más finos utilizando el sistema de *microarrays* muestran que existen diferencias en la expresión génica (Wagner *et al.* 2005).

2.4.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS MSC

Las MSC son capaces de someterse a extensa proliferación antes de diferenciarse en una variedad de tejidos y tipos de células mesenquimales, incluyendo hueso, cartílago, músculo, estroma, tendón y tejido adiposo; y la evidencia también sugiere que tienen gran plasticidad en la habilidad de diferenciarse en tejidos no-mesenquimatosos como el hígado, corazón, piel y tejido nervioso. En la Figura 6 se muestran los diferentes tipos de células a los que puede dar origen dicho mecanismo.

Inicialmente se consideraba que la diferenciación era el principal mecanismo mediante el cual las células madre adultas, incluyendo las MSC, reparaban los tejidos (Liechty *et al.* 2000; Reyes *et al.* 2002). Esta teoría fue apoyada por estudios de fusión/diferenciación *in vivo* (Alvarez-Dolado 2003). Sin embargo, a medida que se realizaron más estudios quedó patente que estos mecanismos, si bien existentes, se producían en un porcentaje muy bajo de casos y de ningún modo justificaban los mecanismos terapéuticos desencadenados *in vivo*.

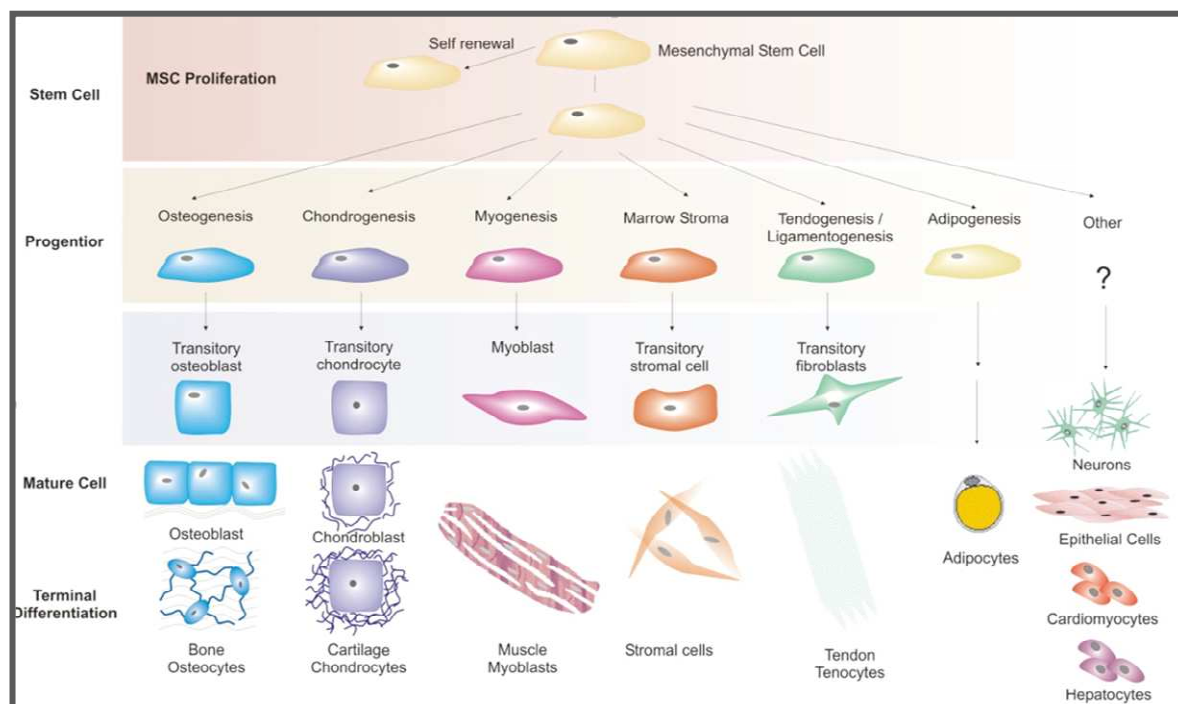


Figura 6. Potencial de diferenciación del multi-linaje de MSC. (Adaptado de Caplan y Bruder, 2001).

De este modo fue cobrando más fuerza la teoría del efecto paracrino, mediante el cual las células trasplantadas no se diferenciaban a células de otros linajes, pero inducían la reparación de los tejidos dañados, bien por estimulación de las propias células madre residentes o bien por la secreción de factores pro-angiogénicos y anti-apoptóticos.

Además, apoyando esta teoría, se ha demostrado la producción y secreción de citoquinas y diferentes factores de crecimiento *in vivo* por parte de las MSC, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor 1 de crecimiento insulínico (IGF-1). Con esta secreción de diferentes factores se controla el proceso inflamatorio que sigue al infarto agudo de miocardio, además del comportamiento de las células reclutadas y células trasplantadas en el miocardio isquémico. En este sentido existen estudios en los que se demuestra que medios de cultivo condicionado liberado por MSC mejoran la función cardíaca (Zisa *et al.* 2009; Nguyen *et al.* 2010; Tang *et al.* 2010; Timmers *et al.* 2011).

2.4.3 INFLUENCIA DE LA HIPOXIA EN LOS MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA CELULAR

El factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) se descubrió en 1992 como responsable de la expresión de eritropoyetina en condiciones de hipoxia (Semenza y Wang 1992). Desde entonces se han descubierto muchos genes inducidos por este factor de transcripción, que están implicados en diferentes funciones celulares (esenciales para la adaptación celular a

la baja concentración de oxígeno), tales como supervivencia celular, proliferación celular, apoptosis, metabolismo de la glucosa y angiogénesis (Gustafsson *et al.* 2005) .

Cuando se encuentra activado, HIF-1 es un heterodímero que consta de 2 subunidades; la subunidad β , que está expresada de manera constitutiva en todas las condiciones de oxígeno y la subunidad α , que es indetectable en normoxia y está controlada por la concentración de oxígeno. Esta proteína presenta una fuerte homología entre especies (90% de similitud entre humanos, ratas y ratones) (Dery *et al.* 2005), y sus dos subunidades son proteínas grandes que comprenden entre 826 y 789 aminoácidos respectivamente. Ambas (HIF 1 α y 1 β) contienen señales de localización nuclear y pertenecen a la familia de factores de transcripción bHLH. Sin embargo la subunidad α es la principal proteína funcional y se conocen 3 isoformas. HIF 1 α y 2 α son muy similares tanto estructural como funcionalmente, ya que ambas son inducidas por hipoxia, dimerizan con HIF-1 β y su actividad transcripcional está mediada por los elementos de respuesta a hipoxia (HREs). La diferencia es que regulan diferentes grupos de genes diana, siendo HIF-1 α la predominante en la inducción del gen hipóxico. Mientras que HIF-1 α y 1 β se expresan en todos los tejidos de humano y de ratón, HIF-2 α sólo se expresa en un tipo restringido de células (Dehne y Brune 2009). La tercera isoforma, denominada HIF-3 α , funciona como inhibidor que interviene en la regulación negativa de respuestas transcripcionales a hipoxia; entre otras, regula negativamente la respuesta angiogénica (Hu *et al.* 2007).

La cantidad de estas subunidades está controlada por una familia de proil hidroxilasas llamadas PHD1 (localizada exclusivamente en el núcleo), PHD2 (presente principalmente en el citoplasma) y PHD3 (con localización nuclear y perinuclear), ya que en presencia de oxígeno catalizan la hidroxilación de un dominio de HIF- α . Esta hidroxilación permite que la proteína de supresión tumoral von Hippel-Lindau (pVHL) se una a las subunidades α y las marque para posteriormente ser ubiquitinadas y degradadas por el proteasoma.

Para que el complejo transcripcional HIF-1 sea funcional, los niveles de HIF-1 α deben ser estabilizados. En hipoxia la actividad PHD disminuye, por lo que las subunidades α se estabilizan y traslocan al núcleo pudiendo entonces heterodimerizar con la subunidad β . Esta proteína dimerizada reconoce los elementos de respuesta frente a la hipoxia (HREs) para inducir la expresión del gen diana.

Mecanismo de reparación

La activación de HIF-1 α dirige la expresión de múltiples factores como el factor derivado de células estromales-1 α (SDF-1 α), el VEGF y el HGF entre otros, los cuales incrementan la supervivencia celular, estimulan la angiogénesis y provocan la migración

celular y reclutamiento tanto de células inflamatorias como progenitoras, ayudando a la reparación cardíaca.

En condiciones normales, la mayoría de las células progenitoras están en la médula ósea retenidas por la alta expresión del SDF-1 α , inducido a su vez por el microambiente hipóxico. Así, la activación del HIF-1 α en el miocardio dañado e hipóxico induce el SDF-1 α e incrementa la expresión del CXCR4 (receptor de SDF-1 α) en las células progenitoras derivadas de médula ósea, que actúan promoviendo angiogénesis después del IAM. El SDF-1 α también estimula la migración de células endoteliales induciendo angiogénesis. Así, el SDF-1 α y su receptor CXCR4, que se expresa en altos niveles tanto en los progenitores vasculares como hematopoyéticos, juegan un papel fundamental en el desarrollo del corazón y vasos sanguíneos, y en la regulación de la movilidad y diferenciación en células progenitoras hematopoyéticas (HSCs). Además, recientes investigaciones han mostrado que el SDF-1 α ejerce efectos antiapoptóticos tras el IAM (Takahashi 2010).

Control de la angiogénesis por la hipoxia

La angiogénesis se define como la formación de ramas capilares que aparecen de capilares pre-existentes y se compone de una serie de procesos independientes y ordenados en el tiempo. HIF-1 juega un papel fundamental en la angiogénesis tanto durante el desarrollo embrionario como en la patogénesis de la enfermedad (por ejemplo en la hipoxia intratumoral).

Existen muchos genes involucrados en diferentes etapas de la angiogénesis tales como VEGF, ANGPT1, ANGPT2, PLGF, PDGFB y genes involucrados en el metabolismo celular como son las metaloproteinasas, el receptor del plasminógeno o los activadores e inhibidores de la síntesis del colágeno. La mayoría de ellos son genes diana de HIF-1 α , es decir que su transcripción está regulada por dicho factor de transcripción.

Diferentes factores angiogénicos como el VEGF, el PDGFB y la familia de los FGF, han mostrado muy buenos resultados y seguridad en estudios pre-clínicos. Sin embargo en ensayos clínicos se han obtenido efectos muy limitados o ineficaces, sugiriendo que las estrategias en las que se incremente la actividad de HIF-1 α podrían ser más eficaces que aquellas en las que se sobre-exprese únicamente un factor.

2.4.4 ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA EFICACIA TERAPÉUTICA DE LAS MSC

Se han propuesto diferentes estrategias para que las MSC puedan mejorar su eficacia terapéutica en el IAM. Entre ellas se encuentra la ingeniería genética mediante el uso de vectores virales para sobre-expresar factores de transcripción, citoquinas o factores de crecimiento (aunque existen limitaciones clínicas para el uso de adenovirus y retrovirus). Con esta tecnología se pretende mejorar la supervivencia celular en el trasplante e

incrementar su función biológica (Jo *et al.* 2007). En este contexto, existen estudios en los que se ha observado un aumento de la supervivencia de MSC transducidas con Akt (MSC-AKT) y trasplantadas intracoronariamente en cerdos a los que previamente se les había realizado un IAM. Este efecto se debe a que la sobre-expresión de dicha molécula proporciona a las MSC una mayor resistencia frente a apoptosis (Lim *et al.* 2006). Un estudio parecido, pero en este caso en ratas infartadas, mostró la mejora de la función cardíaca y la reducción del tamaño del infarto tras el trasplante de MSC-AKT mediante inyección intramiocárdica (Mangi *et al.* 2003).

Diferentes investigadores han realizado manipulaciones sobre el sistema de señalización SDF-1 α /CXCR4 para el tratamiento de IAM. Zhang y colaboradores realizaron un estudio en el que observaron una mayor migración de células c-kit+, tras realizar inyecciones intramiocárdicas en la zona borde del infarto con MSC que sobre-expresaban SDF-1 α (Zhang *et al.* 2007). Otro tipo de estrategia fue el pre-condicionamiento con hipoxia; Rosova y colaboradores demostraron que el pre-condicionamiento de células precursoras endoteliales puede aumentar la capacidad de reparar miembros isquémicos (Rosova *et al.* 2008). En el presente trabajo se presenta otra alternativa con el objeto de incrementar por un lado, la viabilidad y migración de las MSC *in vivo* y por otro, de aumentar su capacidad terapéutica mediante la transducción con vectores que expresen HIF-1 α de forma condicional o no. Puesto que el entorno fisiológico de las células mesenquimales de médula ósea es hipóxico, la sobre-expresión del factor inducible por hipoxia-1 α podría inducir en ellas mecanismos que favorecieran su poder terapéutico.

2.5 BIOMATERIALES Y TERAPIA CARDIOVASCULAR

2.5.1 INTRODUCCIÓN A LA INGENIERÍA TISULAR

La técnica de la cardiomioplastia celular consiste en inyectar células (en nuestro caso, progenitoras adultas) directamente en el miocardio isquémico. A pesar de que diferentes estudios han constatado la mejora de la función del VI y la disminución del remodelado ventricular en un corazón infartado (Pelacho *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2008; Zeng *et al.* 2011), esta técnica tiene varios inconvenientes que conllevan una limitada supervivencia celular tras el trasplante. Esto se debe a que el trasplante así realizado, conlleva la inyección de las células a presión en medio de suspensión líquido, con lo que no tienen una matriz donde adherirse y se forman cúmulos celulares en zonas muy localizadas, provocando una limitada distribución celular y falta de conducción eléctrica (Christman y Lee 2006).

Esto ha dado lugar a que en los últimos años se hayan desarrollado nuevas técnicas de trasplante basadas en la ingeniería de tejidos (Jawad *et al.* 2007). Su avance exponencial

ha sido posible gracias al trabajo coordinado en diferentes campos de investigación (medicina, biología, mecánica, electrónica e ingeniería textil entre otros), todos con el objetivo de sintetizar materiales con un fin terapéutico. A pesar de que todavía se encuentra en una fase muy temprana, el gran interés generado se debe a que potencialmente permite el diseño de nuevas aplicaciones terapéuticas y da muchas expectativas para el tratamiento de enfermedades hasta ahora incurables.

La bioingeniería cardio-regenerativa pretende solventar los problemas que ocurren tras un infarto de miocardio mediante 3 objetivos terapéuticos (Christman y Lee 2006):

- 1) Vehículo y liberación controlada: Se trata de sintetizar el biomaterial (BM) *in vitro* para implantarlo posteriormente *in vivo*. El BM actuaría a modo de vehículo para facilitar el transporte celular hasta la región del miocardio dañado. Además podría servir como sistema de liberación controlada de células, factores y/o fármacos. Se han realizado numerosos estudios con resultados esperanzadores; sin embargo el gran inconveniente de esta técnica es la necesidad de realizar una cirugía para proceder a la implantación del BM.
- 2) Contención: Proporcionando un soporte BM para evitar o disminuir la distensión sistólica derivada del remodelado ventricular, que acaba conduciendo a una insuficiencia cardíaca.
- 3) Prevención de adherencias pericárdicas: Tras la realización de una cirugía a tórax abierto se produce una importante fibrosis; la aparición de estas adherencias provoca la pérdida de la anatomía cardíaca, complicando y haciendo más peligrosas las reintervenciones. A continuación se explican más detalles de este problema clínico.

2.5.2 ADHERENCIAS PERICÁRDICAS

Las adherencias pericárdicas son el resultado del proceso de cicatrización que se produce tras realizar una cirugía cardíaca. Este proceso fibrótico ocurre como consecuencia de los daños producidos en el tejido (incisión para realizar la toracotomía o esternotomía, manipulación de estructuras, sequedad, producción de espacios muertos, sangrado, inflamación, etc.) (Burns *et al.* 1995).

Este tejido cicatricial formado no conduce a una morbilidad inmediata (Seeger *et al.* 1997), sin embargo estas adherencias post-quirúrgicas que suelen darse entre el epicardio y el pericardio, y entre el pericardio y la pleura, producen un aumento de las complicaciones quirúrgicas en las frecuentes intervenciones posteriores. Estas adherencias son una realidad importante puesto que la mejora experimentada en el campo de la cirugía cardíaca se ha traducido en un aumento de la supervivencia de los pacientes con patologías tales como cardiopatía congénita, isquémica o valvular; pero estos pacientes pasan a ser crónicos ya que los tratamientos quirúrgicos aplicados son limitados en el tiempo y muchos de ellos necesitarán ser reintervenidos como consecuencia, entre otras causas, de una disfunción

protésica o una oclusión de bypass coronario (la duración media de un bypass aorto-coronario con vena safena es de 10-15 años).

Además, se ha detectado que el crecimiento de este tejido cicatricial puede afectar la capacidad contráctil del corazón, impidiendo un completo llenado diastólico. Se ha comprobado que cuanto más severas son las adherencias, más afectada se ve la función ventricular (Bailey *et al.* 1984; Jiamsripong *et al.* 2010).

Se han ideado diferentes estrategias para prevenir esta reacción fibro-inflamatoria y evitar, o al menos minimizar, su efecto nocivo. Entre ellas destacan el uso de fármacos para inhibir la actividad fibrótica, la aplicación de una solución lubricante protectora durante la intervención (Goldberg *et al.* 1980; Duncan *et al.* 1988), el uso de pericardios autólogos (Kohanna *et al.* 1977), la utilización de pericardios heterólogos procedentes de diferentes órganos y especies animales y la aplicación de sustitutos permanentes de pericardio preparados con materiales no biodegradables, como el Goretex (Minale *et al.* 1987) o biodegradables (Yamada *et al.* 1997; Sakuma *et al.* 2005).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados hasta ahora para solventar este problema y de que algunos de los materiales estudiados se utilizan actualmente en la práctica clínica, las adherencias pericárdicas no se han conseguido evitar y son, a día de hoy, una fuente de complicaciones de primera magnitud en las reintervenciones quirúrgicas.

2.5.3 TIPOS DE POLÍMEROS Y CARACTERÍSTICAS NECESARIAS PARA SU USO TERAPÉUTICO

Un biomaterial (BM) se puede definir como una sustancia natural o sintética que puede ser utilizada en un entorno biológico y cuyo objetivo es reemplazar o regenerar los tejidos dañados y recuperar su función.

Los biomateriales pueden obtenerse a partir de polímeros inertes, como el fluoruro de polivinilideno (PVDF), el poliuretano termoplástico (TPU) o la poliamida (PA); o puede tratarse de biomateriales biodegradables como el ácido poliláctico (PLA), el colágeno, la policaprolactona (PCL), el polihidroxitirato (PHB) o la fibroína de seda, los cuales serán reabsorbidos y metabolizados por el organismo en un tiempo suficiente para permitir la cicatrización de la herida.

Un BM ideal debería cumplir las siguientes características (Hutmacher *et al.* 2001; Davis *et al.* 2005): 1) Ser biocompatible, es decir que no cause rechazo por parte del sistema inmune del organismo en el que se implanta. 2) Ser bioactivo (permitiendo el crecimiento del tejido en su interior), no ser tóxico ni carcinogénico. 3) Tener un diseño de ingeniería adecuado a la anatomía del órgano en cuanto a tamaño y forma, y ser de manejabilidad adecuada para su uso terapéutico. Además, debe tener unas características topográficas óptimas para la función a desempeñar como son la elasticidad, la rugosidad, la

porosidad, el potencial eléctrico y el comportamiento hidrófobo o hidrófilo. 4) Tener un bajo coste, ser reproducible y fácil de fabricar a gran escala.

Características de los biomateriales utilizados:

A continuación se realiza una breve descripción de los BM utilizados en este trabajo.

Ácido poliláctico (PLA): Se trata de un termoplástico que pertenece a la familia de los poliésteres. El PLA en condiciones *in vitro* se caracteriza por ser un material con alta resistencia a la tensión y baja elongación cuyo tiempo de degradación es de unas 40 semanas. Es un polímero biodegradable, compatible, no mutagénico ni tóxico y que se puede esterilizar. Es uno de los pocos materiales que están aprobados por la Food and Drug Administration (FDA, la agencia reguladora de los EEUU) para su uso en aplicaciones médicas. Este polímero actualmente tiene uso en tornillos y clavos para unión de ligamentos y fijación de fracturas, suturas, liberación de fármacos, etc. Se trata de un material poroso que permite ser portador de células y ha sido estudiado para la regeneración de diferentes tejidos como el cutáneo, hepático, cartilaginoso, óseo y cardiovascular (Zong *et al.* 2005; Flege *et al.* 2012).

Colágeno: Es un polímero natural obtenido de la piel del cerdo (colágeno tipo I) que se ha utilizado de manera muy segura en aplicaciones cardiovasculares, sobre todo como adyuvante en el revestimiento de prótesis vasculares para asegurar la impermeabilidad. Su reabsorción ocurre de manera natural liberando fragmentos biocompatibles. En el contexto de prevención de adhesión, el colágeno provee un sustrato no inflamatorio para el crecimiento de los fibroblastos y la cicatrización (Tsukihara *et al.* 2006; Bel *et al.* 2010).

Fluoruro de polivinilideno (PVDF): Es un termoplástico no reactivo, tiene un bajo coste y se usa comúnmente en la industria médica para la síntesis de suturas, construcción de injertos vasculares o la sutura de los anillos de las válvulas protésicas cardíacas, entre otros. Sus características son: flexibilidad, bajo peso, baja temperatura de conductividad, alta resistencia a la corrosión química y es inerte. Es biocompatible y se ha observado que *in vivo* tiene una respuesta celular mínima, sin mineralización, hiperplasia o excesiva reacción fibrótica. Es fácil de manipular, tiene una fuerza mecánica adecuada y se puede esterilizar (Laroche *et al.* 1995; Joseph *et al.* 2009).

En el presente trabajo se ha abordado el estudio de alternativas terapéuticas para el tratamiento del infarto agudo de miocardio y de las adherencias pericárdicas. Puesto que entrañan un alto índice de morbilidad y mortalidad, encontrar una alternativa exitosa supondría una importante aportación para la sociedad actual.



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Las células mesenquimales constituyen una importante alternativa para el tratamiento del infarto de miocardio. Sin embargo, los escasos estudios clínicos realizados con este tipo de células muestran que es necesario potenciar su efecto terapéutico, bien mediante el tratamiento con fármacos o sobre-expresión de genes, o bien con el uso combinado con biomateriales que permitan mejorar su supervivencia y anidamiento *in vivo*.

Así pues, el presente trabajo plantea tres objetivos principales:

1. Estudio de la respuesta biológica de las células madre mesenquimales (MSC) en entornos inflamatorios que mimeticen el ambiente hostil producido por el infarto, lo que ayudaría a poder predecir su comportamiento una vez trasplantadas.

1.1 Estudio del efecto de la IL-1 β sobre la proliferación, adhesión y migración de las MSC.

1.2 Estudio de las principales vías de señalización inducidas por la IL-1 β en las MSC.

2. Potenciación del efecto terapéutico de las MSC mediante la sobre-expresión génica del factor inducible por hipoxia-1 α , una molécula clave en la regulación de la supervivencia celular frente a la isquemia.

2.1 Caracterización del efecto de la sobre-expresión del HIF-1 α sobre las funciones biológicas de las MSC.

2.2 Estudio *in vivo* del efecto de la sobre-expresión del HIF-1 α sobre la capacidad terapéutica de las MSC en el infarto agudo de miocardio.

3. El uso de biomateriales como potenciadores del efecto terapéutico de las MSC y en la prevención de las adherencias pericárdicas post-quirúrgicas.

3.1 Evaluación del ácido poliláctico como material biocompatible para el tratamiento del infarto de miocardio.

3.2 Desarrollo de un modelo porcino de infarto de miocardio y adherencias pericárdicas, que nos permita evaluar el efecto de la aplicación de biomateriales como alternativa terapéutica.

3.3 Evaluación del colágeno y fluoruro de polivinilideno en la prevención de adherencias pericárdicas.



MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

4.1.1 CULTIVO CELULAR

Se utilizaron células madre mesenquimales de médula ósea humana (en adelante MSC), procedentes de la Fundación Inbiobank (San Sebastián, España).

Las células recepcionadas venían en criotubos conteniendo 1.000.000 de células en fase 4 en 1 mL de solución de congelación (90% Suero Fetal Bovino (FBS) y 10% Dimetilsulfóxido (DMSO)). Tras su descongelación en un baño de agua a 37°C, las células se resuspendieron en un tubo con 10 mL de medio de cultivo atemperado, cuya composición se detalla en la Tabla 1. Tras agitar el tubo se centrifugó en una centrífuga (Eppendorf 5810 con cabezal basculante) durante 10 minutos a 400 g.

El sedimento celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo y las células se sembraron en frascos de 75 cm² a una densidad entre 1.000-5.000 células/cm² y se crecieron en incubadores con un 5% de CO₂ en atmósfera humidificada a 37°C (Forma Series II Water-Jacketed CO₂ Incubator, Thermo scientific). Los pases celulares se realizaron cada 7 días. Cuando la placa alcanzó un 80% de confluencia se procedió a la amplificación de la muestra para su posterior utilización en los diferentes experimentos. Para ello se tripsinizaron las células (la tripsina es una enzima que rompe las uniones entre células y entre célula y sustrato), se contaron y se sembraron a la densidad adecuada.

Para congelar las células amplificadas se retiró el medio de la placa de cultivo y posteriormente se realizó un lavado con 10 mL de PBS. Se añadió 1 mL de Tripsina/EDTA 1X (Gibco) para levantar las células y se movió la placa lentamente para facilitar la liberación de las mismas. Pasados un par de minutos, se confirmó mediante microscopio que las células se habían levantado y seguidamente se añadieron 10 mL del medio de cultivo a la placa para neutralizar la acción de la tripsina y se pipeteó asegurando así el aspirado de las células con el medio. Se pasaron a un tubo Falcon de 15 mL para posteriormente centrifugar durante 10 minutos a 400 g. El pellet se resuspendió en 1 mL de FBS y se homogeneizó la disolución (en este momento se procedió a realizar el conteo en los casos oportunos).

Para evitar la destrucción de las células durante la congelación, se añadieron 100 µL de DMSO a cada criotubo. Posteriormente se agregaron 900 µL de la disolución conteniendo células con FBS. Los criotubos se introdujeron en un recipiente con isopropanol (crioprotector) para permitir un descenso controlado de la temperatura de aproximadamente 1°C por hora, y se colocó en un congelador a -80°C. Pasadas 24 horas, los criotubos se llevaron a nitrógeno líquido.

REACTIVO	CASA COMERCIAL	CONCENTRACIÓN
DMEM	Sigma Aldrich	Base del medio
Suero bovino fetal	Sigma Aldrich	10%
L-Glutamina	Gibco (Invitrogen)	2 mM
Penicilina		100 U/mL
Estreptomicina	Sigma Aldrich	100 µg/ mL

Tabla 1. Composición del medio de cultivo de MSC. DMEM: Medio de Eagle modificado de Dulbecco; U: unidades.

4.1.2 RECUENTO DE LA VIABILIDAD CELULAR

El recuento de la viabilidad celular de una suspensión celular dada se realizó mezclando en un eppendorf 10 µL de dicha solución con 10 µL de Azul de Tripán al 0,2% en PBS (Gibo-Invitrogen). El Azul de Tripán es un colorante que tiñe las células no viables ya que es capaz de entrar en la célula muerta debido a la alteración de la membrana de la misma. Se colocó una gota de dicha mezcla en una cámara Neubauer y se procedió al recuento de las células viables por observación directa al microscopio. La fórmula para el conteo de la concentración celular es:

N° de células viables/mL = $10.000 \times N^{\circ}$ células contadas en la cámara $\times 2$ (dilución)

4.1.3 MARCAJE CELULAR MEDIANTE TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL

Las MSC se transdujeron usando lentivirus generados con los plásmidos pWIPI-GFP y pWIPI-HIF-GFP, que codifican para la proteína verde fluorescente (GFP) unida o no con el factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α). Adicionalmente, para determinados experimentos las MSC se transdujeron con ARN de silenciamiento para IKK β .

La generación de los lentivirus así como las transducciones de las MSC con los diferentes vectores se realizaron en la Fundación Inbiomed.

4.1.4 TRATAMIENTO CON FACTORES

Las MSC se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm² en DMEM suplementado con 10% FBS y tras 16 horas de cultivo se les cambió el medio y se incubaron durante 24 horas con baja concentración de suero (2% FBS); posteriormente se incubaron durante 30 minutos con DMEM suplementado o no con IL-1 β (25 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL), IL-8 (20 ng/mL) y TNF- α (50 ng/mL). Los cultivos se lisaron en el momento apropiado para estudiar las vías de señalización.

4.1.5 ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

4.1.5.1 Migración frente a factores

Para el estudio de migración celular se utilizaron cámaras de migración (BD) con un sistema de pocillos transwells con un tamaño de poro de 8 μm . Las células se sembraron en los insertos (pocillos superiores) y se dejaron migrar hacia los pocillos inferiores, en los que previamente se habían añadido diferentes citoquinas y factores de crecimiento (IL-1 β , IL-6, IL-8, SDF-1 α , TNF- α , IGF, HGF, FBS). Pasadas 4 horas se cuantificó la migración en respuesta a factores tróficos. El estudio se realizó por pocillos duplicados y se repitió 3 veces.

En concreto, se sembraron MSC (transducidas lentiviralmente o no) a una densidad de 20.000 células/cm² (0.3 cm² superficie de membrana) en 250 μl de medio con 10% de FBS en cada inserto de la cámara de migración y se añadieron 750 μl de medio de cultivo con 10% de FBS a cada uno de los pocillos (bandeja inferior). Tras la incubación durante la noche para permitir la adhesión de las células a la base del inserto, se realizó un cambio de medio en las cámaras superior e inferior, añadiéndose 250 μl de medio de cultivo con 0,5% de FBS en los insertos. A continuación se añadieron 750 μl de medio de cultivo con 0,5% de FBS con los diferentes factores quimiotácticos en la cámara inferior (25 ng/mL de IL-1 β , 20 ng/mL de IL-6, 20 ng/mL de IL-8, 50 ng/mL de TNF- α , 20 ng/mL de SDF-1 α , 20 ng/mL de IGF, 50 ng/mL de HGF) y se permitió la migración de las células a 37°C y 5% CO₂ durante 4 horas. Como control positivo se añadieron 750 μl de medio de cultivo con 10% de FBS y como control negativo se añadieron 750 μl de medio con 0,5% de FBS sin ningún factor. Tras fijar con etanol al 70% las células adheridas a la parte inferior de la membrana, ésta se colocó sobre un portaobjetos y se procedió al marcaje con 4',6 diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) para teñir los núcleos y contabilizar así el número de células migradas.

4.1.5.2 Migración de Polimorfonucleares (PMNs)

Para el estudio de migración de PMNs hacia MSC (transducidas o no con shIKK β y tratadas o no con IL-1 β), se procedió a realizar el mismo experimento que el explicado en el apartado 4.1.5.1, con la excepción de que en este caso las MSC se sembraron en los pocillos inferiores y al día siguiente se trataron o no con IL-1 β durante 2 horas. A continuación se lavaron dos veces con PBS y se añadieron en los insertos medio de cultivo con 10.000 células PMNs/cm² provenientes de "buffy coats" (concentrado leucocitario) de pacientes sanos. Se dejaron migrar hacia los pocillos inferiores durante 5 horas y posteriormente se fijaron las células adheridas a la parte inferior de la membrana. Por último se realizó una tinción de Hematoxilina-Eosina de la membrana, lo que nos permitió realizar una cuantificación morfológica de los leucocitos.

4.1.5.3 Ensayo de “Wound healing”

Otra manera de evaluar la capacidad migratoria de las MSC que sobre-expresaban HIF-1 α (MSC-HIF) con respecto a las MSC fue mediante la siembra de 20.000 células/cm² en placas (P35). Cuando la confluencia fue del 100%, con una rasqueta se realizó un surco sobre la superficie de la placa eliminando el tapiz celular que lo recubría. En ese momento (Tiempo 0) se realizó la toma de imágenes (5 fotos a 10X). Pasadas 18 horas tras la realización del surco se procedió de nuevo a fotografiar la zona, obteniendo una cuantificación expresada como el número de células que ocuparon la superficie rascada en 18 horas. Con este experimento se pudo evaluar las diferencias en cuanto a la migración de las MSC y las MSC-HIF.

4.1.6 ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR

Para realizar el estudio de adhesión celular, se colocaron discos o coverslips (Tissue Culture Coverslips, Sarstedt) en placas de 24 pocillos y se tapizaron con Fibronectina (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), laminina (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) o colágeno (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

A continuación se sembraron las células (modificadas o no) a una densidad de 5.000 células/cm² y se dejaron en incubación durante 1 hora. Pasado este tiempo, se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con PFA al 2% durante 20 minutos aproximadamente. Se lavaron de nuevo dos veces con PBS y a continuación se retiraron los discos de las placas de cultivo, se colocaron sobre un portaobjetos y se montaron con DAPI para realizar el conteo de las células adheridas. El experimento se realizó 3 veces.

4.1.7 CITOMETRÍA DE FLUJO

Para analizar la expresión de la GFP, las MSC o MSC-HIF en pase 3-10 se sembraron en frascos de 75 cm² a una densidad de 2.000 células/cm². Cuando el cultivo alcanzó el 80% de confluencia, las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 400 g durante 7 minutos y se lavaron con PBS con 1% de Albúmina de Suero Bovino (BSA). Todos los lavados se realizaron con PBS suplementado con BSA para preservar la integridad celular. El sedimento celular se resuspendió en 1 mL de PBS y se distribuyó en alícuotas de 100 μl (50.000 células/tubo) en tubos de citometría, que se centrifugaron durante 5 minutos a 400 g. Las MSC marcadas con GFP se identificaron por su epifluorescencia verde con el citómetro de flujo Cytomics FC 500 de Beckman Coulter, realizado por el servicio de citómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

4.1.8 ENSAYO DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR

Este ensayo colorimétrico *in vitro* está basado en la reducción de una sal de tetrazolio soluble (MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) de color

amarillo en un formazán insoluble de color azul. Esta reducción se realiza en el interior de la célula por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Debido a ello, cuanto mayor sea el porcentaje de células vivas, mayor será el cambio de color de amarillo a azul, que se registrará gracias a un lector de absorbancia fijado a 570 nm (Victor3 1420 Multilabel Counter; PerkinElmer Inc).

Las MSC se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/cm² durante 24 horas. A continuación las células se trataron o no con IL-1 β (25 ng/mL) o IL-6 (20 ng/mL) durante 24 horas y se obtuvieron los valores de absorbancia. Los valores obtenidos se expresaron respecto al control utilizado (MSC sin tratar).

Además, este procedimiento se utilizó para calcular la viabilidad y proliferación de las células sembradas en biomateriales de ácido poliláctico. Para ello, se utilizaron placas de 96 pocillos en las que se introdujeron los biomateriales y sobre ellos se sembraron las células (8.000 células/0,5 cm² de biomaterial). Como control se utilizaron MSC sembradas directamente en los pocillos. El ensayo de MTT se realizó en 4 tiempos diferentes de cultivo, con los que se elaboraron las curvas de crecimiento.

Con esta técnica los valores de absorbancia obtenidos son indicativos de la viabilidad y proliferación celular.

4.2 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES

4.2.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

Para la obtención de los extractos proteicos se trabajó en todo momento en hielo. En primer lugar los cultivos celulares se lavaron 2 veces con PBS frío y se añadieron 150 μ l/P100 de tampón de lisis M-PER[®] Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific), una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) e inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich). Las células se levantaron con un rascador estéril, se transfirieron a un tubo eppendorf y se pipeteó repetidas veces con el fin de disgregar y lisar el extracto. A continuación se incubaron en hielo durante 20 minutos y se centrifugaron en una centrífuga refrigerada (Eppendorf 5417 R) a 4°C y máxima velocidad durante 15 minutos. Posteriormente el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y las muestras se conservaron a -80°C.

4.2.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Una vez obtenidos los extractos proteicos se cuantificó la cantidad de proteína mediante el método BCA (BCA protein assay kit (Pierce, Cultek)). El ensayo BCA está basado en el ácido bicinonínico (BCA) para la detección y cuantificación colorimétrica de la cantidad de proteína total de una muestra.

Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos. En primer lugar se preparó la solución de trabajo formada por las soluciones A (carbonato sódico, bicarbonato sódico, ácido bicinconínico, tartrato sódico en hidróxido sódico 0,1 M) y B (sulfato de cobre al 4%) en una proporción 50:1 respectivamente. A continuación se añadieron 10 µl de cada estándar (para realizar la curva patrón) o de la muestra al pocillo correspondiente, se agregaron 200 µl por pocillo de la solución de trabajo y se agitó durante 30 segundos en un agitador orbital. La placa se cubrió y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Tras el periodo de incubación la placa se enfrió a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a 562 nm en un lector Victor con el programa Wallac 1420 Workstation.

4.2.3 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis es una técnica utilizada para la separación de proteínas según su movilidad en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica. Para ello, las proteínas se cargan con sustancias como el SDS (detergente) que incorpora cargas negativas de manera dependiente del peso molecular.

En nuestro caso, las proteínas se analizaron por SDS-PAGE (electroforesis en gel de acrilamida con SDS como agente desnaturizante) en un sistema discontinuo donde un primer gel (al 8% de poliacrilamida) produce la acumulación de todas las proteínas en el frente de migración, lo que nos asegura que todas las proteínas empiezan a migrar en el mismo momento, y un segundo gel (al 10% o 12% de poliacrilamida) donde realmente se realiza la separación de las proteínas. Para el análisis se cargaron 30 µg de proteína total. Antes de realizar la carga, se añadió a las muestras tampón de carga concentrado 5 veces (15% SDS (Sigma-Aldrich), 50% glicerol (Sigma-Aldrich), 0,1% azul de bromofenol (Sigma-Aldrich), 16% β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), 312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8) y se calentaron a 96°C durante 5 minutos. Para su separación por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, se utilizó el sistema MiniProtean II (Bio-Rad) y un tampón compuesto por 27 mM Glicina, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl. Como marcador de pesos moleculares se utilizó el marcador SM0441 (Fermentas, MD). La electroforesis se realizó a 100 voltios (V) hasta que las muestras entraron en el gel separador, momento en que se pasó a 150 V durante aproximadamente 70-80 minutos.

4.2.4 TRANSFERENCIA MEDIANTE WESTERN BLOT

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon™-P Transfer Membrane, Millipore), previamente activada con metanol (2 minutos), durante 1 hora a 60 V en un aparato MiniProtean II (Bio-Rad) y con un tampón de transferencia compuesto por 20% Metanol, 20 mM Tris y 150 mM Glicina. Tras la transferencia, la membrana se lavó con

TBS-T (Tris HCl 0,1 M pH 8, NaCl 150 mM (Sigma-Aldrich), 0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich) y se incubó en la solución de bloqueo (TBS-T, 5% BLOT-QuickBlocker (Chemicon)) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave en un agitador Stuart SSM1.

A continuación se incubó la membrana toda la noche a 4°C en agitación suave, con el anticuerpo primario para la forma fosforilada correspondiente (Tabla 2). Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos en agitación con TBS-T y la membrana se incubó con un anticuerpo secundario unido a HRP durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. A continuación se realizaron 3 lavados de 10 minutos en agitación con TBS-T y se reveló la membrana.

ANTICUERPO 1 ^{ario}	CASA COMERCIAL	ESPECIE	CONCENTRACIÓN
Anti-GAPDH	MAB 374, Chemicon	Ratón	1:1.000
Anti-p38MAPK	Cell Signaling	Conejo	1:1.000
Anti-P-p38MAPK	Cell Signaling	Conejo	1:1.000
Anti-NFκβ	Santa Cruz	Conejo	1:500
Anti-P-NFκβ	Santa Cruz	Conejo	1:500
Anti-SAPK/JNK	Cell Signaling	Conejo	1:1.000
Anti-P-SAPK/JNK	Cell Signaling	Conejo	1:1.000
Anti-ERK	Cell signaling	Conejo	1:1.000
Anti-P-ERK	Cell signaling	Conejo	1:500
Anti-Akt	Santa Cruz	Conejo	1:500
Anti-P-Akt	Cell Signaling	Conejo	1:1.000
Anti-HIF-1α	BD	Ratón	1:1.000

ANTICUERPO 2 ^{ario}	CASA COMERCIAL	ESPECIE	CONCENTRACIÓN
Anti-ratón IgG HRP	Promega	Cabra	1:20.000
Anti-conejo IgG HRP	Santa Cruz	Cabra	1:10.000

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la técnica de western blot.

En los casos en los que el tamaño de las proteínas permitió una separación suficiente de las mismas, la membrana se cortó horizontalmente pudiendo así incubar por una parte la membrana con el anticuerpo correspondiente a la proteína de estudio y por otra, la membrana con el anticuerpo anti-GAPDH como control de carga. En caso contrario, la membrana se incubó posteriormente con este último.

Las membranas se reutilizaron para la detección de las formas no fosforiladas de la proteína. Para ello se realizaron 5 lavados de 10 minutos con TBS-T y se procedió a bloquear la membrana e incubar de nuevo con los anticuerpos primarios para las formas no

fosforiladas, seguido de la incubación con los anticuerpos secundarios y revelado correspondiente.

La detección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia empleando el kit ECL-plus (Amersham). Las membranas se cubrieron con papel transparente y se procedió a su autorradiografía en películas CURIX RP2 PLUS (Agfa).

4.2.5 EXTRACCIÓN DE ARN

Para realizar la extracción de ARN de las células (MSC, MSC tratadas con IL-1 β o MSC-HIF), las placas (P100) se colocaron en hielo, se realizaron 2 lavados con 10 mL de PBS frío y se añadió 1 mL de Trizol (Tri-reagent, Sigma-Aldrich). A continuación y con la ayuda de un rascador se recogieron las células y se resuspendieron con el trizol para obtener una buena homogeneización. La suspensión celular se añadió a un tubo eppendorf y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 0,2 mL de cloroformo (Sigma-Aldrich), se dejó 2-3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Consecutivamente se recogió en otro eppendorf la fase acuosa (con cuidado de no aspirar la fase proteica), se añadieron 0,5 mL de Isopropanol (Panreac) y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Después, se centrifugó a 12.000 g, 20 minutos a 4°C; se eliminó el sobrenadante con vacío y se añadieron 0,8 mL de etanol al 70%. La suspensión se mezcló suavemente con la mano, se centrifugó a 12.000 g, 15 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante con vacío. A continuación se procedió al secado al aire y por último se añadieron 50 μ l de agua DEPC (Gibco-Invitrogen) y la muestra se conservó a -80°C.

4.2.6 CUANTIFICACIÓN DEL ARN

La determinación de la concentración del ARN se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Se añadió 1 μ l de muestra al NanoDrop ND-1000 y se obtuvo el espectro a partir del cual se calculó la concentración total de ARN y el ratio entre el área de los picos de ARN ribosomal 28S/18S. Los ratios comprendidos entre 1,5 y 2 indicaron un ARN puro. Para confirmar la integridad del ARN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio, a un voltaje de 80 V (8 V/cm) hasta que el frente de electroforesis alcanzó el final del gel. La visualización de las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal se llevó a cabo en un transiluminador de luz UV (Bio-Rad).

4.2.7 RT (TRANSCRIPCIÓN REVERSA) Y PCR EN TIEMPO REAL

La reacción de RT-PCR consta de dos etapas. Primero tiene lugar la transcripción reversa (RT) mediada por una retrotranscriptasa que cataliza la conversión de ARN mensajero (ARNm) en ADN complementario (ADNc). A continuación, este ADNc sintetizado se emplea como molde en una reacción convencional de PCR.

4.2.7.1 Síntesis de ADNc: Transcripción reversa

La transcripción reversa consiste en la síntesis de ADNc desde una muestra de ARN que actúa como molde; el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias unas ADN polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Para la síntesis de ADNc a partir de ARNm de las muestras se utilizó la transcriptasa inversa M-MLV-RT (Invitrogen) y la reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf partiendo de 1 µg de ARN como molde de la reacción y usando hexámeros de secuencia aleatoria (Applied Biosystems-Invitrogen) como cebadores. Esta reacción se llevó a cabo como se indica a continuación: en una primera etapa se añadió 1 µg de ARN, 1,25 µl de hexámeros de secuencia aleatoria 50 µM y agua DEPC (Sigma-Aldrich) hasta un volumen final de 12 µl. Esta reacción se incubó durante 5 minutos a 37°C. A continuación se añadió a la reacción 4 µl de First Strand Buffer 5x (Invitrogen), 1,5 µl de la transcriptasa inversa M-MLV RT (Invitrogen), 1,25 µl del inhibidor de ARNasas RNaseOUT (Invitrogen) y 1,25 µl de la mezcla de dNTPs 10 mM (Invitrogen) y se incubó durante 1 hora a 37°C. El ADNc sintetizado se guardó a -20°C hasta la realización de la siguiente etapa.

4.2.7.2 Amplificación del ADNc en tiempo real (qPCR)

El diseño de los cebadores se realizó utilizando primer blast <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> del software LigthCycler®480 SW 1.5., herramienta on line de diseño de oligonucleótidos.

En la Tabla 3 se muestra las secuencias de los oligonucleótidos usados para la amplificación de los ADNs complementarios; en todos ellos se comprobó con anterioridad que sólo amplificaban el gen de interés. Todas las parejas de oligonucleótidos se diseñaron de modo que fueran compatibles con reacciones de PCR con una temperatura de fusión de 60°C y un producto de amplificación de aproximadamente 100 pares de bases.

GEN	OLIGO DIRECTO	OLIGO REVERSO	PB
ACTB	AGAGCCTCGCCTTTGCCGATCC	CATGCCGGAGCCGTTGTGCAC	101
CCL2	TCTCAGTGACAGAGGCTCGCGA	CCACTTCTGCTTGGGGTCAGCAC	119
CCL3	TTCAGAAGGACACGGGCAGCAGACA	GGAATCTGCCGGGAGGTGTAGCT	216
CCL5	TACATTGCCCGCCCACTGCC	GGGTTGGCACACACTTGGCG	119
CCL7	CAGCTGCTTTTCAGCCCCCAGG	GCTTCCCGGGGACAGTGGCTA	148
CCL8	TGGCAGCCACTTTAGCCCT	GCACAGACCTCCTTGCCCG	190
CCL20	TCTGCGGGGAATCAGAAGCAGC	TTCATTGGCCAGCTGCCGTGT	110
CLDN1	CCGGGTTGCCACCTGCAAA	CGTACATGGCCTGGGCGGTC	258
CLDN14	GTCGCTGTGGCAGGTGGTC	AGCCTCCCCTTCCCAGCCTG	192
CSF2	TGCAGCATCTCTGCACCCGC	AGGCAGGTCCGGCTCTGGAG	176
CSF3	AGACCCATGGCTGGACCTGCC	GTGGCACACTCACTACCAGCTTC	218
CX3CL1	CTGGCTGGACAGCACCACGG	GCTCCTTCCGGTCCGGCACAG	175
CXCL1	AGCCTGCAACATGCCAGCCA	TGTGCACATACATTCCCCTGCC	94
CXCL10	TGCAAGCCAATTTTGTCCACGTGT	GCAGCCTCTGTGTGGTCCATCC	200
CXCL11	TGCTTTGCATAGGCCCTGGGCT	AGCCTTGTGCTTCCGATTTGGGA	164
CXCL3	AATGTAAGGTCCCGGACCC	ACCACCTGCAGGAAGTGTCAA	199
CXCL5	AATCTCCGCTCCTCCACCCAGT	GCTCTCTCAACACAGCAGCGGC	201
CXCL6	GCACGAGGAAACCAAGTGTCTG	GTGCAACGCAGCTGTGCAGCA	234
ELF3	ATTTAGAGCCGGGTAGGGGAGCG	GTTGCAGCCATGAGGCTACCGGAGT	132
GAPDH	CCCTCTGCTGATGCCCCCA	TGACCTTGGCCAGGGGTGCT	122
IBSP	GGAGTACGAATACAGGGGCGCC	GGTAGCCGGATGCAAAGCCAGA	222
ICAM1	CTGGCTCTGCTCGGGCTCT	GGGCTGGTCAAGGAGGTC	126
ICAM4	AATACACTTTGCGCTGCCACGTG	GGCTCCAAGCGAGCATCAGTGT	264
IL11	TGACCCGCTCTCTCTGGCG	GCACGTGCCGAGGTAGGAC	192
IL12A	CCCAAAACCTGCTGAGGGCCG	TGGAGCCAGGCAACTCCAT	219
IL15	GCTGCTGGAACCCCTTGCCAT	TAGGTGCTTTGGCCAACTGGG	214
IL1B	AGGCACAAGGCACAACAGGCT	AACAAGTACGCGGCCTGCC	277
IL23A	TGGCTGTGACCCCAAGGACTC	TGCCATGGCTGGCTGGACT	246
IL32	TTTGTGCCAGGAAGACTGCGTGC	GGCTCGACATCACCTGTCCACG	215
IL34	GAACACCACCATGCCCGGG	CAGCCTGGTACGTTGGCGA	250
IL6	CATTCTGCCCTCGAGCCACC	GGCAGCAGGCAACACCGGA	139
IL7	GCTGCTCGAAAGTTGAGGCAATTT	TTGTTGGTTGGGCTTCAACCAGG	157
IL8	CGTGGCTCTTGGCAGCCTTC	TTCTTGGGGTCCAGACAGAGCTC	229
ITGA9	GCAGTGACCGCTGGCCACTT	GCGCACAAAGGAGGAGCCGAA	182
ITGB3	TGCCGCCCTGCTCATCTGGA	TCCTGCAATCGTGGCACAGGC	239
ITGB8	CTAGCGACACTCGGCCCGC	CTGGACCCAGCGCAAGGCAC	292
MMP1	GTGTCTCACAGCTTCCCAGCGAC	GCACTCCACATCTGGCTGCTTC	238
NOD2	AGGCCTACCCGCAGATGCCA	GTGGGAGAGAGGCTGGCCCA	298
SDC4	CGGAGTCGCCGAGTCGATCC	GGCTCCCAGACCCTGCCCTC	248
SELECTIN	TTGTTCTGCCAGCAGCTGCC	AGGGCCAGAGACCCGAGGAG	164
SERPINE1	AGGACGAACCGCCAATCGCAAG	ACCCTCACCCCGAAGTCTGAGG	167
TCAM1P	CGAGCTTGGCTGTGGCCTCC	TCTCCGCCATCCCAGCCTCC	225
TLR2	AGGCAGCGAGAAAGCGCAGC	CCCCAAAGACCCACACCTCCA	253
TLR4	CCCTGCGTGAGGTTGTTCTCA	CTCCAGGGGTAAGTCTGGATGGG	280
TNF	CCCTCTGGCCAGGCAGTCA	ATGGGTGGAGGGGAGCCTT	235
VCAM1	AGGTGACGAATGAGGGGACCACA	CCAGCCTCCAGAGGGCCACT	181

GEN	OLIGO SENTIDO	OLIGO ANTISENtido	PB
TGFB2	CCCTCCGAAACTGTCTGCC	TGGGCGGGATGGCATCAAGGTA	110
AMIGO2	CGAAGAGCTTGGCTGCTGCGT	ACCAAGTGAACGGTGTGGGGAG	228
SDC1	CCGAAAGCGAGTTCGGCCA	GCCGGATTCTTCCGCTCG	101
c-MET	CGGGGCGACAGCTGACTTGC	GCACAGCGGGGCTTCATT	133
COL12A1	TGCGGAGTAGGCTTCCCCAG	CCATCCGTTGTAGGGTCCACCG	193
ITGA2	CACAGAGTTGCCCGAGCACA	TCAAGGGCAGGCTAGTGCCA	115
BNIP3	GTGACAGCCACCTGCTCG	GCCGTGCGCTTCCGGTGT	232
CD3D	CCACTCTGCTCCTTGTCTGGGA	CCGAGCCAGTTTCTTCCAAAGG	167
APLN	GAATCTGCGGCTTGCCTGC	GGTGGCGGACATTGCCCTG	122
ANGTP1	GCTCCACAGTGGAACCGGA	CCAGCATGGTAGCCGTGTGT	175
CTGF	TGCCCGGAAATGCTGCGAG	CAGTCGGTAAGCCGCGAGGG	86
SPARC	CGCATGCGGACTGGCTCAA	ACGGGGTGGTCTCTGCTCC	143
BNIP3L	GCAGTCTGCCAGTGTCCG	GATGGTACGTGTTCCAGCCCC	208
CYR61	GGGCGCTCGCCTTAGTCGTC	CTTACAGCAGCCGAGCCGT	143
FGF2	TGTAGAAGATGTGACGCCGCGG	TCGGCCGCTTCTGTCCG	200
PIK3C3	TGCACCAAGTGAGAATGGGCCA	AGAGGCTTTGGATCCCAGCCCA	198
NCAM2	GGAAGAGTGGAGGCCAGGGGAG	TGGCGGGTCTGGAGAGCCTG	163
ACTB	AGAGCCTCGCCTTTGCCGATCC	CATGCCGGAGCCGTTGTGCAC	101
HIF1 α	TGGAAGGATTTGCACTGCAC	ATTTGATGGGTGAGGAATGG	112

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la técnica de RT-qPCR. La primera tabla recoge los oligos utilizados en los experimentos del primer capítulo, mientras que la segunda tabla contiene los cebadores con los que se realizaron los experimentos del segundo capítulo.

La amplificación del ADN complementario de cada gen de interés se realizó utilizando SYBR green master mix y Taq (Light Cycler 480 Sybr Green 1 Master Roche) en el termociclador Light Cycler 480 (Roche).

Una vez sintetizado el ADNc, amplificamos de forma selectiva secuencias específicas de ADN por medio de la reacción en cadena de la ADN-polimerasa (PCR). Cada reacción de PCR contenía 3 μ l de ADNc sintetizado en el paso anterior, 1 μ l Taq DNA polimerasa NETZYME (1 U/ μ l, NEED), 2,5 μ l tampón de la polimerasa 10x, 1 μ l MgCl₂ 50 mM, 2,5 μ l dNTPs 2 mM, 0,5 μ l primer Forward 6 μ M, 0,5 μ l primer Reverse 6 μ M y la cantidad suficiente de agua DEPC para un volumen final de 15 μ l. Una vez preparada la reacción, las muestras se introdujeron en el termociclador siguiendo las condiciones de amplificación mostradas a continuación en la Tabla 4.

PASO	TEMPERATURA	DURACIÓN	Nº CICLOS
PRE-INCUBACIÓN	95°C	10 minutos	
AMPLIFICACIÓN	95°C	15 seg	45
	58°C	10 seg	
	72°C	20 seg	
CURVA DE MELTING	94°C	5 seg	1
	60°C	15 seg	
	97°C	Continuo	
ENFRIAMIENTO	4°C	10 seg	

Tabla 4. Condiciones para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Seg: Segundos.

4.2.7.3 Análisis del producto de la qPCR

Los resultados se normalizaron frente a los genes “housekeeping” (ACTB y GAPDH) y se expresaron como incremento del número de veces que la expresión aumentaba o disminuía respecto a los valores de las MSC no modificadas (control). Los resultados se consideraron significativos con una inducción de 2 veces. Las muestras se analizaron por triplicado.

4.3 MICROARRAYS DE EXPRESIÓN

El perfil de expresión génica de las MSC control, MSC tratadas con IL-1 β y MSC-HIF se realizó utilizando el sistema Affymetrix “GeneChip microarrays”.

El ARN total fue extraído de las células usando el kit de aislamiento High Pure RNA (Roche Diagnostics) y se cuantificó por espectrometría (NanoDrop ND1000, NanoDrop Technologies, Wilmington). La hibridación fue realizada por el servicio de genómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe. La señal fue estandarizada a través de los *arrays*

usando normalización cuantitativa (Bolstad *et al.* 2003). El set de genes a analizar fue llevado a cabo por *Gene Ontology terms* utilizando *FatiScan* (Al-Shahrour *et al.* 2007), lo que permitió la visualización de las categorías funcionales con su contexto biológico. El análisis de los *microarrays* fue realizado por el servicio de informática y estadística del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

4.4 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

La técnica histológica consta de varios procedimientos, que describimos a continuación.

4.4.1 FIJACIÓN

Tras la muerte celular aparecen numerosos procesos de degradación que alteran la estructura tisular y celular. Para conservar al máximo dichas estructuras y poder realizar así un estudio adecuado del tejido, se realiza un proceso de fijación cuyo principal objetivo es la interrupción de los procesos de degradación, asegurando la máxima conservación de las características químicas y de sus estructuras celular y tisular.

En el caso de la rata, una vez finalizado el estudio, los animales fueron anestesiados profundamente con tiopental a una dosis de 50 mg/Kg (Tiobarbital, Braun 1 g) y 0,05 mg/Kg de fentanilo (Fentanest, Kern Pharma); tras colocar al animal en decúbito supino, se procedió a la apertura del tórax a través del diafragma y a la perfusión del corazón con una solución con KCl 1 M (Sigma) (15 mL por la vena porta y 5 mL por el ápex), consiguiendo así la parada cardíaca en diástole. A continuación se inyectaron 10 mL de PBS por la vena porta e inmediatamente después tanto por vena cava como por el ápex se administraron 5 mL de PFA al 2%. Por último se extrajo el corazón y tras cortar las aurículas se lavó con suero fisiológico con ayuda de una jeringuilla, para vaciar las cavidades ventriculares de restos de sangre. Los corazones se mantuvieron en PFA al 2% durante 24 horas a 4°C. Transcurrido ese tiempo se procedió a eliminar la solución fijadora del tejido mediante 5 lavados de 15 minutos con solución tampón fosfato sódico (PB) 0,1 M (3,12 g/L de 77 NaH₂PO₄ y 11,36 g/L de Na₂HPO₄) (Panreac) con agitación fuerte, a 200 rpm.

En el caso del cerdo, con el animal anestesiado, se procedió a realizar la eutanasia mediante inyección intracardíaca con 10 mL de KCl 1 M (Fresenius Kabi). A continuación se extrajo el corazón y se lavó con solución salina fisiológica para eliminar restos de sangre. Posteriormente se realizaron 4 secciones de 5-7 mm de grosor desde al ápex hasta la zona de oclusión. Para proceder a la fijación, las rodajas se sumergieron en PFA al 4% durante 24 horas a 4°C. La eliminación de la solución fijadora mediante lavados con PB se realizó tal y como se ha detallado anteriormente.

En función del tipo de procesado de las muestras, éstas se conservaron en etanol al 70% para su posterior inclusión en parafina o se crioprotegieron con PB 0,1 M y sacarosa al 20% (Panreac) para posteriormente realizar los criocortes. Una vez que las muestras fueron embebidas en la solución crioprotectora, se encastraron en OCT (Bayer) para su almacenamiento a -80°C hasta su procesamiento en el criostato. En el caso de las ratas se utilizó el corazón completo para el análisis histológico, mientras que en el caso del cerdo se tomaron muestras de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm.

4.4.2 OBTENCIÓN DEL BLOQUE PARA CRIOSTATO Y CORTE DEL TEJIDO

Los corazones murinos, ya encastrados en OCT se seccionaron desde el ápex hasta la base del corazón utilizando un criostato (MICRON modelo HM550). Se realizaron 5 series de cortes de 7 µm sobre porta (porta-objetos superfrost plus Menzel-Glaser, AFORA), obteniéndose aproximadamente 10-12 portas por serie. La estandarización del procedimiento permite que el mismo número de portas de cada serie corresponda a una sección similar del corazón en todos los animales estudiados. De esta manera se pudo disponer de 5 portas con cortes muy similares para la realización de diferentes análisis.

Las muestras se conservaron a -80°C hasta realizar los diferentes análisis. Una serie completa se utilizó para localizar las células MSC (que expresan la GFP) trasplantadas en el tejido miocárdico mediante inmunohistoquímica de fluorescencia con un anticuerpo anti-GFP y observación al microscopio DM600 de Leica. Una segunda serie se utilizó para cuantificar el área de la zona infartada mediante la tinción de Tricrómico de Masson. Las series restantes se utilizaron para la valoración del infiltrado mediante la tinción de Hematoxilina–Eosina y para el estudio de la angiogénesis y otros mediante inmunohistoquímica de fluorescencia.

4.4.3 INCLUSIÓN EN PARAFINA Y CORTE DEL TEJIDO

Para su inclusión en parafina, los corazones se sometieron a sucesivos baños de etanol de distinta gradación en agitación a 200 rpm en el orden siguiente: 15 minutos en etanol al 70%, 15 minutos en etanol al 85%, 20 minutos en etanol al 96% y 2 baños de 30 y 40 minutos respectivamente en etanol absoluto. Posteriormente se introdujeron en xileno 20 minutos y a continuación en un baño de parafina a 60°C toda la noche. Una vez embebidos totalmente en parafina, se colocaron en un molde adecuado, previamente calentado, se añadió parafina caliente hasta cubrir el corazón y se dejaron enfriar. Los corazones así incluidos se cortaron con un grosor de 7 µm utilizando un microtomo (Leica RM2235) sobre porta superfrost.

4.4.4 TINCIONES DE TEJIDO CARDÍACO

Debido a que el material biológico apenas presenta contraste, es necesario dotar a las preparaciones de suficiente contraste como para poder apreciar sus componentes. El fundamento de cualquier método de tinción radica en la propiedad que poseen todos los tejidos para incorporar y fijar, de manera variable, diversos colorantes.

4.4.4.1 Tinción de Hematoxilina-Eosina

La Hematoxilina-Eosina (H-E) es una coloración de rutina muy utilizada; la Eosina tiñe los citoplasmas y las fibras del tejido conectivo, mientras que la Hematoxilina tiñe los núcleos. De esta manera podremos diferenciar la zona fibrótica del tejido sano, e identificar los infiltrados celulares del tejido. En esta tinción se utilizan dos colorantes: Eosina, colorante ácido que tiñe estructuras catiónicas del citoplasma y de la matriz extracelular, y Hematoxilina, colorante básico que tiñe la heterocromatina, los ribosomas y el ARN ribosomal.

La tinción se realizó según el siguiente protocolo: las muestras se lavaron inicialmente con agua corriente 5 minutos, se incubaron con Hematoxilina de Harris (Panreac) durante 1 minuto, se lavaron abundantemente con agua corriente, se realizaron dos pases en alcohol clorhídrico (dilución 1:200 de HCl en etanol al 70%) para eliminar el exceso de coloración y se lavaron de nuevo con agua corriente. A continuación, se efectuaron 5 pases en agua amoniacal (15 a 20 gotas de amoniaco en agua destilada) para posteriormente volver a lavar las muestras con agua. Seguidamente se incubaron durante 1 minuto en Eosina alcohólica recién preparada (Eosina Merck al 25% en etanol al 20%) y se lavaron con un pase en agua corriente. Por último el tejido se deshidrató con incubaciones sucesivas en etanoles de gradación creciente, realizando 20 pases en etanol al 96%, 20 pases en etanol absoluto y 3 pases en xileno. Finalmente las muestras se montaron con Eukkit (Panreac).

4.4.4.2 Tinción de Tricrómico de Masson

Esta tinción tiñe de azul el colágeno y de rosa el músculo cardíaco, lo que permite identificar la zona fibrótica.

El protocolo de la tinción se detalla a continuación: se introdujeron las muestras en solución de Bouin (Sigma Aldrich) precalentada a 56°C y se mantuvieron durante 15 minutos; a continuación se enfriaron y lavaron con agua corriente. Se incubaron durante 5 minutos en Hematoxilina de Harris (Panreac) y se lavaron con agua corriente primero y agua destilada después, hasta eliminar el exceso de coloración. Posteriormente se incubaron durante 5 minutos en Ponceau Fucsina. Esta solución está compuesta por la mezcla en proporción 1:2 de la solución A (1% de Ponceau de Silidina (Sigma Aldrich) en agua acética

al 0,5%) y B (1% de Fucsina ácida (Merck) en agua acética al 0,5%). La mezcla se filtró antes de usarla. Se lavaron con agua destilada y seguidamente se introdujeron en ácido fosfomolibdico (Sigma Aldrich) 5 minutos y en una solución de Azul de Anilina (Prolabo) (disuelta al 2% en agua acética al 0,5%) durante 5 minutos. A continuación se lavaron con agua destilada y seguidamente con agua acética al 1% durante 2 minutos. Por último se realizaron 20 pases en etanol al 70%, 20 pases en etanol al 96%, 20 pases en etanol absoluto y 3 pases en xileno. Finalmente las muestras se montaron con Eukkit (Panreac).

4.4.4.3 Tinción de Tetrazolio

El cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTZ) (Sigma) reacciona con las células en función de su actividad mitocondrial; en el miocardio viable es convertido en rojo de formazán por acción de deshidrogenasas, tiñendo de rojo oscuro el tejido. Dado que las células necróticas no presentan la actividad de deshidrogenasas, en los cortes miocárdicos se aprecia una zona no teñida (blanca) que corresponde al área de necrosis; esto permite realizar la medida del tamaño del tejido infartado.

Para realizar esta tinción, las secciones de corazón obtenidas fueron sumergidas en una solución de TTZ al 1% en PB 0,1 M y se incubaron a 37°C durante 20 minutos.

4.4.5 INMUNOCITOQUÍMICA

El objetivo de esta técnica es identificar algunos tipos celulares que expresan determinadas moléculas de forma específica. Dichas moléculas reaccionan con un anticuerpo al que posteriormente se une otro anticuerpo marcado con un fluorocromo que podemos identificar y fotografiar mediante microscopía de fluorescencia.

Inmunocitoquímica anti-Paxilina

El anclaje de la célula a la matriz extracelular se produce a través de la formación de complejos de adhesión celular, que se componen de integrinas y otras muchas proteínas citoplásmicas, entre ellas la Paxilina. Así, mediante inmunocitoquímica anti-Paxilina es posible detectar cambios en la arquitectura del citoesqueleto.

Para realizar la inmunocitoquímica de los cultivos, las células (MSC o MSC-HIF) dispuestas en monocapa en placa de 8 pocillos con celdillas (Chamber slide, Lab-Tek) se lavaron con PBS dos veces, se fijaron con PFA al 2% durante 10 minutos y se lavaron de nuevo con PBS 3 veces. Se conservaron en PB 0,1 M con azida sódica (Panreac) al 0,05% hasta ser utilizadas.

Las preparaciones se bloquearon con PBS, 10% de Suero normalizado de Cabra (NGS) (Gibco-Invitrogen) y 0,01% Triton X-100 durante 1 hora a 37°C. A continuación se incubaron con el anticuerpo primario (anti-Paxilina (Abcam) a una concentración 1:250)

durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 555 anti-conejo (Invitrogen) a una concentración 1:500) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS y se añadieron 20 µl del medio de montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, colorante para la tinción fluorescente del ADN) (ProLong Gold antifade with DAPI, Molecular Probes- Invitrogen). Por último se retiraron las celdillas y las muestras se cubrieron con un cubre-objetos (Menzel-Glaser, Afora) y se sellaron con laca de uñas.

4.4.6 INMUNOHISTOQUÍMICA

Esta técnica es similar a la anterior, pero en este caso el protocolo se realiza sobre tejido y no sobre células.

Para su realización, en caso de tratarse de muestras de parafina, hay que preparar previamente las muestras como se explica a continuación.

Desparafinado y rehidratación de las muestras

Tiene por objetivo retirar la parafina de los cortes histológicos; para ello se dejaron los cortes en la estufa a 60°C durante 1 hora; a continuación para rehidratar las muestras se realizaron los siguientes pases: 10 minutos en xileno (Panreac) a 37°C, 10 minutos en xileno a temperatura ambiente, 10 minutos en xileno + etanol absoluto 1:1, 3 pases de 10 minutos cada uno en etanol absoluto, 10 minutos en etanol al 96%, 10 minutos en etanol al 80%, 10 minutos en etanol al 70%, 10 minutos en etanol al 50%, 10 minutos en agua destilada y por último un lavado con TBS.

Desenmascaramiento

Este procedimiento se realiza para exponer los epítomos de las proteínas, de manera que la unión del anticuerpo primario específico con el antígeno pueda llevarse a cabo.

Los portaobjetos se sumergieron en citrato pH 6 1X (DakoCytomation, S2369) durante 1 hora a 90°C en baño de agua, a continuación se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos para posteriormente sumergirlos de nuevo en tampón citrato a 4°C durante 20 minutos.

Las inmunohistoquímicas han sido clasificadas en función de la localización de los antígenos. A continuación, en la Tabla 5, se detallan los anticuerpos utilizados.

ANTICUERPO 1 ^{ario}	CASA COMERCIAL	ESPECIE	CONCENTRACIÓN
Anti-GFP	ABCAM	Conejo	1:200
Anti-Tn I	Santa Cruz	Conejo	1:50
Anti-RECA-1	ABCAM	Ratón	1:50
Anti-Laminina	Sigma	Conejo	1:50
Anti-SMA	Sigma	Ratón	1:200
ANTICUERPO 2 ^{ario}	CASA COMERCIAL	ESPECIE	CONCENTRACIÓN
Alexa Fluor 555 anti-ratón	Invitrogen	Cabra	1:500
Alexa Fluor 555 anti-conejo	Invitrogen	Cabra	1:500
Alexa Fluor 488 anti-conejo	Invitrogen	Cabra	1:100

Tabla 5. Resumen de los anticuerpos utilizados especificando si son primarios o secundarios, la casa comercial proveedora, la especie en la que han sido obtenidos y su dilución correspondiente para la técnica de inmunohistoquímica.

4.4.6.1 Antígenos citoplasmáticos

Inmunohistoquímica anti-RECA-1

Pan-endotelio (RECA-1) es un anticuerpo monoclonal desarrollado a partir de antígenos de células endoteliales de rata para el estudio de la función de las células endoteliales en procesos fisiológicos y patológicos. No presenta reactividad cruzada frente a otros tipos celulares y posee mayor especificidad que otros anticuerpos utilizados para este fin como el Von Willebran Factor (Duijvestijn *et al.* 1992). Se une a antígenos del endotelio vascular de diferentes tejidos de rata, lo que permite cuantificar la angiogénesis.

En primer lugar, para eliminar el OCT se realizaron 3 lavados de 5 minutos con solución tampón TBS a las muestras de tejido conservadas en criostato. Seguidamente se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de tampón bloqueo compuesta por TBS con un 10% de NGS más 0,1% de triton X-100 para permeabilizar el tejido y facilitar el acceso del anticuerpo a sus epítomos. A continuación se añadieron en cada porta, 200 µl de una solución de anticuerpo primario en tampón bloqueo a una dilución 1:50 y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron las muestras 5 veces durante 5 minutos con TBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad con una dilución 1:500 en tampón bloqueo del anticuerpo secundario. Transcurrido este tiempo se realizaron otros 5 lavados de 5 minutos con TBS y finalmente se montaron las muestras previa adición de medio de montaje con DAPI para fluorescencia (Vectashield mounting medium with DAPI. Vector Lab.) y se sellaron.

Inmunohistoquímica anti-Troponina I

Este protocolo se realizó para la detección de Troponina I; lo que nos permitió evaluar la presencia de cardiomiocitos (unidad funcional del músculo cardíaco) en las muestras de corazón de rata en diferentes condiciones experimentales. El protocolo de inmunohistoquímica utilizado fue similar al descrito en el apartado anterior.

Inmunohistoquímica anti- α -SMA

La proteína α -Actina de Músculo Liso (α -SMA) es un marcador que puede ser utilizado para la identificación de músculo liso en pericitos, fibroblastos y miofibroblastos. El protocolo de la inmunohistoquímica fue similar al anterior exceptuando que el anticuerpo primario estaba conjugado con el cromóforo Cy3 (Sigma Aldrich Química S.A.) y no hizo falta realizar la incubación con el anticuerpo secundario.

Inmunohistoquímica anti-GFP

La proteína verde fluorescente (GFP) se expresa en las células transducidas con el lentivirus portador del gen *GFP*. A pesar de que poseen fluorescencia propia, interesa amplificar dicha fluorescencia mediante inmunohistoquímica para valorar la supervivencia de dichas células, especialmente cuando se encuentran en número muy reducido. Para ello se utilizó el siguiente protocolo: Las muestras se lavaron con una solución de PBS con un 0,2% de Triton X-100 más un 0,1% de BSA durante 5 minutos y a continuación se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de tampón bloqueo compuesta por un 10% de NGS más un 7,5% de leche en polvo en PBS. Seguidamente se añadió a las muestras una dilución 1:500 de anticuerpo primario en tampón bloqueo diluido al 50% en PBS y se mantuvo toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, se lavaron 3 veces 5 minutos con PBS, se incubaron de nuevo con tampón bloqueo 30 minutos y se añadió el anticuerpo secundario (dilución 1:100 en tampón bloqueo diluido al 50% en PBS); se incubó durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 5 lavados durante 5 minutos cada uno con PBS. Las muestras se montaron con medio de montaje con DAPI y se sellaron para preservar su fluorescencia.

4.4.6.2 Antígenos de citoesqueleto

Inmunohistoquímica anti-Laminina

Para detectar la lámina basal se utilizó un anticuerpo anti-Laminina; así conseguimos marcar el área de los cardiomiocitos. El protocolo utilizado fue similar al descrito para la inmunohistoquímica anti-RECA-1.

4.4.7 REACCIONES ENZIMÁTICAS

4.4.7.1 EdU

El EdU (5-etinil-2'-deoxiuridina) (Invitrogen) es un nucleósido análogo a la timidina que se incorpora al ADN de las células que se encuentran en estado de división. Tras la unión del fluorocromo (Alexa Fluor 488) con el EdU mediante una reacción enzimática, es posible detectar mediante microscopía de fluorescencia el grado de proliferación en un determinado momento.

El protocolo utilizado fue el siguiente: Las muestras de tejido cardíaco se lavaron 2 veces con BSA 3% en PBS. A continuación se añadió 0,5% Tritón x-100 en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron dos lavados con BSA 3% en PBS. Se añadieron 860 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de la mezcla de reacción (Click-iT reaction cocktail). Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la incubación, se realizaron 3 lavados con BSA 3% en PBS. Por último las muestras se montaron con medio de montaje con DAPI y se sellaron con laca de uñas.

4.4.7.2 TUNEL

Se trata de una técnica de marcaje de los fragmentos de ADN de las células que se encuentran en estado de apoptosis. Estos fragmentos pueden ser identificados por fluorescencia tras una reacción enzimática llevada a cabo por la Transferasa deoxinucleotídica Terminal (TdT), que cataliza la polimerización de nucleótidos marcados a los terminales libres 3'-OH (reacción de TUNEL) (Roche).

El protocolo utilizado fue el siguiente: Tras realizar el desparafinado y la rehidratación de las muestras de tejido cardíaco tal y como se ha explicado anteriormente, se añadió proteinasa K a las muestras durante 15 minutos para, a continuación, realizar 2 lavados de 2 minutos con PBS. Tras retirar con cuidado el PBS restante se añadió la mezcla de reacción de TUNEL (50 $\mu\text{L}/\text{muestra}$) y se incubó en estufa a 37°C y cámara húmeda durante 1 hora. A continuación se lavaron las muestras con PBS 3 veces durante 1 minuto. Por último se añadió el medio de montaje con DAPI y se sellaron las muestras.

4.4.7.3 Detección de fibras de actina mediante el ensayo de unión a Faloidina

La Faloidina es una molécula que proviene de la *Amanita phalloides* y se une específicamente a las fibras de actina del citoesqueleto.

El protocolo utilizado fue similar al explicado en el apartado de inmunocitoquímica. La Faloidina fluorocromada (Invitrogen) se añadió sobre las células fijadas a una dosis de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, lo que nos permitió visualizar los filamentos de actina utilizando la microscopía de fluorescencia.

4.5 TÉCNICAS DE IMAGEN

4.5.1 MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA

Tras realizar la inmunohistoquímica de fluorescencia, los cortes de tejido cardíaco se fotografiaron con el microscopio óptico DM6000 de Leica, equipado con la cámara en blanco y negro Leica DFC350 y con el software Leica Application Suite Version 2.4.0 R1. Se realizó una adquisición secuencial de imágenes con distintos filtros de barrera (adecuados para cada uno de los fluorocromos) que posteriormente se combinaron creando una imagen superpuesta en color, lo que facilitó el análisis de la co-localización de los marcadores y, en su caso, la cuantificación de su expresión.

4.5.2 MICROSCOPIA CONFOCAL

La microscopía confocal es un tipo de microscopía de fluorescencia basada en el uso de un láser que incide sobre la muestra y barre todos los puntos en un plano focal mientras que elimina la luz emitida por otros niveles, lo que permite realizar fotos secuenciales a distintos planos y crear una composición de imagen 3D. Esto consigue evitar efectos de solapamiento de señales y resulta imprescindible en estudios inmunohistoquímicos de alta precisión.

Tras realizar la inmunohistoquímica de fluorescencia las muestras se analizaron con el microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS utilizando un objetivo de inmersión 63 X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N. Las muestras se analizaron mediante una doble o triple excitación 405 nm (DAPI), 491 nm (Alexa Fluor 488) y 561 nm (Alexa Fluor 555). El análisis se realizó a través del servicio de microscopía confocal del Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia.

4.6 TÉCNICAS MORFOMÉTRICAS

4.6.1 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL ÁREA INFARTADA

En el caso de la rata, para cuantificar la extensión del infarto se realizó la tinción de Tricrómico de Masson en una serie completa de cortes de tejido cardíaco para cada animal. Los cortes se fotografiaron con un fotomicroscopio DMD 108 de Leica y mediante un programa de análisis de imagen, Image Proplus (7.0) software de Media Cybernetics, se determinó el área de la cicatriz resultante del infarto. La extensión del infarto se expresó como el porcentaje de zona fibrótica respecto al total del área del ventrículo izquierdo. Las mediciones se realizaron en el departamento de Patología de la Universidad de Valencia.

En el caso del cerdo, tras realizar fotografías por ambas caras de cada sección de corazón, se midió el tamaño de la zona necrótica mediante el programa de imagen "Scion

Image” y se calculó el porcentaje de la zona necrótica respecto al ventrículo izquierdo. En el caso del grupo crónico de infarto, para determinar el remodelado producido por el infarto crónico (5 semanas después del IAM), con el programa de imágenes “Scion Image” se midió el grosor (desde endocardio a epicardio en mm) de cuatro puntos en cada sección de ventrículo izquierdo, que correspondieron a la zona media de tabique interventricular (TIV), pared lateral izquierda, pared anterior y pared posterior.

4.6.2 MEDIDA DE LA DENSIDAD VASCULAR

El número de vasos se calculó a partir de las imágenes de fluorescencia de tejido cardíaco marcado con el anticuerpo anti-RECA-1, obtenidas a 20 aumentos, a razón de 8 fotos en borde de infarto y 3 laminillas por animal.

La densidad vascular se midió con un programa de tratamiento de imágenes (Image Proplus (7.0) software de Media Cybernetics) y se expresó como número de vasos/mm². Las mediciones se realizaron en el departamento de Patología de la Universidad de Valencia.

4.6.3 ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LOS CARDIOMIOCITOS

En cortes teñidos con el anticuerpo anti-Laminina, una vez realizadas las fotografías de las laminillas a 20 aumentos, a razón de 8 fotos en borde de infarto y 2 laminillas por animal; se procedió a la cuantificación del área de los cardiomiocitos mediante el programa Image Pro Plus.

El porcentaje de cardiomiocitos se calculó atendiendo a su tamaño por intervalos de 100 μm , comenzando de 0-100 μm^2 , hasta un máximo de 900-1.000 μm^2 . Las mediciones se realizaron en el departamento de Patología de la Universidad de Valencia.

4.7 FABRICACIÓN DE LOS BIOMATERIALES.

Existen diferentes procedimientos experimentales que permiten la síntesis de biomateriales, entre los que se encuentran: la separación de fases, las plantillas, el autoensamblado y la electrohilatura (electrospinning). Esta última, presenta las ventajas de permitir la producción de fibras muy finas (del orden de nanómetros) con una elevada densidad por unidad de área superficial, lo que le confiere al material buenas propiedades mecánicas, y además es de fácil procesado (Newton *et al.* 2009; Garg y Bowlin 2011).

El biomaterial de colágeno se obtuvo de la empresa Viscofan Bioengineering, a través de la colaboración con el Dr. F. Prosper, mientras que los materiales PLA y PVDF utilizados fueron sintetizados en el Instituto Tecnológico Textil AITEX por el método de la electrohilatura. Mediante esta técnica los biomateriales se obtienen a partir de una disolución de polímero biocompatible, a la que se le aplica una elevada diferencia de

potencial. El campo electrostático formado entre dos electrodos, uno en contacto con el polímero y el otro a una cierta distancia (entre 10 y 15 cm), permite que el polímero cargado eléctricamente venza la tensión superficial y forme finos chorros de disolución que se ven arrastrados por el campo electrostático formado hasta el electrodo opuesto. Durante este recorrido, el chorro sufre un estiramiento y latiguo que hace que disminuya su tamaño hasta formar fibras con un diámetro entre los 500 y 1500 nm (Figura 7). Estas fibras se depositan formando una estructura tridimensional muy porosa de fibras entrecruzadas y en estado sólido. Este velo de nanofibras se colecta sobre un soporte no textil que permitirá la manipulación de las nanofibras.

En función del voltaje aplicado, la distancia entre electrodos y la velocidad de recolección de las nanofibras formadas, se pueden obtener velos de nanofibras con unas propiedades muy especiales, como una alta porosidad, pequeño tamaño de poros y elevada superficie específica.

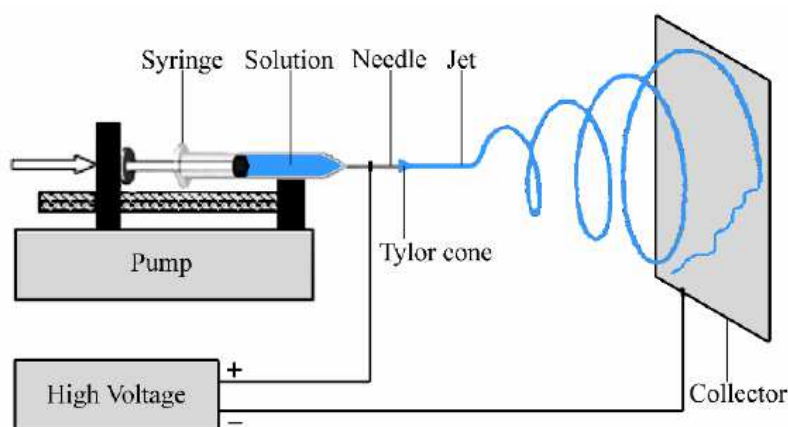


Figura 7. Esquema de obtención de nanofibras mediante un montaje clásico de aguja conectada a un campo electrostático. (Tomado de M. Ziabari, 2008; vol 10. Brazilian Journal of Chemical Engineering).

4.8 PROCEDIMIENTOS CON ANIMALES

Todos los procedimientos *in vivo* de este estudio fueron previamente supervisados y aprobados por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Fundación Hospital La Fe y/o el Centro de Investigación Príncipe Felipe, respetando la legislación española sobre “Protección de animales utilizados para experimentación y otros propósitos científicos” (Real Decreto 1201/2005) y las Directivas de la Comunidad Europea al respecto.

El modelo *in vivo* utilizado para la realización de este trabajo han sido ratas macho de 200 gramos de peso de las cepas Nude (*rnu/rnu*) y Wistar, ambas obtenidas de los laboratorios Charles River. Las primeras se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos (SPF), con aire filtrado HEPA, temperatura estable a 22°C, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y comida y agua *ad libitum*, esterilizadas por irradiación. La cepa

Wistar fue mantenida en condiciones similares pero sin los mismos requisitos de esterilidad. Además se utilizaron cerdos de la raza Large White, hembras de unos 20 Kg de peso, obtenidos de una granja acreditada para suministrar animales para centros de investigación.

4.8.1 MAMÍFERO INFERIOR

4.8.1.1 Modelo de infarto de miocardio

Anestesia

La anestesia general se realizó mediante la inducción en cámara anestésica con una mezcla de oxígeno y sevoflurano (5% v/v Abbott). A continuación se procedió a la intubación de la rata, para lo cual el animal se colocó en decúbito supino y con una fuente de luz fría en dirección a la zona ventral del cuello se consiguió la transiluminación de la tráquea. Separando con delicadeza la lengua se facilitó el acceso a la glotis y se procedió a la intubación endotraqueal con un catéter de 18 G (1,3 mm de diámetro) y una longitud de 2" (5,1 cm) (Braun). A partir de ese momento, la rata se conectó a un respirador automático (modelo 683, Harvard Apparatus), ajustando los parámetros siguientes: volumen tidal 2 mL, ritmo de respiración 100 respiraciones por minuto y 2% de sevoflurano. Se comprobó la correcta intubación mediante la confirmación de aliento sobre una superficie de cristal primero y asegurando el movimiento rítmico del tórax con respecto a la ventilación asistida después. El plano anestésico se mantuvo mediante anestesia volátil con una mezcla de 0,3 L de oxígeno con 2% de sevoflurano a lo largo de todo el procedimiento quirúrgico. La rata fue colocada sobre una manta eléctrica para asegurar el mantenimiento de la temperatura corporal. Se utilizaron 0,05 mg/Kg de fentanilo (Fentanest, Kern Pharma) como analgesia intraoperatoria mediante inyección intraperitoneal (IP). Para cubrir la analgesia postoperatoria se utilizaron 0,05 mg/Kg de buprenorfina IP (Buprex, Schering-Plough S.A.). El tratamiento con buprenorfina se mantuvo hasta 48 horas después de la cirugía.

Técnica quirúrgica

Para la realización del infarto experimental, la rata se colocó en decúbito lateral derecho con la extremidad anterior izquierda en hiperextensión. A continuación se rasuró el hemitórax izquierdo y se preparó la zona quirúrgica asépticamente con betadine (Viatrix Manufacturing) para la realización de una toracotomía lateral en el 4º espacio intercostal izquierdo. Para ello se realizó una incisión cutánea de dos centímetros y tras la disección de los músculos pectorales e intercostales (estos últimos cranealmente a la costilla para evitar el paquete vascular que corre caudalmente a las mismas) se accedió a la cavidad torácica. Se colocó un separador de Weitlaner con el que se consiguió un buen campo quirúrgico y con una torunda embebida en suero salino fisiológico (SALINO) se retiraron con delicadeza

el timo cranealmente y el lóbulo pulmonar dorsalmente. Consecutivamente, con ayuda de dos pinzas de microcirugía, se realizó una pericardiotomía permitiendo visualizar la arteria coronaria descendente anterior izquierda (ACDAI). Inmediatamente se procedió a la oclusión de la misma mediante ligadura permanente con sutura de monofilamento no reabsorbible de 7/0 (Premilene, Braun). El cambio inmediato de coloración de la zona infartada (a un color azulado) permitió verificar que la técnica se había realizado de manera adecuada. Seguidamente se realizó el trasplante intramiocárdico con 21 μ l de SALINO o 200.000 células (MSC o MSC-HIF), y microesferas fluorescentes (FluorSpheres polystyrene microspheres, 1 μ m, red fluorescent (580/605), Invitrogen) diluidas en una proporción 1:30. Para ello se realizaron 3 inyecciones de 7 μ l en tres puntos diferentes del borde del infarto con una jeringuilla Hamilton de 25 μ l (Tecnokroma). Por último se procedió al cierre del tórax por capas (unión costilla-costilla, planos musculares y sutura intradérmica) con sutura de monofilamento reabsorbible de 3/0 (Monosyn, Braun) y se curó la herida con betadine. La rata despertó tras unos minutos desde la retirada del agente anestésico.

4.8.1.2 Parámetros de función cardíaca

La ecocardiografía es una prueba fundamental para ver la evolución de la función cardíaca en el tiempo. Con ella se obtiene información muy detallada, en tiempo real, de la morfología cardíaca. Además, es una técnica no invasiva y de bajo coste.

Para realizar la ecografía, se realizó la anestesia inhalatoria de la rata con mascarilla (Sevorane 2% v/v). Tras la colocación en decúbito supino, se rasuró el hemitórax izquierdo hasta el esternón, por donde se adquirieron las imágenes. En este estudio se utilizó el ecógrafo General Electric modelo Vivid 5 equipado con una sonda lineal de 10 MHz.

El protocolo para la toma de imágenes ecocardiográficas fue el siguiente: se efectuó un día antes de la realización del infarto (función cardíaca basal) y 30 días post-infarto (función cardíaca post-IAM).

El estudio ecocardiográfico en cada uno de los tiempos anteriormente comentados constaba de una ecocardiografía transtorácica en el eje corto (corte transversal del corazón a nivel de los músculos papilares) incluyendo la toma de imágenes tanto en modo-M (imagen lineal a la que se le ha introducido la variable tiempo) como 2D (imagen bi-dimensional en tiempo real). Los parámetros funcionales se calcularon en tres ciclos cardíacos consecutivos utilizando métodos estándares. En el modo-M se midieron el diámetro del ventrículo izquierdo (DVI), el grosor de la pared anterior (GPA) y el grosor de la pared posterior (GPP) tanto en diástole como en sístole (Figura 8). En las imágenes 2D se midió el área interna del ventrículo izquierdo (AVI) en diástole y en sístole.

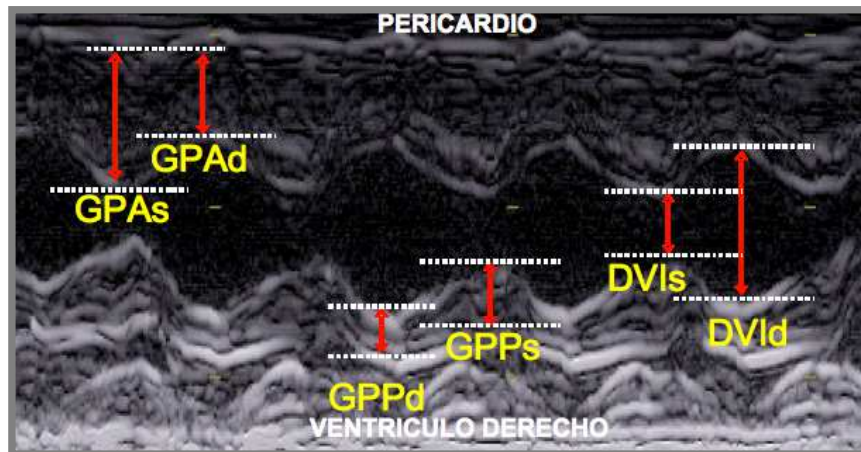


Figura 8. Imágenes en modo-M donde se indican los diferentes parámetros del ventrículo izquierdo a medir. GPAd y GPAs: Grosor pared anterior en diástole y sístole respectivamente; GPPd y GPPs: Grosor pared posterior en diástole y sístole respectivamente; DVId y DVIs: Diámetro ventrículo izquierdo en diástole y sístole respectivamente.

A partir de estas medidas se calcularon los siguientes parámetros de función cardíaca:

- Cambio Porcentual de Área (CPA): $[(AVI_d - AVI_s) / AVI_d] \times 100$
 Donde: AVI_d: Área ventrículo izquierdo diastólico
 AVI_s: Área ventrículo izquierdo sistólico
- Fracción de Acortamiento (FA): $[(DVI_d - DVI_s) / DVI_d] \times 100$
 Donde: DVI_d: Diámetro ventrículo izquierdo diastólico
 DVI_s: Diámetro ventrículo izquierdo sistólico
- Engrosamiento de la Pared Anterior (EPA): $(GPAs - GPAd - 1) \times 100$
 Donde: GPAs: Grosor pared anterior en sístole
 GPAd: Grosor pared anterior en diástole

4.8.1.3 Tratamiento con 5-Etiniil-2'-deoxiuridina (Edu)

En un grupo de estudio, tras realizar el infarto de miocardio y el trasplante (con SALINO, MSC o MSC-HIF), se procedió a la inyección intraperitoneal diaria de 50 mg/Kg de EdU diluido en 0,5 mL de suero salino fisiológico, durante 15 días.

La realización de la reacción enzimática mediante la cual los núcleos de las células en división quedan marcados de verde nos permitió, mediante contaje con microscopio de fluorescencia, obtener el índice de proliferación celular y el porcentaje de cardiomiocitos en proliferación.

4.8.1.4 Modelo de implante de biomaterial

Tras anestesiar al animal, se realizó una toracotomía lateral izquierda seguida de IAM como se ha explicado con anterioridad. A continuación se procedió a realizar las diferentes técnicas de anclaje, tal y como se describen a continuación: 1) La técnica de sutura consistió en colocar el biomaterial (BM) en la zona isquémica del epicardio y se fijó al mismo mediante 2 puntos sueltos de sutura con Premilene 7/0 (Braun). 2) Se realizó el mismo procedimiento que la técnica anterior, pero en este caso el BM recibió 4 puntos sueltos de sutura con Premilene 7/0 (Braun). 3) Técnica de pegamento quirúrgico (Glubran2, GEM), mediante la cual se aplicó el pegamento sobre una de las superficies del BM y a continuación se colocó sobre la superficie cardíaca. 4) La última técnica consistió en la utilización del propio pericardio para cubrir el BM, previamente colocado, e inmovilizarlo sobre el epicardio.

La duración del estudio fue de un mes, pasado el cual se procedió a la eutanasia del animal y apertura del tórax para determinar qué técnica resultó ser la más adecuada.

4.8.1.5 Modelo de inducción de adherencias pericárdicas

Tras realizar la anestesia general y abordaje quirúrgico como se ha explicado en el apartado 4.8.1.1, se procedió al raspado de la superficie cardíaca mediante aguja de 18 G. Una vez se pudo apreciar macroscópicamente el daño producido al epicardio, se procedió al cierre del tórax.

La duración del experimento fue de 1 y 2 meses, transcurridos los cuales se realizó la anestesia de la rata con apertura diafragmática para comprobar macroscópicamente la formación o no de adherencias pericárdicas.

Las adherencias encontradas se clasificaron en 3 tipos: los animales calificados como (+) presentaron importantes adherencias fibróticas, produciendo una fuerte unión del epicardio a la pared del tórax, difícilmente resecables mediante cirugía y con alto riesgo de perforación ventricular. El segundo tipo (+/-), incluyeron aquellos animales que presentaban adherencias entre el epicardio, el pericardio y la pleura, que se caracterizaron por ser relativamente fáciles de reseca mediante bisturí. Por último los animales que presentaron pocas o nulas adherencias pericárdicas, que no suponen un problema para los cirujanos se clasificaron como (-).

4.8.2 MAMÍFERO SUPERIOR

4.8.2.1 Modelo agudo de infarto de miocardio

Anestesia

Se realizó la preanestesia del cerdo con ketamina a una dosis de 30 mg/Kg (Ketolar, Pfizer) y midazolam a una dosis de 0,3 mg/Kg (Midazolam, Mayne, Mayne Pharma S.L.) mediante inyección intramuscular en las tablas del cuello. Tras 10 minutos de espera para que la sedación hiciera efecto, y previa cateterización de la vena auricular (Vasofix Safety 22 G x 2", Braun), se procedió a la inducción anestésica vía intravenosa (IV) con propofol 6 mg/mL (Lipuro, Braun). A continuación se realizó la intubación endotraqueal (tubo endotraqueal Nº 6, Mallinckrodt Medical) para proceder al mantenimiento del plano anestésico con sevorane 2,5% (Sevofluorane, Abbot) en una mezcla de oxígeno (60%) y protóxido de nitrógeno (40%) con ventilación asistida (respirador Temel VT3). Se ajustó la ventilación mecánica a una frecuencia entre 16 y 20 respiraciones por minuto, con un volumen de 5 L/minuto. Para la toma de muestras y administración de fármacos se colocó una vía central mediante acceso por la vena yugular (Vasofix Safety 16 G x 2 ", Braun). La analgesia y relajación muscular se alcanzaron con la administración en bolo IV de 0,2 mg/Kg de morfina (Cloruro mórfico, B/Braun) y 0,08 mg/Kg de bromuro de vecuronio (Norcuron, Shering-Plough). A continuación, a través de la vía intravenosa permeable conectada a una llave de tres vías se procedió a la fluidoterapia de mantenimiento (10 mL/Kg/hora de Solución Salina Fisiológica (Grifols R, Grifols)). Mediante bomba de infusión continua (Braun Percusor Melsungen A.G) se procedió a la administración de una solución de morfina como agente analgésico y bromuro de vecuronio como bloqueante neuromuscular (0,2 mg/Kg y 0,08 mg/Kg respectivamente) en 50 mL de suero salino, a una velocidad de 12 mL/hora. El cerdo fue colocado sobre una manta eléctrica para asegurar el mantenimiento de la temperatura corporal a lo largo de todo el procedimiento.

Procedimiento quirúrgico

A) Abordaje quirúrgico

Para la realización del infarto experimental se colocó al cerdo en decúbito supino, con las extremidades anteriores en hiperextensión. A continuación se rasuró y preparó asépticamente con betadine (Viatrix Manufacturing) la zona quirúrgica. El acceso a la cavidad torácica se obtuvo por esternotomía media mediante incisión del plano cutáneo y planos musculares con bisturí eléctrico seguido de apertura del esternón. Seguidamente se colocaron unos separadores de Rose para mantener el tórax abierto y se procedió a la pericardiotomía con exposición del corazón.

Se procedió a la disección de la arteria coronaria descendente anterior, en la zona proximal al nacimiento de la segunda diagonal y a continuación se colocó una ligadura de referencia (para más tarde realizar la oclusión arterial).

B) Parámetros de función cardíaca global

La pulsioximetría (Cardio-Aid TM 100, Artema) y la temperatura rectal se monitorizaron a lo largo de todo el experimento. El registro del electrocardiograma (ECG) periférico se realizó con electrodos subcutáneos en extremidades. La implantación de un catéter a través de pared, en cavidad del ventrículo izquierdo (VI) y otro en aurícula izquierda (AI) conectados a un transductor de presión (Transpac IV, Abbot) permitió la medida de presión en ventrículo izquierdo y en aurícula izquierda (PVI y PAI). Tras la disección de la raíz aórtica, separándola cuidadosamente de la arteria pulmonar, se implantó una sonda de flujo (Transonic Flowprobe 16SB) justo por encima de los ostium coronarios. Se conectó a un medidor de flujo (Modelo T206 Serie T206X-93-0480, Transonic Systems Inc.) indicando el caudal de sangre que pasa por la raíz aórtica cada 3 latidos, lo que nos permitió el cálculo del volumen latido y del gasto cardíaco mediante la siguiente fórmula:
Gasto cardíaco = Volumen latido x Frecuencia cardíaca.

C) Parámetros de función cardíaca regional

Se implantaron tres pares de microcristales ultrasónicos (Sonometrics) para el registro de curvas de contractilidad miocárdica regional en tres zonas diferentes del miocardio del VI. Las zonas de colocación de los microcristales fueron: La base del VI (zona sana), el tercio medio de pared anterior de VI (zona borde o peri-isquémica) y la pared anterior del ápex (zona isquémica). Estos cristales, conectados a un medidor ultrasónico de movimiento (Sonometrics Corporation Digital Ultrasonic Measurement System TRX Serie 6), permitieron la medida de contractilidad regional.

Se midieron las longitudes telediastólica (LTd) y telesistólica (LTs) y mediante la fórmula que se muestra a continuación se calculó la fracción de acortamiento (FA) de cada segmento miocárdico elegido.

- Fracción de acortamiento (FA): $[(LTd-LTs)/LTd] \times 100$
Donde: LTd: Longitud telediastólica
 LTs: Longitud telesistólica

Se realizó el registro de los parámetros de función anteriormente mencionados a lo largo del experimento (en los tiempos que se detallan a continuación): Basal, 30 minutos de isquemia, 60 minutos de isquemia, 30 minutos de reperfusión, 60 minutos de reperfusión y 2 horas de reperfusión.

En estos mismos tiempos se extrajeron 5 mL de sangre venosa para posterior análisis bioquímico. Se evaluó el daño miocárdico mediante la medición de niveles en plasma de Troponina T (Tn T) y Creatinina Quinasa MB (CK-MB).

D) Recogida y análisis de datos de función cardíaca

Se digitalizaron y almacenaron en memoria electrónica de señales (BIOPAC Systems Inc) los parámetros de función cardíaca global: ECG (Derivada II y Derivada III) (mVol), PVI (sistólica pico: PVI y telediastólica: PTdVI) (mm Hg), primera derivada de la presión con respecto al tiempo (dP/dt) (mm Hg/seg), presión media de aurícula izquierda (PAI) (mm Hg), flujo de raíz aórtica (FI Ao) (mL/3 latidos) y gasto cardíaco calculado (L/minuto), así como los parámetros de función miocárdica segmentaria: longitudes telediastólica y telesistólica (mm) y fracción de acortamiento (%).

E) Protocolo isquémico

Tras la calibración de los distintos parámetros y estabilización del modelo, se procedió a la oclusión de la ACDAI mediante un microclamp vascular durante 60 minutos. Transcurrido el periodo de isquemia, se retiró el microclamp y se procedió así a la reperfusión de la arteria durante dos horas.

A continuación se realizó la eutanasia del animal mediante la inyección intracardíaca de 10 mL de cloruro potásico (KCl), para producir la parada cardíaca en diástole.

4.8.2.2 Modelo crónico de infarto y adherencias pericárdicas

La preparación y abordaje quirúrgicos se realizaron de la misma manera que para el modelo agudo. Se monitorizaron parámetros de función cardíaca global ECG y PVI; pero no se implantaron los cristales ni se colocó el medidor de flujo de aorta con la intención de manipular lo menos posible el corazón y maximizar la supervivencia de estos animales.

Una vez llegados al periodo de reperfusión, en los casos en los que se aplicó el biomaterial, éste se colocó sobre el epicardio mediante la ayuda de unas pinzas y se procedió a la sutura del mismo al miocardio con sutura de monofilamento no absorbible de 6/0 (Premilene, Braun) mediante 4 puntos sueltos correspondientes a cada una de las esquinas del biomaterial.

El cierre del tórax se consiguió mediante la unión del esternón con sutura de acero del Nº 1 (Laboratorios Aragón), unión de los planos musculares y subcutáneo mediante sutura continua de monofilamento reabsorbible del 0 (monosyn, Braun) y finalmente cierre de piel mediante grapas (Grap-35 R, Quirumed). Se aplicó un tubo de drenaje torácico conectado a un redón (Straigh thoracic catheter; drenofast, Hospital Care) para restablecer la presión negativa en la cavidad torácica. Se eliminó el gas anestésico y se dejó que el animal se recuperara y comenzase con respiración espontánea. A partir de este momento se le retiró

el tubo endotraqueal y se continuó con la fluidoterapia con suero glucosado y salino fisiológico a una velocidad de 4 mL/Kg/hora. Se proporcionó calor durante las siguientes 12 horas mediante lámpara de infrarrojos y se controlaron las constantes vitales regularmente.

La analgesia post-operatoria consistió en 2 gramos de metamizol magnésico (Nolotil, Boehringer Ingelheim) y 1 mg de buprenorfina (Buprex, Schering-Plough S.A.) durante las siguientes 24-48 horas. Como antibioterapia se administró 1 gramo de cefonicid IV (Cefonicid, CombinoPharm) antes de comenzar la cirugía y 4 horas después. Luego se continuó durante una semana dos veces al día vía intramuscular (Cefonicid Normon, Laboratorios Normon).

En este modelo se realizaron los mismos tiempos de registro de los parámetros de función que en el caso del infarto agudo, excepto que en este caso añadimos también un último registro a las 5 semanas tras la isquemia.

Pasado el tiempo experimental (5 semanas), se procedió a la realización de la anestesia general y apertura del tórax. Se observó macroscópicamente el estado del corazón y las adherencias existentes y se registró con fotografías. Por último, se procedió a la eutanasia del animal mediante inyección intracardiaca con 10 mL de KCl y posterior extracción de la pieza para su estudio histológico.

4.8.2.3 Parámetros de función cardíaca

La puesta a punto del modelo de ecocardiografía en el cerdo fue de mayor complejidad pero a la vez nos proporcionó mayor información que en el modelo de rata, ya que se pudieron obtener prácticamente los mismos parámetros que en los estudios ecocardiográficos de la especie humana. La recopilación de todas estas imágenes nos permitió conocer el estado de las válvulas, el diámetro de las cavidades, el grosor de las paredes, la velocidad de flujo a través de las válvulas y la contractilidad del miocardio. Para ello se utilizó un ecógrafo Vivid S5 (General Electrics) con una sonda de 3 MHz.

El protocolo para la toma de imágenes ecocardiográficas fue el siguiente: Se efectuó un día antes de la realización del infarto (función cardíaca basal) y 5 semanas post-infarto (función cardíaca post-IAM). Para ello fue necesario la anestesia general del cerdo tal y como se ha explicado anteriormente.

Con la realización del estudio ecocardiográfico se obtuvieron los diámetros sistólico y diastólico de ventrículo izquierdo a nivel basal, así como los grosores septales y de pared anterior tanto en sístole como en diástole, en el plano paraesternal eje largo (en modo-M y 2D). En el plano apical de cuatro cavidades se obtuvieron las medidas de los volúmenes ventriculares, lo que permite estimar la fracción de eyección por el método Simpson. Además en este plano se valoró la función valvular con doppler color y la función diastólica del ventrículo izquierdo mediante el doppler pulsado en la válvula mitral. Las alteraciones de

la contractilidad segmentaria se valoraron en los planos transversales a nivel basal, medio y apical.

A partir de estas medidas se calcularon los siguientes parámetros de función cardíaca:

- Fracción de Acortamiento (FA): $[(DVI_d - DVI_s) / DVI_d] \times 100$
 Donde: DVI_d: Diámetro ventrículo izquierdo diastólico.
 DVI_s: Diámetro ventrículo izquierdo sistólico.
- Engrosamiento de la Pared Anterior (EPA): $(GPAs - GPAd - 1) \times 100$
 Donde: GPAs: Grosor pared anterior en sístole
 GPAd: Grosor pared anterior en diástole
- Fracción de eyección (FE) (Método Simpson): $[(Vol. VId - Vol. VIs) / Vol. VId] \times 100$
 Donde: Vol. VIs: Volumen del VI al final de la sístole
 Vol. VId: Volumen del VI al final de la diástole

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos de los experimentos realizados están expresados como media \pm desviación estándar (DS) o error estándar (ES).

Se comprobó la normalidad de las distribuciones de las variables con el test de Kolmogorov-Smirnov. Se compararon los distintos parámetros en cada serie respecto a su situación basal y entre las distintas series.

En las variables con distribución normal, se estudiaron las diferencias de medias para parámetros cuantitativos mediante la aplicación de ANOVA (N muestras) y el test de la t de Student para comparación de dos medias (pareadas y no pareadas).

En las variables cuya distribución no cumplía la normalidad se utilizaron las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney (pareadas) o el test de Wilcoxon (no pareadas) para dos grupos y el test de Kruskal-Wallis para más de dos grupos.

La comparación de las variables cualitativas se realizó mediante al aplicación de test de comparación de porcentajes.

Los análisis fueron realizados con los programas SPSS 9.0 y Graphpad 5. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con $p < 0,05$, con un intervalo de confianza del 95%.



RESULTADOS

5. RESULTADOS

Los resultados de este estudio se han estructurado siguiendo el esquema de los objetivos propuestos. Todos los experimentos con células han sido realizados utilizando muestras de MSC humanas previamente aisladas de pacientes entre 18 y 65 años de edad, en el banco nacional de células madre, de modo que cumplen los requisitos éticos y legales para trabajar con este tipo de células según establece la Ley 14/2007, del 3 de Julio, sobre Investigación Biomédica.

CAPÍTULO 5.1: ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA IL-1 β EN LAS MSC

5.1.1 REPERCUSIÓN DE LAS CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR DE LAS MSC

En este capítulo hemos estudiado *in vitro* el efecto de la respuesta inflamatoria en la biología de las células troncales adultas. Tras el infarto, en la fase aguda de la enfermedad, existe una abundante sobre-expresión de citoquinas y factores de crecimiento que gobiernan el proceso inflamatorio y dictaminan el comportamiento de las células troncales trasplantadas en el nicho isquémico (Vandervelde *et al.* 2005). Debe tenerse en cuenta el efecto de estas citoquinas sobre las células trasplantadas, ya que es posible que (aún siendo la dosis y el tipo celular idóneo para la regeneración del tejido infartado) las células mueran o se desplacen a otras zonas del organismo pocas horas tras su trasplante por falta de señales adecuadas para su adhesión, proliferación o supervivencia, o por exceso de señales pro-apoptóticas (Segers *et al.* 2006). Por desgracia éste es un campo harto complejo, ya que los efectos de las citoquinas tienen carácter pleiotrópico y dependen de las variaciones espaciales y temporales; por ello las terapias encaminadas a inhibir o a potenciar dichos factores en el corazón son arriesgadas pudiendo producir efectos adversos (Frangogiannis *et al.* 2002; Nian *et al.* 2004).

Aunque se desconoce el perfil detallado del tipo de citoquinas que aparecen después del infarto, que es el momento del trasplante, se ha apuntado que las citoquinas IL-1, IL-6 y las quimioquinas IL-8 y CXCL12 (SDF-1 α) son las que permanecen mayoritariamente elevadas (Pillarisetty y Gupta 2001). Por este motivo, en nuestro laboratorio se seleccionaron dichas citoquinas y se estudió la respuesta individual inducida por cada una de ellas en términos de activación de vías de señalización celular.

En la Figura 9 se observan las vías de señalización que se ven activadas en las MSC cuando son estimuladas con determinadas citoquinas.

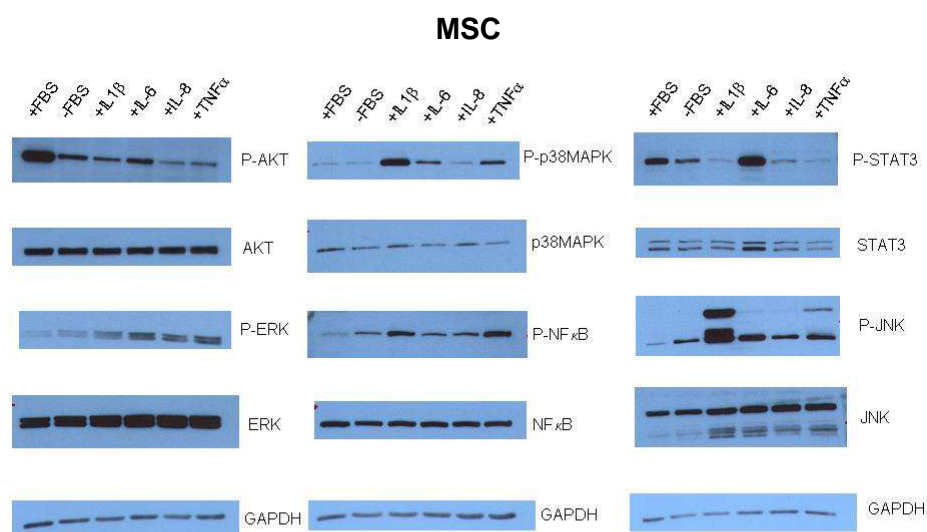


Figura 9. Efecto de las citoquinas pro-inflamatorias en las vías de señalización de las MSC. Las MSC se incubaron durante 30 minutos con las siguientes citoquinas: IL-1 β (25 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL), IL-8 (20 ng/mL), TNF- α (50 ng/mL). Los lisados proteicos totales se resolvieron mediante SDS-PAGE y se analizó la fosforilación de Akt, ERK, p38MAPK, NF- κ B, STAT3 y JNK mediante western blot.

Atendiendo a estos resultados, este estudio se centró en el efecto de la IL-1 β en la biología de las MSC, por ser ésta una citoquina pro-inflamatoria modelo; así podrían extrapolarse los resultados a otras citoquinas, en especial para el TNF- α , ya que se ha descrito que comparten muchas vías de señalización y respuestas biológicas (Kim *et al.* 2009).

5.1.2 PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS MSC CULTIVADAS CON IL-1 β

Para analizar el efecto de la adición de IL-1 β sobre la respuesta global de las MSC, se realizaron estudios de expresión génica mediante la tecnología de *microarrays*. Las MSC se cultivaron con o sin IL-1 β (a una dosis de 25 ng/mL) durante 24 horas, posteriormente se recogieron y se procedió a la extracción de ARN para su análisis. Se realizó un análisis bioinformático del transcriptoma de las MSC con o sin IL-1 β utilizando la plataforma Babelomics (<http://www.babelomics4.org>), que permitió clasificar los genes por funciones moleculares utilizando (GO, KEGG), revelando así las principales familias de genes afectadas por el tratamiento (Tabla 6).

El cultivo celular con IL-1 β produjo la activación de genes asociados a categorías muy específicas de familias génicas o funciones moleculares. En particular, identificamos alteraciones en la expresión de genes implicados en los siguientes procesos biológicos: respuesta a cicatrización, respuesta inmune e inflamatoria, quimiotaxis, comportamiento locomotor, regulación de la proliferación celular, cascada I-kappaB quinasa/NF-kappaB, regulación negativa de la apoptosis, coagulación sanguínea y adhesión celular.

Kegg	Conjunto de procesos génicos	valor <i>P</i>
hsa04060	Interacción receptores citoquina-citoquina	2.54E-9
hsa04062	Vía de señalización de quimioquinas	1.71E-06
hsa04630	Vía de señalización de Jak-STAT	1.80E-04
hsa04620	Vía de señalización de receptores Toll-like	5.45E-04
hsa04640	Linaje celular hematopoyético	6.09E-04
hsa04210	Apoptosis	4.17E-02
hsa04010	Vía de señalización de MAPK	5.02E-01
hsa04514	Moléculas de adhesión celular (CAMs)	7.22E-01
hsa04330	Vía de señalización de Notch	8.60E-01
hsa04370	Vía de señalización de VEGF	4.30E-01
GO Función Molecular	Conjunto de procesos génicos	valor <i>P</i>
GO:0005125	Actividad citoquina	3.95E-19
GO:0008009	Actividad quimioquina	5.88E-15
GO:0001664	Acoplamiento a proteínas-G	2.31E-4
GO:00015057	Actividad receptor Trombina	1.51E-2
GO:0005164	Unión receptor Factor de necrosis tumoral	2.86E-3
GO Proceso Biológico	Conjunto de procesos génicos	valor <i>P</i>
GO:0009611	Respuesta a cicatrización	2.00E-21
GO:0006955	Respuesta inmune	1.74E-19
GO:0006954	Respuesta inflamatoria	2.43E-18
GO:0006952	Respuesta de defensa	2.43E-17
GO:0006935	Quimiotaxis	5.44E-10
GO:0007626	Comportamiento locomotor	6.15E-9
GO:0042127	Regulación de la proliferación celular	1.27E-5
GO:0030595	Quimiotaxis leucocitaria	3.04E-3
GO:0007249	Cascada I-kappaB kinasa/NF-kappaB	3.27E-3
GO:0043066	Regulación negativa de la apoptosis	3.64E-3
GO:0007596	Coagulación sanguínea	1.36E-2
GO:0007155	Adhesión celular	3.26E-2

Tabla 6. Procesos biológicos activados en MSC tratadas con IL-1 β . El análisis bioinformático identificó las familias génicas expresadas en las condiciones experimentales MSC y MSC-IL-1 β . Se indican los nombres sistemáticos de los procesos biológicos y la descripción de los mismos, así como el nivel de significancia (valor *P*).

5.1.3 EXPRESIÓN DE QUIMIOQUINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO POR LAS MSC

Tras el análisis bioinformático, los genes más sobre-expresados relacionados con estos procesos biológicos fueron comprobados mediante PCR en tiempo real. Así se confirmaron los datos obtenidos *in silico*, que apuntaban que el cultivo de MSC en presencia de IL-1 β desencadena la expresión de quimioquinas con importante poder trófico para otros tipos celulares como son las células del sistema inmune, junto con la inducción de la

expresión de integrinas, otras moléculas de adhesión y metaloproteinasas implicadas en la migración de las MSC a través de la matriz extracelular (Tabla 7, Figura 10).

Genes	Nº banco génico	Media PC*	DS PC	Valores Normalizados	Error Normalizado
Quimioquinas					
CXCL1	NM_001511	21.72	0.036	89.1	5.9
CXCL3	NM_002090	20.92	0.036	154	11
CXCL5	NM_002994	28.49	0.050	8.65	0.59
CXCL6	NM_002993	26.37	0.071	16.5	1.27
CXCL10	NM_001565	24.10	0.051	2028	127
CXCL11	NM_005409	29.72	0.178	41.3	3.07
CX3CL1	NM_002996	25.96	0.087	21.1	0.76
CCL2	NM_002982	17.01	0.006	13.1	0.46
CCL3	NM_002963	29.64	0.050	29.2	15.8
CCL5	NM_002985	23.82	0.052	312	27
CCL7	NM_006273	23.93	0.032	13.1	0.90
CCL8	NM_005623	27.98	0.167	12.2	1.00
CCL20	NM_004591	21.19	0.068	187	15
Moléculas de Adhesión					
Selectin E	NM_000450	17.64	0.085	0.94	0.08
VCAM-1	NM_001078.3	17.31	0.010	5.33	0.19
ICAM-1	NM_000201	22.42	0.094	24.5	0.84
ICAM-4	NM_001544.3	28.16	0.116	87.4	9.1
Syndecan 4	NM_002999.3	20.51	0.030	1.45	0.05
IBSP	NM_004967.3	27.12	0.049	6.21	1.64
ITGA9	NM_002207.2	27.63	0.098	0.81	0.05
ITGB3	NM_000212.2	22.43	0.008	2.75	0.11
ITGB8	NM_002214.2	27.76	0.023	1.24	0.07
TCAM-1	NR_002947.1	27.05	0.078	2.17	0.12
Interleuquinas					
IL1	NM_000576.2	21.12	0.110	145	41
IL6	NM_000600.3	17.08	0.088	9.99	1.12
IL7	NM_000880.3	26.58	0.213	1.29	0.27
IL8	NM_000584.3	15.88	0.707	76	14.4
IL11	NM_000641.2	24.23	0.163	0.79	0.18
IL12A	NM_000882.3	29.08	0.047	1.16	0.05
IL15	NM_172175.2	28.78	0.035	2.94	0.48
IL23A	NM_016584.2	27.01	0.053	25.3	7.8
IL32	NM_001012631.1	24.41	0.078	14.8	0.81
IL34	NM_152456.2	24.59	0.078	3.12	1.44
Factores de crecimiento					
TNF	NM_000594	21.58	0.019	243	21
CSF2	NM_000758	24.47	0.188	39.3	13.2
CSF3	NM_000759	31.56	0.043	1.16	0.03
ELF3	NM_004433	25.68	0.088	656	45

Receptores Toll-like					
Claudin 1	NM_021101.4	24.49	0.148	5.49	0.23
Claudin 14	NM_144492.2	30.48	0.093	1.30	0.13
NOD2	NM_022162.1	28.04	0.17	1.23	0.11
TLR2	NM_003264.3	31.23	0.352	2.29	0.12
TLR4	NM_138554.3	26.45	0.024	1.50	0.16
Metaloproteínas					
MMP1	NM_002421.3	25.01	0.084	162	12
MMP3	NM_002426.4	16.56	0.650	47.5	7.02

Tabla 7. Niveles transcripcionales de los genes sobre-expresados en MSC tratadas con IL-1 β . Los valores normalizados de MSC-IL-1 β respecto a MSC no tratadas se calcularon y expresaron como media \pm DS de tres experimentos de PCR independientes. PC: Punto de Corte.

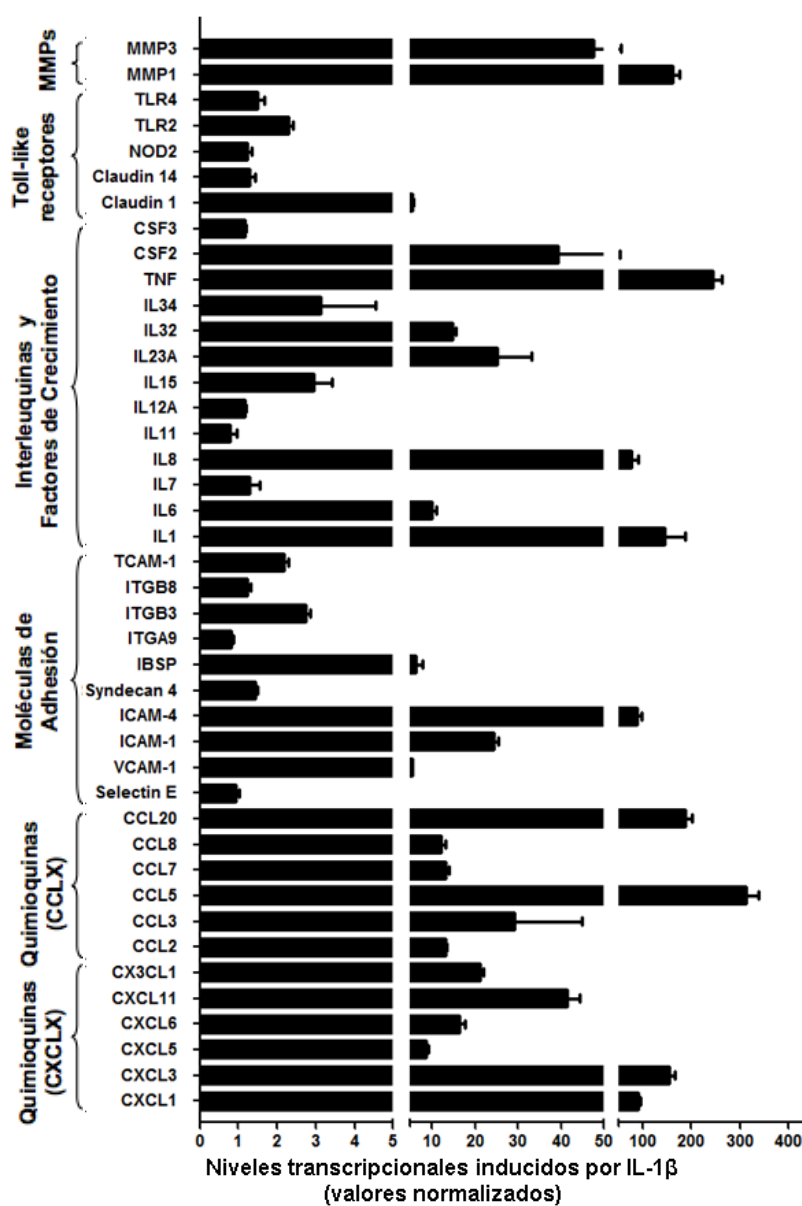


Figura 10. Cuantificación de los niveles de transcripción génica mediante análisis RT-qPCR en cultivos de MSC tratadas o no con IL-1 β . Los datos están expresados como incremento relativo al control (valores normalizados) y se representan como la media \pm DS de tres experimentos.

Las quimioquinas son pequeñas moléculas que dirigen la migración de las células inmunes mediante interacciones entre receptores quimioquina-quimioquina. Basadas en su organización genética y en la posición de 2 residuos de cisteína bien conservados en el extremo N-terminal, las quimioquinas pueden dividirse en 4 subgrupos: familias CC, CXC, C y CX₃C (Moser y Loetscher 2001). De la familia de quimioquinas CC, las CCL5 y CCL20 fueron las más sobre-expresadas en respuesta al tratamiento con IL-1 β (con un incremento de 321 \pm 27 y 187 \pm 15 veces respectivamente). Las quimioquinas CXCL1, CXCL3 y CX₃CL1 también aumentaron su expresión tras el tratamiento con IL-1 β .

CXCL10, CXCL11 y ELF3 se expresaron “de novo” tras la estimulación de MSC con IL-1 β (Tabla 7).

En cuanto a las moléculas de adhesión celular, las familias más importantes incluyen las moléculas de adhesión intercelular (ICAMs), las moléculas de adhesión vascular (VCAMs), caterinas y selectinas. Mediante PCR a tiempo real se pudo comprobar que las moléculas más afectadas por el tratamiento con IL-1 β , y que por tanto aumentaban su expresión, fueron la sialoproteína de unión a integrina (IBSP), la ICAM1, la ICAM4, la integrina beta IIIa (ITGB3), la TCAM1P y la VCAM1 (Tabla 7, Figura 10). El análisis de *microarrays* mostró que otras moléculas de adhesión también manifestaron un aumento significativo de expresión (Anexo1).

El tratamiento con IL-1 β también promovió la secreción de interleuquinas y factores de crecimiento. Las mayores diferencias en el incremento de expresión se encontraron en el TNF- α , seguido por los niveles de IL-8 y el CSF2 (Tabla 7, Figura 10). El TNF- α es una citoquina inflamatoria implicada en muchos procesos biológicos; en cambio tanto IL-8 como el CSF2 se han asociado a actividades biológicas más concretas. Así IL-8 se ha relacionado principalmente con quimiotaxis de neutrófilos mientras que el CSF2 está implicado en diferenciación monocítica (Spanaus *et al.* 1997; Gordon y Martinez 2010).

Otros procesos biológicos activados en respuesta a IL-1 β se relacionaron con defensa del hospedador y respuesta inmune (respuesta adaptativa y respuesta innata). El análisis de *microarrays* y los experimentos de PCR a tiempo real mostraron la sobre-expresión de diferentes moléculas: los receptores Toll-like (TLRs), las claudinas y las NOD proteínas. Estas moléculas están implicadas en la respuesta inmune innata frente a la infección microbiana. Sin embargo, estudios recientes han revelado que estas moléculas también modulan funciones biológicas de MSC tales como diferenciación, migración y respuestas inmunomoduladoras (Tomchuck *et al.* 2008; Kim *et al.* 2010).

5.1.4 LA IL-1 β NO INDUCE PROLIFERACIÓN EN LAS MSC

En correlación con el análisis de *microarrays* (Tabla 6 y Anexo 1), los ensayos colorimétricos con el reactivo de MMT confirmaron que la IL-1 β no induce una proliferación celular (Figura 11).

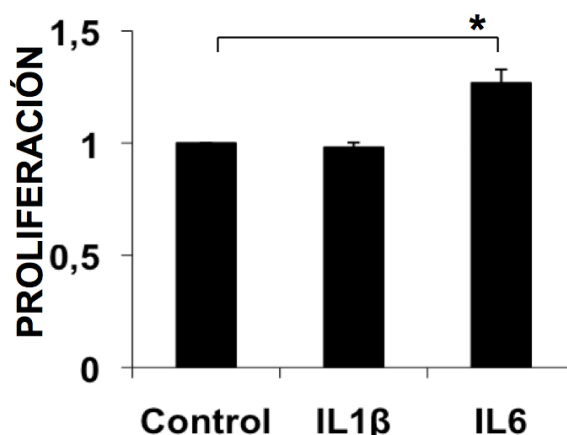


Figura 11. Ensayo de viabilidad y proliferación de cultivos de MSC tratados con IL-1 β (25ng/mL) o IL-6 (20ng/mL) durante 24 horas. Los valores se expresan como incremento respecto al control (* $p < 0,05$).

5.1.5 LA MIGRACIÓN Y ADHESIÓN INDUCIDAS POR IL-1 β ESTÁ MEDIADA PRINCIPALMENTE POR LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NF-kB

5.1.5.1 La IL-1 β activa la molécula NF-kB

Como se ha demostrado anteriormente, la IL-1 β promovió la fosforilación de NF-kB y p38MAPK. Teniendo en cuenta que NF-kB ha sido descrito en MSC como un factor clave que se activa en respuesta a estímulos inflamatorios (Crisostomo *et al.* 2008) y que la activación de p38MAPK puede estar mediada por quinasas activadas tras la fosforilación de NF-kB, decidimos centrarnos en esta vía de transducción de señal; estudios más exhaustivos de la implicación de esta vía en las respuestas biológicas inducidas por las MSC se desarrollan en los siguientes apartados.

5.1.5.2 La IL-1 β induce la migración de las MSC

Estudios previos de varios grupos, han descrito que las MSC trasplantadas son capaces de migrar *in vivo* a ambientes isquémicos y pro-inflamatorios (Zhang, Fan *et al.* 2008; Kim, Park *et al.* 2009; Arminan *et al.* 2010). Este comportamiento podría explicar la capacidad que tienen estas células para acelerar el proceso de reparación.

Se ha estudiado *in vitro* la migración de MSC hacia citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento (Ponte *et al.* 2007). Para verificar si la IL-1 β era capaz de aumentar la habilidad migratoria de las MSC, éstas se cultivaron en la cámara superior de un "transwell" y se indujo la migración mediante la adición de SDF-1 α , IL-1 β o 10% FBS en la cámara inferior (Figura 12). SDF-1 α se utilizó por ser un factor trófico bien conocido para las

MSC, implicado en la migración hacia áreas isquémicas. Como control positivo se utilizó 10% FBS, ya que es una fuente de citoquinas y factores de crecimiento.

Aunque la migración máxima se consiguió con el gradiente de FBS (con un aumento de 1.87 ± 0.12 veces), la migración de las MSC en respuesta a la IL-1 β fue mayor que la producida por el SDF-1 α (1.68 ± 0.21 veces frente a 1.35 ± 0.16 veces respectivamente), indicando así el fuerte efecto pro-migratorio inducido por esta citoquina.

A continuación evaluamos el efecto de la vía de señalización NF- κ B en la respuesta migratoria ejercida en las MSC como resultado de su tratamiento con IL-1 β . Para este propósito se construyó un vector conteniendo ARN de silenciamiento (shRNA) para IKK β , con el que se transdujeron los cultivos de MSC (MSC-shIKK β). Así se consiguieron cultivos con la ruta de NF- κ B inhibida (Mercurio *et al.* 1997; Hayden y Ghosh 2004).

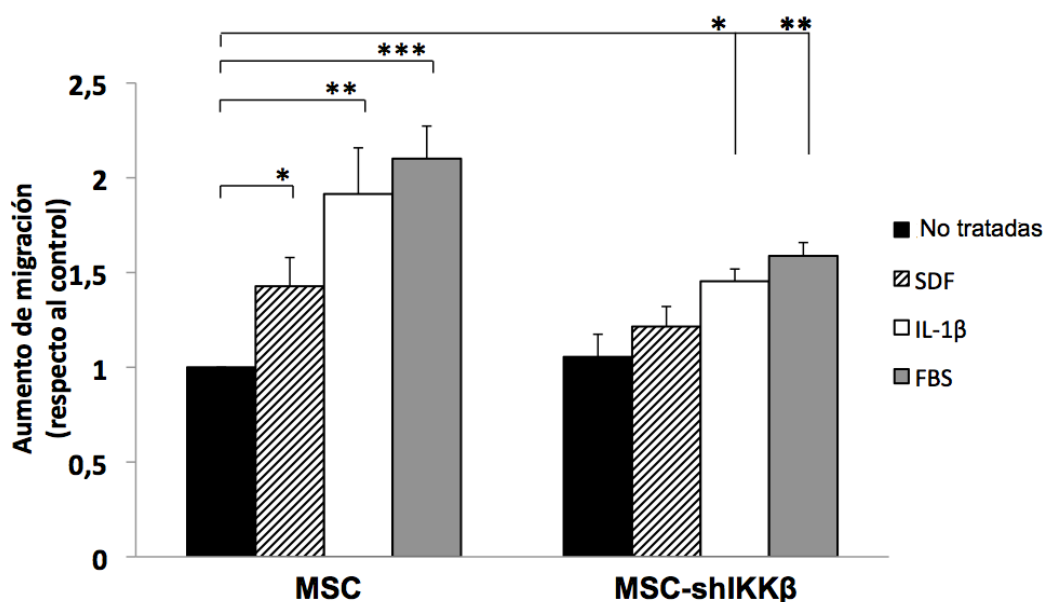


Figura 12. Migración de MSC y MSC-shIKK β hacia los factores tróficos SDF-1 α (20 ng/mL), IL-1 β (25 ng/mL) y 10% FBS. Los datos se expresan como incremento relativo respecto a los controles no tratados (MSC y MSC-IKK β). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Como se muestra en la Figura 12, la transducción de las MSC con shRNA para IKK β , a pesar de no inhibir totalmente la migración a los factores, redujo la respuesta trófica de las MSC-shIKK β hacia cualquiera de los factores probados en comparación con las MSC no transducidas; así, el aumento de la migración de las MSC-shIKK β fue de 1.21 ± 0.11 veces hacia SDF-1 α , 1.45 ± 0.06 veces hacia IL-1 β y 1.58 ± 0.07 veces hacia 10% FBS, indicando fuertemente que la vía de señalización NF- κ B juega un papel fundamental en el tropismo de las MSC.

5.1.5.3 La IL-1 β induce la adhesión de las MSC

La migración de células adherentes está mediada en parte por la afinidad de éstas hacia algún componente en particular de la matriz extracelular (ECM). Para comprobar si la IL-1 β tenía un efecto en la adhesión celular de las MSC, medimos la adhesión de las MSC (tratadas o no) a los principales componentes de la matriz extracelular. Los resultados mostraron que el tratamiento con IL-1 β durante 1 hora incrementó la adhesión a colágeno (3.03 ± 0.29 veces), fibronectina (1.75 ± 0.11 veces) y laminina (2.79 ± 0.15 veces) con respecto a las MSC sin tratar (Figura 13). De un modo similar a los experimentos de migración, la adhesión inducida por el tratamiento con IL-1 β a superficies tapizadas con colágeno, fibronectina o laminina se vio afectada en las MSC-shIKK β (1.75 ± 0.15 veces en el caso del colágeno, 1.20 ± 0.05 veces en el caso de la fibronectina y 1.32 ± 0.07 veces en el caso de la laminina).

El hecho de que la expresión de shIKK β sólo afecte la adhesión inducida por IL-1 β , pero no los niveles basales de adhesión a los componentes de la matriz extracelular indica que este vector de silenciamiento bloquea específicamente los mecanismos inducidos por esta citoquina, confirmando la importancia de la vía de señalización NF- κ B en el proceso biológico mediado por IL-1 β .

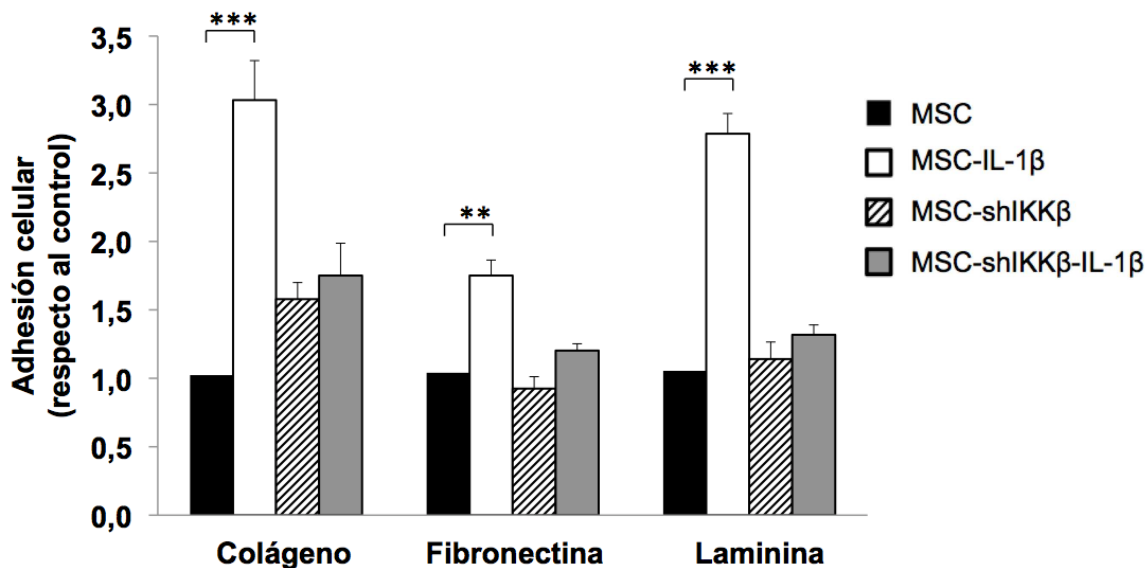


Figura 13. Adhesión de MSC y MSC-shIKK β tratadas o no con IL-1 β frente a colágeno, fibronectina y laminina. Los datos se expresan como incremento relativo respecto a MSC control. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.1.6 LAS MSC TRATADAS CON IL-1 β INDUCEN MAYOR RECLUTAMIENTO DE LEUCOCITOS *IN VITRO*

Las MSC trasplantadas han demostrado fomentar el reclutamiento de células inflamatorias como neutrófilos, eosinófilos o macrófagos y la supresión de la proliferación de células citotóxicas y T helper a través de la liberación de factores solubles como el HGF y el TGF- β (Ren *et al.*; Aggarwal y Pittenger 2005). De hecho, la administración de MSC en el miocardio y otros tejidos va acompañada de una marcada inflamación leucocítica paracrina (Chen *et al.* 2008).

Para comprobar si el tratamiento con IL-1 β tenía un impacto similar en el reclutamiento de leucocitos por parte de las MSC, cultivamos MSC tratadas o no con IL-1 β en pocillos de 2 cámaras que permiten el intercambio de fluidos y células, y medimos el número y tipo de leucocitos migrados a través de los poros de la membrana.

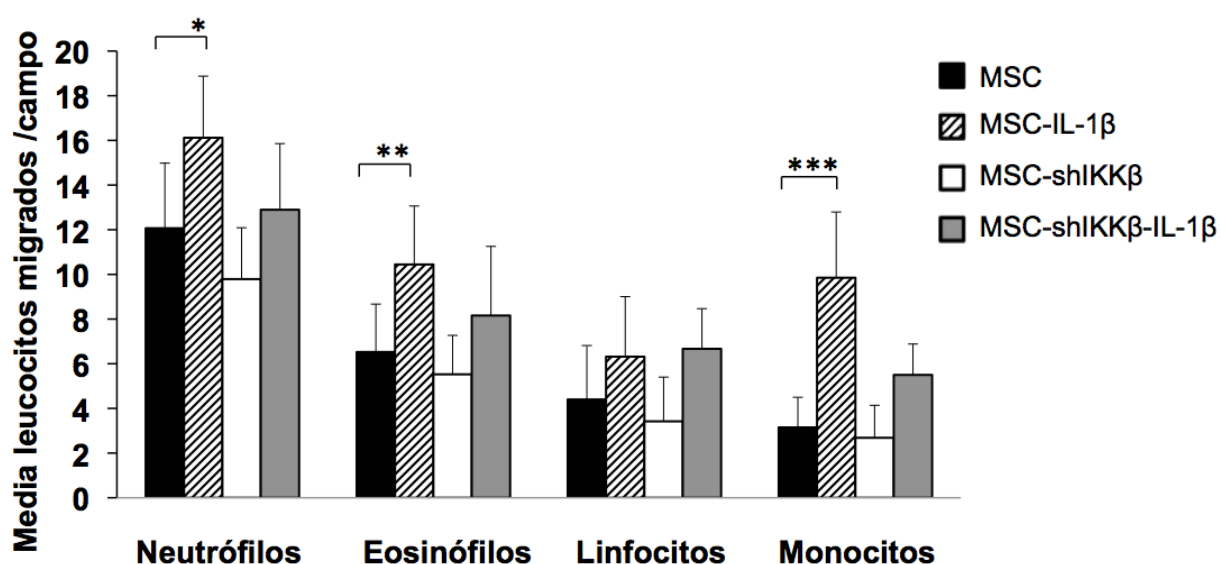


Figura 14. Ensayo de migración de polimorfonucleares (PMNs) humanos usando un sistema de pocillos (transwells) hacia diferentes estímulos. En la cámara superior se añadieron los PMNs y la cámara inferior se sembró con MSC o MSC-shIKK β tratadas o no con IL-1 β . Los neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos migrados se presentan como la media de tres experimentos (N $^{\circ}$ de células migradas/campo) \pm DS. (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

Después de 5 horas de cultivo, la media de los leucocitos migrados por campo hacia la cámara inferior revestida con MSC fue de 12.06 ± 2.91 neutrófilos, 6.52 ± 2.14 eosinófilos, 4.40 ± 2.41 linfocitos y 3.15 ± 1.34 monocitos. Sin embargo la migración hacia los pocillos revestidos con MSC previamente tratadas con IL-1 β mostró mayor número de células migradas (16.11 ± 2.75 neutrófilos, 10.44 ± 2.61 eosinófilos, 6.31 ± 2.68 linfocitos y 9.85 ± 2.94 monocitos) (Figura 14).

Cuando las MSC fueron transducidas con shIKK β , se observó un menor incremento en la migración quimiotáctica leucocitaria estimulada por el tratamiento con IL-1 β (9.78 \pm 2.29 neutrófilos, 5.52 \pm 1.74 eosinófilos, 3.42 \pm 1.98 linfocitos y 2.68 \pm 1.45 monocitos) (Figura 14).

Así IL-1 β indujo el reclutamiento de neutrófilos, eosinófilos y monocitos; y NF-kB tiene una función primordial en el trofismo ejercido por las MSC en la población leucocitaria.

CAPÍTULO 5.2: ESTUDIO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE HIF-1 α EN MSC PARA POTENCIAR SU EFECTO TERAPÉUTICO

5.2.1 LA SOBRE-EXPRESIÓN DE HIF-1 α INDUCE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA Y EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MSC

Las MSC fueron transducidas con los vectores lentivirales denominados pWIPI-GFP o pWIPI-HIF-GFP (en adelante denominadas MSC y MSC-HIF respectivamente). Tras dos tandas de infección se analizó por citometría de flujo la expresión de la GFP en los cultivos, cuantificando así el grado de infección de los mismos. El 90-95% de los cultivos celulares fueron GFP positivos (Figura 15).

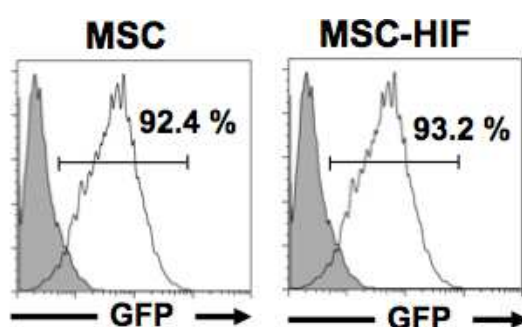


Figura 15. Caracterización de cultivos de MSC transducidos con pWIPI-GFP o pWIPI-HIF-GFP. Análisis mediante citometría de flujo de cultivos de MSC o MSC-HIF mostrando más del 90% de infección (detectado mediante la expresión de la proteína verde fluorescente GFP).

Una vez comprobado que los cultivos estaban correctamente transducidos se procedió a la cuantificación de los niveles de ARN mensajero (ARNm) para el gen HIF-1 α . Tal y como se muestra en la Figura 16, los niveles de ARNm HIF-1 α se vieron aumentados 4.88 ± 0.57 veces en MSC-HIF con respecto a MSC.

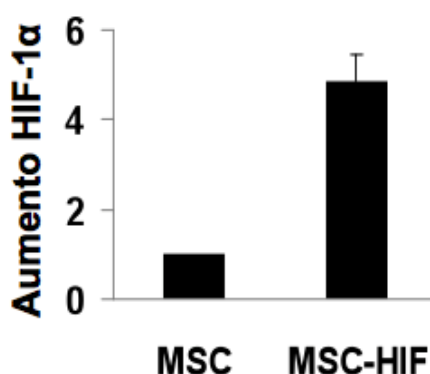


Figura 16. Niveles de ARNm de HIF-1 α en poblaciones de MSC-HIF normalizados frente a los niveles en MSC, evaluadas mediante PCR cuantitativa. Los datos se expresan como incremento relativo frente al control y representa la media \pm DS de tres experimentos.

Por otra parte se analizó la estabilización de la proteína HIF-1 α en MSC-HIF frente a los cultivos no tratados. Los cultivos MSC-HIF mostraron la expresión de la proteína HIF-1 α en normoxia, con un aumento de 5.4 ± 1.6 veces en MSC-HIF frente a MSC (Figura 17).

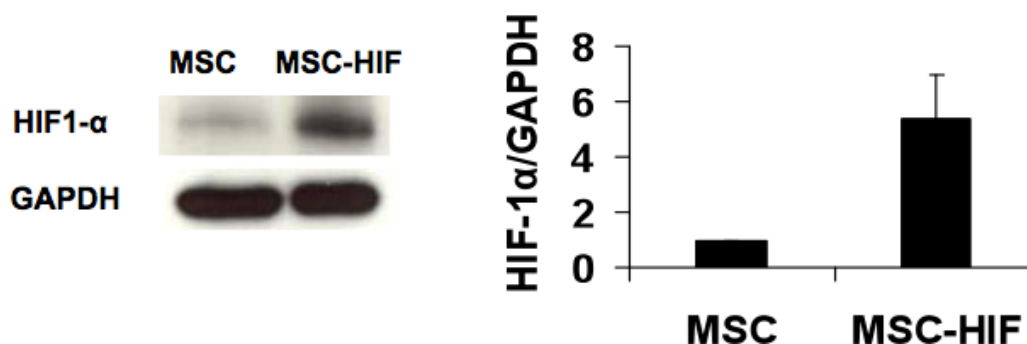


Figura 17. Expresión de proteína HIF-1 α en MSC y MSC-HIF cultivadas en normoxia. Las diferencias respecto al control fueron cuantificadas por densitometría de las películas de western blot reveladas. Se utilizó GAPDH como proteína de control de carga. Los datos representan la media \pm DS de tres experimentos independientes.

Para evaluar el efecto de la sobre-expresión de HIF-1 α en la biología de las MSC, en el laboratorio se realizaron estudios de *microarrays* con los cultivos de MSC y MSC-HIF. En base a los resultados se seleccionó un grupo de genes que mostraron un aumento de la expresión génica de al menos 1,5 veces. De los 30 genes diana de HIF analizados mediante PCR a tiempo real, detectamos aumento de expresión en 11 (Figura 18). Estos genes están implicados en angiogénesis (ANGPT1, APLN, CD3D, CTGF, CYR61), supervivencia celular (BNIP3, BNIP3L, PIK3C3), remodelado de la matriz extracelular (FGF2, TGF β 2) y quimiotaxis (c-MET). De manera notable, la sobre-expresión del TGF β 2 fue de 7.31 ± 1.25 veces y de c-MET de 3.88 ± 0.22 veces; la ANGPT1 se vio incrementada 2.11 ± 0.21 veces.

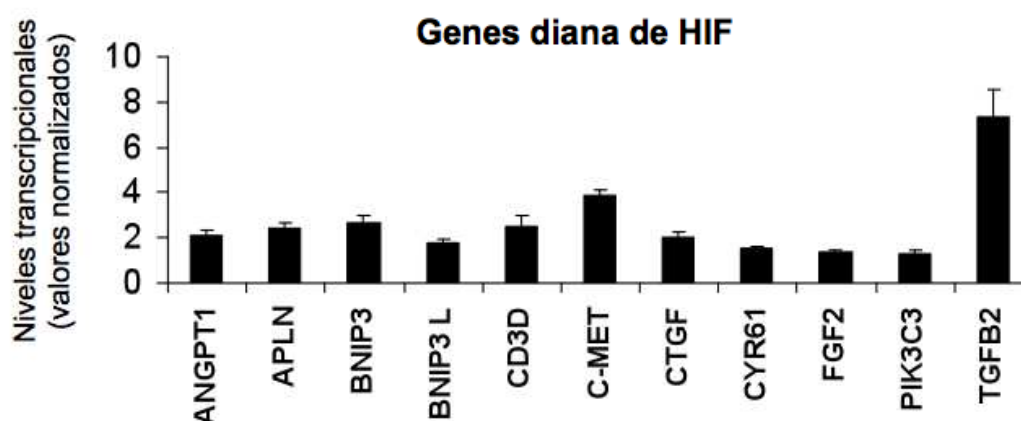


Figura 18. Respuestas biológicas inducidas por la transducción de MSC con vectores HIF-1 α . Cuantificación de los niveles de transcripción de diferentes genes diana de HIF mediante análisis RT-qPCR en cultivos MSC-HIF frente a cultivos MSC. Los datos se expresan como incremento relativo frente al control y representa la media \pm DS de tres experimentos.

Para investigar si la estabilización no-hipóxica de HIF-1 α tenía un impacto en la rutas de señalización PI3K/Akt, p38MAPK y JNK/SAP, se llevó a cabo análisis por western blot de la fosforilación de las quinasas AKT, P38 MAPK y JNK/SAP (Figura 19).

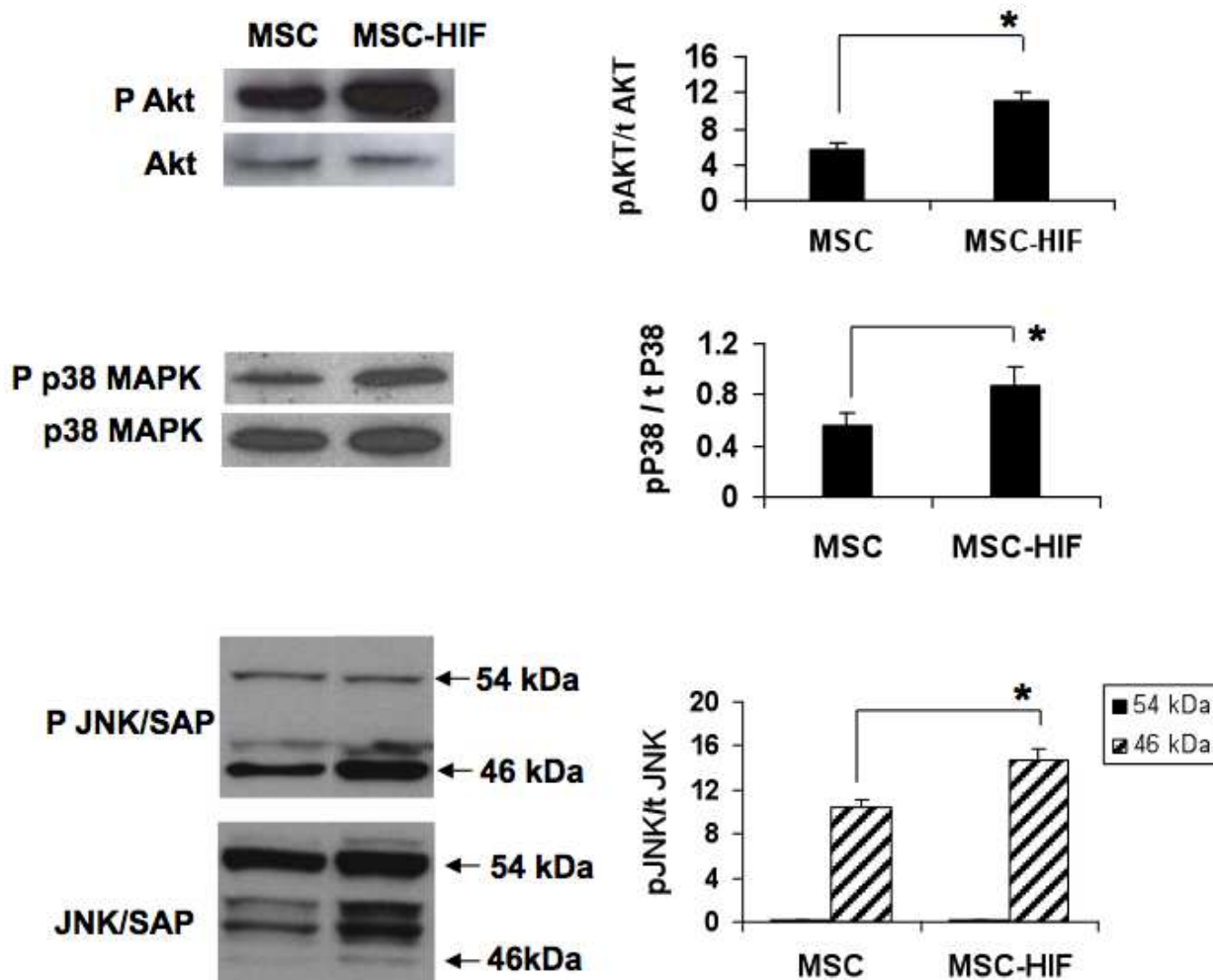


Figura 19. Análisis de western blot de la fosforilación de quinasas en MSC-HIF. Los lisados celulares totales (30 μ g) se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron por western blot. Tras la incubación con anticuerpos específicos y posterior revelado, las diferencias de intensidad de señal de fosforilación se cuantificaron mediante densitometría. Anti-GAPDH fue utilizado como control de carga. Los datos se expresan como incremento relativo frente al control y representa la media \pm DS de tres experimentos independientes (* p <0,05).

Los niveles de Akt fosforilado se vieron incrementados (11.12 ± 1.2 veces en MSC-HIF frente a 5.54 ± 0.8 veces en MSC; p <0,05). También se observó el aumento de p38MAPK (0.87 ± 0.15 veces en MSC-HIF frente a 0.56 ± 0.1 veces en MSC; p <0,5) y pMAPK/JNK (8.31 ± 1.18 veces en MSC-HIF frente a 2.07 ± 0.41 veces en MSC; p <0,5), indicando el efecto positivo de la estabilización de HIF en la proliferación de MSC y supervivencia celular.

5.2.2 EL HIF-1 α INDUCE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

A continuación analizamos la influencia del HIF-1 α en la adhesión de las MSC. La PCR cuantitativa mostró un aumento de la expresión respecto a las MSC control en diferentes genes implicados en adhesión celular (AMIGO2 4.8 ± 0.38 veces, NCAM2 1.27 ± 0.12 veces, ITGA2 2.87 ± 0.12 veces, SDC1 4.44 ± 0.15 veces, SPARC 2.03 ± 10 veces) y producción de matriz extracelular (COLXII 3.59 ± 0.69 veces) (Figura 20).

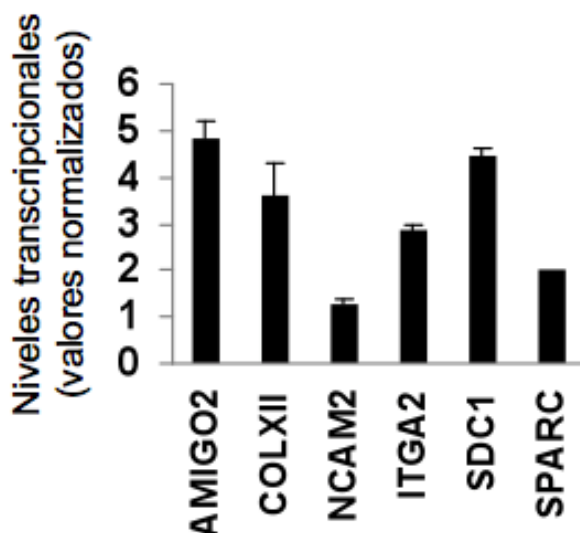


Figura 20. Cuantificación de los niveles de transcripción génica de moléculas de adhesión y proteínas de matriz extracelular mediante análisis RT-qPCR en cultivos MSC-HIF frente a cultivos MSC. Los datos se expresan como incremento relativo frente al control y representan la media \pm DS de tres experimentos independientes.

5.2.3 LA SOBRE-EXPRESIÓN DE HIF-1 α INCREMENTA LA MIGRACIÓN Y LA ADHESIÓN CELULAR

Teniendo en cuenta los genes sobre-expresados, consideramos muy probable que la estabilización de HIF-1 α tuviera un efecto en la migración y adhesión de las MSC.

Para comprobar esta hipótesis, se realizaron en primer lugar estudios de migración utilizando un modelo de “wound healing”. En este modelo se realizó un surco mediante rascado en la placa de cultivo y se monitorizó la migración de las células a través de la hendidura. Los experimentos *in vitro* mostraron que la sobre-expresión de HIF-1 α promovió la repoblación celular de la zona rascada, con un aumento de 2.09 ± 0.5 veces a las 18 horas ($p<0,01$) (Figura 21).

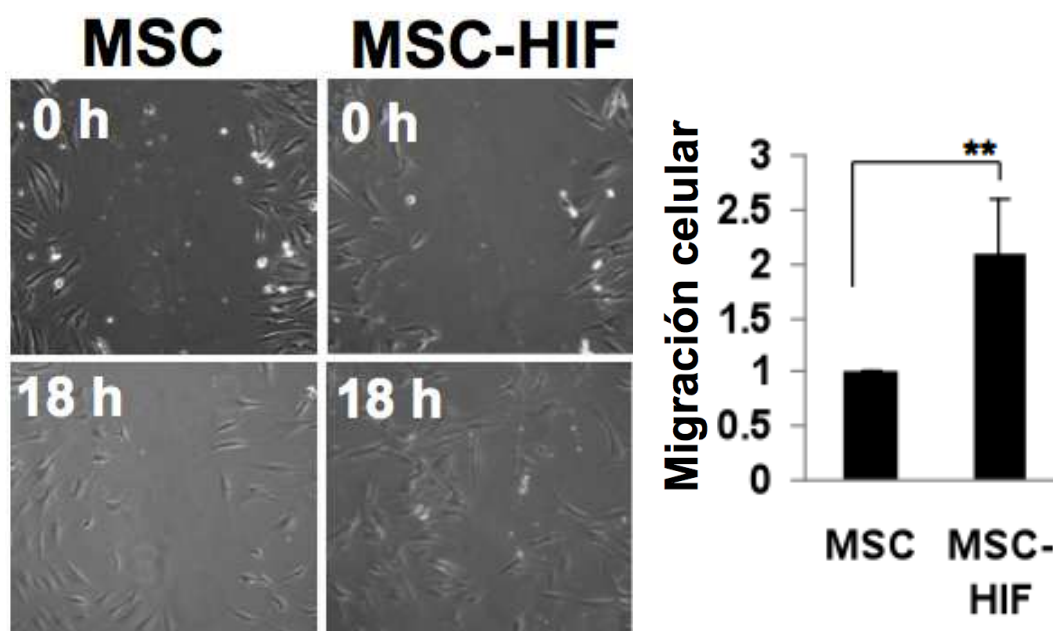


Figura 21. Imágenes fotográficas de microscopía óptica (200 aumentos) del ensayo de migración celular con cultivos de MSC y MSC-HIF. Las diferencias se calcularon 18 horas después del raspado celular inicial. Los valores se normalizaron respecto a las MSC y representan la media \pm DS de tres experimentos independientes. (* p <0,05; ** p <0,01).

Respecto a la adhesión celular a sustratos, las MSC migran a través de la matriz extracelular mediante la expresión de proteínas de unión (integrinas) a componentes de la misma tales como colágeno, laminina o fibronectina. Por este motivo las placas de cultivo se tapizaron con estas moléculas para, tras una hora de cultivo, cuantificar la adhesión de las MSC modificadas o no para la expresión de HIF-1 α .

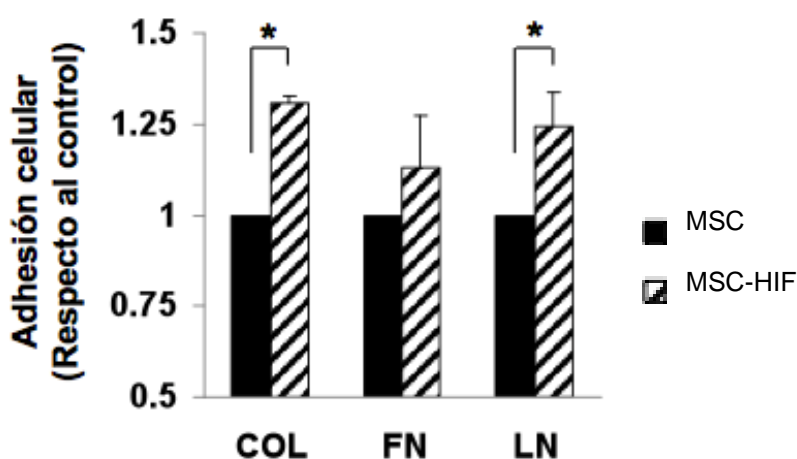


Figura 22. Adhesión de MSC y MSC-HIF a colágeno, fibronectina y laminina. Los datos representan la media \pm DS y se normalizaron respecto a MSC. COL: Colágeno; FN: Fibronectina; LN: Laminina. (* p <0,05).

Tal y como se muestra en la Figura 22, la adhesión celular se vio aumentada en MSC-HIF frente a MSC para los tres compuestos, siendo este incremento significativo para el colágeno (1.31 ± 0.02 veces) y para la laminina (1.24 ± 0.09 veces) ($p<0,05$).

5.2.4 EL HIF-1 α PROMUEVE LA MIGRACIÓN EN RESPUESTA A SEÑALES TRÓFICAS

Otro proceso importante en la biología de las MSC es determinar si el efecto terapéutico inducido por las MSC es debido a su capacidad para migrar en respuesta a factores quimiotácticos. Para ello se estudió la migración de las células hacia factores tróficos en una placa con un sistema de cultivo pocillos transwell.

La Figura 23 muestra cómo a las 4 horas, la migración se elevó de manera significativa en los cultivos modificados para la sobre-expresión de HIF-1 α hacia los siguientes factores: IL-6 (1.93 ± 0.12 veces en MSC-HIF frente a 1.5 ± 0.18 veces en MSC; $p<0,05$), HGF (2 ± 0.25 veces en MSC-HIF frente a 1.12 ± 0.12 veces en MSC; $p<0,01$) y SDF-1 α (1.7 ± 0.23 veces en MSC-HIF frente a 1.17 ± 0.02 veces en MSC; $p<0,01$).

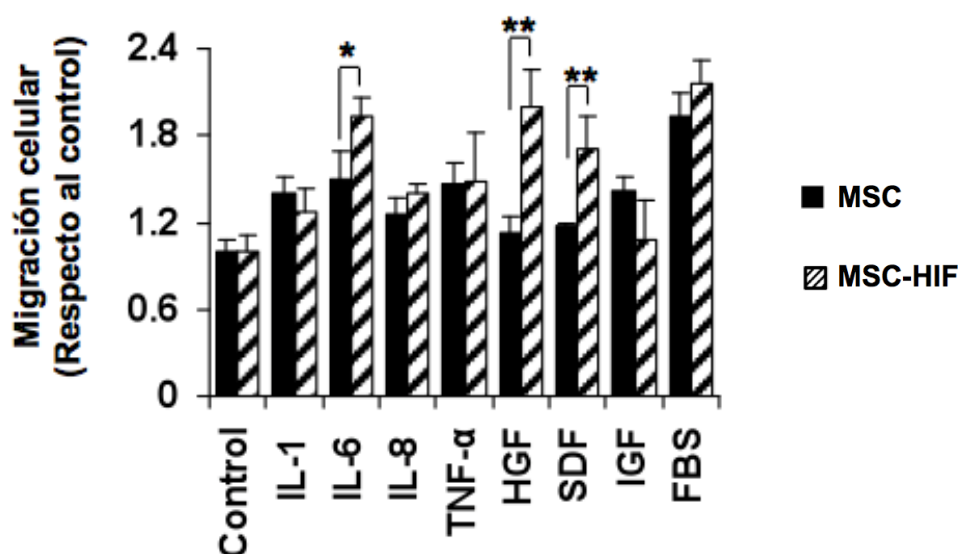


Figura 23. Migración de MSC o MSC-HIF hacia factores tróficos: IL-1 β (25 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL), IL-8 (20 ng/mL), TNF- α (50 ng/mL), HGF (50 ng/mL), SDF-1 α (20 ng/mL), IGF-1 (20 ng/mL) y 10% FBS. (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

A continuación quisimos estudiar los cambios en la organización estructural de las MSC mediante tinciones de Paxilina y Faloidina. La Paxilina es una proteína que forma parte del citoesqueleto celular, mientras que la Faloidina es una toxina que proviene de la *Amanita phalloides* y se une a las fibras de actina.

De manera consistente con los resultados mostrados en las Figuras 21 y 22, se observaron mayores cambios en la arquitectura del citoesqueleto y reorganización de actina en MSC-HIF frente a los detectados en MSC tras cultivo en presencia de factores de crecimiento (Figura 24).

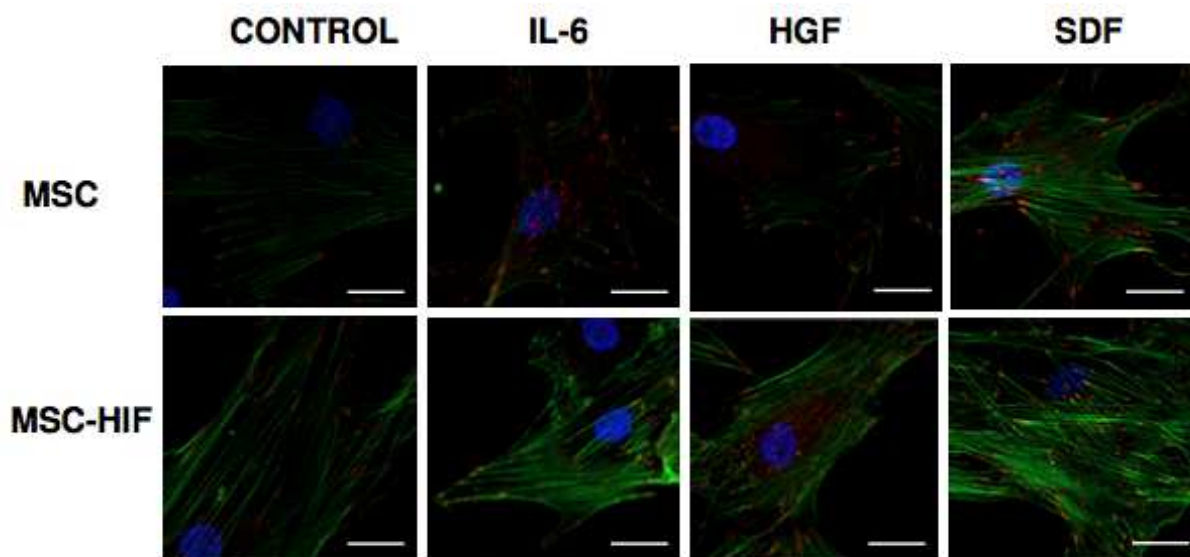


Figura 24. Tinción doble de cultivos de MSC y MSC-HIF con Faloidina (marcada en rojo) y anti-Paxilina (marcada en verde) tratadas o no con IL-6 (20 ng/mL), HGF (50 ng/mL) y SDF-1 α (20 ng/mL). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 25 μ m.

Estos resultados indican que HIF-1 α induce cambios morfológicos en MSC similares a los inducidos por factores tróficos y sugiere que HIF-1 α podría modular la distribución y densidad de ciertas proteínas del citoesqueleto asociadas a los puntos de adhesión focal.

5.2.5 LAS MSC-HIF MEJORAN LA FUNCIÓN CARDÍACA EN UN MODELO DE INFARTO DE MIOCARDIO

Para comprobar si la expresión de HIF-1 α mejoraba las propiedades terapéuticas de MSC durante la reparación cardíaca, las MSC-HIF fueron trasplantadas en ratas Nude tras la inducción del infarto de miocardio. El número inicial de animales utilizados fue de 80, con una mortalidad en todos los grupos del 25% debido al procedimiento quirúrgico.

El trasplante de dosis altas de MSC-HIF (1.500.000 células/animal) permitió la detección celular *in vivo* a las 2 semanas post-inyección, pero el reclutamiento de células inflamatorias alrededor de las células implantadas fue exacerbado en comparación con el trasplante de MSC (Figura 25).

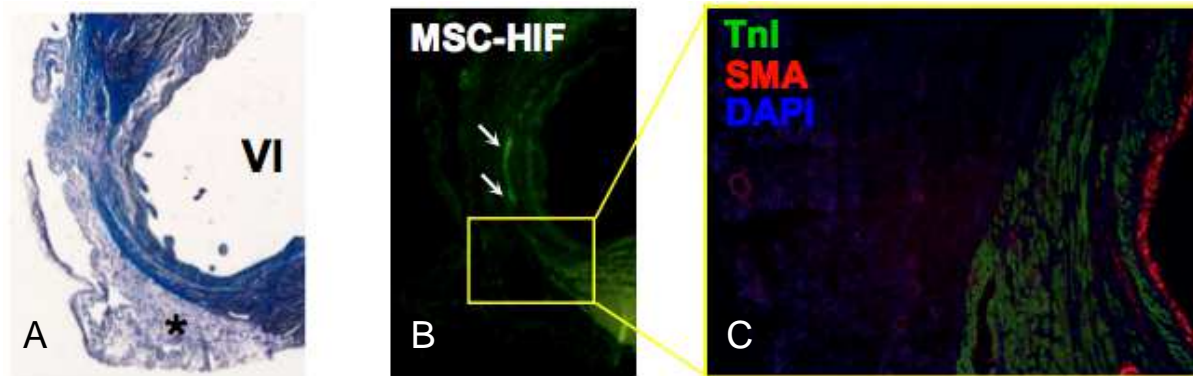


Figura 25. A) Imagen tomada con lupa de un corte de tejido cardíaco teñido con Tricrómico de Masson. En la zona infartada señalada con el asterisco, se observa una gran reacción inflamatoria. B) Imagen tomada en microscopio de fluorescencia de bajo aumento de un corte de tejido cardíaco de un animal trasplantado con 1.500.000 células MSC-HIF a los 15 días post-trasplante. Tras inmunofluorescencia anti-GFP para intensificar la señal, se observa un acúmulo de células GFP+ en la zona del infarto (indicado mediante flechas). C) Imagen en microscopio de fluorescencia donde puede apreciarse una zona extensa de infiltrado alrededor del área de infarto.

Basándonos pues en observaciones previas de nuestro grupo (Arminan, Gandia *et al.* 2010) y para minimizar los infiltrados inflamatorios debido al trasplante de células madre, la dosis celular se ajustó a 200.000 células/animal. El protocolo experimental utilizado se detalla en la Figura 26.

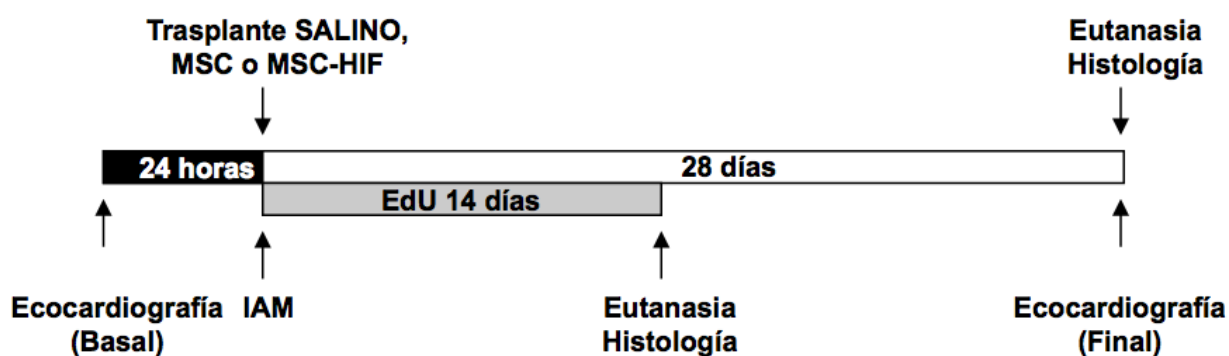


Figura 26. Diseño del protocolo experimental. A tiempo 0 se realizó la oclusión permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (ACDAI), que provocó el infarto agudo de miocardio (IAM). Inmediatamente después se realizó el trasplante intramiocárdico de las MSC-HIF (grupo de estudio), MSC (grupo control celular) o PBS (grupo control). La función cardíaca se monitorizó mediante ecocardiografía un día antes del IAM y a los 30 días post-trasplante. Se hicieron dos grupos, en uno de ellos los animales se sacrificaron pasados 28 días del trasplante para llevar a cabo el estudio histológico. En el segundo grupo se inyectó diariamente EdU a los animales durante 15 días, momento en que se realizó el sacrificio de los animales.

Así, inmediatamente después de haber inducido el infarto de miocardio mediante ligadura de la ACDAI, las ratas fueron trasplantadas con suero salino fisiológico (SALINO), MSC o MSC-HIF. El cambio inmediato de coloración de la zona del miocardio dependiente de la arteria ligada nos indicó la correcta realización del IAM (Figura 27).

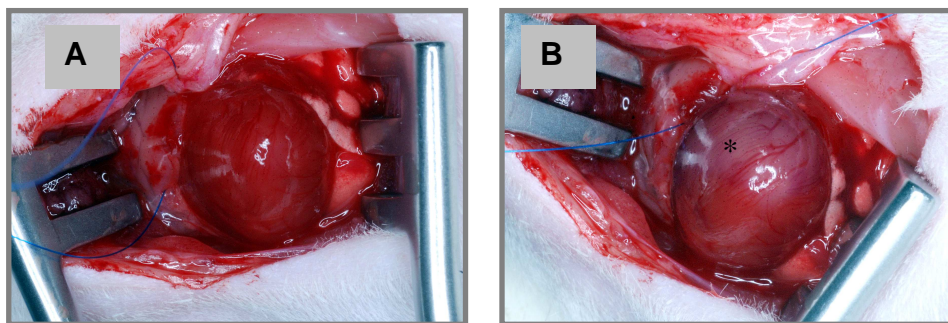


Figura 27. Fotografías del corazón durante la realización del procedimiento quirúrgico, en las que se muestra la coloración del corazón antes y después de la ligadura de la ACDAI (A y B respectivamente). El asterisco muestra el cambio de color en la zona afectada por la falta de vascularización del ventrículo izquierdo. ACDAI: Arterial coronaria descendente anterior izquierda; VI: Ventrículo izquierdo.

Para confirmar que el trasplante celular se realizó de forma correcta, en la inyección miocárdica junto con las células, se añadieron microesferas fluorescentes que más tarde se observaron por microscopía óptica (Figura 28).

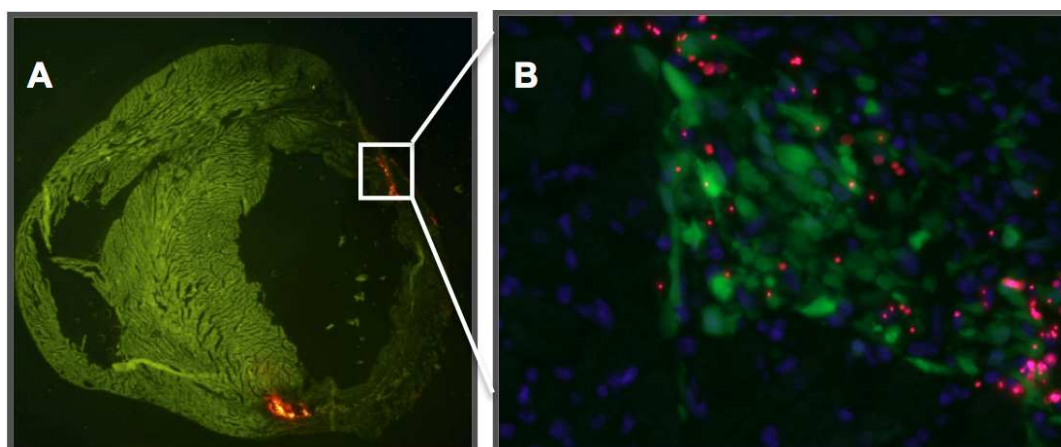


Figura 28. Comprobación de la correcta realización del trasplante mediante la visualización de las microesferas fluorescentes presentes en el tejido cardíaco. A) Imagen con lupa de fluorescencia en la que se pueden observar dos puntos de inyección en ambos bordes del infarto. B) Imagen tomada a 40 aumentos con microscopio de fluorescencia. Se observa una sección de tejido cardíaco teñido con anticuerpo anti-Tn (verde), donde se puede apreciar la presencia de microesferas fluorescentes (rosa).

Los parámetros de función cardíaca se midieron cuatro semanas post-cirugía para evaluar el grado de recuperación funcional conseguido debido al trasplante de MSC o MSC-HIF en la zona borde del infarto.

El grupo MSC-HIF mostró una recuperación significativa de la función sistólica calculada como el porcentaje del cambio porcentual de área ($33.16 \pm 1.51\%$ en el grupo SALINO, $38.25 \pm 2.03\%$ en MSC y $44.01 \pm 1.14\%$ en MSC-HIF; $p < 0,0001$ en MSC-HIF frente a SALINO y $p < 0,05$ en MSC-HIF frente a MSC y MSC frente a SALINO) (Figura 29, Tabla 8).

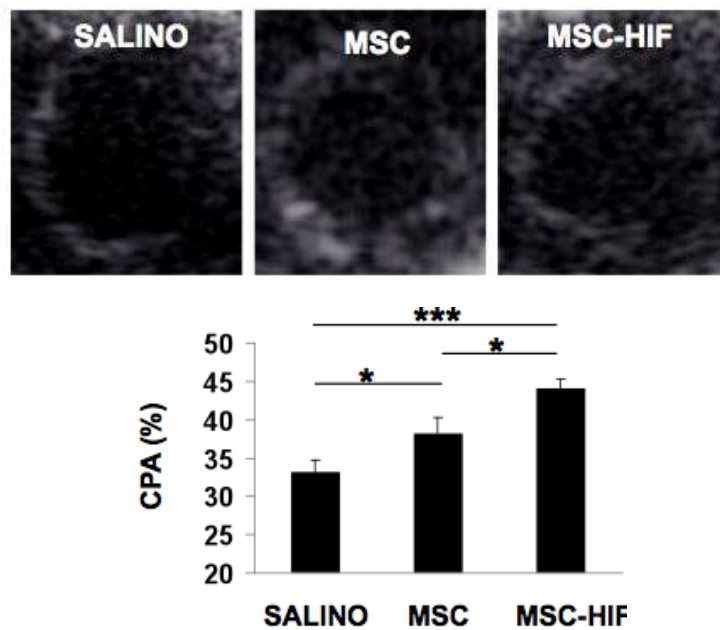


Figura 29. Mejora de la función del VI en los animales tratados con MSC-HIF. Imágenes ecocardiográficas en 2D representativas de la sístole del VI para cada uno de los grupos de estudio. La gráfica muestra los valores cuantitativos del cambio porcentual de área (CPA). Los datos se expresan como media \pm ES. (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

Del mismo modo la fracción de acortamiento mejoró significativamente ($23.23 \pm 0.79\%$ en el grupo SALINO, $24.96 \pm 1.48\%$ en MSC y $30.15 \pm 0.90\%$ en MSC-HIF; p <0,0001 en MSC-HIF frente a MSC). Se observaron también efectos beneficios en el grosor de la pared anterior del VI ($22.64 \pm 0.76\%$ en el grupo SALINO, $24.73 \pm 1.59\%$ en MSC y $26.74 \pm 0.92\%$ en MSC-HIF; p <0,01 en MSC-HIF frente a SALINO) (Figura 30, Tabla 8).

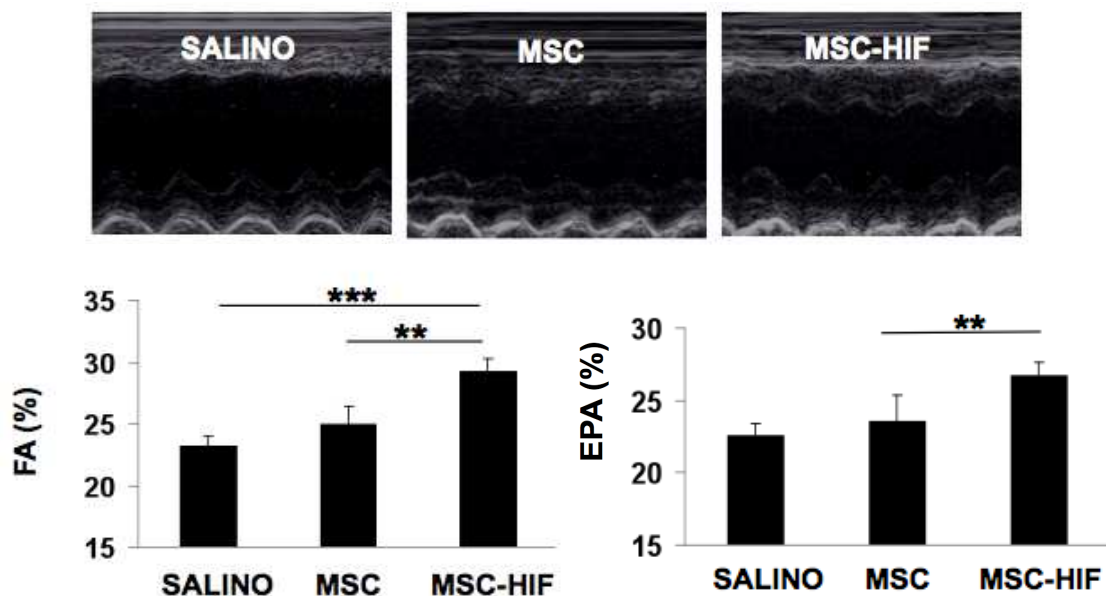


Figura 30. Imágenes ecocardiográficas en modo-M representativas del grupo SALINO (n=12), MSC (n=10) y MSC-HIF (n=11) mostrando las diferencias en la motilidad y grosor de la pared del VI. Valores cuantitativos de la fracción de acortamiento (FA) y engrosamiento de la pared anterior (EPA). Los datos se expresan como media \pm ES. (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

Tabla 8. Valores ecocardiográficos de los grupos SALINO, MSC y MSC-HIF

	SALINO		MSC		MSC-HIF		<i>p</i> Valores*			
	(n=13)		(n=10)		(n=11)		ANOVA	SALINO vs MSC	SALINO vs MSC-HIF	MSC vs MSC-HIF
	Basal	Final*	Basal	Final*	Basal	Final*				
GPAd	1.60±0.03	1.04±0.03	1.40±0.03	1.03±0.03	1.47±0.03	1.27±0.11				
DVIId	5.84±0.08	7.44±0.16	5.14±0.20	6.95±0.27	5.39±0.19	7.03 ±0.17				
GPPd	1.46±0.05	1.58±0.08	1.44±0.04	1.38±0.11	1.44±0.09	1.58±0.08				
GPAAs	2.44±0.05	1.35±0.04	2.31±0.12	1.37±0.05	2.37±0.07	1.77±0.16				
DVIs	3.43±0.05	5.68±0.16	2.92±0.11	5.21±0.20	3.15±0.14	4.91±0.14		0.003		
GPPs	2.13±0.09	2.08±0.12	2.04±0.08	1.97±0.09	2.09±0.07	2.14±0.07				
AVId	31.41±0.64	44.38±1.55	27.29±1.39	44.12±2.10	25.91±1.23	41.73±1.69				
AVIs	8.66±0.40	29.67±1.36	7.64±0.47	27.36±1.85	7.61±0.49	22.93±1.41		0.002		
FA	41.23±0.70	23.23±0.79	43.23±1.00	24.96±1.48	41.72±0.96	30.15±0.90		0.0007		0.03
CPA	72.42±1.11	33.16±1.51	71.86±1.57	38.25±2.03	70.53±1.02	44.01±1.14	0.02	0.0001		0.01
EPA	34.49±0.85	22.64±0.76	38.95±1.75	24.73±1.59	37.75±0.70	26.74±0.92		0.008		

Abreviaturas: vs: Versus; GPAd: Grosor pared anterior en diástole; GPAAs: Grosor pared anterior en sístole; EPA: Engrosamiento pared anterior; AVId: Área del VI al final de la diástole; AVIs: Área del VI al final de la sístole; CPA: Cambio porcentual de área; DVIId: Diámetro del VI en diástole; DVIs: Diámetro del VI en sístole; FA: Fracción de acortamiento; GPPd; Grosor de la pared posterior en diástole; GPPs: Grosor pared posterior en sístole. Todos los valores están expresados como la media ± ES. GPAd, DVIId, GPPd, GPAAs, DVIs, y GPPs están expresados en mm mientras que AVId y AVIs están expresados en mm². FA, CPA y EPA están expresados como porcentaje.

5.2.6 LAS MSC-HIF REDUCEN EL ÁREA DE TEJIDO FIBRÓTICO

Tras la eutanasia 4 semanas post-trasplante, se procedió a la cuantificación del área de infarto de los animales de los tres grupos. El tratamiento con MSC-HIF redujo de manera significativa el área fibrótica (Figura 31); el porcentaje de tejido cicatricial fue de $29.91 \pm 1.72\%$ en el grupo SALINO ($n=8$), $18.12 \pm 0.93\%$ en el grupo MSC ($n=6$) y $12.73 \pm 1.04\%$ en el grupo MSC-HIF ($n=11$) ($p < 0,00001$ en MSC-HIF frente a SALINO, $p < 0,0001$ en MSC frente a SALINO y $p < 0,01$ en MSC-HIF frente a MSC).

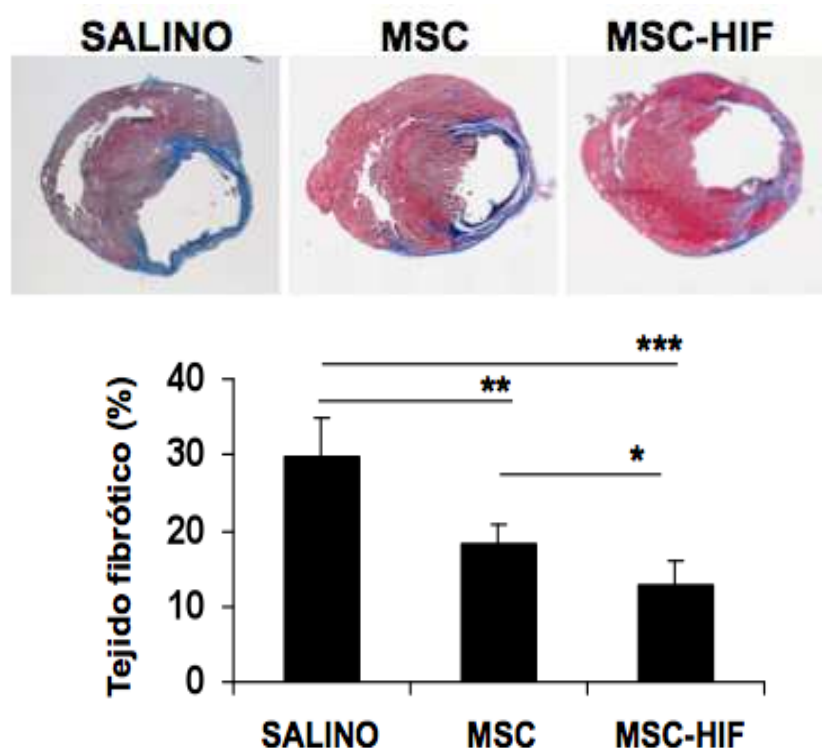


Figura 31. Efecto del trasplante de MSC-HIF en el tamaño del infarto. Las imágenes muestran secciones de corazones representativas de ratas Nude infartadas habiendo recibido SALINO ($n=8$), MSC ($n=6$) o MSC-HIF ($n=11$) teñidas con Tricrómico de Masson. El color azul tiñe el tejido fibrótico, permitiendo medir el área del infarto. La gráfica muestra el porcentaje de área fibrótica del VI calculada mediante la tinción de una serie de secciones con Tricrómico de Masson y posterior análisis morfométrico. Los valores representan la media \pm ES. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.2.7 LAS MSC-HIF INDUCEN ANGIOGÉNESIS

Habiendo observado la sobre-expresión de genes con función angiogénica mediante PCR, decidimos proceder a la cuantificación de la angiogénesis en los animales de los tres grupos. Para ello los animales se sacrificaron 15 días post-trasplante, ya que es el momento donde los cambios en este proceso son mayores. Estas medidas se realizaron mediante tinción de secciones con anti-Reca-1 y posterior análisis por planimetría.

El número de capilares por mm^2 fue de 518 ± 81 en el grupo SALINO, 810 ± 53 en el grupo MSC y 1.252 ± 80 en el grupo MSC-HIF ($p < 0,0001$ en MSC-HIF versus SALINO, $p < 0,01$ en MSC-HIF versus MSC) (Figura 32).

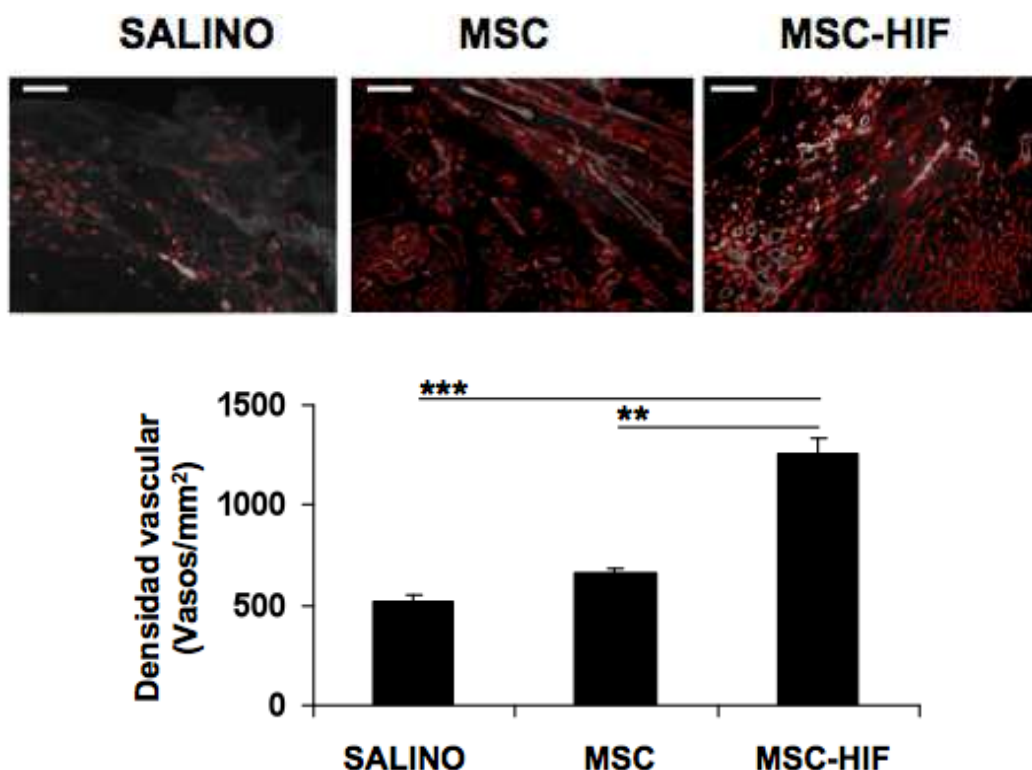


Figura 32. Secciones representativas de animales tratados con SALINO, MSC y MSC-HIF ($n=9$ en cada grupo) teñidas con anti-RECA-1 (rojo). Barra de escala = $200 \mu\text{m}$. Los vasos están resaltados en blanco. La gráfica muestra la cuantificación del número total de vasos en los diferentes grupos mediante la utilización de un software de análisis de imagen. ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$).

Así, los resultados mostraron un claro aumento del número de vasos en los animales tratados con MSC-HIF.

5.2.8 EL TRATAMIENTO CON MSC-HIF PROMUEVE LA REGENERACIÓN DE TEJIDO MIOCÁRDICO

Con el objeto de determinar si la sobre-expresión de HIF-1 α promovía la regeneración tisular, se analizó el número de células en proliferación en la zona borde de infarto de los animales tratados con EdU. Para ello, tras la realización del infarto y trasplante, los animales fueron tratados diariamente con EdU durante 2 semanas, momento en el que se sacrificaron y los corazones se procesaron para proceder a su estudio histológico.

A las dosis administradas, no pudimos detectar células injertadas en los grupos tratados con células. Sin embargo, el trasplante celular produjo un aumento de la proliferación del tejido cardíaco (Figura 33).

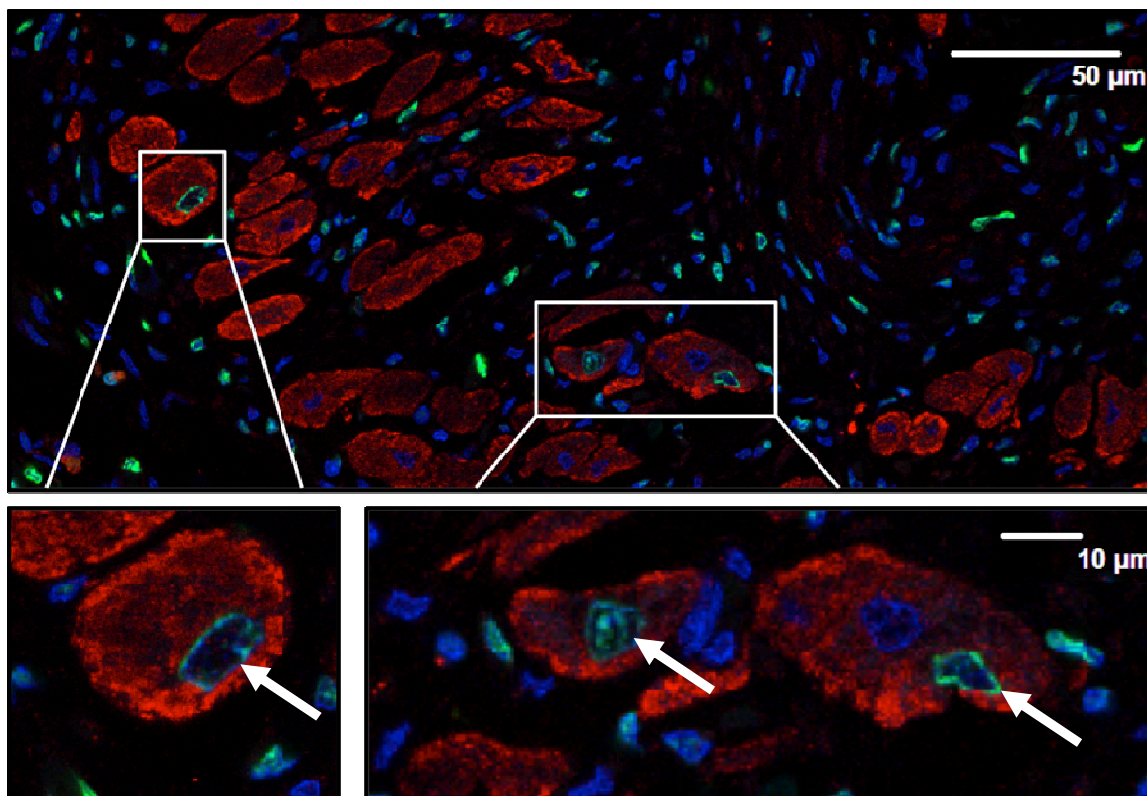


Figura 33. Imagen tomada en microscopio confocal de la doble inmunohistoquímica con anticuerpos anti-Tn I (rojo) y anti-EdU (verde) de una sección de corazón de un animal tratado con MSC-HIF (las flechas indican el doble marcaje de los cardiomiocitos en proliferación). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul).

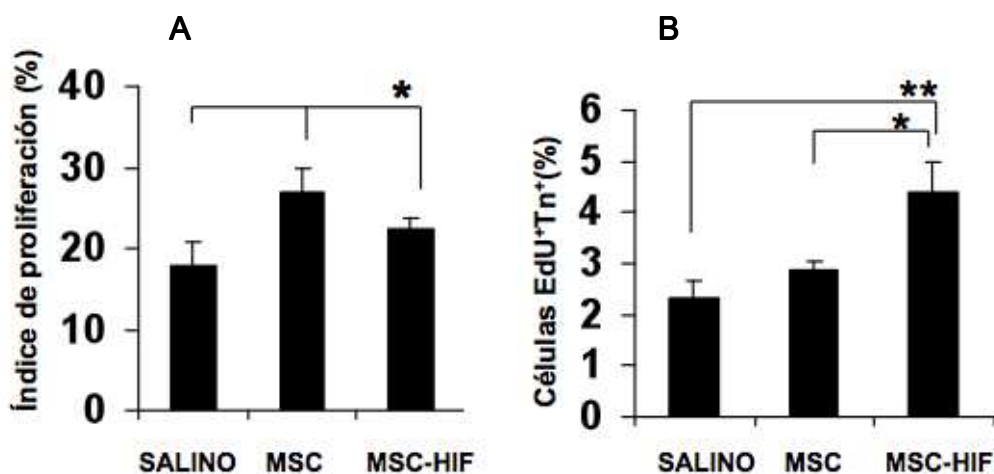


Figura 34. A) La gráfica muestra un aumento del índice de proliferación en los animales tratados con células con respecto a los tratados con SALINO. El índice de proliferación (número de células EdU⁺/núcleos totales) x 100 se expresa como porcentaje. B) Cuantificación del número de cardiomiocitos generados de novo. Se observa un aumento en la proliferación de cardiomiocitos en los animales tratados con MSC-HIF. El índice de proliferación de cardiomiocitos (número de células EdU+TnI+/TnI+DAPI+ totales) x 100 se indica como porcentaje. ($p < 0,01$ MSC-HIF vs PBS, $p < 0,05$ MSC-HIF vs MSC).

El índice de proliferación fue $17.81 \pm 2.86\%$ en el grupo SALINO, $26.82 \pm 3.05\%$ en MSC y $22.44 \pm 1.22\%$ en MSC-HIF ($p < 0,05$ en MSC y MSC-HIF versus SALINO). Mediante inmunohistoquímica doble EdU/Troponina I se reveló la presencia de cardiomiocitos en proliferación, cuyo índice fue $2.32 \pm 0.34\%$ en el grupo SALINO ($n=5$), $2.86 \pm 0.18\%$ en MSC ($n=6$) y $4.39 \pm 0.61\%$ en MSC-HIF ($n=5$) ($p < 0,05$ en MSC frente a SALINO y $p < 0,01$ en MSC-HIF frente a SALINO) (Figura 34).

A pesar de que el índice de proliferación de cardiomiocitos en MSC-HIF aumentó de manera significativa con respecto a los grupos MSC y SALINO, estos resultados apuntan a un efecto paracrino como mecanismo inducido por el trasplante celular.

Por último, quisimos evaluar si la hipertrofia cardíaca contribuyó al aumento del tejido miocárdico en animales tratados con MSC o MSC-HIF. Para ello, se calculó el área de los cardiomiocitos en secciones teñidas con anticuerpos anti-Laminina y anti-Troponina I (Figura 35).

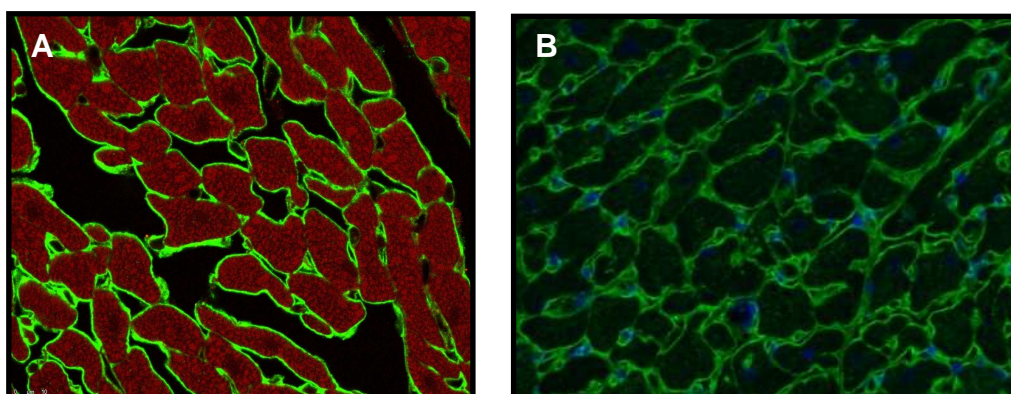


Figura 35. Detección de la matriz extracelular de los cardiomiocitos con el objeto de cuantificar su tamaño. A) Imagen fluorescente representativa de una sección de corazón con doble inmunohistoquímica con anticuerpos anti-Laminina (verde) y anti-Troponina I (rojo) (magnificación 200x). B) Imagen de una sección de corazón con anticuerpo anti-Laminina (verde); los núcleos están teñidos con DAPI en azul.

Se seleccionaron regiones de miocitos transversales en la zona borde de infarto para el análisis del área. Los cardiomiocitos de menor tamaño (menos de $200 \mu\text{m}^2$) fueron más abundantes en animales trasplantados con células (16.21 ± 2.47 en SALINO, 24.34 ± 7.28 en MSC y 27.13 ± 4.45 en MSC-HIF; $p < 0,05$ en MSC-HIF vs SALINO) (Figura 36).

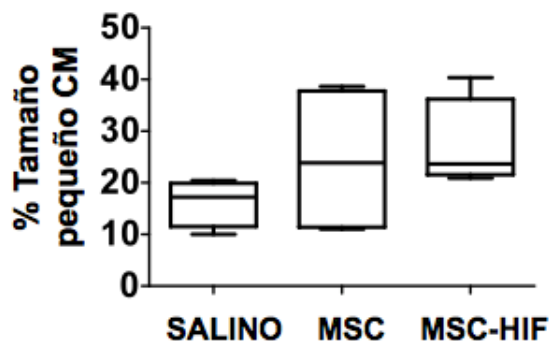


Figura 36. Gráfica de cubos donde se muestra el área transversal de cardiomiocitos pequeños ($0-200 \mu\text{m}^2$) detectados en grupos SALINO, MSC y MSC-HIF. Los cubos muestran la mediana y el percentil 25° y 75°. Las barras muestran el 1° y 90° percentil. ($p < 0,05$ en MSC-HIF frente a SALINO).

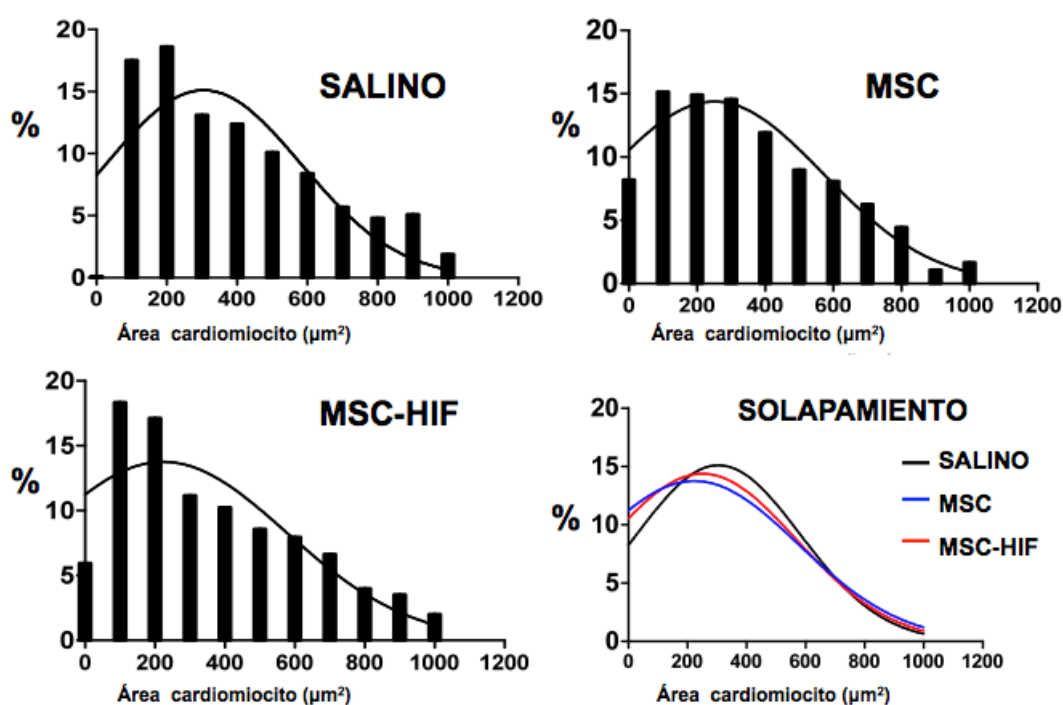


Figura 37. Frecuencia de distribución de áreas transversales de cardiomiocitos en la zona borde de IAM en los grupos SALINO ($n=4$), MSC ($n=4$), y MSC-HIF ($n=5$). Alrededor de 3.000 cardiomiocitos fueron analizados por animal. La media del ranking de cardiomiocitos de 0 a $1.200 \mu\text{m}^2$, con intervalos de $100 \mu\text{m}$, se representa mediante curvas de Gauss. El solapamiento de las curvas de Gauss representa la distribución de cardiomiocitos correspondiente a los grupos SALINO (línea negra), MSC (línea azul) y MSC-HIF (línea roja). No se observaron diferencias significativas entre los grupos, indicando la ausencia de hipertrofia cardíaca en las células de los grupos tratados.

Sin embargo, tal y como se muestra en la Figura 37, cuando analizamos el tamaño global de los cardiomiocitos, observamos que con respecto a los animales tratados con SALINO, en ambos grupos (MSC y MSC-HIF) la distribución del área de sección del miocito estaba desviada hacia la izquierda sin diferencias significativas en el área del cardiomiocito, indicando la ausencia de hipertrofia cardíaca.

CAPÍTULO 5.3: ESTUDIO DEL BIOMATERIAL ÁCIDO POLILÁCTICO COMO SOPORTE DE MSC PARA FAVORECER SU EFECTO TERAPÉUTICO

En el capítulo anterior se ha tratado el uso del trasplante intramiocárdico de células madre adultas como estrategia terapéutica para el tratamiento del infarto de miocardio; en este apartado exploramos otras formas de tratamiento utilizando soportes poliméricos biocompatibles. Las ventajas del uso de estos andamios en lugar del trasplante intramiocárdico son potencialmente importantes, ya que el biomaterial (BM) ofrecería un esqueleto de sustentación a las células.

5.3.1 ESTUDIO DE BIOCOMPATIBILIDAD DEL ÁCIDO POLILÁCTICO *IN VITRO*

En un primer momento se estudió *in vitro* el biomaterial ácido poliláctico (PLA); este material fue sintetizado en el Instituto Tecnológico Textil AITEX por el método de la electrohilatura y recibió un tratamiento de superficie con N₂ gaseoso. El plasma a baja presión de N₂ produce la modificación de la superficie de las nanofibras y los BM tratados pasan así a ser hidrofílicos. Esta habilidad adquirida es importante ya que permite posteriormente, que el medio de cultivo pueda penetrar bien en el material proporcionándole un ambiente adecuado para la supervivencia y proliferación celular. Además, los sucesivos lavados que recibió el biomaterial eliminaron el disolvente utilizado para su síntesis, evitando su efecto nocivo en las células y asegurando así que fuera adecuado para su utilización con fines terapéuticos.

5.3.1.1 Análisis de la viabilidad celular sobre el biomaterial

El biomaterial PLA mostró cualidades para permitir el crecimiento celular, lo que se tradujo en una gran densidad tras varios días de cultivo. La distribución de las células fue homogénea en el interior del BM; primero se formaron acúmulos celulares para posteriormente expandirse siguiendo las fibras hasta acabar invadiendo todo el biomaterial (Figura 38).

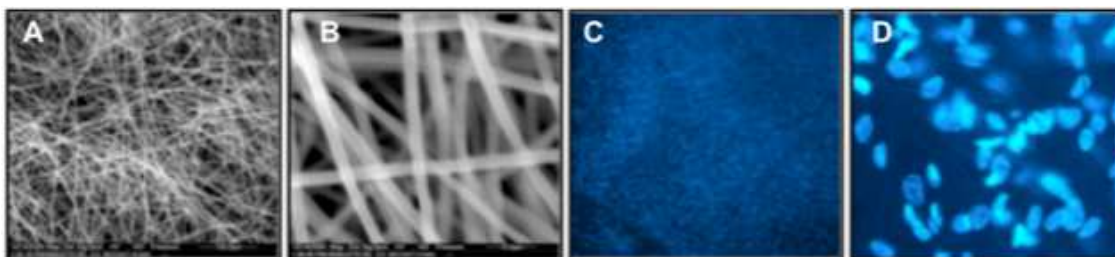


Figura 38. A) y B) Imágenes de microscopía de barrido de la estructura interna del PLA (600 y 5.000 aumentos respectivamente). Tomadas del Instituto Tecnológico Textil AITEX. C) y D) Fotografías de los biomateriales tomadas en microscopio de fluorescencia a 100 y 200 aumentos. Se observa las MSC marcadas con DAPI (azul) crecidas en el interior de los biomateriales.

El PLA se caracterizó por ser fácilmente manejable, resistente y adecuado para permitir la proliferación de las MSC en su interior.

5.3.1.2 Cuantificación celular sobre los biomateriales

Una vez comprobado que el PLA era apto para el cultivo y proliferación celular, se procedió a cuantificar dicha proliferación en el interior del biomaterial. Puesto que los biomateriales están formados por fibras que se entrecruzan formando una matriz tridimensional (Figura 39) y no es posible el recuento directo, recurrimos a los ensayos de viabilidad y proliferación celular utilizando el reactivo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) para obtener una relación entre el crecimiento celular y el tiempo (Zund *et al.* 1999).

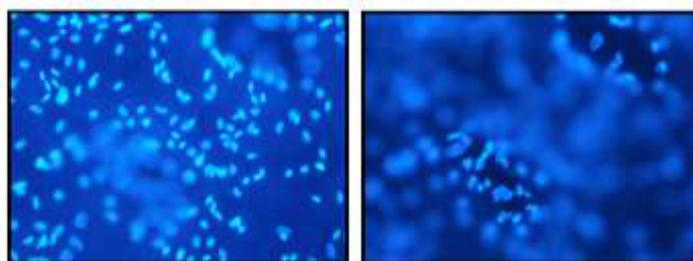


Figura 39. MSC marcadas con DAPI sembradas en el interior del biomaterial. El contaje directo del número de células viables mediante azul tripán no fue posible debido a la tridimensionalidad del biomaterial.

Se sembraron las MSC sobre el biomaterial en placas de 96 pocillos a una densidad de 8.000 células/pocillo y se realizaron lecturas de absorbancia a los días 1, 2, 3 y 4. El control fue la absorbancia de las células sembradas en los pocillos sin biomateriales.

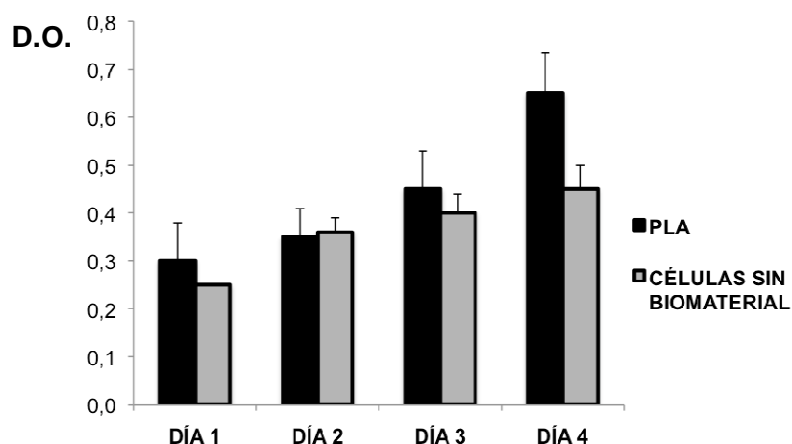


Figura 40. Gráfica de viabilidad celular con el biomaterial PLA y control (MSC). Los datos representan la media \pm DS de tres experimentos independientes. D.O.: Densidad óptica.

El biomaterial reaccionó con la sal de tetrazolio dando una tonalidad de color, por lo que cuando se procedió a la medición de las absorbancias en los pocillos que contenían el BM con la siembra celular, se descartó la absorbancia del biomaterial. De este modo los resultados muestran la absorbancia perteneciente al crecimiento celular, es decir la viabilidad y proliferación celular.

La Figura 40 muestra la diferencia entre el crecimiento celular de los pocillos control (células sin biomaterial) y los pocillos con células sembradas en el biomaterial. Así, observamos que el PLA siguió un patrón ascendente con respecto al tiempo. Esto puede deberse a que los biomateriales proporcionan a través de las fibras que los forman, una estructura tridimensional que hace aumentar la superficie de crecimiento de las células.

5.3.2 ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL BIOMATERIAL *IN VIVO*

Una vez confirmado que el PLA era un candidato adecuado según los estudios *in vitro*, pasamos a comprobar mediante estudios *in vivo* si reunía las condiciones necesarias de biocompatibilidad.

5.3.2.1 Técnica quirúrgica para la fijación del biomaterial

Dado que en la literatura hay muy poco descrito sobre cómo aplicar los biomateriales sobre la superficie cardíaca, el primer paso para establecer un protocolo de ingeniería tisular para el tratamiento del IAM fue determinar el mejor método para inmovilizar o acoplar el biomaterial a la superficie del corazón y poder disponer así de un modelo animal para la validación de la funcionalidad de diferentes materiales biológicos.

Para este estudio se utilizaron ratas Wistar macho de 200 gramos de peso. La duración del estudio fue de un mes. Se realizaron 4 grupos con un número total de 12 animales. En el primero el BM se ancló mediante técnica de fijación con dos puntos de sutura (n=3); en el segundo grupo el BM se fijó con cuatro puntos de sutura (n=3); en el tercer grupo el BM se aplicó mediante fijación con pegamento quirúrgico (n=3) y por último, en el cuarto grupo el BM se colocó en el VI infartado y se cubrió con el pericardio (n=3).

Tras anestesiar al animal, se realizó una toracotomía lateral izquierda e IAM como se ha explicado con anterioridad en el apartado de material y métodos. A continuación, tal y como se muestra en la Figura 41, se procedió a realizar las diferentes técnicas de anclaje. Un mes después de la realización del procedimiento quirúrgico se procedió a la eutanasia y apertura del tórax para observar los resultados.

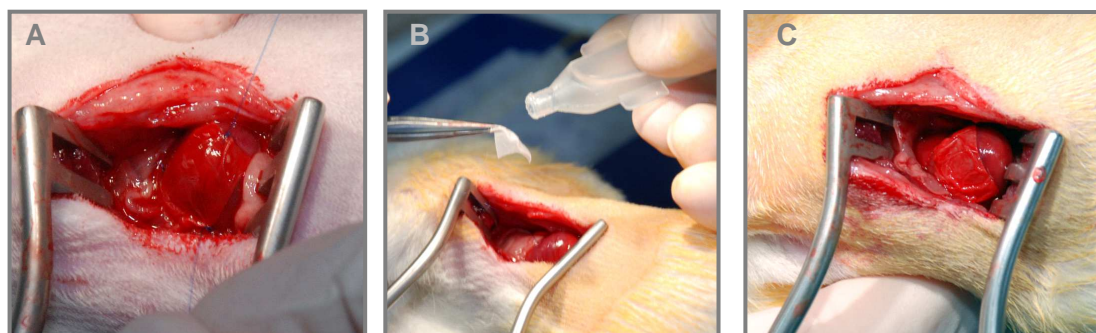


Figura 41. Diferentes técnicas utilizadas para la aplicación de biomateriales. A) Técnica de sutura de BM con dos puntos. B) Técnica de anclaje mediante pegamento quirúrgico. C) Técnica de superposición del pericardio.

La técnica de superposición del pericardio, no fue un buen método para aplicar el BM, ya que este procedimiento no brinda una sujeción adecuada y debido al continuo movimiento del corazón se produjeron desplazamientos del BM. Además, en una ocasión la superposición del pericardio produjo importantes adherencias, de manera que no fue posible identificar el parche.

Respecto a la técnica de pegado quirúrgico, se produjeron complicaciones derivadas del pequeño tamaño de la especie, ya que la expansión por capilaridad del pegamento provocó el contacto del mismo con diferentes órganos provocando adherencias entre ellos.

Por último, la técnica de fijación mediante puntos de sutura resultó ser adecuada; aunque observamos que la aplicación de 4 puntos fue excesivamente agresiva, sin aportar mayor beneficio. Así pues, la técnica con dos puntos de sutura resultó ser un método adecuado para la fijación del BM. Esta técnica fue relativamente fácil y rápida de realizar tras adquirir experiencia y es un método fiable y reproducible. Sin embargo, este procedimiento no estuvo exento de inconvenientes, ya que en alguna ocasión se produjo el rasgado del biomaterial a la hora de suturarlo al corazón. Además esta técnica de anclaje provocó una fibrilación ventricular pasajera durante uno de los procedimientos quirúrgicos.

5.3.2.2 Estudio de biodegradabilidad del PLA

Para este estudio se utilizaron un total de 12 ratas Wistar macho de 200 gramos de peso. Se realizaron 3 grupos en función de la duración del protocolo experimental. En el primer grupo el protocolo fue de un mes, en el segundo de 3 meses y por último el tercer grupo de estudio tuvo una duración de 12 meses.

El estudio *in vivo* demostró que este biomaterial es muy estable en el organismo (Figura 42), ya que los estudios realizados a uno y tres meses mostraron un biomaterial prácticamente intacto sin alteración de su forma. Un año después de su aplicación se pudo observar el biomaterial de manera macroscópica (aunque su aspecto era irregular y con un menor grosor), indicando que su degradación es muy lenta.

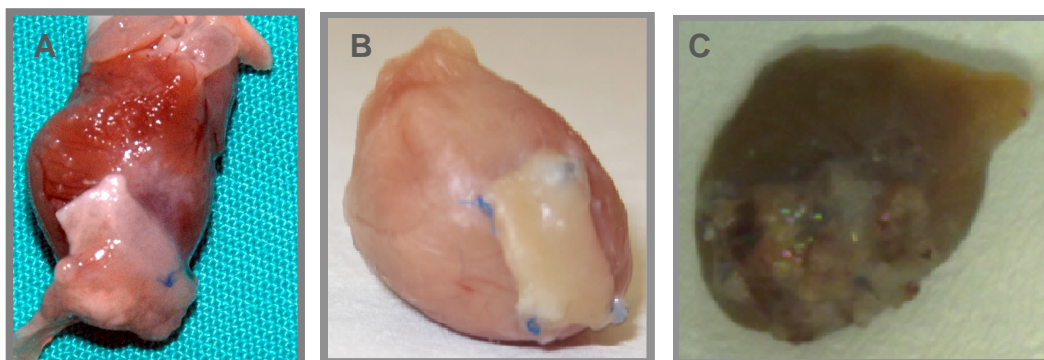


Figura 42. Imágenes macroscópicas de corazones a los que se les aplicó el biomaterial PLA. Duración del protocolo experimental: A) Un mes. B) Tres meses. C) Un año.

5.3.2.3 Estudio de la infiltración y biocompatibilidad *in vivo*

El corazón es un órgano muy vascularizado y por tanto de muy fácil acceso para el sistema inmune. Por este motivo la introducción de sustancias en el mismo, aunque sólo sea por contacto puede producir una respuesta inflamatoria inespecífica importante. Por ello, fue también objeto de este estudio el evaluar el posible efecto inflamatorio del biomaterial implantado, lo que permitiría determinar si sería adecuado para uso terapéutico en el tejido cardíaco.

El análisis mediante tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) de este biomaterial reveló la presencia de un gran infiltrado celular (Figura 43).

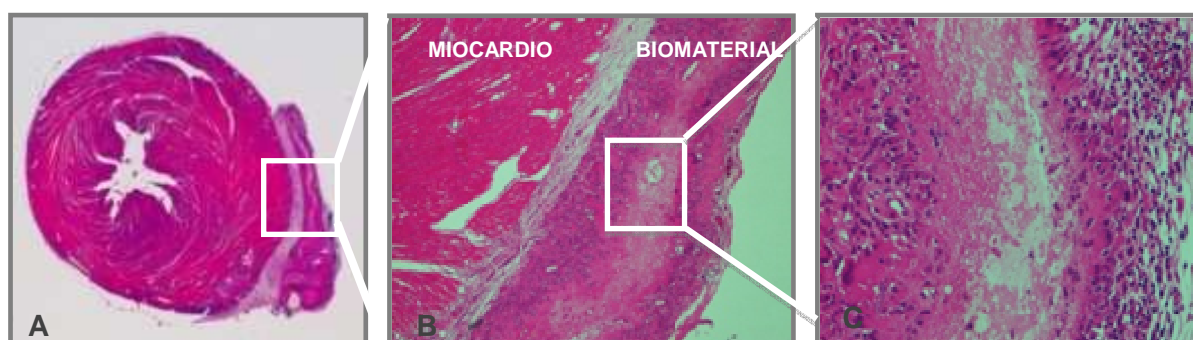


Figura 43. Efecto del implante del material sobre la superficie cardíaca en la respuesta inflamatoria. Tinciones de Hematoxilina-Eosina de un corte histológico de corazón al que se le ha implantado el BM PLA. A) Fotografía tomada con lupa. B) Imagen a 20 aumentos del miocardio con el BM. C) Imagen a 40 aumentos del BM, que se encuentra completamente infiltrado de células.

Este efecto inflamatorio es probable que se deba a una reacción de cuerpo extraño y al consiguiente proceso de biodegradación. A pesar de que el biomaterial implantado se encontraba embebido de células inflamatorias tanto a uno y tres meses, como al año de su implantación, no se produjo un rechazo tal que fuera incompatible con la vida del animal o requiriese un tratamiento inmunosupresor permanente.

5.3.2.4 Estudio de la neovascularización *in vivo*

Mediante tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-Reca-1, se procedió a estudiar si la presencia del biomaterial, además del efecto inflamatorio observado, también producía un proceso de neovascularización (Figura 44).

A pesar de que no se realizó un estudio cuantitativo, se observó una gran cantidad de vasos neoformados dentro del biomaterial. Este proceso angiogénico (una vez comprendido y controlado) podría ayudar a reducir la cicatriz del infarto mediante su aporte sanguíneo.

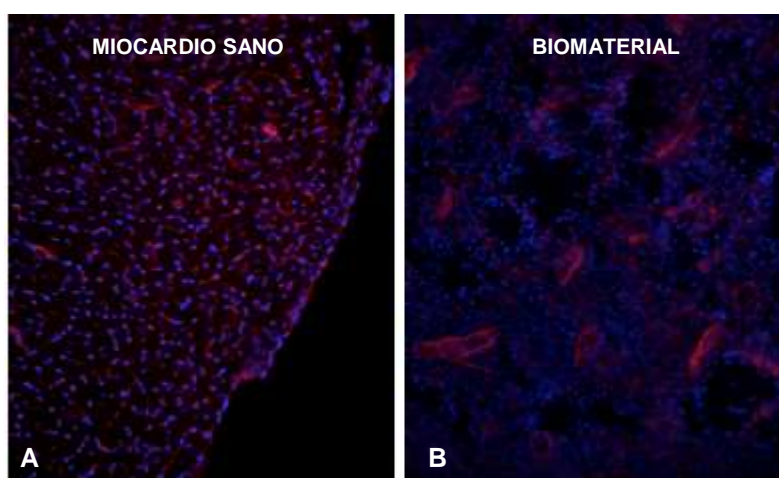


Figura 44. Inmunohistoquímica con anticuerpo anti-Reca-1. A) Fotografía a 10 aumentos en la que se muestra los vasos existentes en el miocardio sano. B) Fotografía del biomaterial PLA a 20 aumentos en la que se observa los vasos neoformados. Los núcleos celulares están teñidos con DAPI (azul).

Así, a pesar de que el polímero demostró capacidad para albergar grandes cantidades de células, su uso en el campo de la cardio-regeneración resulta dudoso ya que, aunque no resultó ser nocivo para los animales tratados, no cumple con un requisito indispensable como es la biocompatibilidad.

CAPÍTULO 5.4: ESTUDIO DE PREVENCIÓN DE ADHERENCIAS PERICÁRDICAS

Las adherencias pericárdicas son el efecto indeseado, resultado de toda cirugía realizada a tórax abierto. Son reacciones fibróticas que producen adherencias entre el pericardio y el corazón e incluso con la cavidad torácica a través de la pleura. Esto complica las frecuentes reintervenciones posteriores, ya que se pierden las referencias anatómicas debido a la gran fibrosis que aparece en esa zona.

5.4.1 MODELO MURINO DE INDUCCIÓN DE ADHERENCIAS PERICÁRDICAS

Un total de 24 ratas Wistar macho, con un peso entre 200-250 gramos se incluyeron en el estudio de puesta a punto del modelo de adherencias pericárdicas en la rata. El procedimiento consistió en inducir un IAM y a continuación realizar varias lesiones en el epicardio mediante rasgado del mismo con aguja de 18 G (Figura 45).

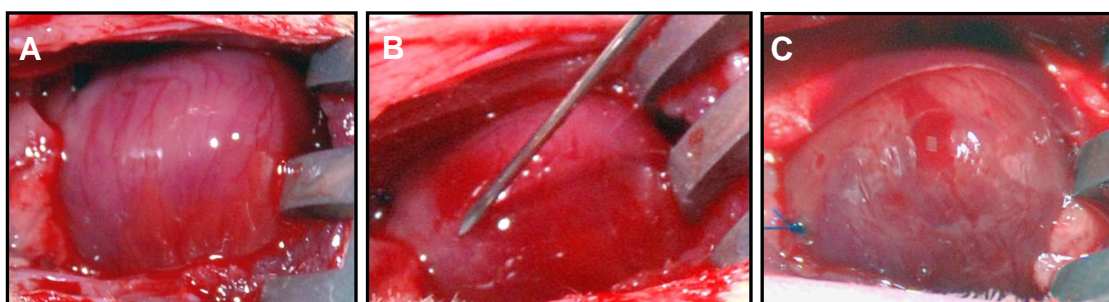
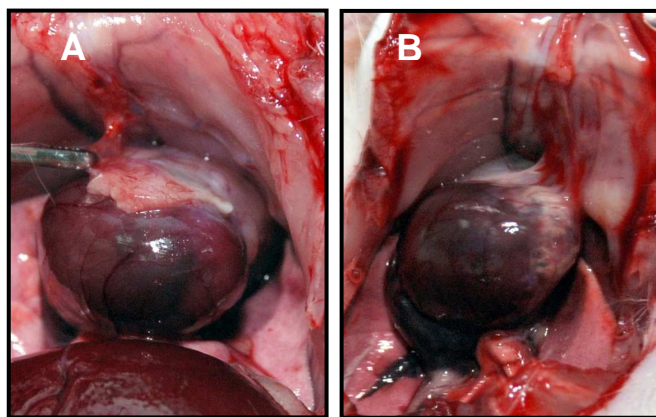


Figura 45. Modelo de adherencias pericárdicas en la rata. A) Imagen en la que se observa el cambio de color provocado por la ligadura de la ACDAI. B) Rasgado del epicardio con aguja de 18 G. C) Aspecto final del epicardio antes de proceder al cierre del tórax. ACDAI: Arteria coronaria descendente anterior izquierda.

Se hicieron dos grupos (en el primero el protocolo experimental tuvo una duración de 1 mes mientras que en el segundo grupo fue de 2 meses). Al final del tiempo experimental se procedió al sacrificio de los animales para valorar macroscópicamente el grado de adherencias pericárdicas que presentaban.

Se realizó un estudio semi-cuantitativo determinando el grado de adherencias. Los resultados obtenidos, tal y como se puede valorar en la Figura 46 no fueron uniformes ni siguieron un patrón predecible, por lo que el modelo murino no resultó ser el adecuado para realizar un estudio de adherencias.



SEMICUANTIFICACIÓN ADHERENCIAS PERICÁRDICAS

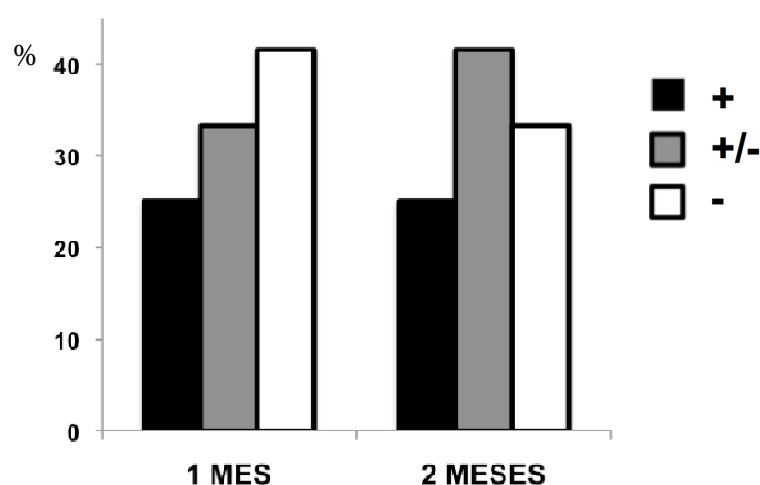


Figura 46. Imagen macroscópica de dos corazones en los que se realizó el mismo protocolo quirúrgico. A) La superficie cardíaca se puede apreciar perfectamente y no presenta apenas adherencias. B) Se observa la presencia de fuertes adherencias pericárdicas con la pleura parietal, que incluso producen la desviación del ápex y del VI hacia el hemitórax izquierdo. La gráfica representa el estudio semi-cuantitativo del grado de adherencias en el modelo de rata, en el que (+) indica la presencia de fuertes adherencias, (+/-) representa adherencias relativamente fáciles de retirar mediante bisturí y (-) señala la existencia de muy pocas o nulas adherencias.

Así pues, atendiendo a estos resultados y dado que en la literatura el cerdo ha sido utilizado en numerosos estudios por su similitud anatómica con la especie humana, se propuso la utilización del modelo porcino para estudiar las adherencias pericárdicas que aparecen tras una intervención a tórax abierto.

Este modelo nos permitió reproducir lo más fielmente posible el ambiente clínico, en el que los biomateriales (con función antiadherente) se aplican en circunstancias inflamatorias y de reperfusión de la coronaria ocluida.

Teniendo en cuenta el desafío que suponía comenzar a trabajar con esta especie, nuestro primer objetivo fue la puesta a punto de un modelo de adherencias pericárdicas, que nos permitiera evaluar la capacidad de diversos materiales para la prevención de dichas

adherencias. Para ello tuvimos que sistematizar previamente el modelo de IAM, ecocardiografía e implante de biomaterial en esta especie.

Así pues, pusimos a punto el modelo agudo de infarto de miocardio con reperfusión y una vez comprobamos que era reproducible, pasamos al modelo crónico para proceder a realizar el estudio de adherencias.

5.4.2 MODELO PORCINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Se realizó un estudio con 6 cerdos White Large hembras de 20 Kg de peso, para poner a punto el modelo agudo de infarto de miocardio mediante isquemia/reperfusión (Figura 47).

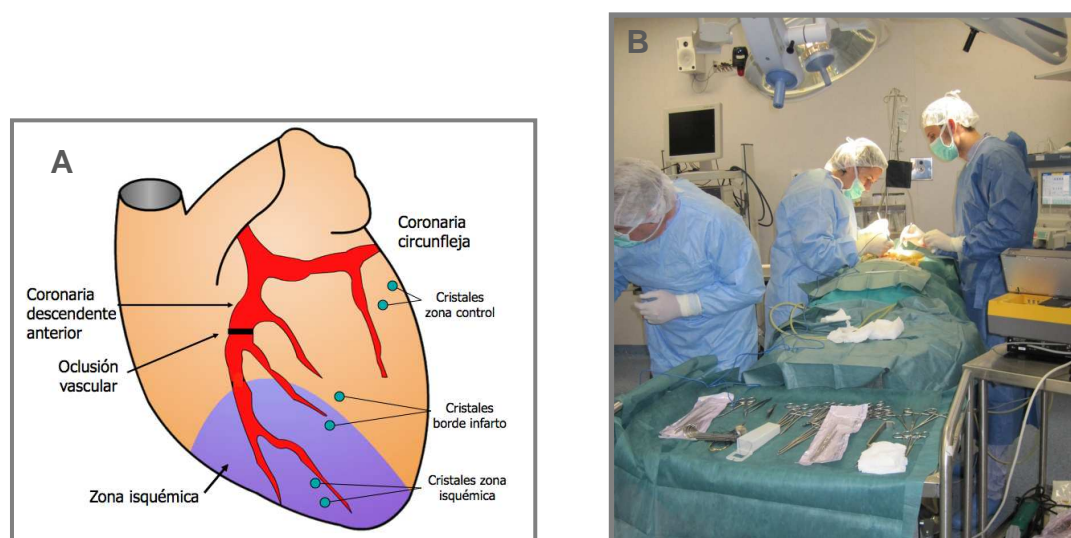


Figura 47. A) Imagen esquemática de la irrigación del corazón, la localización del punto de oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (ACDAI) y las diferentes zonas de colocación de los cristales piezoeléctricos. B) Imagen del quirófano durante un procedimiento quirúrgico en cerdo.

El 100% de los sujetos sufrió una fibrilación ventricular durante la fase de isquemia, por lo que se procedió a la reanimación mediante masaje cardíaco y posterior desfibrilación eléctrica con 20 Julios de energía, consiguiendo así normalizar la actividad eléctrica y funcional del corazón en todos los casos.

El esquema del protocolo experimental llevado a cabo, tal y como se muestra en la Figura 48, consistió en la realización de una anestesia general para proceder a la esternotomía; a continuación se realizó la oclusión de la ACDAI durante una hora con posterior reperfusión de 2 horas y por último se sacrificó el animal para proceder al estudio histológico. Durante el protocolo se tomaron medidas de parámetros de función cardíaca regional, global y muestras de suero en los siguientes tiempos: Basal, 30 y 60 minutos de isquemia, y 30, 60 y 120 minutos de reperfusión.

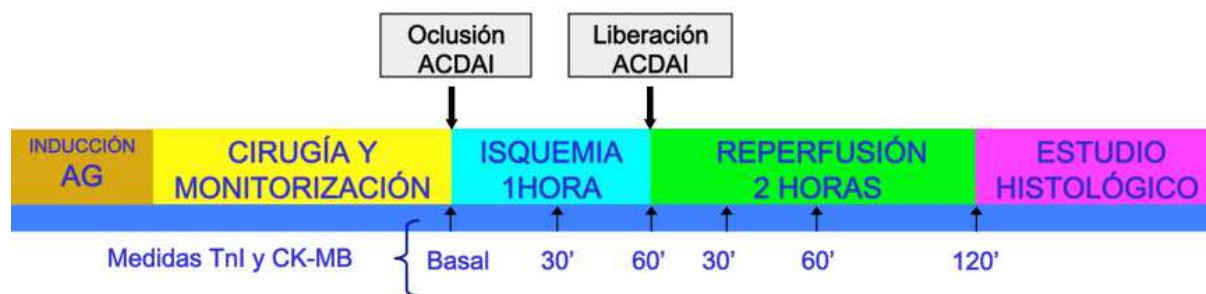


Figura 48. Diagrama de trabajo en el modelo agudo de infarto de miocardio. AG: Anestesia general.

En los siguientes apartados se confirma la correcta realización de la técnica y su homogeneidad y fiabilidad mediante la observación a tiempo real de los cambios morfológicos ocurridos tras la isquemia, la monitorización electrocardiográfica, hemodinámica y bioquímica, y por último mediante el estudio histológico.

5.4.2.1 Cambios macroscópicos

Pocos minutos después de realizar la oclusión de la ACDAI, se verificó la correcta realización del infarto al observar el cambio de coloración y la disquinesia acontecidos en la zona dependiente de la vascularización de la arteria ocluida (Figura 49).

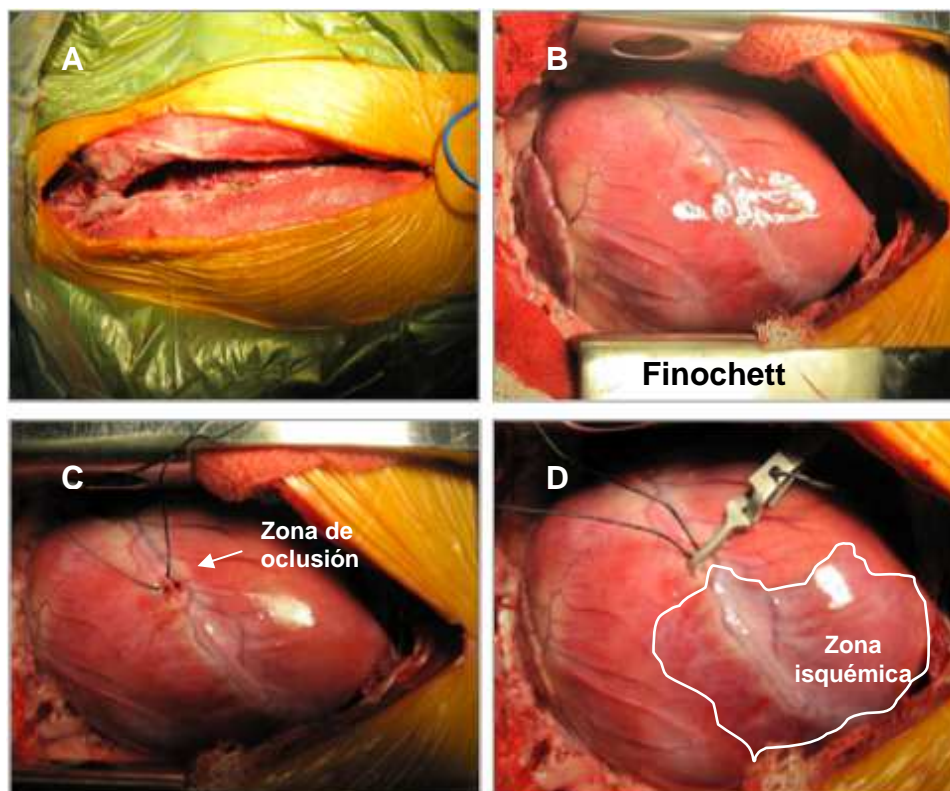


Figura 49. Procedimiento quirúrgico para la realización del IAM. A) Apertura de la cavidad torácica mediante esternotomía. B) Colocación de un separador de Finochett para obtener un buen campo quirúrgico y observación del aspecto normal del corazón. C) Aislamiento de la ACDAI, por encima de la 2ª diagonal. D) Oclusión de la ACDAI con la ayuda de un clamp vascular y visualización del cambio de color inmediato y la alteración de la contractilidad de la zona afectada.

5.4.2.2 Función cardíaca global

Tal y como se muestra en la Tabla 9 y la Figura 50, la inducción de la isquemia produjo moderadas alteraciones de los parámetros hemodinámicos, los cuales recuperaron sus valores basales en la reperfusión.

Se observó que la presión sistólica del ventrículo izquierdo (PsVI) se mantuvo con valores similares a los basales (67,9±9,3 mm Hg) durante todo el protocolo, aunque a los 120 minutos de reperfusión descendió de forma significativa (56,5±19,4 mmHg, $p<0,05$). Por el contrario, la presión telediastólica del ventrículo izquierdo (PTdVI) ascendió durante la isquemia, para volver posteriormente a sus valores basales. Se calculó la primera derivada de la presión con respecto al tiempo del VI (dP/dt); no se observaron cambios significativos en la máxima positiva, mientras que en la mínima negativa se produjo un ascenso significativo a los 30 minutos de isquemia (indicando afectación de la relajación cardíaca) recuperando los valores basales el resto del estudio. Los valores de la presión media de aurícula izquierda no variaron significativamente a lo largo del proceso. En cuanto a la frecuencia cardíaca basal media, fue de 90,5 ± 17,6 latidos por minuto (lpm) y se incrementó de forma estadísticamente significativa al final del protocolo. El flujo de aorta así como el volumen/latido y el gasto cardíaco descendieron en la isquemia con recuperación en la reperfusión.

También se monitorizó de forma continuada la actividad eléctrica del corazón mediante electrocardiograma con derivaciones subcutáneas en las extremidades (D II y D III), donde se pudo observar la presencia de arritmias y cambios electrocardiográficos tales como la elevación del segmento ST, cuya significación se traduce en proceso isquémico.

FUNCIÓN CARDÍACA GLOBAL						
	Basal	30' Isq.	60' Isq.	30' Repf.	60' Repf.	120' Repf.
FC (lpm)	90,5±2	94,2±2	94,7±18*	101±15,7*	108,3±18,4	116,8±22*
PsVI (mmHg)	67,9±9,3	63,7±11,7	62,9±16	60,5±18,8	56,3±24,6	56,5±19,4*
PTdVI (mmHg)	5,5±2,3	7,2±3,5	7,5±1,6*	6,6±1,6	6,3±3,7	6,6±2
PAI (mmHg)	5±0,9	6,6±2,3	5,5±1,3	5±2,7	3,9±2,9	4,5±0,9
dP/dt+ (mmHg/sec.)	829,7±224	768,2±254	720±302,6	747,2±388,4	767±438,6	707,7±440,3
dP/dt- (mmHg/sec.)	862,8±357	712±261,5*	855,8±456,4	761,8±371,1	786,2±579,9	752,7±490,9
FI Ao (mL/3L)	71,7±5	63,3±6	61,7±4,7	71±11,2	76±8,5	69±22,6
GC (L/minutos)	2,03±0,6	1,9±0,5	1,8±0,4	2,3±0,1	2,8±0,5	2,7±1

Tabla 9. Valores hemodinámicos obtenidos durante los 60 minutos de isquemia y 2 horas de reperfusión. Isq: Isquemia; Repf: Reperfusión; FC: Frecuencia cardíaca; PsVI: Presión sistólica del ventrículo izquierdo; PTdVI: Presión telediastólica del ventrículo izquierdo; PAI: Presión media de aurícula izquierda; dP/dt: Derivada de la presión respecto al tiempo; +: Máxima positiva, -: Máxima negativa; FI Ao: Flujo en raíz aórtica. Comparación de los promedios de cada fase con la situación basal (* $p<0,05$).

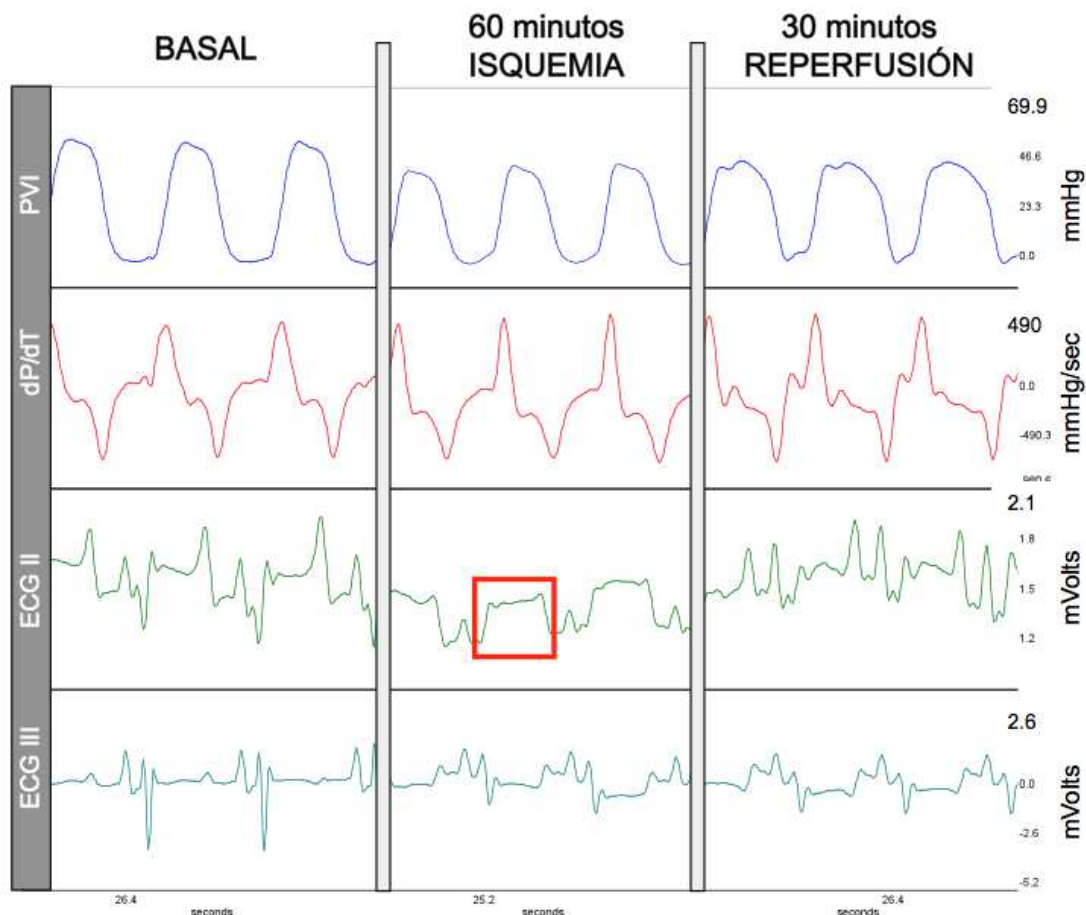


Figura 50. Registro de los parámetros hemodinámicos y ECG en los diferentes tiempos del protocolo. El cuadro rojo indica la elevación del segmento ST acontecida a los 60 minutos de isquemia.

5.4.2.3 Función cardíaca regional

La longitud telediastólica (LTd) es el parámetro que mide la máxima separación entre dos cristales, es decir la relajación de un segmento miocárdico. Mientras que la longitud telesistólica (LTs) a su vez mide la máxima aproximación entre dos cristales, es decir la contracción de un segmento miocárdico. La fracción de acortamiento es el parámetro que mide la contractilidad del segmento miocárdico.

Se tomaron estas medidas a lo largo de las diferentes fases del experimento en las tres zonas del VI donde fueron colocados los cristales piezoeléctricos (Tabla 10). En la zona control (sana) no se produjeron cambios significativos a lo largo del proceso en ninguna de las longitudes y la fracción de acortamiento a pesar de verse incrementada, no lo hizo de forma significativa. En la zona borde del infarto las LTd y LTs se incrementaron significativamente durante la isquemia, recuperándose posteriormente; la fracción de acortamiento descendió de forma significativa a lo largo del proceso de reperfusión, produciéndose hipoquinesia de la zona (disminución de la contractilidad). En la zona isquémica tanto la LTd como la LTs se incrementaron de forma estadísticamente significativa durante la isquemia y se mantuvieron por encima de los valores basales durante la reperfusión.

FUNCIÓN MIOCÁRDICA REGIONAL						
	Basal	30' Isq.	60' Isq.	30' Repf.	60' Repf.	120' Repf.
LTd CONTROL	10,9±2,2	11,9±1,9	11,8±2,1	11,8±2,1	11,8±2,1	11,7±2,2
LTs CONTROL	10,2±2,1	10,8±1,7	10,6±2	10,6±2	10,6±2,1	10,6±2,1
LTd BORDE	12,7±2,1	13,1±2,1***	12,9±2	12,4±2,2	12,2±2,1*	12,3±2,3
LTs BORDE	11,1±1,6	11,7±1,9*	11,4±1,5*	11,4±1,9	11,4±1,9	11,4±1,9
LTd IAM	11,8±2,1	12,9±2,2***	12,5±2,4**	11,8±1,4*	11,8±1,3	12,2±1,5
LTs IAM	10,6±1,4	12,9±2,2**	12,7±2,1**	11,5±1,2*	11,6±1,1*	12,1±1,4*

Tabla 10. Tabla en la que se muestran los valores de los parámetros de función miocárdica regional en las distintas fases del estudio, en la zona control, borde de infarto y zona isquémica. LTd: longitud telediastólica; LTs: longitud telesistólica; Isq: isquemia; Repf: reperusión. Los valores representan la media \pm DS. Comparación de medias respecto al valor basal. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

En la Figura 51 se observa cómo la fracción de acortamiento se vio afectada significativamente durante la isquemia, alcanzando valores negativos (disquinesia: contracción asincrónica respecto al ciclo cardíaco), y durante las 2 horas de reperusión en las que el corazón se mantuvo hipoquinético.

FRACCIÓN DE ACORTAMIENTO						
	Basal	30' Isq.	60' Isq.	30' Repf.	60' Repf.	120' Repf.
CONTROL	7+3,8	9,1+3	10,2+1,9	9,9+3*	10,9+2,7*	9,4+2,9
BORDE	12,3+4,2	10,4+4,3	10,5+4,6	7,9+3,5*	6,7+2,8*	6,6+3,5**
IAM	9,9±4,6	-0,2±1,7**	-1,8±4,8**	2+1,9**	1,8+1,2**	0,8+2,6**

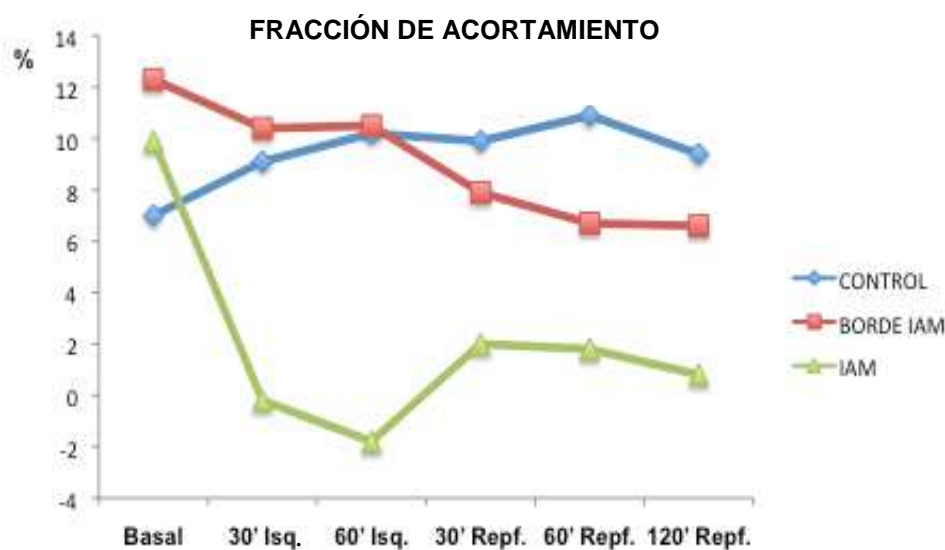


Figura 51. En la gráfica se observa la tendencia de los valores de la fracción de acortamiento segmentario en las distintas zonas del corazón en función de la fase del protocolo experimental. Comparación de medias respecto al valor basal. Los valores representan la media \pm DS. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

5.4.2.4 Marcadores bioquímicos de necrosis miocárdica

Se realizaron extracciones de sangre para determinar mediante ELISA los niveles plasmáticos de Troponina T (Tn T) y Creatinina Quinasa-MB (CK-MB) (enzimas indicadoras de daño miocárdico) durante las fases del procedimiento detalladas con anterioridad.

Se observó la elevación significativa de los niveles de Tn T de forma progresiva desde los 30 minutos de isquemia hasta el final del protocolo experimental, confirmando la isquemia producida tras el IAM. En cuanto a los valores CK-MB, se mantuvieron más estables y no aumentaron significativamente en los tiempos registrados (Figura 52).

Con estos marcadores se confirmó que efectivamente se produjo una necrosis miocárdica tras el infarto.

MARCADORES BIOQUÍMICOS						
	Basal	30' Isq.	60' Isq.	30' Repf.	60' Repf.	120' Repf.
Tn T	0,01±0	0,06±0,02**	0,1±0,04**	0,5±0,3*	0,7±0,5*	0,9±0,6*
CK-MB	0,5±0,2	0,6±0,2	0,6±0,3	0,7±0,2*	0,6±0,2**	0,6±0,2

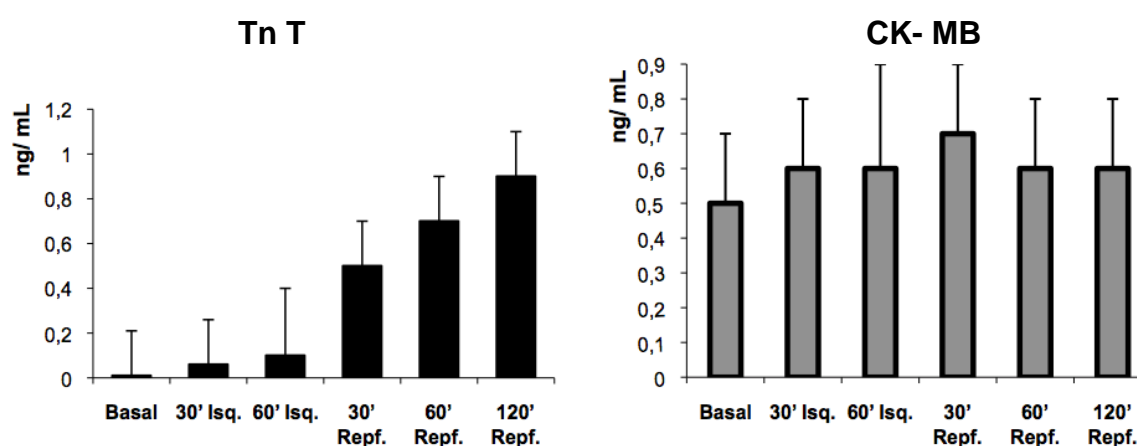


Figura 52. Las gráficas muestran el aumento significativo de los valores de Tn T a partir de 30 minutos de isquemia, mientras que la CK-MB se mantiene estable a lo largo de todo el protocolo. Tn T: Troponina T; CK-MB: Creatinina Quinasa-MB. Comparación de los distintos tiempos con la situación basal. Los valores representan la media ± DS. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.4.2.5 Análisis morfométrico del tejido infartado

Al final del protocolo experimental se procedió a la eutanasia del animal. Tras la extracción y lavado del corazón con suero salino fisiológico se realizaron cuatro secciones transversales tal y como se describe en el apartado de material y métodos, y se procedió al cálculo del área de la zona infartada (Figura 53).

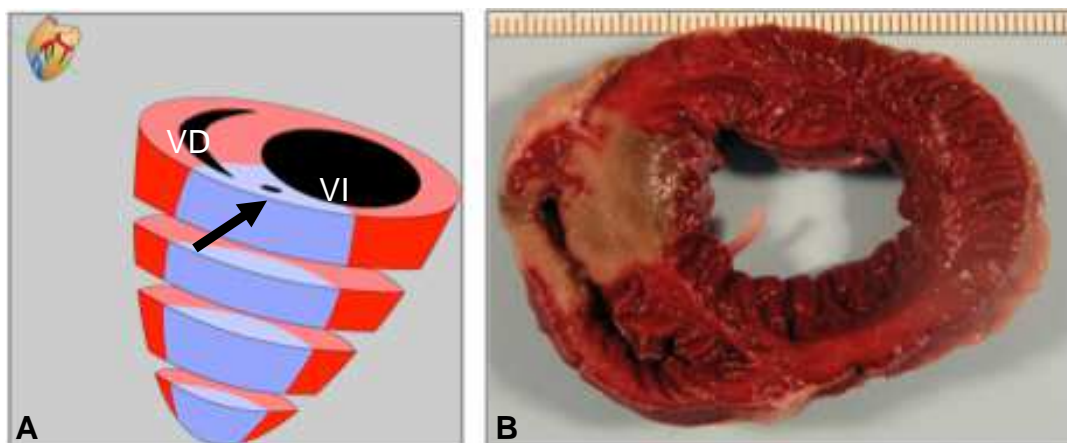


Figura 53. A) Dibujo en el que se muestra las secciones efectuadas para realizar el análisis morfológico de la zona infartada. La flecha indica el punto de oclusión de la arteria; el color rojo representa tejido sano y el color morado la zona infartada. B) Sección de corazón tras la realización de la tinción de Tetrazolio. La zona necrótica aparece blanquecina, mientras que la parte viable se observa de color rojizo.

Mediante la técnica de tinción con Tetrazolio se midió el tamaño del IAM, como porcentaje de la zona necrótica con respecto al VI (a partir de la zona de oclusión), medido por planimetría. El volumen total del VI a partir del punto de oclusión coronaria fue de $17,4 \pm 1,7 \text{ cm}^3$, y el volumen de tejido necrótico fue de $2,4 \pm 1 \text{ cm}^3$. Así pues el porcentaje del área infartada fue de $13,9 \pm 5,4\%$ (Figura 54).

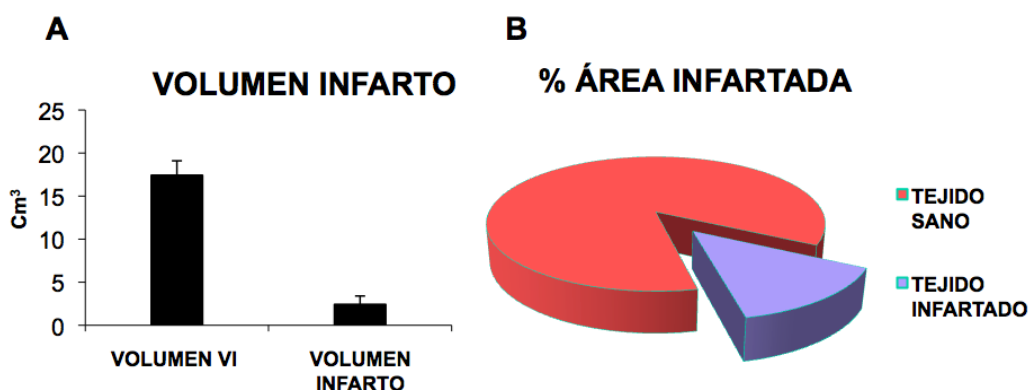


Figura 54. A) Gráfica indicando el volumen de tejido necrótico respecto al sano. B) Gráfica donde se muestra el porcentaje del área infartada (color morado) con respecto a zona sana (color rojo). Los valores representan la media \pm DS.

5.4.2.6 Tinción de Hematoxilina-Eosina

En cuanto al estudio histológico, mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina se observó la diferencia entre tejido sano y tejido infartado. En la Figura 55 se muestra el aspecto en cada una de las áreas (zona sana, zona borde y zona IAM); se observa la clara diferencia entre el tejido sano, donde se pueden detectar las bandas de sarcómeros y el

tejido infartado, donde la presencia de bandas en forma de oleaje son características de daño isquémico.



Figura 55. Cortes de tejido cardíaco teñidos mediante Hematoxilina-Eosina, donde se puede apreciar la alteración estructural sufrida en el miocardio tras la isquemia. Barra de escala = 0,2 mm.

5.4.2.7 Evaluación de la apoptosis

La técnica de TUNEL, mediante una reacción enzimática consigue marcar el ADN de las células que han entrado en apoptosis. Esto permitió el estudio del número de células apoptóticas respecto al total de núcleos presentes en diferentes áreas del tejido cardíaco, correspondientes a la zona isquémica, borde de infarto y zona sana.

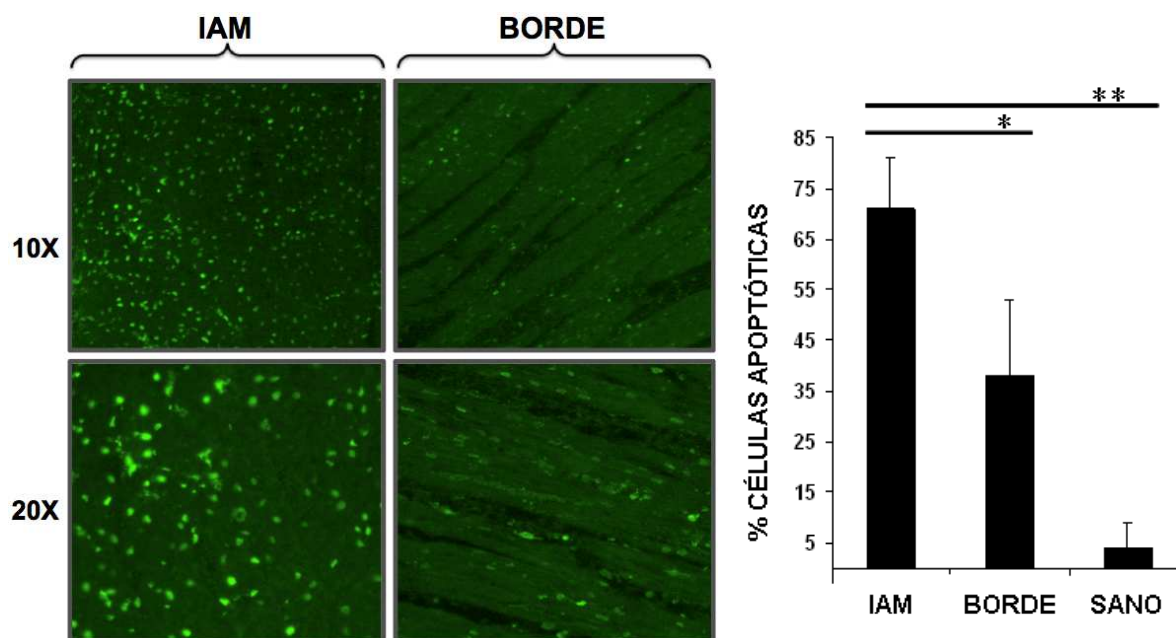


Figura 56. Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia de cortes de corazón en los que se ha realizado TUNEL para cuantificar el número de células apoptóticas (verdes) en la zona de infarto, borde de infarto y sana. La gráfica muestra la cuantificación del número de células apoptóticas contadas respecto al total de las células, en porcentaje. Los valores representan la media \pm DS. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

En la Figura 56 se muestra cómo existe una mayor apoptosis en el área infartada ($71\pm 10\%$) con respecto a la zona de penumbra ($38\pm 15\%$) ($p < 0,05$) y respecto a la zona sana ($4\pm 5\%$) ($p < 0,001$).

5.4.3 MODELO CRÓNICO DE INFARTO Y DE ADHERENCIAS PERICÁRDICAS

Una vez obtenido el modelo de infarto agudo de miocardio, procedimos al desarrollo del modelo crónico, con el objeto de disponer de un sistema con el que evaluar la eficacia de los biomateriales en la reparación tisular, en términos de reducción del remodelado ventricular y/o adherencias pericárdicas. Para la puesta a punto de este modelo se utilizaron 6 cerdos Large White hembras de 20 Kg de peso. En la Figura 57 se muestra el esquema del protocolo experimental seguido; más complejo en este caso debido a la cronicidad del mismo (5 semanas de duración).

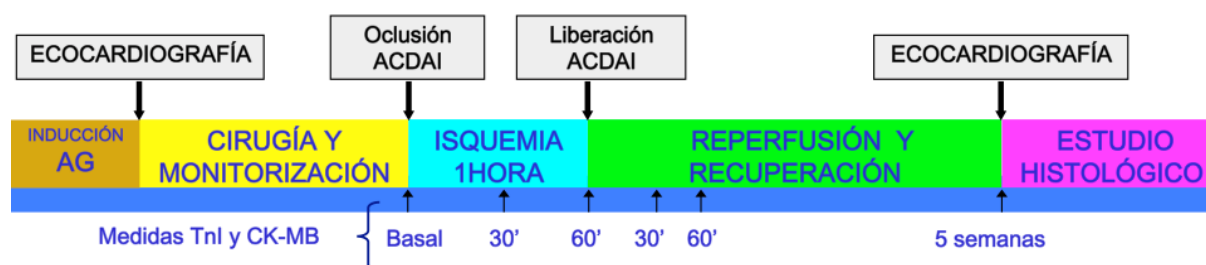


Figura 57. Esquema representativo de las etapas del modelo crónico. Con el animal anestesiado, se realizó el procedimiento quirúrgico que consistió en: esternotomía seguida de pericardiotomía; clampaje de la ACDAI por encima de la segunda diagonal durante 60 minutos y posterior reperusión. Cierre del tórax y recuperación del animal. Un día antes de la cirugía y del final del protocolo experimental se anestesió al animal y se realizaron sendas ecocardiografías. Durante el protocolo, se obtuvieron muestras sanguíneas para el análisis de marcadores séricos. Por último, a las 5 semanas se sacrificó al animal para proceder al estudio histológico. ACDAI: Arteria coronaria descendente anterior; AG: Anestesia general.

En este grupo (denominado crónico sin biomaterial) se realizó el mismo protocolo quirúrgico que en el grupo anterior de infarto agudo, con la salvedad de que no se implantaron los cristales piezoeléctricos ni los catéteres de presión. Puesto que los parámetros de función regional no se tomaron para no dañar en exceso el miocardio, se procedió a realizar la ecocardiografía del animal a 2 tiempos (basal y al final del protocolo experimental) permitiéndonos, de manera no invasiva, estimar la contractilidad cardíaca y la FA, entre otros parámetros.

Así pues, para el modelo crónico se imponía, transcurridos los 60 minutos de isquemia, el despertar del animal. Para ello fue necesario la aplicación de un drenaje torácico y cierre de la esternotomía (tal y como se explica en el apartado de materiales y métodos). A continuación, en la Figura 58, se muestra cómo se procedió al cierre del mismo).



Figura 58. A) Utilización de acero para el cierre del esternón. La flecha indica el tubo de drenaje colocado previamente, para restaurar la presión torácica negativa. B) Corte de los alambres de unión; se observa cómo el tórax ya es impermeable. C) Cierre de piel, eliminación de la vía central y del monitor de pulsioximetría y ECG.

5.4.3.1 Función cardíaca global

En este estudio se registraron los siguientes parámetros de función cardíaca global: ECG, FC, PVI y dPdt. Los valores obtenidos en las diferentes fases de estudio se muestran a continuación en la Tabla 11.

Al final del protocolo (5 semanas), los parámetros hemodinámicos se recuperaron, obteniendo valores de presión ventricular, frecuencia cardíaca y dP/dt similar a los basales, indicando que a pesar de que se haya producido un remodelado ventricular, éste no es suficiente para comprometer la función cardíaca.

FUNCIÓN CARDÍACA GLOBAL						
	Basal	30' Isq.	60' Isq.	30' Repf.	60' Repf.	5 Semanas
FC (lpm)	95±21	105,6±36,8	100,2±24,1	110,3±24,2	114,3±29	98,2±14,7
PsVI (mmHg)	56,5±8	53,1±7,5	47,5±5,9**	47,8±7,3	49,5±8,4	71,1±12,4
PTdVI (mmHg)	4,8±2,4	6,7±3,8	6,3±6	8,8±7,5	6,3±3,7	6,6±2
dP/dt+ (mmHg/sec.)	660±246,1	692,2±255,1	618,2±184,9	553,3±155,8	663,2±238,6	712,8±259,1
dP/dt- (mmHg/sec.)	735±184,4	644,8±151	581,6±150,9*	578,5±192,7*	625,3±222,2	1041,4±277,9

Tabla 11. Datos de la función cardíaca global obtenidos tras un seguimiento de 5 semanas. Comparación de los distintos tiempos con la situación basal. Los valores representan la media ± DS. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.4.3.2 Evaluación de la función cardíaca mediante ecocardiografía

Se realizó un estudio ecocardiográfico basal y al final del protocolo experimental valorando el diámetro de las cámaras cardíacas, el grosor de las paredes ventriculares y las alteraciones de la contractilidad en los diferentes segmentos. Mediante doppler color se realizó una valoración cualitativa de posibles valvulopatías.

La función sistólica de ventrículo izquierdo se estimó mediante el cálculo de la fracción de acortamiento y la fracción de eyección por el método de Simpson (Figura 59).

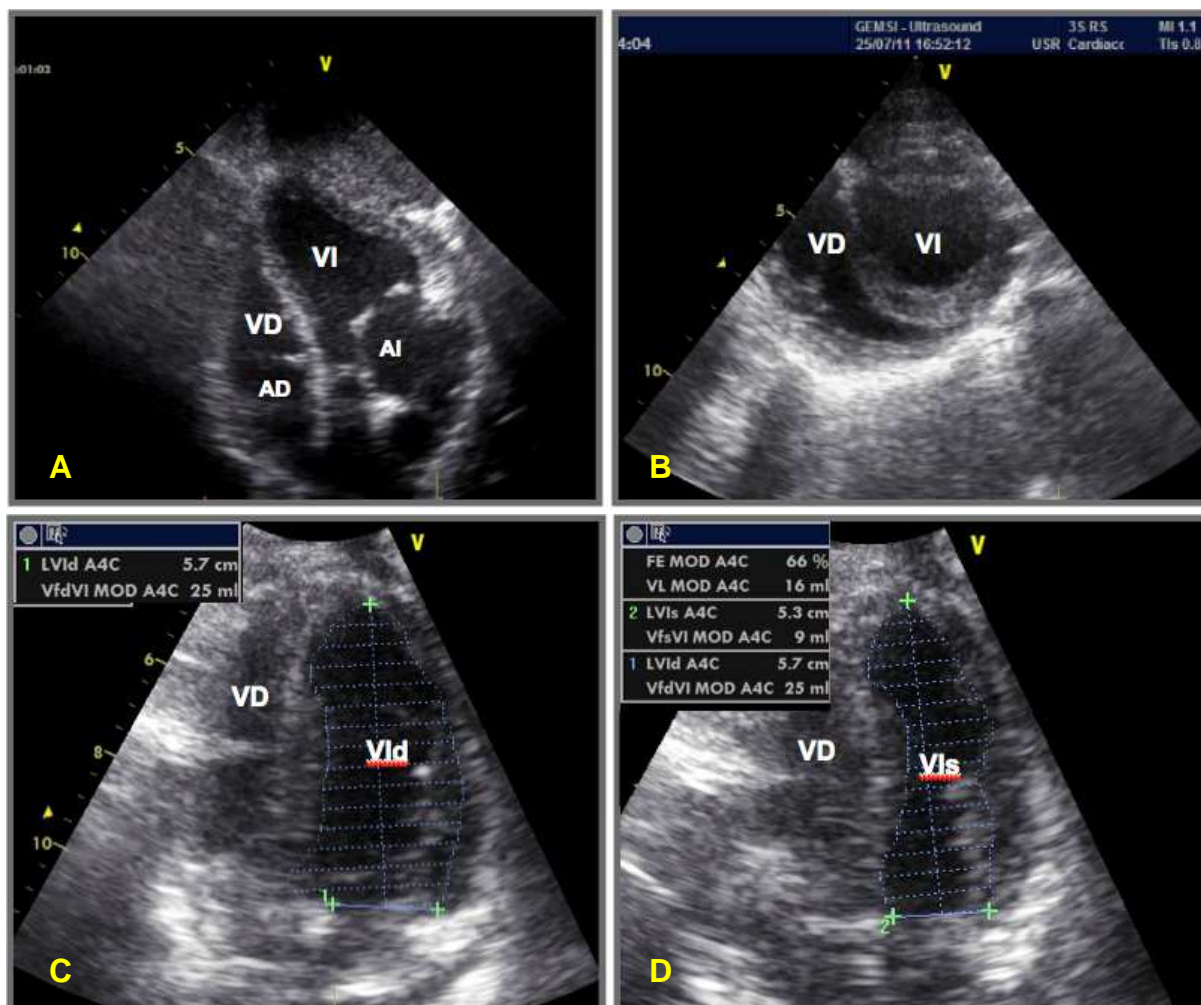


Figura 59. Imágenes tomadas para la obtención de los parámetros ecocardiográficos. A) Corte longitudinal de 5 cámaras, donde se pueden observar el tamaño de las cámaras cardíacas, el grosor de las paredes y la velocidad del flujo y determinar la presencia o no de turbulencias durante el paso por las válvulas mitral, aórtica y tricúspide. Además se puede valorar la contractilidad septal y lateral. B) Corte transversal en el que se puede observar la luz del VI y VD así como el grosor de las paredes. Se puede valorar la contractilidad a esta altura de todos los segmentos del ventrículo. Con esta imagen y con el uso del modo-M, valoramos la fracción de acortamiento y el grosor de las paredes. C y D) Imagen longitudinal de 4 cámaras, donde se ha marcado el área de VI en diástole y en sístole respectivamente; con estos datos obtenemos el volumen final del VI y utilizando el método Simpson, estimaremos la fracción de eyección.

La fracción de acortamiento se obtiene a partir del diámetro telediastólico y telesistólico del VI y nos da información sobre la función contráctil del corazón. Tal y como se muestra en la Figura 60, se detectó una disminución de la fracción de acortamiento como consecuencia del infarto producido.

La fracción de eyección se estimó con el método Simpson, a partir de los volúmenes del VI tanto telesistólico como telediastólico, obteniendo así información sobre la función sistólica cardíaca. De nuevo se detecta un deterioro de la función global sistólica a las 5 semanas post-infarto (Figura 60).

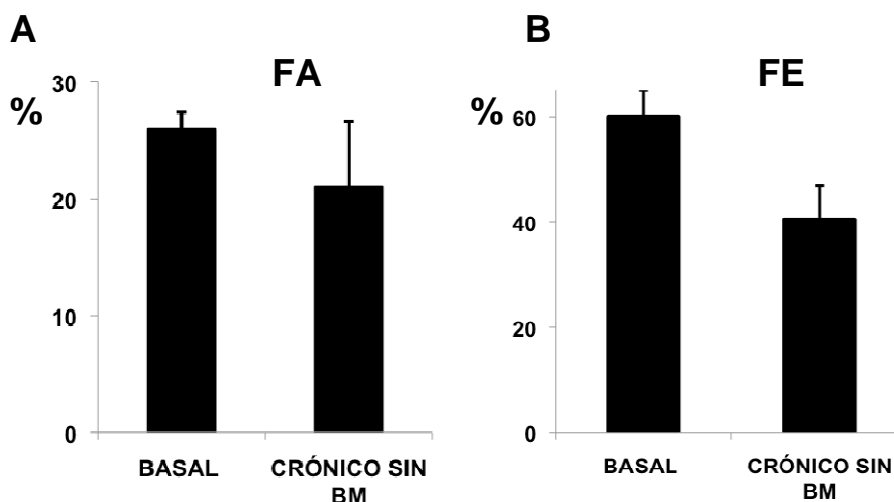


Figura 60. Análisis de la función del ventrículo izquierdo mediante los parámetros de fracción de acortamiento y fracción de eyección (A y B respectivamente), al inicio y al final del experimento. Se observa un descenso de los parámetros a las 5 semanas del infarto respecto a la situación basal. FA: Fracción de acortamiento; FE: Fracción de eyección. Los valores representan la media \pm DS.

Con la medida del grosor de las paredes confirmamos que se había producido un remodelado ventricular. En la Figura 61 se observa cómo el grosor de las paredes del VI se vio adelgazado 5 semanas después del infarto, excepto la pared posterior, que incrementó su grosor de manera compensadora.

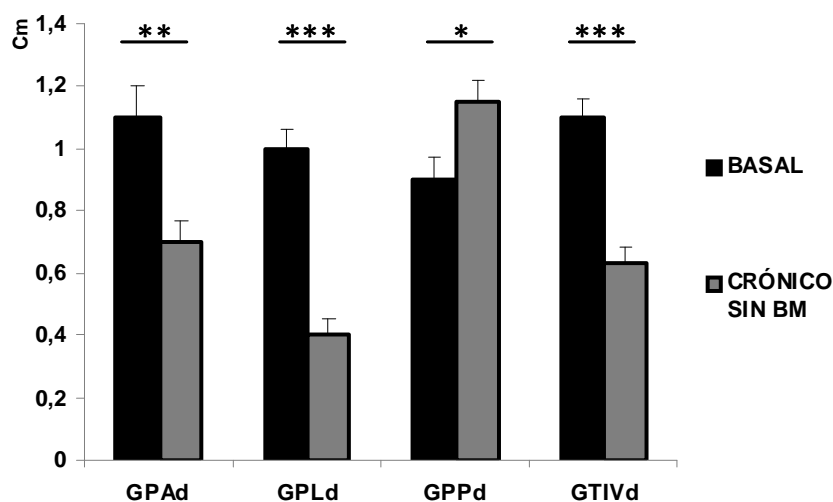


Figura 61. Valores del grosor de las paredes de VI al inicio y al final del experimento. GPA: Grosor pared anterior; GPL: Grosor pared lateral; GPP: Grosor pared posterior; GTIV: Grosor tabique interventricular; d: Diástole. Los valores se representan como la media \pm DS. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

El doppler pulsado, continuo y color permite determinar el tipo del flujo (laminar o turbulento) así como medir su velocidad. Aunque de manera no cuantitativa, se valoró la funcionalidad de las válvulas cardíacas mediante esta técnica. En dos ocasiones se observó una ligera regurgitación mitral sin ningún efecto deletéreo a nivel hemodinámico.

Así pues, con el estudio ecocardiográfico pudimos concluir que a las 5 semanas post-infarto/reperfusión se observó de manera consistente un adelgazamiento de la pared anterior del VI y septo interventricular, sobre todo en los segmentos medioapicales; además se evidenció una disminución marcada de la función global sistólica ventricular izquierda.

5.4.3.3 Marcadores bioquímicos de necrosis miocárdica

Se tomaron muestras sanguíneas a los mismos tiempos que en el modelo agudo y además en la fase final del protocolo. Como cabía esperar, ya que estas enzimas son marcadores de necrosis tisular, los niveles plasmáticos tanto de Tn T como de CK-MB se vieron incrementados en la fase de isquemia e inmediata reperfusión para posteriormente descender hasta niveles basales a las 5 semanas (Figura 62).

MARCADORES BIOQUÍMICOS					
	Basal	60' Isq.	60' Repf.	120' Repf.	5 Semanas
Tn T	0,01±0	0,03±0,01*	0,4±0,1**	0,6±0,2**	0,003***
CK-MB	0,3±0,1	0,4±0,1	0,2±0,1	0,3±0,3	0,1±0,05

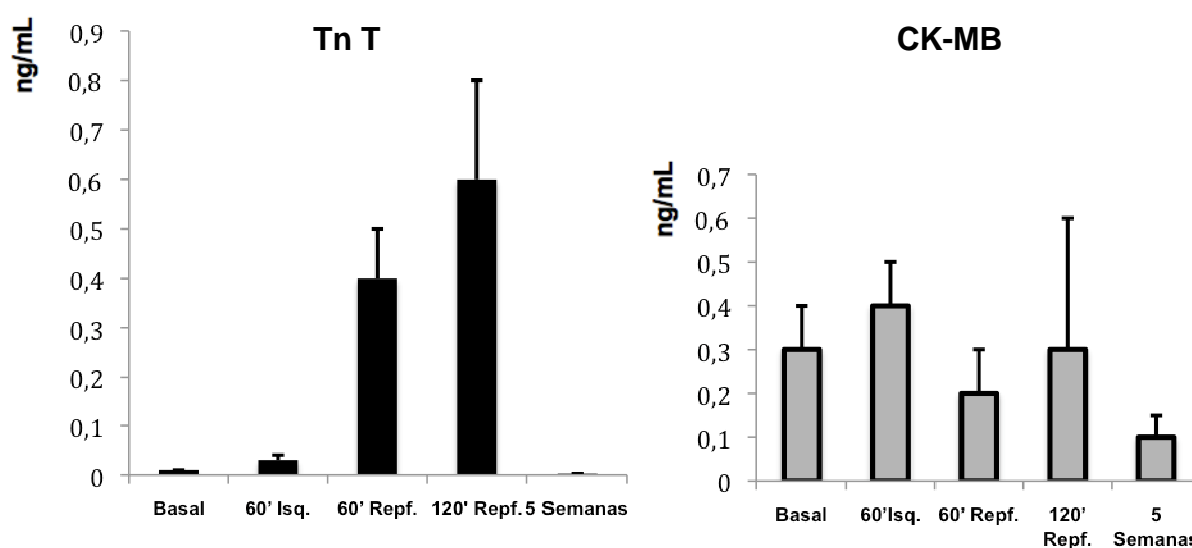


Figura 62. Datos obtenidos tanto para Tn T como CK-MB durante el protocolo experimental. A las 5 semanas el marcador en suero desciende a niveles normales. Comparación de los distintos tiempos con la situación basal. Los valores representan la media \pm DS. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.4.3.4 Valoración macroscópica de las adherencias pericárdicas

A las 5 semanas tras el infarto, se procedió a la apertura del tórax y evaluación del grado de adherencias.

Como control positivo se consideró el cierre del pericardio, ya que este proceso ha demostrado generar muchas adherencias en la especie humana. Como se observa en la Figura 63, nuestro control positivo generó las adherencias esperadas.

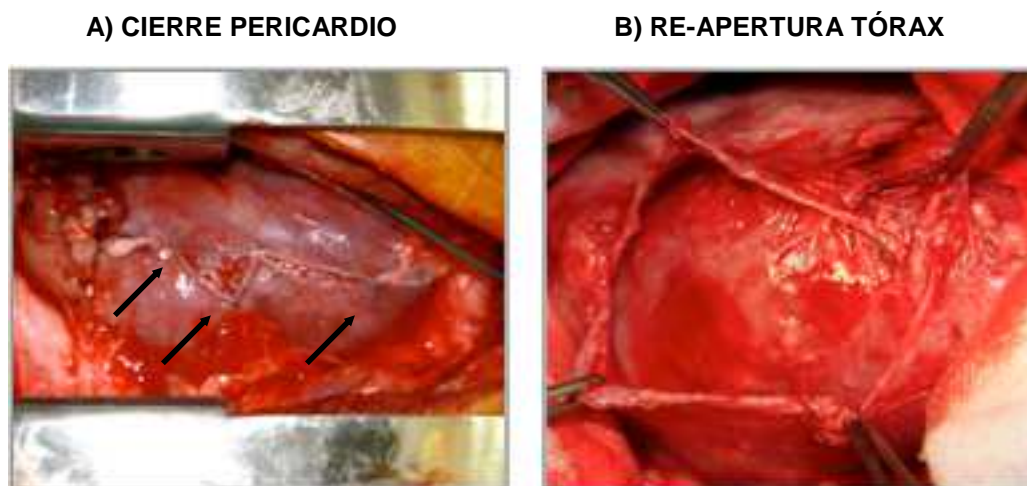


Figura 63. Control positivo. A) Final de la cirugía y cierre del pericardio con puntos sueltos con material monofilamento 6/0 (indicado con flechas). B) Apertura del tórax 5 semanas post-cirugía. El pericardio se ha abierto y se sujeta con pinzas. Su aspecto es fibroso y engrosado, a diferencia de la fina lámina transparente serosa que presentaba antes de la cirugía. Además, el epicardio se encuentra fibrosado y se ha perdido su estructura anatómica impidiendo la identificación de la irrigación coronaria.

En todos los casos se observaron grandes adherencias pericárdicas, con lo que consideramos que éste era un buen modelo para el estudio de la prevención de adherencias pericárdicas.

5.4.3.5 Estudio del remodelado ventricular

Una vez extraído el corazón, se realizaron 4 secciones para proceder a su fijación y posterior estudio histológico. En este caso, lo primero que se detectó fue el remodelado ventricular ocurrido tras el infarto realizado 5 semanas antes.

El tejido necrótico fue sustituido por tejido fibrótico cicatricial y la pared anterior del VI así como parte del TIV se encontraban muy adelgazadas. Por otra parte, la pared posterior del VI sufrió un aumento de grosor compensador (Figura 64).

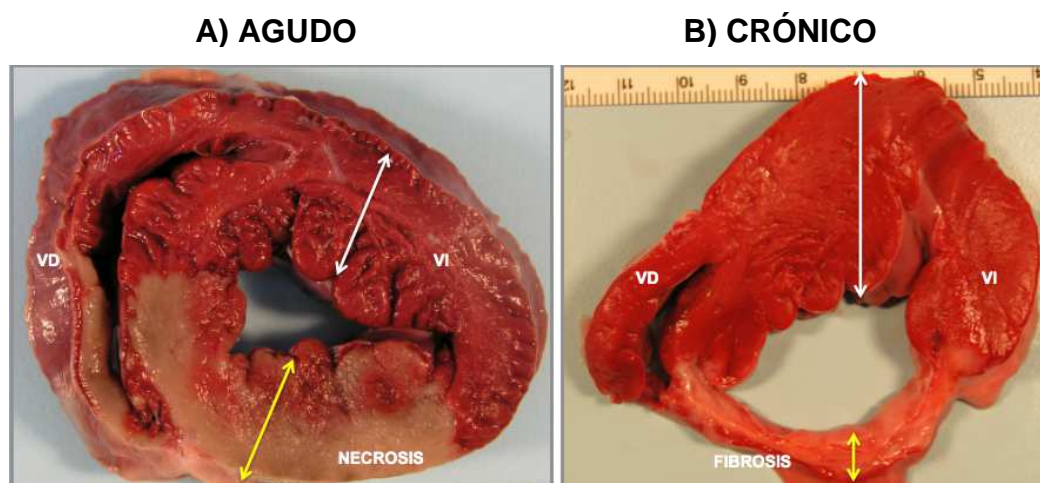


Figura 64. Imágenes macroscópicas de secciones de corazón. A) Representa una sección de un corazón al que se le ha realizado una isquemia de 60 minutos seguida de 2 horas de reperusión. La tinción de Tetrazolio delimita la zona necrótica del corazón (zona blanquecina), consecuencia de la isquemia sufrida. B) Imagen de una sección de corazón 5 semanas post-infarto. Se aprecia el gran adelgazamiento de la cara anterior del VI con engrosamiento de su cara posterior. Las flechas amarillas indican el grosor de la pared anterior del VI, mientras que las flechas blancas determinan el espesor de su pared posterior.

En la Tabla 12 se muestran los valores promedio del grosor en cada segmento del VI de cada sección (por ambas caras: superior (A) e inferior (B)) de los grupos de estudio (agudo y crónico sin biomaterial). Al comparar los datos obtenidos entre ambos modelos, se observaron diferencias significativas en los puntos correspondientes a la pared anterior del VI. En la pared posterior se produjo un engrosamiento significativo en varias secciones al compararlas con el modelo agudo.

MEDIDA GROSOR PAREDES VI AGUDO Vs CRÓNICO SIN BM				
	TIV	P. LAT. IZQ.	P. ANTERIOR	PARED POST.
Sección 1	15,9±0/10,2±7,6	10,7±0/5,4±3,6	8,1±0/4,8±1,6	11,8±0/8,7±5,6
Sección 2A	12,7±2,6/11,2±3,5	8,1±2,0/7,1±1,7	11,7±2,8/5,4±2,2**	10,4±1,7/14,1±4,4
Sección 2B	11,4±2,2/11,1±3,1	9,9±3,9/7,5±2,7	11,3±2,4/5,9±1,5**	10,6±1,3/14,1±10,2
Sección 3A	11,4±1,2/10,2±3,1	9,2±2,2/10,0±2,7	10,6±1,6/5,2±1,1***	10,5±2,6/16,7±7,3*
Sección 3B	11,4±1,8/10,3±4,0	9,4±2,1/10,3±2,1	11,4±2,8/6,8±1,2**	10,3±2,2/14,9±3,5*
Sección 4A	13,0±1,9/12,2±4,9	10,0±1,8/11,9±2,8	10,9±2,1/7,3±2,2**	11,6±2,5/14,9±3,0
Sección 4B	12,5±2,2/12,6±3,3	9,9±2,0/13,0±2,2*	10,1±2,6/6,9±1,2*	10,8±3,0/16,1±3,7*

Tabla 12. Tabla con los datos del grosor de pared del VI en el modelo agudo y en el modelo crónico sin BM. Se estudiaron las diferencias de grosor en cada punto entre ambas series. TIV: Tabique interventricular; Lat: Lateral; Izq: Izquierda; Post: Posterior; A: Cara superior de las secciones; B: Cara inferior de las secciones. Los valores representan la media ± DS. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

En la figura 65 se evidencia el remodelado ventricular producido en la serie crónica sin biomaterial 5 semanas después del infarto, con un marcado adelgazamiento en la pared anterior del VI, mientras en la pared posterior se observó un aumento de grosor.

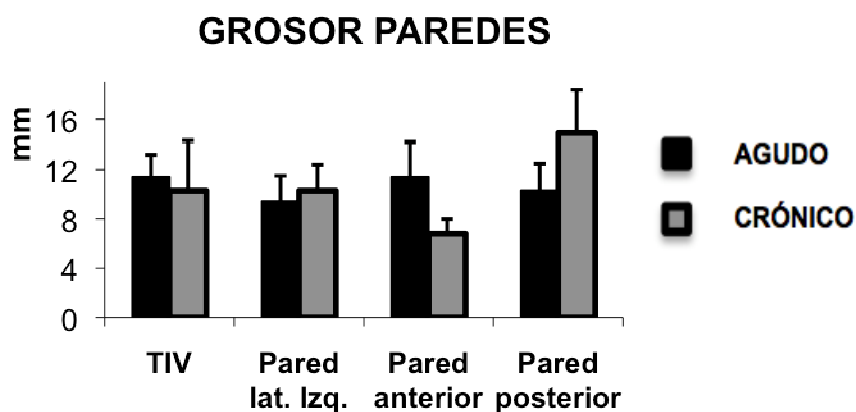


Figura 65. Gráfica en la que se compara los valores del grosor de la pared del VI de una sección del corazón (sección 3A) de la serie crónica sin biomaterial con respecto a la serie aguda.

Mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina observamos el tejido cicatricial correspondiente a la zona afectada por el infarto, confirmando la sustitución de tejido miocárdico por tejido fibrótico (Figura 66).

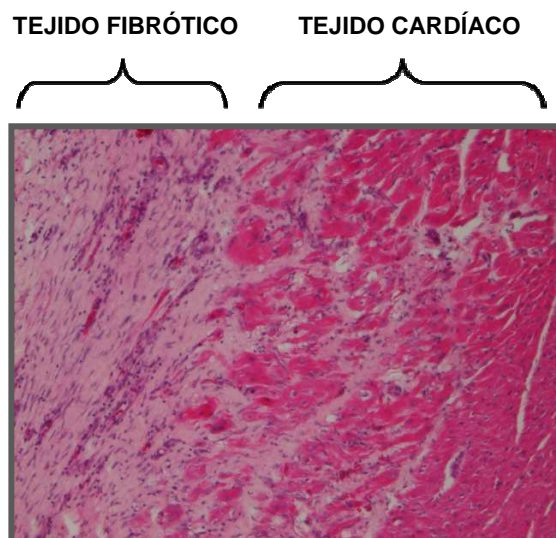


Figura 66. Imagen a 10 aumentos de una sección de corazón teñida con H-E. Esta región se corresponde a zona infartada (tejido fibrótico) y zona sana (tejido cardíaco). Como se trata de un modelo crónico en el que el IAM ocurrió hace 5 semanas el tejido necrótico ha sido sustituido por tejido fibroso.

5.4.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOMATERIALES PARA PREVENIR LA GENERACIÓN DE ADHERENCIAS PERICÁRDICAS

Una vez comprobado que el modelo crónico era adecuado para el estudio de las adherencias pericárdicas, se procedió a su utilización para evaluar el efecto de diferentes BM en la prevención de dichas adherencias. En este estudio (grupo crónico con biomaterial) se utilizaron 6 cerdos de las mismas características que el estudio anterior y el protocolo experimental fue el mismo, con la excepción de que tras la liberación de la arteria ocluida se procedió a la aplicación del biomaterial mediante puntos de sutura sueltos con monofilamento reabsorbible (prolene 6/0).

Los materiales utilizados fueron el colágeno y PVDF. El primero es de origen natural, y consiste en una malla de colágeno porcino deshidratado mientras que el PVDF se trata de un polímero artificial cuya síntesis se realizó por el método de la electrohilatura.

Se formaron 2 grupos con 3 animales por grupo. En el primero se aplicó el biomaterial de colágeno hidratado en suero salino fisiológico mientras que en el segundo se aplicó el biomaterial de PVDF.

Dado que no se encontraron diferencias significativas entre los dos biomateriales, todos los resultados que se muestran a continuación se comparan respecto al grupo crónico sin biomaterial.

5.4.4.1 Función cardíaca global

Se registraron de nuevo los siguientes parámetros de función cardíaca global: ECG, FC, PVI y dPdt. Los cambios en la función cardíaca global fueron similares a los acontecidos en el grupo del apartado anterior (crónicos sin biomaterial), indicando que aunque la aplicación del biomaterial no tuvo ningún efecto beneficioso en el remodelado ventricular tampoco afectó negativamente la función global del corazón (Tabla 13).

	FUNCIÓN CARDÍACA GLOBAL					
	Basal	30' Isq.	60' Isq.	30' Repf.	60' Repf.	5 Semanas
FC (lpm)	82,8±8,3	85,6±8,9	85,4±7,8	89±16	84±8,5	99,4±13
PsVI (mmHg)	60,21±2	54,2±8	53±7,6*	58,6±17	58,6±17	69,8±11,8
PTdVI (mmHg)	5,5±1,8	8,2±3,9	7,5±2,7	10±5,3	9,8±2	6,8±3,8
dP/dt+ (mmHg/sec.)	672,4±218	622,6-219	680,2±203	674,8±280	670,6±203	698,8±186
dP/dt- (mmHg/sec.)	-795±346	-704,4±289*	-699±301*	-766±496	-760±351	-977±338

Tabla 13. Datos de la función cardíaca global obtenidos tras un seguimiento de 5 semanas. Comparación de los distintos tiempos con la situación basal. Los valores representan la media ± DS (* $p < 0,05$).

5.4.4.2 Evaluación de la función cardíaca mediante ecocardiografía

Las imágenes ecocardiográficas tomadas mostraron diferencias no significativas en cuanto al remodelado ventricular y disminución de la contractilidad respecto al grupo anterior (crónico sin biomaterial). Se observó un ligero empeoramiento tanto de la fracción de acortamiento como de la fracción de eyección con respecto a la serie anterior (Figura 67).

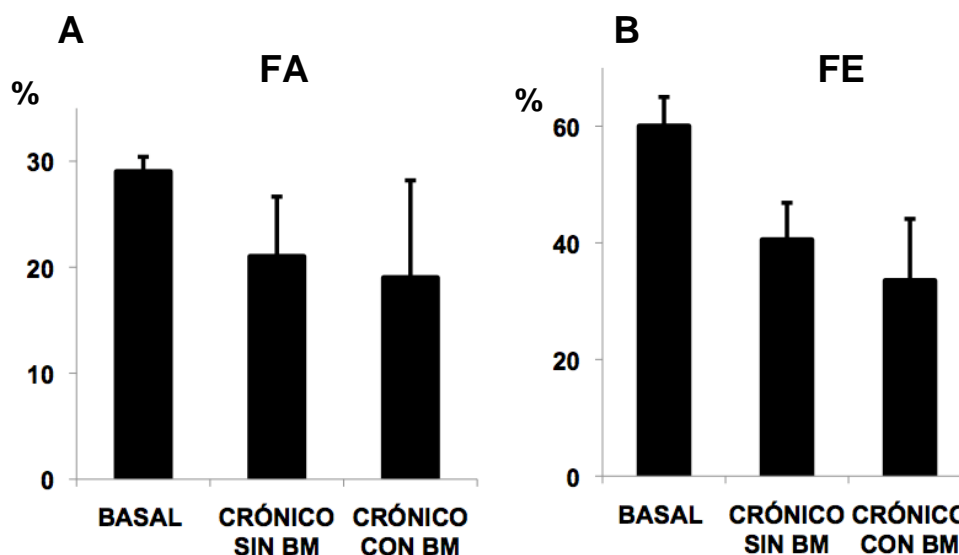


Figura 67. Análisis de la función del ventrículo izquierdo mediante los parámetros de fracción de acortamiento y fracción de eyección (A y B respectivamente). Las gráficas muestran los valores para los dos grupos (crónico sin y con biomaterial) y en ambos se observa un descenso de los parámetros respecto a la situación basal. Los valores representan la media \pm DS.

De nuevo se realizó la medida de los grosores de las paredes para evaluar el remodelado ventricular producido.

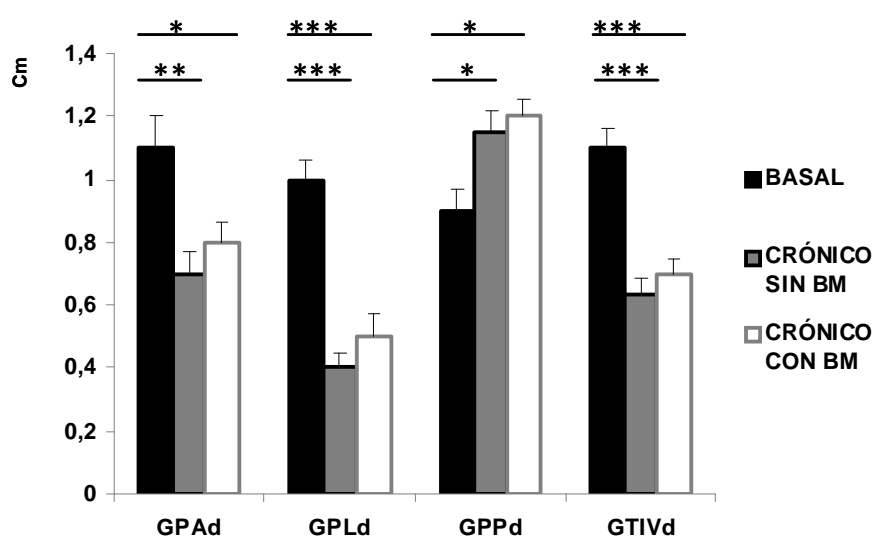


Figura 68. Grosor de las paredes a tiempo basal y al final del experimento. Comparación de los valores de los dos grupos (crónico con y sin biomaterial) respecto a la situación basal. GPA: Grosor pared anterior; GPL: Grosor pared lateral; GPP: Grosor pared posterior; GTIV: Grosor tabique interventricular; d: Diástole. Los valores representan la media \pm DS. (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

Tal y como se muestra en la Figura 68, no se produjeron diferencias significativas derivadas de la aplicación de los biomateriales con respecto al grupo crónico sin biomaterial.

Con todos estos datos pudimos concluir que los BM empleados no tuvieron un efecto de prevención del remodelado ventricular consecuencia del infarto.

5.4.4.3 Marcadores bioquímicos de necrosis miocárdica

Los valores bioquímicos obtenidos tanto para la Tn T como para la CK-MB durante todas las fases del estudio fueron similares al grupo crónico sin biomaterial, indicando así que el BM no promovía mayor necrosis a lo largo del tiempo (Tabla 14).

MARCADORES BIOQUÍMICOS					
	Basal	60' Isq.	60' Repf.	120' Repf.	5 Semanas
Tn T	0,01±0	0,04±0,02*	0,5±0,1**	0,7±0,01**	0,004***
CK-MB	0,3±0,1	0,4±0,2	0,2±0,1	0,3±0,3	---

Tabla 14. Valores séricos de marcadores de necrosis miocárdica en el estudio de prevención de adherencias. Comparación de los valores en los distintos tiempos respecto a la situación basal. Los valores representan la media ± DS. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.4.4.4 Valoración macroscópica de las adherencias pericárdicas

Pasado el tiempo experimental procedimos a reintervenir al animal para evaluar el grado de adherencias presentes con ambos biomateriales. En la Figura 69 podemos observar las diferencias macroscópicas entre el colágeno y PVDF tanto el día de su implantación como al final del experimento.

Ni el colágeno ni el PVDF consiguieron minimizar las adherencias producidas de manera sistemática tras la esternotomía. La diferencia entre ambos fue que en el caso del colágeno el material se reabsorbió en gran medida aunque no totalmente; en cambio el PVDF permaneció sin reabsorberse durante el tiempo del estudio y en todos los casos apareció recubierto de tejido fibroso y engrosado, con presencia de adherencias por ambas caras, indicando una reacción de tipo cuerpo extraño.

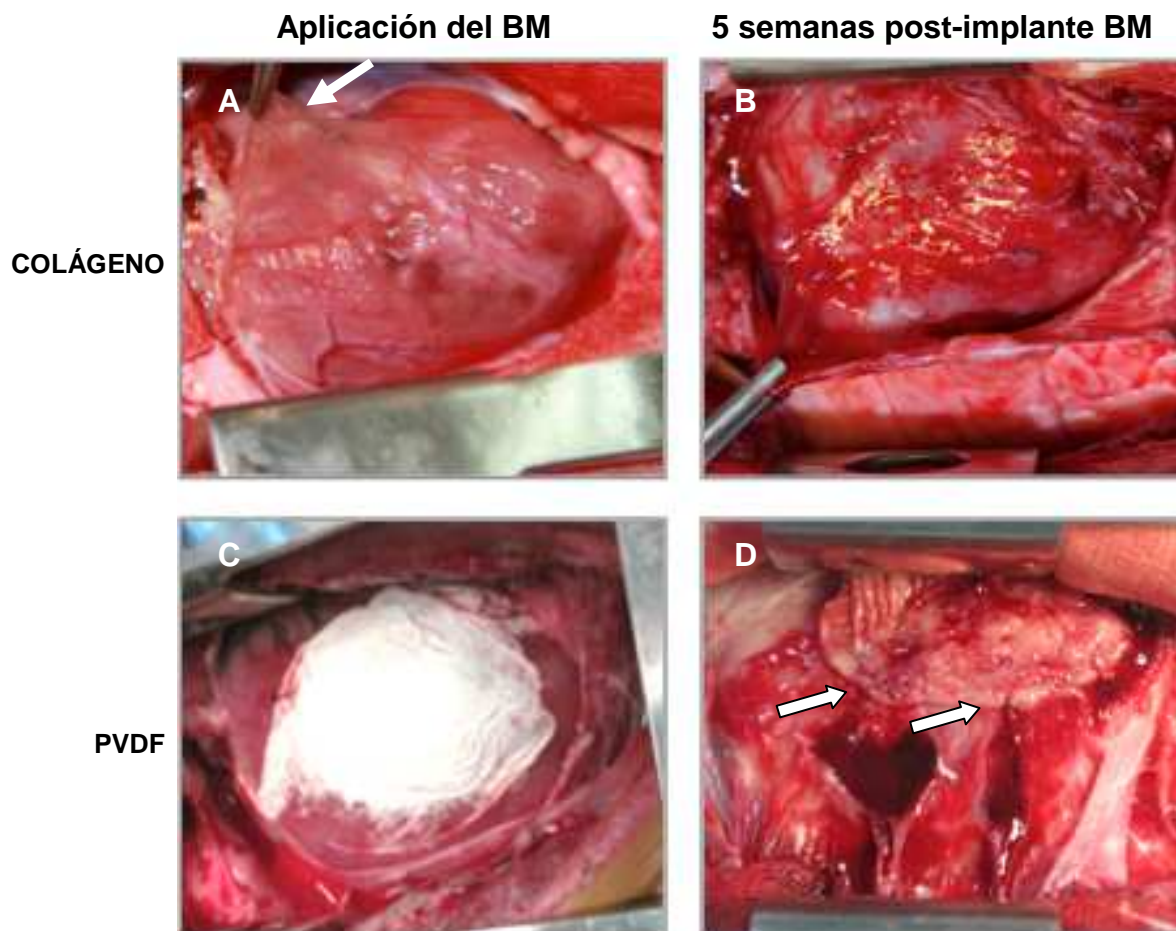


Figura 69. Aspecto macroscópico del corazón en el momento de la cirugía y 5 semanas post-cirugía. A) Aplicación del BM de colágeno. B) Aspecto del corazón 5 semanas post-cirugía. Se observan grandes adherencias, sin embargo macroscópicamente no se identifica la presencia del BM de colágeno. C) Aplicación del BM de PVDF al comienzo del protocolo experimental. D) Aspecto macroscópico del corazón al final de tiempo experimental. De nuevo aparecen adherencias importantes. En este caso se aprecia claramente la presencia del biomaterial (el cual presenta adherencias por su cara interna con el epicardio y en su lado externo con el esternón).

5.4.4.5 Estudio del remodelado ventricular

Al igual que con el grupo crónico sin biomaterial, tras la eutanasia se procedió al estudio histológico. Se realizó la medición de las diferentes secciones por ambos lados. Los resultados fueron similares a los descritos en el grupo anterior (Tabla 15), indicando que los cambios observados en el remodelado ventricular no son dependientes de la aplicación de ninguno de los biomateriales estudiados.

MEDIDA GROSOR PAREDES VI AGUDO vs CRÓNICO CON BM				
	TIV	P. LAT. IZQ.	P. ANTERIOR	P. POSTERIOR
Sección 1	10,2±7,6/13,1±9,2	5,4±3,6/7,8±5	4,8±1,6/6,2±3,7	8,7±5,6/9,1±4,6
Sección 2A	11,2±3,5/10,9±2,6	7,1±1,7/8±1,6	5,4±2,2/6±5,2	14,1±4,4/15,53*
Sección 2B	11,1±3,1/10,1±3,5	7,5±2,7/7,2±3,4	5,9±1,5/5,3±12,1	14,1±10,2/13,5±8,2
Sección 3A	10,2±3,1/11,6±4,7	10,0±2,7/9,7±5,7	5,2±1,1/5±0,7	16,7±7,3/15,9±6*
Sección 3B	10,3±4,0/12,5±2,7	10,3±2,1/12±1,6*	6,8±1,2/8±2,7	14,9±3,5/12,1±4*
Sección 4A	12,2±4,9/14,1±5,1	11,9±2,8/12,8±4,7	7,3±2,2/8.3±5,1	14,9±3,0/13±2,1
Sección 4B	12,6±3,3/11,8±2,3	13,0±2,2/12,6±3,6*	6,9±1,2/7,7±2,5	16,1±3,7/14,2±3*

Tabla 15. Tabla con los datos del grosor de pared de VI en el modelo agudo frente al modelo crónico con biomaterial. Los valores representan la media \pm DS. (* $p < 0,05$).

Con respecto al estudio histológico, mediante tinción de Hematoxilina-Eosina se observó gran infiltrado inflamatorio en ambos casos; aunque la reacción del organismo frente a los BM fue diferente.

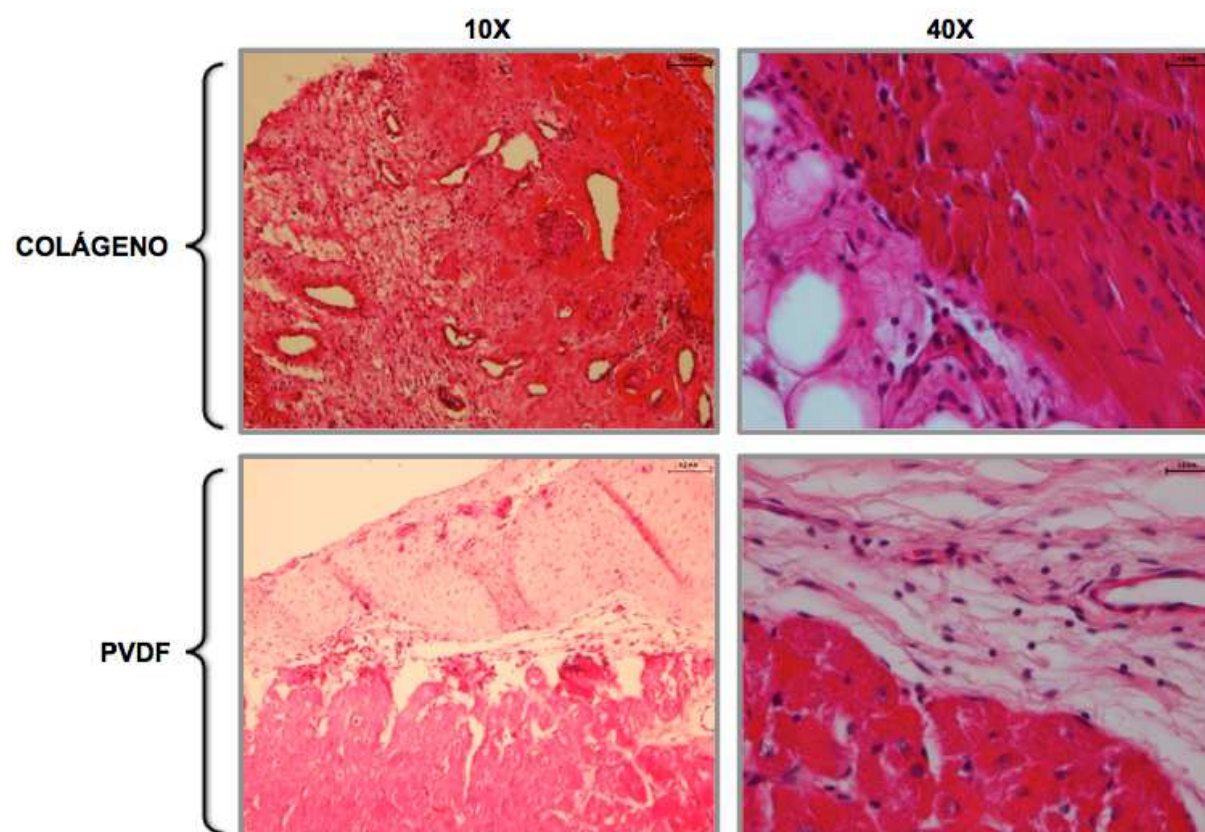


Figura 70. Secciones de corazón teñidas con H-E y fotografiadas a diferentes aumentos. Se observa cómo el colágeno se encuentra integrado con el tejido cardíaco, mientras que el PVDF ha provocado una reacción de cuerpo extraño. Ambos biomateriales están infiltrados con células inflamatorias.

En el caso del colágeno, a nivel macroscópico no se pudo apreciar su presencia; sin embargo, bajo microscopio se pudo identificar el BM bien integrado con el tejido cardíaco con un gran infiltrado inflamatorio. En cuanto al PVDF, macroscópicamente se distinguió perfectamente y al microscopio óptico se observó que no estaba integrado con el corazón, sino que se apreciaba claramente una línea de separación y al igual que ocurrió con el colágeno estaba embebido de células inflamatorias (Figura 70).

Aunque ninguno de estos dos biomateriales estudiados consiguió el objetivo de prevención de adherencias pericárdicas, en el laboratorio seguiremos estudiando nuevos biomateriales, algunos de ellos con capacidad de liberar sustancias que favorezcan tanto la prevención de adherencias como la protección/repación del tejido miocárdico.



ANEXOS

6. ANEXOS

6.1: MICROARRAYS

Identificación de procesos biológicos aumentados en MSC-IL-1 β . Los incrementos se calcularon entre 2 condiciones experimentales como logaritmo en base 2 de transformación del ratio entre MSC y MSC tratadas con IL-1 β . Se indican el nombre sistemático, el símbolo génico y la descripción de los genes con cambios significativos. Los valores negativos del *fold change* (Fc) indican sobre-expresión en MSC-IL-1 β .

Blood Coagulation (GO:0007596)				
Systematic Name	Probe Name	Gene Symbol	Description	Fc
NM_001993	A_23_P126782	F3	Coagulation factor III	-1.32
AF118092	A_24_P359491	AF118092	PRO2061	-0.96
ENST00000248076	A_24_P228470	PAR4	Protease-activated receptor 4	-0.83
ENST00000222543	A_24_P95070		cDNA FLJ26323 fis	-0.76
NM_000675	A_23_P109436	ADORA2A	Adenosine A2a receptor	-0.76
J02940	A_23_P152926	GP1BA	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	-0.69
NM_005242	A_23_P58835	F2RL1	Coagulation factor II	-0.55
NM_000641	A_23_P67169	IL11	Interleukin 11	-0.34
NM_000312	A_23_P40096	PROC	Protein C	-0.32
NM_000602	A_24_P158089	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor	-0.30
NM_000488	A_23_P114626	SERPINC1	Serpin peptidase inhibitor	-0.27
NM_000361	A_23_P91390	THBD	Thrombomodulin	-0.27
NM_006528	A_23_P393620	TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	-0.22
NM_000212	A_23_P38519	ITGB3	Integrin-beta 3	-0.21
Cell Adhesion (GO:0007155)				
Systematic Name	Probe Name	Gene Symbol	Description	Fc
NM_000584	A_32_P87013	IL8	Interleukin 8	-2.61
NM_000450	A_23_P97112	SELE	Selectin E	-1.67
NM_002985	A_23_P152838	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	-1.34
NM_021101	A_23_P57784	CLDN1	Claudin 1	-1.12
NM_004967	A_23_P144549	IBSP	Integrin-binding sialoprotein	-0.97
NM_144492	A_23_P91512	CLDN14	Claudin 14	-0.95
NM_000594	A_23_P376488	TNF	Tumor necrosis factor	-0.93
NM_002996	A_24_P381901	CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif)	-0.87
NM_003734	A_23_P426305	AOC3	Amine oxidase	-0.83
NM_000201	A_23_P153320	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	-0.81
J02940	A_23_P152926	GP1BA	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	-0.69
NM_004062	A_23_P100240	CDH16	Cadherin 16 KSP-cadherin	-0.68
NM_018534	A_23_P429555	NRP2	Neuropilin 2	-0.66
NM_000425	A_24_P207995	L1CAM	L1 cell adhesion molecule	-0.66
NM_002982	A_23_P89431	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	-0.60
NM_016369	A_23_P336693	CLDN18	Claudin 18	-0.59
NM_023068	A_23_P17481	SIGLEC1	Sialic acid binding Ig-like lectin 1	-0.53
NM_001078	A_23_P34345	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	-0.53
NM_013280	A_23_P47168	FLRT1	Fibronectin leucine rich transmembrane protein 1	-0.52
NM_001523	A_23_P27400	HAS1	Hyaluronan synthase 1	-0.51

NM_007115	A_23_P165624	TNFAIP6	TNF alpha-induced protein 6	-0.50
NM_014470	A_23_P53370	RND1	Rho family GTPase 1	-0.50
NM_201266	A_23_P209669	NRP2	Neuropilin 2	-0.45
NM_004613	A_32_P86763	TGM2	Transglutaminase 2	-0.40
NM_138938	A_23_P119936	REG3A	Regenerating islet-derived 3 alpha	-0.39
NM_002589	A_23_P310921	PCDH7	BH-protocadherin	-0.38
NM_002986	A_23_P66635	CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	-0.38
NM_033100	A_23_P149946	PCDH21	Protocadherin 21	-0.37
NM_005725	A_23_P201193	TSPAN2	Tetraspanin 2	-0.36
NM_006403	A_23_P344555	NEDD9	Neural precursor cell expressed	-0.35
NM_003152	A_23_P207367	STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5A	-0.32
NM_000346	A_23_P26847	SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9	-0.31
NM_002984	A_23_P207564	CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	-0.30
AK074780	A_24_P376150	ROBO2	cDNA FLJ90299 fis, clone NT2RP2000514	-0.29
AF193046	A_24_P921436	FBN2	PP187	-0.29
NM_001305	A_24_P115183	CLDN4	Claudin 4	-0.28
NM_018891	A_23_P160968	LAMC2	Laminin. gamma 2	-0.27
NM_001203	A_24_P63380	BMPR1B	Bone morphogenetic protein receptor type IB	-0.27
NM_004148	A_23_P169137	NINJ1	Ninjurin 1	-0.26
NM_006727	A_23_P144656	CDH10	Cadherin 10 type 2 (T2-cadherin)	-0.25
NM_005353	A_23_P129665	ITGAD	Integrin-alpha D	-0.25
NM_181861	A_23_P36611	APAF1	Apoptotic peptidase activating factor	-0.23
NM_201264	A_24_P50801	NRP2	Neuropilin 2	-0.23
NM_016242	A_23_P382065	EMCN	Endomucin	-0.22
NM_181847	A_23_P14083	AMIGO2	Adhesion molecule with Ig-like domain 2	-0.21
NM_003277	A_23_P6321	CLDN5	Claudin 5	-0.21
NM_020815	A_23_P170238	PCDH10	Protocadherin 10	-0.21
NM_000212	A_23_P38519	ITGB3	Integrin. beta 3	-0.21
NM_001544	A_23_P130537	ICAM4	Intercellular adhesion molecule 4	-0.21
NM_080792	A_23_P210708	SIRPA	Signal-regulatory protein alpha	-0.20
NM_000330	A_23_P148292	RS1	Retinoschisis (X-linked. juvenile) 1	-0.20
A_24_P927917	A_24_P927917	A_24_P927917	Unknown	-0.20
NM_005562	A_23_P201636	LAMC2	Laminin gamma 2	-0.19
NM_006769	A_23_P380181	LMO4	LIM domain only 4	-0.18
NM_005201	A_23_P211699	CCR8	Chemokine (C-C motif) receptor 8	-0.18
AJ008005	A_23_P106174	PSEN1	PSN1 gene. alternative transcript	-0.18
BC002828	A_24_P256513	AGGF1	Angiogenic factor with G patch and FHA domains 1	-0.17
NM_003259	A_23_P119143	ICAM5	Intercellular adhesion molecule 5	-0.17
NM_198951	A_24_P923251	TGM2	Transglutaminase 2	-0.17
NM_152750	A_23_P348253	FLJ23834	Hypothetical protein FLJ23834	-0.15
NM_014718	A_23_P53724	CLSTN3	Calsyntenin 3	-0.15
NM_001772	A_24_P301655	CD33	CD33 molecule	-0.15
NM_005985	A_23_P131846	SNAI1	Snail homolog 1	-0.15
NM_152733	A_32_P113566	BTBD9	BTB (POZ) domain containing 9	-0.15
A_32_P1076	A_32_P1076	A_32_P1076	Unknown	-0.15
NM_013994	A_24_P123601	DDR1	Discoidin domain receptor family. member 1	-0.14
NM_004572	A_23_P162466	PKP2	Plakophilin 2	-0.14
NM_019863	A_23_P217643	F8	Coagulation factor VIII	-0.14

NM_014751	A_23_P347632	MTSS1	Metastasis suppressor 1	-0.14
NM_021155	A_24_P305345	CD209	CD209 molecule	-0.14
NM_012129	A_23_P157268	CLDN12	Claudin 12	-0.13
NM_138931	A_23_P57856	BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6	-0.13
XM_942822	A_32_P703	LOC646626	Hypothetical protein LOC647393	-0.13
NM_003506	A_23_P123276	FZD6	Frizzled homolog 6	-0.13
NM_001943	A_23_P141730	DSG2	Desmoglein 2	-0.13
NM_004407	A_23_P133153	DMP1	Dentin matrix acidic phosphoprotein	-0.13
NM_000632	A_23_P124108	ITGAM	Integrin. alpha M	-0.13
NM_020882	A_32_P185637	COL20A1	Collagen. type XX alpha 1	-0.13
NM_198148	A_23_P138524	CPXM2	Carboxypeptidase X	-0.13
A_32_P215745	A_32_P215745	A_32_P215745	Unknown	-0.13
NM_002716	A_24_P98762	PPP2R1B	Protein phosphatase 2	-0.12
NM_002214	A_24_P273599	ITGB8	Integrin beta 8	-0.12
NM_014442	A_24_P40001	SIGLEC8	Sialic acid binding Ig-like lectin 8	-0.12
NM_007314	A_23_P138099	ABL2	V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2	-0.12
NM_005157	A_24_P281101	ABL1	V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	-0.12
NM_005168	A_23_P142849	RND3	Rho family GTPase 3	-0.11
NM_014479	A_23_P256425	ADAMDEC1	ADAM-like. decysin 1	-0.11
NM_001779	A_23_P138308	CD58	CD58 molecule	-0.11
BC020868	A_24_P342178	STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B	-0.11
NM_006725	A_23_P139162	CD6	CD6 molecule	-0.10
NM_024690	A_23_P5211	MUC16	Mucin 16. cell surface associated	-0.10
NM_001337	A_23_P407565	CX3CR1	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	-0.10
NM_001663	A_23_P48691	ARF6	ADP-ribosylation factor 6	-0.10
NM_003830	A_23_P15995	SIGLEC5	Sialic acid binding Ig-like lectin 5	-0.10
NM_005245	A_23_P69586	FAT	FAT tumor suppressor homolog 1	-0.09
NM_004762	A_23_P83781	PSCD1	Pleckstrin homology. Sec7 and coiled-coil domains 1	-0.09
NM_016639	A_23_P49338	TNFRSF12A	Tumor necrosis factor receptor superfamily	-0.09
NM_152403	A_23_P144911	FLJ39155	Hypothetical protein FLJ39155	-0.09
NM_002160	A_23_P157865	TNC	Tenascin C	-0.09
NM_003921	A_23_P115286	BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	-0.09
NM_173670	A_24_P363100	RGMB	RGM domain family. member B	-0.09
NM_004386	A_23_P153797	CSPG3	Chondroitin sulfate proteoglycan 3	-0.09
NM_012448	A_23_P100788	STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B	-0.08
NM_012192	A_23_P127851	FXC1	Fracture callus 1 homolog	-0.08
NM_021181	A_24_P353638	SLAMF7	SLAM family member 7	-0.08
NM_145351	A_23_P15414	SCARF1	Scavenger receptor class F. member 1	-0.08
NM_152888	A_32_P405759	COL22A1	Collagen. type XXII alpha 1	-0.07
NM_148960	A_23_P379054	CLDN19	Claudin 19	-0.07
NM_005228	A_23_P215790	EGFR	Epidermal growth factor receptor	-0.07
NM_003285	A_23_P45864	TNR	Tenascin R	-0.07
NM_016580	A_23_P423309	PCDH12	Protocadherin 12	-0.07
NM_021219	A_23_P120667	JAM2	Junctional adhesion molecule 2	-0.07
NM_004040	A_23_P51136	RHOB	Ras homolog gene family member B	-0.07
NM_001400	A_23_P404481	EDG1	Endothelial differentiation	-0.07
NM_016952	A_23_P98335	CDON	Cdon homolog	-0.07
NM_006149	A_23_P254917	LGALS4	Lectin. galactoside-binding soluble 4	-0.07

NM_003882	A_23_P354694	WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	-0.06
NM_016184	A_23_P48029	CLEC4A	C-type lectin domain family 4 member A	-0.06
NM_000494	A_23_P52323	COL17A1	Collagen. type XVII Alpha 1	-0.06
NM_032011	A_24_P334529	PCDHGA3	Protocadherin gamma subfamily A3	-0.06
NM_007261	A_23_P207037	CD300A	CD300a molecule	-0.06
NM_024814	A_23_P146004	CBLL1	Cas-Br-M ecotropic retroviral transforming sequence-like 1	-0.06
NM_018935	A_23_P121851	PCDHB15	Protocadherin beta 15	-0.06
NM_002855	A_24_P50890	PVRL1	Poliovirus receptor-related 1	-0.06
Chemotaxis (GO:0006935)				
Systematic Name	Probe Name	Gene Symbol	Description	Fc
NM_000584	A_32_P87013	IL8	Interleukin 8	-2.61
NM_001565	A_24_P303091	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-2.26
NM_004591	A_23_P17065	CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	-2.22
NM_000576	A_23_P79518	IL1B	Interleukin 1beta	-2.13
NM_000575	A_23_P72096	IL1A	Interleukin 1alpha	-1.62
NM_002993	A_23_P155755	CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6	-1.59
NM_005623	A_23_P207456	CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	-1.57
NM_002985	A_23_P152838	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	-1.34
NM_002089	A_23_P315364	CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-1.32
NM_006273	A_23_P78037	CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	-1.26
NM_005409	A_24_P20607	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	-1.11
NM_001511	A_23_P7144	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-1.00
NM_002090	A_24_P183150	CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-0.97
Defense Response (GO:0006952)				
Systematic Name	Probe Name	Gene Symbol	Description	Fc
NM_000584	A_32_P87013	IL8	Interleukin 8	-2.61
NM_000758	A_23_P133408	CSF2	Colony stimulating factor 2	-2.27
NM_001565	A_24_P303091	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-2.26
NM_004591	A_23_P17065	CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	-2.22
NM_000576	A_23_P79518	IL1B	Interleukin 1beta	-2.13
NM_022162	A_23_P420863	CARD15	Caspase recruitment domain family. member 15	-1.69
NM_000450	A_23_P97112	SELE	Selectin E	-1.67
NM_000575	A_23_P72096	IL1A	Interleukin 1alpha	-1.62
NM_002993	A_23_P155755	CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6	-1.59
NM_005623	A_23_P207456	CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	-1.57
NM_000759	A_23_P501754	CSF3	Colony stimulating factor 3	-1.41
NM_003785	A_24_P314337	PAGE1	P antigen family member 1	-1.37
NM_002985	A_23_P152838	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	-1.34
NM_002089	A_23_P315364	CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-1.32
NM_001432	A_23_P41344	EREG	Epiregulin	-1.32
NM_006273	A_23_P78037	CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	-1.26
NM_030956	A_23_P33420	TLR10	Toll-like receptor 10	-1.17
NM_003264	A_23_P92499	TLR2	Toll-like receptor 2	-1.12
NM_005409	A_24_P20607	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	-1.11
NM_014589	A_23_P114857	PLA2G2E	Phospholipase A2 group IIE	-1.08
NM_001511	A_23_P7144	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-1.00
NM_002090	A_24_P183150	CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-0.97

NM_000594	A_23_P376488	TNF	Tumor necrosis factor	-0.93
NM_001570	A_23_P80635	IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	-0.90
NM_002176	A_23_P71774	IFNB1	Interferon. beta 1. fibroblast	-0.90
NM_000963	A_24_P250922	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	-0.88
NM_002996	A_24_P381901	CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	-0.87
NM_003734	A_23_P426305	AOC3	Amine oxidase. copper containing 3	-0.83
NM_000600	A_23_P71037	IL6	Interleukin 6	-0.79
NM_005894	A_23_P126584	CD5L	CD5 molecule-like	-0.78
NM_000675	A_23_P109436	ADORA2A	Adenosine A2a receptor	-0.76
NM_002983	A_23_P373017	CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	-0.76
NM_004233	A_23_P70670	CD83	CD83 molecule	-0.76
NM_003182	A_23_P215283	TAC1	Tachykinin. precursor 1	-0.70
NM_006737	A_23_P101636	KIR3DL2	Killer cell immunoglobulin-like receptor	-0.70
NM_001200	A_23_P143331	BMP2	Bone morphogenetic protein 2	-0.60
NM_002982	A_23_P89431	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	-0.60
NM_016584	A_23_P76078	IL23A	Interleukin 23 alpha subunit p19	-0.58
NM_002704	A_23_P121596	PPBP	Pro-platelet basic protein	-0.55
NM_001001437	A_23_P321920	CCL3L3	Chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	-0.53
NM_023068	A_23_P17481	SIGLEC1	Sialic acid binding Ig-like lectin 1	-0.53
NM_172140	A_23_P337800	IL29	Interleukin 29	-0.53
NM_007115	A_23_P165624	TNFAIP6	Tumor necrosis factor	-0.50
NM_002994	A_23_P110204	CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-0.48
NM_004843	A_23_P27606	IL27RA	Interleukin 27 receptor	-0.45
NM_080869	A_23_P68436	WFDC12	WAP four-disulfide core domain 12	-0.42
NM_004244	A_23_P33723	CD163	CD163 molecule	-0.41
NM_138938	A_23_P119936	REG3A	Regenerating islet-derived 3 alpha	-0.39
NM_001066	A_24_P54174	TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily	-0.39
NM_058176	A_23_P215577	HDAC9	Histone deacetylase 9	-0.39
NM_001805	A_23_P2990	CEBPE	CCAAT/enhancer binding protein	-0.38
NM_000397	A_23_P217258	CYBB	Cytochrome b-245 beta polypeptide	-0.38
NM_014707	A_23_P404162	HDAC9	Histone deacetylase 9	-0.38
NM_000710	A_23_P128744	BDKRB1	Bradykinin receptor B1	-0.38
NM_002986	A_23_P66635	CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	-0.38
NM_000064	A_23_P101407	C3	Complement component 3	-0.37
NM_005408	A_24_P125335	CCL13	Chemokine (C-C motif) ligand 13	-0.35
NM_176891	A_23_P302060	IFNE1	Interferon epsilon 1	-0.35
NM_003998	A_23_P30024	NFKB1	Nuclear factor of kappa B-cells 1	-0.35
I-kappaB kinase_NF-kappaB cascade (GO:0007249)				
Systematic Name	Probe Name	Gene Symbol	Description	Fc
NM_022162	A_23_P420863	CARD15	Caspase recruitment domain family	-1.69
NM_003807	A_24_P237036	TNFSF14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily	-1.06
NM_000594	A_23_P376488	TNF	Tumor necrosis factor	-0.93
NM_001570	A_23_P80635	IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	-0.90
NM_006290	A_24_P157926	TNFAIP3	Tumor necrosis factor. alpha-induced protein 3	-0.85
NM_002908	A_23_P56938	REL	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog	-0.59
NM_020529	A_23_P106002	NFKBIA	Nuclear factor of kappa B-cells inhibitor	-0.37
NM_003821	A_23_P252106	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine	-0.30

			kinase 2	
AF009616	A_23_P209394	CFLAR	FLAME-1	-0.29
NM_000572	A_23_P126735	IL10	Interleukin 10	-0.25
NM_005178	A_23_P4662	BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3	-0.25
NM_003879	A_24_P120115	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	-0.23
NM_006622	A_23_P30254	PLK2	Polo-like kinase 2	-0.19
NM_001250	A_23_P57036	CD40	CD40 molecule TNF receptor superfamily	-0.17
NM_004862	A_23_P3532	LITAF	Lipopolysaccharide-induced TNF factor	-0.16
NM_014002	A_23_P887	IKBKE	Inhibitor of kappa B-cells	-0.15
NM_001278	A_23_P46748	CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	-0.15
NM_004310	A_23_P58132	RHOH	Ras homolog gene family member H	-0.15
NM_182919	A_23_P90311	TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1	-0.14
NM_021138	A_23_P169331	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	-0.13
XM_942822	A_32_P703	LOC646626	Hypothetical protein LOC647393	-0.13
NM_003842	A_24_P218265	TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily	-0.13
NM_003804	A_23_P370005	RIPK1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	-0.12
NM_001166	A_24_P115774	BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	-0.12
BC014095	A_23_P104689	RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A	-0.11
NM_003921	A_23_P115286	BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	-0.09
NM_054014	A_23_P397238	FKBP1A	FK506 binding protein 1A. 12kDa	-0.06
NM_016072	A_23_P162425	GOLT1B	Golgi transport 1 homolog B	-0.06
NM_015093	A_23_P19702	MAP3K7IP2	Mitogen-activated protein kinase	-0.06
NM_003900	A_23_P81399	SQSTM1	Sequestosome 1	-0.06
NM_133484	A_24_P257108	TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	-0.05
NM_000639	A_23_P369815	FASLG	Fas ligand	-0.05
NM_153719	A_24_P322444	NUP62	Nucleoporin 62kDa	-0.05
NM_020205	A_23_P138157	OTUD7B	OTU domain containing 7B	-0.05
NM_145803	A_23_P75921	TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	-0.05
NM_016463	A_24_P930062	CXXC5	CXXC finger 5	-0.05
NM_014397	A_23_P216920	NEK6	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 6	-0.04
NM_057159	A_23_P502879	EDG2	Endothelial differentiation	-0.04
NM_003348	A_23_P116829	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N	-0.04
NM_138554	A_23_P60306	TLR4	Toll-like receptor 4	-0.04
NM_138793	A_23_P26759	CANT1	Calcium activated nucleotidase 1	-0.04
NM_032415	A_23_P82324	CARD11	Caspase recruitment domain family	-0.04
NM_006355	A_23_P93236	TRIM38	Tripartite motif-containing 38	-0.04
NM_005415	A_23_P165657	SLC20A1	Solute carrier family 20 (phosphate transporter)	-0.04
NM_006070	A_23_P29517	TFG	TRK-fused gene	-0.03
NM_004180	A_23_P154306	TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	-0.03
NM_014550	A_23_P434890	CARD10	Caspase recruitment domain family	-0.03
NM_019028	A_23_P13065	ZDHHC13	Zinc finger DHHC-type containing 13	-0.02
AK090431	A_23_P340019	NOD3		-0.02
NM_016334	A_23_P1056	GPR89A	G protein-coupled receptor 89A	-0.02
NM_003824	A_24_P278637	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	-0.02
NM_002468	A_23_P362659	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene	-0.02

A_24_P375932	A_24_P375932	A_24_P375932	Unknown	-0.02
NM_007315	A_23_P56630	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	-0.02
NM_178844	A_23_P329399	NOD3	NOD3 protein	-0.02
AK074557	A_24_P297827	TMED4	cDNA FLJ90076 fis	-0.02
NM_020644	A_23_P162087	TMEM9B	TMEM9 domain family	-0.01
NM_203505	A_24_P128977	G3BP2	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding	-0.01
NM_004619	A_23_P201731	TRAF5	TNF receptor-associated factor 5	-0.01
NM_024544	A_23_P200598	C1orf166	Chromosome 1 open reading frame 166	-0.01
NM_003265	A_23_P29922	TLR3	Toll-like receptor 3	-0.01
NM_002133	A_23_P120883	HMOX1	Heme oxygenase	-0.01
A_32_P148636	A_32_P148636	A_32_P148636	Unknown	-0.01
NM_021649	A_32_P123088	TICAM2	Toll-like receptor adaptor molecule 2	-0.01
NM_024110	A_23_P207879	CARD14	Caspase recruitment domain family member 14	-0.01
NM_014959	A_24_P14260	CARD8	Caspase recruitment domain family member 8	-0.01
NM_004797	A_23_P369237	ADIPOQ	Adiponectin C1Q and collagen domain containing	-0.01
NM_019080	A_24_P264909	NDFIP2	Nedd4 family interacting protein 2	-0.01
NM_000165	A_23_P93591	GJA1	Gap junction protein. alpha 1	0.01
ENST00000379563	A_23_P68539		cDNA FLJ41962	0.01
NM_001065	A_23_P139722	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily	0.01
NM_000061	A_23_P137139	BTK	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	0.01
A_24_P409681	A_24_P409681	A_24_P409681	Unknown	0.01
NM_003639	A_23_P159920	IKBKG	Inhibitor of kappa B-cells. kinase gamma	0.01
NM_001664	A_23_P69491	RHOA	Ras homolog gene family	0.01
NM_032378	A_23_P31840	EEF1D	Eukaryotic translation elongation factor 1 delta	0.01
NM_139266	A_24_P274270	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	0.01
NM_078471	A_23_P78122	MYO18A	Myosin XVIIIa	0.01
NM_030571	A_23_P81241	NDFIP1	Nedd4 family interacting protein 1	0.01
NM_080875	A_24_P259328	MIB2	Mindbomb homolog 2	0.01
NM_138330	A_23_P339687	ZNF675	Zinc finger protein 675	0.01
NM_002342	A_23_P53557	LTBR	Lymphotoxin beta receptor	0.01
NM_001035005	A_24_P271049	LOC497661	Putative NFkB activating protein	0.01
NM_006406	A_23_P114232	PRDX4	Peroxiredoxin 4	0.01
NM_000801	A_32_P50522	FKBP1A	FK506 binding protein 1A	0.02
NM_018098	A_23_P44684	ECT2	Epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	0.02
NM_178040	A_23_P258377	RAB6IP2	RAB6 interacting protein 2	0.02
NM_004425	A_23_P160559	ECM1	Extracellular matrix protein 1	0.02
NM_013254	A_23_P44768	TBK1	TANK-binding kinase 1	0.02
NM_016479	A_23_P212475	SCOTIN	Scotin	0.02
NM_009587	A_32_P452655	LGALS9	Lectin galactoside-binding. soluble. 9	0.02
NM_007051	A_23_P96853	FAF1	Fas (TNFRSF6) associated factor 1	0.02
NM_003270	A_23_P171143	TSPAN6	Tetraspanin 6	0.02
NM_178148	A_23_P19257	SLC35B2	Solute carrier family 35	0.02
NM_199203	A_24_P5935	Kua-UEV	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	0.02

NM_020345	A_23_P338519	NKIRAS1	NFKB inhibitor interacting Ras-like 1	0.02
NM_003263	A_23_P10873	TLR1	Toll-like receptor 1	0.02
NM_006785	A_23_P96008	MALT1	Mucosa associated lymphoid lymphoma Translocation	0.03
NM_001242	A_23_P48088	TNFRSF7	TNF receptor superfamily 7	0.03
ENST00000369797	A_23_P161257		OTTHUMP00000059187	0.03
NM_003302	A_24_P4054	TRIP6	Thyroid hormone receptor interactor 6	0.03
NM_006068	A_24_P17677	TLR6	Toll-like receptor 6	0.03
NM_020428	A_23_P208340	SLC44A2	Solute carrier family 44	0.03
NM_001992	A_23_P213562	F2R	Coagulation factor II	0.03
NM_015336	A_24_P76995	ZDHHC17	Zinc finger DHHC-type containing 17	0.04
NM_016395	A_23_P99920	PTPLAD1	Protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1	0.04
NM_033292	A_23_P202978	CASP1	Caspase 1 apoptosis-related cysteine peptidase	0.04
NM_052813	A_23_P500433	CARD9	Caspase recruitment domain family	0.04
NM_021003	A_23_P151679	PPM1A	Protein phosphatase 1A	0.04
NM_000867	A_23_P16953	HTR2B	5-hydroxytryptamine	0.04
NM_003810	A_23_P121253	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily	0.05
NM_017721	A_23_P55873	CC2D1A	Coiled-coil and C2 domain containing 1A	0.05
NM_213590	A_23_P87973	RFP2	Ret finger protein 2	0.06
NM_006092	A_24_P129277	CARD4	Caspase recruitment domain family	0.06
NM_001039661	A_23_P397856	TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor	0.07
NM_148910	A_23_P202905	TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor	0.08
NM_032376	A_23_P15516	TMEM101	Transmembrane protein 101	0.08
Immune Response (GO:0006955)				
Systematic Name	Probe Name	Gene Symbol	Description	Fc
NM_000584	A_32_P87013	IL8	Interleukin 8	-2.61
NM_000758	A_23_P133408	CSF2	Colony stimulating factor 2	-2.27
NM_001565	A_24_P303091	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-2.26
NM_004591	A_23_P17065	CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	-2.22
NM_000576	A_23_P79518	IL1B	Interleukin 1beta	-2.13
NM_000575	A_23_P72096	IL1A	Interleukin 1alpha	-1.62
NM_002993	A_23_P155755	CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6	-1.59
NM_005623	A_23_P207456	CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	-1.57
NM_014143	A_23_P338479	CD274	CD274 molecule	-1.51
NM_000759	A_23_P501754	CSF3	Colony stimulating factor 3	-1.41
NM_002985	A_23_P152838	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	-1.34
NM_002089	A_23_P315364	CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-1.32
NM_006235	A_23_P312920	POU2AF1	POU domain class2 associating factor1	-1.32
NM_001993	A_23_P126782	F3	Coagulation factor III	-1.32
NM_001432	A_23_P41344	EREG	Epregrulin	-1.32
ENST00000381961	A_23_P33643	Q9G7C4	Cytochrome oxidase c	-1.28
NM_006273	A_23_P78037	CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	-1.26
NM_030956	A_23_P33420	TLR10	Toll-like receptor 10	-1.17
NM_003264	A_23_P92499	TLR2	Toll-like receptor 2	-1.12
NM_005409	A_24_P20607	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	-1.11
NM_001561	A_23_P51936	TNFRSF9	TNF super family ligand 9	-1.10
NM_003807	A_24_P237036	TNFSF14	TNF superfamily ligand 14	-1.06
NM_001252	A_23_P119202	TNFSF7	TNF superfamily ligand 7	-1.00
NM_001511	A_23_P7144	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-1.00

NM_002090	A_24_P183150	CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-0.97
NM_000594	A_23_P376488	TNF	Tumor necrosis factor	-0.93
NM_002176	A_23_P71774	IFNB1	Interferon. beta 1. fibroblast	-0.90
NM_002996	A_24_P381901	CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	-0.87
NM_002309	A_24_P122137	LIF	Leukemia inhibitory factor	-0.82
NM_002187	A_23_P7560	IL12B	Interleukin 12B	-0.80
NM_000600	A_23_P71037	IL6	Interleukin 6	-0.79
NM_002983	A_23_P373017	CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	-0.76
NM_004233	A_23_P70670	CD83	CD83 molecule	-0.76
NM_004951	A_23_P25566	EBI2	Epstein-Barr virus induced gene 2	-0.71
NM_052941	A_23_P103496	GBP4	Guanylate binding protein 4	-0.67
NM_004833	A_32_P44394	AIM2	Absent in melanoma 2	-0.67
NM_002164	A_23_P112026	INDO	Indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	-0.64
NM_000882	A_23_P91943	IL12A	Interleukin 12A	-0.64
NM_002982	A_23_P89431	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	-0.60
NM_006186	A_23_P131208	NR4A2	Nuclear receptor subfamily 4	-0.58
NM_016584	A_23_P76078	IL23A	Interleukin 23, alpha subunit p19	-0.58
NM_002198	A_23_P41765	IRF1	Interferon regulatory factor 1	-0.56
NM_003811	A_23_P67224	TNFSF9	TNF superfamily ligand 9	-0.56
NM_181337	A_24_P143301	KAAG1	Kidney associated antigen 1	-0.56
NM_002704	A_23_P121596	PPBP	Pro-platelet basic protein	-0.55
NM_006144	A_23_P133445	GZMA	Granzyme A	-0.55
NM_000139	A_23_P1904	MS4A2	Membrane-spanning 4-domains	-0.53
NM_001001437	A_23_P321920	CCL3L3	Chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	-0.53
NM_019618	A_23_P17053	IL1F9	Interleukin 1 family member 9	-0.53
NM_172140	A_23_P337800	IL29	Interleukin 29	-0.53
NM_002341	A_23_P93348	LTB	Lymphotoxin beta	-0.53
NM_002185	A_23_P404494	IL7R	Interleukin 7 receptor	-0.51
NM_013269	A_24_P241183	CLEC2D	C-type lectin domain family 2	-0.49
NM_002994	A_23_P110204	CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-0.48
AK022802	A_24_P942933	APOBEC3G	cDNA FLJ12740 fis	-0.45
NM_006399	A_23_P128974	BATF	Basic leucine zipper transcription factor	-0.45
NM_004843	A_23_P27606	IL27RA	Interleukin 27 receptor alpha	-0.45
NM_005238	A_23_P127525	ETS1	V-ets erythroblastosisvirus E26 oncogene homolog 1	-0.44
NM_025239	A_23_P94412	PDCD1LG2	Programmed cell death 1 ligand 2	-0.44
NM_003855	A_24_P208567	IL18R1	Interleukin 18 receptor 1	-0.41
NM_004244	A_23_P33723	CD163	CD163 molecule	-0.41
NM_004258	A_24_P131066	IGSF2	Immunoglobulin superfamily	-0.41
NM_002053	A_32_P107372	GBP1	Guanylate binding protein 1	-0.41
NM_000397	A_23_P217258	CYBB	Cytochrome b-245 beta polypeptide	-0.38
NM_002986	A_23_P66635	CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	-0.38
NM_004810	A_24_P10884	GRAP2	GRB2-related adaptor protein 2	-0.37
NM_000064	A_23_P101407	C3	Complement component 3	-0.37
NM_005191	A_23_P155632	CD80	CD80 molecule	-0.36
NM_005408	A_24_P125335	CCL13	Chemokine (C-C motif) ligand 13	-0.35
NM_003998	A_23_P30024	NFKB1	Nuclear factor of kappa B-cells 1	-0.35
Inflammatory response (GO:0006954)				
Systematic Name	Probe Name	Gene Symbol	Description	Fc
NM_000584	A_32_P87013	IL8	Interleukin 8	-2.61

NM_001565	A_24_P303091	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-2.26
NM_004591	A_23_P17065	CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	-2.22
NM_000576	A_23_P79518	IL1B	Interleukin 1beta	-2.13
NM_000450	A_23_P97112	SELE	Selectin E	-1.67
NM_000575	A_23_P72096	IL1A	Interleukin 1. alpha	-1.62
NM_002993	A_23_P155755	CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6	-1.59
NM_005623	A_23_P207456	CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	-1.57
NM_002985	A_23_P152838	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	-1.34
NM_002089	A_23_P315364	CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-1.32
NM_006273	A_23_P78037	CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	-1.26
NM_030956	A_23_P33420	TLR10	Toll-like receptor 10	-1.17
NM_003264	A_23_P92499	TLR2	Toll-like receptor 2	-1.12
NM_005409	A_24_P20607	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	-1.11
NM_014589	A_23_P114857	PLA2G2E	Phospholipase A2 group IIE	-1.08
NM_001511	A_23_P7144	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-1.00
NM_002090	A_24_P183150	CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-0.97
NM_001570	A_23_P80635	IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	-0.90
NM_000963	A_24_P250922	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	-0.88
NM_002996	A_24_P381901	CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	-0.87
NM_003734	A_23_P426305	AOC3	Amine oxidase, copper containing 3	-0.83
NM_000600	A_23_P71037	IL6	Interleukin 6	-0.79
NM_000675	A_23_P109436	ADORA2A	Adenosine A2a receptor	-0.76
NM_002983	A_23_P373017	CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	-0.76
NM_003182	A_23_P215283	TAC1	Tachykinin. precursor 1	-0.70
NM_001200	A_23_P143331	BMP2	Bone morphogenetic protein 2	-0.60
NM_002982	A_23_P89431	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	-0.60
NM_016584	A_23_P76078	IL23A	Interleukin 23, alpha subunit p19	-0.58
NM_001001437	A_23_P321920	CCL3L3	Chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	-0.53
NM_023068	A_23_P17481	SIGLEC1	Sialic acid binding Ig-like lectin 1	-0.53
NM_007115	A_23_P165624	TNFAIP6	Tumor necrosis factor. alpha-induced protein 6	-0.50
NM_002994	A_23_P110204	CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-0.48
NM_004244	A_23_P33723	CD163	CD163 molecule	-0.41
NM_138938	A_23_P119936	REG3A	Regenerating islet-derived 3 alpha	-0.39
NM_001066	A_24_P54174	TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily	-0.39
NM_058176	A_23_P215577	HDAC9	Histone deacetylase 9	-0.39
NM_000397	A_23_P217258	CYBB	Cytochrome b-245, beta polypeptide	-0.38
NM_014707	A_23_P404162	HDAC9	Histone deacetylase 9	-0.38
NM_000710	A_23_P128744	BDKRB1	Bradykinin receptor B1	-0.38
NM_002986	A_23_P66635	CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	-0.38
NM_000064	A_23_P101407	C3	Complement component 3	-0.37
NM_005408	A_24_P125335	CCL13	Chemokine (C-C motif) ligand 13	-0.35
NM_003998	A_23_P30024	NFKB1	Nuclear factor of kappa B-cells 1	-0.35
NM_012275	A_23_P39856	IL1F5	Interleukin 1 family	-0.33
NM_015991	A_24_P222655	C1QA	Complement component 1q subcomponent A chain	-0.32
NM_003152	A_23_P207367	STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5A	-0.32
NM_145912	A_23_P17911	NFAM1	NFAT activating protein with ITAM motif 1	-0.31
NM_002984	A_23_P207564	CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	-0.30
NM_003821	A_23_P252106	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	-0.30

NM_004895	A_23_P9883	CIAS1	Cold autoinflammatory syndrome 1	-0.28
NM_002981	A_23_P49759	CCL1	Chemokine (C-C motif) ligand 1	-0.27
NM_145637	A_23_P211488	APOL2	Apolipoprotein L. 2	-0.27
NM_001203	A_24_P63380	BMPR1B	Bone morphogenetic protein receptor. type IB	-0.27
NM_022718	A_23_P376557	MMP25	Matrix metalloproteinase 25	-0.26
NM_000572	A_23_P126735	IL10	Interleukin 10	-0.25
NM_000066	A_23_P35252	C8B	Complement component 8. beta polypeptide	-0.25
NM_173842	A_23_P209995	IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist	-0.25
NM_000647	A_23_P212354	CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	-0.25
NM_002416	A_23_P18452	CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-0.24
NM_001710	A_23_P156687	CFB	Complement factor B	-0.23
NM_000623	A_23_P304897	BDKRB2	Bradykinin receptor B2	-0.21
NM_001140	A_23_P55373	ALOX15	Arachidonate 15-lipoxygenase	-0.21
Leukocyte Chemotaxis (GO:0030595)				
Systematic Name	Probe Name	Gene Symbol	Description	Fc
NM_000584	A_32_P87013	IL8	Interleukin 8	-2.61
NM_000576	A_23_P79518	IL1B	Interleukin-1beta	-2.13
Locomotory Behavior (GO:0007626)				
Systematic Name	Probe Name	Gene Symbol	Description	Fc
NM_000584	A_32_P87013	IL8	Interleukin 8	-2.61
NM_001565	A_24_P303091	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-2.26
NM_004591	A_23_P17065	CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	-2.22
NM_000576	A_23_P79518	IL1B	Interleukin 1beta	-2.13
NM_000575	A_23_P72096	IL1A	Interleukin 1alpha	-1.62
NM_002993	A_23_P155755	CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6	-1.59
NM_005623	A_23_P207456	CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	-1.57
NM_002985	A_23_P152838	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	-1.34
NM_002089	A_23_P315364	CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-1.32
NM_006273	A_23_P78037	CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	-1.26
NM_005409	A_24_P20607	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	-1.11
NM_001511	A_23_P7144	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-1.00
NM_002090	A_24_P183150	CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-0.97
Regulation of Apoptosis (GO:0043066)				
Systematic Name	Probe Name	Gene Symbol	Description	Fc
NM_000758	A_23_P133408	CSF2	Colony stimulating factor 2	-2.27
NM_000575	A_23_P72096	IL1A	Interleukin 1alpha	-1.62
NM_000594	A_23_P376488	TNF	Tumor necrosis factor	-0.93
NM_006290	A_24_P157926	TNFAIP3	Tumor necrosis factor	-0.85
NM_002575	A_24_P245379	SERPINB2	Serpin peptidase inhibitor-clade B	-0.83
NM_000600	A_23_P71037	IL6	Interleukin 6	-0.79
NM_153694	A_23_P76374	SYCP3	Synaptonemal complex protein 3	-0.69
NM_001165	A_23_P98350	BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	-0.61
NM_002982	A_23_P89431	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	-0.60
NM_004923	A_23_P161507	MTL5	Metallothionein-like 5 testis-specific	-0.57
NM_004049	A_23_P152002	BCL2A1	BCL2-related protein A1	-0.54
NM_003897	A_23_P42257	IER3	Immediate early response 3	-0.52
ENST00000299502	A_23_P153185		cDNAclone CS0DH002YJ05, T cells	-0.50

NM_003955	A_23_P207058	SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	-0.41
NM_003998	A_23_P30024	NFKB1	Nuclear factor of kappa B-cells 1	-0.35
NM_013246	A_23_P138760	CLCF1	Cardiotrophin-like cytokine factor 1	-0.33
NM_000312	A_23_P40096	PROC	Protein C	-0.32
NM_003152	A_23_P207367	STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5A	-0.32
NM_014350	A_32_P219520	TNFAIP8	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8	-0.32
AF009616	A_23_P209394	CFLAR	FLAME-1	-0.29
NM_000880	A_23_P8961	IL7	Interleukin 7	-0.26
NM_000572	A_23_P126735	IL10	Interleukin 10	-0.25
NM_005178	A_23_P4662	BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3	-0.25
NM_000477	A_23_P257834	ALB	Albumin	-0.25
NM_003879	A_24_P120115	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	-0.23
A_23_P170719	A_23_P170719	A_23_P170719	Unknown	-0.19
NM_016569	A_23_P13772	TBX3	T-box 3	-0.18
NM_139314	A_23_P159325	ANGPTL4	Angiopoietin-like 4	-0.18
AJ008005	A_23_P106174	PSEN1	PSN1 gene alternative transcript	-0.18
NM_021972	A_23_P38106	SPHK1	Sphingosine kinase 1	-0.17
NM_014336	A_23_P100935	AIPL1	Aryl hydrocarbon receptor interacting protein-like 1	-0.16
NM_003840	A_23_P95417	TNFRSF10D	Tumor necrosis factor receptor superfamily	-0.16
NM_005345	A_23_P111132	HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A	-0.16
NM_017617	A_23_P60387	NOTCH1	Notch homolog 1 translocation-associated	-0.16
NM_005734	A_23_P422809	HIPK3	Homeodomain interacting protein kinase 3	-0.15
NM_005194	A_23_P411296	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein	-0.15
NM_170735	A_23_P127891	BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	-0.15
NM_000551	A_24_P134942	VHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor	-0.13
NM_138931	A_23_P57856	BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6	-0.13
XM_942822	A_32_P703	LOC646626	Hypothetical protein LOC647393	-0.13
NM_000043	A_23_P63896	FAS	Fas	-0.13
NM_001166	A_24_P115774	BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	-0.12
NM_012068	A_23_P119337	ATF5	Activating transcription factor 5	-0.12
ENST00000374189	A_23_P202540		Unknown	-0.11
BC020868	A_24_P342178	STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B	-0.11
NM_021960	A_24_P319635	MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1	-0.10
NM_007308	A_23_P29939	SNCA	Synuclein alpha	-0.10
NM_003877	A_23_P128215	SOCS2	Suppressor of cytokine signaling 2	-0.10
NM_001025366	A_23_P81805	VEGF	Vascular endothelial growth factor	-0.09
NM_003921	A_23_P115286	BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	-0.09
NM_012448	A_23_P100788	STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B	-0.08
NM_000546	A_23_P26810	TP53	Tumor protein p53	-0.08
NM_023111	A_23_P219105	FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1	-0.08
NM_000875	A_23_P205986	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	-0.07
Regulation of cell proliferation (GO:0042127)				
Systematic Name	Probe Name	Gene Symbol	Description	Fc
NM_000584	A_32_P87013	IL8	Interleukin 8	-2.61
NM_000758	A_23_P133408	CSF2	Colony stimulating factor 2	-2.27

NM_001565	A_24_P303091	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-2.26
NM_000576	A_23_P79518	IL1B	Interleukin-1beta	-2.13
NM_001965	A_23_P380318	EGR4	Early growth response 4	-2.07
NM_000575	A_23_P72096	IL1A	Interleukin-1alpha	-1.62
NM_000759	A_23_P501754	CSF3	Colony stimulating factor 3	-1.41
NM_001432	A_23_P41344	EREG	Epiregulin	-1.32
NM_001561	A_23_P51936	TNFRSF9	TNF superfamily ligand 9	-1.10
NM_001511	A_23_P7144	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-1.00
AF118092	A_24_P359491	AF118092	PRO2061	-0.96
NM_000594	A_23_P376488	TNF	Tumor necrosis factor	-0.93
NM_002176	A_23_P71774	IFNB1	Interferon-beta 1	-0.90
NM_001945	A_23_P213944	HBEGF	Heparin-binding EGF-like Growth F	-0.83
NM_002309	A_24_P122137	LIF	Leukemia inhibitory factor	-0.82
NM_002187	A_23_P7560	IL12B	Interleukin 12B	-0.80
NM_000600	A_23_P71037	IL6	Interleukin 6	-0.79
Response to Wounding (GO:0009611)				
Systematic Name	Probe Name	Gene Symbol	Description	Fc
NM_000584	A_32_P87013	IL8	Interleukin 8	-2.61
NM_001565	A_24_P303091	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-2.26
NM_004591	A_23_P17065	CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	-2.22
NM_000576	A_23_P79518	IL1B	Interleukin-1beta	-2.13
NM_000450	A_23_P97112	SELE	Selectin E	-1.67
NM_000575	A_23_P72096	IL1A	Interleukin-1alpha	-1.62
NM_002993	A_23_P155755	CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6	-1.59
NM_005623	A_23_P207456	CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	-1.57
NM_002985	A_23_P152838	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	-1.34
NM_002089	A_23_P315364	CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-1.32
NM_001993	A_23_P126782	F3	Coagulation factor III	-1.32
NM_001432	A_23_P41344	EREG	Epiregulin	-1.32
NM_006273	A_23_P78037	CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	-1.26
NM_030956	A_23_P33420	TLR10	Toll-like receptor 10	-1.17
NM_003264	A_23_P92499	TLR2	Toll-like receptor 2	-1.12
NM_005409	A_24_P20607	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	-1.11
NM_014589	A_23_P114857	PLA2G2E	Phospholipase A2. group IIE	-1.08
NM_001511	A_23_P7144	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-1.00
NM_002090	A_24_P183150	CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-0.97
AF118092	A_24_P359491	AF118092	PRO2061	-0.96
NM_001570	A_23_P80635	IRAK2	IL-1 receptor-associated kinase 2	-0.90
NM_000963	A_24_P250922	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	-0.88
NM_002996	A_24_P381901	CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	-0.87
ENST00000248076	A_24_P228470	PAR4	Protease-activated receptor 4	-0.83
NM_001945	A_23_P213944	HBEGF	Heparin-binding EGF-like Growth F	-0.83
NM_003734	A_23_P426305	AOC3	Amine oxidase copper containing 3	-0.83
NM_000600	A_23_P71037	IL6	Interleukin 6	-0.79
ENST00000222543	A_24_P95070		cDNA FLJ26323 fis. clone HRT00813	-0.76
NM_000675	A_23_P109436	ADORA2A	Adenosine A2a receptor	-0.76
NM_002983	A_23_P373017	CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	-0.76
NM_003182	A_23_P215283	TAC1	Tachykinin. precursor 1	-0.70
J02940	A_23_P152926	GP1BA	Human platelet glycoprotein Ib alpha chain	-0.69
NM_001200	A_23_P143331	BMP2	Bone morphogenetic protein 2	-0.60

NM_002982	A_23_P89431	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	-0.60
NM_016584	A_23_P76078	IL23A	Interleukin 23. alpha subunit p19	-0.58
NM_005242	A_23_P58835	F2RL1	Coagulation factor II	-0.55
NM_001001437	A_23_P321920	CCL3L3	Chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	-0.53
NM_023068	A_23_P17481	SIGLEC1	Sialic acid binding Ig-like lectin 1	-0.53
NM_004200	A_23_P161935	SYT7	Synaptotagmin VII	-0.51
NM_007115	A_23_P165624	TNFAIP6	Tumor necrosis factor. alpha-induced protein 6	-0.50
NM_002994	A_23_P110204	CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-0.48
NM_002608	A_24_P339944	PDGFB	Platelet-derived growth factor beta polypeptide	-0.46
NM_004244	A_23_P33723	CD163	CD163 molecule	-0.41
NM_138938	A_23_P119936	REG3A	Regenerating islet-derived 3 alpha	-0.39
NM_001066	A_24_P54174	TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily	-0.39
NM_058176	A_23_P215577	HDAC9	Histone deacetylase 9	-0.39
NM_000397	A_23_P217258	CYBB	Cytochrome b-245. beta polypeptide	-0.38
NM_014707	A_23_P404162	HDAC9	Histone deacetylase 9	-0.38
NM_000710	A_23_P128744	BDKRB1	Bradykinin receptor B1	-0.38
NM_002986	A_23_P66635	CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	-0.38
NM_000064	A_23_P101407	C3	Complement component 3	-0.37
NM_005408	A_24_P125335	CCL13	Chemokine (C-C motif) ligand 13	-0.35
NM_003998	A_23_P30024	NFKB1	Nuclear factor of kappa B-cells 1	-0.35
NM_000641	A_23_P67169	IL11	Interleukin 11	-0.34
NM_012275	A_23_P39856	IL1F5	Interleukin 1 family member 5	-0.33
NM_015991	A_24_P222655	C1QA	Complement component 1q subcomponent	-0.32
NM_000312	A_23_P40096	PROC	Protein C	-0.32
NM_003152	A_23_P207367	STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5A	-0.32
NM_145912	A_23_P17911	NFAM1	NFAT activating protein with ITAM motif 1	-0.31
NM_002984	A_23_P207564	CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	-0.30
NM_003821	A_23_P252106	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	-0.30
NM_000602	A_24_P158089	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor clade E	-0.30
NM_004895	A_23_P9883	CIAS1	Cold autoinflammatory syndrome 1	-0.28
NM_002981	A_23_P49759	CCL1	Chemokine (C-C motif) ligand 1	-0.27
NM_145637	A_23_P211488	APOL2	Apolipoprotein L2	-0.27
NM_000488	A_23_P114626	SERPINC1	Serpin peptidase inhibitor clade C 1	-0.27
NM_000361	A_23_P91390	THBD	Thrombomodulin	-0.27
NM_001203	A_24_P63380	BMPR1B	Bone morphogenetic protein receptor type IB	-0.27
NM_004148	A_23_P169137	NINJ1	Ninjurin 1	-0.26
NM_022718	A_23_P376557	MMP25	Matrix metalloproteinase 25	-0.26
NM_000572	A_23_P126735	IL10	Interleukin 10	-0.25
NM_000066	A_23_P35252	C8B	Complement component 8beta polypeptide	-0.25
NM_173842	A_23_P209995	IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist	-0.25
NM_000647	A_23_P212354	CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	-0.25
NM_002416	A_23_P18452	CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-0.24
NM_001710	A_23_P156687	CFB	Complement factor B	-0.23
NM_006528	A_23_P393620	TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	-0.22
NM_000623	A_23_P304897	BDKRB2	Bradykinin receptor B2	-0.21
NM_000212	A_23_P38519	ITGB3	Integrin-beta 3	-0.21
NM_001140	A_23_P55373	ALOX15	Arachidonate 15-lipoxygenase	-0.21

6.2 USO DE CÉLULAS MADRE



San Sebastián, 31 de Marzo del 2010

A quien pueda corresponder,

INBIOBANK (www.inbiobank.org) está situado en en el Parque Tecnológico de Miramón en San Sebastián (Guipúzcoa). INBIOBANK es un biobanco privado sin ánimo de lucro de células madre adultas humanas para investigación. El biobanco está dedicado al aislamiento y expansión de células madre humanas adultas y la posterior distribución hacia Centros de Investigación y Hospitales nacionales o internacionales que requieran dichas células para fines de investigación básica.

La obtención de donaciones humanas se produce a través de hospitales de titularidad pública y privada bajo convenios específicos. Estos hospitales suministran la información necesaria para el paciente, incluyendo el destino de la donación, y recojen el consentimiento informado correspondiente, habiendo superado las pertinentes comisiones éticas.

INBIOBANK ha sido acreditado como biobanco por la Consejería de Sanidad del Gobierno Vasco con fecha 10 de Junio de 2009, según establece la Ley 14/2007, del 3 de Julio, sobre Investigación Biomédica. INBIOBANK es nodo del Banco Nacional de Líneas Celulares del Instituto de Salud Carlos III desde Enero de 2010.

El proyecto titulado “**Evaluación del efecto de la expresión de HIF-1alfa sobre las células mesenquimales y su contribución a la regeneración miocárdica y al mantenimiento de los progenitores hematopoyéticos**” cuyo investigador principal es la **Dra. Pilar Sepúlveda Sanchís** y a realizar en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia) incluye el uso de muestras humanas las cuales serán obtenidas a través de INBIOBANK.

Y para que conste donde proceda firma atentamente,

Dr Angel García Martín
Director Inbiobank



DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1 COMPORTAMIENTO DE LAS MSC EN ENTORNOS INFLAMATORIOS

Las células madre mesenquimales (MSC) son particularmente atractivas para la regeneración tisular debido a su facilidad de extracción, purificación y expansión *in vitro*, y a su fenotipo bajo en inmunogenicidad. De hecho han sido utilizadas en estudios preclínicos en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades como el parkinson, la diabetes, la enfermedad de injerto contra huésped o la degeneración cartilaginosa (Espejo *et al.* 1998; Tsuchida *et al.* 2003). Con respecto al tratamiento del infarto de miocardio, estudios anteriores en nuestro grupo demuestran que las MSC ofrecen ventajas terapéuticas respecto a otros tipos celulares para reducir el área de infarto y mejorar la contractilidad cardíaca (Arminan, Gandia *et al.* 2010).

Mientras que la contribución a la diferenciación/transdiferenciación en el tejido a reparar es a menudo mínima, otros efectos positivos tanto angiogénicos como inmunomoduladores son ejercidos por las MSC en ambientes isquémicos, apoptóticos y pro-inflamatorios.

Debido a que las interacciones con el microambiente juegan un papel fundamental en la biología de las células madre tanto *in vivo* como *in vitro*, nos planteamos el estudio de su comportamiento en entornos inflamatorios, ya que los tejidos dañados suelen ser objeto de procesos de isquemia, tropismo celular o estrés oxidativo.

La IL-1 β es producida en diferentes tejidos, no sólo como respuesta a patógenos, sino también como señales de peligro en patologías tales como infarto agudo de miocardio (Bujak y Frangogiannis 2009), diabetes tipo 2 (Donath y Shoelson 2011) o desórdenes neuronales (Shaftel *et al.* 2008). Esta citoquina es considerada la citoquina pro-inflamatoria por excelencia y su presencia en tejidos o en cultivos celulares es suficiente para desencadenar potentes respuestas relativamente conservadas en las células de mamíferos. Así, decidimos investigar la respuesta de las MSC frente al tratamiento con IL-1 β . Para tener una visión global de los procesos biológicos afectados por dicho tratamiento, procedimos al estudio de *microarrays* y posterior análisis bioinformático, lo que nos permitió determinar las funciones moleculares y procesos biológicos íntimamente relacionados con la exposición de las MSC a IL-1 β .

Como suele ocurrir en los estudios de *microarrays*, una gran variedad de respuestas biológicas fueron activadas tras la estimulación de las MSC con IL-1 β , pero quizás la más destacada fue la potente estimulación de secreción de quimioquinas (tipo CC y CXC) y factores de crecimiento, que a su vez fueron capaces de aumentar la migración y adhesión de las MSC y regular el reclutamiento de leucocitos. Es conocido que los miembros de la

familia CC afectan principalmente a la migración de los monocitos y linfocitos T, mientras que las quimioquinas del grupo CXC tienen por diana principal los neutrófilos. Como algunas de estas moléculas son quimiotácticas para leucocitos inflamatorios, como monocitos y neutrófilos, estos factores paracrinicos podrían facilitar la infiltración de células inmunes para la reparación tisular cuando las MSC son trasplantadas en tejidos dañados.

Aunque el tráfico leucocitario es la principal característica funcional de las quimioquinas, también poseen otras actividades biológicas como son la regulación de la angiogénesis, el control de la proliferación celular y la alteración de la expresión de moléculas de adhesión (Le *et al.* 2004). Estas propiedades podrían afectar a las MSC *in vivo* cuando son trasplantadas en tejidos dañados, puesto que éstos contienen gran cantidad de IL-1 β . En este mismo contexto, CXCL10 es considerada una “señal de parada” que limita la expansión de la reacción fibrótica estimulada por el TGF β , el FGF y el VEGF durante la cicatrización miocárdica (Bujak y Frangogiannis 2009). Así pues, estos hallazgos dan luz sobre el comportamiento de las MSC en ambientes inflamatorios y sugiere que mediadores inflamatorios como la IL-1 β inducen una respuesta en MSC que podría activar acciones paracrinicas *in vivo*.

También encontramos diferencias entre el patrón de activación de las MSC en respuesta a IL-1 β y otros mediadores de la inflamación como el TNF- α . Mientras que este último aumentó principalmente las citoquinas CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL10 y CCL11 (Ponte, Marais *et al.* 2007), nosotros demostramos que la IL-1 β aumentaba preferentemente CCL3, CCL5, CCL20, CXCL1, CXCL3, CXCL10 y CXCL11. En este sentido, este estudio muestra cómo la modulación de las respuestas biológicas de las MSC está muy asociada con las condiciones de cultivo y la presencia de mediadores inmunes y además, influye en la multipotencia de las MSC. Otros trabajos ya habían llegado a la misma conclusión y actualmente se están desarrollando protocolos de expansión de MSC teniendo muy en cuenta las mejores condiciones para preservar la estabilidad del cromosoma, mantener su grado de indiferenciación y evitar su activación en respuesta a estímulos como la IL-1 β (Crespo-Díaz *et al.* 2011).

7.2 MECANISMOS TERAPÉUTICOS DE LAS MSC

Diferentes estudios preclínicos muestran que las células madre mesenquimales son capaces de migrar *in vivo* a través del tejido miocárdico isquémico e inflamatorio y que las células trasplantadas mediante inyección intramiocárdica, reclutan células inflamatorias que inducen mecanismos de regeneración (angiogénesis, cardioprotección y reducción de fibrosis) que contribuyen a la mejora de la función cardíaca y disminución del remodelado ventricular en un corazón infartado.

Aún en el caso de la utilización de poblaciones de células troncales adultas muy purificadas y a pesar de que las células madre han demostrado ser seguras en ensayos preclínicos (Rosenzweig 2006; Passier *et al.* 2008) (con excepción de algunos estudios en los que se ha detectado la aparición de arritmias debido a la falta de integración a nivel eléctrico de las células trasplantadas (Fernandes *et al.* 2006; Fouts *et al.* 2006; Hagege *et al.* 2006)), estos resultados son muy limitados e insuficientes para aplicarlos como terapia alternativa en la actualidad. Una posible explicación sería que la supervivencia, migración, anidamiento, proliferación y diferenciación de las células madre se ven obstaculizadas durante el proceso de trasplante.

En los últimos años ha habido un fuerte debate entre los posibles mecanismos por los que las células progenitoras son capaces selectivamente de dirigirse a las zonas isquémicas, crear un nicho y producir el efecto terapéutico. En este sentido se planteó la contribución a la generación de nuevos cardiomiocitos por las células trasplantadas versus mecanismos paracrinos. En general, las estrategias basadas en promover la diferenciación de MSC mediante modificaciones genéticas con factores de transcripción cardíacos o quinasas que regulan varias funciones intracelulares, no son suficientemente apoyadas. Esto se debe sobre todo a la alterada conexión con tejido cardíaco sano (que podría conducir a arritmias), al limitado grado de diferenciación (siendo la gran mayoría de las células sólo positivas a un marcador cardíaco) y a la pequeña mejora obtenida con respecto al trasplante con MSC silvestres (Grauss *et al.* 2008). Por el contrario, las estrategias dirigidas a promover la supervivencia de las MSC, mayoritariamente mediante modificaciones genéticas, han mostrado un incremento significativo en la función cardíaca en relación con los tratamientos con MSC silvestres (a pesar de la modesta mejora en cuanto a anidamiento de MSC y persistencia a corto plazo de las células). La sobreexpresión de moléculas de supervivencia sobre todo a través de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt tanto *in vivo* como *in vitro*, y citoquinas y factores de crecimiento como el CXCR4/SDF-1 α , el HGF, el IGF y el VEGF, parece ser una buena estrategia para potenciar la terapéutica basada en células madre. Además, es suficiente como para desencadenar una respuesta basada en mecanismos paracrinos que conducen a angiogénesis, limitación en fibrosis y movilización de células madre (Mangi, Noiseux *et al.* 2003; Noiseux *et al.* 2006; Zeng, Lin *et al.* 2011).

7.3 POTENCIACIÓN DE LAS MSC EN EL TRATAMIENTO DEL IAM

Como se ha comentado en el apartado anterior, a pesar de los avances recientes en el tratamiento del IAM, esta patología todavía es una causa importante de mortalidad. Así pues, nos planteamos la posibilidad de mejorar los resultados hasta ahora obtenidos

mediante terapia celular con el trasplante de MSC modificadas genéticamente con el gen HIF-1 α (Factor inducible por hipoxia-1 α). Esta estrategia terapéutica, nada tiene que ver con la sobre-expresión de HIF-1 α en el tejido cardíaco, ya que este factor de transcripción juega diferentes funciones en dicho tejido que han sido extensamente estudiadas y han sido motivo de controversia. Mientras la acumulación de HIF-1 α en los cardiomiocitos mediante transgénesis conlleva una reducción en la contractilidad en el adulto y un deterioro de la función ventricular (Minamishima *et al.* 2008; Bekeredjian *et al.* 2010), desaconsejando así su modulación en el músculo cardíaco, la sobre-expresión de este factor de transcripción de forma inducible en el tejido cardíaco atenuó la disfunción cardíaca tras un IAM (probablemente debido al aumento de la perfusión sanguínea y glicólisis y a la reducción de la apoptosis (Kido *et al.* 2005; Parisi *et al.* 2005; Loor y Schumacker 2008)). En este contexto, la estabilización de HIF-1 α en ratones knockout con proil hidroxilasas (PHD) inducibles (ratones Phd2 flox/flox) produjo la protección del tejido dependiente de HIF-1 α tras haber sufrido un IAM, con un aumento de la densidad capilar y preservación de la estructura y función cardíacas (Holscher *et al.* 2011). Los autores argumentan que el éxito de este planteamiento fue evitar la estabilización de HIF-1 α durante el desarrollo del corazón, previniendo la activación de vías que provocaran efectos deletéreos, a la vez que se moduló la expresión de PHD2 en el adulto, inhibiendo por tanto la hidroxilación de HIF-1 α y la consiguiente ubiquitinación y degradación por el proteasoma.

Considerando el potencial peligro de la modulación de HIF-1 α en el tejido cardíaco, quisimos fomentar los mecanismos terapéuticos inducidos por el gen sin modular los niveles de HIF-1 α en las células endógenas del corazón, utilizando terapia celular. Las MSC son una aproximación atractiva para reparar el tejido isquémico y la hipoxia es considerada un estímulo importante para potenciar sus mecanismos terapéuticos (Tsai *et al.* 2011). En un estudio previo, nuestro grupo documentó que las MSC reducen la formación de tejido cicatricial e incrementan la neovascularización de manera más eficiente que otros tipos de células madre adultas (Arminan, Gandia *et al.* 2010).

Los mecanismos paracrinos dependientes de las MSC observados *in vivo* parecen ser activados por la hipoxia, ya que las células inyectadas en el miocardio viable en el borde de la zona, a menudo migran hacia el tejido isquémico indicando no sólo un anidamiento en el sitio de la lesión, sino también la habilidad de esas células para sobrevivir (durante cortos periodos de tiempo) en ambientes hipóxicos. De hecho, existen nichos fisiológicos de células madre de médula ósea en niveles reducidos de oxígeno y esta condición es caracterizada por el mantenimiento de su capacidad de autorrenovación y pluripotencia (Ceradini *et al.* 2004).

Siguiendo este razonamiento, quisimos investigar el efecto de la sobre-expresión de HIF-1 α en la biología y terapéutica de las MSC. Esta nueva estrategia podría ser importante para: 1) Cultivar MSC en normoxia y simular algunos de los efectos inducidos por hipoxia. 2) Identificar los mecanismos por los cuales las MSC incrementan sus efectos paracrinos. 3) Determinar las moléculas diana de HIF-1 α en las MSC, que podrían contribuir al fenotipo de MSC hipoxia-inducido.

Lo primero que investigamos fue el impacto de HIF-1 α en la expresión génica de las MSC. Los estudios de ganancia de función en MSC mostraron que HIF-1 α coordinadamente regulaba la expresión de genes codificando proteínas y factores de crecimiento implicados en reparación de heridas, angiogénesis y producción de matriz extracelular, la mayoría de ellos previamente descritos como dianas de HIF (Kelly *et al.* 2003; Higgins *et al.* 2004; Calvani *et al.* 2006; Ronkainen *et al.* 2007; Kitajima *et al.* 2008; Wolf *et al.* 2010). Varios factores pro-angiogénicos incluyendo Angiopoyetina (ANGPT1), apelina (APLN) y la proteína matricelular CYR61 (CNN1) se sobre-expresaron en MSC-HIF. La expresión de ANGPT1 y APLN1 se ve modulada por la hipoxia y HIF-1 α en miocitos cardíacos y ambos promueven efectos beneficiosos en la función cardíaca y presión sanguínea (Kelly, Hackett *et al.* 2003; Ronkainen, Ronkainen *et al.* 2007). De manera similar, el factor pro-angiogénico CYR61 (CNN1) ha sido implicado en la senescencia de los fibroblastos durante el proceso fibrótico como un mecanismo para controlar la fibrogénesis en la reparación de heridas (Jun y Lau 2010).

El TGF β y el factor de tejido conectivo (CTGF) fueron también genes diana de HIF-1 α . Diferentes estudios sugirieron que el TGF β podría ser crucial para el mecanismo de reparación miocárdica de las células madre por la represión de la síntesis de genes inflamatorios, reduciendo el infiltrado inflamatorio (Li *et al.* 2005; Bujak y Frangogiannis 2007). Además, el TGF β aumenta la adhesión celular y regula la liberación de metaloproteinasas de matriz requeridas para la migración de las MSC a través de dicha sustancia (Ries *et al.* 2007). En este sentido, el CTGF es un mediador regulado en cascada por debajo de las señales tanto del TGF β (Grotendorst 1997) como del receptor 30 de la proteína de acoplamiento G (GPER) y recientemente su activación en la línea de cardiomiocitos HL-1 ha sido relacionada con la estabilización de HIF-1 α y asociada a mecanismos anti-apoptóticos (Bennewith *et al.* 2009; Recchia *et al.* 2011).

La sobre-expresión de HIF-1 α en las MSC también activó genes relacionados con la síntesis de tejido conectivo, expresión de integrinas y reorganización de citoesqueleto, los cuales fueron responsables de la mejor cicatrización y del comportamiento de las MSC en estudios funcionales de quimiotaxis.

De especial importancia resultó el aumento de migración hacia el SDF-1 α y el HGF. Estas dos moléculas están implicadas en el eje CXCR4 y c-Met respectivamente, que no sólo se activan en respuesta a hipoxia, sino que también median la migración y anidamiento *in vivo* de las células derivadas de médula ósea (Hattori *et al.* 2001; Ceradini, Kulkarni *et al.* 2004; Neuss 2004; Wojakowski *et al.* 2004). Todos estos procesos biológicos podrían ser responsables de la mejora de la reparación cardíaca mediada por las MSC.

Mediante estudios de *microarrays* y western blot, comprobamos que la contribución a la respuesta paracrina de las MSC-HIF se produjo a través de la activación de las vías de la señalización PI3K/Akt, p38MAPK y MAPK/JNK, fomentando los mecanismos terapéuticos de las MSC frente al infarto de miocardio. Así, las MSC-HIF producen una mayor mejora de la función contráctil cardíaca con respecto a las MSC, además de producir mayor angiogénesis.

Una limitación de nuestro estudio fue el análisis de la acción de HIF-1 α *in vitro* en normoxia, por lo que no podemos descartar mecanismos adicionales en cultivos en hipoxia. Sin embargo, los efectos observados *in vivo* son probablemente más precisos y reproducen los efectos de HIF-1 α en ambientes hipóxicos resultado de la isquemia cardíaca.

En general, este estudio demuestra que la expresión de HIF-1 α en las MSC potencia mecanismos terapéuticos y añade nueva información sobre los procesos de reparación inducidos por las MSC.

7.4 ELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL

En el campo de la medicina regenerativa, a pesar de aplicar en la medida de lo posible la regla de las 3R' (reemplazamiento, reducción y refinamiento), es necesario disponer de modelos animales para el estudio de diferentes enfermedades.

Aunque ningún modelo animal puede replicar completamente la complejidad de las condiciones patológicas humanas, los modelos animales son la herramienta para comprender los mecanismos de la enfermedad y para evaluar las tecnologías de diagnóstico y tratamiento. En el caso que nos ocupa, el modelo experimental de infarto agudo de miocardio (IAM) constituye un pilar fundamental para entender la regeneración miocárdica y desarrollar procedimientos de terapia celular cardiovascular.

A lo largo de los años, los investigadores han propuesto diferentes modelos animales para IAM (Zaragoza *et al.* 2011), entre los que destaca el modelo de isquemia/reperfusión (I/R), la criolesión o la ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior (Selye *et al.* 1960; Dewald *et al.* 2004; van Amerongen *et al.* 2008). Este último resulta muy adecuado para simular la obstrucción a la que se ve sometida dicha arteria como consecuencia de un proceso aterotrombótico. Por otro lado, en este modelo no es posible la

recuperación espontánea de la lesión, como se ha descrito en modelos de I/R en roedores, lo que permite evaluar más fácilmente si los cambios en la estructura del tejido cardíaco o en la funcionalidad del órgano son debidos a una terapia determinada.

En cuanto al momento de oclusión de la arteria coronaria, para acercarse al modelo de IAM agudo tal y como ocurre en la especie humana, es preferible efectuar el trasplante inmediatamente después de haber realizado la ligadura de la arteria. Por otra parte, la duración de la isquemia es muy importante para garantizar la producción del infarto. Los modelos de isquemia y reperfusión tanto en mamífero superior (cerdos) como inferior (ratas), coinciden en que es necesario un tiempo mínimo de 60 minutos de isquemia asegurando así la producción del infarto (Takagawa *et al.* 2007; dos Santos *et al.* 2008).

Otra variable importante en los modelos animales de infarto experimental es la especie de elección (Theroux *et al.* 1974; Schuleri *et al.* 2008). La realización del infarto en mamífero inferior tiene como principal ventaja la facilidad para realizar un número elevado de ensayos debido al bajo coste y facilidad de manejo de los animales. Pero cuenta con dos inconvenientes fundamentales: por un lado la dificultad de los procedimientos quirúrgicos debido al pequeño tamaño del corazón de los roedores y por otro lado, hay que tener en cuenta el error experimental originado por la dificultad de conseguir buenas imágenes ecocardiográficas (incluso con sondas de alta frecuencia) con las que medir los cambios en la función cardíaca de dichos animales (Charuzi *et al.* 1983; Buda *et al.* 1986).

En contraposición, se encuentran los modelos de mamífero superior, generalmente establecidos en cerdo, ya que aportan gran similitud anatómica y fisiológica con el humano; por lo que en ciertos aspectos como la predicción del tamaño de infarto o la fisiopatología de la cardiopatía isquémica, son comparables (Suzuki *et al.* 2011).

La oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda por encima de la segunda diagonal, es la localización más factible para desarrollar un modelo porcino de infarto de miocardio reperfundido; ésta puede realizarse mediante la oclusión externa tras la apertura del tórax o con un balón intracoronario mediante angiografía (Suzuki *et al.* 2008). La realización de la oclusión coronaria a tórax abierto tiene las ventajas de permitir una visualización directa de la misma y por tanto controlar su oclusión, medir la contractilidad regional directamente en distintas zonas del corazón e incluso medir directamente el flujo en las arterias coronarias y en la raíz aórtica con técnicas de ultrasonidos. Pero también tiene inconvenientes, que son los propios de la cirugía y los cambios debidos a la apertura de tórax y pericardio que puedan influir en el remodelado miocárdico en los modelos crónicos.

La alta incidencia de fibrilación y taquicardia ventricular es una dificultad en el modelo porcino de infarto de miocardio, que conlleva una elevada mortalidad. Una de las ventajas del modelo quirúrgico con tórax abierto es la facilidad de reversión de estas arritmias mediante masaje y choque eléctrico de baja energía.

Al tratarse de una especie animal de mayor tamaño, nos permite obtener determinados parámetros que ya están muy estudiados y establecidos en los hombres, como son los marcadores cardíacos, la ecocardiografía o el ECG. En nuestro estudio medimos las enzimas Tn T y CK- MB (Ricciardi *et al.* 2003), ambas indicadoras de necrosis de tejido cardíaco. Los niveles séricos de estas enzimas comienzan a elevarse de manera significativa a las dos horas aproximadamente de haberse producido el daño y su pico máximo se observa 12 y 8 horas tras la oclusión, respectivamente. Ambas enzimas descienden hasta valores basales a las 48-72 horas post-infarto. Así pues estos marcadores son muy importantes a la hora de detectar un IAM en su fase aguda. Existen otros marcadores tales como NT-Pro BNP, mediante los que se obtiene valiosa información en el modelo crónico sobre la contractilidad cardíaca y la evolución del remodelado ventricular (Januzzi *et al.* 2012). Una de las limitaciones de nuestro estudio fue que debido a su elevado coste, no pudimos medir este marcador cardíaco. Sin embargo, este inconveniente se solventó mediante el estudio ecocardiográfico realizado, con el que pudimos observar y cuantificar la contractilidad cardíaca del animal a nivel basal y al final del experimento (Pipers *et al.* 1978; Lee *et al.* 2007; Ruan *et al.* 2009).

En los estudios de contractilidad regional se observó un incremento en la contractilidad en la zona no dependiente de la coronaria ocluida durante la isquemia, posiblemente para compensar la disquinesia en la zona isquémica. Este hecho concuerda con la observación de las secciones histológicas de los corazones del modelo crónico de IAM, en las que se aprecia un adelgazamiento de la pared del VI afectada por la isquemia con un aumento del grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo, zona enfrentada a la zona infartada.

El modelo de infarto agudo de miocardio desarrollado en cerdo ha servido además para disponer de un modelo en el que evaluar el efecto de nuevas moléculas con carácter anti-apoptótico y anti-inflamatorio, que podrían utilizarse en la protección temprana del tejido miocárdico tras el infarto.

A pesar de que el modelo porcino no está exento de inconvenientes ya que conlleva un alto coste, mayores problemas éticos, la necesidad de un equipo quirúrgico más complejo y se requiere una gran infraestructura, sigue siendo a día de hoy el modelo más fidedigno para simular una patología cardíaca del ser humano.

7.5 BIOMATERIALES

La bioingeniería en el campo de la cardio-regeneración ha evolucionado de una manera exponencial en los últimos años y ha pasado a ser una investigación de naturaleza

multidisciplinar, cuyo objetivo es solventar los problemas que ocurren tras un infarto de miocardio prolongando así la vida del paciente (Leor *et al.* 2006; Piao *et al.* 2007).

Los materiales y la biocompatibilidad con el tejido cardíaco: Estudio del Ácido Poliláctico

Uno de los factores a tener en cuenta para el éxito del trasplante celular es la vía utilizada. Así pues decidimos afrontar el hecho de que la supervivencia celular es muy limitada cuando éstas son trasplantadas mediante inyección intramiocárdica. Así, nuestro propósito fue ver si la utilización de biomateriales como vehículo de administración mejoraba la eficacia de la terapia celular. Como se comentó en la introducción, cabe suponer que al liberar las células con un soporte en forma de matriz, éstas tengan mayor capacidad de supervivencia y migración favoreciendo la prolongación de su efecto paracrino. En este sentido existe una intensa investigación para diseñar materiales más adecuados en términos de biodegradabilidad y con propiedades regenerativas, que sirvan como vehículo para liberar factores o células cultivadas en su interior.

Así pues una vez instaurado el modelo animal para la validación de la funcionalidad de diferentes materiales biológicos, comenzamos realizando un estudio con el Ácido L-Poliláctico (PLA), como posible candidato. Los parámetros tenidos en cuenta fueron la capacidad para albergar células, su efecto inflamatorio y la neovascularización producida.

Para valorar la viabilidad celular utilizamos el ensayo de MTT, obteniendo un buen resultado en cuanto a proliferación. Fue también objeto de este estudio la evaluación de la respuesta inflamatoria del biomaterial implantado para determinar si sería adecuado su uso terapéutico en el tejido cardíaco. El análisis mediante tinción de H-E del PLA implantado reveló la presencia de gran infiltrado celular tanto a corto (1 - 3 meses) como a largo plazo (un año). Este efecto inflamatorio es probable que se deba a una reacción de cuerpo extraño. Esto hizo que nos planteáramos la adecuación de este BM como vehículo celular, porque a pesar de que con el estudio se demostró que esta inflamación no era peligrosa para la vida del animal, sí que podría influir en la fagocitosis de las células sembradas en el biomaterial antes de realizar su papel de efecto paracrino.

Así, a pesar de que el polímero demostró capacidad para albergar grandes cantidades de células y a pesar de que se confirmó una neovascularización en el BM, su uso en el campo de la cardio-regeneración resulta dudoso ya que no cumple con un requisito indispensable como es la biocompatibilidad.

Efecto de los BM en la prevención del remodelado

Como se comentó en la introducción, el verdadero problema generado tras el infarto de miocardio es el deterioro progresivo de la elasticidad de la pared del ventrículo izquierdo (VI) y las consecuencias que ello conlleva; proceso que se conoce como remodelado

ventricular. En el caso de los infartos grandes, en el periodo crónico la cavidad del VI se ve seriamente agrandada. Además puede producirse el efecto de distensión sistólica en la zona fibrótica debido a la incapacidad, por parte del VI dañado, de soportar la presión ejercida en cada sístole. Esto provoca una disquinesia con la consiguiente reducción del gasto cardíaco, además del riesgo de ruptura ventricular. Como consecuencia, en ocasiones es necesario proceder a la resección de parte del VI para disminuir quirúrgicamente el tamaño del corazón, de modo que éste pueda aumentar su capacidad de bombeo de sangre hacia el organismo. Para ello en ocasiones los cirujanos se proveen de mallas compuestas por materiales sintéticos que ayudan, tras la resección, a recuperar la geometría del corazón (Benetis *et al.* 2007; Isomura 2011). Aunque en este estudio no hemos conseguido definir un biomaterial con las características adecuadas para prevenir el remodelado ventricular, la línea de investigación sigue abierta, con el análisis de nuevos materiales o la modificación de los ya existentes.

7.6 ADHERENCIAS PERICÁRDICAS

En las intervenciones cardíacas se producen grandes adherencias entre el epicardio, pericardio y pared torácica haciendo muy complicadas las posteriores re-intervenciones, necesarias en algunos casos. Puesto que la literatura sugería un mínimo de 2 meses para la obtención de adherencias pericárdicas en el modelo porcino, realizamos un pre-estudio a diferentes tiempos con el que se pudo determinar que el modelo de reintervención quirúrgica a 5 semanas era adecuado ya que producía la aparición de grandes adherencias pericárdicas tanto con el epicardio como con el esternón. Con este modelo estudiamos macroscópicamente la cantidad de adherencias presentes e histológicamente la fibrosis e inflamación producida.

La elección de los biomateriales utilizados se debió a que el colágeno es un biomaterial natural que ya ha sido ensayado para la reparación de diversos órganos o tejidos como tendones, crecimiento neuronal, osteogénesis imperfecta, etc. Con respecto al Fluoruro de polivinilideno (PVDF), estudios *in vitro* de cultivo celular demostraron propiedades antiadherentes para este material; y en estudios *in vivo* se observó una mínima reacción celular (Kaushal *et al.* 2011).

A pesar de que en ninguno de los casos obtuvimos ninguna mejoría, con este estudio pudimos determinar las diferentes reacciones de cada uno de los biomateriales. Mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina comprobamos la gran inflamación provocada por ambos biomateriales. A pesar de este hecho, observamos tanto macroscópica como microscópicamente que el polímero de colágeno se había integrado con el miocardio y

estaba en proceso de reabsorción, mientras que el PVDF había hecho una reacción de cuerpo extraño y se apreciaba perfectamente sobre la superficie cardíaca.

Sin embargo, el planteamiento de un biomaterial bicapa, que por un lado ofreciera una función de terapia celular y por otro estuviera diseñado como material antiadherente, podría apuntar como candidato adecuado al biomaterial de colágeno; éste podría actuar como vehículo celular para posteriormente ser reabsorbido (Radisic *et al.* 2003; Ma *et al.* 2007). En cuanto al PVDF, a pesar de no haber evitado la producción de adherencias, podría ser adecuado en un futuro si pudiera someterse a un tratamiento con moléculas que inhibieran la proliferación (tales como el tamoxifeno o la colchicina) de modo que éste permanecería separando las estructuras y al mismo tiempo serviría de indicador para el cirujano de la cercanía del corazón. Por otro lado, serán necesarios estudios *in vitro* sobre la dosis adecuada del fármaco o el tipo de liberación del mismo, así como su forma de esterilización.

En un futuro se intentarán conseguir biomateriales más adecuados y multifuncionales. Entre las características más destacadas se buscará que sean biocompatibles, reabsorbibles en un determinado tiempo, que muestren cierta elasticidad para evitar disquinesia y a su vez que proporcionen rigidez suficiente para evitar la distensión sistólica, que produzcan un microambiente adecuado para la proliferación y migración celular, que faciliten la liberación paulatina de células, factores, citoquinas y/o fármacos, que prevengan las adherencias pericárdicas y además que sean fácilmente sintetizables y económicos (Hutmacher 2001; Davis, Hsieh *et al.* 2005).

Aunque todavía queda mucho trabajo por delante y los problemas son difíciles de resolver, este apasionante campo está en constante evolución y tiene grandes perspectivas. Por ello es necesario continuar con los esfuerzos de investigación, ya que es una potencial alternativa terapéutica para dar solución a los millones de personas que en la actualidad sufren una patología cardíaca.



CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. La IL-1 β modula las respuestas biológicas de las células madre mesenquimales (MSC) afectando principalmente a su capacidad de migración y tropismo.
2. La migración y adhesión inducidas por la IL-1 β en las MSC están mediadas principalmente por la activación de la vía de señalización NF- κ B.
3. Las MSC tratadas con IL-1 β presentan mayor quimiotaxis *in vitro*, lo que se traduce en una mayor capacidad para reclutar leucocitos con respecto a las MSC no tratadas.
4. El factor de transcripción HIF-1 α , a través de la activación de las vías de señalización PI3K/Akt, p38MAPK y MAPK/JNK, modula respuestas biológicas asociadas a migración y reparación en las MSC.
5. Las MSC-HIF muestran una mayor habilidad de adhesión a las proteínas de la matriz extracelular y de migración hacia factores tróficos *in vitro*.
6. Las MSC-HIF muestran una mayor habilidad para reparar la función cardíaca en un modelo experimental de infarto agudo de miocardio en rata, induciendo una mayor angiogénesis y reducción del tejido fibrótico.
7. Las MSC-HIF estimulan la proliferación de cardiomiocitos *in vivo* en ausencia de hipertrofia cardíaca.
9. El biomaterial ácido poliláctico resultó ser un buen candidato como soporte para proliferación celular, pero sin embargo no se recomienda su utilización *in vivo* ya que provoca fuertes reacciones inflamatorias a nivel del epicardio.
10. El modelo porcino es adecuado para estudios de infarto de miocardio y de adherencias pericárdicas, siendo la ecocardiografía una técnica no invasiva que constituye una herramienta muy valiosa para determinar la evolución de la lesión.
11. Los biomateriales con base polimérica de colágeno y PVDF no fueron capaces de prevenir las adherencias pericárdicas inducidas tras el infarto de miocardio, aunque el biomaterial de colágeno mostró una buena reabsorción, lo que lo habilita para futuros ensayos de ingeniería tisular.



BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal, S. and M. F. Pittenger (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." *Blood* 105(4): 1815-22.

Al-Shahrour, F., P. Minguez, et al. (2007). "FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments." *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue): W91-6.

Alhaddad, I. A., L. Tkaczewski, et al. (1995). "Aspirin enhances the benefits of late reperfusion on infarct shape. A possible mechanism of the beneficial effects of aspirin on survival after acute myocardial infarction." *Circulation* 91(11): 2819-23.

Alpert, J. S., K. Thygesen, et al. (2000). "Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol* 36(3): 959-69.

Alvarez-Dolado, M., et al. (2003). "Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes." *Nature* 425(6961): 968-73.

Anderson, J. L., C. D. Adams, et al. (2011). "2011 ACCF/AHA Focused Update Incorporated Into the ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines." *Circulation* 123(18): e426-579.

Arminan, A., C. Gandia, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells provide better results than hematopoietic precursors for the treatment of myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol* 55(20): 2244-53.

Armour, J. A. (1999). "Myocardial ischaemia and the cardiac nervous system." *Cardiovasc Res* 41(1): 41-54.

Babuín, L. and A. S. Jaffe (2005). "Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury." *Cmaj* 173(10): 1191-202.

Bailey, L. L., L. Ze-jian, et al. (1984). "A cause of right ventricular dysfunction after cardiac operations." *J Thorac Cardiovasc Surg* 87(4): 539-42.

Bekeredjian, R., C. B. Walton, et al. (2010). "Conditional HIF-1 α expression produces a reversible cardiomyopathy." *PLoS One* 5(7): e11693.

Bel, A., L. Kachatryan, et al. (2010). "A new absorbable collagen membrane to reduce adhesions in cardiac surgery." *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 10(2): 213-6.

- Beltrami, A. P., L. Barlucchi, et al. (2003). "Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration." *Cell* 114(6): 763-76.
- Benetis, R., A. Simukauskiene, et al. (2007). "[Ischemic cardiomyopathy: possibilities of surgical treatment]." *Medicina (Kaunas)* 43(11): 909-17.
- Bennewith, K. L., X. Huang, et al. (2009). "The role of tumor cell-derived connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in pancreatic tumor growth." *Cancer Res* 69(3): 775-84.
- Bergmann, O., R. D. Bhardwaj, et al. (2009). "Evidence for cardiomyocyte renewal in humans." *Science* 324(5923): 98-102.
- Bolstad, B. M., R. A. Irizarry, et al. (2003). "A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias." *Bioinformatics* 19(2): 185-93.
- Buda, A. J., R. J. Zotz, et al. (1986). "Comparison of two-dimensional echocardiographic wall motion and wall thickening abnormalities in relation to the myocardium at risk." *Am Heart J* 111(3): 587-92.
- Bujak, M. and N. G. Frangogiannis (2007). "The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling." *Cardiovasc Res* 74(2): 184-95.
- Bujak, M. and N. G. Frangogiannis (2009). "The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57(3): 165-76.
- Burns, J. W., K. Skinner, et al. (1995). "Prevention of tissue injury and postsurgical adhesions by precoating tissues with hyaluronic acid solutions." *J Surg Res* 59(6): 644-52.
- Calvani, M., A. Rapisarda, et al. (2006). "Hypoxic induction of an HIF-1alpha-dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells." *Blood* 107(7): 2705-12.
- Ceradini, D. J., A. R. Kulkarni, et al. (2004). "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1." *Nat Med* 10(8): 858-64.
- Crespo-Diaz, R., A. Behfar, et al. (2011). "Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability." *Cell Transplant* 20(6): 797-811.
- Crisostomo, P. R., Y. Wang, et al. (2008). "Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism." *Am J Physiol Cell Physiol* 294(3): C675-82.
- Channer, K. and F. Morris (2002). "ABC of clinical electrocardiography: Myocardial ischaemia." *Bmj* 324(7344): 1023-6.

- Charuzi, Y., R. M. Davidson, et al. (1983). "Simultaneous assessment of segmental and global left ventricular function by two-dimensional echocardiography in acute myocardial infarction." *Clin Cardiol* 6(6): 255-64.
- Chen, L., E. E. Tredget, et al. (2008). "Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing." *PLoS One* 3(4): e1886.
- Christman, K. L. and R. J. Lee (2006). "Biomaterials for the treatment of myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol* 48(5): 907-13.
- Davis, M. E., P. C. Hsieh, et al. (2005). "Custom design of the cardiac microenvironment with biomaterials." *Circ Res* 97(1): 8-15.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, et al. (2001). "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." *Arthritis Rheum* 44(8): 1928-42.
- Dehne, N. and B. Brune (2009). "HIF-1 in the inflammatory microenvironment." *Exp Cell Res* 315(11): 1791-7.
- Dery, M. A., M. D. Michaud, et al. (2005). "Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators." *Int J Biochem Cell Biol* 37(3): 535-40.
- Dewald, O., N. G. Frangogiannis, et al. (2004). "A murine model of ischemic cardiomyopathy induced by repetitive ischemia and reperfusion." *Thorac Cardiovasc Surg* 52(5): 305-11.
- Donath, M. Y. and S. E. Shoelson (2011). "Type 2 diabetes as an inflammatory disease." *Nat Rev Immunol* 11(2): 98-107.
- dos Santos, L., A. F. Mello, et al. (2008). "Determination of myocardial infarction size in rats by echocardiography and tetrazolium staining: correlation, agreements, and simplifications." *Braz J Med Biol Res* 41(3): 199-201.
- Duijvestijn, A. M., H. van Goor, et al. (1992). "Antibodies defining rat endothelial cells: RECA-1, a pan-endothelial cell-specific monoclonal antibody." *Lab Invest* 66(4): 459-66.
- Duncan, D. A., Y. Yaacobi, et al. (1988). "Prevention of postoperative pericardial adhesions with hydrophilic polymer solutions." *J Surg Res* 45(1): 44-9.
- Erices, A., P. Conget, et al. (2000). "Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood." *Br J Haematol* 109(1): 235-42.
- Espejo, E. F., R. J. Montoro, et al. (1998). "Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates." *Neuron* 20(2): 197-206.
- Fernandes, S., J. C. Amirault, et al. (2006). "Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias." *Cardiovasc Res* 69(2): 348-58.

- Flege, C., F. Vogt, et al. (2012). "Development and characterization of a coronary polylactic acid stent prototype generated by selective laser melting." *J Mater Sci Mater Med*.
- Fouts, K., B. Fernandes, et al. (2006). "Electrophysiological consequence of skeletal myoblast transplantation in normal and infarcted canine myocardium." *Heart Rhythm* 3(4): 452-61.
- Frangogiannis, N. G., C. W. Smith, et al. (2002). "The inflammatory response in myocardial infarction." *Cardiovasc Res* 53(1): 31-47.
- Frantz, S., J. Bauersachs, et al. (2009). "Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation." *Cardiovasc Res* 81(3): 474-81.
- Friedenstein, A. J., U. F. Deriglasova, et al. (1974). "Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method." *Exp Hematol* 2(2): 83-92.
- Furie, B. and B. C. Furie (2008). "Mechanisms of thrombus formation." *N Engl J Med* 359(9): 938-49.
- Gao, X. M., A. M. Dart, et al. (2000). "Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice." *Cardiovasc Res* 45(2): 330-8.
- Garcia-Castro, J., C. Trigueros, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool." *J Cell Mol Med* 12(6B): 2552-65.
- Garg, K. and G. L. Bowlin (2011). "Electrospinning jets and nanofibrous structures." *Biomicrofluidics* 5(1): 13403.
- Glass, C. K. and J. L. Witztum (2001). "Atherosclerosis. the road ahead." *Cell* 104(4): 503-16.
- Goldberg, E. P., J. W. Sheets, et al. (1980). "Peritoneal adhesions: prevention with the use of hydrophilic polymer coatings." *Arch Surg* 115(6): 776-80.
- Gordon, S. and F. O. Martinez (2010). "Alternative activation of macrophages: mechanism and functions." *Immunity* 32(5): 593-604.
- Grauss, R. W., J. van Tuyn, et al. (2008). "Forced myocardin expression enhances the therapeutic effect of human mesenchymal stem cells after transplantation in ischemic mouse hearts." *Stem Cells* 26(4): 1083-93.
- Gronthos S, M. M., Brahim J, Robey PG, Shi S. (2000). "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13625-30.
- Grotendorst, G. R. (1997). "Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts." *Cytokine Growth Factor Rev* 8(3): 171-9.

- Gustafsson, M. V., X. Zheng, et al. (2005). "Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state." *Dev Cell* 9(5): 617-28.
- Hagege, A. A., J. P. Marolleau, et al. (2006). "Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients." *Circulation* 114(1 Suppl): I108-13.
- Hass, R., C. Kasper, et al. (2011). "Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC." *Cell Commun Signal* 9: 12.
- Hattori, K., B. Heissig, et al. (2001). "Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells." *Blood* 97(11): 3354-60.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2004). "Signaling to NF-kappaB." *Genes Dev* 18(18): 2195-224.
- Higgins, D. F., M. P. Biju, et al. (2004). "Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1." *Am J Physiol Renal Physiol* 287(6): F1223-32.
- Holscher, M., M. Silter, et al. (2011). "Cardiomyocyte-specific prolyl-4-hydroxylase domain 2 knock out protects from acute myocardial ischemic injury." *J Biol Chem* 286(13): 11185-94.
- Hu, C. J., A. Sataur, et al. (2007). "The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha." *Mol Biol Cell* 18(11): 4528-42.
- Hutmacher, D. W. (2001). "Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives." *J Biomater Sci Polym Ed* 12(1): 107-24.
- Hutmacher, D. W., J. C. Goh, et al. (2001). "An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications." *Ann Acad Med Singapore* 30(2): 183-91.
- In 't Anker, P. S., S. A. Scherjon, et al. (2004). "Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta." *Stem Cells* 22(7): 1338-45.
- In 't Anker, P. S., S. A. Scherjon, et al. (2003). "Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation." *Blood* 102(4): 1548-9.
- Isomura, T. (2011). "Surgical left ventricular reconstruction." *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 59(5): 315-25.
- Januzzi, J. L., Jr., A. S. Maisel, et al. (2012). "Natriuretic Peptide testing for predicting adverse events following heart failure hospitalization." *Congest Heart Fail* 18 Suppl 1: S9-S13.

- Jawad, H., N. N. Ali, et al. (2007). "Myocardial tissue engineering: a review." *J Tissue Eng Regen Med* 1(5): 327-42.
- Jeremy, R. W., R. A. Hackworthy, et al. (1987). "Infarct artery perfusion and changes in left ventricular volume in the month after acute myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol* 9(5): 989-95.
- Jiamsripong, P., M. S. Alharthi, et al. (2010). "Impact of pericardial adhesions on diastolic function as assessed by vortex formation time, a parameter of transmitral flow efficiency." *Cardiovasc Ultrasound* 8: 42.
- Jiang, B. H., Q. T. Nguyen, et al. (2011). "Single measurement of troponin T for early prediction of infarct size, congestive heart failure, and pulmonary hypertension in an animal model of myocardial infarction." *Cardiovasc Pathol* 20(3): e85-9.
- Jo, J., N. Nagaya, et al. (2007). "Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction: benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran." *Tissue Eng* 13(2): 313-22.
- Joseph, R., R. Shelma, et al. (2009). "Characterization of surface modified polyester fabric." *J Mater Sci Mater Med* 20 Suppl 1: S153-9.
- Jun, J. I. and L. F. Lau (2010). "The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing." *Nat Cell Biol* 12(7): 676-85.
- Karlstaedt, A., D. Fliegner, et al. (2012). "CardioNet: A human metabolic network suited for the study of cardiomyocyte metabolism." *BMC Syst Biol* 6(1): 114.
- Kaushal, S., S. K. Patel, et al. (2011). "A novel combination of bioresorbable polymeric film and expanded polytetrafluoroethylene provides a protective barrier and reduces adhesions." *J Thorac Cardiovasc Surg* 141(3): 789-95.
- Kelly, B. D., S. F. Hackett, et al. (2003). "Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1." *Circ Res* 93(11): 1074-81.
- Kido, M., L. Du, et al. (2005). "Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse." *J Am Coll Cardiol* 46(11): 2116-24.
- Kierszenbaum, A. L. (2002). "Histology and cell biology: an introduction to pathology." *Elsevier Health Sciences*.
- Kim, H. S., T. H. Shin, et al. (2010). "Implication of NOD1 and NOD2 for the differentiation of multipotent mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood." *PLoS One* 5(10): e15369.

- Kim, Y. S., H. J. Park, et al. (2009). "TNF-alpha enhances engraftment of mesenchymal stem cells into infarcted myocardium." *Front Biosci* 14: 2845-56.
- Kitajima, Y., T. Ide, et al. (2008). "Induction of hepatocyte growth factor activator gene expression under hypoxia activates the hepatocyte growth factor/c-Met system via hypoxia inducible factor-1 in pancreatic cancer." *Cancer Sci* 99(7): 1341-7.
- Kjekshus, J. K. (1986). "Importance of heart rate in determining beta-blocker efficacy in acute and long-term acute myocardial infarction intervention trials." *Am J Cardiol* 57(12): 43F-49F.
- Kohanna, F. H., P. X. Adams, et al. (1977). "Use of autologous fascia lata as a pericardial substitute following open-heart surgery." *J Thorac Cardiovasc Surg* 74(1): 14-9.
- Kuznetsov, S. A., M. H. Mankani, et al. (2001). "Circulating skeletal stem cells." *J Cell Biol* 153(5): 1133-40.
- Lama, V. N., L. Smith, et al. (2007). "Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts." *J Clin Invest* 117(4): 989-96.
- Laroche, G., Y. Marois, et al. (1995). "Polyvinylidene fluoride (PVDF) as a biomaterial: from polymeric raw material to monofilament vascular suture." *J Biomed Mater Res* 29(12): 1525-36.
- Le, Y., Y. Zhou, et al. (2004). "Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease." *Cell Mol Immunol* 1(2): 95-104.
- Lee, M. Y., S. H. Lee, et al. (2007). "Comparative analysis of heart functions in micropigs and conventional pigs using echocardiography and radiography." *J Vet Sci* 8(1): 7-14.
- Leor, J., E. Guetta, et al. (2006). "Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium." *Stem Cells* 24(3): 772-80.
- Li, T. S., M. Hayashi, et al. (2005). "Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor-beta-preprogrammed bone marrow stem cells." *Circulation* 111(19): 2438-45.
- Libby, P. and P. Theroux (2005). "Pathophysiology of coronary artery disease." *Circulation* 111(25): 3481-8.
- Liechty, K. W., T. C. MacKenzie, et al. (2000). "Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep." *Nat Med* 6(11): 1282-6.
- Lim, S. Y., Y. S. Kim, et al. (2006). "The effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt in a porcine myocardial infarction model." *Cardiovasc Res* 70(3): 530-42.

- Lindenfeld, J., R. L. Page, 2nd, et al. (2005). "Drug therapy in the heart transplant recipient: Part III: common medical problems." *Circulation* 111(1): 113-7.
- Loor, G. and P. T. Schumacker (2008). "Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion." *Cell Death Differ* 15(4): 686-90.
- Lloyd-Jones, D., R. Adams, et al. (2009). "Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee." *Circulation* 119(3): e21-181.
- Ma, L., Y. Shi, et al. (2007). "In vitro and in vivo biological performance of collagen-chitosan/silicone membrane bilayer dermal equivalent." *J Mater Sci Mater Med* 18(11): 2185-91.
- Mahmorian, J. J., L. A. Moye, et al. (1998). "Transdermal nitroglycerin patch therapy improves left ventricular function and prevents remodeling after acute myocardial infarction: results of a multicenter prospective randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Circulation* 97(20): 2017-24.
- Mangi, A. A., N. Noiseux, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts." *Nat Med* 9(9): 1195-201.
- Menasche, P. (2011). "Cardiac cell therapy: lessons from clinical trials." *J Mol Cell Cardiol* 50(2): 258-65.
- Mercurio, F., H. Zhu, et al. (1997). "IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation." *Science* 278(5339): 860-6.
- Minale, C., G. Hollweg, et al. (1987). "Closure of the pericardium using expanded polytetrafluoroethylene GORE-TEX-Surgical Membrane: clinical experience." *Thorac Cardiovasc Surg* 35(5): 312-5.
- Minamishima, Y. A., J. Moslehi, et al. (2008). "Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure." *Blood* 111(6): 3236-44.
- Monnet, E. and J. C. Chachques (2005). "Animal models of heart failure: what is new?" *Ann Thorac Surg* 79(4): 1445-53.
- Morris, F. and W. J. Brady (2002). "ABC of clinical electrocardiography: Acute myocardial infarction-Part I." *Bmj* 324(7341): 831-4.
- Moser, B. and P. Loetscher (2001). "Lymphocyte traffic control by chemokines." *Nat Immunol* 2(2): 123-8.
- Najimi, M., D. N. Khuu, et al. (2007). "Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes?" *Cell Transplant* 16(7): 717-28.

- Neuss, S., Becher E., Woltje M., Tietze L., Jahnen-Dechent W. (2004). "Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult mesenchymal stem cells suggest a role in cell mobilization, tissue repair and wound healing." *Stem cells* 22: 405-414.
- Newton, D., R. Mahajan, et al. (2009). "Regulation of material properties in electrospun scaffolds: Role of cross-linking and fiber tertiary structure." *Acta Biomater* 5(1): 518-29.
- Nguyen, B. K., S. Maltais, et al. (2010). "Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors." *J Cardiovasc Transl Res* 3(5): 547-58.
- Nian, M., P. Lee, et al. (2004). "Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling." *Circ Res* 94(12): 1543-53.
- Noiseux, N., M. Gnecci, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation." *Mol Ther* 14(6): 840-50.
- Parisi, Q., G. G. Biondi-Zoccai, et al. (2005). "Hypoxia inducible factor-1 expression mediates myocardial response to ischemia late after acute myocardial infarction." *Int J Cardiol* 99(2): 337-9.
- Passier, R., L. W. van Laake, et al. (2008). "Stem-cell-based therapy and lessons from the heart." *Nature* 453(7193): 322-9.
- Pelacho, B., Y. Nakamura, et al. (2007). "Multipotent adult progenitor cell transplantation increases vascularity and improves left ventricular function after myocardial infarction." *J Tissue Eng Regen Med* 1(1): 51-9.
- Piao, H., J. S. Kwon, et al. (2007). "Effects of cardiac patches engineered with bone marrow-derived mononuclear cells and PGCL scaffolds in a rat myocardial infarction model." *Biomaterials* 28(4): 641-9.
- Pillarsetti, K. and S. K. Gupta (2001). "Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1): SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction." *Inflammation* 25(5): 293-300.
- Pipers, F. S., W. W. Muir, 3rd, et al. (1978). "Echocardiography in swine." *Am J Vet Res* 39(4): 707-10.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* 284(5411): 143-7.
- Ponte, A. L., E. Marais, et al. (2007). "The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities." *Stem Cells* 25(7): 1737-45.
- Prinzmetal, M., L. L. Schwartz, et al. (1949). "Studies on the coronary circulation; loss of myocardial contractility after coronary artery occlusion." *Ann Intern Med* 31(3): 429-49.

Radisic, M., M. Euloth, et al. (2003). "High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering." *Biotechnol Bioeng* 82(4): 403-14.

Recchia, A. G., E. M. De Francesco, et al. (2011). "The G protein-coupled receptor 30 is up-regulated by hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in breast cancer cells and cardiomyocytes." *J Biol Chem* 286(12): 10773-82.

Ren, G., X. Zhao, et al. "Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression." *J Immunol* 184(5): 2321-8.

Reyes, M., A. Dudek, et al. (2002). "Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow." *J Clin Invest* 109(3): 337-46.

Ricciardi, M. J., C. J. Davidson, et al. (2003). "Troponin I elevation and cardiac events after percutaneous coronary intervention." *Am Heart J* 145(3): 522-8.

Ries, C., V. Egea, et al. (2007). "MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines." *Blood* 109(9): 4055-63.

Ronkainen, V. P., J. J. Ronkainen, et al. (2007). "Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin." *Faseb J* 21(8): 1821-30.

Rosano, G. M., M. Fini, et al. (2008). "Cardiac metabolism in myocardial ischemia." *Curr Pharm Des* 14(25): 2551-62.

Rosenzweig, A. (2006). "Cardiac cell therapy--mixed results from mixed cells." *N Engl J Med* 355(12): 1274-7.

Rosova, I., M. Dao, et al. (2008). "Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells." *Stem Cells* 26(8): 2173-82.

Ruan, W., L. Lu, et al. (2009). "Serial assessment of left ventricular remodeling and function by echo-tissue Doppler imaging after myocardial infarction in streptozotocin-induced diabetic swine." *J Am Soc Echocardiogr* 22(5): 530-6.

Sabia, P., R. D. Abbott, et al. (1991). "Importance of two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular systolic function in patients presenting to the emergency room with cardiac-related symptoms." *Circulation* 84(4): 1615-24.

Sakai, S., K. Mizuno, et al. (2003). "Morphologic changes in infarct-related plaque after coronary stent placement: a serial angiography study." *J Am Coll Cardiol* 42(9): 1558-65.

Sakuma, K., A. Iguchi, et al. (2005). "Closure of the pericardium using synthetic bioabsorbable polymers." *Ann Thorac Surg* 80(5): 1835-40.

- Schuleri, K. H., A. J. Boyle, et al. (2008). "The adult Gottingen minipig as a model for chronic heart failure after myocardial infarction: focus on cardiovascular imaging and regenerative therapies." *Comp Med* 58(6): 568-79.
- Seeger, J. M., L. D. Kaelin, et al. (1997). "Prevention of postoperative pericardial adhesions using tissue-protective solutions." *J Surg Res* 68(1): 63-6.
- Segers, V. F., I. Van Riet, et al. (2006). "Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(4): H1370-7.
- Selye, H., E. Bajusz, et al. (1960). "Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat." *Angiology* 11: 398-407.
- Semenza, G. L. and G. L. Wang (1992). "A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation." *Mol Cell Biol* 12(12): 5447-54.
- Shaftel, S. S., W. S. Griffin, et al. (2008). "The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective." *J Neuroinflammation* 5: 7.
- Spanaus, K. S., D. Nadal, et al. (1997). "C-X-C and C-C chemokines are expressed in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis and mediate chemotactic activity on peripheral blood-derived polymorphonuclear and mononuclear cells in vitro." *J Immunol* 158(4): 1956-64.
- Sutton, M. G. and N. Sharpe (2000). "Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy." *Circulation* 101(25): 2981-8.
- Suzuki, Y., J. K. Lyons, et al. (2008). "In vivo porcine model of reperfused myocardial infarction: in situ double staining to measure precise infarct area/area at risk." *Catheter Cardiovasc Interv* 71(1): 100-7.
- Suzuki, Y., A. C. Yeung, et al. (2011). "The representative porcine model for human cardiovascular disease." *J Biomed Biotechnol* 2011: 195483.
- Takagawa, J., Y. Zhang, et al. (2007). "Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: comparison of area- and length-based approaches." *J Appl Physiol* 102(6): 2104-11.
- Takahashi, M. (2010). "Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction." *Circ J* 74(3): 418-23.
- Tang, J., J. Wang, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells modified with stromal cell-derived factor 1 alpha improve cardiac remodeling via paracrine activation of hepatocyte growth factor in a rat model of myocardial infarction." *Mol Cells* 29(1): 9-19.

- Theroux, P., D. Franklin, et al. (1974). "Regional myocardial function during acute coronary artery occlusion and its modification by pharmacologic agents in the dog." *Circ Res* 35(6): 896-908.
- Timmers, L., S. K. Lim, et al. (2011). "Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction." *Stem Cell Res* 6(3): 206-14.
- Toma, J. G., M. Akhavan, et al. (2001). "Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin." *Nat Cell Biol* 3(9): 778-84.
- Tomchuck, S. L., K. J. Zwezdaryk, et al. (2008). "Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses." *Stem Cells* 26(1): 99-107.
- Tsai, C. C., Y. J. Chen, et al. (2011). "Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST." *Blood* 117(2): 459-69.
- Tsuchida, H., J. Hashimoto, et al. (2003). "Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats." *J Orthop Res* 21(1): 44-53.
- Tsukihara, H., S. Takamoto, et al. (2006). "Prevention of postoperative pericardial adhesions with a novel regenerative collagen sheet." *Ann Thorac Surg* 81(2): 650-7.
- van Amerongen, M. J., M. C. Harmsen, et al. (2008). "Cryoinjury: a model of myocardial regeneration." *Cardiovasc Pathol* 17(1): 23-31.
- Vandervelde, S., M. J. van Luyn, et al. (2005). "Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium." *J Mol Cell Cardiol* 39(2): 363-76.
- Wagner, W., F. Wein, et al. (2005). "Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood." *Exp Hematol* 33(11): 1402-16.
- Williams, J. T., S. S. Southerland, et al. (1999). "Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes." *Am Surg* 65(1): 22-6.
- Wojakowski, W., M. Tendera, et al. (2004). "Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction." *Circulation* 110(20): 3213-20.
- Wolf, N., W. Yang, et al. (2010). "Regulation of the matricellular proteins CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) by hypoxia-inducible factor-1{alpha} and transforming-growth factor-3{beta} in the human trophoblast." *Endocrinology* 151(6): 2835-45.
- Yamada, K., S. Miyamoto, et al. (1997). "Development of a dural substitute from synthetic bioabsorbable polymers." *J Neurosurg* 86(6): 1012-7.

Zaragoza, C., C. Gomez-Guerrero, et al. (2011). "Animal models of cardiovascular diseases." *J Biomed Biotechnol* 2011: 497841.

Zeng, B., G. Lin, et al. (2011). "Over-expression of HO-1 on mesenchymal stem cells promotes angiogenesis and improves myocardial function in infarcted myocardium." *J Biomed Sci* 17: 80.

Zhang, D., G. C. Fan, et al. (2008). "Over-expression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium." *J Mol Cell Cardiol* 44(2): 281-92.

Zhang, G., Y. Nakamura, et al. (2007). "Controlled release of stromal cell-derived factor-1 alpha in situ increases c-kit+ cell homing to the infarcted heart." *Tissue Eng* 13(8): 2063-71.

Zisa, D., A. Shabbir, et al. (2009). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair." *Biochem Biophys Res Commun* 390(3): 834-8.

Zong, X., H. Bien, et al. (2005). "Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs." *Biomaterials* 26(26): 5330-8.

Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." *Tissue Eng* 7(2): 211-28.

Zund, G., Q. Ye, et al. (1999). "Tissue engineering in cardiovascular surgery: MTT, a rapid and reliable quantitative method to assess the optimal human cell seeding on polymeric meshes." *Eur J Cardiothorac Surg* 15(4): 519-24.



PUBLICACIONES

10. PUBLICACIONES