



Diferenciació cel·lular en la regeneració tissular monitoritzada per procediments d'imatge no invasius

Juli Rodríguez Bagó

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**Diferenciació cel·lular en la regeneració tissular
monitoritzada
per procediments d'imatge no invasius**

**Juli Rodríguez Bagó
2012**

Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Memòria presentada per el Llicenciat en Biotecnologia Juli Rodríguez Bagó, per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona, pel programa de Doctorat en Biomedicina del departament de Bioquímica Molecular (Bienni 2004-2006)

La present Tesi doctoral: “Diferenciació cel·lular en la regeneració tissular monitoritzada per procediments d’imatge no invasius”, ha estat realitzada en el Centre d’Investigació Cardiovascular (Consell Superior d’Investigacions Científiques-Institut Català de Ciències Cardiovasculars, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) sota la co-direcció del Dr. Jerónimo Blanco Fernández i la Dra. Núria Rubio Vidal

El Doctorand:

Juli Rodríguez Bagó

Els Directors:

Jerónimo Blanco Fernández

Núria Rubio Vidal

I. TAULA DE CONTINGUTS

I. TAULA DE CONTINGUTS	5
II. ABREVIACIONS	11
III. INTRODUCCIÓ	17
1. PROBLEMÀTICA TERAPÈUTICA ACTUAL	18
2 L'ENGINYERIA TISSULAR.	22
2.1 DEFINICIÓ D'ENGINYERIA TISSULAR (ET)	22
2.2. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES.....	23
2.3 EINES DE L'ET.....	24
2.3.1 Les cèl·lules.....	24
2.3.2 Estructures de suport	31
2.3.3 Reguladors bioquímics i físics	37
3 MONITORATGE CEL·LULAR IN VIVO	40
3.1 MRI.....	43
3.2 PET.....	44
3.3 CT.....	45
3.4 ULTRASONS	45
3.5 TÈCNiques ÒPTIQUES D'IMATGE.....	46
3.5.1 Fluorescència	46
3.5.2 BLI	48
3.6 MÈTODES D'INTRODUCCIÓ DE GENS EN LES CÈL·LULES.....	55
3.6.1 Vectors no virals.....	55
3.6.2 Vectors virals.....	56
IV. OBJECTIUS	63
V. MATERIALS I MÈTODES	67
1. CULTIUS CEL·LULARS	69
1.1 TIPUS CEL·LULARS.....	69
1.1 293T	69
1.1.2 Cèl·lules mare adultes mesenquimals derivades de teixit adipós:	69
1.1.3 Cèl·lules mare mesenquimals derivades de cordó umbilical.....	71
1.2 CONDICIONS DE CULTIU I MÈTODES DE CULTIU.....	71
1.3 CONGELACIÓ CEL·LULAR.....	72
1.4 ESTUDIS DE DIFERENCIACIÓ I ESTAT D'HIPÒXIA IN VITRO	72
1.4.1 Diferenciació adipogènica	72

1.4.2 Diferenciació osteogènica	73
1.4.3 Diferenciació endotelial	74
2 MARCATGE CEL·LULAR	76
2.1 CONSTRUCCIONS PLASMÍDIQUES.....	76
2.1.1. Construcció PLox:PLuc:eGFP	76
2.1.2 Construcció PLox:hOCp:PLuc:eGFP	77
2.1.3 Construcció PLox:hPECAMp:PLuc:eGFP	77
2.1.4 Construcció PLox:HRE-12p:PLuc:eGFP.....	78
2.1.5 Construcció PLox:hcTnlp:PLuc:eGFP	78
2.1.6 Construcció hrl-mrfp-ttk	79
2.2 PRODUCCIÓ DE PARTÍCULES VÍRIQUES.....	79
2.3 TRANSDUCCIÓ CEL·LULAR.....	81
3. ESTRUCTURES TRIDIMENSIONALS	82
3.1 MATRIGEL	82
3.2 FIBRINA	82
3.3 DBM	83
4 MODELS ANIMALS	83
4.1 RATOLINS	83
4.1.2 Ratolins SCID	84
4.2 MODEL IN VIVO D'INFART DE MIOCARDI	84
4.2.1 Procediment quirúrgic en model d'infart.....	85
4.2.2. Cirurgia aguda terminal	88
5. SISTEMES D'ANÀLISI	89
5.1 IMATGE PER BLI	89
5.1.1 BLI in vitro	89
5.1.2 BLI in vivo no invasiva.....	90
5.1.3 Quantificació de fotons a partir de les imatges.....	91
5.2 ANÀLISI FUNCIONAL: ECOCARDIOGRAMA	92
5.3 ANÀLISI MORFOMÈTRICA: TRICRÒMICA DE MASSON.....	93
5.3.1 Tinció Tricròmica de Masson	93
5.4 DENSITAT VASCULAR: TINCIÓ AMB LECTINA GSLIB4.....	95
Procediment:	96
5.5 ANGIOGRAFIA FLUORESCENT	96

5.6 IMMUNOFLUORESCÈNCIA	97
5.7 PCR a temps real	98
VI. RESULTATS.....	103
1. TRAÇADORS QUIMÈRICS PER L'ESTUDI IN VITRO I IN VIVO DE L'ESTAT I DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR MITJANÇANT TÈCNIQUES DE FLUORESCÈNCIA I BLI NO INVASIVA.	105
1.1 CONSTRUCCIONS LENTIVÍRIQUES.....	106
1.2 MONITORITZACIÓ IN VITRO DE L'ESTAT D'HIPÒXIA, LA DIFERENCIACIÓ ENDOTELIAL I OSTEOGÈNICA MITJANÇANT LA BLI.....	107
1.3 MONITORITZACIÓ NO INVASSIVA IN VIVO DE L'ESTAT D'HIPÒXIA, LA DIFERENCIACIÓ ENDOTELIAL I OSTEOGÈNICA MITJANÇANT LA BLI	111
1.4 ANÀLIS DE L'ANGIOGÈNESIS EN DBMs I ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA... ..	115
2. APLICACIÓ DE LA PLATAFORMA BLI PEL DESENVOLUPAMENT DE TERÀPIES EN REGENERACIÓ CARDÍACA.....	118
2.1 LES CÈL·LULES I L'ESTRUCTURA DE SUPORT TRIDIMENSIONAL COM AGENTS TERAPÈUTICS EN MODEL D'INFART MURÍ.	120
2.2 ESTUDI IN VIVO PER BLI.....	121
2.3 VALIDACIÓ DELS RESULTATS DE BLI MITJANÇANT L'ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER PCR A TEMPS REAL.....	128
2.4 ANÀLISI MORFOMÈTRICA.....	130
2.5 ANÀLISI DE LA DENSITAT VASCULAR.....	132
2.6 ESTUDI DE LA FUNCIO CARDÍACA MITJANÇANT ECOCARDIOGRAFIA.....	133
2.7 IDENTIFICACIÓ DE LES CÈL·LULES TRASPLANTADES I ESTUDI DE LA SEVA EXPRESSIÓ PROTEICA.....	134
2.8 ESTUDI DE LA FUNCIONALITAT MICROVASCULAR.....	138
3. ESTUDI PER BLI DE LA CAPACITAT ANGIOGÈNICA DE LES UCBMSC	139
3.1 MARCATGE CEL·LULAR.....	140
3.2 ESTUDI IN VIVO EN MARIUS DE MARIUS	141
3.3 ESTUDI IN VIVO EN MODEL D'INFART DE MIOCARDI.....	145
3.3.1 Marcatge cel·lular, inclusió en estructura tridimensional de fibrina i trasplantament en model d'infart de ratolí.	145
3.3.2 Estudi in vivo per BLI.....	145

3.3.4 Anàlisi morfomètrica	149
3.3.5 Anàlisi de la densitat vascular	150
3.3.6 Identificació post sacrifici de les cèl·lules injectades i estudi de la seva expressió proteica.....	151
VII. DISCUSSIÓ	155
VIII. CONCLUSIONS.....	169
IX. APÈNDIX	172
X. AGRAÏMENTS	181
XI. BIBLIOGRAFIA	187

II. ABREVIACIONES

Ab	anticós
ATDPC	cèl·lules progenitores derivades de teixit adipós
ATCC	de l'anglès <i>american type culture collection</i>
BLI	bioluminescència
CAD	cèl·lules adultes diferenciades
cADN	àcid desoxiribonucleic complementari
CD	grup de diferenciació
CMA	cèl·lules mare adultes
CME	cèl·lules mare embrionàries
CMV	cytomegalovirus
CT	tomografia computeritzada (de l'anglès <i>Computed tomography</i>)
hcTnl	troponina I cardíaca humana
Cx-43	connexina-43
Cy5	cianina 5
CZN	coelenterazina
DBM	matriu d'os desmineralitzada (de l'anglès <i>Demineralized bone matrix</i>)
DMEM	medi modificat amb alta glucosa (de l'anglès <i>Dulbecco's modified eagle media-high glucose</i>)
ADN	àcid desoxiribonucleic
eGFP	proteïna verda fluorescent optimitzada per mamífers
ET	enginyeria tissular
FACS	separació de cèl·lules activada per fluorescència (de l'anglès <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)
FITC	isotiocianat de fluoresceïna
GAPDH	gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa
HBSS	solució salina equilibrada de Hanks
hcTnlp	promotor humà de la troponina I cardíaca
HEPES	àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetansulfònic
HRE-12p	promotor amb 12 repeticions d'elements de resposta a la hipòxia
hPECAM-1p	promotor humà de l'anglès <i>platelet/endothelial cell</i>

	<i>adhesion molecule</i>
hOCp	promotor humà de l'osteocalcina
IM	infart agut de miocardi
IP	intraperitoneal
LTR	repetició terminal llarga (de l'anglès <i>Long terminal repeat</i>)
mRFP	proteïna vermella fluorescent monomèrica
MRI	imatge de ressonància magnètica
mARN	àcid ribonucleic missatger
Nef	gen que facilita la infecció en les cèl·lules quiescents i augmenta la infectivitat dels virions
OC	osteocalcina
O/N	de l'anglès <i>overnight</i>
PBS	solució amortidora de fosfat
PECAM-1	de l'anglès <i>platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>
PFA	paraformaldehid
PHC	contatge total de fotons (de l'anglès <i>Photon counts</i>)
PLuc	<i>photinus pyralis</i> luciferasa
Pol	gen que codifica per enzims de la transcripció reversa
P/S	penicil·lina/estreptomina
RLuc	<i>renilla reniformis</i> luciferasa
PCR a temps real	reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció reversa
Rev	gen que regula el transport de l'ARN
SBF	sèrum boví fetal
SIN	autoinactivador (de l'anglès <i>Self-inactivating</i>)
SCID	immunodeficiència combinada greu (de l'anglès <i>Sever combined immunodeficiency</i>)
SPECT	CT d'emissió d'un sol fotó
TBS	solució salina amortidora de tris
Tris	tris(hidroximetil)aminoetà
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
UCBMSC	cèl·lules mesenquimals derivades de sang de cordó umbilical

Vif	gen que afecta la infectivitat de les partícules víriques
VIH	virus de la immunodeficiència humana
Vpr	gen encarregat de la localització nuclear
Vpu	gen que codifica per les proteïnes de membrana integrals i promoció l'alliberació dels virions

III. INTRODUCCIÓ

1. PROBLEMÀTICA TERAPÈUTICA ACTUAL

La pèrdua o mal funcionament d'un òrgan o teixit és un dels problemes més freqüents i costosos de la sanitat humana. La despesa derivada del manteniment, millora o substitució d'un òrgan danyat segueix essent una gran carga per a la sanitat, estimada en un total de 300 mil milions de dollars per any¹. Per tal de fer-se una idea de la rellevància del problema, només cal recordar que la pèrdua o mal funcionament d'un teixit pot ser causat per diferents patologies, com traumes per accident o per diverses malalties infeccioses (hepatitis C), congènites (atelèctasi pulmonar), hereditàries (fibrosis quística), autoimmunes (diabetis miellitus), neurodegeneratives (Parkinson),² etc. La incidència pel que fa al número d'afectats és molt elevada, així com la gravetat en molts dels casos. Només la diabetis afecta a uns 135 milions de persones en el món i causa la mort de 3 milions de persones per any, amb una predicció de 300 milions d'afectats a l'any 2025 segons la Organització Mundial de la Salut³.

La necessitat de substituir, reemplaçar o reparar teixits degut a malalties o traumes, esdevé una necessitat present i de futur. Les teràpies clíniques que es duen a terme per tal de substituir un teixit no funcional són les que es mostren breument a continuació, amb les seves característiques, avantatges i desavantatges:

1. Al·lotrasplantament: Consisteix en la substitució de l'òrgan malalt per un de sa provinent d'un donant. L'any 1954 es va realitzar el primer al·lotrasplantament d'òrgan amb èxit, a partir del trasplantament de ronyó dut a terme pel Dr. Joseph Murray de l'hospital Brigham de Boston⁴. Avui en dia, la millora en la tècnica permet realitzar al·lotrasplantaments en la majoria d'òrgans i teixits, el que es tradueix amb un augment en l'esperança de vida d'aquelles persones que presenten greus disfuncionalitats. Per exemple, per cada trasplantament de fetge, el pacient receptor guanya una mitjana de 16,1 anys més de vida, mentre que pel cor, el guany mig de vida es situa en 14,5 anys. D'altra banda, el trasplantament doble de ronyó i pàncrees, considerat

vital pels pacients diabètics sotmesos a diàlisi, suposa un promig de 12,9 anys de vida guanyats, el de ronyó 7,2 anys i el de pulmó 2,1 anys³. Com es desprèn de les dades, l'èxit de la tècnica està plenament contrastada, no obstant, presenta a priori dos inconvenients importants. En primer lloc, la necessitat d'administració d'immunosupressors de per vida al pacient (ciclosporina, FK506 i rapamicina). En segon lloc, la tràgica descompensació entre la oferta i la demanda, dada evidenciada el 2008 en *Eurotransplant Annual Report*. Actualment, es calcula que cada dia 12 europeus moren esperant un trasplant. Les dades del Registre Mundial de Trasplants, revelen que les donacions dins la UE (amb una taxa de 18,1 donants p.m.p.) el 2008 només varen permetre cobrir el 46% de les necessitats de trasplants de la població.

2. Autotrasplantaments: Representa l'extracció d'una part de teixit del propi pacient per trasplantar-lo en el teixit danyat. A diferència dels al·lotrasplantaments, elimina la necessitat de l'administració d'immunosupressors al pacient i l'espera d'un donant. Pel que fa a les proves clíniques realitzades fins el moment, els resultats són esperançadors, tot i que no suficients per tal de ser considerada una tècnica plenament satisfactòria. L'inconvenient més important és la impossibilitat de realitzar la tècnica en aquells pacients que no presenten suficient teixit sa per a ser reimplantat. Aquesta circumstància es dona en la majoria de casos², ja que es necessiten quantitats elevades de teixit sa per substituir el teixit no funcional.
3. Xenotrasplantaments: Consisteix en l'extracció d'un teixit o òrgan d'un animal, per a ser trasplantat en un humà. Es tracta doncs, d'una tècnica que eliminaria el problema de la descompensació entre la oferta i la demanda present en els al·lotrasplants, però no solucionaria el problema de rebuig del sistema immunitari. Avui dia, s'està intentant crear animals transgènics humanitzats per a xenotrasplantaments, mitjançant la manipulació genètica dels gens dels antígens majors d'histocompatibilitat, que evitaria el rebuig immunitari⁵. No obstant, la

tècnica presenta encara certes carències, tan científiques com ètiques, juntament a la possibilitat de transmissió d'agents patògens animals als humans (salt d'espècie).

4. Trasplantaments de materials biomimètics. Es basa en la implantació de materials no biològics per substituir teixits no sans en humans, que intenten reproduir les característiques funcionals dels teixits sans. Alguns exemples són els cors artificials⁶, les vàlvules de cor⁷, les pròtesi de meluc⁸ i els implants de pit⁹. Les proves clíniques en humans han representat un impacte positiu en els darrers anys. No obstant, els materials utilitzats estan subjectes a fractures, toxicitat i desgast i en cap cas es remodelen en el temps. Un clar exemple d'aquesta incapacitat de remodelació són els implants de metall per substituir ossos en pacients d'edats infantils i juvenils, els quals hauran de patir una revisió continua de l'implant per corregir la descompensació produïda pel seu desenvolupament. En conseqüència, es pot afirmar que la tècnica no presenta una substitució del tot efectiva, ja que el material trasplantat no presenta les mateixes característiques funcionals i estructurals que els teixits a substituir.

A la vista de les tècniques clàssiques esmentades es dedueix que encara existeixen grans limitacions per tal d'assegurar una substitució totalment satisfactòria d'un teixit danyat. Aquest fet fa que siguin necessàries noves teràpies que superin les carències observades en les teràpies clíniques actuals. Les noves teràpies haurien d'evitar recórrer a teixits de donants humans i evitar el trasplantament de grans quantitats de teixit sa, que no farien més que empitjorar la situació del malat. Finalment, la nova teràpia hauria d'aportar una millora considerable en la qualitat de vida del pacient, el que significa la substitució del teixit o òrgan danyat per un altre, ja sigui biològic o no, que presenti les mateixes característiques estructurals i funcionals del teixit sa, amb la remodelació del mateix a mesura que la persona es va desenvolupant. Davant aquest repte, apareix una nova aproximació terapèutica que busca

solucionar les deficiències observades en les teràpies actuals de reparació de teixits i que es coneix com enginyeria tissular.

2 L'ENGINYERIA TISSULAR.

2.1 DEFINICIÓ D'ENGINYERIA TISSULAR (ET)

El terme ET fou definit en el primer congrés de la “*National Science Foundation*” el 1988 com “l’aplicació dels principis i mètodes de l’enginyeria i les ciències de la vida per al coneixement de la relació entre estructura-funció en teixits humans i sans i el desenvolupament de substituents biològics per a la reparació o regeneració de les funcions de teixits i òrgans”¹⁰. Més tard, Langer i Vacanti el 1993, acabaren de concretar la definició d’ET com “un emergent i interdisciplinari camp que aplica els principis de la biologia i l’enginyeria per al desenvolupament de substituents viables per restaurar, mantenir i millorar el funcionament de teixits humans”.

Tot i que la primera definició d’ET no apareix fins el 1988, a principis dels 80 ja es realitzaven investigacions que entrarien dins la definició d’ET. Aquest és el cas de Bell et al, qui el 1981 ja investigava amb la possibilitat de reconstruir teixits humans vius¹¹, a partir del cultiu i expansió *in vitro* de cèl·lules epitelials per al posterior trasplantament en pacients amb cremades. No obstant, no va ser fins els anys 90 que l’ET es va desenvolupar ràpidament i es van començar a investigar en substituents biològics per a diferents teixits humans. D’aquesta manera la indústria de l’ET ha anat creixent, fins a destinar-se actualment 6 mil milions de dòlars en recerca i desenvolupament en tot el món, segons dades publicades per MedMarket Diligences¹².

En definitiva, l’ET neix de la necessitat de solucionar les deficiències observades en les tècniques clàssiques de reparació de teixits. L’ET uneix l’experiència guanyada en diferents camps, com la biologia cel·lular, la bioquímica, la biologia molecular, l’enginyeria bioquímica i biomecànica i la terapèutica humana, pel desenvolupament de teixits que millorin, restaurin o mantinguin les funcions pròpies de teixits no funcionals

2.2. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES

Les estratègies terapèutiques que s'utilitzen en ET es poden resumir en tres grups (**Fig. 1**) que es descriuen a continuació. La utilització d'una o altra dependrà del teixit que es tracti, així com del grau i tipus de lesió que presentin¹³.

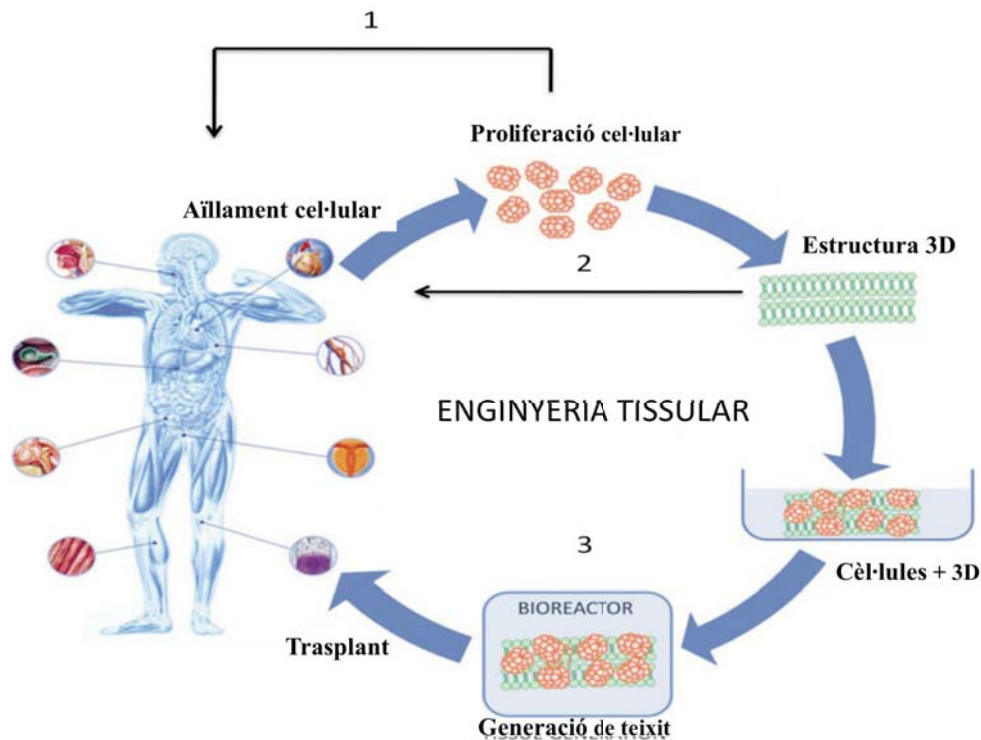


Figura 1. Representació de les diferents estratègies terapèutiques en l'ET (adaptat de <http://www.springerimages.com>).

1. Implantació de cèl·lules directament aïllades o aïllades i cultivades. Les cèl·lules individuals o petits agregats cel·lulars del pacient o d'un donant són injectats en el teixit danyat. En alguns casos, prèviament a la injecció, les cèl·lules són cultivades *in vitro*.
2. Regeneració de teixit *in situ*. Un polímer o estructura de suport és directament implantat en el teixit danyat per tal que les pròpies cèl·lules del pacient promoguin la reparació.
3. Implantació de teixit generat *in vitro* a partir de cèl·lules i estructures de suport. Consisteix en la implantació d'un teixit tridimensional format per una estructura de suport amb cèl·lules del propi pacient o d'un donant en

el teixit danyat. De la mateixa manera que en el primer dels casos, les cèl·lules que s'inclouen en el polímer, poden ser implantades directament amb el polímer en el teixit danyat, o bé cultivades prèviament amb el polímer.

En qualsevol de les estratègies descrites es poden utilitzar agents inductors, com per exemple factors bioquímics i físics estimuladors de la proliferació i diferenciació cel·lular.

2.3 EINES DE L'ET

Per a la creació d'un nou teixit, amb les mateixes característiques estructurals i funcionals que el teixit a substituir, és necessari utilitzar els components bàsics que de forma conjunta realitzen les funcions pròpies de tot teixit. Així doncs, les cèl·lules, polímers i agents inductors seran les eines o components més importants en l'ET. L'aplicació de les mateixes no sempre serà necessària i dependrà de la capacitat de regeneració espontània del teixit i del grau de lesió.

2.3.1 Les cèl·lules

La font cel·lular per ET són molt diverses, i segons els casos, es pot disposar de cèl·lules autòl·logues del propi pacient, cèl·lules al·logèniques d'un donant i xenogèniques d'una altra espècie. A la vegada, aquestes poden ser cèl·lules adultes diferenciades, cèl·lules adultes no diferenciades (cèl·lules mare adultes) i cèl·lules embrionàries (cèl·lules mare embrionàries). Entre els criteris de selecció de la font cel·lular s'ha de considerar la possibilitat de que puguin donar lloc a alguna reacció immunològica al pacient o puguin estar contaminades per patògens, el que podria descartar les al·logèniques i xenogèniques. Tot i no ser considerades com a cèl·lules aptes per a la completa regeneració de teixits, les cèl·lules xenogèniques, també poden presentar possibilitats en tractaments temporals. Un clar exemple són els estudis realitzats amb cèl·lules de fetge (hepatòcits) provinents de porc, i la

seva aplicació en malalts a l'espera d'un al·lotrasplantament de fetge. Els hepatòcits de porc realitzen les funcions del fetge danyat mitjançant la recirculació de la sang del malalt en un bioreactor extern on es troben¹⁴. El resultat és una tècnica d'ET que permet una millor mimetització de les funcions del fetge de les que pot prestar un equip de diàlisi i l'eliminació de possibles agents patògens a partir de la filtració de la sang reciclada pel bioreactor.

Altres criteris de selecció de la font cel·lular són l'accessibilitat, el nombre de cèl·lules totals que es poden obtenir, la seva capacitat de dividir-se *in vitro*, així com la seva plasticitat per donar lloc a les característiques funcionals pròpies del teixit diana.

Cèl·lules autòlogues adultes diferenciades (CAD)

La utilització de CADs, les quals ja estan programades per realitzar les funcions pròpies del teixit d'interès, pot semblar inicialment una bona opció per a la regeneració. Aquesta opció presenta certes limitacions, com són la seva accessibilitat i la seva capacitat de dividir-se *in vitro* sense perdre les característiques funcionals pròpies. Pel que fa a la seva accessibilitat, és difícil concebre, per exemple, la utilització de cèl·lules del cor (miocardiocits) per a la regeneració de lesions en teixit cardíac, per les pròpies repercussions en la salut del malalt. Contràriament, hi ha lesions en altres teixits que no presenten

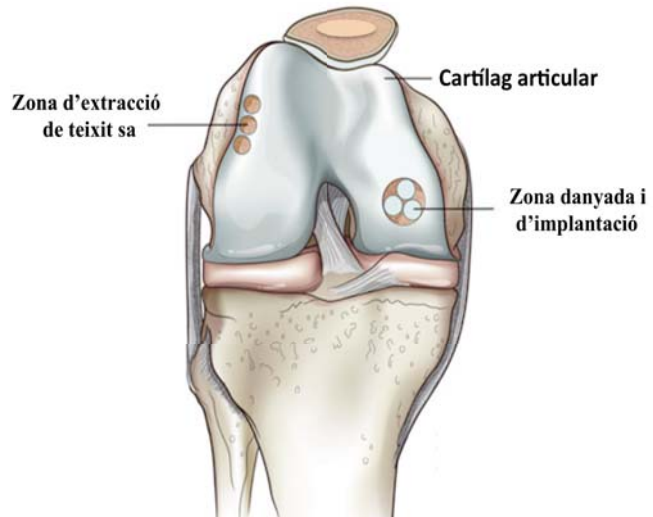


Figura 2. Representació del trasplant de cèl·lules autòlogues del cartílag. (J. Farr, 2005)

problemes d'accessibilitat i permeten aplicar

CAD. És el cas de lesions en el teixit cartilaginós, on l'extracció de cèl·lules del cartílag hialí (condrocits) és possible mitjançant una artroscòpia i les repercussions per la salut del malalt són mínimes (**Fig. 2**)¹⁵.

La capacitat de dividir-se *in vitro* sense perdre les característiques funcionals pròpies, dependrà del teixit d'origen. Les cèl·lules parenquimals, segons el criteri de divisió *in vitro*, es classifiquen en:

1. Cèl·lules de divisió làbil: Amb elevada capacitat de divisió *in vitro* (p.ex: teixit epitelial)
2. Cèl·lules estables: Amb baixa capacitat de divisió *in vitro* però amb capacitat d'estimulació (p.ex: teixit connectiu i ós)
3. Cèl·lules permanents : No es divideixen *in vitro*. (p.ex: teixit muscular)

La utilització de cèl·lules autòl·logues diferenciades queda determinada perquè presentin una bona accessibilitat, així com una alta capacitat de dividir-se *in vitro* mantenint les característiques funcionals pròpies. Un exemple de regeneració de teixit a partir de cèl·lules autòl·logues adultes és la practicada en la regeneració de teixit epitelial. Mitjançant una petita biòpsia de teixit epitelial sa del pacient es cultiven i expandeixen *in vitro* els queratinocits autòl·legs diferenciats del malalt, per a la seva implantació posterior en la zona lesionada del pacient¹⁶.

Malauradament, de forma freqüent no es disposa d'una font de CAD assequible i expandible, pel que es va començar a investigar la utilització de cèl·lules mare embrionàries i cèl·lules mare adultes.

Cèl·lules mare embrionàries (CME)

Les CME són cèl·lules que deriven de la massa interna de l'embrió en estadi de blastocit (7-14 dies). Són cèl·lules pluripotencials, és a dir, tenen la capacitat de diferenciar-se cap a les tres principals línies germinals; ectoderm, endoderm i mesoderm. Poden donar lloc a qualsevol dels més de 200 tipus cel·lulars existents en el cos humà¹⁷ (**Fig. 3**). La seva pluripotencialitat va quedar demostrada quan CME van ser injectades en ratolins immunodeprimits que van generar teratomes benignes que contenien cèl·lules de les tres capes germinals¹⁸.

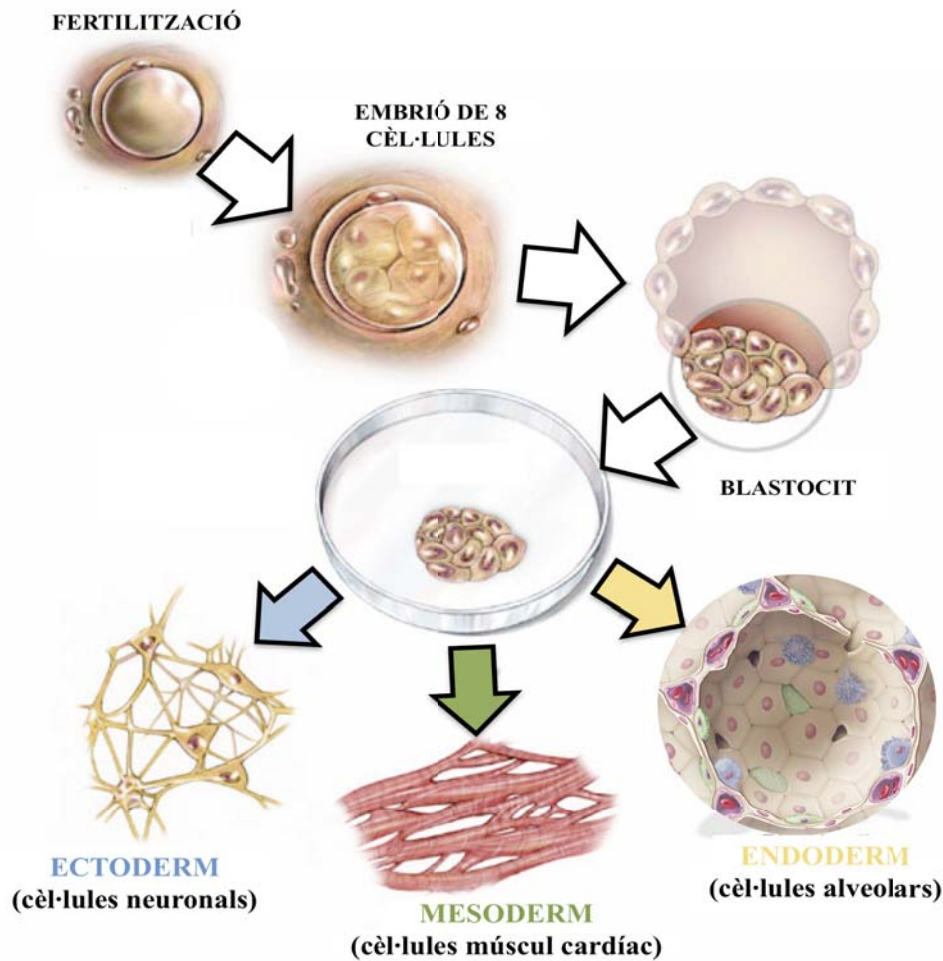


Figura 3. Pluripotencialitat de les CME (adaptat de Benjamin Cummings © 2010 Pearson Education, Inc i <http://www.stemcellresearchfoundation.org>.)

Una altra característica d'aquestes cèl·lules és que es poden cultivar *in vitro* i tenen una elevada capacitat de proliferació. Aquestes cèl·lules presenten un seguit de desavantatges. En primer lloc, les CME tendeixen a formar teratomes, tot i que una possible solució és la que suggereixen Murry i Laflamme mitjançant una selecció genètica per tal d'evitar-ne la formació¹⁹. En segon lloc, les CME presenten rebuig immunitari ja que s'han d'aplicar de forma heteròloga²⁰. Per tal de superar-lo, Odorico i col·laboradors²¹ proposen tres estratègies de manipulació genètica. La primera possibilitat seria manipular genèticament els gens dels antígens majors d'histocompatibilitat per produir línies de cèl·lules mare embrionàries humanes universals. La segona possibilitat seria reprogramar el nucli per mitjà d'una transferència nuclear per generar una font de cèl·lules embrionàries humanes autòl·logues i per últim es

proposa la inducció d'immunotolerància mitjançant el trasplantament de precursors hematopoètics derivats de les cèl·lules mare embrionàries humanes i establir així un quimerisme al moll de l'ós.

La utilització de cèl·lules mare embrionàries presenta avui dia problemes ètics i legals addicionals. Cal esmentar que el 2004 es va aprovar a Espanya el Reial Decret 2132/2004 que permet l'ús per a la investigació de cèl·lules mare embrionàries humanes a partir de preembrions congelats sobrants dels processos de fecundació *in vitro*.

Cèl·lules mare adultes (CMA)

Les CMA són cèl·lules indiferenciades que es troben en els teixits de tot mamífer adult²². La seva funció és la de proveir el cos de la necessitat de cèl·lules especialitzades mitjançant la corresponent diferenciació. Tot i que inicialment es pensava que les CMA només podien donar lloc o diferenciar-se cap a una línia cel·lular particular, actualment s'ha demostrat que moltes de les CMA que es troben en els diferents teixits, tenen la capacitat de diferenciar-se en més d'un tipus cel·lular diferent al llinatge característic del teixit en el que resideixen (**Fig. 4**). A diferència de les CME, les CMA no poden donar lloc a tots els tipus cel·lulars, pel que reben el nom de multipotents. Un tipus de CMA multipotent són les cèl·lules mare mesenquimals que es troben en pràcticament tots els teixits. Com a exemple, en trobem en teixit adipós²³, periostium^{24, 25}, membrana sinovial²⁶, múscul esquelètic²⁷, dermis²⁸, sang²⁹, moll de l'ós³⁰ i ós trabecular^{31, 32}, i es poden diferenciar en condrocits, osteoblasts, adipòcits, i molts altres tipus cel·lulars.

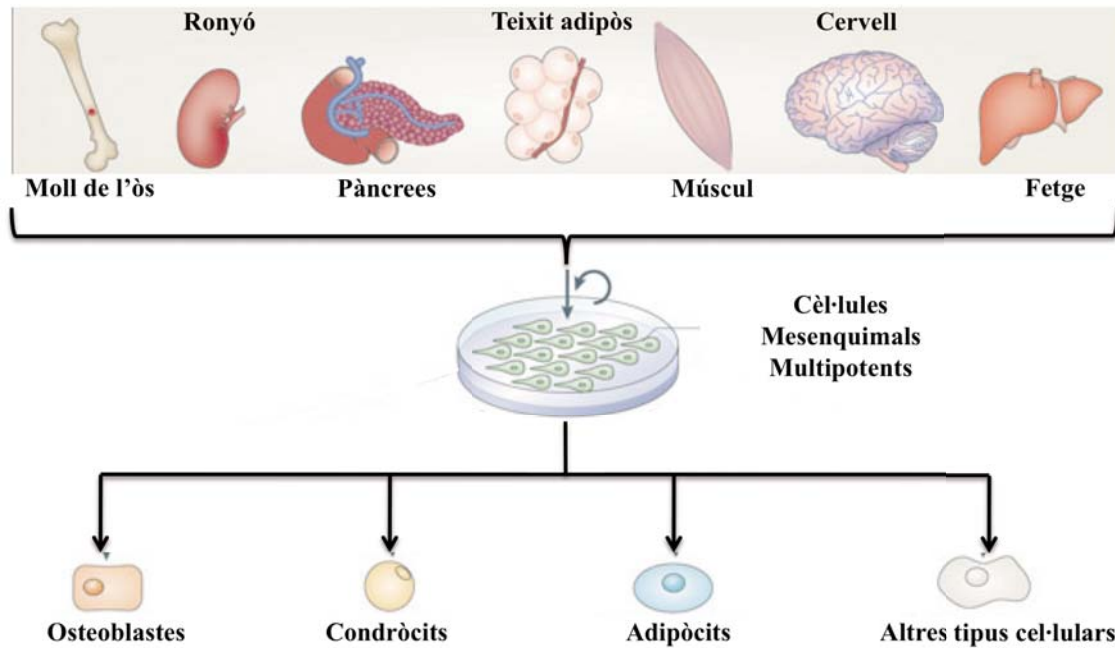


Figura 4. Origen i multipotencialitat de les CMA mesenquimals (adaptat de César Nombela-Arrieta., 2011).

No formen teratomes, no indueixen rebuig immune al ser extreïdes del propi pacient, i no existeixen repercussions ètiques ni legals. A la vegada, poden donar lloc a un gran nombre de tipus cel·lulars amb les mateixes característiques estructurals i funcionals que les cèl·lules del teixit sa a regenerar.

Inicialment, les CMA derivades del moll de l'ós han estat les més utilitzades i estudiades com a font cel·lular per a la regeneració de teixits^{33, 30, 34}. No obstant, estudis recents han demostrat que les CMA mesenquimals derivades de teixit adipós (ATDPCs, de l'anglès *adipose tissue derived progenitor cells*) presenten un seguit d'avantatges respecte de les derivades del moll de l'ós, tan pel que fa a la tècnica d'obtenció poc invasiva (lipoaspirat), com al seu rendiment (en un gram de greix s'obtenen 400 vegades més CMA que en un gram de moll d'ós³⁵).

Les ATDPCs poden ser expandides de forma estable i es poden diferenciar *in vitro* a diferents llinatges com l'osteogènic, condrogènic, adipogènic, miogènic i neural^{36, 37, 38}. A més de la capacitat de diferenciar-se a diferents llinatges, les ATDPCs es caracteritzen per l'expressió de certs marcadors de cèl·lules progenitores mesenquimals com són: CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD54,

CD71, CD90, CD105, CD106, CD117, i STRO-1. No presenten expressió de marcadors del llinatge hematopoètic, tals com: CD45, CD14, CD16, CD56, CD61, CD62E, CD104 i del llinatge endotelial com: PECAM-1, CD144 i factor de von Willebrand (vWF)^{39, 40, 38}. Una altra de les característiques de ATDPCs és la secreció de multitud de factors proangiogènics i antiapoptòtics tals com l'SDF-1 α , VEGF, el HGF o el TGF- β que podrien afavorir l'angiogènesi o conferir una certa protecció al teixit a regenerar⁴¹.

Els últims anys, les ATDPCs no només s'han obtingut del greix subcutani, sinó també d'altres zones com el greix epicàrdic. Aquest greix, envolta aproximadament el 80% de la superfície del cor⁴² i constitueix al voltant d'un 20% del pes de la massa ventricular⁴³. Tot i presentar característiques similars a les ATDPCs subcutànies pel que fa a marcadors i capacitat de diferenciació a diferents llinatges⁴⁴, s'ha hipotetitzat que pel seu contacte directe amb el cor i les evidents interaccions amb aquest, poden contenir una població de cèl·lules mesenquimals amb unes característiques úniques que podrien ser molt útils en el camp de la regeneració cardíaca. De fet, estudis recents confirmen el potencial terapèutic d'aquestes cèl·lules en la regeneració cardíaca⁴⁴.

En general i degut a les característiques òptimes que presenten les diferents ATDPCs com a eina terapèutica en l'ET, s'ha estudiat el seu potencial entre d'altres en la regeneració muscular⁴⁵, óssea⁴⁶, cardíaca⁴⁷ i del sistema nerviós⁴⁸. En tots els casos s'han obtingut resultats esperançadors, tot i que encara falten definir aspectes tals com el tipus d'ATDPCs a utilitzar, el nombre i forma d'aplicació de les cèl·lules, així com el seu mecanisme terapèutic⁴⁹.

Una altra de les fonts de CMA mesenquimals són les derivades de la sang de cordó umbilical (UCBMSCs de l'anglès *Umbilical cord blood mesenchymal stem cells*). Aquestes cèl·lules, tot i no estar tan estudiades com les derivades de moll d'ós i les ATDPCs, presenten característiques similars tan en l'expressió de marcadors de superfície⁵⁰ com en la seva capacitat de diferenciació a diferents tipus cel·lulars^{51, 52, 53}. Presenten diferències pel que fa a la seva menor immunogenicitat en comparació a les derivades de moll d'ós, com a conseqüència del seu origen^{54, 55, 56}, el que permet plantejar l'aplicació heteròloga d'aquestes cèl·lules. Una altra de les diferències observades respecte a les cèl·lules mesenquimals d'altres orígens, és l'elevada capacitat de

proliferació sense presentar indicis de senescència ni canvis morfològics en períodes llargs de cultiu^{57, 58}.

2.3.2 Estructures de suport

Els polímers proporcionen una estructura en la que les cèl·lules poden generar un sistema tissular. La majoria d'estudis suggereixen que els polímers són essencials per produir la regeneració ordenada del teixit, al servir com a guia del seu desenvolupament^{59, 60}. Tot i que les cèl·lules aïllades tenen la capacitat de formar l'estructura tissular corresponent, aquesta reconstrucció és limitada, ja que no presenten capacitat intrínseca d'organització tissular.

De forma general, un polímer com a eina per ET, ha de presentar un seguit de propietats⁶¹:

1. Estar compost per un material biocompatible, és a dir, que no sigui citotòxic.
2. Actuar com a suport pel creixement del teixit en tres dimensions.
3. Permetre la penetració cel·lular per a la formació de nou teixit i la correcta vascularització.
4. Integrar-se al teixit hoste sense la formació de cicatriu.
5. Presentar una textura superficial i composició química que promogui l'adhesió cel·lular i l'adsorció de molècules biològiques com els factors de creixement.
6. Desaparèixer a la vegada que es repara el teixit danyat, generant productes de degradació no tòxics que puguin ser fàcilment eliminats o metabolitzats.
7. Presentar propietats mecàniques adaptades a les necessitats del teixit a regenerar.
8. Produir-se comercialment sota les regulacions existents i amb un cost que permeti el seu us de manera rutinària.
9. No alterar el potencial clonogènic i proliferatiu de les cèl·lules troncales que es cultivin conjuntament en el material.

Actualment, la quantitat i varietat de polímers que presenten les característiques esmentades són considerables. De forma general, els polímers es diferencien en funció de si tenen un origen natural o sintètic. Les avantatges pròpies dels polímers naturals i sintètics són detallades a la **taula 1**.

Taula 1. Principals característiques dels polímers naturals i sintètics

POLÍMERS NATURALS	POLÍMERS SINTÈTICS
Millor adhesió cel·lular	La seva fabricació és reproducible
Major capacitat de promoure diferenciació cel·lular	Poden ser dissenyats per degradar-se controladament
Capacitat d'induir senyals de reconeixement en les cèl·lules	Normalment tenen una menor resposta immune i toxicitat

Estructures de suport (polímers) d'origen natural

1. **Col·lagen:** La seva aplicació en ET és molt habitual al ser la proteïna

més abundant en els teixits de mamífers i el principal component de les matrius extracel·lulars *in vivo*. Hi ha almenys 19 tipus de col·làgens diferents, però l'estructura bàsica de tots ells és la de tres cadenes polipeptídiques, que s'enrotllen entre si per formar una estructura helicoidal (**Fig. 5**). Són el principal element estructural de la matriu extracel·lular, proporcionant la forma i dotant de força i flexibilitat els teixits. El tipus de col·lagen present en la matriu extracel·lular condiona les seves propietats físiques i biomecàniques. La polimerització del col·lagen per a la formació del

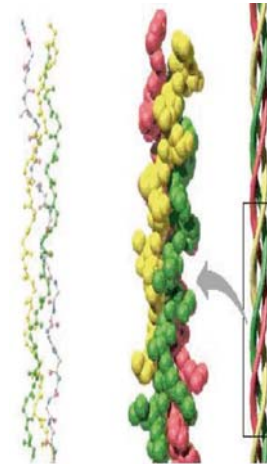


Figura 4. Imatge representativa de l'estructura de col·lagen (Addison Wesley Longman, Inc)

polímer pot ser duta a terme introduint varies unions químiques creuades

(p.ex glutaraldehyd, formaldehyd)⁶², per unions creuades mitjançant tractaments físics (p.ex irradiació per UV o calor)⁶³ i per combinacions amb altres polímers (p.ex àcid hialurònic, àcid polilàctic, chitosan, polietilenglicol)⁶⁴. El col·lagen és degradat naturalment per metaloproteases i serin proteases, marcant el seu grau de degradació la concentració d'aquests enzims. Al tractar-se d'una macromolècula present en els teixit humans, els productes de la seva degradació no presenten toxicitat ni reacció immunològica.

2. **Àcid Hialurònic:** És el glicosaminoglicà més simple i es troba en quasi tots els teixits i fluids de mamífers. És un polisacàrid lineal compost per la repetició d'un disacàrid (**Fig. 6**) format per β -D-àcid glucorònic i *N*-acetil- β -D-glucosamina units per enllaços β (1-3) i (1-4) respectivament. La formació del polímer es realitza mitjançant la unió creuada covalent amb derivats hidrazida⁶⁵, per esterificació i anil·lació⁶⁶. Adicionalment, l'àcid hialurònic s'ha combinat amb col·lagen i alginat^{67, 68}.

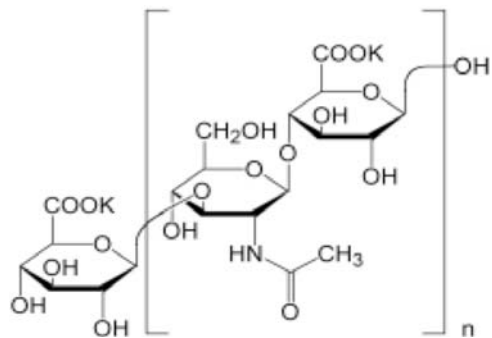


Figura 6. Estructura molecular de l'àcid hialurònic.

L'àcid hialurònic es degrada naturalment per hialuronidases, pel que la velocitat de degradació dependrà de la concentració d'aquests enzims. Al tractar-se d'una macromolècula present en els teixit humans, els productes de la seva degradació no presenten toxicitat ni reacció immune.

3. **Alginat:** S'ha utilitzat en una gran varietat d'aplicacions mèdiques com l'encapsulació de cèl·lules i com agent estabilitzador de medicaments, per la fàcil polimerització amb agents poc agressius i la seva baixa toxicitat. És un polisacàrid lineal format pel copolímer de D-àcid manurònic (M) i α -L-àcid gularònic (G), units per enllaços glucosídics β (1-4) en unions G-G i α (1-4) en unions G-M (**Fig. 7**). El seu origen pot ser tan d'algues marrons i bacteris⁶⁹. La polimerització es produeix per la

interacció de cations bivalents (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+}) amb blocs de monòmers G, formant ponts iònics entre les diferents cadenes del polímer. La degradació del polímer es produeix a mesura que es dissocien els cations bivalents de les cadenes de monòmers de G, pel que la velocitat de degradació dependrà de la concentració tan del ió bivalent com de la de l'alginat. Els productes de degradació s'han descrit com a no tòxics i amb baixa reacció immunològica⁷⁰.

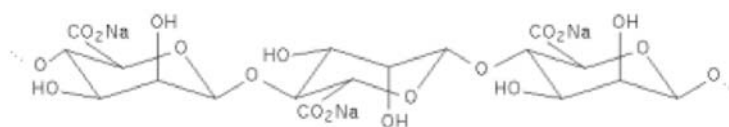


Figura 7. Estructura molecular de l'alginat de sodi.

4. **Chitosan:** S'ha investigat en moltes aplicacions d'ET per la seva similitud estructural amb els glicosaminoglicans i per la capacitat de ser degradat per enzims que es troben en humans (lisozims). És un polisacàrid lineal de (1-4) D-glucosamina i N-acetil-D-glucosamina derivat del polímer natural chitina (**Fig. 8**), que es troba en l'exoesquelet dels artròpods. Els graus de puresa actuals del chitosan presenten nivells tan baixos d'endotoxines que permeten la seva utilització en biomedicina i aplicacions farmacèutiques^{71, 72}. El chitosan és soluble en solucions àcides que produeixen la protonació dels grups amino lliures. Un cop dissolt, la polimerització es pot dur a terme augmentant el pH⁷³ o a partir d'una solució orgànica⁷⁴. La seva degradació és causada per lisozim, pel que la velocitat de degradació dependrà de la concentració de chitosan i del grau de desacetilació, així com de la concentració de lisozim present. Els productes de la seva degradació no presenten toxicitat i la reacció immune no s'aprecia per l'alt grau de puresa⁷⁵.

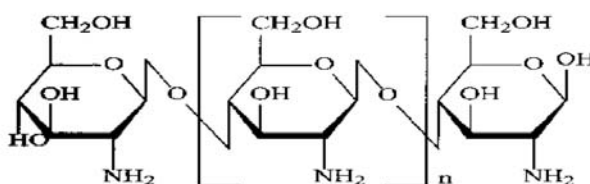


Figura 8. Estructura molecular del chitosan.

5. **Fibrina:** És un polímer àmpliament utilitzat en medicina que es genera de forma natural en els organismes per aturar una hemorràgia o pèrdua de sang produïda per la ruptura de la paret vascular. Aquest mecanisme s'anomena hemostàsia o coagulació sanguínia. En el moment en què es produeix una lesió, els trombòcits s'acumulen al lloc del dany, s'adhereixen entre si i formen una agregació plaquetària, tot segregant substàncies vasoconstrictores. És el que es coneix com a hemostàsia primària i no aconsegueix un tancament estable de la ferida. Seguidament, en l'hemostàsia secundària, la proteïna fibrina forma una xarxa insoluble, el trombe, que tanca la ferida fins a la cicatrització del teixit. El sistema de coagulació és un procés regulat a través d'una cascada enzimàtica composta per sis factors de coagulació (FII, FVII, FIX, FX, FXI, FXII), una transpeptidasa (FXIII), tres factors auxiliars no enzimàtics (FIII, FV, FVIII) i el fibrinogen o FI (substrat de la proteòlisi). Aquests factors de coagulació funcionen com a zimògens, de manera que la forma activada d'un factor catalitza l'activació del següent. Aquesta activació en forma de cascada enzimàtica proteolítica assegura una resposta molt ràpida. Totes aquestes reaccions acaben amb l'activació de la trombina (FIIa), capaç de transformar el fibrinogen, molt abundant en el flux sanguini, en fibrina per formar el trombe un cop aquesta s'ha estabilitzat per acció del factor XIII (**Fig. 9**). La fibrina humana es pot obtenir clínicament del propi pacient⁷⁶ i de crioprecipitats de plasma sanguini comercials (Baxter Healthcare Corp., Glendale, California). És un polímer que presenta el certificat d'aprovació per la FDA (Food and Drug Administration) i és utilitzat en gran nombre d'aplicacions mèdiques⁷⁷. La seva degradació es produeix per acció de la plasmina, enzim del propi cos humà encarregat de la disgregació de la fibrina un cop s'ha regenerat la zona danyada. Al tractar-se d'una macromolècula present en els teixits humans, els productes de la seva degradació no presenten toxicitat i la reacció immune no es considera quan la seva obtenció és autòloga. En els casos en què la fibrina és obtinguda heteròlogament, no s'han apreciat reaccions immunes com a conseqüència del seu alt grau de puresa⁷⁸.

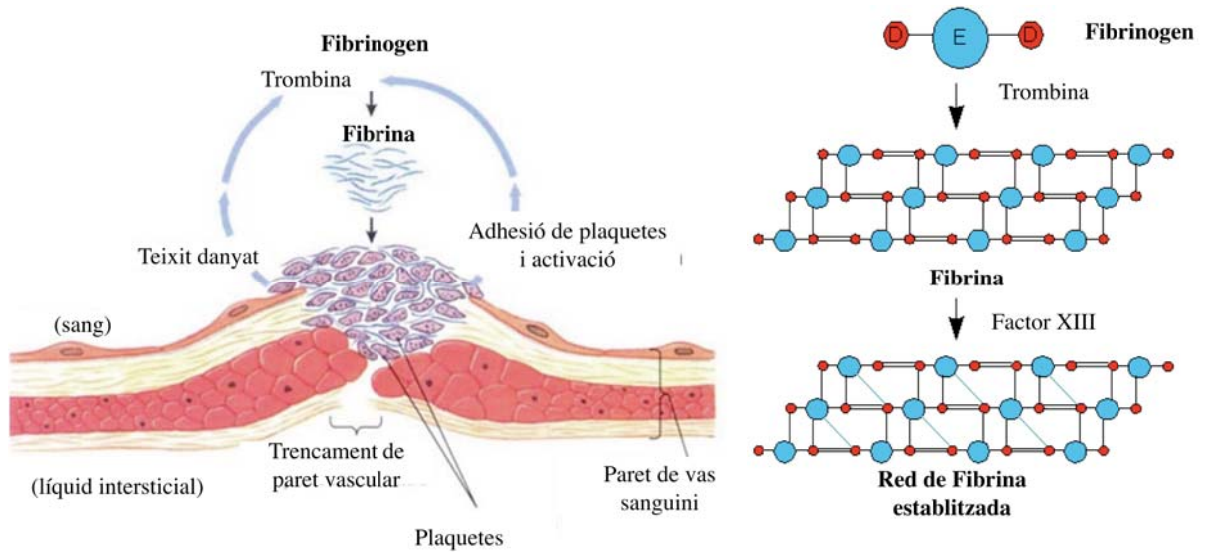


Figura 9. Imatge esquerra procés biològic de formació de la fibrina. Dreta, representació dels canvis en l'estructura del fibrinogen per acció de la trombina i el factor XIIIa per a la formació de la fibrina (adaptat de Audesirk et al., 2003).

Estructures de suport (polímers) d'origen sintètic.

Els polímers sintètics més utilitzats en ET són aquells que ja tenen una llarga trajectòria pel que fa a la seva aplicació en medicina i presenten l'aprovació de la FDA com a biomaterials. En aquest sentit, trobem els polilàctics amb una gran aplicació en medicina com a fils i films per a la fixació d'ossos i sutures⁷⁹, els polièsters com el poliglicòlic (**Fig. 10**) i el poli-L-Lactic-co-glicòlic (**Fig. 11**), molt comuns com a sutures biodegradables des del 1980⁸⁰, els polieteresters com la polidioxanona (**Fig. 12**) aplicada en el camp dels medicaments com a transportador⁸¹ i el polihidroxietilmetacrilat⁸²(**Fig. 13**).

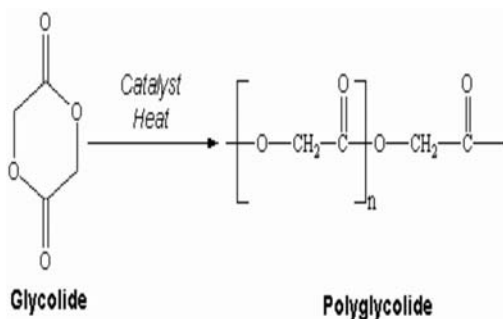


Figura 10. Estructura molecular del poliglicòlic

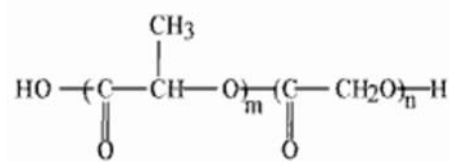


Figura 11. Estructura molecular del poli-L-Lactic-co-glicòlic on el component "m" representa l'àcid làctic i el component "n" representa l'àcid glicòlic

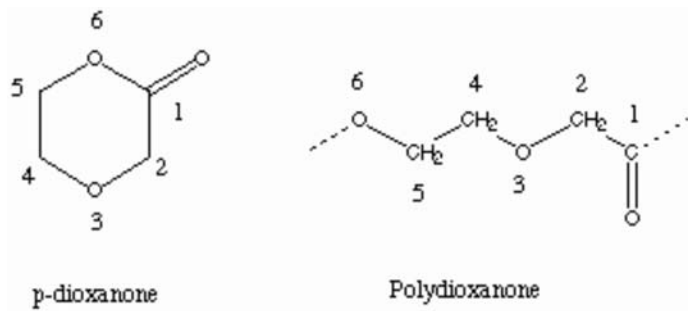


Figura 12. Estructura molecular de la Polidioxanona

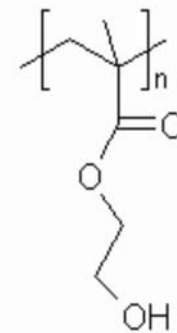


Figura 13. Estructura molecular del polihidroxiètilmetacrilat

Els polímers també poden ser classificats en funció del seu estat. Actualment, es poden presentar en estat sòlid o en forma d'hidrogel. En estat sòlid trobem el que es coneix com a malla⁸³ i esponja⁸⁴. Els polímers sòlids presenten característiques reproduïbles pel que fa a la mida de porus de la matriu. Els polímers en forma d'hidrogel miren de mimetitzar les característiques pròpies de la matriu extracel·lular que trobem en els diferents teixits i òrgans, caracteritzada per una elevada hidratació (més del 30% del seu pes). La principal avantatge que presenten és la capacitat de mantenir un estat líquid fins el moment de la seva polimerització al entrar en contacte amb agents polimeritzadors, tals com canvis de pH, temperatura, etc. Així doncs, l'estat líquid del polímer ens permet l'administració del polímer a la zona de la lesió mitjançant procediments poc invasius pel pacient (p.ex: artroscòpia)⁸⁵.

2.3.3 Reguladors bioquímics i físics

Els reguladors bioquímics i físics com a eina de l'ET, s'utilitzen com a moduladors de la proliferació cel·lular, la diferenciació i la migració cel·lular^{86, 87},

Reguladors químics o factors solubles

Els reguladors bioquímics són diferents compostos biològics (proteïnes, hormones, vitamines), que s'uneixen a receptors de la membrana cel·lular i provoquen un seguit de cascades de senyals intracel·lulars que derivaran amb l'activació de la proliferació cel·lular i/o la diferenciació cel·lular i/o la migració cel·lular (**Fig. 14**).

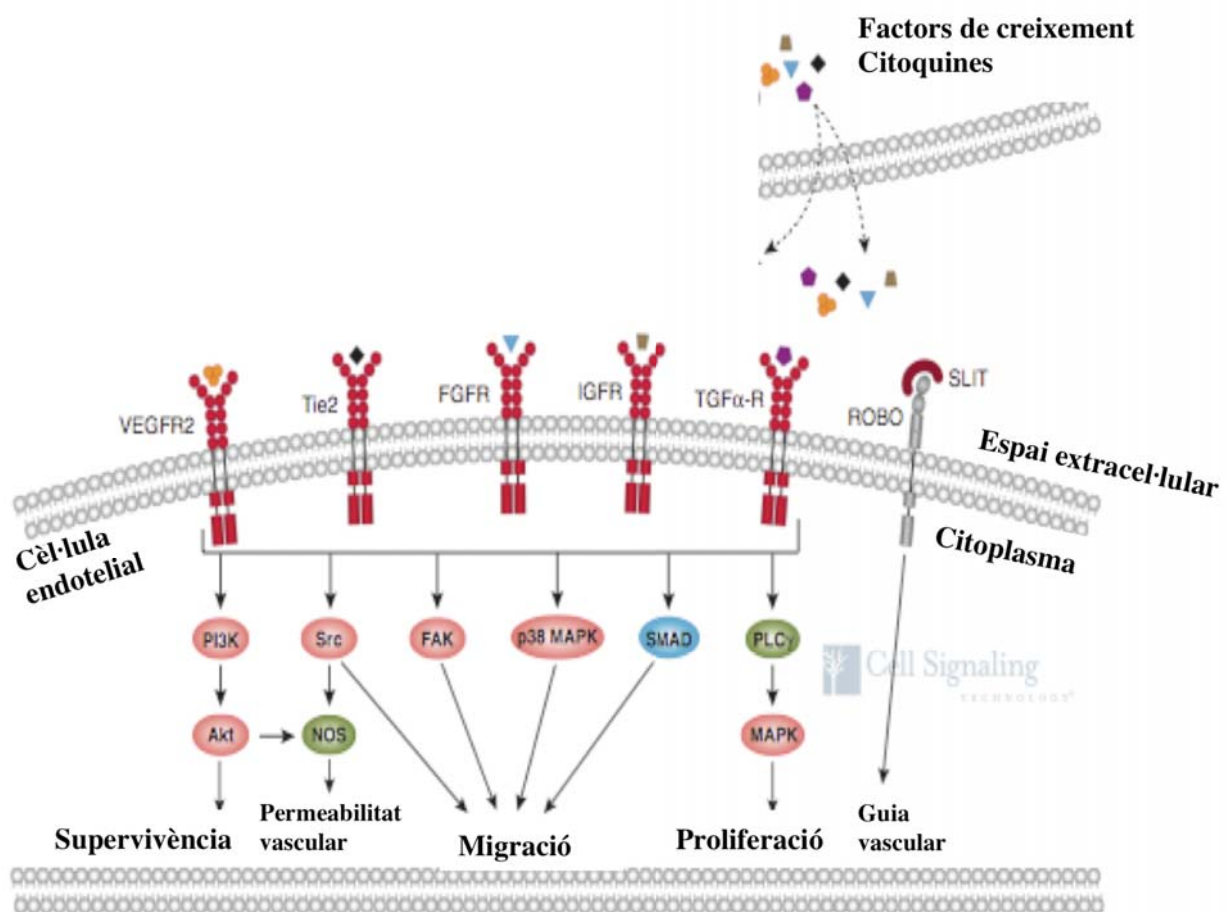


Figura 14. Esquema de les interaccions dels factors solubles amb els receptors de membrana de cèl·lules endotelials i la posterior cascada de senyals. (Cell signaling technology, Inc., 2008)

Els reguladors bioquímics que s'utilitzen actualment són els factors de creixement i les citoquines. La quantitat de factors de creixement i citoquines que es coneixen i utilitzen, així com la seva varietat pel que fa a la seva activitat és molt gran^{89, 90, 91}.

Els reguladors físics

Els reguladors físics representen totes aquelles forces externes que es poden aplicar en una cèl·lula, ja sigui mitjançant la força de cizalla exercida al fer circular un fluid, la pressió exercida per un element sòlid o l'estimulació al aplicar un corrent elèctric i que provoquen una resposta cel·lular en forma de migració cel·lular⁹² i/o proliferació cel·lular⁹³ i/o diferenciació cel·lular^{94, 95}.

El procés mitjançant el qual les cèl·lules interpreten les forces físiques i les tradueixen per adoptar els canvis cel·lulars corresponents, és encara avui dia desconegut en la seva major part. Es creu que una proteïna clau de la membrana extracel·lular actua com un mecanosensor i mecanotransductor. La combinació de les dues funcions permetria convertir una senyal física en una de química que desencadenaria una cascada de senyals intracel·lulars que determinarien els canvis cel·lulars específics⁹⁶.

En la **figura 15**, es mostra gràficament la hipòtesi de la conversió d'una senyal física extracel·lular en una de química intracel·lular.

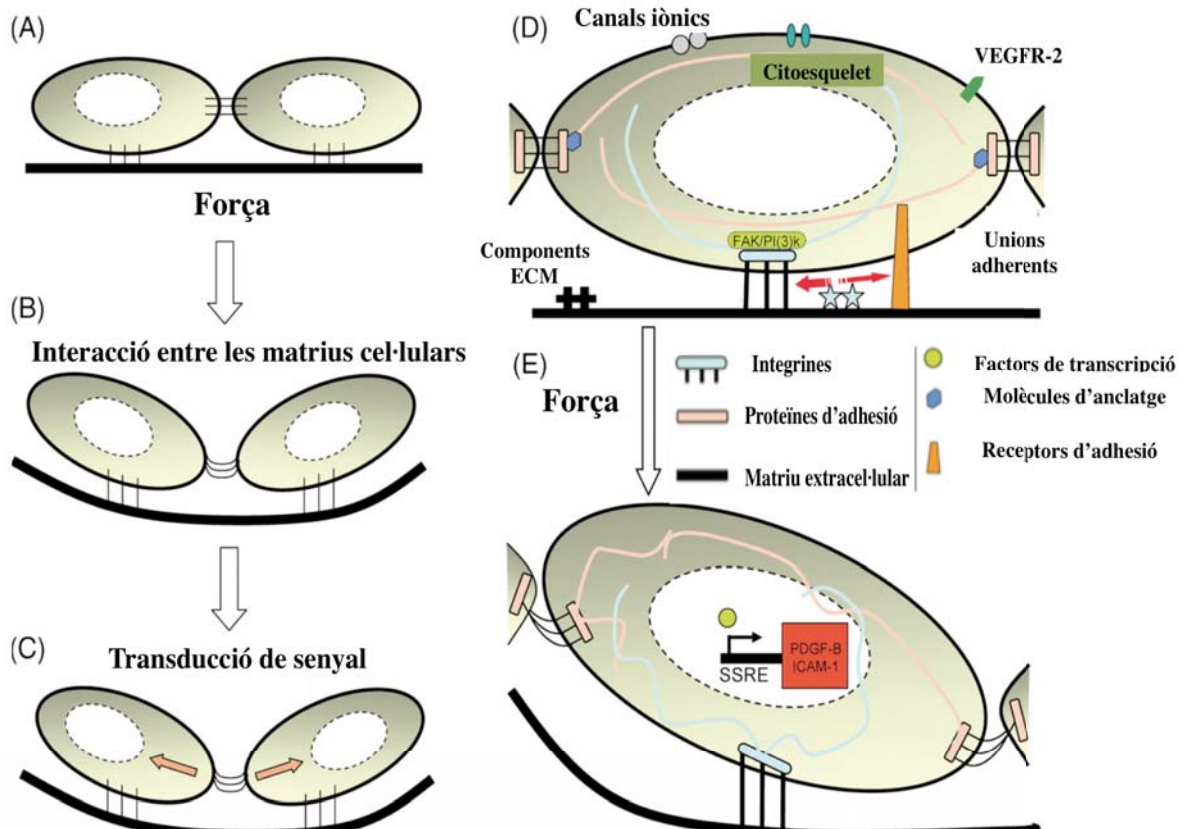


Figura 15. Representació esquemàtica de com les forces mecàniques es tradueixen en senyals intracel·lulars. Forces de pressió que donen com a resultat canvis en la morfologia cel·lular (A-C). Com a conseqüència, el citoesquelet pateix canvis conformacionals que activen respostes funcionals a l'estrès mecànic (D-E). Les respostes funcionals inclouen l'activació de factors de creixement, factors de transcripció i canals iònics (le Noble F et al., 2008).

3 MONITORATGE CEL·LULAR *IN VIVO*

Les possibles combinacions en ET són múltiples i variades, per tant és convenient aplicar tècniques d'anàlisi eficients que ens permetin estudiar totes les variables possibles amb una fiabilitat, cost i temps òptims. A la vegada, ens haurien de permetre determinar la validesa de la teràpia mitjançant un anàlisi *in vivo* a temps real, on a diferència dels anàlisis *in vitro*, es reproduïx adequadament la complexitat de les interaccions que tenen lloc en els teixits. Les tècniques d'anàlisi que millor s'ajusten a les necessitats esmentades són les d'imatge. Per definició, les plataformes d'imatge ideals haurien de presentar les característiques següents⁹⁷:

1. Biocompatibilitat (seguretat i no toxicitat).
2. Sensibilitat (capacitat de detectar una sola cèl·lula).
3. Quantificació (permetre el comptatge del nombre de cèl·lules).
4. Ha d'evitar la dilució del reporter amb la proliferació cel·lular.
5. Procediment no invasiu quan sigui possible.

Els sistemes d'imatge aplicables a aquesta finalitat es poden agrupar segons l'energia que utilitzen i la necessitat o no d'utilitzar traçadors per obtenir la informació visual (raigs X, raigs gamma, positrons, fotons o ones acústiques), segons la resolució espacial que aconseguixen (macroscòpica, mesoscòpica o microscòpica) o bé segons el tipus d'informació que s'obté (anatòmica, fisiològica, cel·lular o molecular). Els sistemes d'imatges macroscòpics que donen informació anatòmica i fisiològica són actualment molt utilitzats en clínica i preclínica. Exemples d'aquest tipus d'imatge són la tomografia computeritzada (CT), les imatges de ressonància magnètica⁹⁸ i els ultrasons. Per altra banda, hi ha els sistemes que donen informació molecular, dels quals només alguns es troben en ús clínic o preclínic, com la tomografia d'emissió de positrons (PET), la CT d'emissió d'un sol fotó (SPECT), la fluorescència de reflectància, la tomografia mitjançada per fluorescència (FMT), la microscòpia de fibra òptica, les imatges de dominis de freqüència òptica, la bioluminescència, la microscòpia confocal d'escaneig per làser i la microscòpia multifotó.

Per aconseguir que aquestes tecnologies d'imatge s'adaptin àmpliament i perquè siguin complementàries a d'altres tipus de mesures moleculars, els resultats obtinguts de la seva lectura han de complir certs criteris; han de ser quantitatius, amb alta resolució, longitudinals (que permetin les imatges al llarg del temps), exhaustius, normalitzables, digitals i sensibles a les pertorbacions moleculars del sistema.

La quantificació és absoluta en aquelles tècniques on els senyals són independents de la posició a la mostra (p. e. CT, FMT, MRI i PET) i la informació és quantificable de manera intrínseca. La quantificació és relativa, en canvi, quan s'obté a partir de la informació d'imatges on el senyal és dependent tant de la fondària com del tipus de mostra, però es pot validar

experimentalment. En aquest últim grup, hi trobem la bioluminescència (BLI), la fluorescència reflectant i la microscòpia multifotó.

Com cada tecnologia té els seus avantatges i les seves limitacions (**Taula 2**), s'han desenvolupat plataformes que combinen diferents tecnologies i que permeten sobrepassar moltes de les limitacions que implica una sola tècnica. Per exemple, hi ha estudis on es combinen el PET, la fluorescència i la BLI⁹⁹.

Taula 2. Avantatges i inconvenients de les diferents tècniques d'imatge segons la seva resolució, el seu límit de fondària, el temps, si és quantitatiu, si utilitza o pot utilitzar més d'un canal, si es pot utilitzar amb animals i si té una aplicació en la clínica. (Adaptada de Massoud, T.F., 2003)

TÈCNICA	RESOLUCIÓ	FONDÀRIA	TEMPS	QUANTITATIU	MÉS D'UN ANIMAL	ÚS EN ANIMALS	ÚS CLÍNIC
MRI	10-100 µm	Sense límit	Minuts a hores	Sí	No	Anàlisi fisiològic/molecular i anatòmic	Sí
CT	50 µm	Sense límit	Minuts	Sí	No	Pulmons i ossos	Sí
Ultrasò	50 µm	cm	Segons a minuts	Sí	No	Vascular i imatges per intervenció	Sí
PET	1-2 mm	Sense límit	Minuts a hores	Sí	No	Modalitat d'imatge versàtil amb molts traçadors	Sí
SPECT	1-2 mm	Sense límit	Minuts a hores	Sí	No	Anticossos, proteïnes i pèptids marcats	Sí
FLUORESC	2-3 mm	<1 cm	Segons a minuts	No	Sí	Processos en malalties basats en superfície	Sí
FMT	1 mm	<10 cm	Minuts a hores	Sí	Sí	Imatges quantitatives	En desenvolupament
BLI	Varis mm	cm	Minuts	Sí	Sí	Expressió gènica, i migració cel·lular	No

3.1 MRI

Aquest tipus d'imatge és una tècnica mèdica no invasiva que utilitza el fenomen de la ressonància magnètica per obtenir informació sobre les estructures i composició de l'organisme a analitzar (**Fig. 16**). Aquest fenomen es basa en el fet que els nuclis atòmics d'un nombre senar de protons, en estar sotmesos a un camp magnètic potent, absorbeixen selectivament ones de radiofreqüència. Els nuclis habitualment detectats en aquesta tècnica són els protons dels nuclis d'hidrogen que es troben en abundància a les molècules aquoses del cos humà. Quan s'envien ones de determinada radiofreqüència (no ionitzants) a un cos col·locat a l'interior d'un potent iman, el moment magnètic dels seus protons, alineats per efecte del camp magnètic, poden absorbir aquesta energia si coincideix amb la requerida per un canvi de nivell quàntic del protó. Quan el moment magnètic dels protons es torna a alinear espontàniament, emeten una ona electromagnètica (de radiofreqüència) de la mateixa energia que l'absorbida, que es pot detectar mitjançant una antena i un amplificador de ràdio. Això permet l'anàlisi de la capacitat de magnetització de la mostra.



Figura 16. MRI de cos sencer (<http://www.melissamemorial.org>)

Els protons de l'aigua dels diferents teixits del cos, al estar associats a diferents macromolècules, modifiquen la freqüència de ressonància amb el camp magnètic extern, en relació amb l'aigua pura. L'anàlisi d'aquestes diferències, mitjançant un procediment de rastreig, genera informació que permet reconstruir una imatge de l'estat de magnetització de l'aigua en diferents parts de la mostra i permet detectar anormalitats en els diferents teixits¹⁰⁰. Tot i que no provoca efectes nocius, una de les limitacions més importants és que és molt menys sensible que les tècniques amb radioisòtops com el PET, que pot detectar 10^{-12} molècules/L de substrat radioactiu, o com la BLI, que detecta en el rang del femtomol (10^{-15}).

3.2 PET

Aquesta tècnica d'imatge mèdica, no invasiva, proporciona una imatge tridimensional o un mapa amb l'activitat metabòlica dels diferents teixits del cos; és a dir, el PET no avalua la morfologia dels teixits directament, sinó el seu metabolisme. Es basa en detectar i analitzar la distribució que adopta a l'interior del cos un radioisòtop administrat intravenosament.

Per a generar imatges, s'administra la substància traçadora (generalment una molècula biològicament activa) unida a un isòtop que emet positrons. La interacció d'un electró i un positró emès resulta en la neutralització d'ambdós i en l'alliberació de dos raigs gamma d'alta energia, que viatgen en direccions oposades. La detecció simultània d'aquests raigs gamma per detectors oposats, permet establir una direcció d'emissió. El còmput de múltiples d'aquestes direccions permet generar una imatge tridimensional de la posició de l'isòtop emissor¹⁰¹.

Una de les molècules més utilitzades per PET és la fluorodesoxiglucosa (FDG), un sucre que unit a un traçador, permet quantificar el consum de glucosa. És una tècnica molt utilitzada en la detecció de teixits neoplàstics, ja que una característica important d'aquests teixits és el seu elevat consum de glucosa. El PET permet localitzar focus de creixement cel·lular anormal a l'organisme, així com exploracions en cardiologia, neurologia i psicobiologia.

Actualment, s'està començant a utilitzar el PET com a tècnica no invasiva pel seguiment *in vivo* de cèl·lules. Amb aquesta finalitat, les cèl·lules que volen ser monitoritzades, són prèviament transfectades amb un gen reporter que expressa constitutivament la timidina quinasa (TK). La monitorització d'aquestes cèl·lules per PET, es realitza a partir de la injecció



Figura 17. Imatge per PET amb localització cèl·lules marcades (*tk*) i injectades en ventricle esquerre de porc (Gyongyosi, M. et al., 2008).

del reporter [^{18}F]9-(4-[^{18}F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)-guanine ([^{18}F]FHBG)), el qual al ser fosforilat per la timidina quinasa queda retingut de forma intracel·lular, fent-se visible per PET¹⁰² (**Fig. 17**) .

Una de les màximes limitacions del PET és l'elevat cost pel que fa al manteniment dels ciclotrons, necessaris per a produir els radioisòtops i a la necessitat de tenir a l'abast els aparells de síntesi química per produir els isòtops units a les molècules d'interès, que degut a la vida mitja tant curta dels traçadors, s'han de generar *in situ*.

3.3 CT

Es basa en el còmput d'una imatge tridimensional (tomogràfica) a partir de múltiples imatges de raigs X, preses a diferents angles al voltant d'un espècimen¹⁰³. Aquesta tècnica s'ha utilitzat en el diagnòstic de patologies com tumors cerebrals, embòlies, hidrocefàlies, etc.

Són proves fàcils de realitzar que ofereixen imatges amb molta nitidesa, però a vegades necessiten substàncies de contrast intravenós i, com que s'utilitza radiació ionitzant, se n'han de tenir en compte els efectes.

3.4 ULTRASONS

S'utilitzen molt en clínica pel seu baix cost, així com per la seva disponibilitat i seguretat i per això s'han fet servir per obtenir imatges del cos durant els últims 50 anys. La generació d'imatges mitjançant aquest procediment consisteix en l'anàlisi d'ones de so de freqüència molt alta, per les quals cada teixit té un índex de refracció diferent¹⁰⁴. Permet visualitzar estructures normals i patològiques a temps real. També s'han utilitzat àmpliament per veure els fetus. Aquest sistema també ha tingut èxit en models de ratolí.

3.5 TÈCNIQUES ÒPTIQUES D'IMATGE

3.5.1 Fluorescència

La fluorescència és la propietat que tenen algunes substàncies per emetre llum quan són exposades a radiacions de tipus ultraviolada o raigs X. Aquestes molècules (fluoròfors) són capaces d'absorbir fotons d'una determinada longitud d'ona i d'emetre, entre 10^{-9} a 10^{-6} segons més tard, energia amb una longitud d'ona major (de més baixa energia). La diferència d'energia entre els fotons absorbits i emesos es converteix en vibracions moleculars o calor. Normalment, els fotons absorbits es troben dins del rang de la llum ultraviolada i la llum emesa dins del rang del visible, però això depèn de la corba d'absorbància i del mateix fluoròfor. Aquest fenomen es va conèixer a mitjans del segle XIX i es va adaptar per microscòpia al segle XX.

Un exemple molt conegut de fluoròfor és la proteïna verda fluorescent (GFP, de l'anglès *green fluorescent protein*) obtinguda a partir de la medusa *Aequorea victoria*, que emet a 509 nm (llum verda) quan s'excita amb llum ultraviolada (395 nm). Hi ha una variant, l'eGFP (de l'anglès *enhanced GFP*), que té un sistema d'expressió més optimitzat per mamífers i un espectre d'excitació desplaçat cap a longituds d'ones més llargues (488 nm), fet que fa que s'obtingui més fotoestabilitat i un augment en la seva intensitat d'emissió de 35 vegades respecte a la nativa^{105,106}. També se n'han fet mutants que varien en la seva emissió, donant lloc a emissions grogues, cian i blaves.

Un altre fluoròfor àmpliament utilitzat és la proteïna vermella fluorescent (RFP, de l'anglès *red fluorescence protein*) clonada a partir del corall *Discosoma sp.* Aquesta proteïna té la limitació de trobar-se en forma de tetràmer, per tant, no és útil per veure localització cel·lular, ja que solen formar agregats intracel·lulars. La versió monomèrica de la proteïna vermella (mRFP1), obtinguda mitjançant una combinació de mutacions del tetràmer, madura 10 vegades més ràpid i té emissió mínima quan s'excita a longituds d'ona òptimes per a la GFP. Això fa, per tant, que la mRFP1 sigui molt adient per a les construccions de fusions multicolors en combinació amb la GFP. Aquesta variant té l'inconvenient de produir només el 25% de la fluorescència que

emeten altres variants¹⁰⁷. Actualment s'estan emprant anàlegs no naturals d'aquest monòmer per tal de millorar-ne les característiques^{108,109}.

El camp de les proteïnes fluorescents continua molt actiu. Actualment, s'estan millorant tant les variants provinents de la medusa com les del corall¹¹⁰.

L'aplicació més important de les proteïnes fluorescents és com a traçadors biològics. S'introdueixen en forma de gen per mitjà dels vectors d'expressió i les proteïnes produïdes permeten el seguiment, molt sensible i precís, de la localització, proliferació i capacitat d'expressió gènica de les cèl·lules marcades, mitjançant l'ús de procediments de microscòpia fluorescent i confocal. La seva sensibilitat de detecció es troba entre el rang nano i picomolar.

L'avantatge principal de les molècules fluorescents com a traçadors és el seu elevat rendiment quàntic (fotons produïts/ fotons absorbits) i que no necessiten substrats. El principal inconvenient fa referència a la baixa penetració de la llum ultraviolada i, en general, de baixa freqüència a través dels teixits, degut a l'absorció per proteïnes, àcids nucleics i altres substàncies. Aquest problema s'agreuja pel fet que degut a l'abundància de molècules autofluorescents en els teixits, l'emissió està contaminada amb un soroll de fons significatiu. Com a conseqüència, fins ara, no han estat possibles els procediments d'imatge no invasius utilitzant la fluorescència i, per tant, queda limitada als procediments histològics. Els recents reporters fluorescents dins l'espectre d'infraroig, però, són molt interessants perquè a aquestes longituds d'ona augmenta la penetració en els teixits i disminueix l'autofluorescència no específica¹¹¹ (**Fig. 18**).

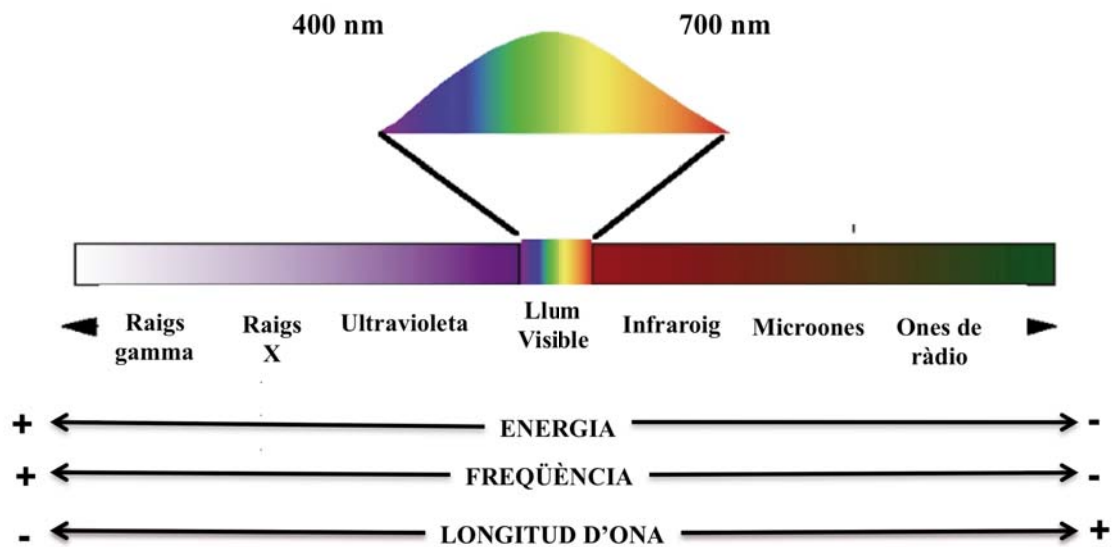


Figura 18. Representació de l'espectre electromagnètic des dels raigs gamma fins a les ones de ràdio i la seva relació amb l'energia, freqüència i longitud d'ona (adaptat de <http://www.lpi.usra.edu>)

3.5.2 BLI

Les imatges *in vivo* per BLI són una eina sensible, resultat de l'emissió de llum a partir de cèl·lules o teixits. Aquesta emissió de llum és conseqüència de la reacció d'un enzim (luciferasa) que catalitza la oxidació d'un substrat (luciferina) donant com a resultat l'alliberació de fotons. Les luciferases són àmpliament representades en el regne animal, com es mostra en la **figura 19**.

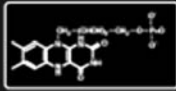
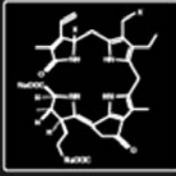
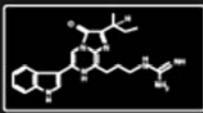
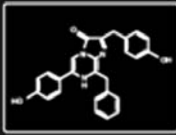
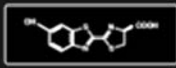

	Bacterià Luciferina + Luciferasa	Bacteris, Alguns peixos Alguns calamars
	Dinoflagel·lats Luciferina + Luciferasa	Dinoflagel·lats Alguns crustacis
	Vargula Luciferina + Luciferasa	Alguns curstacis Alguns peixos
	Coelenterazina Luciferina + Luciferasa Fotoproteïna	Alguns peixos Calamars Cnidaris Alguns crustacis
	Cuques de llum Luciferina + Luciferasa	Cuques de llum
	Altres o desconeguts	Cucs nemertins Bivalves Larvas Lapes Cucs de terra Etc...

Figura 19. Sistemes bàsics de luciferina-luciferasa que es troben en el regne animal.

Una de les luciferases més utilitzades i estudiades és la de *Photinus pyralis* (PLuc), que va ser purificada i caracteritzada el 1978 (Fig. 20). El seu cADN va ser clonat i expressat en *E.coli* per Wet et al. al 1985. Aquesta luciferasa necessita ATP com a cofactor, i és per això que s'ha utilitzat molt per determinar la presència d'aquest nucleòtid. El seu espectre d'emissió és de 550 a 570 nm (Fig. 26), amb un pic d'activitat que dura entre 15 i 25 minuts després de la injecció



Figura 20. Imatge del insecte *Photinus pyralis* d'on es va obtenir la luciferasa del mateix nom (<http://en.wikipedia.org>)

del substrat i es detecta llum fins a 2 o 3 hores després. El fet que la relació entre la concentració del substrat i la llum emesa sigui lineal, juntament amb l'existència de detectors de fotons amb una resposta també lineal en un rang de 7 ordres de magnitud, fan que aquest reporter sigui molt convenient per a la BLI¹¹². Permet detectar en el rang de femtomols de luciferasa.

Una altra de les luciferases més utilitzades és la de *Renilla reniformis* (RLuc)¹¹³ i el seu cADN va ser aïllat per Lorenz et al. el 1991 de l'octocoral del mateix nom (**Fig. 21**). La proteïna comparteix homologia amb la proteïna calmodulina d'unió al calci i l'activitat està controlada per la concentració de Ca²⁺. El seu espectre màxim d'emissió es troba als 480 nm (**Fig. 22**) i la cinètica de producció de llum és molt ràpida; s'inicia als 10 segons i baixa ràpidament durant els 10 minuts següents a la injecció del substrat¹¹⁴. La reacció de la RLuc és molt

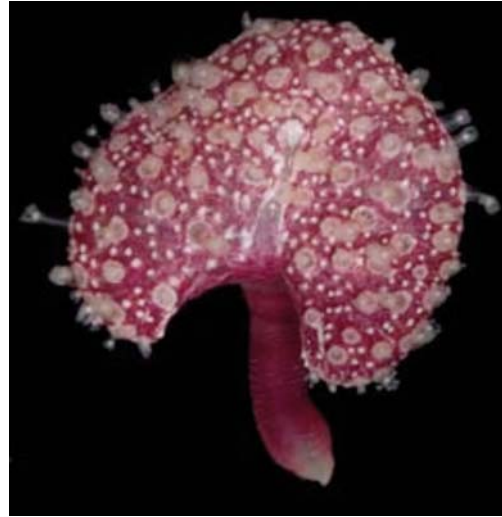


Figura 21. Imatge de l'octocoral *Renilla reniformis* d'on es va obtenir la luciferasa del mateix nom (<http://www.dnr.sc.gov>)

més simple que la de la PLuc, ja que no necessita cofactors com l'ATP, per tant, la RLuc sembla que causaria menys pertorbació a les cèl·lules marcades. La seva ràpida cinètica també li donaria avantatges en experiments on no es vol un senyal gaire persistent al llarg del temps.

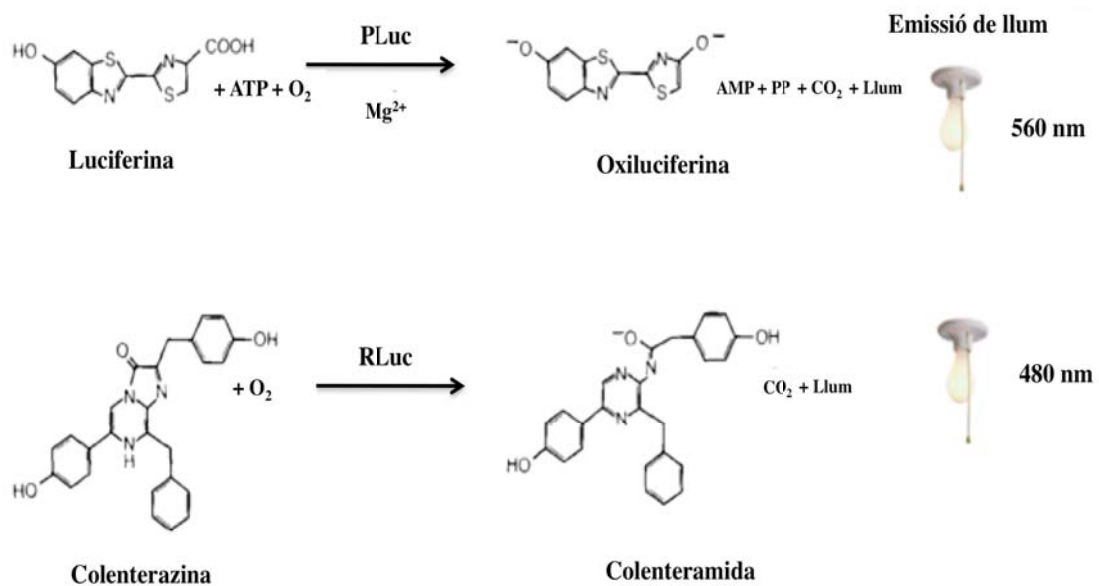


Figura 22. Diagrama de les reaccions enzimàtiques que tenen lloc amb PLuc i RLuc i les longituds d'ona d'emissió màximes resultants (adaptat de Promega Corporation).

Les limitacions d'aquesta luciferasa es deuen sobretot al seu espectre d'emissió, ja que només un 3% dels fotons emesos són de longitud d'ona superior a 600 nm i escapen a través dels teixits. Per això, s'han desenvolupat variants de RLuc amb un espectre d'emissió desplaçat cap al vermell que en millora l'ús en animals¹¹⁵.

El fet de presentar la PLuc i la RLuc diferents longituds d'ona d'emissió, així com diferents substrats que no presenten reacció creuada, fa possible la utilització de les dues reaccions en un mateix animal i amplia les variables a estudiar mitjançant la BLI.

La utilització de la BLI per el seguiment *in vivo* de cèl·lules o teixits, requereix enginyeria genètica prèvia. Bàsicament, es dota les cèl·lules o teixits d'interès de l'expressió d'un gen reporter bioluminescent (p.ex: RLuc i/o PLuc), sota el control transcripcional d'un promotor. Les diferents variables que es poden aplicar en la construcció corresponent al gen reporter i promotor ens permeten entendre l'estructura dels promotors, l'activació-unió de receptors de membrana, monitorització de la diferenciació cel·lular, anàlisi de l'estructura dels factors de transcripció, estudi de la infecció vírica i activació de receptors nuclears (**Fig. 23**).

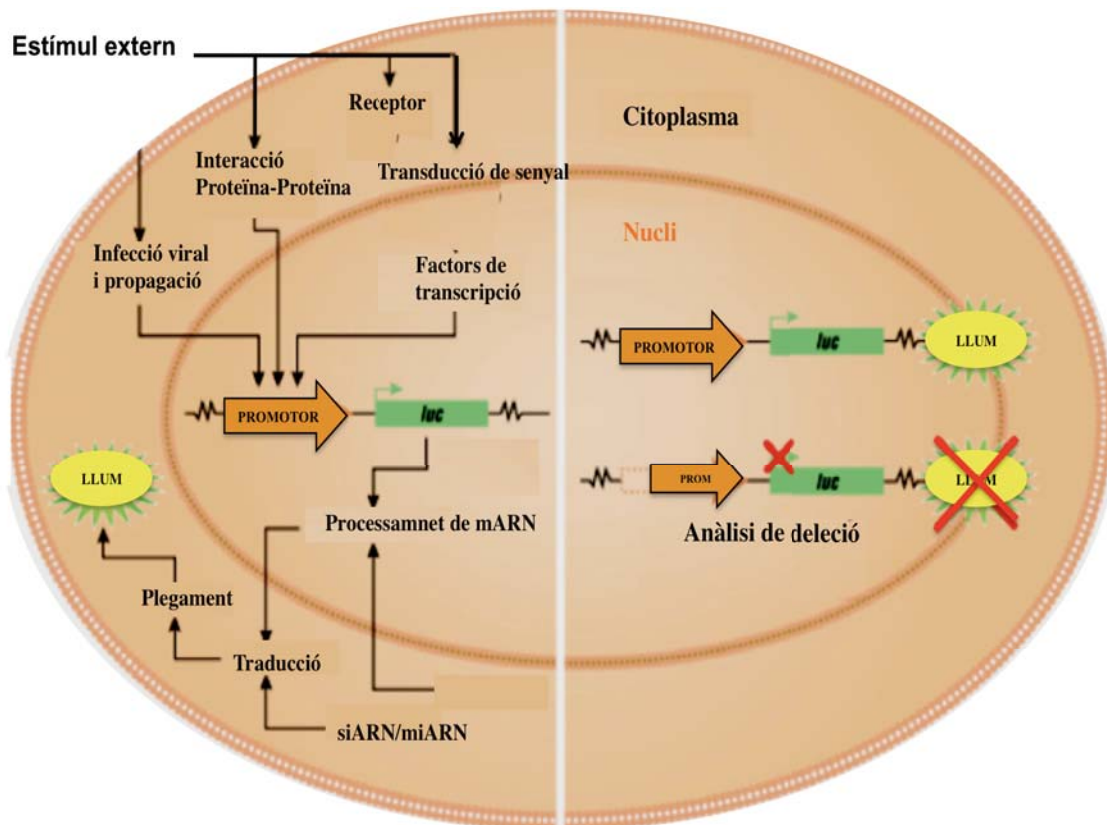


Figura 23. Diagrama representatiu d'una cèl·lula amb les diferents aplicacions per BLI per a l'estudi de processos cel·lulars (Promega Corporation).

La utilització de la BLI per a l'estudi de la diferenciació cel·lular *in vivo*, ens permet millorar el desenvolupament d'estratègies de regeneració per ET¹⁶. Amb aquesta finalitat, les cèl·lules són doblament transfectades: en primer lloc amb un gen que codifica per una proteïna bioluminescent (p.ex: RLuc) sota el control transcripcional d'un promotor constitutiu, i en segon lloc per un gen que codifica per una altra proteïna bioluminescent (p.ex: PLuc) sota el control transcripcional d'un promotor específic actiu en processos de diferenciació. La relació entre les dues llums ens permet determinar tan la proliferació cel·lular obtinguda per l'emissió de llum regulada pel promotor constitutiu, com l'estat de diferenciació obtingut a partir de la relació entre l'emissió de llum regulada pel promotor constitutiu i la llum emesa i regulada pel promotor específic (**Fig. 24**).

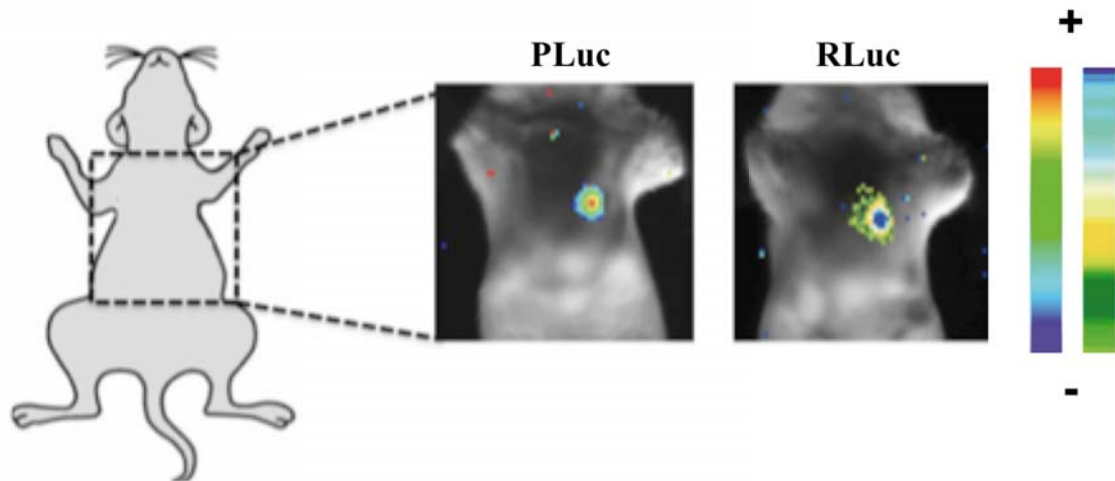


Figura 24. Diagrama on es mostra la monitorització de cèl·lules implantades en miocardi de ratolí, prèviament transfectades amb *RLuc* sota el control transcripcional de *CMV* i *PLuc* sota el control transcripcional del promotor de la troponina I cardíaca. L'anàlisi del ratio de les dues llums en el temps permet determinar in vivo l'estat transcripcional d'un gen determinat en un conjunt de cèl·lules.

Els avantatges de les luciferases com a traçadors cel·lulars són vàries:

1. El gen codificant s'integra dins el genoma de les cèl·lules, pel que no es diluirà l'activitat a mesura que les cèl·lules proliferin.
2. La quantitat de fotons produïts és proporcional a la quantitat de cèl·lules. L'existència d'una relació lineal entre el nombre de cèl·lules i el nombre de fotons permet avaluar el nombre de cèl·lules implantades.
3. Els mamífers no presenten reaccions quimioluminescents, pel que la contribució de l'organisme al soroll de fons és pràcticament nul.
4. Els instruments de detecció de fotons, a més de ser extraordinàriament sensibles, poden detectar de l'ordre de desenes de fotons i produeixen respostes lineals, és a dir, directament proporcionals al nombre de fotons¹¹².

Els principals inconvenients de les luciferases són la necessitat d'utilitzar un substrat i que els teixits vius absorbeixen llum visible, fet que limita la profunditat a la que es poden detectar les cèl·lules marcades en animals vius. Aquesta absorció de llum depèn del tipus de teixit, així, per exemple, la pell i el múscul tenen la transmissió de llum més elevada i són gairebé independents de la longitud d'ona; en canvi, òrgans amb un contingut vascular molt alt, com el fetge o la melsa, tenen la mínima emissió de transmissió, ja que la llum és absorbida per l'oxihemoglobina i la desoxihemoglobina. La reducció del senyal

de BLI és d'unes 10 vegades per cada centímetre de fondària, i això varia en funció del tipus de teixit; per tant, la màxima fondària que permet la BLI és de 2-3 cm¹¹⁷. Un altre problema és que les imatges obtingudes són bidimensionals i, per tant, hi ha manca d'informació de profunditat. Amb càmeres amb dispositiu de càrrega acoblat (CCD, de l'anglès *Charged couple device*) rotatòries o múltiples visions del mateix animal es solucionaria aquest problema i es podria obtenir una imatge volumètrica. L'altre inconvenient és la impossibilitat d'aplicar aquest procediment en humans.

Com a conseqüència de la poca quantitat de llum que travessa els teixits, es fa necessari emprar càmeres d'alta sensibilitat als fotons¹¹⁸. Els detectors CCD són el component principal d'aquestes càmeres, i estan essencialment constituïts per matrius bidimensionals de fotodetectors d'estat sòlid. Aquests detectors són extremadament sensibles a la llum visible i a l'infraroig proper i constitueixen l'element sobre el que un objectiu projecta una imatge del subjecte de l'anàlisi. Aquestes càmeres, converteixen la llum dels fotons de longitud d'ona entre 400 a 1000 nm en electrons amplificats i registrats per poder ser digitalitzats.

L'energia tèrmica generada en el CCD provoca una producció constant d'electrons que contamina la senyal d'interès. Aquest soroll tèrmic baixa en un factor de 10 per cada 20°C de descens de temperatura; per això, els CCD treballen en un rang de temperatura que va dels -80°C als -120°C. La cambra CCD es troba ubicada dins d'una caixa fosca, on s'hi col·loca la mostra a analitzar, i estan acoblats a una unitat criogènica refrigeradora. La informació obtinguda és processada i analitzada posteriorment per un sistema informàtic¹⁰⁵.

De les tècniques d'imatge òptiques esmentades es pot deduir que la fluorescència i la BLI presenten propietats pròpies que les fan complementàries i aplicables a diferents casos. Així doncs, la BLI presenta unes característiques òptimes per a la seva aplicació *in vivo*, al presentar poc soroll de fons i una elevada sensibilitat de detecció. A la vegada, la fluorescència permet una aplicació més adient en processos d'anàlisi *in vitro* i histologia on el soroll de fons és més baix i permet obtenir imatges d'alta resolució.

3.6 MÈTODES D'INTRODUCCIÓ DE GENS EN LES CÈL·LULES

Tant per a la monitorització cel·lular *in vivo* com *in vitro*, mitjançant BLI o fluorescència, cal utilitzar vehicles, anomenats vectors, que permetin la transducció de gens reporters a les cèl·lules d'interès. Per tal que un vector sigui adequat, ha de presentar una sèrie de característiques^{119,120}:

1. Ha de permetre la incorporació i, si és possible, l'expressió regulada dels gens necessaris durant un temps convenient.
2. Ha de proporcionar un alt nivell de transducció del teixit desitjat o de la població cel·lular diana.
3. No ha de ser reconegut pel sistema immunològic.
4. No ha d'induir una resposta inflammatòria.
5. L'expressió ha de ser estable.
6. La generació del vector ha de ser fàcil.
7. No ha de ser oncogènic.

Els vectors poden ser virals o no virals i l'expressió del gen introduït pot ser transitòria o permanent.

3.6.1 Vectors no virals

Són vectors plasmídics o oligonucleòtids amb promotors d'expressió eucariòtics que s'introdueixen en la cèl·lula de forma directa, és a dir, amb l'ADN nu o emprant mètodes químics o físics. Així doncs, la injecció de l'ADN nu ha donat lloc a una transfecció positiva en cèl·lules musculars¹²¹, de fetge¹²² i de pell¹²³. En els mètodes químics de transfecció, l'ADN és embolcallat mitjançant lípids catiónics¹²⁴ o polímers¹²⁵. En els mètodes físics de transfecció s'utilitza l'energia mecànica (bombardeig de partícules), elèctrica (electroporació), ultrasònica i hidrodinàmica per penetrar la membrana cel·lular i introduir l'ADN¹²⁶.

El principal problema de la utilització de mètodes no virals és la possible degradació de l'ADN als endosomes abans d'arribar al nucli, donant lloc a una baixa eficiència de transfecció.

3.6.2 Vectors virals

Els virus són capaços d'evitar moltes barreres en el procés d'introducció d'ADN exogen en el genoma cel·lular, pel que són vehicles ideals i molt utilitzats per a la teràpia gènica. Amb la finalitat d'evitar els inconvenients derivats d'una infecció vírica, es substitueixen els gens vírics necessaris per a la replicació per els gens que es vulguin expressar. Com que aquests virus modificats no poden produir noves partícules per ells mateixos, s'han creat línies cel·lulars de cèl·lules empaquetadores que expressen les proteïnes necessàries per a la seva replicació i el seu empaquetament en partícules víriques. La introducció del genoma viral modificat dins de les cèl·lules empaquetadores té com a resultat la producció de partícules víriques capaces d'infectar qualsevol cèl·lula desitjada, però que són incapaces de replicar-se.

Vectors virals més utilitzats:

Adenovirus: Són vectors de doble cadena d'ADN i sense envoltura vírica, capaços de transduir eficientment una gran varietat de tipus cel·lulars, tan *in vivo* com *in vitro*. Poden transfectar tan cèl·lules en divisió com quiescents, donant lloc en tots els casos a una expressió transient, conseqüència de la no integració en el genoma de l'hoste. Un dels principals inconvenients dels vectors adenovirals és la seva elevada toxicitat i immunogenicitat¹²⁷.

Adenoassociats: Són virus amb una sola cadena d'ADN que es poden integrar al genoma de l'hoste i poden infectar tan cèl·lules quiescents com en divisió. Aquests virus infecten amb molta eficiència i de manera estable provocant una baixa immunogenicitat. Un dels principals inconvenients dels vectors adenoassociats és la limitació en la mida del ADN que es pot introduir, així com l'elevada dificultat que presenta la seva producció¹²⁸.

Retrovirus: Són virus d'una cadena d'ARN amb la capacitat d'integrar-se dins el genoma donant lloc a una expressió prolongada del transgen. Els retrovirus més utilitzats són els derivats dels oncovirus, com el virus de la leucèmia en

ratolins o lentivirus. Dins dels lentivirus, els més utilitzats són els derivats dels virus de la immunodeficiència en humans¹²⁹, primats i felins¹³⁰. Els lentivirus són capaços d'infectar tan cèl·lules en divisió com quiescents¹³¹. La seva habilitat d'integrar-se al genoma fa que els gens exògens no es dilueixin com a resultat de la divisió cel·lular. Genèticament, els lentivirus estan constituïts per 3 gens indispensables per la replicació i integració. Aquests gens es coneixen com *gag*, *pol* i *env*. Existeixen gens accessoris que contribueixen a una millor persistència. En el cas del VIH aquests gens es coneixen com: *vif*, *vpu*, *vpr* i *nef*. El cicle vital d'aquests virus comença amb la unió de la càpsida del virus a proteïnes de membrana cel·lular específiques. Un cop assolida la unió, per un seguit de mecanismes es produeix la penetració i la denudació de la càpsida a l'interior de la cèl·lula, donant lloc a l'alliberació de l'ARN víric al citoplasma cel·lular. A continuació es produeix la còpia de l'ARN a ADN mitjançant l'acció de l'enzim transcriptasa reversa. Aquest ADN és translocat al nucli cel·lular a través del complex del porus nuclear i és integrat en el genoma, on rep el nom de provirus. Seguidament, el provirus es transcriu i es tradueix, donant lloc a les proteïnes víriques i ARN víric que s'organitzen en el citoplasma cel·lular, per donar lloc a nous virus (**Fig. 25**).

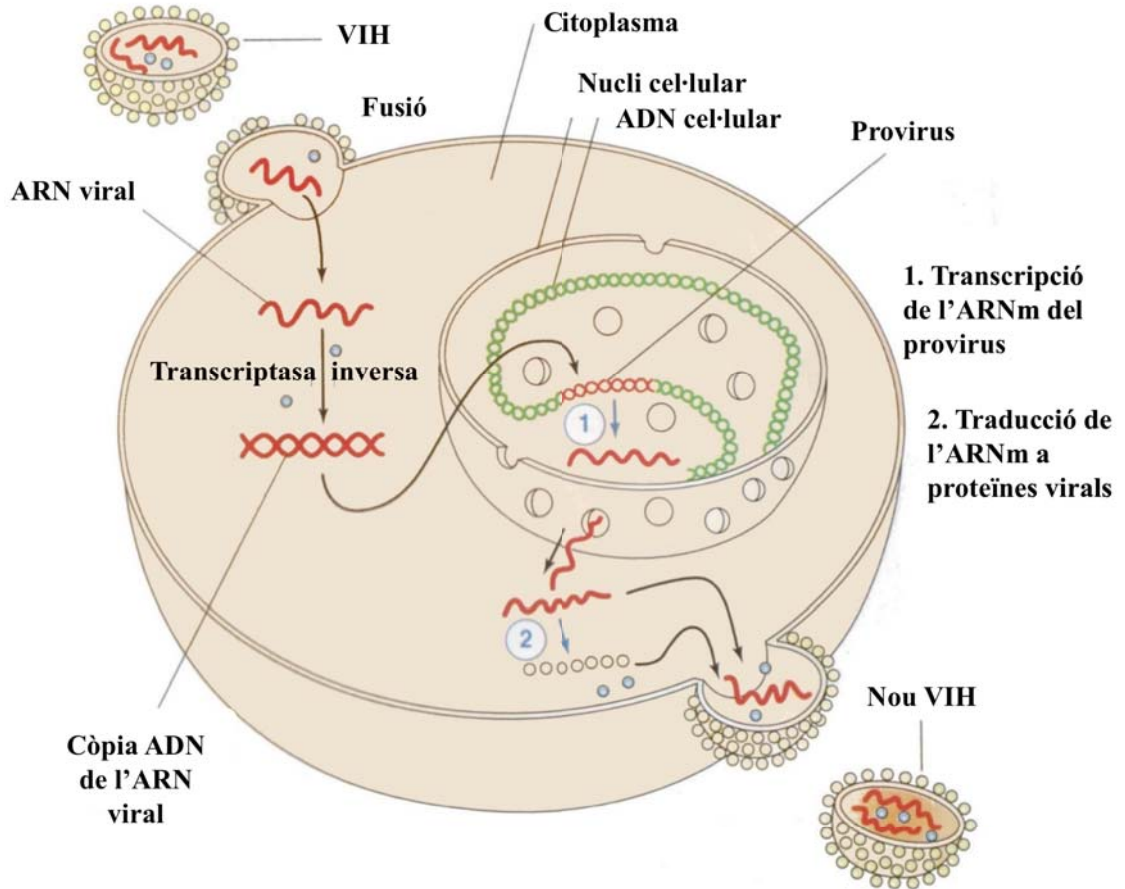


Figura 25. Representació simplificada del cicle víric dels retrovirus (adaptat de <http://imagesbiogeolfxm.free.fr>)

3.6.2.1 Vectors derivats del VIH per a la teràpia gènica

Els vectors derivats del VIH més primerencs no s'entenen com un vehicle per introduir gens, sinó com a eines per a l'estudi de la biologia del VIH. Consistien en genomes virals gairebé intactes amb poques delecions en el gen *env* (que codifica per la glicoproteïna de superfície i la proteïna transmembrana del virió) i amb la inserció de gens reporters en lloc seu. El gen *env* era introduït amb un plasmidi separat. La titulació d'aquests virus era molt baixa i hi havia un alt risc de producció de partícules competents per a la replicació.

Degut al interès de la utilització de vectors derivats del VIH per a la teràpia gènica s'han desenvolupat nous vectors, més segurs, que es descriuen a continuació.

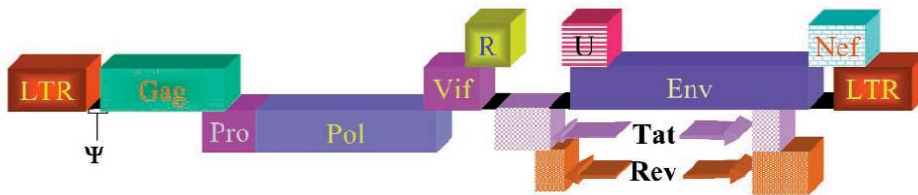


Figura 26. Organització genòmica del VIH. A partir d'aquesta estructura bàsica es van fer deletions per obtenir les diferents generacions de vectors (Daly, G. et al., 2000).

Primera generació

La primera generació de vectors lentivírics per a l'alliberació de gens implicava un sistema d'expressió de tres plasmidis^{132,133}. Amb això es va aconseguir que fos molt improbable que hi hagués una recombinació i es produïssin partícules competents per a la replicació (**Fig. 27**). Constava de:

-Una construcció empaquetadora, amb múltiples atenuacions del provirus del VIH per tal d'eliminar les seqüències d'actuació en *cis* imprescindibles per a l'empaquetament, la transcripció reversa i la integració dels transcrits derivats del plasmidi d'empaquetament.

-Una construcció d'envolta, on el gen VSV-G (de l'anglès *G glycoprotein of vesicular stomatitis virus*) podia estar expressat a partir del promotor del citomegalovirus (CMV) o a partir de la repetició terminal llarga (LTR, de l'anglès *long terminal repeat*) del virus de la leucèmia murina (MLV, de l'anglès *Murine Leukemia Virus*). La proteïna VSV-G de l'envolta confereix una alta estabilitat a les partícules, i permet que es puguin emmagatzemar durant períodes llargs i que es puguin concentrar per ultracentrifugació. A més, la VSV-G s'uneix a fosfolípids de la membrana cel·lular i permet que els virus entrin amb més facilitat.

-Una construcció de transferència, que conté les seqüències d'activació en *cis* del VIH necessàries per a l'empaquetament, la transcripció reversa i la integració del genoma víric. Aquestes seqüències són el senyal d'empaquetament, la regió 5' del gen *gag* (de grup específic antígen i que codifica per les proteïnes estructurals internes del virus ja siguin de la matriu, de la càpside o de la nucleocàpside) i el fragment derivat d'*env* que inclou l'element de resposta *rev* (RRE) que regula el transport de l'ARN i

l'empalmament entre els LTR virals. Aquests fragments que inclou el RRE se sap que potencien el procés d'empaquetament. A més, té llocs únics de restricció que permet la clonació d'ADN heterogeni.

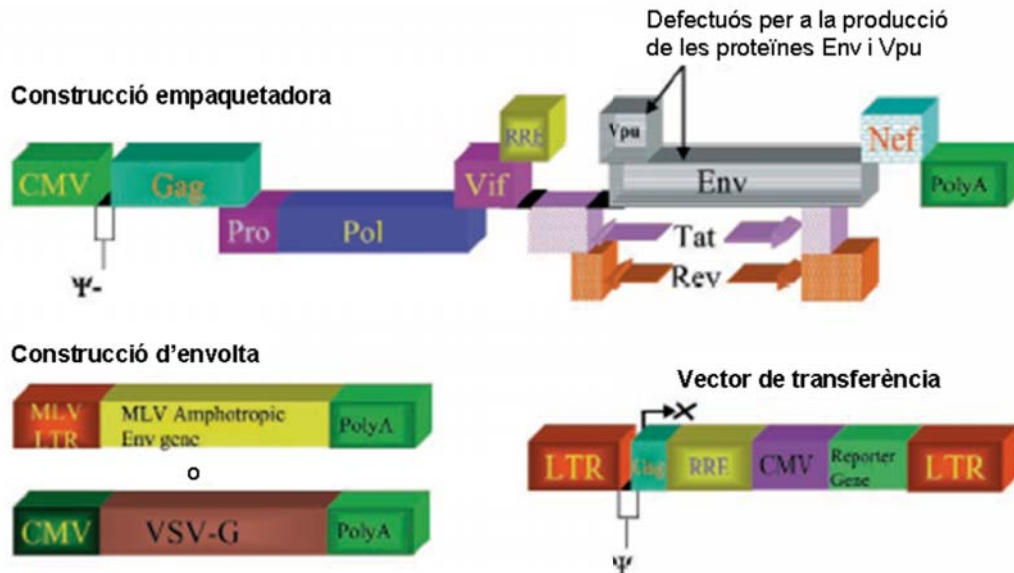


Figura 27. Construcció empaquetadora, construcció d'envolta i vector de transferència de la primera generació de vectors virals per a la teràpia gènica. Els gens deletats es mostren de color gris (Adaptada de Daly, G. et al., 2000).

Segona generació

En la segona generació de vectors lentivírics es va demostrar que la majoria de gens *vif* (que afecta la capacitat infectiva de les partícules víriques), *vpu* (que codifica per les proteïnes de membrana integrals, promociant l'alliberació dels virions), *vpr* (encarregat de la localització nuclear) i *nef* (que facilita la infecció en les cèl·lules quiescent, augmentant la capacitat infectiva dels virions) de la construcció empaquetadora eren prescindibles i que el gen *gag* era suficient perquè es produís aquest procés¹³⁴.

Tercera generació

En aquesta generació¹³⁵, a partir dels canvis anteriors, es va mutar el gen *tat* (que activa la transcripció), veient que aquest era també dispensable, i es va substituir el 5'LTR amb un promotor activament constitutiu. A més, el gen *rev* s'expressava des d'un plasmidi diferent, convertint-se en un sistema d'expressió de quatre plasmidis. En aquesta generació quedaven, doncs, només tres dels nou gens presents en el genoma del virus parental: *gag*, *pol*

(que codifica pels enzims de transcripció reversa (RT) que conté l'ADN polimerasa amb activitats associades ARNasa H i la integrasa) i *rev.* Tot això eliminava la possibilitat que un virus natiu es pogués reconstituir a través de la recombinació.

Vectors SIN

A partir d'aquests coneixements, es va millorar el sistema, eliminant del vector els elements transcripcionals del VIH, i es van crear els vectors autoinactivadors (SIN, *self-inactivating*), en els quals s'introduïa una deleció en la regió U3 del 3'LTR de l'ADN utilitzat per produir el vector d'ARN. Durant la transcripció reversa, aquesta deleció es transfereix al 5'LTR de l'ADN províric, i s'aconsegueix que les seqüències localitzades adjacents al lloc d'integració del vector no s'expressin de manera aberrant, ja sigui per culpa de l'activitat del promotor del 3'LTR o a través d'un efecte potenciador. Amb aquests vectors SIN, també s'evita una interferència transcripcional entre el LTR i el promotor intern que condueix l'expressió del transgen.

Els vector derivats del VIH toleren grans delecions de la regió U3 i, fins i tot, una eliminació total del promotor viral sense que hi hagi cap pèrdua en la seva funcionalitat¹³⁶⁻¹⁴⁰. També es va demostrar que aquests vectors podien produir fins al doble de titulació que els vectors dels quals derivaven¹⁴¹. Els vectors SIN, doncs, són els més segurs pels requeriments de les aplicacions clíniques¹⁴².

IV. OBJECTIUS

Principal

- Desenvolupament d'una plataforma d'imatge no invasiva per a l'estudi de la regeneració tissular.

Específics

- Creació de vectors lentivírics amb gens reporters quimèrics que expressin proteïnes bioluminescents i fluorescents, sota el control transcripcional de diferents promotors específics de teixit, que participin en processos de diferenciació.
- Validació *in vitro* dels diferents vectors lentivírics aplicant tècniques d'imatge no invasiva mitjançant la BLI.
- Validació *in vivo* de la plataforma d'imatge, utilitzant un model de regeneració òssia.
- Aplicació de la plataforma d'imatge al desenvolupament de procediments d'ET per a la regeneració de lesions en teixit cardíac.

V. MATERIALS I MÈTODES

1. CULTIUS CEL·LULARS

1.1 TIPUS CEL·LULARS

1.1.1 293T

La línia cel·lular humana 293T, que deriva de ronyó embrionari i expressa constitutivament l'antigen SV40 large T, s'obtingué a partir de l'*American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, EUA). Aquesta línia, que és altament transfectable, es va utilitzar al llarg d'aquesta tesi com a empaquetadora de virus, mitjançant transfeccions transitòries.

1.1.2 Cèl·lules mare adultes mesenquimals derivades de teixit adipós:

- Lipoaspirat subdèrmic de maluc (ATDPCs de l'anglès *Adipose tissue derived progenitor cells*).

Les ATDPCs s'obtingueren de pacients amb un índex de massa corporal superior a 25, sotmeses a una liposucció subdèrmica de maluc. El protocol seguit per al seu aïllament es descriu a continuació:

- * Rentar cinc vegades el lipoaspirat amb tampó de fosfat salí (PBS, de l'anglès *Phosphate-buffered saline*) 1X i incubar amb 1 volum de col·lagenasa I al 0,075% (Sigma, Steinheim, Alemanya) durant 30 minuts a 37°C amb agitació.
- * Inactivar la col·lagenasa mitjançant 1 volum de DMEM (de l'anglès, *Dulbecco's modified eagle media-high glucose*) (Sigma) amb un 10% de SBF (sèrum boví fetal) (Sigma).
- * Centrifugar a 450 g durant 10 minuts i rentar el precipitat amb 50 ml de solució de Ringer.
- * Recompondre amb 10 ml de clorur d'amoni 0,16 M i deixar a temperatura ambient durant 10 minuts per tal de llisar els eritròcits.

- * Centrifugar a 450 g durant 10 minuts i el precipitat es recompon en medi complet (DMEM (Sigma) + 10% SBF (Sigma) + 1% penicilina-streptomina (P/S) (Sigma)).
- * Sembrar en flascó i cultivar a 37°C en atmosfera al 5% CO₂.
- * A les 24 hores, retirar el medi per eliminar les cèl·lules que no s'han adherit i afegir medi complet fresc.

- greix epicàrdic (ATDPC cardíques) i subcutani (ATDPC subcutànies).

El greix epicàrdic (0,5 -1 g) s'obté en cirurgies cardíques rutinàries de la base de l'artèria aorta. En la mateixa cirurgia s'obté també, el greix subcutani (≈ 5 g) que s'extreu d'entre la pell i l'estern. En ambdós tipus de teixit adipós es segueix el mateix protocol d'aïllament cel·lular (protocol adaptat a partir del descrit per Martinez-Estrada i col¹⁴³:

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

1.1.3 Cèl·lules mare mesenquimals derivades de cordó umbilical.

Les cèl·lules mare humanes mesenquimals derivades de cordó umbilical (UCBMSC), es varen obtenir seguint el protocol adaptat de¹⁴⁴ i que es descriu a continuació:

- * Centrifugar a 400 g durant 5 min la sang de cordó umbilical (60-100 ml) i recompondre el precipitat en 30 ml de PBS lliure de calci i magnesi.
- * La suspensió es diposita sobre 1,077 g/ml de *Lymphoprep* (Nycomed Inc, Oslo, Norway) i es centrifuga a 400 g durant 30 minuts.
- * El precipitat resultant es recompon en *Pharm-Lyse* (BD Biosciences, San Diego, CA) durant 15 minuts per eliminar les restes de cèl·lules mononuclears.
- * Les cèl·lules restants es cultiven en flascons a 37°C en atmosfera al 5% CO₂ i en medi DMEM complementat amb el 30% SBF, 1% P/S i 10⁻⁷ mol/L de dexametasona (Sigma).
- * Les cèl·lules adherides es tripsinitzen i es tornen a cultivar com a cultiu primari en flascons i medi complet (DMEM + 10% SBF + 1% P/S)

1.2 CONDICIONS DE CULTIU I MEDIS DE CULTIU

Un cop s'han establert els diferents cultius primaris, el medi de cultiu es canvia cada 3-4 dies. Els cultius es mantenen fins a arribar a un 70% de confluència, es tripsinitzen i es ressemblen a una concentració de 1000 cèl·lules viables/cm². En tots els casos els cultius es mantenen a 37°C i una atmosfera del 5% CO₂.

El medi de cultiu emprat es descriu a continuació:

- DMEM 4500 glucosa (Sigma)
- 2 mM L-glutamina (Sigma)
- 50 u/ml P/S (Sigma)
- 10% SBF (Sigma)

En el cas dels cultius amb 293-T s'afegeix:

- 25 mM Hepes (Sigma)

1.3 CONGELACIÓ CEL·LULAR

El medi de congelació conté:

-90% de SBF (Sigma)

-10 % dimetil sulfòxid (DMSO) (Sigma)

Abans de recompondre els precipitats cel·lulars, el medi de congelació es manté a 4°C durant 15 minuts. La concentració cel·lular és de 1×10^6 cèl·lules/ml. Es fan alíquotes d'un ml en criotubs que es passen a les caixes de criocongelació a -80°C. Després de 48 hores, les cèl·lules es guarden en nitrogen líquid per a una conservació permanent.

1.4 ESTUDIS DE DIFERENCIACIÓ I ESTAT D'HIPÒXIA IN VITRO

1.4.1 Diferenciació adipogènica

Per a la diferenciació *in vitro* de les cèl·lules mesenquimals al llinatge adipogènic, les cèl·lules són cultivades en el medi de diferenciació *StemPro adipogenic differentiation Kit* (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA) i en les condicions de cultiu recomanades pel proveïdor (www.invitrogen.com/support). Les cèl·lules es cultiven a una densitat de 1×10^4 cèl·lules/cm² en plaques de 12 pous durant 14 dies, canviant cada 3 dies per medi fresc de diferenciació. Com a control s'utilitzen les mateixes cèl·lules cultivades en medi de cultiu estàndard (DMEM, 10% SBF i P/S) durant el mateix període de temps.

Anàlisi de la diferenciació adipogènica:

S'utilitza el colorant liposoluble Oil Red O per a la detecció de triglicèrids, àcids grassos i lipoproteïnes intracel·lulars. Aquest colorant dóna una tinció vermella.

Protocol:

- * Rentar les cèl·lules amb PBS 1X i fixar amb paraformaldehid (Sigma) al 4% durant 1 hora.
- * Rentar les cèl·lules fixades amb isopropanol (Panreac S.A, Castellar del Vallès, Espanya) al 60% durant 1 minut.
- * Tenyir amb solució Oil Red O (60 ml de la solució estoc, que és una solució saturada d'Oil Red O en isopropanol 100%, amb 40 ml d'aigua destil·lada).
- * Rentar dues vegades amb isopropanol 60% durant 1 minut.
- * Rentar amb aigua destil·lada durant 5 minuts.
- * Tenyir els nuclis mitjançant hematoxilina de Mayer (Sigma) durant 2-3 minuts.
- * Rentar amb aigua durant 3 minuts i seguidament amb aigua destil·lada 3 minuts més.
- * Observar al microscopi de contrast de fases.

1.4.2 Diferenciació osteogènica

Per a la diferenciació *in vitro* al llinatge osteogènic, les cèl·lules mesenquimals són cultivades en el medi de diferenciació *StemPro osteogenesis differentiation Kit* (Invitrogen), en les condicions de cultiu recomanades pel proveïdor (www.invitrogen.com/support).

Les cèl·lules es cultiven a una densitat de 5×10^3 cèl·lules/cm² en plaques de 12 pous durant 14 dies, canviant cada 3 dies per medi fresc de diferenciació. Com a control s'utilitzen les mateixes cèl·lules cultivades en medi de cultiu estàndard (DMEM, 10% SBF i P/S) durant el mateix període de temps.

Anàlisi de la diferenciació osteogènica:

-Es basa en la detecció de la deposició en el cultiu de matriu extracel·lular calcificada, característica típica dels osteoblasts, mitjançant la tinció específica amb el colorant vermell d'alizarina¹⁴⁶ i posterior observació al microscopi de contrast de fases.

Protocol:

- * Retirar el medi osteogènic.
- * Rentar 3 cops amb PBS per eliminar les restes de medi i SBF.
- * Fixar amb PFA al 4% durant 10 min a T^a ambient.
- * Rentar 3 cops amb aigua destil·lada.
- * Tenyir amb una solució al 1% de vermell d'alizarina (Merk Inc, Darmstadt, Alemanya) en aigua destil·lada durant 10 min.
- * Rentar 3 cops amb aigua destil·lada.
- * Observar al microscopi de contrast de fases.

- Alternativament s'analitza el grau de diferenciació osteogènica a partir de l'anàlisi per PCR a temps real (veure apartat 5.7 Real time PCR) del gen que codifica per la proteïna osteocalcina (BGLAP), associada a la mineralització de la matriu òssia.

1.4.3 Diferenciació endotelial

La diferenciació endotelial de les cèl·lules mesenquimals es va dur a terme mitjançant dos processos:

a. Cultivant les cèl·lules amb medi EGM-2 (Lonza Walkersville, Inc.; ref. CC-3162) durant 14 dies. Aquest medi conté els factors EGF, hidro cortisona, VEGF, bFGF, R3-IGF-1, àcid ascòrbic i heparina que s'ha demostrat que afavoreixen la diferenciació endotelial en diferents tipus cel·lulars^{147, 148, 149}. Com a control s'utilitzen les mateixes cèl·lules cultivades en medi de cultiu estàndard (DMEM, 10% SBF i P/S) durant el mateix període de temps.

b. Assaig de formació de tubs *in vitro*. Es basa en la propietat de les cèl·lules endotelials per formar estructures tubulars quan són cultivades en una matriu de suport gelificada com les obtingudes a partir de proteïnes derivades de tumor Engelbreth Holm-Swarm (EHS) de ratolí (ECMatrixTM o MatrigelTM) (BD Bioscience Inc, Franklin Lakes, New Jersey, EUA)

Aquesta matriu, que està considerada com la membrana basal generada a partir d'un sarcoma de ratolí, no només conté els components de la membrana basal (col·lagen, laminina i proteoglicans) sinó també enzims proteolítics (plasminogen, tPA, MMPs), els seus inhibidors i factors de creixement (TGF- β , FGF). El MatrigelTM que solidifica a temperatura ambient, es manté en fred durant la seva manipulació.

Protocol:

- * Dipositar 50 μ l de la solució de MatrigelTM per pou en placa de 96. Incubar a 37°C durant 30 minuts
- * Cultivar sobre la superfície del MatrigelTM 1×10^4 cèl·lules en un volum de 100 μ l d' EGM-2.
- * Durant 7 hores fer seguiment de la formació d'estructures tubulars en microscopi de contrast de fase.

Anàlisi de la diferenciació endotelial:

-El grau de diferenciació endotelial es comprova analitzant per PCR a temps real l'expressió d'un conjunt de gens endotelials (CD34¹⁵⁰, CD36¹⁵¹, CD102¹⁵², VEGF¹⁵³, vWF¹⁵⁴, VEGFR2¹⁵⁵), moduladors angiogènics (PECAM/CD31¹⁵⁶, EGR-3¹⁵⁷, Eph-B2¹⁵⁸) i moduladors vasculogènics (ILK¹⁵⁹ i SDF-1 α ¹⁶⁰) (veure apartat 5.7 Real time PCR).

- Alternativament es poden utilitzar tècniques basades en la incorporació de Dil-Ac-LDL, una lipoproteïna acetilada de baixa densitat que és incorporada de manera específica per les cèl·lules endotelials¹⁶¹. La Ac-LDL es marca amb el fluoròfor Dil de manera que, quan la lipoproteïna és degradada per les enzimes lisosomals, s'acumula a les membranes intracel·lulars i pot ser detectada per microscòpia de fluorescència.

Protocol de marcatge:

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

2 MARCATGE CEL·LULAR

2.1 CONSTRUCCIONS PLASMÍDIQUES

El marcatge estable de cèl·lules amb proteïnes bioluminescents i fluorescents es va fer mitjançant vectors vírics. Com que la majoria de cèl·lules utilitzades no es dividien amb gran rapidesa, el sistema que es va emprar va ser el sistema lentivíric.

Per a totes les construccions es va partir de l'esquelet lentivíric de transferència SIN, Plox/Twgf_p cedit pel doctor D. Trono (École Polytechnique Fédérate de Lausanne), d'on es va extreure el fragment *XhoI-KpnI*, al qual es va clonar un polilligador amb diferents dianes de restricció que feien més fàcils les clonacions posteriors.

2.1.1. Construcció PLox:PLuc:eGFP

El vector lentivíric pLox:PLuc:eGFP, amb el gen traçador que codifica per la proteïna quimèrica formada per una proteïna bioluminescent (PLuc) i una proteïna fluorescent (eGFP), es va obtenir emprant tècniques clàssiques de biologia molecular. El gen PLuc es va extreure del plàsmid pGL4.10:PLuc (Promega Corporation, Madison, WI) amb els primers:

5'-CTCGAGATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAG-3'

5'-AGATCTCCATGGAGGCGATCTTGCCGCCCTTC-3'

El producte d'amplificació es va clonar en el plàsmid pCR2.11 (Invitrogen). A continuació, es va digerir amb els enzims de restricció NcoI/Spel i es va clonar en el plàsmid pEGFP (Clontech Inc, Shiga, Japó) prèviament digerit amb els enzims NcoI/XbaI. Finalment, el grup format per la fusió dels dos gens es va extreure del plàsmid pEGFP digerint amb enzim EcoRI i clonant aquest en el vector lentivíric Plox prèviament digerit amb EcoRI.

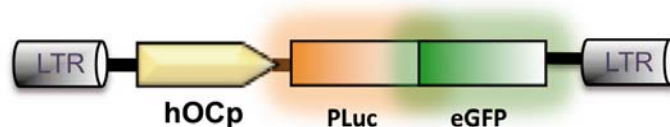
2.1.2 Construcció PLox:hOCp:PLuc:eGFP

El promotor humà del gen de l'osteocalcina (hOCp) es va obtenir a partir de la PCR en l'ADN genòmic humà emprant els següents primers¹⁶²:

5'-CTGCAGGGTCAGGAGGAGAAT-3'

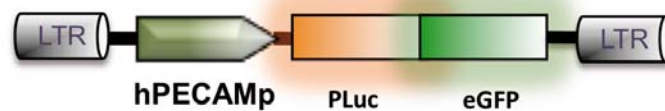
5'-GGGCTGCTGCTCAGGACT-3'

El fragment resultant de 800pb es va clonar en el plàsmid pCR2.11. Finalment, es va extreure la zona promotora del plàsmid pCR2.11 digerint aquest amb enzims de restricció XbaI/Spel i clonat el fragment resultant en el vector lentivíric pLox:PLuc:eGFP prèviament digerit amb Spel.



2.1.3 Construcció PLox:hPECAMp:PLuc:eGFP

El promotor humà del gen que codifica per la molècula d'adhesió cel·lular endotelial (hPECAM-1p), va ser cedit pel Dr. Carmelo Bernabéu (Centro de Investigaciones Biológicas CSIC, Madrid) i clonat en el vector lentivíric pLox:PLuc:eGFP mitjançant la utilització dels enzims de restricció XbaI/Spel i Spel, respectivament.



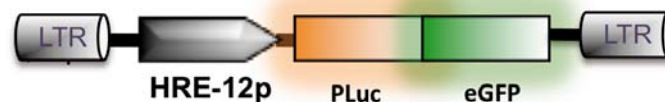
2.1.4 Construcció PLox:HRE-12p:PLuc:eGFP

El promotor HRE-12p està format per la repetició de 12 fragments. Cada fragment està format per diferents zones promotores que responen a hipòxia i controlen la transcripció dels gens PGK1, ENO1 i LDHA. Per a la seva obtenció, es va realitzar l'aparellament de dues monocadenes d'ADN complementàries de 79 nucleòtids:

5'-ctagaggacgtgacaaacagaagccacacgtcctaggacgtggggagtgcgtaggagtagctgtaggacacgtgggta-3'

5'-ctagtaccacgtgtcctcacgtactcctcacgcactccccacgtccctaggacgtgtggcttctgtttgtcactcct-3'

La seva unió permet obtenir un fragment de doble cadena d'ADN (monòmer) amb extrems compatibles XbaI i SpeI, tal i com es descriu en¹⁶³. Després de la lligació dels propis monòmers entre si, es va seleccionar el fragment corresponent a la unió de 12 còpies del monòmer (HRE-12p), a partir d'un gel d'agarosa al 1%. Finalment, el fragment HRE-12p, es va clonar en el vector lentivíric pLox:PLuc:eGFP prèviament digerit amb SpeI.



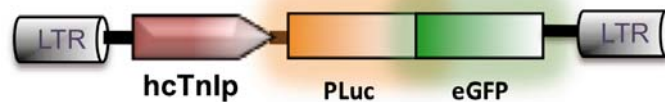
2.1.5 Construcció PLox:hcTnlp:PLuc:eGFP

El promotor humà del gen de la troponina I humana (hcTnlp) es va obtenir a partir de la PCR realitzada en ADN genòmic humà emprant els següents primers¹⁶⁴:

5'-TCCTTGTGTGAGGGAGTGG-3'

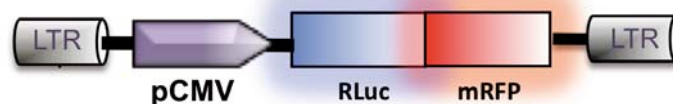
5'-GGGTGACCTTCAGGGTCC-3'

El fragment resultant de 340 pb es va clonar en el plàsmid pCR2.11. Finalment, es va extreure la zona promotora del plàsmid pCR2.11 digerint aquest amb enzims de restricció XbaI/Spel i clonat el fragment resultant en el vector lentivíric pLox:PLuc:eGFP prèviament digerit amb Spel.



2.1.6 Construcció CMV:hrl:mrfp

La construcció CMV:hrl:mrfp, cedida pel Dr. S. S. Gambhir (Stanford University, EUA), conté la quimera formada pel gen reporter que codifica per la proteïna bioluminescent RLuc i el gen reporter que codifica per la RFP, transcripcionalment regulats pel promotor constitutiu CMV^{97,165}.



2.2 PRODUCCIÓ DE PARTÍCULES VÍRIQUES

Protocol:

* Sembrar 3×10^6 cèl·lules 293T en plaques de 10 cm^2 de superfície, prèviament tractades amb $5 \mu\text{g/ml}$ de poli-D-lisina (Sigma) per tal d'augmentar l'adherència de les cèl·lules al plàstic.

- * 24 hores després i 2 hores abans de la transfecció de les cèl·lules, canviar de medi i afegir 9 ml de medi fresc.
- * El vector de transferència (pLOX SIN), amb els diferents gens clonats, el plasmidi d'envolta pMD-G-VSV-G *env* i el plasmidi d'empaquetament pCMVDR8.2 es barregen amb una proporció de 20 µg, 5 µg i 15 µg, respectivament, amb H₂O estèril fins un volum final de 450 µl.
- * Afegir 50 µl de clorur de calci (Sigma) 2,5 M, prèviament escalfat a temperatura ambient, a la mescla d'ADN i H₂O.
- * Amb una pipeta Pasteur, afegir aquesta barreja gota a gota a 500 µl de HEPES 2X (pH 7) a temperatura ambient i en agitació, deixant immòbil durant 20 min.
- * La barreja final s'afegeix, també gota a gota, sobre la placa sembrada amb les 293T mentre es va movent lleugerament.
- * Deixar les cèl·lules més precipitat durant 16 hores a 37°C i al 5% de CO₂.
- * Després de 16 hores de cultiu, es retira el medi de precipitació, es renten les cèl·lules amb PBS 1X i s'afegeix medi de cultiu sense SBF.
- * 48 hores després, es recull el medi i es centrifuga a 400xg durant 10 minuts per eliminar les restes cel·lulars i el sobrenedant es filtra mitjançant un filtre de 0,45 µm. Posteriorment, es fa una ultracentrifugació a 26.000 rpm a 4°C durant 90 minuts amb un rotor SW41.Ti en una ultracentrífuga L-100xp (Beckman Coulter, Fullerton, EUA) per tal de concentrar els virus.
- * El precipitat obtingut es recompon amb PBS 1X (amb Mg²⁺) i es congela amb alíquotes a -80°C.

Titulació de partícules víriques

La titulació de partícules víriques es fa mitjançant un assaig immunoabsorvent lligat a enzims (ELISA) de l'antigen p24 del VIH (EIA, Beckman Coulter).

- * Dipositar alíquotes de les mostres i dels controls en una placa de 96 pous juntament amb el tampó de lisi, i s'incuba durant 1 hora a 37°C. S'aspira el medi i es renten els pous amb el tampó de rentat 6 vegades durant 30 segons.

- * Afegir 200 µl de reactiu de biotina anti-VIH-1 humà reconstituït, a excepció del pou utilitzat com a blanc, i deixar 1 hora a 37°C. Seguidament, aspirar el medi i rentar els pous 6 vegades durant 30 segons amb el tampó de rentat.
- * Afegir 200 µl de SA-HRPO (conjugat d'estreptavidina i peroxidasa de rave) a tots els pous a excepció del blanc i incubar a 37°C durant 30 minuts. Rentar els pous, tal com s'ha fet prèviament.
- * Finalment, afegir el reactiu TMB (que conté tetrametilbenzidina i peròxid d'hidrogen) i incubar a la foscor durant 30 minuts mentre reacciona amb els complexos de peroxidasa. Es para la reacció mitjançant l'adició d'àcid CSR-1 (4NH₂SO₄).
- * L'absorbància de la coloració es mesura amb un espectrofotòmetre a 450/570 nm. Els resultats s'obtenen amb pg/ml de quantitat de proteïna VIH-1 p24. En les nostres condicions de transfecció, s'obté que 10 ng de p24 corresponen a 10⁶ unitats transfectants (TU).

2.3 TRANSDUCCIÓ CEL·LULAR

Per marcar les cèl·lules desitjades de manera permanent, mitjançant les partícules lentivíriques, es segueix el següent protocol:

- * Les cèl·lules mesenquimals es sembren a 5000 cèl·lules/cm² en placa de 12 pous.
- * Al medi de les cèl·lules, que conté polybrene (*hexadimethrine bromide*) (Sigma) a una concentració final de 10 µg/ml, s'hi afegeix el virus concentrat per tal d'obtenir una MOI (Multiplicitat d'infecció, partícules víriques infeccioses/cèl·lula) de 20 (2 x 10⁶ TU/ml) amb un volum final de 500 µl.
- * El medi de transducció es deixa durant 24 hores. Es netegen les cèl·lules amb PBS 1X, s'afegeix medi nou i es deixa créixer les cèl·lules.
- * L'eficiència de transducció vírica es determina per la detecció de les proteïnes fluorescents mitjançant microscòpia de fluorescència o per citometria de flux.

Selecció de les cèl·lules transduïdes

Les cèl·lules que són positives per fluorescència, es seleccionen mitjançant la separació de cèl·lules activada per fluorescència (FACS, de l'anglès *fluorescence-activated cell sorting*). La selecció va del 10% al 5% mes marcat depenent de la capacitat proliferant del tipus cel·lular.

3. ESTRUCTURES TRIDIMENSIONALS

3.1 MATRIGEL

Protocol:

- * Anestesià el ratolí mitjançant una injecció intraperitoneal (IP) amb 100 mg/kg de ketamina i 3,3 mg/kg de xilacina.
- * Barrejar 100 µl de Matrigel™ amb 3×10^5 cèl·lules totals diluïdes en 100 µl de PBS. Al ser la temperatura el catalitzador de la polimerització de la matriu, el procés és realitzat en fred.
- * Inyectar en la zona dorsal subcutània del ratolí la barreja Matrigel™ i cèl·lules, utilitzant una agulla de 21G.

3.2 FIBRINA

Protocol:

- * Barrejar $1,5 \times 10^6$ cèl·lules totals en 8 µl de la solució amb fibrinogen (Tissucol Tissucol Duo Baxter Inc, Heidelberg, Germany).
- * A la suspensió cel·lular resultant afegir 8 µl de la solució amb trombina per donar lloc a la formació del polímer de fibrina.
- * Trasplantar en cor de ratolins com es descriu en apartat 4.2.1 Procediment quirúrgic en model d'infart.

3.3 DBM (Matriu d'os desmineralitzat, de l'anglès *demineralized bone matrix*)

Amb la finalitat de seguir el procés de diferenciació a os *in vivo*, s'utilitza el model de càmeres DBM. Aquestes càmeres, construïdes i cedides pel doctor J.A. Andrades^{166,167} (Universidad de Màlaga), s'implanten dorsalment al llarg de l'esquena de ratolins SCID. S'implanten 3 DBM per ratolí. El protocol que es segueix és el següent:

- * Anestesiar els ratolins mitjançant una injecció IP amb 100 mg/kg de ketamina i 3,3 mg/kg de xilacina.
- * Administrar analgèsia (0,05 mg/kg de buprenorfina (Schering-Plough, Kenilworth, EUA)) mitjançant una injecció subcutània (SC).
- * Depilar la zona on es volen implantar els DBM i aplicar antisèptic (povidone-iodine, Braun, Melsungen, Alemanya).
- * Realitzar una incisió a la pell de l'esquena i introduir de manera subcutània el material, mitjançant unes pinces.
- * Cosir la pell amb sutures de seda trenades 5-0 (Mersilk, Ethicon, New Brunswick, EUA).
- * Els implants es deixen durant una setmana abans de la implantació de les cèl·lules, amb la finalitat de donar temps a la formació de vasos al seu entorn i oferir un ambient adient per a la supervivència cel·lular. Així doncs, després d'una setmana, s'inoculen dins les càmeres de DBM 3×10^5 cèl·lules (hAMSC) recompostes en 15 μ l de DMEM, per una de les membranes laterals utilitzant una xeringa de 0,5 ml.

4 MODELS ANIMALS

4.1 RATOLINS

Els animals que s'han utilitzat al llarg d'aquesta tesi han estat mantinguts en un ambient lliure de patògens.

Tots els procediments amb animals aplicats al llarg dels diferents estudis van ser aprovats pel comitè ètic del Centre d'Investigació Cardiovascular (CIC) i per

la Generalitat de Catalunya. Els investigadors han seguit la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Research* (Publicació del NIH nº 86-23, Revisió de 1996).

4.1.2 Ratolins SCID

Els ratolins SCID (de l'anglès *Severe Combined Immunodeficiency*) es caracteritzen per la incapacitat de poder donar una resposta immune apropiada a causa de l'absència o defectuositat dels limfòcits T i B, degut a una mutació recessiva en el cromosoma 16. A nivell funcional, aquesta mutació provoca que el sistema immunològic no maduri i aquests ratolins no poden combatre infeccions ni rebutjar tumors o trasplantaments.

4.2 MODEL IN VIVO D'INFART DE MIOCARDI

El model d'infart de miocardi en ratolí es realitza mitjançant la lligadura permanent de l'artèria coronària anterior esquerra descrita per primera vegada en un model de rata realitzat per Pfeffer i col. el 1979¹⁶⁸ i més endavant en el model de ratolí per Michael i col. el 1995¹⁶⁹. En aquests models, els canvis histològics després d'una oclusió total coronària són similars als observats en humans després d'un IAM (infart agut de miocardi) no tractat, però en canvi, es desenvolupen en un marc temporal més breu i inclouen una menor infiltració de cèl·lules polimorfonucleades^{170, 171}.

El nostre estudi es va realitzar en ratolins femella SCID de 12 setmanes d'edat i d'un pes comprés entre els 20 i 24g (Charles River laboratories inc, Wilmington, Mass, EUA). Els animals van ser alimentats *ad libitum*.

4.2.1 Procediment quirúrgic en model d'infart

Material:

- 2X Pinces Adson (FST, Fine Science Tools, Vancouver, Canadà) rectes de 12 cm de llargada total.
- 2X Pinces Bishop-Harman serrades de 8,5 cm de llargada total (FST)
- 1X Pinces Supergrip (punta ampla) (FST)
- 2X Portagulles Cohan–mini corbats
- Pinces i tisores.
- Pomada oftàlmica.
- Sutura Ethicon Cardiovascular (Johnson-Johnson comp., Nwe Brunswick, NJ, EUA) de 7-0 de seda negra amb dues agulles per sutura del tipus BV-1.
- Sutura monofilament de polipropilè de 6-0 no reabsorbible amb dues agulles Ethicon tipus C-1.
- Lidocaïna injectable (1%), 100 ml. Vedco (St. Joseph, MO, EUA)
- Buprenorfina, Buprex (Schering Plough Corp., Kenilworth, New Jersey, EUA) 0,3mg.
- Cola quirúrgica intraoperatoria. GLUBRAN2 (GEM, S.r.l.).
- Cola quirúrgica Histoacryl® (Braun, Kronberg, Alemanya)
- Dispensador d'isoflurà i tanc d'oxigen
- Lupa
- Respirador amb control de pressió, model TOPO (Kent Scientific Corporation, San Diego, CA, EUA)

Protocol:

- * Anestesiàr el ratolí amb isoflurà amb el vaporitzador. Per fer-ho, col·locar l'animal en una cambra d'aïllament i realitzar la inducció durant 1 min aproximadament amb 5% d'isoflurà en 100% oxigen. Seguidament, subministrar un 2% d'isoflurà en 100% d'oxigen mitjançant un con nasal i mantenir l'anestèsia de l'animal per que respiri espontàniament. Aplicar solució o pomada oftàlmica per evitar la sequedat als ulls.
- * Rasurar el coll i el costat esquerre del pit del ratolí.
- * Netejar les àrees amb solució iodada i etanol al 70%.
- * Injectar buprenorfina (0,1-0,5 mg/Kg) subcutàniament com a analgèsic.

* Per a la intubació, exposarem la tràquea amb la finalitat de visualitzar el correcte recorregut del tub per la mateixa i evitar introduir-lo a l'esòfag. Es fa una incisió de 0,5 cm al coll (0,5 cm per sota de la boca) i es separa la pell, les glàndules i la musculatura que envolta la tràquea amb els retractors. Subjectar la llengua del ratolí amb unes pinces corbades i moure-la cap a un costat. Suaument introduir per la tràquea el tub del respirador (20G). En cas de dificultats per introduir el catèter, aplicar, amb un pinzell, una solució de lidocaïna 1% a la tràquea.

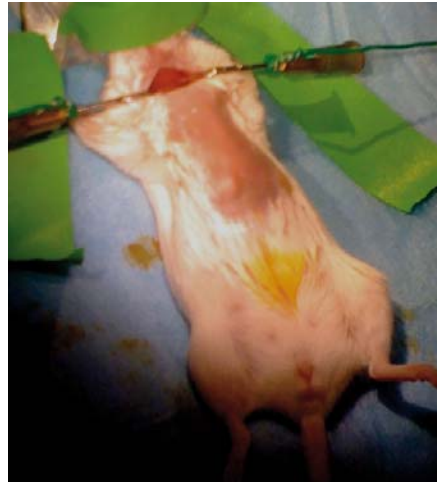


Figura 28. Exposició de la tràquea per a la posterior intubació

* Configurar el respirador a 90 respiracions/min i a un volum total de 0,1 ml per a un ratolí de 30 g. Ventil·lar l'animal amb 2% d'isoflur·n en 100% oxigen durant tot el procediment quir·rgic. Treure els retractors i hidratar la ferida amb solució salina per evitar la sequedat fins que se suturi al final de la cirurgia.

* Dur a terme una incisió vertical de 1 cm paral·lela a l'estern en el costat esquerre de l'animal i retirar els m·sculs pectorals subjacents. Exposar el cor entrant a la cavitat pectoral a trav·s del quart espai intercostal retirant les costelles adjacents. Pessigar el pericardi amb els f·rceps Bishop-Harman i realitzar un petit forat per retirar-lo. Localitzar l'art·ria coron·ria descendent anterior esquerra i ocluir-la lligant-la amb una sutura de 7-0 (fer un doble nus i dos de simples) per provocar un infart de miocardi (MI). El teixit per sota la lligadura esdevindr·n p·l·lid. És important realitzar la lligadura a m·s d'un mil·l·metre de l'aur·cula, d'altra manera l'infart ser·n massa gran per qu· l'animal sobrevisqui.

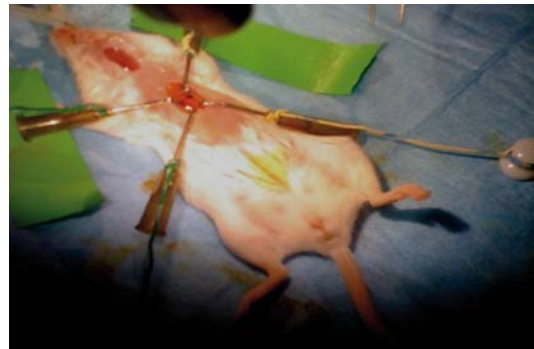


Figura 29. Incisió vertical per exposició del cor

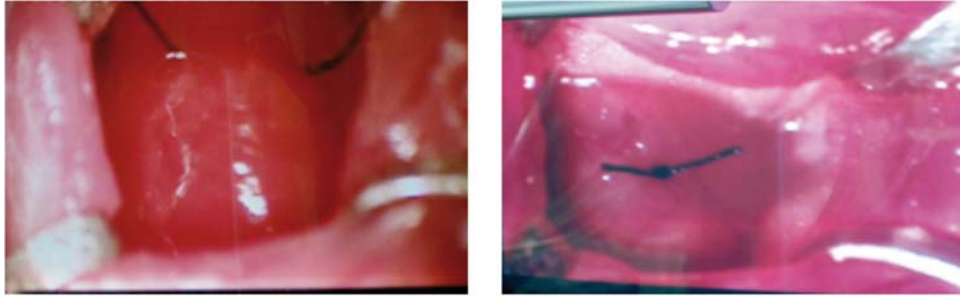


Figura 30. *Imatge esquerra amb sutura envoltant artèria coronària descendent. Imatge dreta sutura amb doble nus i dos de simples ocluint l'artèria coronària descendent*

* Es col·loca sobre la zona infartada la matriu de fibrina que inclou les cèl·lules a estudi. Per tal d'assegurar que la matriu quedi adherida a la zona de la lesió, es fixa la mateixa al cor emprant cola quirúrgica (GLUBRAN2, GEM, S.r.l., Viareggio, LU, Itàlia).

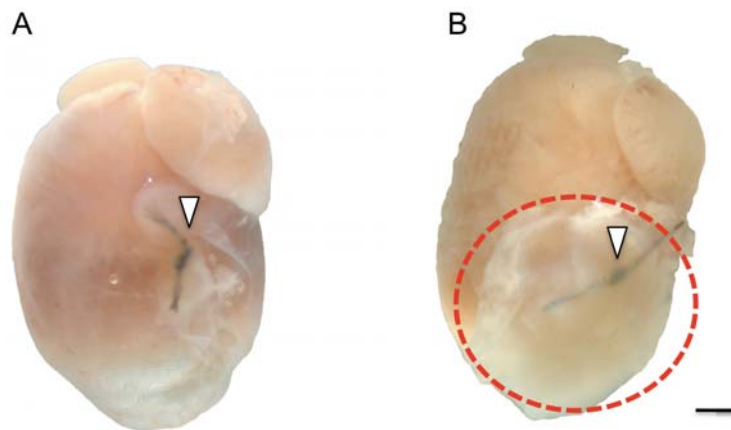


Figura 31. *Imatge representativa de cor de ratolí infartat a partir de la lligadura de l'artèria coronària descendent anterior esquerra (A) (fletxa blanca indicant zona lligadura), i posterior trasplantament en la zona de la lesió de la fibrina amb cèl·lules (B) (en vermell). Barra a escala 1mm.*

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



Figura 32. Procés de sutura de les costelles adjacents (esquerra) i sutura final (dreta)

* Injectar 0,5 ml de solució salina subcutàniament per prevenir la deshidratació de l'animal. Després d'apagar l'anestèsia, retirar el catèter de la tràquea i ventilar l'animal amb oxigen al 100% fins que recuperi el coneixement. Per tal de contrarestar la possible hipotèrmia provocada per l'anestèsia mantenir l'animal calent amb una alfombreta calefactada.

* Realitzar un seguiment de la ferida, administrar analgèsia i tractar possibles infeccions amb un antibiòtic (administració parenteral d'enrofloxacina (Baytril®, Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Alemanya) 85 mg/Kg durant 14 dies).

4.2.2. Cirurgia aguda terminal

La cirurgia aguda terminal va ser realitzada als 30 dies post implantació amb la finalitat de retirar els cors dels ratolins per a posteriors anàlisis.

Protocol:

* Anestèsia de l'animal amb anestèsia inhalatòria isoflurà al 5% utilitzant el vaporitzador.

* Obrir la cavitat pectoral i arrestar el cor amb la solució hipercalcèmica d'arrest freda de Krebs-Henseleit modificada** (conté butanodiona monoxima per bloquejar la contracció) injectant-la al ventricle esquerre a través de l'àpex. Injectar de 0,3-0,5 ml per evitar la sobrecàrrega del ventricle esquerre. Aquest mètode d'eutanàsia assegura que el cor estigui en l'estat fisiològic necessari per als estudis histològics del cor aïllat (diàstole).

* Extreure el cor i fixar en PFA al 4% durant un mínim de 24h a 4°C. Posteriorment, es mantenen en una solució de sucrosa al 30% en PBS fins la saturació per tal de criopreservar-los. Per la seva conservació i posterior anàlisi histològic es tallen de manera transversal a l'alçada de la lligadura, obtenint un segment basal i un apical. Seguidament s'inclouen en OCT (tissue-tek®, SAKURA, Torrance, CA, EUA) i es congelen de manera immediata en isopentà refredat amb nitrogen líquid. Ràpidament són emmagatzemats al congelador de -80°C.

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

-NaCl 0,4g

-KCl 0,44g

-Glucosa 0,2g

-NaHCO₃ 0,01g

-BDM 0,3g

-Heparina (1000U/ml) 1ml

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

5. SISTEMES D'ANÀLISI

5.1 IMATGE PER BLI

5.1.1 BLI *in vitro*

L'anàlisi *in vitro* de l'emissió de llum en les cèl·lules marcades amb gens que codifiquen per a l'expressió de proteïnes bioluminescents, es realitza en plaques de 24 pous:

Protocol:

* Eliminar el sobrenedant de cèl·lules en cultiu.

* Netejar dues vegades amb PBS 1X

- * Afegir 100 µl del substrat per PLuc o RLuc (Promega). Amb l'objectiu d'evitar creuaments en les emissions de llums registrades, l'estudi de l'emissió de cada llum es fa en dies consecutius.
- * Col·locar la placa dins de la càmera d'alta eficiència ORCA-2BT (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japó). Durant tot l'estudi es manté la mateixa distància per a la presa de la imatge, així com la màxima obertura de l'objectiu.
- * Prendre una imatge del camp clar durant 125 mseg i amb un *binning* 1 x 1 (tècnica que aboca el contingut de diferents píxels dels sensor CCD i col·loca el resultat d'aquesta suma en un sol píxel de la imatge final, en aquest cas matrius de 1 x 1 píxels adjacents).
- * Immediatament després, i sense moure la posició la placa, prendre una imatge amb fosc total on es capten els fotons de llum emesos per les cèl·lules. El temps i el *binning* utilitzats són diferents per a cada procediment i depenen, tant de la quantitat de cèl·lules com dels fotons emesos per cada una d'aquestes cèl·lules.

5.1.2 BLI in vivo no invasiva

Protocol:

- * Anestesiari el ratolí mitjançant una injecció IP amb 100 mg/kg de ketamina i 3,3 mg/kg de xilacina.
- * Administrar IP el substrat de la PLuc, la luciferina. El substrat de la RLuc, la colenterazina (CZN), s'administra IV a través de la vena caudal dels ratolins.
- * Immobilitzar el ratolí sobre una peça de metacrilat de color negre i col·locar a una determinada distància de l'objectiu de la càmera (HFP-Schneider Xenon 0,95/25 mm) d'alta eficiència ORCA-2BT (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japó). En cada estudi es manté la distància, però aquesta és diferent entre els diversos estudis. La distància emprada depèn tant de l'àrea de l'animal on es vol detectar presència de cèl·lules com de la intensitat del senyal que produeixen aquestes cèl·lules. Per a tots els estudis, l'objectiu de la càmera es troba a la màxima obertura.

- * Prendre una imatge del camp clar durant 125 milisegons i amb un *binning* 1 x 1.
- * Immediatament després, i sense moure la posició de l'animal, prendre una imatge amb foscors total on es captin els fotons de llum emesos per les cèl·lules implantades en el ratolí. El temps i el *binning* utilitzats són diferents per a cada procediment i depenen, tant de la quantitat de cèl·lules com dels fotons emesos per cada una d'aquestes cèl·lules.

5.1.3 Quantificació de fotons a partir de les imatges

La quantificació dels fotons detectats en cada imatge es fa mitjançant el programa d'anàlisi d'imatge Wasabi (Hamamatsu Photonics). Els resultats s'expressen com a comptes fotònics (PHCs, de l'anglès *photon counts*).

Protocol:

Mitjançant el programa Wasabi, definir l'àrea d'interès d'on es vol fer el càlcul de fotons totals i extreure de la memòria de la imatge els PHC captats. D'aquesta manera, s'obté un nombre total de PHC de l'àrea d'estudi.

A la vegada, extreure el nombre del total de PHC d'una àrea de la mateixa imatge on no hi hagi senyal detectable. Això és el que es coneix com a soroll de fons.

El càlcul net de PHC de l'àrea que es vol estudiar es fa aplicant la següent fórmula:

$$\text{PHC} = (\text{PHC totals de l'àrea d'interès}) - [(\text{mitjana de PHC del soroll de fons}) \times (\text{nombre total de píxels de l'àrea d'estudi})]$$

En els estudis on ha estat necessari, es normalitzen tots els valors de PHC obtinguts durant l'experiment respecte als del dia inicial.

5.2 ANÀLISI FUNCIONAL: ECOCARDIOGRAMA

La funció cardíaca dels ratolins es va avaluar mitjançant ecocardiografia transtoràcica realitzada amb un ecocardiògraf (Vivid 7, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, GB) equipat amb un transductor lineal de 10 MHz. Es van adquirir mesures basals (1 dia abans del MI), postIAM (2 dies després del MI) i a 2 i 4 setmanes post MI. Es van realitzar ecocardiografies mode M i bidimensionals a nivell dels músculs papil·lars en la visió paraesternal de l'eix llarg (Fig. 33).

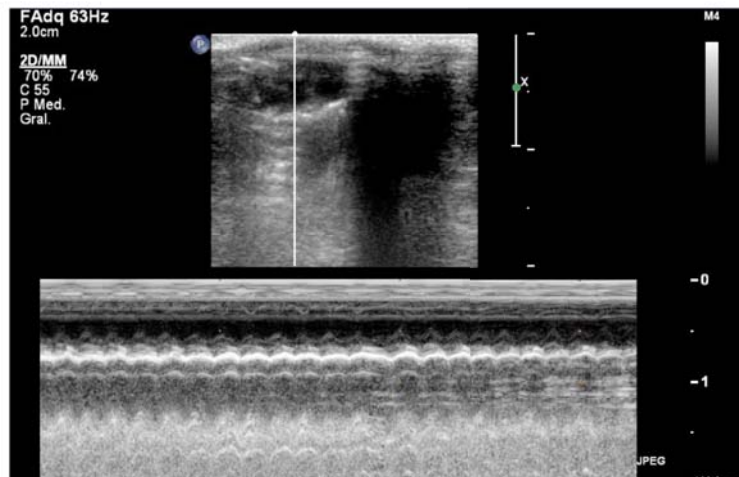


Fig 33. Imatge representativa d'ecocardiografia en mode M del múscul papil·lar en la visió de l'eix llarg

Els paràmetres funcionals es van calcular a partir de 5 cicles consecutius utilitzant mètodes estàndards¹⁷². Es van quantificar les dimensions (volum (V), àrea (A) i diàmetre (D)) del ventricle esquerre en telesístole (VEs) i telediàstole (VEd) pel càlcul de la fracció d'ejecció (FE) segons:

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

Es va realitzar un ANOVA de dos factors. Els càlculs estadístics es van fer sense la primera lectura ja que l'efecte d'interès que es vol observar és el que succeeix en posterioritat i podria emascarar els resultats.

5.3 ANÀLISI MORFOMÈTRICA: TRICRÒMICA DE MASSON

Es tallen els segments apicals dels cors congelats en seccions de 10 µm de gruix i es tenyeixen un total de 8 seccions per ratolí separades 100 µm, amb la tinció tricròmica de Masson (descrita més avall) per distingir entre cardiòcits i la matriu de col·lagen. Es capten les imatges amb una lupa Leica a 10 augments que permet incloure la secció completa del cor. L'àrea fibròtica es pot identificar pel seu color blau clar. Això ens permet determinar la mida del infart (superfície), el gruix de la paret del infart i la dilatació del ventricle esquerre (superfície interna del ventricle esquerre) mitjançant planimetria computeritzada utilitzant el programa d'anàlisi ImageJ. Totes les seccions s'han examinat cegament i els càlculs dels valors expressats es fan com es descriuen a continuació. L'àrea infartada es calcula com el promig de les superfícies riques en col·làgena de les diferents seccions respecte el promig de la superfície total de paret del ventricle esquerre. Els valors s'expressen en percentatge. Per avaluar el gruix de la paret infartada, es realitza per una banda, mesures de la distància més curta entre l'endocardi i l'epicardi, i per l'altra també es mesura el gruix de les zones del marge del infart. El valor expressat final s'obté de fer la mitjana de 6 seccions separades per 100 µm. La dilatació del ventricle esquerre s'expressa com la mitjana (6 seccions separades per 100 µm de distància) de la superfície interna del ventricle esquerre comparant animals tractats respecte els controls.

5.3.1 Tinció Tricròmica de Masson

La tricròmica de Masson és àmpliament utilitzada amb l'objectiu de distingir les cèl·lules del teixit connectiu que les envolta. En el nostre cas concret ens permet visualitzar la cicatriu generada després del infart de miocardi i distingir-la del teixit viable restant.

Solucions necessàries:

- Àcid fosfomolíbdic:

· 1 g d'àcid fosfomolíbdic en 100 ml H₂O

- Blau d'anilina:

· Àcid acètic 2,5% (2,5 ml en 100 ml H₂O)

· Solució de blau d'anilina saturada

- Aigua acètica:

· 1 ml d'àcid acètic

· 99 ml de H₂O

- Fucsina de Ponceau:

· Solució A:

1 g de Ponceau Solidina

100 ml H₂O acètica 0,5%

· Solució B:

1 g de Fucsina àcida

100 ml H₂O acètica 0,5%

Barrejar 2 parts de la Solució A + 1 part de la Solució B

Protocol:

- * Preparar els diferents colorants.
- * Desparafinar i rehidratar amb un protocol estàndard.
- * Rentar la mostra amb aigua corrent durant 5 min.
- * Tenyir amb hematoxilina durant 5 min.
- * Rentar amb aigua corrent.
- * Rentar amb aigua acètica.
- * Rentar amb aigua corrent.
- * Tenyir amb Fucsina de Ponceau durant 5 min.
- * Rentar amb aigua corrent durant aprox. 1 min.
- * Rentar amb aigua acètica durant aprox. 1 min.
- * Incubar en àcid fosfomolíbdic.
- * Rentar amb aigua acètica durant 1 min.
- * Tenyir amb blau d'anilina durant 5 min.

- * Rentar amb aigua corrent.
- * Rentar amb aigua acètica.
- * Rentar amb aigua corrent.
- * Deshidratar:
 - 5 min en etanol 70°
 - 2 x 5 min en etanol 96°
 - 2 x 5 min en etanol 100°
 - 20 min xilè
- * Muntar.

Resultats esperats:

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

5.4 DENSITAT VASCULAR: TINCIÓ AMB LECTINA GSLIB4

La lectina I-isolectina B4 de la *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* (GSL I o GSL I-B4) és un bon marcador per identificar les cèl·lules de llinatge endotelial^{173, 174}. Les seccions de cor de ratolí es tenyeixen amb la lectina GSLIB4 seguint el protocol descrit més avall. Com a sistema de detecció s'utilitza l'Alexa 647 conjugat a estreptavidina (Invitrogen). Es determina l'àrea de marcatge de lectina i es divideix per la superfície de teixit. S'obté així la densitat vascular. Es capten imatges de 20 camps seleccionats aleatòriament (10 de la zona del marge del infart i 10 de zones distals) en 2 seccions per animal en un total de 56 animals (10 controls MI, 10 controls MI fibrina, 8 Sham cardíac ATDPCs, 8 Sham sub ATDPCs, 10 MI cardíac ATDPCs i 10 MI sub ATDPCs). Les imatges són captades amb el microscopi confocal de fluorescència Leica SP5 i tan les superfícies de teixit com de marcatge de lectina es mesuren en cada camp amb el programa d'anàlisi d'imatges ImageJ. Els valors finals es van obtenir a partir de la mitjana de les seccions per no sobredimensionar la mida de la mostra.

Solucions necessàries:

- TBS 10x pH 7,4:
 - 87,66g NaCl
 - 60,57g Tris
 - 1000 ml H₂O

Ajustar a pH 7,4 i diluir a 1X

Protocol:

- * Assecar les seccions amb l'ajuda d'un ventilador durant 30 min.
- * Rentar les seccions 2 X 5 min en TBS.
- * Rentar les seccions 3 X 10 min en TBS + 0,5% Tritó-X100 (0,1% TBS-T).
- * Incubació amb la lectina: Diluir la GSL I isolectina B4 biotinilada (Vector, ref. B-1205) en 1% BSA en 0,1% TBS-T. Incubar o/n a 4°C en una cambra humida. Dilució 1:25.
- * Temperar durant 1h a temperatura ambient.
- * Rentar les seccions 3 X 5 min en 0,5% TBS-T.
- * Incubar les seccions en estreptavidina conjugada amb Alexa 647 (Invitrogen, ref. S32357) en TBS durant 1h a temperatura ambient en una cambra humida protegida de la llum. Dilució 1:500 (4 µg/ml).
- * Protegir les seccions de la llum d'ara en endavant.
- * Rentar les seccions 3 X 5 min en TBS.
- * Incubar amb Hoechst (1 µg/ml) durant 15 min en una cambra humida.
- * Muntar en medi Fluoromount™ (Sigma).
- * Observació i captació d'imatges al microscopi confocal fluorescència Leica SP5 .

5.5 ANGIOGRAFIA FLUORESCENT

La utilització d'un traçador verd fluorescent, que no es difon a través de la paret vascular, ens permet determinar tant quantitativament com qualitativament els vasos funcionals de nova formació^{175, 176} en els diferents polímers estudiats *in vivo*.

Protocol:

- * Injectar per la vena caudal de la cua del ratolí 200 µl (10mg/ml) de FITC-dextran (Sigma) i deixar que difongui per l'organisme durant 10 minuts.
- * Sacrificar el ratolí, retirar el polímer amb les cèl·lules i fixar 24 hores a 4°C amb solució al 10% de formalina (Sigma).
- * Per a la observació macroscòpica de la formació de nous vasos funcionals, es pren fotografia de l'emissió de fluorescència amb aparell IVIS spectrum (Caliper Life Sciences Inc, MA, EUA). Per a la observació microscòpica dels vasos i la disposició de les cèl·lules a estudi, es fa observació del polímer per microscòpia de confocal.

5.6 IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Amb l'objectiu d'identificar *ex vivo* les cèl·lules implantades en els diferents polímers i determinar la seva expressió proteica, es realitzen diferents immunofluorescències seguint el protocol descrit:

- * Assecar les seccions amb l'ajuda d'un ventilador durant 30 min.
- * Posar les seccions a un cambra humida.
- * Rentar les seccions 2 X 5 min en TBS.
- * Rentar les seccions 3 X 10 min en TBS + 0, 5% Tritó-X100 (0, 5% TBS-T).
- * Bloquejar durant 1 h en solució de bloqueig (1% BSA + 5% NDS en TBS-T).
- * Incubar les seccions amb l'anticòs primari a la dilució necessària (taula 4) en solució de bloqueig O/N a 4°C en una cambra humida.
- * Temperar durant 1 h a temperatura ambient.
- * Rentar les seccions 3 X 5 min en 0, 5% TBS-T.
- * Incubar les seccions amb l'anticòs secundari (taula 3) contra el primari conjugat amb un fluoròfor a la dilució necessària en TBS durant 1 h a temperatura ambient en una cambra humida protegida de la llum (Protegir les seccions de la llum d'ara en endavant).
- * Rentar les seccions 3 X 5 min en TBS.
- * Incubar amb Hoechst (Sigma) (1 µg/ml) durant 15 min en una cambra humida.
- * Rentar les seccions 2 X 5 min en TBS.

* Muntar en medi Fluoromount™ (Sigma).

Taula 3. Especificacions dels diferents anticossos primaris i secundaris utilitzats en les immunofluorescències.

Anticossos primaris:

Antigen reconegut	Espècie hoste	Dilució	Casa comercial
<i>Troponina I cardíaca</i>	Ratolí	1:100 (36µg/ml)	Abcam ab19615
<i>CD31</i>	Conill	1:50 (4µg/ml)	Abcam ab2864
<i>α-actinina sarcomèrica</i>	Ratolí	1:100 (no especificat)	Sigma A7811
<i>RFP</i>	Rata	1:50 (0.2mg/ml)	Chromoteck ref. 5F8
<i>RFP</i>	Conill	1:50 (10µg/ml)	Abcam ab62341
<i>GFP</i>	Pollastre	1:200 (5µg/ml)	Abcam ab13970
<i>GFP</i>	Cabra	1:50 (20µg/ml)	Abcam ab66773
<i>HIF1-α</i>	Ratolí	1:50 (0.21mg/ml)	Abcam ab8366
<i>OC</i>	Conill	1:50 5µg/ml	Abcam ab76688

Anticossos secundaris:

Espècie reconeguda	Espècie hoste	Dilució	Marcatge	Casa comercial
Conill	Burro	7,5 µg/ml	Cy5	Jackson ImmunoResearch ref. 711-175-152
Ratolí	Burro	7,5 µg/ml	Cy5	Jackson ImmunoResearch ref. 715-175-151
Rata	Burro	7,5 µg/ml	Cy3	Jackson ImmunoResearch ref. 712-165-150
Conill	Burro	7,5 µg/ml	Alexa 549	Jackson ImmunoResearch ref. 711-505-152
Pollastre	Burro	7,5 µg/ml	DyLight 488	Jackson ImmunoResearch ref.703-485-155
Cabra	Burro	7,5 µg/ml	Cy2	Jackson ImmunoResearch ref. 705-225-147

5.7 PCR a temps real

Aquesta tècnica ens permet mesurar quantitativament el nombre total de diferents mARNs en una mostra.

Protocol:

* Aïllament de l'ARN total amb el RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN) seguint el protocol del fabricant (http://www1.qiagen.com/HB/RNeasyPlusMicroKit_EN).

* L'ARN obtingut va ser quantificat amb l'aparell espectrofotòmetre nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

* Retrotranscripció: La obtenció de cADN es va dur a terme a partir de 2 µg de RNA i seguint el protocol descrit en el kit *Script One-Step RT_PCR kit* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

· Volum final reacció: 50 µl

-25 µl 2X RT-PCR reaction

-(21,5-X) µl H₂O lliure de nucleases

- X µl RNA (~2 µg)

-2,5 µl (≈250 nM) *Random hexamers* (50 µM)(Qiagen)

-1 µl *iScript Reverse Transcriptase* (50X)

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

-10 min a 25°C (anellament d'hexàmers)

-10 min a 50°C (síntesi de cADN)

-5 min a 95°C (inactivació de la transcriptasa reversa)

* PCR a temps real: Les amplificacions es van dur a terme amb 2 µl de cADN i en un volum final de 50 µl que contenia:

- 21 µl H₂O estèril

- 25 µl TaqMan 2X *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA)

- 2 µl cADN

- 2 µl sonda (cebadors)**

**Totes les sondes utilitzades van ser adquirides a Applied Biosystems:

- Gens d'expressió constitutiva:
 - gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH) (Hs99999905_ml)
- Gens implicats en diferenciació cardíaca:

- GATA-4 (Hs00171403_ml)
- Nkx2.5 (Hs00231763_ml)
- α -actinina sarcomèrica (Hs00241650_ml)
- cadena pesada de la β -miosina (β -MHC) (Hs00165276_ml)
- connexina-43(Cx-43)(Hs00748445_s1)
- SERCA-2 (Hs00544877_ml)
- troponina I cardíaca (cTnI) (Hs00165957_m1)
- Tbx5 (Hs00361155_ml)

- Gens implicats en diferenciació endotelial:

- VCAM-1 (Hs00365486_m1)
- vWF (Hs00169795_m1)
- VE-caderina (Hs00174344_m1)
- CD34 (Hs00990732_m1)
- EGR-3 (Hs00231780_m1)
- CD102 (Hs00168384_m1)
- CD36 (Hs00169627_m1)
- VEGF-A (Hs00173626_m1)
- EGR-1 (Hs00152928_m1)
- CD31 (Hs00169777_m1)
- SDF-1 (Hs00930455_m1)

- Gens implicats en diferenciació a òs:

- Osteocalcina/BGLAP (Hs01587813_g1)

- Gens implicats en estat d'hipòxia:

- LDHA (Hs00855332_g1)
- PGK1 (Hs00943178_g1)

Anàlisi de dades:

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

com a referència. Les comparacions pel que fa als nivells d'expressió relativa entre diferents mostres es van fer amb el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrit per Livak i col¹⁷⁷.

VI.RESULTATS

1. TRAÇADORS QUIMÈRICS PER L'ESTUDI *IN VITRO* I *IN VIVO* DE L'ESTAT I DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR MITJANÇANT TÈCNiques DE FLUORESCÈNCIA I BLI NO INVASIVA.

L'objectiu de l'ET és la producció de teixits funcionals que substitueixin o millorin els danyats, emprant materials biològics i sintètics, normalment en combinació amb cèl·lules i reguladors químics i físics. La complexitat en les interaccions entre les diferents eines i el gran nombre de variables existents fan que la utilització d'un sistema d'anàlisi *in vivo* àgil i eficient esdevingui una prioritat.

Davant aquesta necessitat, l'objectiu d'aquest apartat és demostrar la validesa del sistema d'imatge per BLI no invasiva com a tècnica àgil i eficient per a l'estudi i crivell de les eines de l'ET. Amb aquesta finalitat, es creen un seguit de vectors formats per gens traçadors bioluminescents i fluorescents regulats transcripcionalment per diferents promotors específics. La posterior integració d'aquests vectors dins les cèl·lules, ens permet determinar l'estat transcripcional de la cèl·lula a partir de la mesura dels canvis en l'emissió de llum i/o fluorescència. A la vegada, al presentar els fotons de llum la capacitat de passar els teixits, ens permet estudiar la localització i estat transcripcional de les cèl·lules que es troben dins d'un organisme viu, sense necessitat de sacrificar-lo. L'estudi de la potencialitat d'aquests vectors s'estudia, tant *in vitro* com *in vivo*, a partir de la capacitat que presenten a l'hora d'interpretar un procés de diferenciació, concretament un procés de diferenciació osteogènica. És per això que es marquen ATDPCs amb diferents gens traçadors sota el control transcripcional de promotors específics relacionats en el procés d'osteogènesi. Les ATDPCs estan considerades com una possible eina en la regeneració òssia per ET, al presentar unes característiques òptimes, com capacitat de diferenciació al llinatge ossi i endotelial, fàcil obtenció, abundància i estabilitat en períodes llargs de temps en cultiu *in vitro*.

Per a l'estudi de la capacitat dels traçadors utilitzats per a la monitorització d'un procés de diferenciació osteogènica *in vivo*, s'utilitzen els materials tridimensionals DBM o matrius d'os desmineralitzades. Aquestes matrius

permeten la infiltració i colonització cel·lular de l'hoste, i presenten els factors de creixement necessaris per a la diferenciació osteogènica.

1.1 CONSTRUCCIONS LENTIVÍRIQUES

Amb l'objectiu d'obtenir gens traçadors, que ens permetin tant la monitorització *in vitro* com *in vivo* de la diferenciació cel·lular i de l'estat cel·lular, es creen un seguit de construccions plasmídiques d'origen lentivíric. Es va optar per utilitzar gens traçadors que codifiquessin tant per proteïnes bioluminescents com per proteïnes fluorescents. La BLI té unes característiques òptimes per a la seva aplicació *in vivo*, al presentar poc soroll de fons i una elevada sensibilitat de detecció a partir de la utilització de càmeres d'alta sensibilitat. A la vegada, la fluorescència permet una aplicació més adient en processos d'anàlisi *in vitro* on el soroll de fons és més baix i permet obtenir imatges d'alta resolució. Els gens traçadors que es creen són gens que codifiquen proteïnes quimèriques formades per una proteïna fluorescent i una bioluminescent, assegurant així la no dissociació dels dos traçadors. S'han utilitzat dos gens traçadors, un que codifica per la proteïna quimèrica formada per RLuc més mRFP i un altre que codifica per la proteïna PLuc més la eGFP. El primer dels traçadors (RLuc-mRFP) es troba regulat transcripcionalment pel promotor d'expressió constitutiva del citomegalovirus (CMV). Pel que fa al segon dels traçadors (PLuc-eGFP), es troba regulat per diferents promotors específics implicats en diferents processos de diferenciació cel·lular i d'estat cel·lular, com processos de diferenciació a endoteli (hPECAM-1p), ós (hOCp) i miocardi (hcTnIp), així com un promotor indicador de l'estat d'hipòxia (HRE-12p).

La utilització conjunta dels dos traçadors en una mateixa cèl·lula (un traçador transcripcionalment regulat per un promotor constitutiu i un traçador transcripcionalment regulat per un promotor específic) ens permet determinar quin és l'estat transcripcional d'una cèl·lula per un gen determinat. Si aquest gen està implicat en processos de diferenciació o estat d'hipòxia, és un indicador de la possible diferenciació o estat cel·lular.

Amb la finalitat d'obtenir una expressió estable de les diferents construccions plasmídiques en les cèl·lules d'interès, s'utilitzen esquelets plasmídics lentivírics que ens permetran obtenir partícules lentivíriques caracteritzades per la capacitat d'integració permanent en el genoma de l'hoste, incloses en aquelles cèl·lules que no presenten divisió cel·lular o que és molt baixa (ATDPCs).

1.2 MONITORITZACIÓ *IN VITRO* DE L'ESTAT D'HIPÒXIA, LA DIFERENCIACIÓ ENDOTELIAL I OSTEOGÈNICA MITJANÇANT LA BLI

Una vegada obtingudes les diferents construccions lentivíriques, es determina *in vitro* si presenten la capacitat de definir l'estat transcripcional d'una cèl·lula a partir dels canvis observats en l'emissió de fotons. Les cèl·lules utilitzades per testar les diferents construccions són les ATDPCs que es marquen permanentment mitjançant infecció vírica amb la construcció plasmídica que expressa constitutivament els gens reporters (CMV:Rluc-mRFP). Una vegada seleccionades per FACS, gràcies a l'expressió de mRFP, les cèl·lules es divideixen en tres grups i s'infecta cada grup amb una construcció lentivírica diferent (**Fig 34**).

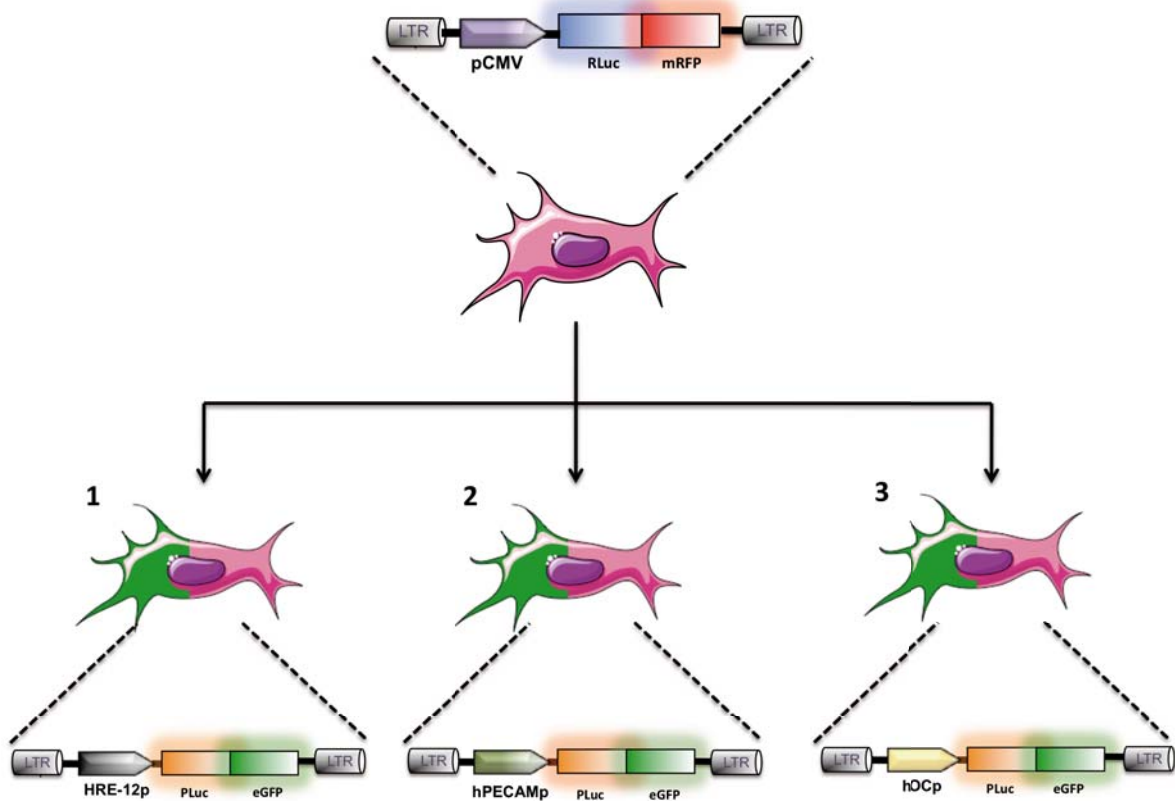


Figura 34. Diagrama amb les diferents infeccions lentivíriques dutes a terme en les ATDPCs.

El primer grup s'infecta amb la construcció lentivírica que presenta l'expressió dels gens reporters regulada pel promotor específic de l'estat d'hipòxia (HRE-12p: PLuc-eGFP). El segon grup s'infecta amb la construcció lentivírica que presenta el control transcripcional del gen reportier regulat pel promotor específic PECAM-1 (hPECAM-1p:PLuc-eGFP). Finalment, l'últim grup s'infecta amb la construcció lentivírica amb el control transcripcional del gen reportier regulat pel promotor específic de l'OC (hOCp: PLuc-eGFP).

Cada un dels grups es cultiven en diferents condicions. El primer grup, es cultiven les cèl·lules en condicions d'hipòxia (1% O₂) i normòxia (20% O₂) durant 24 hores. El segon i tercer grup es cultiven en condicions de diferenciació al llinatge endotelial i osteogènica durant 14 dies, respectivament. En els últims dos casos, i com a control, es cultiven les cèl·lules en medi estàndard de cultiu durant el mateix període de temps. En tots els casos, es procedeix a l'estudi de l'emissió de llum. Els resultats de les imatges obtingudes es mostren en la **figura 35**.

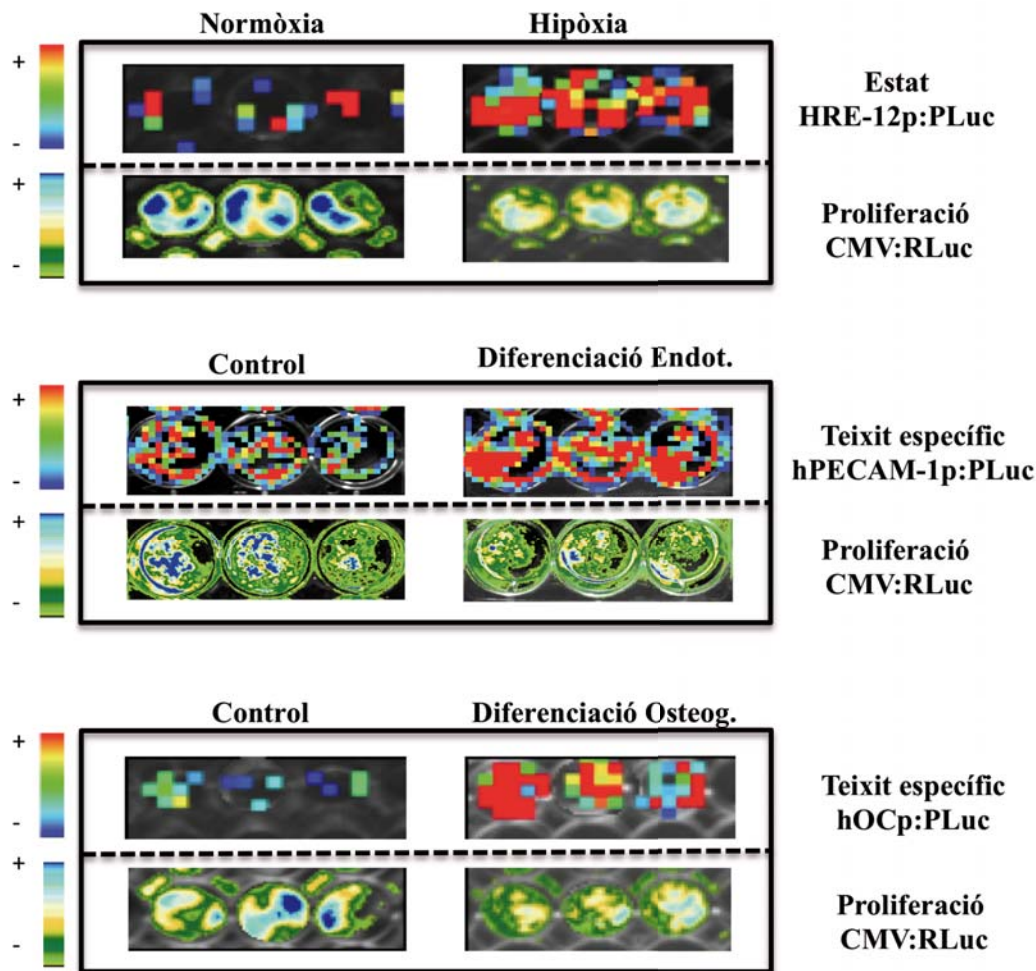


Figura 35. Imatges de BLI representatives de l'activitat de les diferents luciferases en ATDPCs exposades a medis i condicions de cultiu estàndards (part esquerra de la imatge) i medis de diferenciació o condicions d'hipòxia (part dreta de la imatge). La imatge superior de cada panell representa la llum emesa pel gen reporter transcripcionalment regulat pel corresponent promotor específic (PLuc) i la part inferior la llum emesa pel gen reporter transcripcionalmet regulat pel promotor constitutiu CMV (RLuc). Les barres de colors laterals representen els nivells d'intensitat bioluminescent per a la PLuc (blau, baixa; vermell, alta) i RLuc (verd, baixa ; blau, alta).

El càlcul de fotons totals emesos en cada cas ens permet obtenir el ràtio entre l'emissió de fotons corresponents als gens reporters regulats pels promotors específics i els fotons emesos pels gens reporters regulats pel promotor constitutiu. Els valors obtinguts es representen en el gràfic de la **figura 36A** .

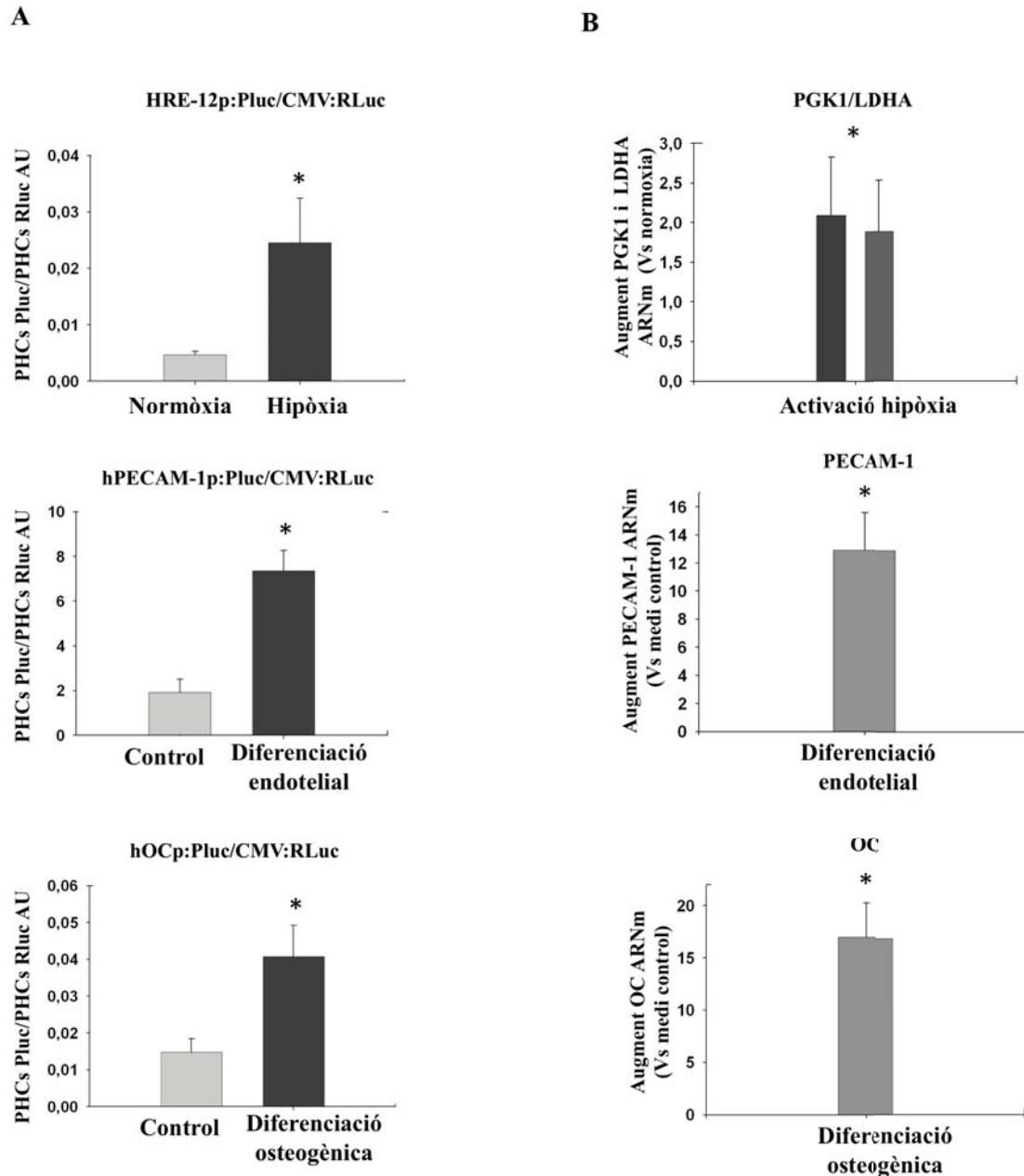


Figura 36. (A) Histogrames amb la representació dels ràtios PLuc/RLuc obtinguts de les imatges per BLI en les diferents condicions de cultiu (en gris les cèl·lules en condicions de cultiu estàndard i en negre les cèl·lules en condicions de cultiu hipòxiques o de diferenciació cel·lular). PH, "photon counts". AU, "arbitrary light units". (B) Representació de l'augment en l'expressió gènica de diferents marcadors en condicions d'hipòxia vs no hipòxia i en condicions de diferenciació cel·lular vs no diferenciació cel·lular. Per el càlcul de l'augment en l'expressió de cada gen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) s'utilitza el valor promig de Ct corresponent a tres experiments independents realitzats per duplicat, emprant el GAPDH com a referència. Els valors es representen com la mitjana \pm SD. * $p < 0,05$.

Els resultats obtinguts ens mostren que els ràtios resultants són superiors en aquelles cèl·lules que s'han cultivat en condicions d'hipòxia o de diferenciació al llinatge endotelial i osteogènic, respecte de les mateixes cèl·lules cultivades en condicions de normòxia i en medi de cultiu estàndard. Les diferències observades són estadísticament significatives en tots els casos. Concretament, el ràtio en cèl·lules cultivades en condicions d'hipòxia és 5 vegades superior a les mateixes cèl·lules cultivades en condicions de normòxia, mentre que les cèl·lules cultivades en medis de diferenciació al llinatge endotelial i osteogènic presenten ràtios de 2,8 i 3,9 vegades superiors als registrats en les mateixes cèl·lules en condicions de cultiu estàndards.

Amb la finalitat de validar els resultats obtinguts a partir d'una altra tècnica d'anàlisi independent, es realitza la comprovació de l'expressió gènica mitjançant PCR a temps real pels diferents grups en les diferents condicions. Els resultats obtinguts es mostren en el gràfic de la **figura 36B**. S'observa un augment de l'expressió dels gens relacionats amb l'activació d'hipòxia (PGK1 i LDHA) en les cèl·lules cultivades en hipòxia, essent 2 vegades superior respecte les mateixes cèl·lules en condicions de normòxia. Pel que fa a les cèl·lules cultivades en medi de diferenciació a endoteli, presenten un augment en l'expressió del gen endotelial PECAM-1, 12 vegades superior respecte a les mateixes cèl·lules cultivades en medi de cultiu estàndard. De la mateixa manera, les cèl·lules cultivades en medi de diferenciació a ós, presenten un augment en l'expressió del gen OC, 15 vegades superior respecte a les mateixes cèl·lules cultivades en medi de cultiu estàndard. En resum, els resultats obtinguts per PCR a temps real coincideixen amb els registrats per BLI.

1.3 MONITORITZACIÓ NO INVASSIVA IN VIVO DE L'ESTAT D'HIPÒXIA, LA DIFERENCIACIÓ ENDOTELIAL I OSTEOGÈNICA MITJANÇANT LA BLI

Amb la finalitat de determinar si els constructes lentivírics permeten la monitorització de la diferenciació cel·lular *in vivo*, s'utilitzen les matrius d'os desmineralitzades (DBM). Aquestes matrius, produïdes a partir de l'os cortical de rata, presenten un ambient osteoinductor adequat per a l'estudi *in vivo* de la

capacitat de diferenciació cel·lular. Un procés d'osteogènesi, no només compren una població cel·lular capaç de diferenciar-se a ós, si no que també és necessària una població cel·lular que ha de donar lloc a una estructura vascular capaç d'aportar els requeriments metabòlics necessaris en el procés de formació d'ós. Així doncs, el procés d'osteogènesi en matrius de DBM, ens permet l'estudi *in vivo* de la variació en l'expressió dels diferents reporters indicadors de processos claus en l'osteogènesi com l'activació de la hipòxia i la diferenciació endotelial i òssia. Les cèl·lules utilitzades per a la monitorització *in vivo* de l'osteogènesi són les ATDPCs, al presentar potencialitat de diferenciació al llinatge endotelial i ossi.

S'utilitzen les mateixes ATDPCs i els mateixos marcatges emprats *in vitro*. Abans de la injecció en els DBMs, aquests són implantats subcutàniament en l'esquena de 6 ratolins (3 DBMs per ratolí) durant una setmana, amb la finalitat que es formi una matriu suficientment vascularitzada per a la supervivència cel·lular. A la setmana post implantació de les matrius de DBMs, s'injecten dins d'elles les ATDPCs amb els diferents gens reporters, seguint l'esquema de la **figura 37**. Es monitoritza l'emissió de fotons per part del les ATDPCs incloses en les matrius de DBMs cada set dies, fins un total de 56 dies. Les imatges registrades cada setmana es mostren en la **figura 37**.

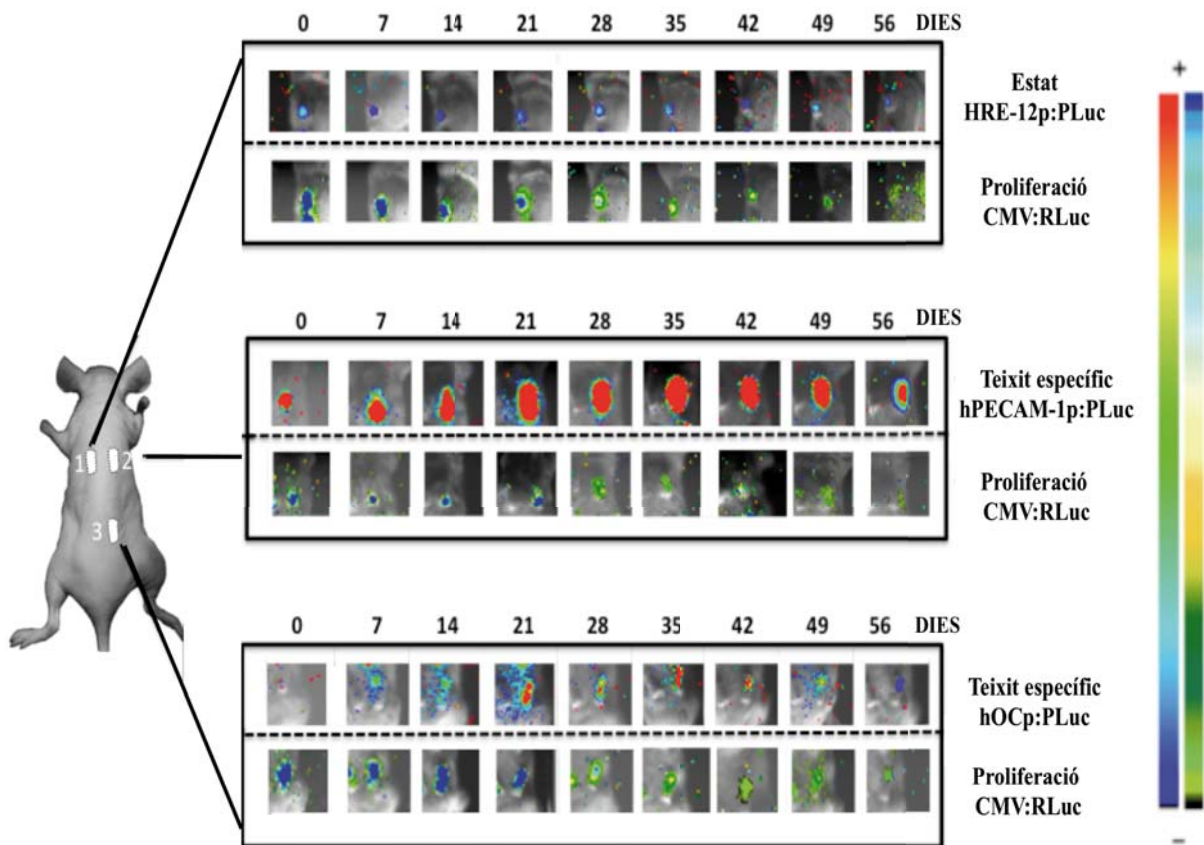


Figura 37. Diagrama amb la zona d'implantació dels diferents DBM i la numeració en funció de la construcció lentivírica integrada en les ATDPCs (DBM-1=PLox-HRE12p:PLuc:eGFP + CMV:RLuc:mRFP:ttk; DBM-2=PLox-hPECAM-1p:PLuc:eGFP + CMV:RLuc:mRFP:ttk; DBM-3=PLox-hOCp:PLuc:eGFP + CMV:RLuc:mRFP:ttk). Les imatges per BLI mostren una representació en el temps dels diferents grups, on la part superior mostra la llum emesa per la RLuc i la part inferior la llum emesa per la PLuc (n=6). Les barres de colors laterals representen els nivells d'intensitat bioluminescent per a la PLuc (blau, baixa; vermell, alta) i la RLuc (verd, baixa; blau, alta).

La quantificació dels fotons produïts per les ATDPCs en els diferents DBM (**Fig. 38**) ens mostren que el ràtio PLuc/RLuc augmenta progressivament al llarg del temps, fins a un màxim de 125 (a dia 28) en les cèl·lules que duen la regulació transcripcional de la PLuc lligada al promotor específic hPECAM-1. De la mateixa manera, en el cas de les cèl·lules amb la regulació transcripcional de la PLuc lligada al promotor específic hOCp, s'observa un augment progressiu del ràtio PLuc/RLuc al llarg del temps, assolint un màxim de 15 al dia 35. Finalment, en el cas de les cèl·lules amb la regulació transcripcional de la PLuc lligada al promotor específic HRE-12, s'observa un lleuger augment en el ràtio

PLuc/RLuc a partir del dia 21, però en cap cas representa un augment significatiu.

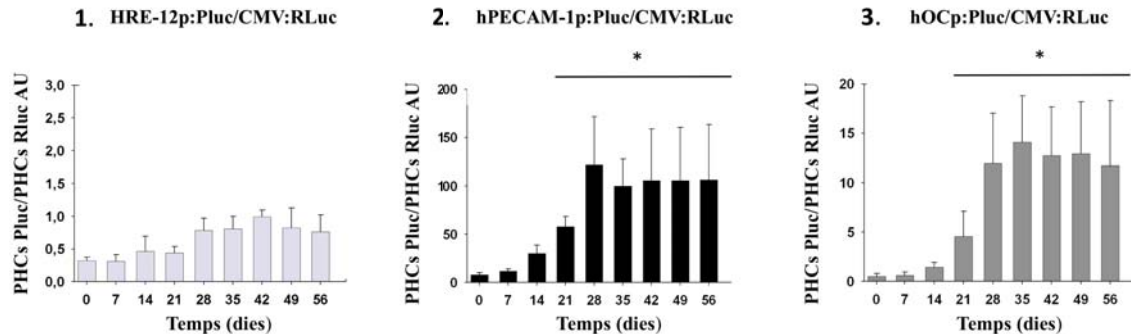


Figura 38. Histogrames amb els valors resultants del ràtio PLuc/RLuc pels diferents grups obtingut a partir de l'anàlisi de fotons de les imatges per BLI. Els valors es representen com la mitjana \pm SD.* $p < 0,05$. PH, "photon counts". AU, "arbitrary light units".

A partir de l'anàlisi independent per PCR a temps real, s'estudia l'expressió gènica dels diferents DBMs en el temps, per validar els resultats obtinguts per BLI. Es realitza l'extracció de mARN dels DBMs a diferents dies (21, 42 i 56) i s'analitzen els canvis d'expressió dels gens PECAM-1, OC, PGK1 i LDHA. Els resultats (**Taula 4**), de la mateixa manera que els observats en l'anàlisi per BLI, presenten un augment al llarg del temps de l'expressió dels gens PECAM-1 i OC en les cèl·lules humanes incloses en els DBM, respecte a les mateixes cèl·lules crescudes en monocapa *in vitro*. A la vegada, no es detecta augment en l'expressió dels gens relacionats amb la hipòxia (PGK-1 i LDHA) al llarg del temps, corroborant els valors de BLI, on no s'observava augment significatiu del ràtio PLuc/RLuc en el temps.

Taula 4. Expressió *in vivo* vs *in vitro* de diferents marcadors gènics en ATDPCs incloses en matrius de DBM al llarg del temps. Per el càlcul de l'augment en l'expressió de cada gen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) s'utilitza el valor promig de Ct corresponent a tres experiments independents realitzats per duplicat, emprant el GAPDH com a referència

Augment expressió ARNm* (vs. cèl·lules control)								
21 dies			42 dies			56 dies		
PGK1/ LDHA	Pecam-1	OC	PGK1/ LDHA	Pecam-1	OC	PGK1/ LDHA	Pecam-1	OC
0/0	8,96	5,48	0/0	9,41	9,96	0/0	18,85	22,39

En conjunt, els canvis registrats *in vivo* en l'activitat de la PLuc regulada transcripcionalment per diferents promotors específics, presenten una relació directa amb els nivells d'expressió gènica dels gens regulats pels propis promotors endògens.

1.4 ANÀLIS DE L'ANGIOGÈNESIS EN DBMs I ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA.

Per a la visualització del desenvolupament de la microvasculatura en els DBMs implantats i la seva relació amb les ATDPCs, es realitza abans del sacrifici i a dies consecutius (19, 42 i 56), la injecció per la vena caudal del ratolí del traçador verd fluorescent de vasos (FITC-dextrà) (**Fig. 39A**). Una vegada extrets els DBMs dels ratolins, la observació macroscòpica de la fluorescència verda en els diferents DBMs (**Fig. 39B**), ens indica un augment progressiu de la fluorescència al llarg del temps. Concretament, els valors de fluorescència obtinguts són $5,15 \cdot 10^8$, $6,67 \cdot 10^8$ i $8,06 \cdot 10^8$ p/sec/cm²/sr per els dies 21, 42 i 56* respectivament (*p< 0,005). Aquests resultats ens confirmen l'existència d'un sistema vascular en els DBM, així com la seva connexió amb el sistema vascular de l'hoste.

Aquest mateix fenomen de vascularització és observat a nivell microscòpic a partir de la observació directa dels DBM per microscòpia de fluorescència confocal (**Fig. 39B i video 1**), on es pot observar el sistema vascular i la seva distribució dins els DBMs.

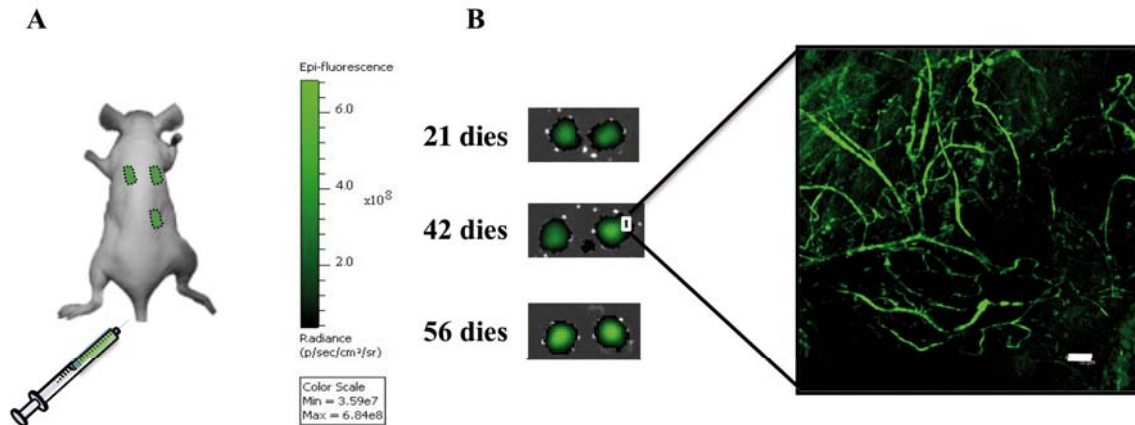


Figura 39. (A) Diagrama del procés d'injecció per la vena de la cua del FITC-dextrà. (B) Esquerra: Imatges per fluorescència de DBMs extrets a diferents temps i post injecció de FITC-dextrà. Dreta: imatge d'una secció de DBM obtinguda per microscòpia de fluorescència confocal que mostra l'existència d'una xarxa vascular fluorescent. Barra a escala 100 μ m.

Una observació més detallada per microscòpia de confocal dels diferents DBMs, ens permet distingir la distribució de les ATDPCs en la matriu, així com l'estat transcripcional dels gens reporters fluorescents i la seva correlació amb els valors registrats amb els reporters bioluminescents. Cal recordar, que la fluorescència verda de les cèl·lules està transcripcionalment regulada pels diferents promotors específics (hPECAM-1P:PLuc:eGFP; hOCp:PLuc:eGFP; HRE-12p:PLuc:eGFP).

Com es pot veure en la **figura 40**, en tots els casos es poden localitzar les ATDPCs en la matriu de DBM, a partir de la fluorescència vermella transcripcionalment regulada pel promotor constitutiu CMV (CMV:hRLuc:RFP:ttk). D'altra banda, en el cas de les seccions de DBM amb ATDPCs que porten la construcció lentivírica amb el promotor específic hPECAM-1, expressen també fluorescència verda, indicatiu de la seva possible diferenciació al llinatge endotelial (**Fig. 39 i video 2**). A la vegada, les cèl·lules que expressen aquesta doble fluorescència, presenten una morfologia endotelial, així com una disposició lineal al llarg dels vasos plens del traçador verd fluorescent.

En el cas de les seccions de DBM amb ATDPCs que porten el promotor específic hOCp, també s'observen cèl·lules que expressen el doble marcador verd/vermell, però en aquest cas les cèl·lules amb el doble marcatge no presenten una morfologia endotelial i no es troben associades a vasos (**Fig.**

40).

Finalment, les seccions de DBMs a diferents temps amb ATDPCs que porten el promotor específic HRE-12p i expressen fluorescència vermella, no presenten expressió de fluorescència verda (**Fig. 40**), indicatiu de que les ATDPCs no es troben en condicions d'hipòxia.

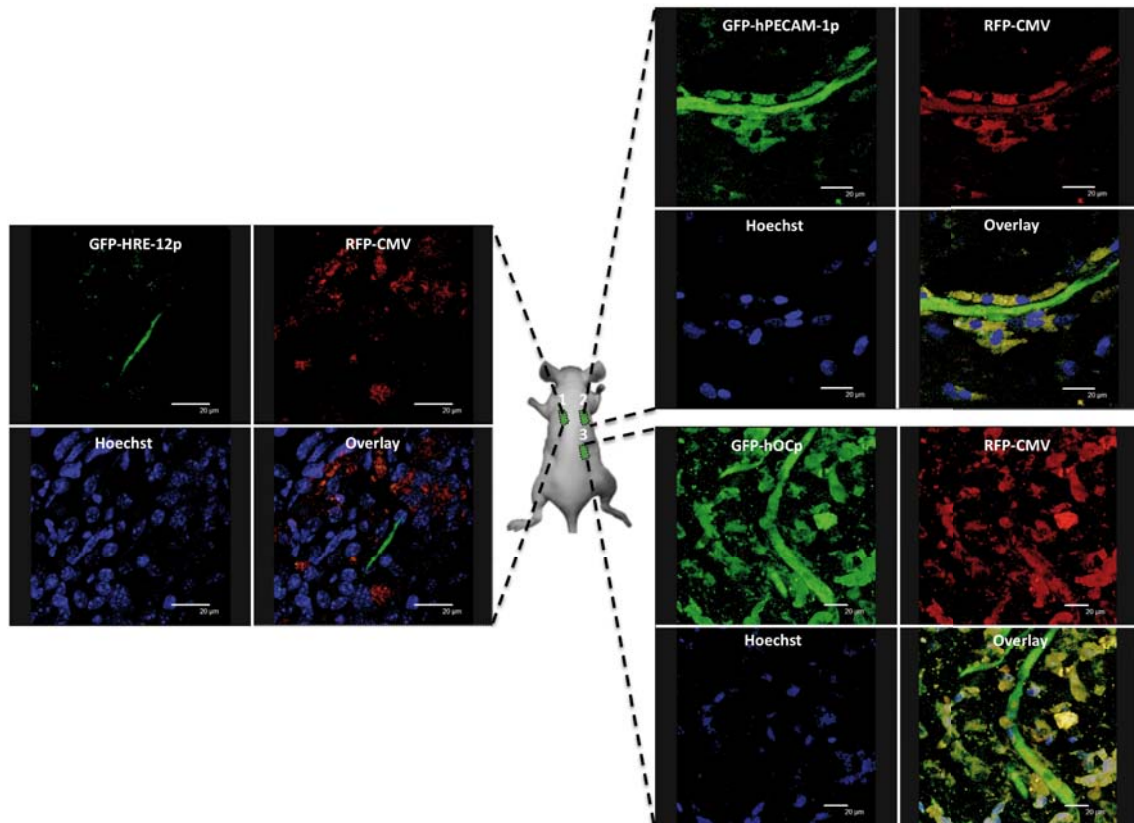


Figura 40. *Imatges per microscòpia de fluorescència dels diferents DBMs amb els capil·lars marcats amb el traçador verd fluorescent FITC-dextrà. Cada imatge està composta per fluorescència verda corresponent a l'expressió del gen eGFP transcripcionalment regulat per un promotor específic i el traçador verd fluorescent de capil·lars (dalt-esquerra), la fluorescència vermella corresponent a l'expressió del gen RFP transcripcionalment regulat pel promotor constitutiu (dalt-dreta), la fluorescència blava per la tinció dels nuclis amb Hoechst (baix-esquerra) i la composició de les tres fluorescències (baix-dreta). Barres a escala 20 µm.*

Per acabar, es porta a terme un anàlisi independent de l'expressió proteica en els diferents DBMs, per confirmar les dades obtingudes per BLI i fluorescència. Es realitzen immunofluorescències amb anticossos específics. En el cas dels DBMs que porten el promotor específic hPECAM-1p, s'utilitza l'anticòs específic humà anti-PECAM-1, en el cas dels DBMs amb el promotor específic hOCp s'utilitza l'anticòs específic humà anti-OC, i en el cas dels DBM amb el promotor específic HRE-12p s'utilitza l'anticòs específic anti-HIF-1 α . En tots els casos,

els anticossos es conjuguen amb l'anticòs secundari Cy5, que al emetre la seva fluorescència dins el vermell llunyà no interfereix en l'anàlisi de les altres fluorescències. Els resultats obtinguts es presenten en la **figura 41** i confirmen la relació de l'expressió proteica amb els resultats observats per BLI, fluorescència i anàlisi genètic per PCR a temps real.

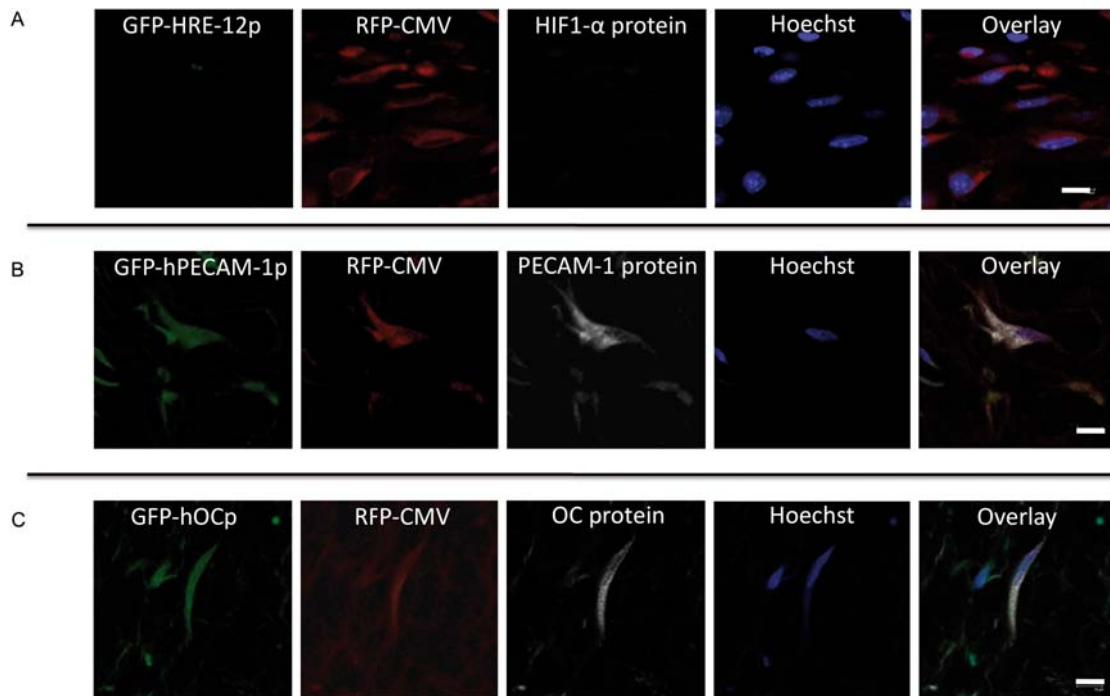


Figura 41. Tinció immunofluorescent per a la detecció de les proteïnes específiques HIF1- α (A), hPECAM-1 (B) i hOC (C), en ATDPCs implantades en els diferents DBMs. En cada cas, d'esquerra a dreta: fluorescència verda expressada a partir del control transcripcional del promotor específic; fluorescència vermella expressada a partir del promotor constitutiu CMV; en color blanc la detecció per anticòs específic de la proteïna corresponent; fluorescència blava corresponent a la tinció dels nuclis amb Hoechst; composició del conjunt d'imatges. Barra a escala 10 μ m.

2. APLICACIÓ DE LA PLATAFORMA BLI PEL DESENVOLUPAMENT DE TERÀPIES EN REGENERACIÓ CARDÍACA.

El desenvolupament de procediments terapèutics per a la regeneració cardíaca requereix la consideració de les cèl·lules, les estructures de suport i els factors físics i químics com agents terapèutics.

Dels diferents tipus cel·lulars que poden ser considerats com a potencialment aptes per a la regeneració cardíaca, les cèl·lules mare adultes autòlogues ens proporcionen inicialment un seguit d'avantatges. La primera d'elles és la innocuïtat d'aquestes cèl·lules pel que fa a la formació de teratomes i no presentar rebuig per part del sistema immune. Dins d'aquest grup cel·lular, les derivades de teixit adipós en permeten obtenir un gran nombre de cèl·lules amb una elevada capacitat de diferenciació a diferents llinatges.

La utilització de matrius tridimensionals pot aportar millores, al assegurar la localització de les cèl·lules en la zona de la lesió, evitant la seva dispersió i concentrant l'activitat de factors paracrins, potencialment beneficiosos. D'altra banda, la utilització d'estructures de suport d'origen natural que aporten informació espacial y molecular, poden promoure la diferenciació cel·lular.

Els hidrogels, presenten un estat líquid fins el moment de la seva polimerització, permeten l'administració en la zona de la lesió utilitzant mètodes quirúrgics poc invasius (p.ex: toracotomia lateral). L'estratègia d'administració del conjunt de cèl·lules i polímer en la zona infartada pot ser realitzada a partir del recobriment directa de la mateixa o bé a partir de la seva injecció. La primera opció es considera, a priori, la més recomanable com a conseqüència de l'elevada mortalitat observada en proves prèvies amb injecció directa del conjunt polímer i cèl·lules, així com pels últims estudis en què s'observa una millor eficàcia terapèutica en el recobriment de la zona infartada en comparació amb la injecció directa intramiocàrdica¹⁷⁸.

En aquest capítol s'apliquen les tècniques d'imatge per fluorescència i BLI pel crivell *in vivo* de dos tipus cel·lulars, les cèl·lules mare adultes derivades de teixit adipós cardíac (ATDPC cardíques) i subcutani (ATDPC subcutànies), incloses en estructures de suport de fibrina, com agents terapèutics en la regeneració cardíaca. En el dos casos s'han dut a terme estudis previs que demostren el seu potencial com a eines per a la regeneració cardíaca^{44, 179}.

L'estructura de suport de fibrina utilitzada és un polímer d'origen natural àmpliament aplicat en medicina⁶⁰ i que pot ser obtingut del propi pacient, evitant així qualsevol rebuig del sistema immune. Aquest material, que també pot ser obtingut de crioprecipitats de plasma sanguini comercials (Baxter

Healthcare Corp., Glendale, California), no presenta toxicitat cel·lular i permet mantenir la funció pròpia dels miocardiòcits de rata nounada (**video 3**).

2.1 LES CÈL·LULES I L'ESTRUCTURA DE SUPORT TRIDIMENSIONAL COM AGENTS TERAPÈUTICS EN MODEL D'INFART MURÍ.

Amb la finalitat d'estudiar el mecanisme per BLI amb el que aquestes cèl·lules promouen el procés de regeneració cardíac, s'obtenen ATDPCs subcutànies i de epicàrdiques, i es transfecten, en cada cas, amb gens indicadors de la proliferació cel·lular (CMV:RLuc-mRFP) i amb gens transcripcionalment regulats per promotors específics (induïbles) implicats en processos de diferenciació al llinatge endotelial (PECAM-1) (hPECAM-1p:PLuc-eGFP) i al llinatge muscular cardíac (Troponina) (hcTnlp:PLuc-eGFP). Aquesta estratègia ens permet monitoritzar diferents paràmetres importants en la regeneració cardíaca, com la viabilitat cel·lular i la capacitat de diferenciació al llinatge cardíac i endotelial. El diagrama de la **figura 42** mostra les modificacions genètiques dutes a terme en cèl·lules ATDPCs subcutànies i epicàrdiques.

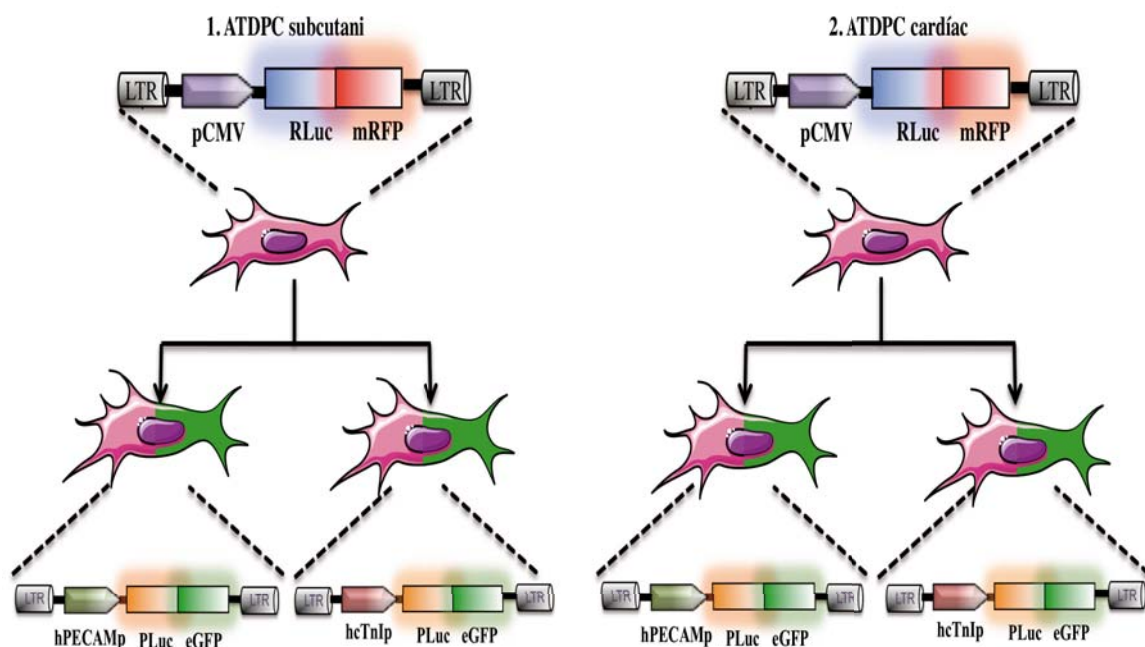


Figura 42. Construccions lentivíriques utilitzades i estratègia de transducció de les ATDPCs subcutànies i cardíques

Un cop infectats els diferents tipus cel·lulars, s'inclou cada grup en matrius de

fibrina, i es mantenen en cultiu fins el moment del seu trasplantament (48 hores mes tard) en el miocardi dels ratolins. En total es realitzen 68 implants en ratolins SCID femelles de 12 setmanes, 40 d'ells en ratolins als quals se'ls hi ha practicat una lligadura en l'artèria coronària descendent anterior esquerre (MI) i els altres 28 als que no se'ls hi ha practicat lligadura (Sham) (**Fig. 43**). A la vegada, es duen a terme els corresponents controls amb ratolins amb MI sense tractament (n=13) i ratolins amb MI tractat amb fibrina sense cèl·lules (n=13).

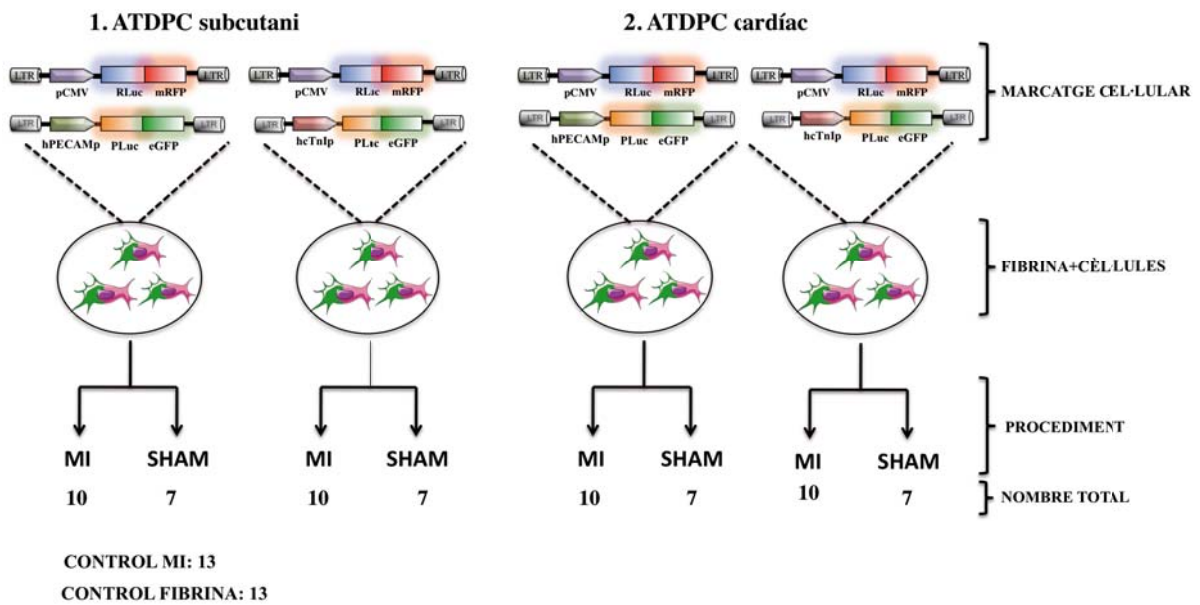


Figura 43. Diagrama amb les diferents infeccions realitzades en les ATDPCs, la posterior inclusió en matrius tridimensionals de fibrina, procediments quirúrgics aplicats i nombre total d'animals estudiats.

2.2 ESTUDI IN VIVO PER BLI

En els ratolins amb i sense infart, es monitoritza l'emissió de llum un cop per setmana durant un total de 3 setmanes. En les **figures 44, 45, 46 i 47** es mostren imatges representatives obtingudes per BLI que mostren la llum emesa pel gen traçador indicador de la proliferació cel·lular (RLuc), i la llum emesa pel gen traçador transcripcionalmet controlat pels promotors específics hPECAM-1p i hcTnlp (PLuc), tan en ATDPCs subcutànies com cardíques.

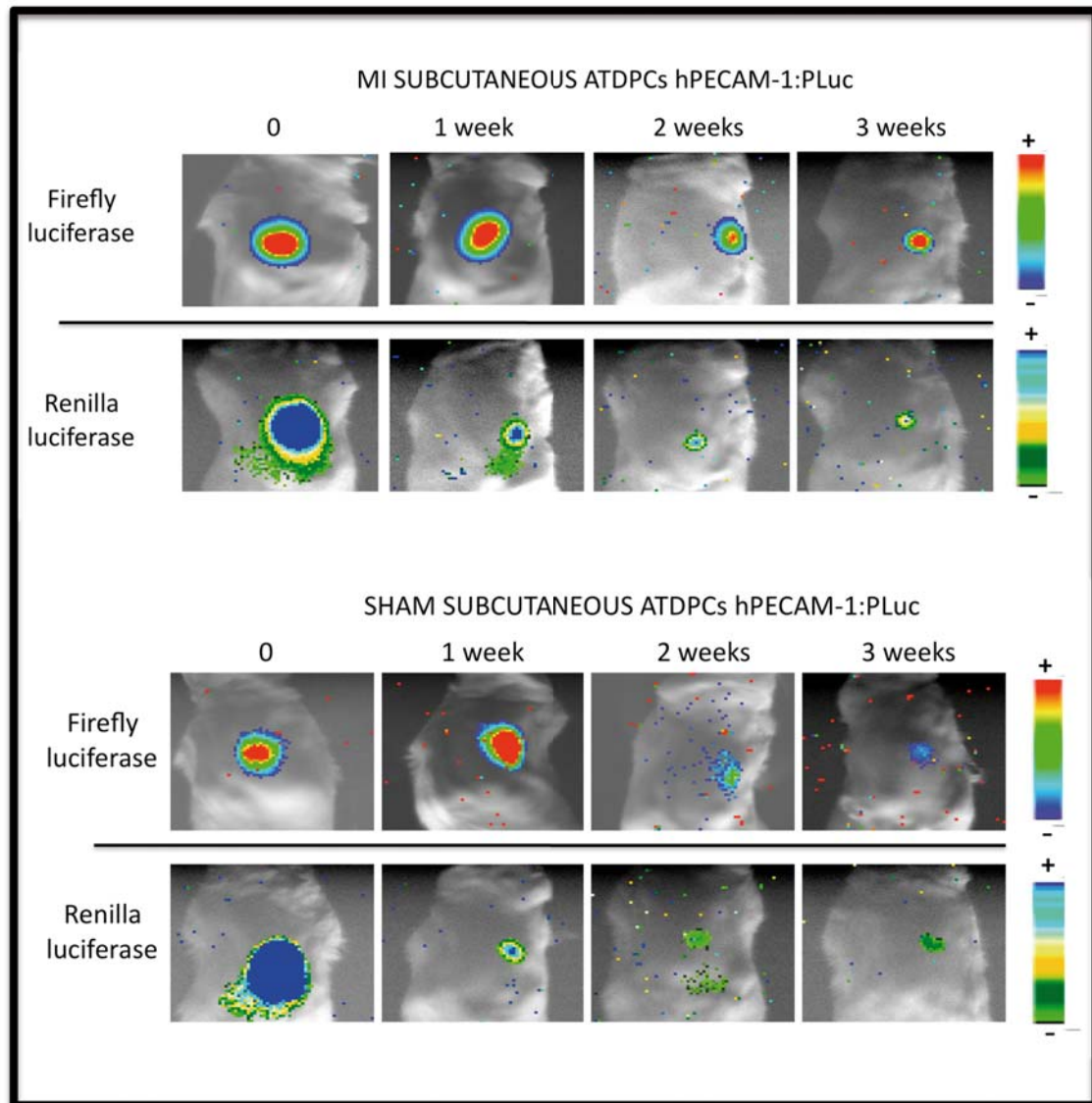


Figura 44. Representació de les imatges de BLI obtingudes en el temps, en ratolins que han patit un infart (MI: part superior de la imatge) i ratolins que no han patit un infart (Sham: part inferior de la imatge). Les cèl·lules monitoritzades són ATDPCs subcutànies i porten el constructe amb els gens traçadors indicadors de la proliferació cel·lular (RLuc: part inferior de cada tira d'imatges) i el constructe amb els gens reporters transcripcionalment regulats pel promotor específic hPECAM-1p (PLuc: part superior de cada tira d'imatges). Les barres de colors laterals representen els nivells d'intensitat bioluminescent per a la PLuc (blau, baixa; vermell, alta) i la RLuc (verd, baixa; blau, alta).

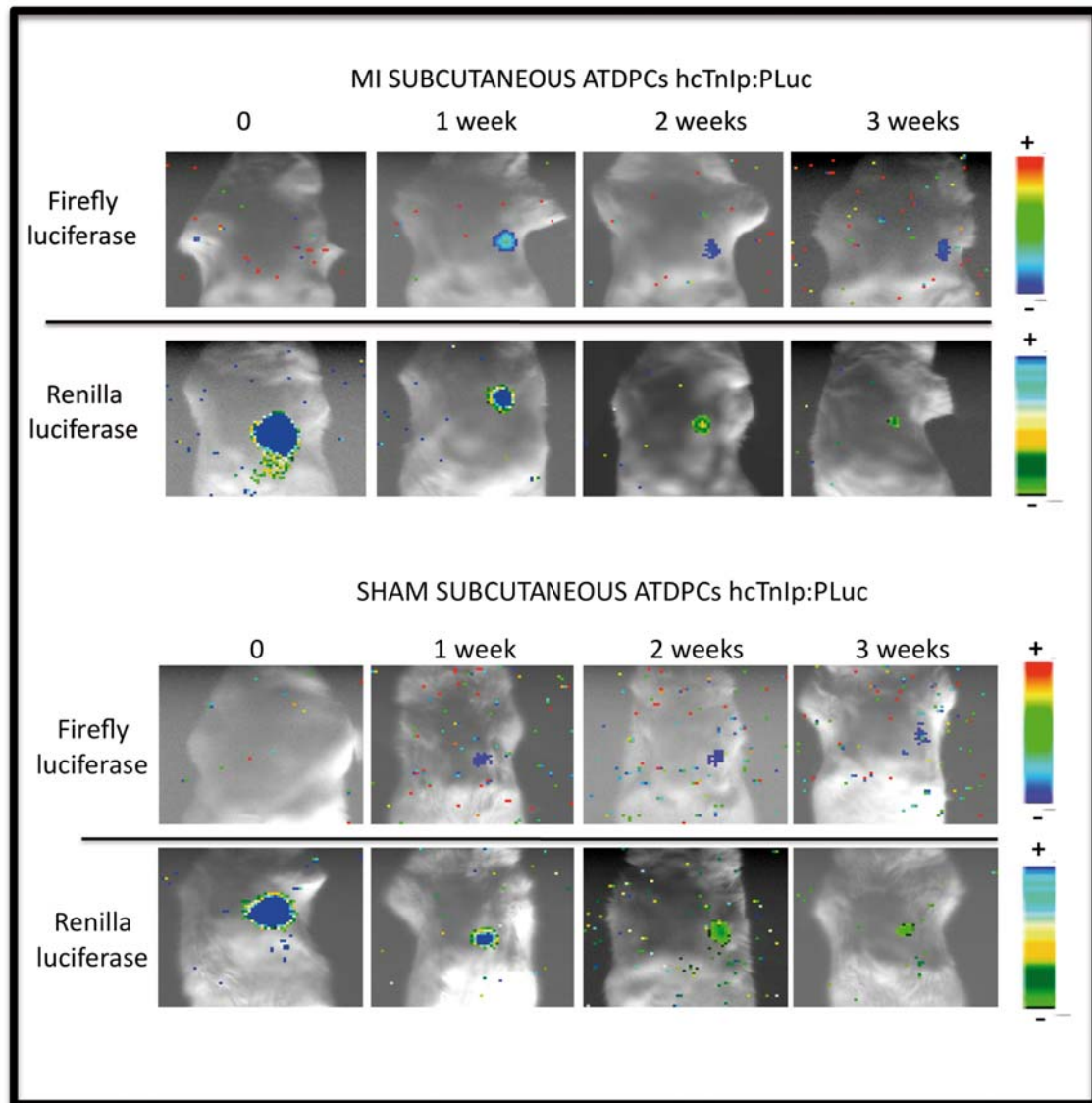


Figura 45. Representació de les imatges de BLI obtingudes en el temps, en ratolins que han patit un infart (MI: part superior de la imatge) i ratolins que no han patit un infart (Sham: part inferior de la imatge). Les cèl·lules monitoritzades són ATDPCs subcutànies i porten el constructe amb els gens traçadors indicadors de la proliferació cel·lular (RLuc: part inferior de cada tira d'imatges) i el constructe amb els gens reporters transcripcionalment regulats pel promotor específic hcTnlp (PLuc: part superior de cada tira d'imatges). Les barres de colors laterals representen els nivells d'intensitat bioluminescent per a la PLuc (blau, baixa; vermell, alta) i la RLuc (verd, baixa; blau, alta).

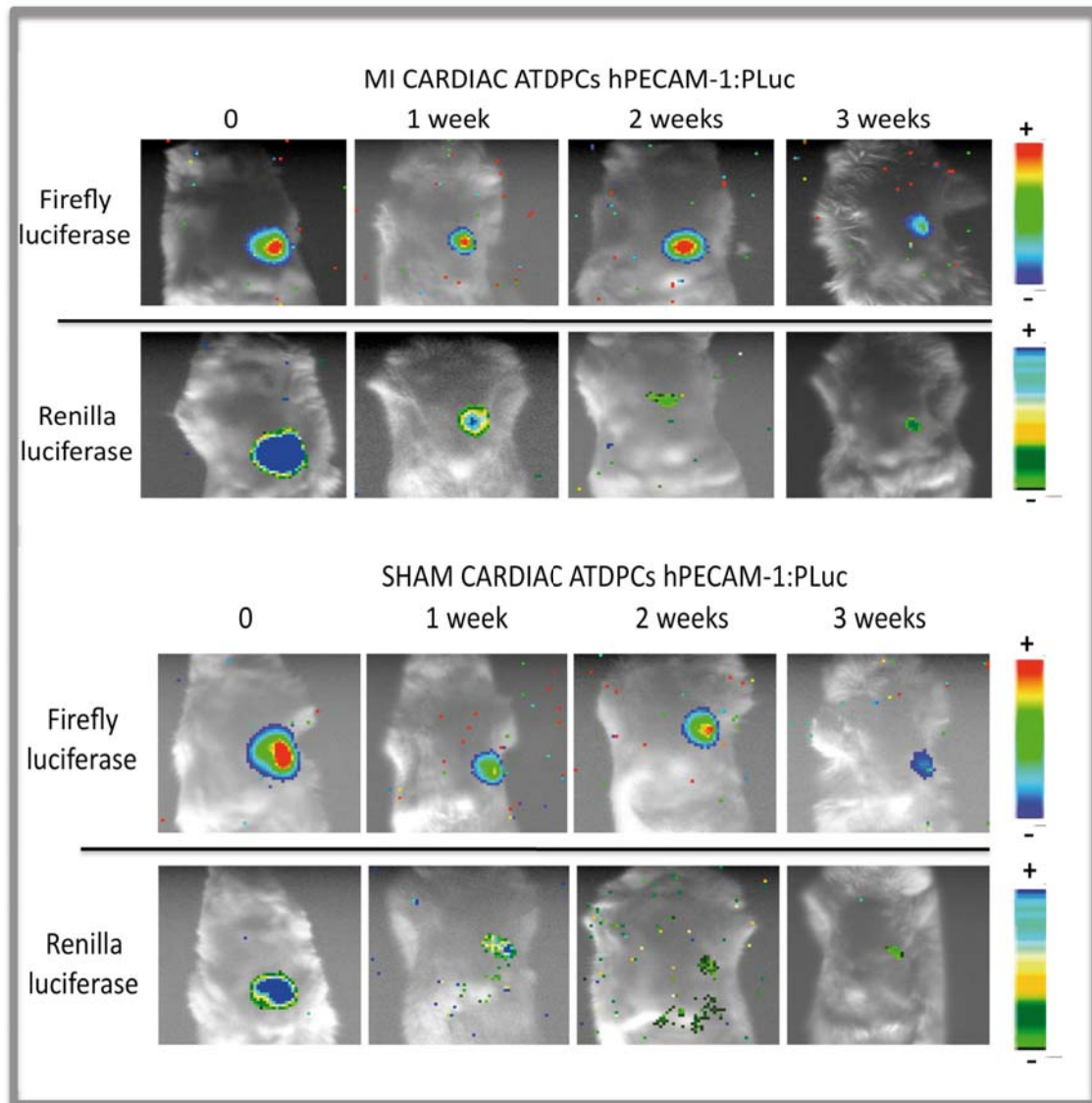


Figura 46. Representació de les imatges de BLI obtingudes en el temps, en ratolins que han patit un infart (MI: part superior de la imatge) i ratolins que no han patit un infart (Sham: part inferior de la imatge). Les cèl·lules monitoritzades són ATDPCs cardíacues i porten el constructe amb els gens traçadors indicadors de la proliferació cel·lular (RLuc: part inferior de cada tira d'imatges) i el constructe amb els gens reporters transcripcionalment regulats pel promotor específic hPECAM-1p (PLuc: part superior de cada tira d'imatges). Les barres de colors laterals representen els nivells d'intensitat bioluminescent per a la PLuc (blau, baixa; vermell, alta) i la RLuc (verd, baixa; blau, alta).

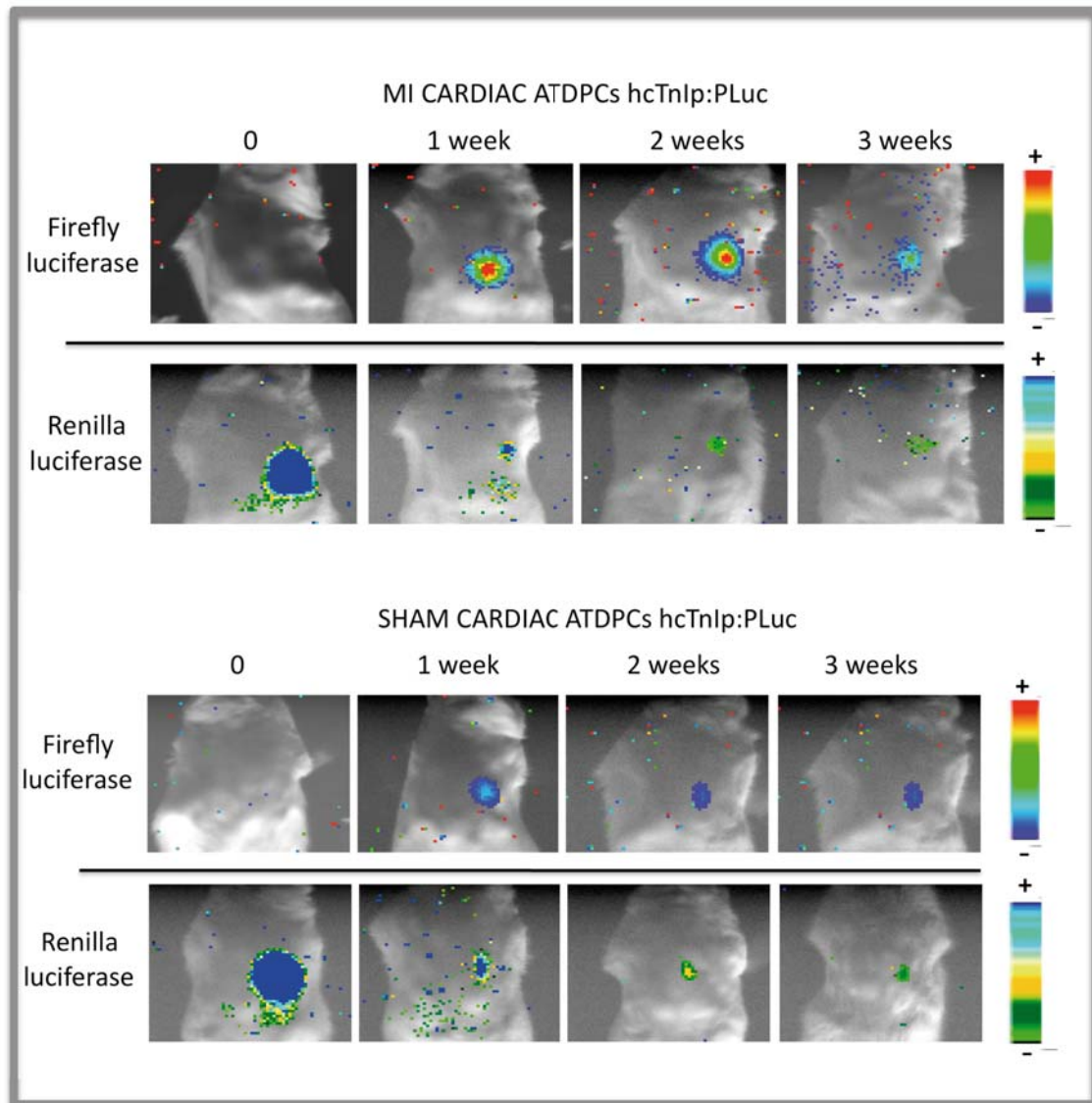


Figura 47. Representació de les imatges de BLI obtingudes en el temps, en ratolins que han patit un infart (MI: part superior de la imatge) i ratolins que no han patit un infart (Sham: part inferior de la imatge). Les cèl·lules monitoritzades són ATDPCs cardíacues i porten el constructe amb els gens traçadors indicadors de la proliferació cel·lular (RLuc: part inferior de cada tira d'imatges) i el constructe amb els gens reporters transcripcionalment regulats pel promotor específic hcTnlp (PLuc: part superior de cada tira d'imatges). Les barres de colors laterals representen els nivells d'intensitat bioluminescent per a la PLuc (blau, baixa; vermell, alta) i la RLuc (verd, baixa; blau, alta).

Per a l'estudi de la proliferació cel·lular, es representen els valors de llum corresponents al gen traçador indicador de la proliferació cel·lular (RLuc) al llarg del temps per els dos tipus cel·lulars i comparant en funció del procediment quirúrgic aplicat (**Fig. 48**). L'anàlisi de les imatges mostra una caiguda important de la supervivència cel·lular al llarg del temps en els dos tipus cel·lulars. La caiguda en el nombre total de cèl·lules s'observa des de la primera setmana, amb una supervivència del 16,45% en ATDPCs subcutànies i del 8,48% en ATDPCs cardíques. Aquesta tendència es manté a la segona setmana amb una supervivència del 3,33 % en ATDPCs subcutànies i del 1,28 % en ATDPCs cardíques, fins una supervivència a la tercera setmana del 1,61 % en ATDPC subcutànies i del 0,90 % en ATDPC cardíques. Tampoc s'observen diferències significatives en la supervivència de les cèl·lules implantades en els cors amb MI i sense infart (SHAM), el que ens indica que la mort cel·lular no depèn del tipus cel·lular ni de l'ambient fisiològic en la zona del infart.

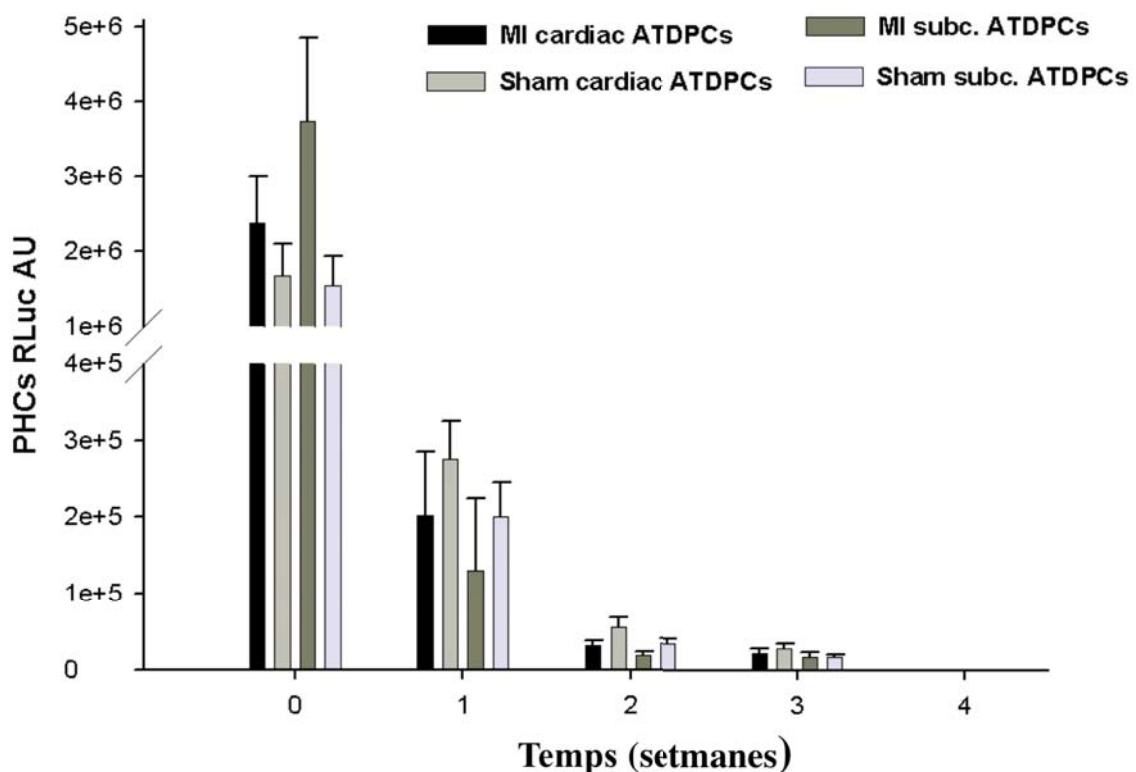


Figura 48. *Histogrames amb la representació dels valors de RLuc obtinguts de les imatges per BLI per als diferents tipus cel·lulars i diferents procediments quirúrgics. Els valors es representen com la mitjana ± SD. PHCs, "photon counts". AU, "arbitrary light units".*

Per avaluar l'estat transcripcional dels gens associats al llinatge endotelial (PECAM-1) i cardíac (hTnI), es representen per als dos tipus cel·lulars i segons la presència o no d'infart, els valors corresponents al ràtio entre la llum emesa pel gen traçador (PLuc) regulat pel promotor induïble (hPECAM-1p i hTnIp) i la llum emesa pel gen traçador (RLuc) associat a la proliferació cel·lular (**Fig. 49**). Els resultats ens mostren que en els dos tipus cel·lulars hi ha un augment significatiu i progressiu del ràtio PLuc/RLuc i que aquests canvis es produeixen tant en els ratolins amb MI com Sham, independentment de l'estat fisiològic del teixit. Així doncs, els dos tipus cel·lulars presenten diferenciació tant al llinatge endotelial com cardíac. La diferenciació al llinatge endotelial és molt similar en els dos tipus cel·lulars (**Fig. 49A**). Contràriament, la diferenciació al llinatge cardíac és estadísticament superior en les ATDPCs cardíacques respecte les subcutànies (**Fig. 48 B**).

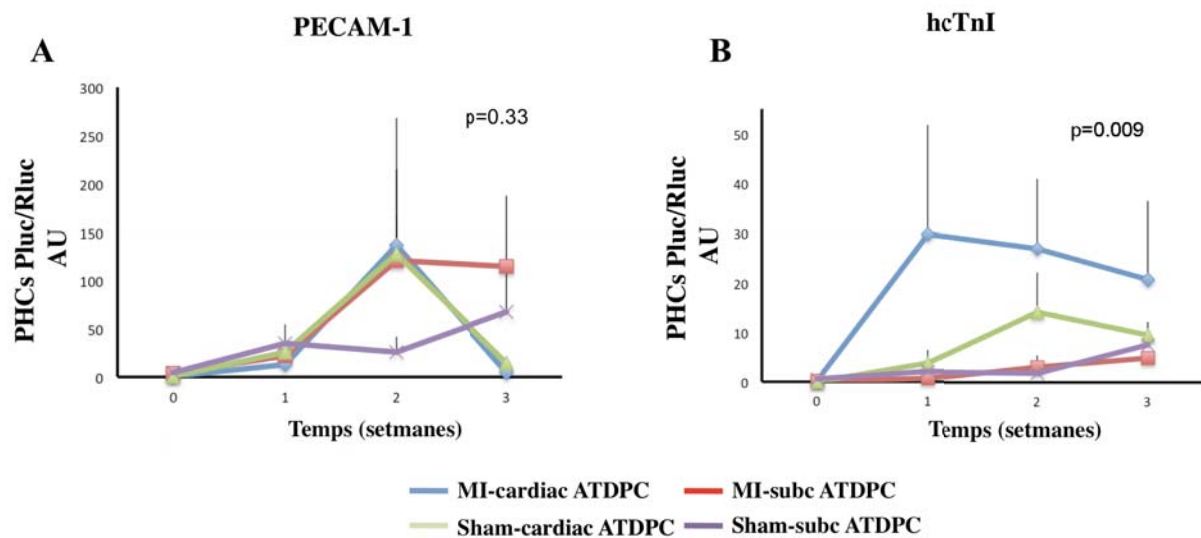


Figura 49. (A) Representació gràfica en el temps dels valors resultants del ràtio PLuc/RLuc en ATDPCs cardíacques i subcutànies amb la PLuc transcripcionalment regulada pel promotor específic hPECAM-1p, en ratolins amb MI i Sham. (B) Representació gràfica en el temps dels valors resultants del ràtio PLuc/RLuc en ATDPCs cardíacques i subcutànies amb la PLuc transcripcionalment regulada pel promotor específic hcTnIp, en ratolins amb MI i Sham. PHCs, “photon counts”. AU, “arbitrary light units”.

2.3 VALIDACIÓ DELS RESULTATS DE BLI MITJANÇANT L'ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER PCR A TEMPS REAL

L'anàlisi posterior de l'expressió gènica de les ATDPCs mitjançant un procediment independent (PCR a temps real), ens permet validar els resultats obtinguts per BLI.

Trenta dies post trasplantament s'extreu el conjunt fibrina i cèl·lules del cor dels ratolins amb infart agut de miocardi, per l'anàlisi de l'expressió gènica dels gens associats al llinatge endotelial (**Fig. 50**) i cardíac (**Fig. 51**).

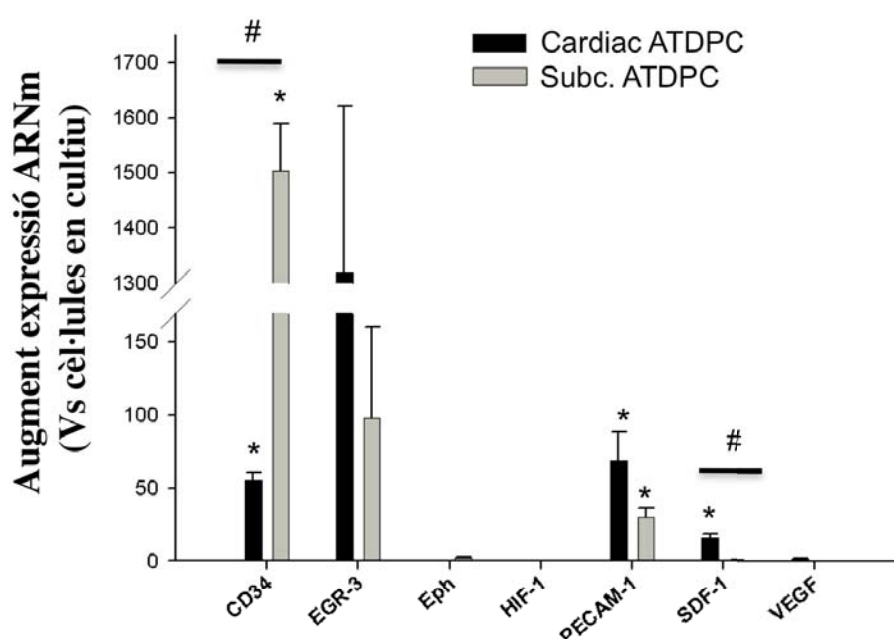


Figura 50. Histograma representant els resultats de l'anàlisi de l'expressió gènica dels gens associats al llinatge endotelial en ATDPCs cardíques i subcutànies, 30 dies post trasplantament en el cor de ratolins amb MI. Per el càlcul de l'augment en l'expressió de cada gen (2^{-Ct}) s'utilitza el valor promig de Ct corresponent a tres experiments independents realitzats per duplicat, emprant el GAPDH com a referència. Els valors es representen com la mitjana \pm SD. Diferències significatives respecte el propi control in vitro * $p < 0,05$. Diferències significatives entre els dos tipus cel·lulars # $p < 0,05$

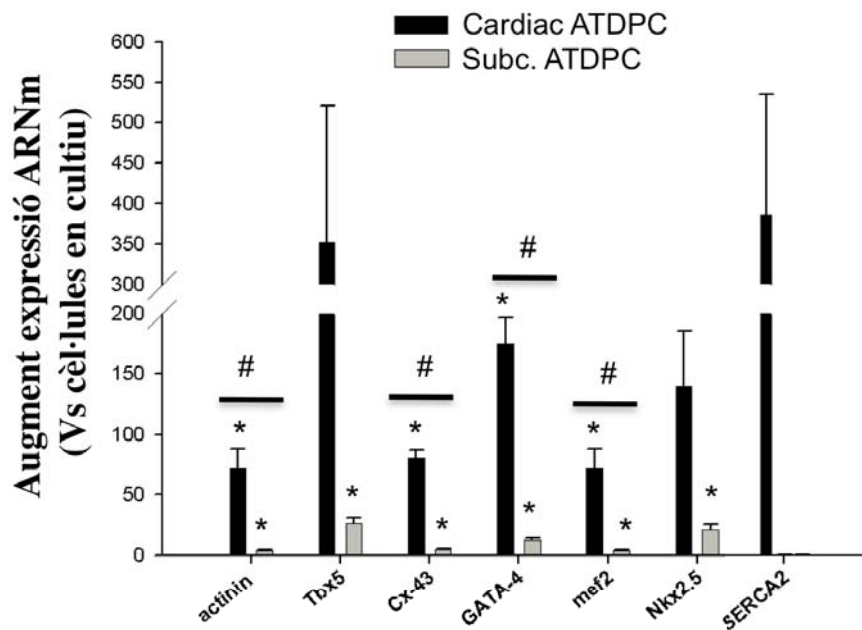


Figura 51. Histograma representant els resultats de l'anàlisi de l'expressió gènica dels gens associats al llinatge cardíac en ATDPCs cardíques i subcutànies, 30 dies post trasplantament en el cor de ratolins amb MI. Per el càlcul de l'augment en l'expressió de cada gen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) s'utilitza el valor promig de Ct corresponent a tres experiments independents realitzats per duplicat, emprant el GAPDH com a referència. Els valors es representen com la mitjana \pm SD. Diferències significatives respecte el propi control *in vitro* * $p < 0,05$. Diferències significatives entre els dos tipus cel·lulars # $p < 0,05$

L'anàlisi de l'expressió gènica en els implants de fibrina ens mostra un augment similar en l'expressió d'alguns gens associats al llinatge endotelial, tan en ATDPCs subcutànies com cardíques (CD34, EGR-3, PECAM-1 i SDF-1). Tot i que l'expressió de CD34 és significativament superior en les cèl·lules subcutànies i el SDF-1 en les d'origen cardíac, l'expressió de la resta de marcadors endotelials augmenta de forma similar en els dos tipus cel·lulars. Particularment l'augment és molt similar en l'expressió del gen PECAM-1, el promotor del qual s'ha utilitzat per regular l'expressió de la PLuc en els experiments de BLI.

Pel que fa l'expressió dels gens associats al llinatge cardíac, observem un augment en la seva expressió tan en ATDPCs cardíques com subcutànies. No obstant, i a diferència dels gens endotelials, l'expressió de tots els marcadors cardíacs analitzats és clarament superior en les ATDPCs cardíques. Aquestes diferències són significatives en els gens α -actinina, Cx-43, GATA-4, Mef2. En el cas de l'anàlisi d'expressió del gen SERCA-2, tot i no presentar diferències

significatives, s'ha de considerar que mentre les ATDPCs cardíques presenten un augment en la seva expressió ($279,65 \pm 105,75$), en les ATDPCs subcutànies no es detecta expressió ($0,19 \pm 0,11$).

Les sondes emprades per l'anàlisi del gen de la troponina I cardíaca amplifiquen inespecíficament el mARN del ratolí, pel que no s'ha pogut incloure en l'estudi impedit una comparació directa.

En resum, l'augment significatiu en l'expressió dels marcadors cardíacs en les ATDPCs cardíques relatiu a les subcutànies es correlaciona amb els valors de BLI registrats

2.4 ANÀLISI MORFOMÈTRICA

Mitjançant la tinció tricròmica de Masson i l'anàlisi morfomètrica dels cors control i tractats es van obtenir 3 paràmetres indicatius de l'estat del teixit miocàrdic ventricular. El primer paràmetre va ser la mida del infart, calculat respecte el total del ventricle esquerre (VE) que ens permetria valorar quanta àrea de teixit fibròtic quedava als 30 dies després del trasplantament de les ATDPCs cardíques/subcutànies amb fibrina, amb fibrina sense cèl·lules i sense fibrina i sense cèl·lules.

El segon va ser el gruix de la paret del VE en la zona infartada utilitzat per estimar el grau de millora/empitjorament del teixit miocàrdic infartat entre els diferents grups. Per últim, es va calcular el volum intern del VE que ens permetria valorar les diferències en la dilatació del VE entre els diferents grups.

A la **figura 52** podem observar imatges representatives amb les diferències morfològiques entre el cor d'un animal no tractat i tractat (fibrina, fibrina amb ATDPCs cardíques i ATDPC subcutànies).

L'anàlisi morfomètrica mostra una reducció estadísticament significativa del 31,15%, 32,55% i 36,51% de l'àrea de la cicatriu del infart respecte el control, en els animals tractats amb fibrina, fibrina més ATDPCs cardíques i fibrina més ATDPCs subcutànies respectivament (**Fig. 52A**). El gruix de la paret infartada del VE va ser estadísticament superior en un 27,91%, 40,31% i 64,12% respecte el control, en els animals tractats amb fibrina, fibrina més ATDPCs cardíques i fibrina més ATDPCs subcutànies respectivament (**Fig. 52**

B). Per últim, la dilatació del VE va ser un 37,78%, 23,13% i 20,36% menor respecte el control, en els animals tractats amb fibrina (diferència significativa), fibrina més ATDPCs cardíacs i fibrina més ATDPCs subcutànies (diferència significativa) respectivament (**Fig. 52C**).

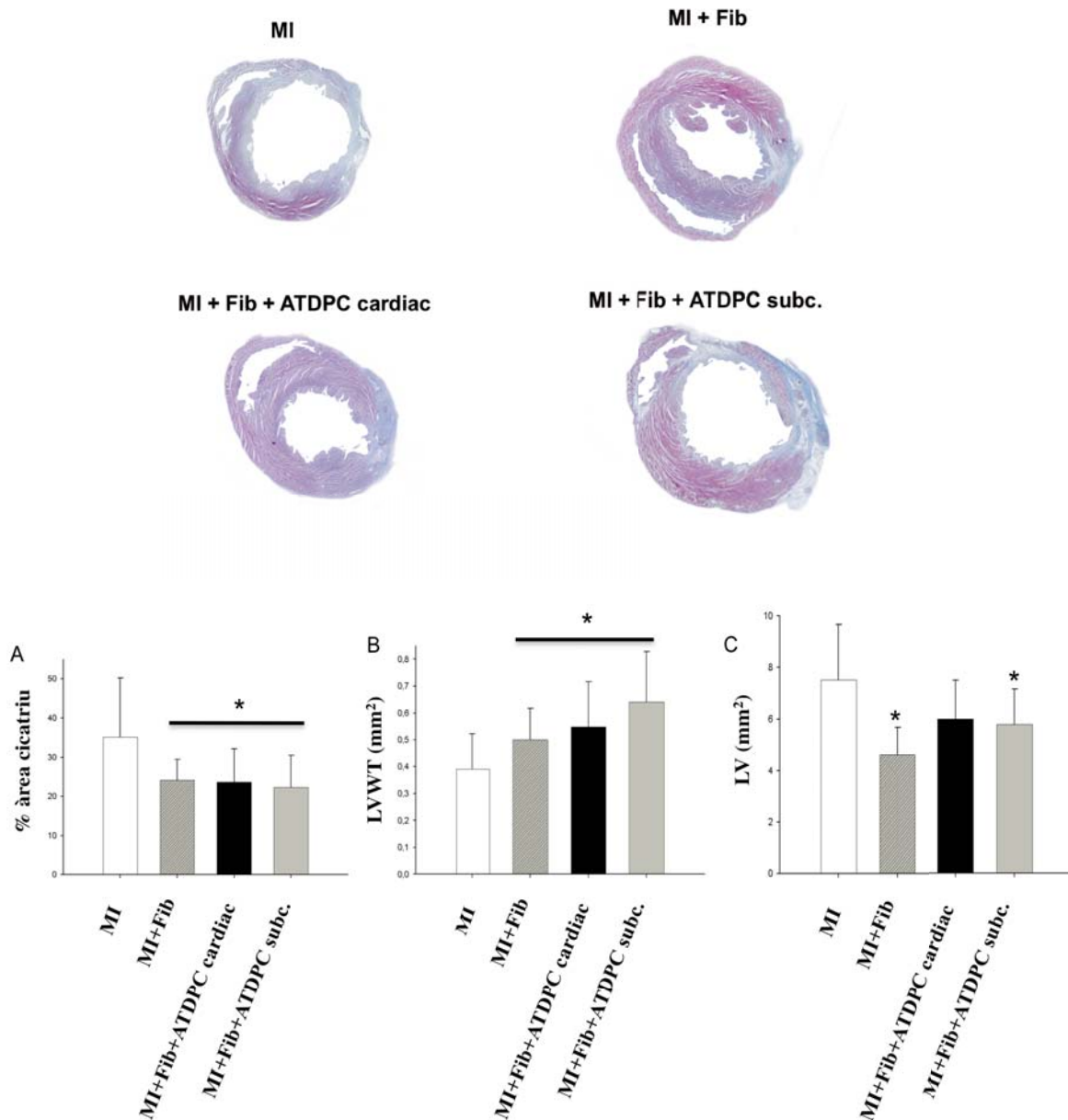


Figura 52. Part superior, imatges representatives de tincions amb tricròmica de Mason en cors amb MI no tractats i tractats (fibrina, fibrina amb ATDPCs cardíacs i subcutànies). Part inferior, histogrames amb la representació dels valors registrats en l'àrea de cicatriu dels infarts (% **A**), gruix de la paret infartada del ventricle esquerre (LVWT, **B**) i dilatació del ventricle esquerre (LV, **C**), en cors d'animals no tractats i tractats (fibrina, fibrina amb ATDPCs cardíacs i subcutànies). Els valors es representen com la mitjana \pm SD. Diferències significatives respecte el propi control MI * $p < 0,05$.

2.5 ANÀLISI DE LA DENSITAT VASCULAR

Mitjançant la tinció amb la lectina GSLIB4 es determina la densitat vascular per unitat de superfície, a la regió del marge del infart i al miocardi distal del infart, tant en els ratolins tractats com en els controls, 30 dies després dels diferents trasplantaments (**Fig. 53**).

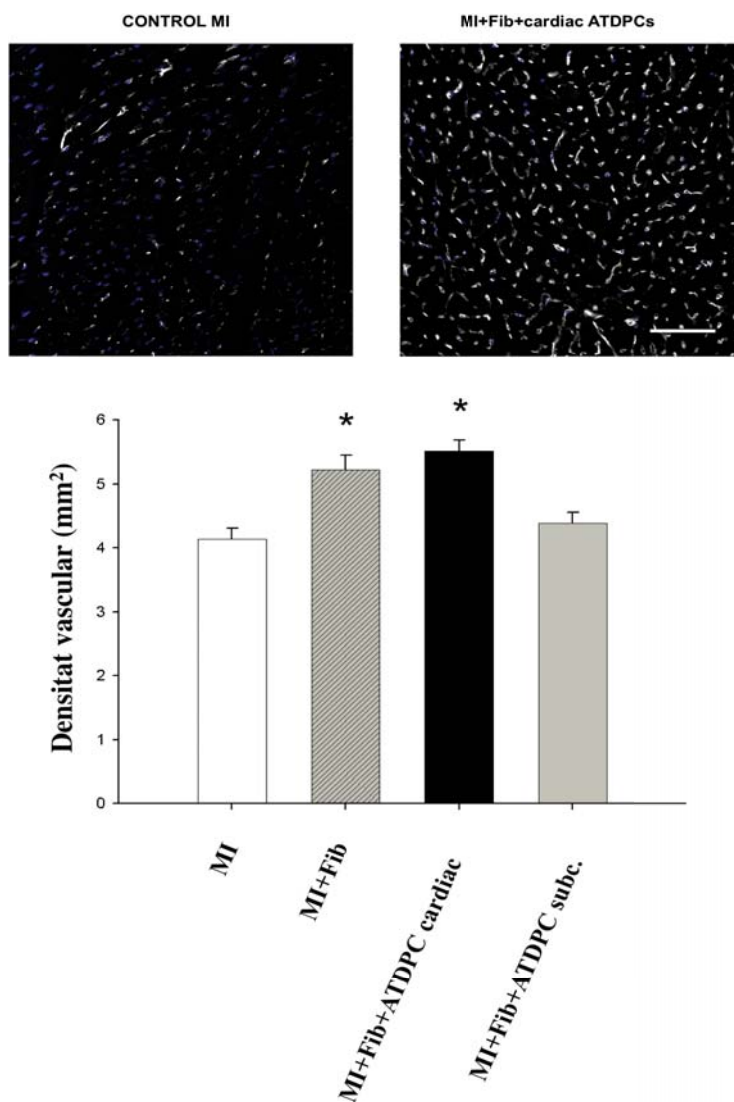


Figura 53. Part superior, imatge representativa de les tincions amb lectina GSLI B4 (blanc) de les seccions amb MI (control) i tractades amb fibrina i ATDPCs cardíacques. Barra a escala 75 μ m. Part inferior, histograma amb el percentatge d'àrea amb vasos en els grups control (MI) i tractats (MI amb fibrina, MI amb fibrina i ATDPCs cardíacques, MI amb fibrina i ATDPCs subcutànies). Els valors es representen com la mitjana \pm SD. Diferències significatives respecte el propi control MI * $p < 0,05$.

Els resultats mostren un augment significatiu de la densitat vascular a la regió del marge i al miocardi distal del infart en cors amb fibrina (26,08% superior respecte control) ($p < 0,01$) i fibrina amb ATDPCs cardíaques (33,33% superior respecte control) ($p < 0,01$). No obstant, tot i haver-hi també un augment en la densitat vascular dels cors tractats amb fibrina i ATDPCs subcutànies (5,79% superior respecte control), aquest no és estadísticament significatiu respecte el control.

2.6 ESTUDI DE LA FUNCIO CARDÍACA MITJANÇANT ECOCARDIOGRAFIA

Es va avaluar la funció cardíaca a partir de la fracció d'ejecció (FE) a diferents temps pre i post MI. La FE calcula la disminució del volum del ventricle esquerre del cor en sístole (contracció), respecte a la diàstole (repós). Així doncs, una fracció d'ejecció del 50% significa que el cor, al contraures, redueix el volum del seu ventricle esquerre a la meitat, respecte a la seva posició relaxada. A major fracció d'ejecció, més volum de sang és expulsat cap a l'aorta durant el període de contracció.

Els valors obtinguts ens mostren una millora funcional en els animals tractats respecte els control. La FE va ser un 7,81%, 8,92% i 6,28% superior en animals tractats amb fibrina, fibrina més ATDPC cardíaques i fibrina més ATDPCs subcutànies als 15 dies post MI respectivament, comparat amb animals control (MI). Aquesta tendència es manté als 30 dies post MI en animals tractats amb fibrina (11,69%) i fibrina més ATDPC cardíaques (9,95%), i presenta una davallada en animals tractats amb fibrina més ATDPCs subcutànies (1,25%) respecte els animals control (**Fig. 54**).

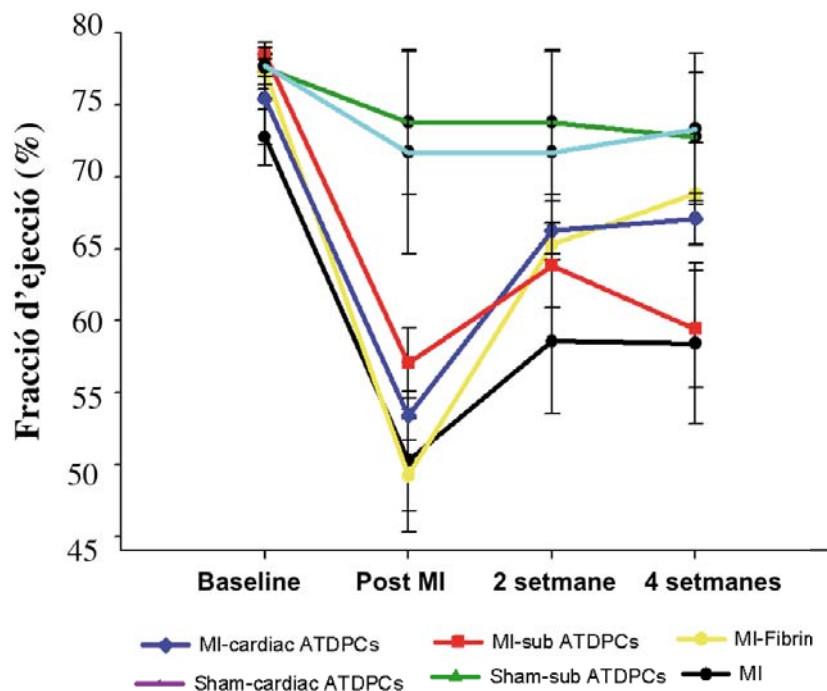


Figura 54. Evolució temporal dels paràmetres de les ecocardiografies en animals control (MI), tractats, i sense infart (Sham). Baseline: 1 dia abans MI; Post MI: 2 dies després MI. Els valors es representen com la mitjana \pm SE.

2.7 IDENTIFICACIÓ DE LES CÈL·LULES TRASPLANTADES I ESTUDI DE LA SEVA EXPRESSIÓ PROTEICA.

Un cop finalitzada la monitorització *in vivo* per BLI, es sacrifiquen i s'extreuen els cors dels diferents ratolins per a la localització i estudi de l'expressió proteica de les cèl·lules incloses en les matrius de fibrina.

Tan en el cas de les ATDPCs cardíacques com subcutànies es varen poder localitzar les cèl·lules implantades en la matriu de fibrina ja que aquestes expressen constitutivament la fluorescència vermella i específicament la fluorescència verda, transcripcionalment regulada pels promotors específics hPECAMp i hTnIp. L'activació de la fluorescència verda està en correlació amb l'activació monitoritzada *in vivo* del traçador bioluminescent (PLuc) transcripcionalment regulada pels mateixos promotors específics.

Amb l'objectiu de verificar que l'expressió dels traçadors representa el de les proteïnes endògenes regulades pel mateix promotor, i per tant, també el grau

de diferenciació als llinatges endotelials i cardíac de les cèl·lules implantades, es van fer tincions immunofluorescents contra la proteïna endotelial *PECAM-1* i contra la proteïna cardíaca *troponina I*. Els resultats obtinguts ens mostren com les ATDPCs cardíques i subcutànies expressen tan les proteïnes associades al llinatge endotelial (*PECAM-1*) (**Fig. 55**) com les proteïnes associades al llinatge cardíac (*hcTnl*) (**Fig. 56**), en correlació amb l'expressió de la fluorescència verda transcripcionalment regulada pels promotors específics dels mateixos gens i amb els valors de BLI registrats *in vivo*.

Com que les cèl·lules d'interès expressen traçadors fluorescents, en aquests experiments es va tenir especial cura en evitar el solapament de les diferents longituds d'ona d'emissió, pel que es va utilitzar un anticòs secundari (Cy5 emissió $\lambda=670$) que emet a longituds d'ona molt separades a les de les fluorescències verdes i vermella endògenes.

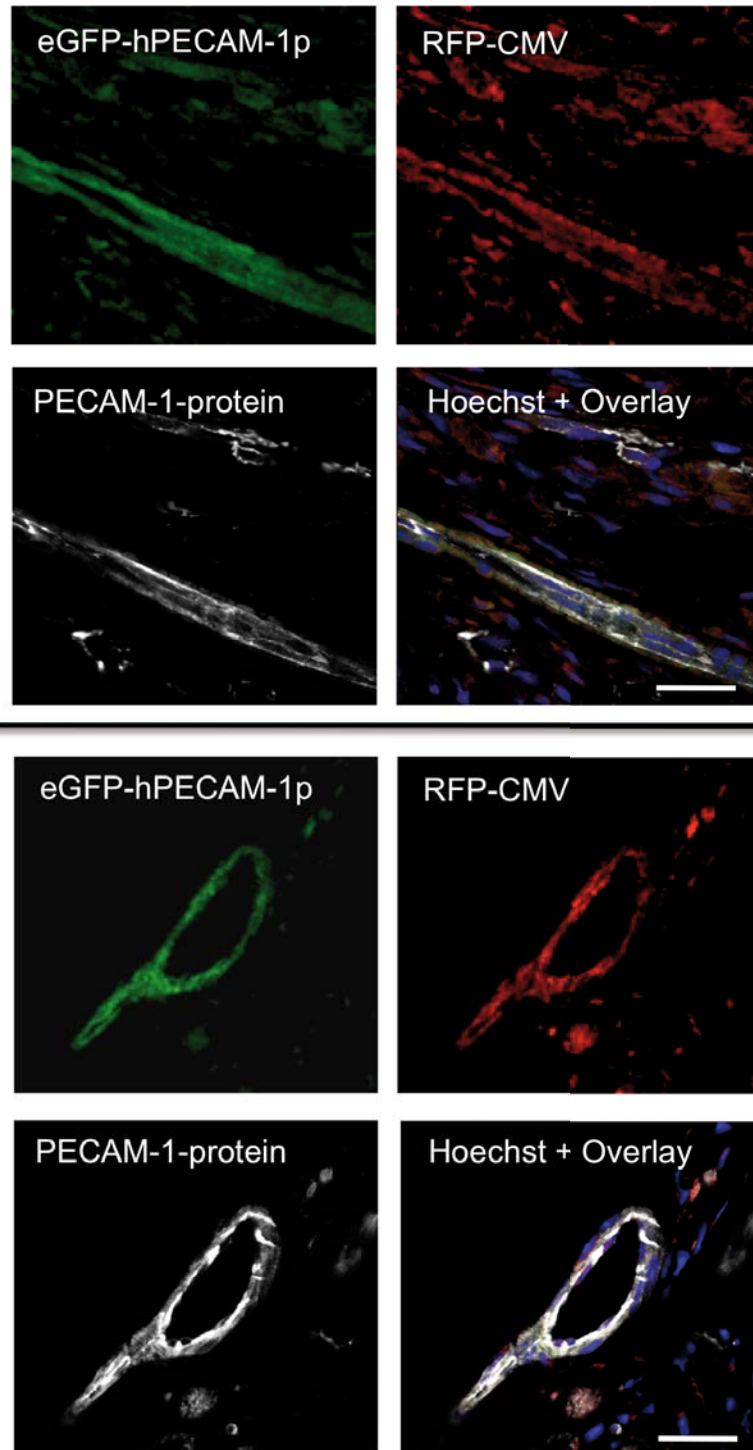


Figura 55. Cèl·lules en matriu de fibrina als 30 dies post implantació en MI. Panell superior ATDPCs subcutànies. Panell inferior ATDPCs cardíaques. D'esquerra a dreta de cada panell: fluorescència verda corresponent a l'expressió del gen eGFP transcripcionalment regulat pel promotor específic hPECAM-1p, fluorescència vermella corresponent a l'expressió del gen RFP transcripcionalment regulat pel promotor constitutiu, l'anticòs específic contra PECAM-1 (blanc) i superposició de les tres imatges amb la fluorescència blava corresponent a la tinció dels nuclis tenyits amb Hoechst. Barres = 25 μ m

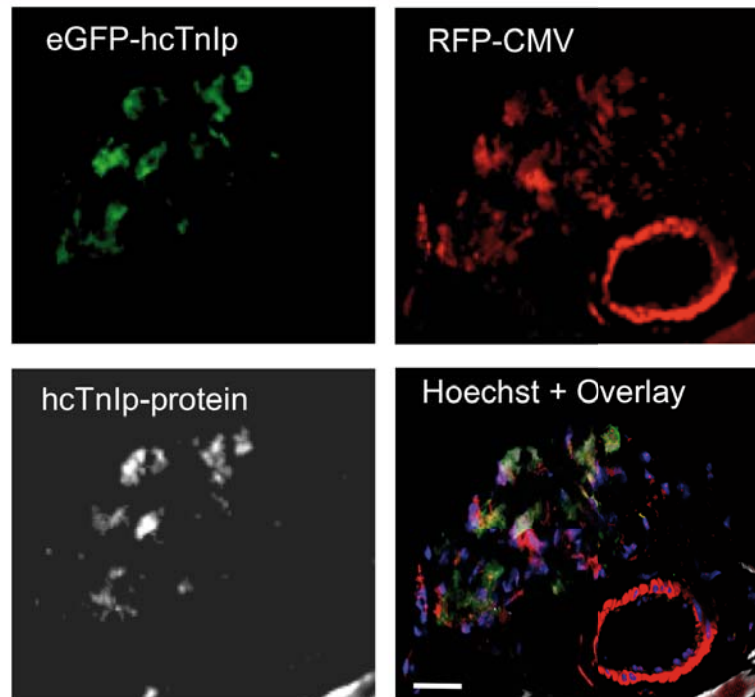
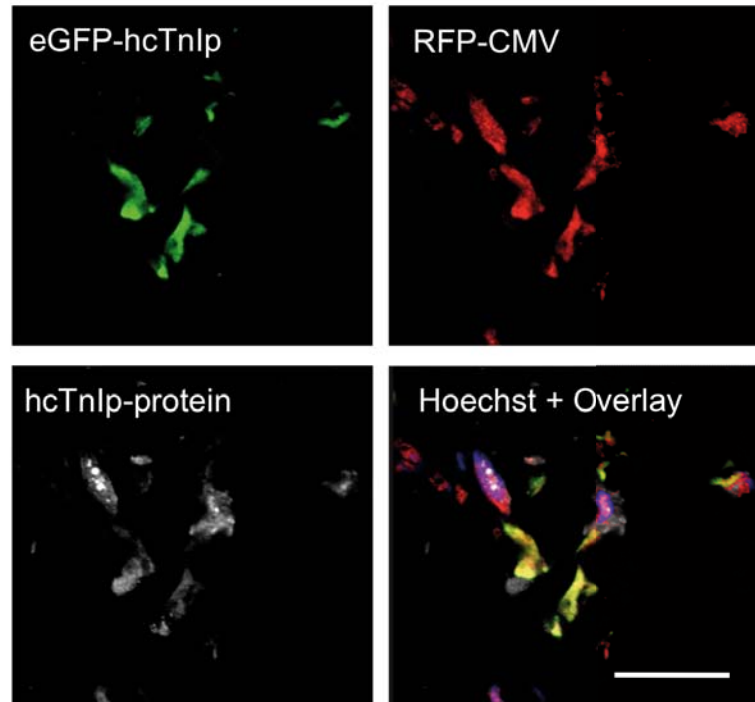


Figura 56. Cèl·lules en matriu de fibrina als 30 dies post implantació en MI. Panell superior ATDPCs subcutànies. Panell inferior ATDPCs cardíques. D'esquerra a dreta de cada panell: fluorescència verda corresponent a l'expressió del gen eGFP transcripcionalment regulat pel promotor específic hTnlp, fluorescència vermella corresponent a l'expressió del gen RFP transcripcionalment regulat pel promotor constitutiu, l'anticòs específic contra hcTnI (blanc) i superposició de les tres imatges amb la fluorescència blava corresponent a la tinció dels nuclis tenyits amb Hoechst. Barres = 25 μ m

La identificació per fluorescència de les ATDPCs subcutànies i cardíques no permet detectar migració de les cèl·lules fluorescentes cap a la zona del miocardi. En la **figura 57** es mostra com excepció la presència d'una cèl·lula a la zona de la cicatriu en ATDPC cardíques i subcutànies.

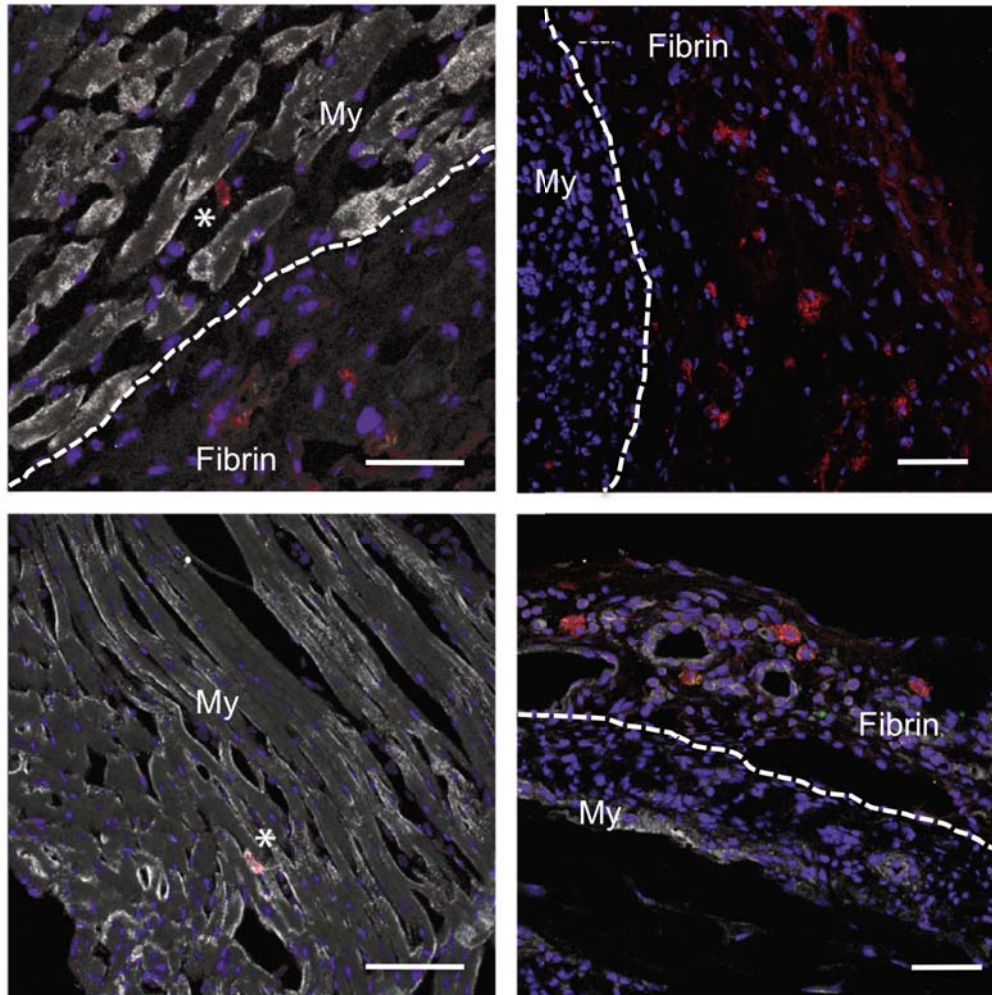


Figura 57. ATDPCs cardíques, panell superior i subcutànies, panell inferior, en la matriu de fibrina als 30 dies post implantació en MI. Vermell, ATDPCs; blanc, immunotinció contra actinina murina per delimitar las zones de miocardi i fibrina. La línia de punts separa la regió del miocardi (My) de la de l'implant (Fibrin). Asterisc, ATDPCs en la zona del miocardi. Barres = 50 μ m.tie

2.8 ESTUDI DE LA FUNCIONALITAT MICROVASCULAR

Per determinar qualitativament si la microvasculatura present en les zones del miocardi i fibrina són funcionals, abans del sacrifici s'injectà per la vena de la cua un dextrà verd fluorescent d'alt pes molecular como a traçador del sistema

vascular funcional. En les seccions histològiques de la **figura 58**, es troben estructures vasculares, tant en la zona de la cicatriu com en la zona de l'implant de fibrina. A la vegada, les estructures capil·lars en la zona de l'implant contenen fluoresceïna, el que demostra una connectivitat funcional entre el miocardi i l'implant. Aquesta fenomen té lloc tant en implants de fibrina amb ATDPCs cardíacs i subcutànies (**Fig. 58A**), com en implants sense cèl·lules (**Fig. 58B**). En les matrius de fibrina amb cèl·lules, s'observa com en molts casos, les cèl·lules estan formant part de vasos funcionals al localitzar-se en el mateix lloc el vermell de les cèl·lules implantades amb el verd de la fluoresceïna i el blanc de tinció contra lectines. En alguns casos es pot observar la connexió vascular entre la zona del miocardi i l'implant de fibrina (**Fig. 58C**).

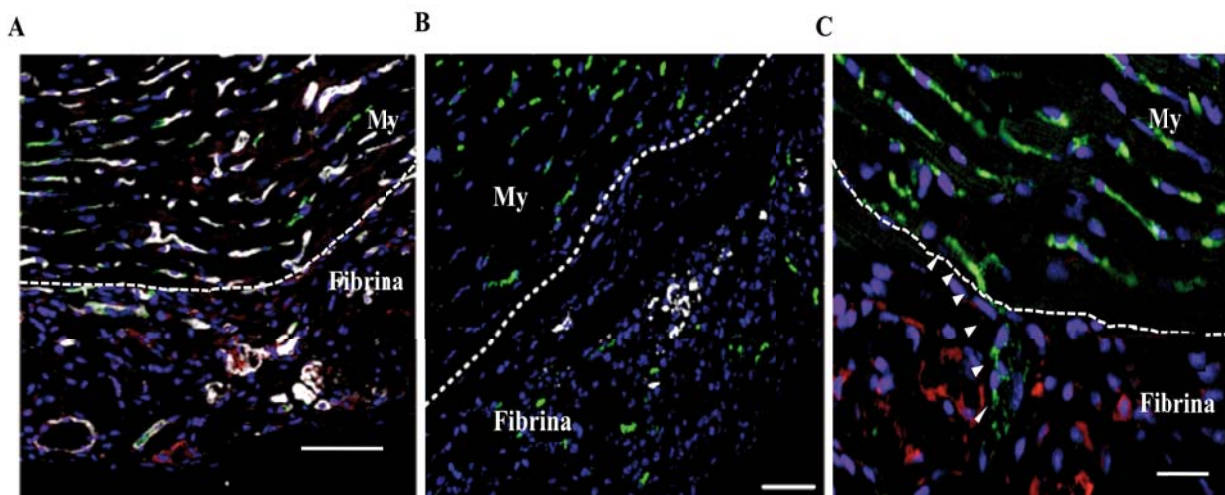


Figura 58. Seccions histològiques que comprenen la regió de teixit cardíac (My) i implant de fibrina als 30 dies post implantació en MI, amb ATDPCs cardíacs (A i C) i sense cèl·lules (B). Vermell, ATDPC cardíacs; blanc, tinció contra lectines; verd, Dextrà-fluoresceïna. La línia de punts separa la regió del miocardi (superior) de la de l'implant (inferior). Barra= 75 μ m.

3. ESTUDI PER BLI DE LA CAPACITAT ANGIOGÈNICA DE LES UCBMSC

Les UCBMSCs es consideren com un potencial agent terapèutic per a la regeneració de teixits, al presentar pluripotencialitat així com la possibilitat de ser aïllades i expandides *in vitro* en grans quantitats. A la vegada, estudis

recents confirmen la no aparició de canvis morfològics i de senescència en temps prolongats de cultiu^{57, 58}, el que podria suposar una millora en la viabilitat cel·lular en teràpies de regeneració *in vivo*.

A diferència de les ATDPCs, no existeixen molts estudis que avalin la capacitat terapèutica d'aquestes cèl·lules en un model d'isquèmia. En un primer apartat s'estudia per BLI la capacitat de formació de vasos funcionals a partir d'un model *in vivo* amb matrigel, en paral·lel amb cèl·lules ATDPCs, de les quals la capacitat terapèutica ja ha estat demostrada. L'estudi de la capacitat de formació de vasos funcionals ens permet determinar el potencial terapèutic, ja que en la majoria de teixits una correcta regeneració requereix una neovascularització prèvia^{180, 181, 182}. En un segon apartat s'estudia per BLI la seva capacitat terapèutica en un model murí d'infart de miocardi.

3.1 MARCATGE CEL·LULAR

Es transfecten els dos tipus cel·lulars (UCBMSCs i ATDPCs) amb el constructe lentivíric que expressa els gens traçadors indicadors de la proliferació cel·lular (CMV:RLuc-mRFP-ttk) i amb el constructe lentivíric que expressa els gens traçadors transcripcionalment regulats pel promotor específic hPECAM-1p (hPECAM-1p: PLuc-eGFP), segons el diagrama de la **figura 59**.

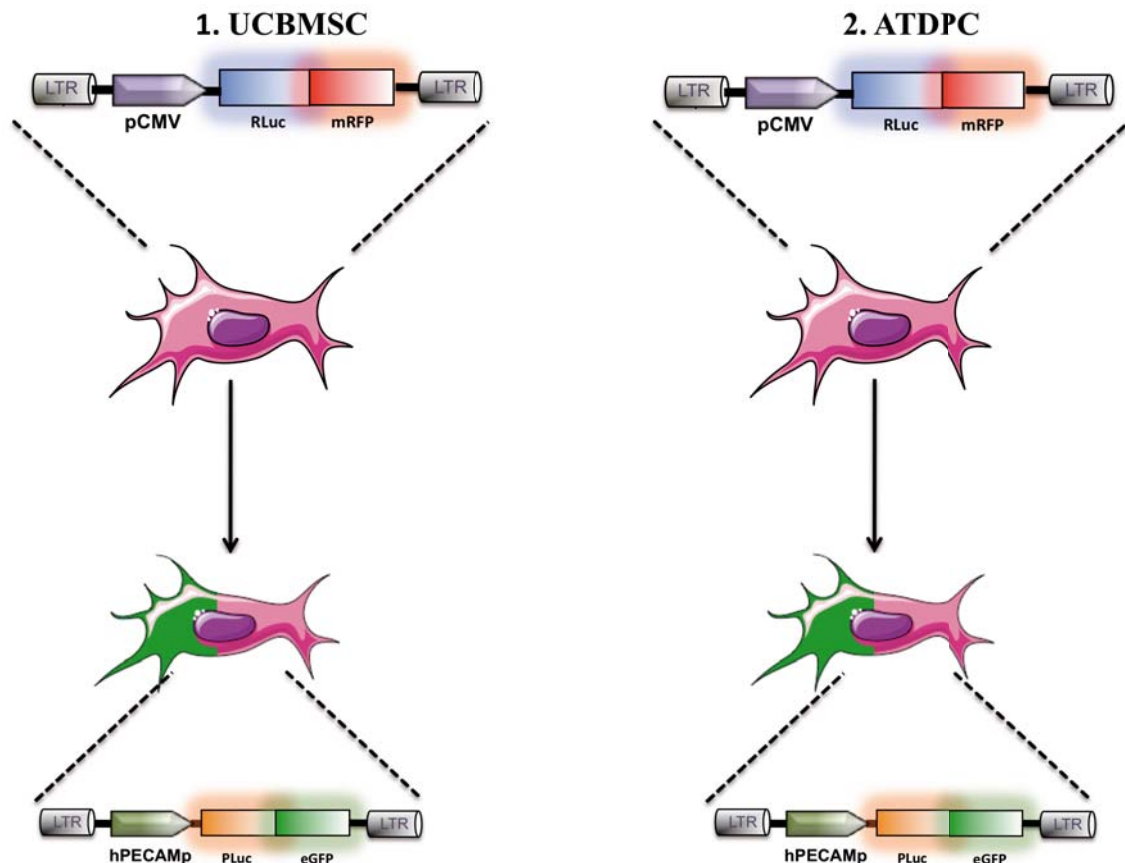


Figura 59. Diagrama amb l'estratègia de transducció per marcar les UCBMSCs i ATDPCs.

3.2 ESTUDI IN VIVO EN MATRIUS DE MATRIGEL

Una vegada infectats els dos tipus cel·lulars, s'inclou cada un d'ells en matrius de matrigel i s'injecten subcutàniament en 4 punts dorsals de l'esquena del ratolí. Les matrius de matrigel són àmpliament utilitzades per avaluar la capacitat de diferenciació cel·lular al llinatge endotelial, ja que proporcionen el conjunt de factors necessaris per a la seva diferenciació.

El mateix dia d'injecció i el dia 5 p.i, es monitoritza l'emissió de llum emesa pel gen traçador indicador de la proliferació cel·lular i el gen reporter transcripcionalment controlat pel promotor hPECAM-1p. L'anàlisi de les imatges obtingudes (**Fig. 60**), ens mostren un augment significatiu en el ràtio PLuc/RLuc del dia 5 post implantació respecte al del dia d'injecció ($p < 0,001$) en els dos tipus cel·lulars. No obstant, a dia 5 p.i, el ràtio PLuc/RLuc és significativament superior en les UCBMSCs ($p = 0,032$) respecte les ATDPCs.

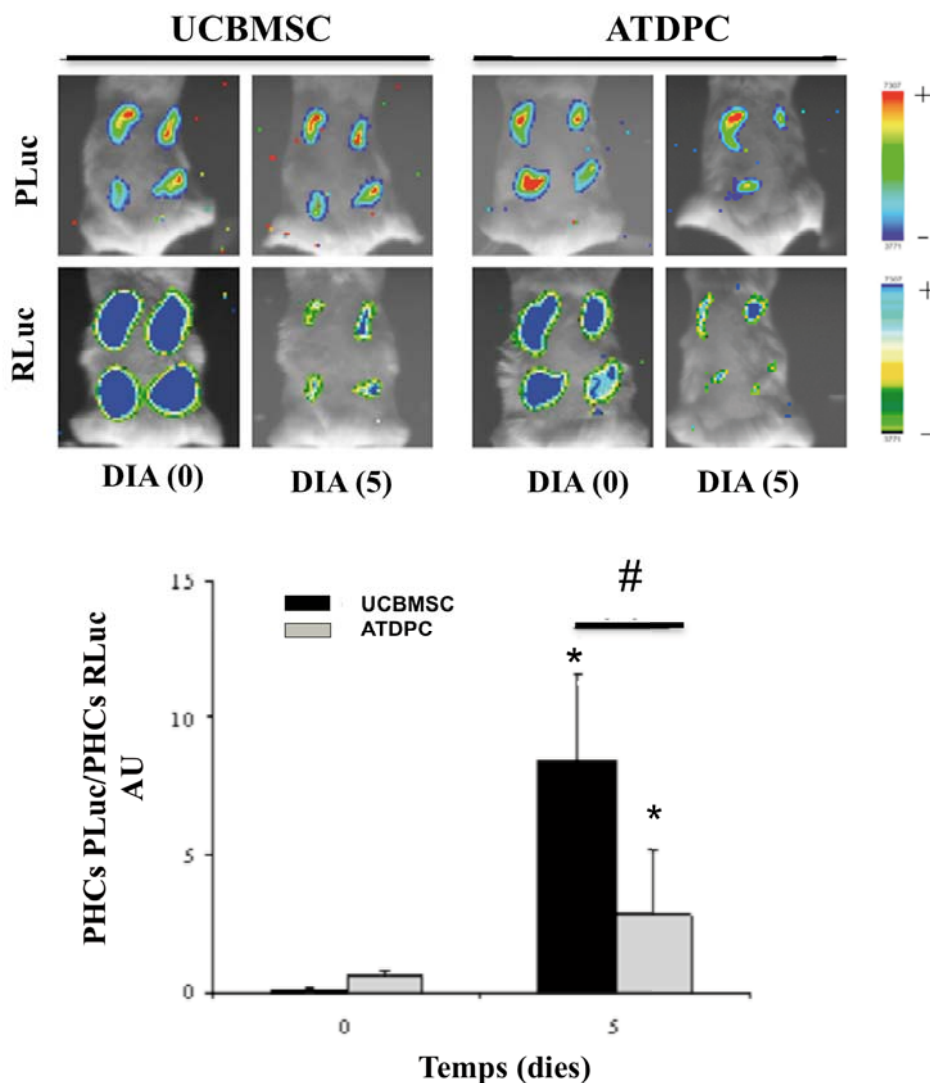


Figura 60. Panell superior, imatges representatives de BLI generades pels dos tipus cel·lulars. Tira superior imatges de PLuc; tira inferior imatges de RLuc (n=4). Les barres de colors laterals representen els nivells d'intensitat bioluminescent per a la PLuc (blau, baixa; vermell, alta) i la RLuc (verd, baixa; blau, alta). Panell inferior: histograma representant els valors del ràtio PLuc/RLuc en UCBMSCs i ATDPCs. Els valors representen la mitjana ± SD. *, diferències significatives respecte el control *in vitro* ($p < 0,05$); #, diferències significatives entre els dos tipus cel·lulars ($p < 0,05$). PHCs, "photon counts". AU, "arbitrary light units".

Al cinquè dia de monitorització de l'emissió de llum *in vivo*, es sacrifiquen els ratolins i s'extreuen els implants per l'anàlisi posterior per PCR a temps real dels diferents gens associats al llinatge endotelial. Els resultats obtinguts (**taula 5**) ens mostren un augment en tots els gens estudiats, tant en les UCBMSCs com amb les ATDPCs, excepte en l'expressió del gen SDF-1 α per part de les ATDPCs. Pel que fa a l'expressió del gen PECAM-1, s'observa una diferència significativa entre els dos tipus cel·lulars, essent clarament superior en les

UCBMSCs. Aquest resultat valida els obtinguts per BLI. L'expressió dels gens CD36, Egr-3, SDF-1 α i ILK també presenten valors significativament superiors en les UCBMSCs respecte de les ATDPCs. L'únic gen que presenta una expressió significativament superior en les ATDPCs respecte les UCBMSCs és el CD34.

Taula 5. Anàlisi de l'expressió gènica de diferents marcadors endotelials en UCBMSCs i ATDPCs cultivades in vivo en matrius de matrigel. * Per el càlcul de l'augment en l'expressió de cada gen ($2^{-\Delta Ct}$) s'utilitza el valor promig de Ct corresponent a tres experiments independents realitzats per duplicat, emprant el GAPDH com a referència.

	Augment expressió gènica* (Vs cèl·lules en cultiu)		Relació
	UCBMSC (Matrigel)	ATDPC (Matrigel)	UCBMSC/ ATDPC
<i>CD31</i>	378	38.3	9.9
<i>CD34</i>	2	28.2	0.1
<i>CD36</i>	77	17	4.5
<i>vWF</i>	2	3.8	0.5
<i>Egr-3</i>	102	5	20.4
<i>VEGF</i>	81	89	0.9
<i>SDF-1α</i>	11.8	0.4	29.5
<i>HIF-1α</i>	50	60	0.8
<i>ILK</i>	23.5	1.1	21.4
<i>Ephrin-B2</i>	2.1	1.5	1.4

Finalment, s'estudien els vasos funcionals de nova formació en les diferents matrius de matrigel. Al cinquè dia post implantació i abans del sacrifici, s'injecta el traçador verd fluorescent de microvasculatura (dextrà-fluoresceïna) per la vena caudal del ratolí i es compara la formació de vasos en la matriu de matrigel, així com la distribució cel·lular, per a cada tipus cel·lular (**Fig. 61**).

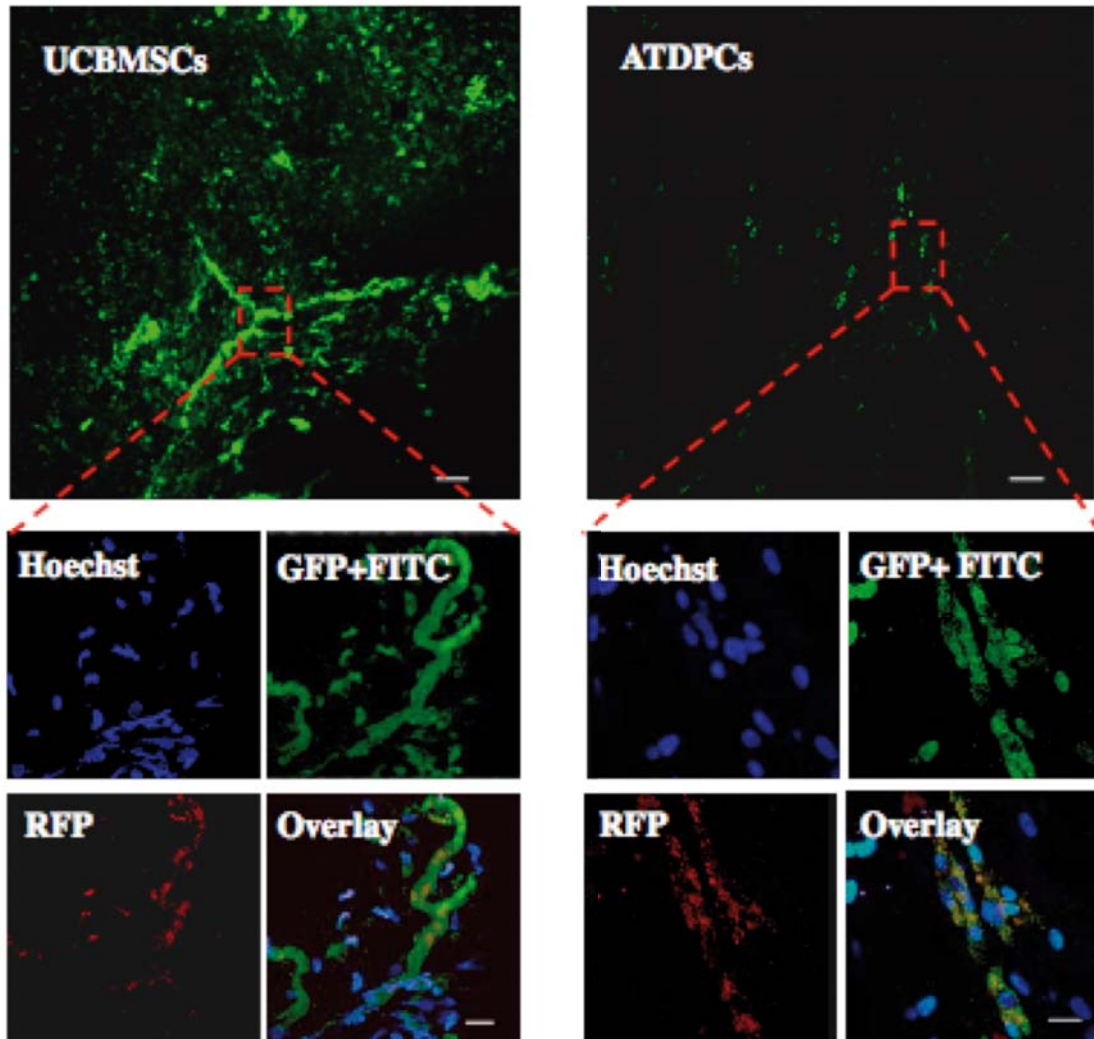


Figura 61. Panell superior, seccions histològiques representatives amb vasos funcionals (verds) en UCBMSCs i ATDPCs incloses en matrius de matrigel, implantades en ratlons perfundits amb el traçador verd fluorescent FITC-dextrà (Barra a escala: 100 μ m). Les ampliacions inferiors mostren les UCBMSCs i ATDPCs amb els diferents canals. Cada imatge presenta: nuclis tenyits amb DAPI; fluorescència verda corresponent a l'expressió del gen eGFP transcripcionalment regulat per un promotor específic i el traçador verd fluorescent de capil·lars; la fluorescència vermella corresponent a l'expressió del gen RFP transcripcionalment regulat pel promotor constitutiu; i la composició de les tres fluorescències. La superposició de cèl·lules fluorescentes vermelles i verdes apareixen en groc (Barra = 20 μ m).

Com es pot veure en la **figura 61**, les matrius de matrigel amb UCBMSCs presenten més fluorescència verda que les ATDPCs, com a conseqüència de la major presència de vasos funcionals de nova formació. Una observació més detallada, ens mostra les UCBMSCs formant part dels vasos de nova formació (**video 4**), contràriament al que fan les ATDPCs que no es troben formant part de vasos funcionals.

Aquest últim estudi funcional, també coincideix amb els obtinguts tant per BLI com per PCR a temps real i suggereixen un elevat potencial de les UCBMSCs com agents vascularitzadors durant la regeneració de teixits.

3.3 ESTUDI IN VIVO EN MODEL D'INFART DE MIOCARDI

Una vegada determinat el potencial angiogènic de les UCBMSCs, s'estudia la seva capacitat per regenerar el miocardi danyat monitoritzat per BLI. S'utilitza el polímer de fibrina com estructura de suport cel·lular, amb la finalitat de facilitar l'estudi comparatiu entre tots els tipus cel·lulars.

3.3.1 Marcatge cel·lular, inclusió en estructura tridimensional de fibrina i trasplantament en model d'infart de ratolí.

S'utilitzen les mateixes UCBMSCs marcades en l'experiment anterior. S'inclouen en matrius de fibrina, mantenint-se en cultiu 48 hores abans del trasplantament en ratolins. En total es trasplanten 4 matrius de fibrina amb cèl·lules en 4 ratolins SCID femelles de 12 setmanes. En tots ells se'ls hi ha practicat un MI. Com a controls negatius es fan MI en 4 ratolins, als quals no se'ls hi aplica ni fibrina ni cèl·lules.

3.3.2 Estudi in vivo per BLI.

Els animals trasplantats es monitoritzen un cop per setmana durant 4 setmanes amb la finalitat d'avaluar la llum emesa pel gen traçador de la proliferació cel·lular (RLuc) i pel traçador transcripcionalment controlat pel promotor específic hPECAM-1 (PLuc) (**Fig. 62**).

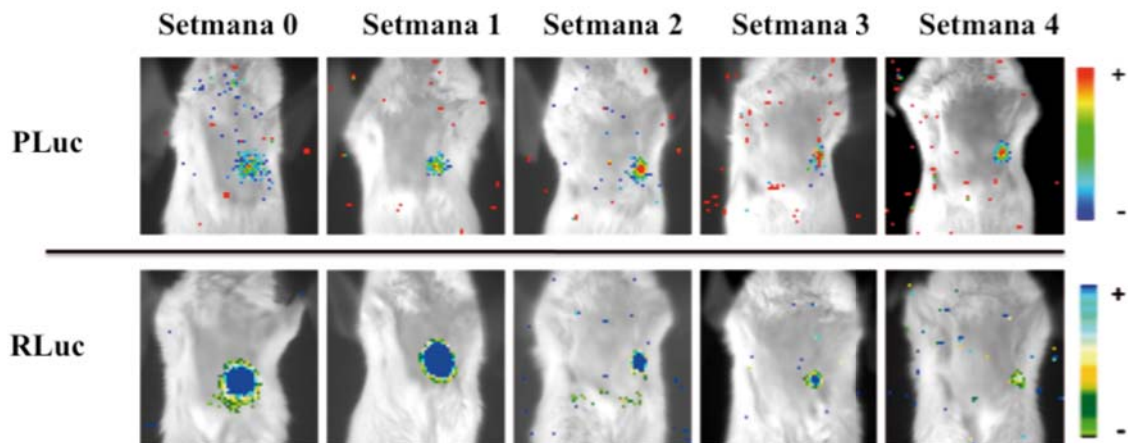


Figura 62. Imatges representatives mostrant la BLI dels trasplants de fibrina més UCBMSCs. La tira superior presenta imatges de la llum emesa pel traçador PLuc, regulat pel promotor específic hPECAM-1p; la tira inferior presenta imatges de la llum emesa pel constructe amb el gen traçador regulat pel promotor d'expressió constitutiva RLuc (n=4). Les barres de colors laterals representen els nivells d'intensitat bioluminescent per a la PLuc (blau, baixa; vermell, alta) i la RLuc (verd, baixa; blau, alta).

L'anàlisi dels valors de la llum RLuc en el temps (**Fig 63**) ens mostra que després de sobreviure el 100% de les cèl·lules durant la primera setmana, es produeix una pèrdua progressiva de viabilitat cel·lular, quedant el 12,08%, 12,69% i 2,96% de les cèl·lules en les següents 2a, 3a i 4a setmana respectivament.

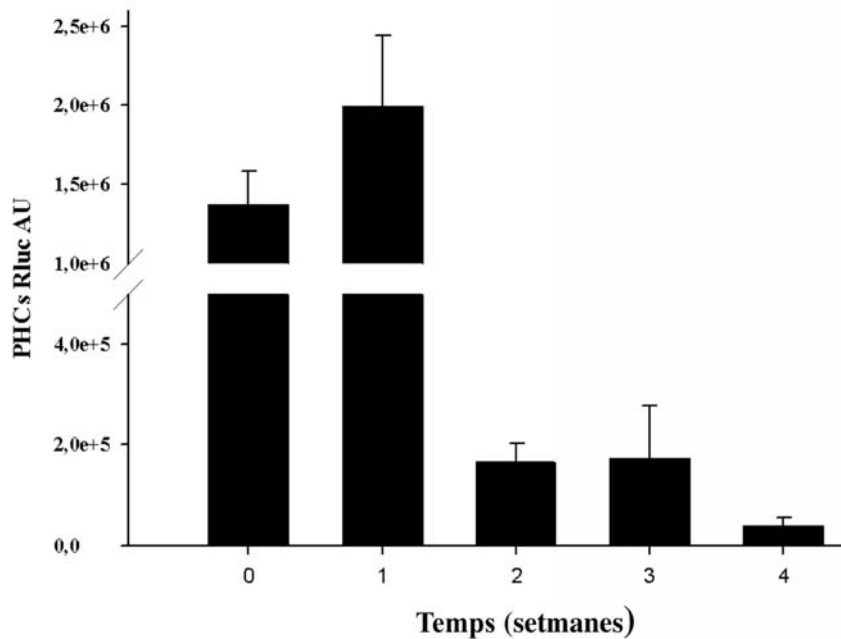


Figura 63. Supervivència de les cèl·lules implantades. L'histograma mostra els valors de RLuc obtinguts de les imatges per BLI al llarg del temps ($n=4$). Els valors es representen com la mitjana \pm SD. PHCs, "photon counts". AU, "arbitrary light units".

D'altra banda, la representació dels ràtios resultants de la llum emesa pel gen reporter transcripcionalment controlat pel promotor específic hPECAM-1p (PLuc) i la llum emesa pel gen reporter indicador de la proliferació cel·lular (RLuc), mostra un augment progressiu i significatiu de l'expressió del traçador endotelial (**Fig. 64**). Aquest augment progressiu fins la quarta setmana i paral·lel a la pèrdua de viabilitat, suggereix la selecció d'una població de cèl·lules que es diferencien al llinatge endotelial..

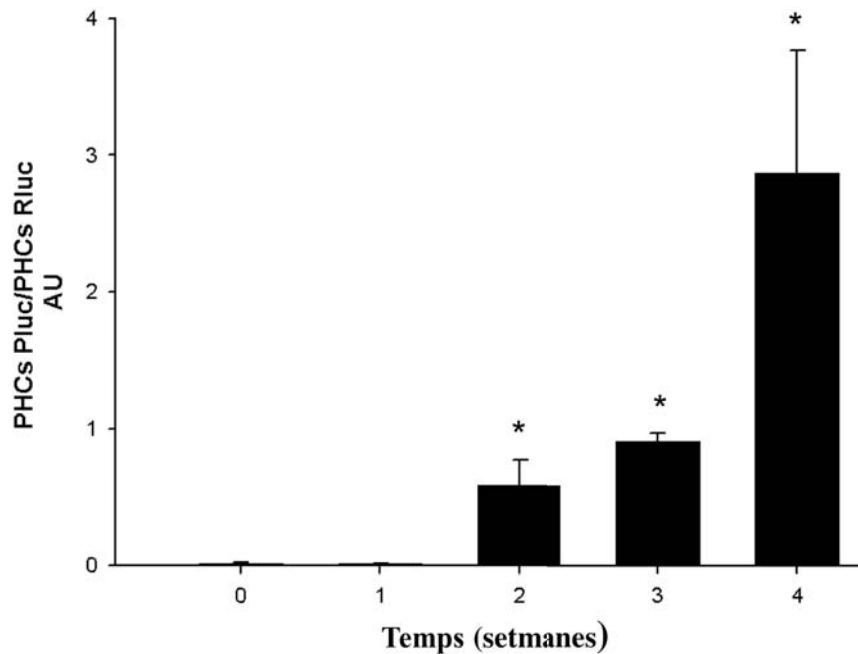


Figura 64. Histograma amb els canvis en els valors resultants del ràtio PLuc/RLuc. Els valors es representen com la mitjana \pm SD. * $p < 0,05$. PHCs, “photon counts”. AU, “arbitrary light units”.

3.3.3 Expressió gènica de les UBSMSCs en infart

Per validar els resultats obtinguts per BLI, als 30 dies post trasplantament, es sacrifiquen els animals i s’extreu el cor per l’anàlisi de l’expressió gènica mitjançant PCR a temps real. Els valors obtinguts ens mostren un augment significatiu en l’expressió de la majoria dels gens estudiats implicats en la diferenciació endotelial (CD-336, CD34, Egr-3, CD-31, SDF1 α i HIF1 α (**Fig. 65**), confirmant la diferenciació endotelial de les UCBMSCs en el model d’infart agut i validant els resultats obtinguts per BLI.

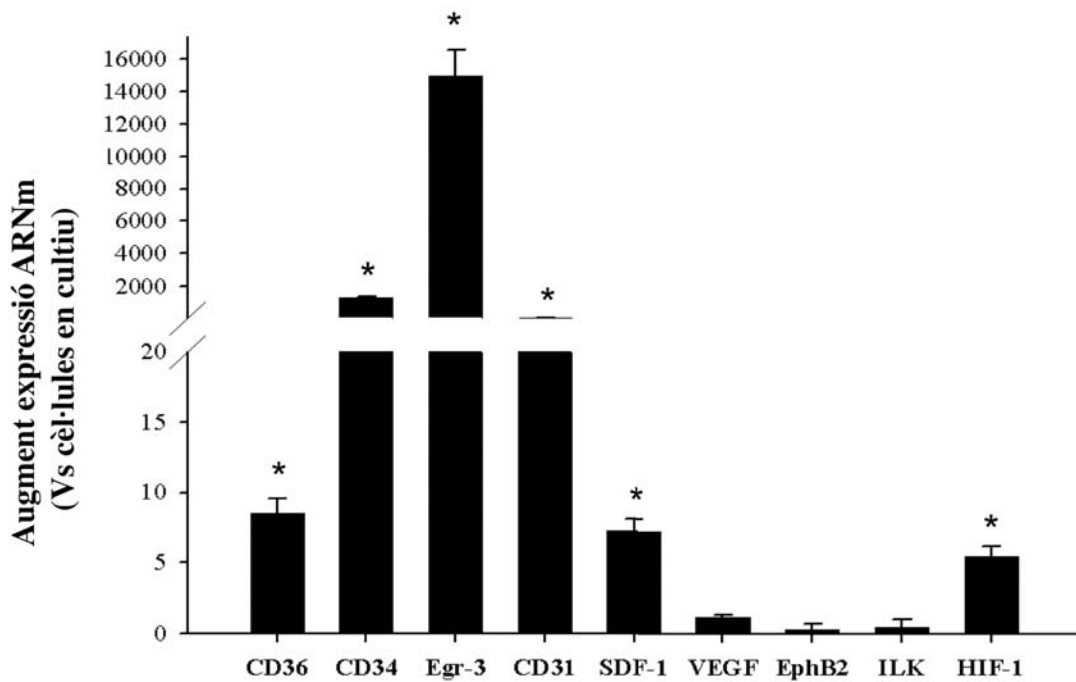


Figura 65. Histograma amb el resultat de l'anàlisi de l'expressió dels gens associats al llinatge endotelial en UCBMSCs, 30 dies post implantació en el cor de ratolins amb MI. Pel càlcul de l'augment en l'expressió de cada gen ($2^{-\Delta Ct}$) s'utilitza el valor promig de Ct corresponent a tres experiments independents realitzats per duplicat, emprant el GAPDH com a referència. Els valors es representen com la mitjana \pm SD. * $p < 0,05$.

3.3.4 Anàlisi morfomètrica

L'anàlisi morfomètrica, basat en la tinció tricròmica de Masson, mostra una reducció estadísticament significativa del 67,40% de l'àrea de la cicatriu del infart en els animals tractats amb el conjunt fibrina més cèl·lules respecte els controls amb MI (16.1 ± 7.5 % i 49.4 ± 16.1 respectivament; $p < 0.001$) (**Fig. 66**).

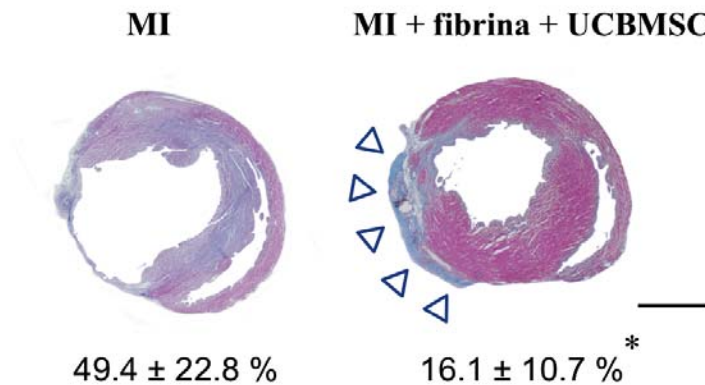


Figura 66. Seccions representatives de cor tenyides amb tinció tricròmica de Masson. Part esquerra de la imatge cor amb MI (control) i part dreta imatge cor amb MI tractat amb fibrina més cèl·lules. Les fletxes indiquen posició de la fibrina i els valors numèrics el % d'àrea de cicatriu (* $p < 0,001$). Barra a escala 1mm.

3.3.5 Anàlisi de la densitat vascular

Per estudiar l'efecte de l'implant en la densitat vascular, s'analitza el nombre de vasos per unitat de superfície en el teixit miocàrdic del ventricle esquerre, mitjançant la tinció amb lectina GSLIB4. Els resultats ens presenten valors significativament superiors en els cors amb el conjunt fibrina més cèl·lules respecte el control ($4,9 \pm 1.4$ i 8.1 ± 0.5 mm, respectivament; $p < 0.001$), o el que és el mateix, un 65,30% més de densitat vascular en els cors tractats respecte els controls (**Fig. 67**).

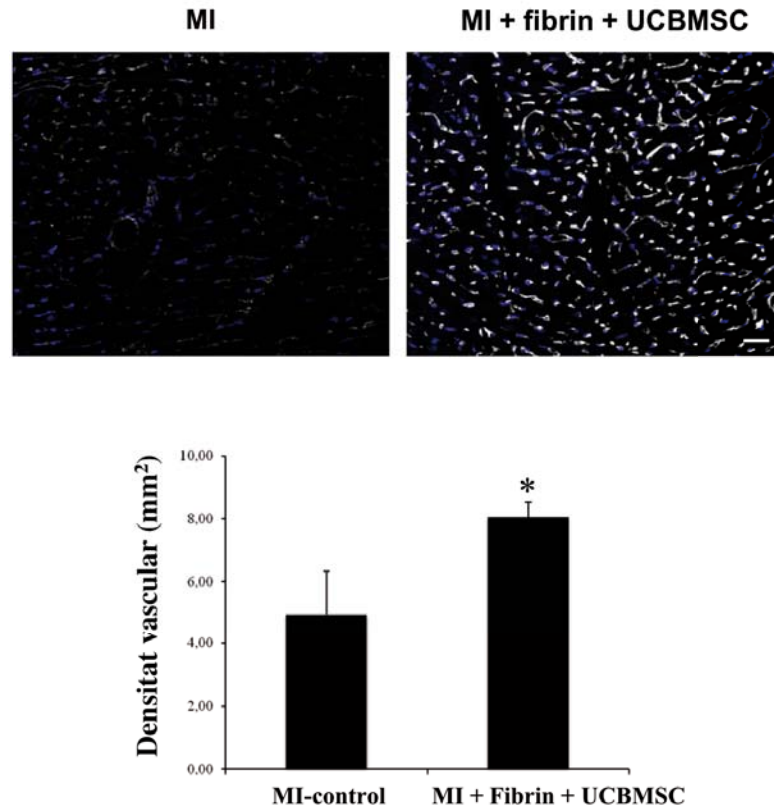


Figura 67. Panell superior, imatge representativa de les seccions de miocardi tenyides amb lectina GSLI B4 (blanc). Panell inferior, histograma amb el percentatge d'àrea amb vasos en els grups control i tractats (* $p < 0.001$). Barra a escala 75 μm . Els valors es representen com la mitjana \pm SD.

3.3.6 Identificació post sacrifici de les cèl·lules injectades i estudi de la seva expressió proteica

Als 30 dies post implantació, s'analitza a partir d'imatges de fluorescència i BLI dels cors sencers, la presència de les cèl·lules UCBMSCs en la zona del infart en els animals sacrificats. La llum emesa registrada correspon a la BLI produïda pel gen reporter transcripcionalment regulat pel promotor específic hPECAM-1p, així com la fluorescència verda, regulada pel mateix promotor. D'altra banda, la fluorescència vermella observada correspon al traçador indicador de la proliferació cel·lular (**Fig. 68**). En tots els casos, l'emissió de llum o fluorescència es localitza en la zona de la cicatriu ventricular del cor on es va trasplantar el conjunt de cèl·lules i fibrina.

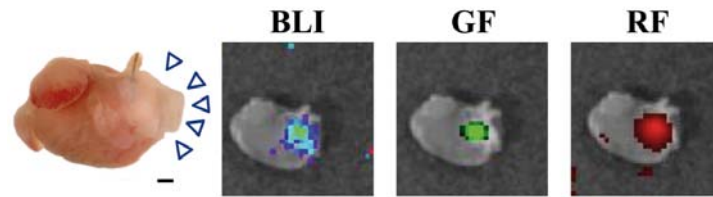


Figura 68. Fotografia representativa mostrant un cor extret a les 4 setmanes amb MI i tractat amb el conjunt fibrina més UCBMSCs. D'esquerra a dreta cor amb fibrina (fletxes), emissió de BLI, fluorescència verda i vermella per part de les UCBMSCs. Barra a escala 1 mm.

L'estudi posterior mitjançant microscòpia confocal de las seccions histològiques dels cors ens permet detectar les UCBMSCs dins els implants de fibrina, però en cap cas, s'observa migració de les cèl·lules cap a la zona de la cicatriu. Per analitzar el grau de diferenciació endotelial assolit per part de les UCBMSCs i validar els resultats dels traçadors fluorescents, les seccions histològiques es tenyeixen per immunofluorescència amb anticossos contra la proteïna *PECAM-1* (CD31) del llinatge endotelial. Els resultats obtinguts ens confirmen l'expressió proteica de la proteïna *PECAM-1* per part de les UCBMSCs, coincidint amb l'expressió de la fluorescència verda regulada pel promotor h*PECAM-1p*. De forma generalitzada, les UCBMSCs es troben localitzades al llarg de l'implant de fibrina formant estructures tubulars (**Fig. 69**).

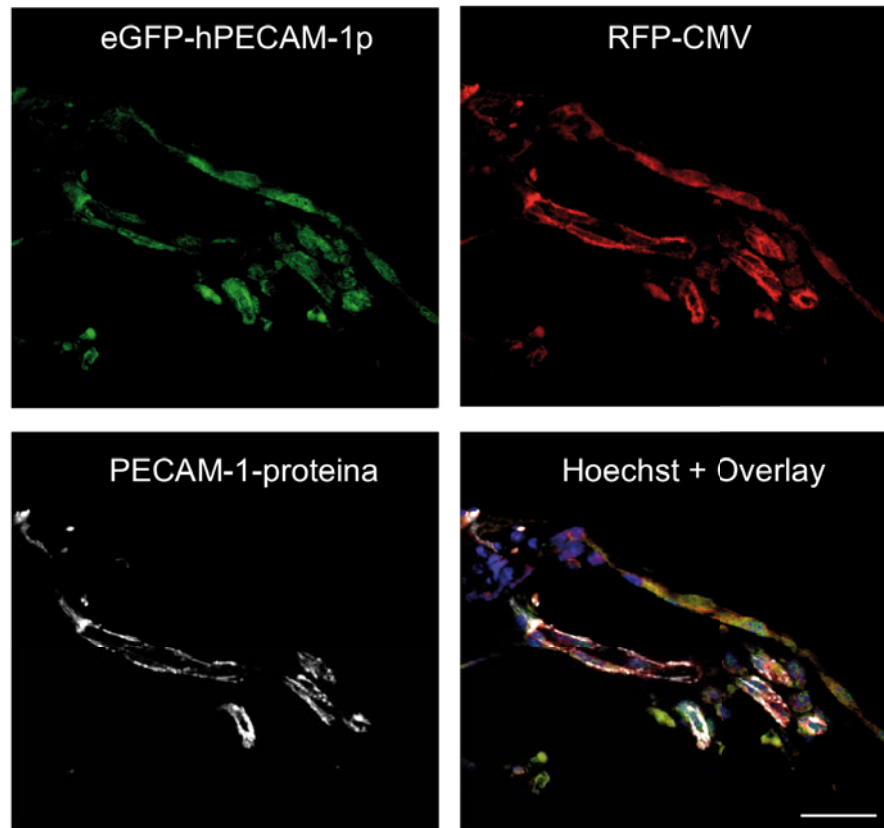


Figura 69. Imatges histològiques mostrant les UCBMSCs formant estructures vasculars dins un polímer de fibrina adherit a la zona ventricular del cor amb MI. D'esquerra a dreta la imatge presenta la fluorescència verda corresponent a l'expressió del gen eGFP transcripcionalment regulat pel promotor específic hPECAMp, la fluorescència vermella corresponent a l'expressió del gen RFP transcripcionalment regulat pel promotor constitutiu, la tinció en blanc de l'anticòs específic contra la proteïna PECAM-1 i la superposició de les tres imatges amb la fluorescència blava corresponent a la tinció dels nuclis amb Hoechst. Barra a escala 25 μ m.

DIFUSIÓ

El conjunt de resultats obtinguts han permès obtenir els manuscrits que es descriuen:

- Corresponent al primer apartat de resultats:

Juli R. Bagó, Elisabeth Aguilar, Maria Alieva, Carolina Soler-Botija, Olaia F. Vila, Silvia Claros, José A. Andrades, José Becerra, Nuria Rubio, Jerónimo Blanco. ***In vivo* bioluminescence imaging of cell differentiation in biomaterials: a platform for scaffold development.** *Sotmès a Tissue engineering.*

- Corresponent al segon apartat de resultats:

Carolina Soler-Botija, Juli R. Bagó, Antoni Bayés Genis. **Birds-eye view on cell therapy and tissue engineering for cardiac regeneration.** *Acceptat a Annals of the New York Academy of Science.* En preparació segon article.

- Corresponent al tercer apartat de resultats:

- Santiago Roura, Juli R. Bagó, Carolina Soler-Botija, Josep M. Pujal, Carolina Gálvez-Montón, Cristina Prat-Vidal, Aida Lluçia-Valldeperas, Jerónimo Blanco, Antoni Bayés-Genís. **Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells can be induced to the endothelial lineage and promote vascular growth in vivo.** *Coautoria. Sotmès a Cardiovascular Research.*

VII. DISCUSSIÓ

El desenvolupament d'estratègies per a la regeneració de teixits per ET requereix un gran nombre d'estudis eficaços tan *in vitro* com *in vivo*. Mentre els estudis *in vitro* utilitzen condicions arbitràries i simplificades, que proporcionen dades indicatives, els estudis *in vivo* requereixen més temps i despeses com a conseqüència de la seva complexitat¹⁸³. Les consideracions ètiques i econòmiques representen un altre dels esculls importants dels estudis *in vivo*. Els diferents comitès ètics han realitzat un gran esforç per evitar experimentacions *in vivo* innecessaris, donant lloc a la reducció del nombre d'animals utilitzats per investigació mèdica humana i veterinària del 31% al 23%¹⁸⁴. No obstant, actualment l'experimentació animal segueix essent indispensable al no poder reproduir *in vitro* condicions fisiològiques tan complexes. Així doncs, s'ha fet necessari desenvolupar mètodes d'anàlisi fiables que minimitzin al màxim el nombre d'animals a utilitzar.

Validació de la plataforma d'imatge per a la monitorització *in vivo* de la viabilitat cel·lular i diferenciació cel·lular

En la primera part d'aquesta tesis s'ha presentat la validació d'una alternativa metodològica a partir de l'anàlisi no invasiu per BLI i fluorescència de l'estat i diferenciació cel·lular, que permet l'estudi tan *in vitro* com *in vivo* de les diferents variables en ET, rentabilitzant així el nombre de recursos i temps a emprar.

Els aspectes fisiomecànics i instrumentals de la BLI estan ben establerts i són relativament fàcils de controlar en sistemes enzimàtics aïllats i en cèl·lules *in vitro*. No obstant, el seguiment de cèl·lules implantades en animals vius i monitoritzades per tècniques bioluminescents d'imatge no invasiva, presenta més dificultats com a conseqüència de les diferències en l'ambient fisiològic i en les propietats òptiques dels diferents teixits. Amb l'objectiu de reduir al màxim l'error inherent en l'anàlisi *in vivo*, es va recórrer a una estratègia basada en fer una doble transfecció de les cèl·lules amb uns reporters quimèrics per l'expressió d'una luciferasa i una proteïna fluorescent (RLuc:RFP) regulats transcripcionalment per un promotor constitutiu (CMV) i uns altres reporters quimèrics (PLuc:eGFP) regulats transcripcionalment per un promotor

induïble teixit específic (hOCp, hPECAMp i HRE-12p). La relació entre l'expressió de les dues luciferases en la mateixa cèl·lula, ens facilita la interpretació dels valors obtinguts i els fa independents de l'estat de proliferació cel·lular. A la vegada, l'expressió de les proteïnes fluorescents ens permet també la detecció i posterior selecció de les cèl·lules transfectades, així com la validació final *ex vivo* dels resultats obtinguts per BLI a partir de tècniques estàndards d'histologia.

La capacitat de monitorització *in vitro* de l'estat i diferenciació cel·lular de les ATDPCs mitjançant la BLI és demostrat a partir de l'anàlisi del ràtio en l'expressió de PLuc/RLuc en el temps. Així doncs, les ATDPCs amb els gens traçadors regulats transcripcionalment per els promotors específics hOCp, hPECAMp i HRE-12p, s'indueixen a la diferenciació als llinatges endotelials o osteogènics, o es cultiven en condicions d'hipòxia. Els resultats són ràtios estadísticament significatius de 2,6, 3,4 i 5,5 vegades superiors als de les cèl·lules control, no induïdes o cultivades en condicions de normòxia, respectivament. Emprant una tècnica d'anàlisi independent (PCR a temps real), es correlacionen aquests valors amb l'anàlisi dels nivells d'expressió de mRNA dels gens regulats pels corresponents promotors específics endògens. Els resultats obtinguts ens mostren un augment significatiu de 17, 13 i 2 vegades respectivament, comparat amb cèl·lules no diferenciades o cultivades en condicions normòxiques.

Així doncs, els valors registrats en el ràtio PLuc/RLuc es correlacionen amb els obtinguts per PCR a temps real, tot i presentar uns valors que no són exactament els mateixos. Aquestes diferències poden ser degudes al fet que els promotors específics que regulen els diferents traçadors no presenten tots els parells de bases que correspondrien als promotors naturals, sinó els parells de bases mínims que confereixen especificitat al promotor. A la vegada, també podria ser causa de la inserció a l'atzar en el cromosoma dels diferents vectors.

Una vegada establerta l'eficiència dels diferents traçadors quimèrics per l'estudi de l'estat i diferenciació cel·lular *in vitro*, es passa a determinar si aquest tipus d'anàlisi també és possible *in vivo*, sens dubte una situació molt més complexa.

Per a la demostració de la capacitat de monitorització *in vivo* dels canvis en l'expressió gènica durant el desenvolupament ossi mitjançant la BLI, s'utilitzen les matrius de DBM, estructures d'os desmineralitzades que proporcionen els requeriments necessaris per induir la diferenciació òssia. En aquest model s'injecten les ATDPCs amb els diferents traçadors dins els DBM implantats en l'esquena de ratolins, i es fa seguiment de l'emissió de llum un cop per setmana durant 56 dies. Els valors obtinguts ens mostren un augment significatiu en el temps del ràtio PLuc/RLuc en les ATDPCs amb els gens traçadors transcripcionalment regulats per hOCp i hPECAM-1p. Els valors màxims assolits són de 15 i 125 vegades respectivament, indicant una possible diferenciació cap a llinatge ossi i endotelial. No obstant, no es va detectar un augment significatiu en el ràtio de les ATDPCs amb el traçador transcripcionalment regulat pel promotor específic HRE-12p, el que ens indica un ambient poc hipòxic dins les matrius de DBM. L'anàlisi posterior per PCR a temps real de l'ARNm extret dels DBMs ens mostra un augment significatiu en l'expressió dels gens OC i PECAM-1 en el temps respecte les mateixes cèl·lules control en cultiu (valors màxims de 22,39 i 18,85 vegades respectivament), però no un augment en l'expressió dels gens que responen a la hipòxia. De la mateixa manera que el registrat *in vitro*, els valors obtinguts es correlacionen amb els registrats per BLI. Unes dades interessants són els valors clarament superiors en els ràtios PLuc/RLuc *in vivo*, respecte als obtinguts *in vitro*. Aquest fet es podria deure a la major opacitat dels teixits a longituds d'ona curtes, com les generades pels fotons emesos per la RLuc (480 nm). De totes maneres, la causa més probable sigui l'ambient fisiològic en què s'implanten els DBM, així com l'origen natural dels DBM que proporcionen les característiques òptimes tan estructurals com moleculars per a la diferenciació osteogènica.

Una altra línia de verificació dels resultats de BLI ha estat l'estudi de la funcionalitat microvascular en els DBM a diferents temps. La injecció intravenosa d'un traçador verd fluorescent (FITC) de dextrà d'alt pes molecular i que no presenta difusió capil·lar, ens permet observar tan la presència de fluorescència verda dins els DBM, com un augment de la mateixa en el temps. Aquests resultats ens confirmen mitjançant microscòpia de confocal la

presència en els DBM d'una xarxa de vasos funcionals connectats a l'hoste, així com el seu creixement progressiu en el temps. Això ens indica l'existència en els DBMs d'una zona molt vascularitzada i per tan amb un ambient poc hipòxic, com ja s'havia indicat per BLI amb la no activació del traçador regulat transcripcionalment pel promotor de resposta a la hipòxia (HRE-12p). Al seu torn, l'augment progressiu en el temps de la vascularització presenta el mateix patró d'augment registrat per BLI en el traçador regulat transcripcionalment pel promotor específic PECAM-1.

Una verificació addicional dels estudis per BLI s'obté a partir de l'anàlisi per microscòpia de confocal dels diferents DBMs, que ens permet localitzar les cèl·lules implantades dins el tram vascular. La observació de la doble expressió de fluorescència vermella i verda per part de les cèl·lules implantades, ens permet no solament determinar la seva posició si no també la seva diferenciació als llinatges endotelial i osteogènic. L'estudi més detallat de les cèl·lules implantades amb el traçador transcripcionalment regulat pel promotor hPECAM-1p ens mostra com les cèl·lules que presenten la doble expressió de fluorescència vermella i verda presenten una morfologia allargada i estan associades als capil·lars, mentre que en el cas de les cèl·lules implantades amb el traçador transcripcionalment regulat pel promotor hOCp, les cèl·lules amb fluorescència vermella i verda, es troben disperses en la matriu de DBM i no associades a capil·lars. D'altra banda, es poden observar cèl·lules implantades amb fluorescència vermella, que tot i portar el traçador fluorescent verd transcripcionalment regulat pel promotor HRE-12p, no l'expressen, indicant que no es troben en un ambient hipòxic, en correlació amb les observacions registrades per BLI.

Finalment, es confirma la diferenciació de les cèl·lules implantades al llinatge endotelial i osteogènic a partir de la tinció per immunofluorescència amb els anticossos contra les proteïnes *PECAM-1* i *OC*. A la vegada, d'acord amb els resultats de BLI i PCR a temps real, no es pot detectar presència de la proteïna HIF-1 α mitjançant immunofluorescència en les cèl·lules implantades.

Aplicació de la BLI en l'estudi de la regeneració cardíaca a partir d'estructures tridimensionals de fibrina i cèl·lules (UCBMSCs, ATDPCs d'origen pericàrdic i subcutani)

Tot i els avenços farmacològics i en estratègies de revascularització coronària, el conjunt de les malalties cardiovasculars, que inclou l'infart agut de miocardi (MI) i la insuficiència cardíaca congestiva (ICC), representen la principal causa de mort en els països desenvolupats (16,7 milions de morts anuals segons la OMS l'any 2004). Tradicionalment, l'única teràpia adreçada a solucionar el problema fonamental de la ICC, la pèrdua de cardiòcits, ha estat el trasplantament de cor, tractament que està molt limitat per l'escàs nombre de donants. Amb la finalitat d'oferir una millor alternativa als malalts, s'està intentant implementar l'ET per a la regeneració de lesions en teixit cardíac.

En l'estudi presentat s'ha aplicat una teràpia per ET en models de ratolí amb MI, utilitzant diferents tipus cel·lulars d'origen mesenquimal i estructures de suport tridimensionals de fibrina, estudiant la proliferació cel·lular i la diferenciació a partir de la BLI.

La selecció de les ATDPCs cardíques i subcutànies per l'estudi, respon al potencial que presenten com a eines per a la regeneració cardíaca, tal i com s'ha demostrat en diferents treballs previs^{44, 185, 186}.

Els valors registrats per BLI ens presenten una evolució molt similar de les ATDPCs cardíques i subcutànies pel que fa a la proliferació cel·lular en el temps tan en cors amb MI com Sham.

Es detecta que en aquestes dues situacions es produeix una forta caiguda en la supervivència tan de cèl·lules subcutànies com cardíques durant les tres primeres setmanes post implantació: 16,45% i 8,48% la primera setmana, 3,33% i 1,28% segona setmana, 1,61% i 0,80% tercera setmana respectivament.

La similitud entre els valors de supervivència pels dos tipus cel·lulars en ratolins amb MI i SHAM, suggereix que la causa d'aquesta pèrdua de viabilitat no és l'ambient en la zona infartada o dependent del tipus cel·lular. És més, aquesta forta caiguda en la viabilitat cel·lular, també s'ha observat en altres estudis on es recobreix la zona infartada amb cèl·lules humanes mesenquimals i mioblasts dins de matrius de col·lagen tipus I i matrigel^{187, 188}. També és poc probable que

sigui un problema de toxicitat cel·lular com a conseqüència de la fibrina, al no haver-s'hi registrat *in vitro* pèrdues de viabilitat cel·lular durant llargs períodes de cultiu en matrius tridimensionals d'aquest material.

Una possible causa de la caiguda en la viabilitat cel·lular podria ser la lenta cinètica de vascularització en la matriu de fibrina *in vivo*, que podria provocar la mort cel·lular registrada la primera setmana, al no poder suplir els requeriments metabòlics necessaris per el gran nombre de cèl·lules presents ($1,5 \times 10^6$ cèl·lules). La caiguda més lenta de la viabilitat cel·lular durant la segona i tercera setmana, podria ser conseqüència de l'assoliment d'un tram vascular suficient pel manteniment cel·lular registrat. Aquests resultats posen de manifest dos temes importants. El primer, un problema que s'ha observat repetidament en els estudis de biomaterials *in vivo* i que consisteix en la incapacitat d'aquests per suportar la supervivència cel·lular en el període inicial de l'implant. El desenvolupament de biomaterials que proporcionin aquest tipus de suport hauria de ser un objectiu en aquest camp. El segon és la capacitat dels procediments d'imatge per avaluar la supervivència cel·lular en els materials en temps real, el que ens proporciona l'eina ideal per guiar el desenvolupament de materials amb aquestes propietats.

Pel que fa a la monitorització per BLI de la diferenciació cel·lular, es registren valors molt similars en l'emissió de llum transcripcionalment regulada pel promotor específic hPECAM-1p, tan en ATDPCs cardíaques com subcutànies amb MI i Sham. En tots els casos s'observa un augment significatiu durant la primera setmana, tendència que es manté en la segona i tercera setmana. Aquests resultats ens permeten determinar la cinètica de diferenciació de les ATDPCs cardíaques i subcutànies al llinatge endotelial i de la mateixa manera que en el cas de la viabilitat cel·lular, aquesta diferenciació és independent de l'ambient en la zona del infart. Tècniques d'anàlisi independents, com la PCR a temps real i les immunofluorescències contra l'ab *PECAM-1*, ens confirmen aquesta diferenciació. És més, mitjançant microscòpia de confocal s'observa com les cèl·lules ATDPCs cardíaques i subcutànies es troben associades a vasos, que al seu torn s'identifiquen com a funcionals al trobar-se plens de fluoresceïna injectada prèviament per la vena caudal de la cua.

D'altra banda, la monitorització de la diferenciació cel·lular al llinatge cardíac per BLI, registra un augment des de la primera setmana tan en ATDPCs cardíques com subcutànies, augment que es manté fins a la tercera setmana d'estudi, essent significativament superiors els valors registrats en les ATDPCs cardíques. Estudis posteriors per PCR a temps real i les immunofluorescències contra l'ab *hcTnl* ens confirmen tan l'expressió positiva de diferents marcadors cardíacs, com la major expressió en ATDPCs cardíques. Aquesta major capacitat de diferenciació de les ATDPCs cardíques al llinatge cardíac, es correlaciona amb els resultats registrats en estudis previs⁴⁴. Pel que fa als valors registrats en MI i Sham, no s'observen diferències significatives entre els dos grups, el que ens indica que la diferenciació al llinatge cardíac sembla ser independent de l'ambient en la zona del infart, com també s'ha registrat en la diferenciació al llinatge endotelial. Aquest fenomen podria estar causat per la possible barrera física que pot exercir la matriu de fibrina en la difusió de molècules senyalitzadores de la zona del miocardi. Aquesta possible barrera física podria explicar l'absència, excepte en algun cas anecdòtic, de cèl·lules implantades que hagin migrat de la zona de fibrina cap al miocardi adjacent.

L'anàlisi morfomètric, de densitat vascular i funcional a partir d'ecocardiograma, ens mostren diferències significatives entre els animals tractats i no tractats. No obstant, s'observen poques diferències entre els animals tractats només amb la fibrina i la fibrina amb cèl·lules, el que es podria atribuir a la baixa supervivència cel·lular. Tot i així, l'efecte beneficiós de l'aplicació de la fibrina (31%), la fibrina amb ATDPCs cardíques (32%) o subcutànies (36%) en el que fa referència a la mida del infart, és millor que l'observat en altres estudis amb la injecció intramiocàrdica de cèl·lules mare derivades de moll d'os 6,7%¹⁸⁹, cèl·lules mare cardíques adultes 21%¹⁹⁰, o cèl·lules mare derivades de teixit adipós 14%¹⁹¹. L'efecte terapèutic observat de la fibrina es deu probablement al seu potencial com a material angiogènic. La fibrina, de forma natural està relacionada amb la cicatrització de ferides actuant com a matriu natural per a l'angiogènesis. El procés es caracteritza per la migració de les cèl·lules endotelials pel coàgul de fibrina a través de la unió de les integrines $\alpha_v\beta_3$ als motius d'arginina-glicina-asparagina¹⁹². La producció de plasmina per part de les cèl·lules endotelials

dóna lloc a la degradació de la matriu¹⁹³. Aquesta disminució en la densitat en la fibrina, permet la formació dels capil·lars. A la vegada, un producte de la degradació de la fibrina, el fragment E de la mateixa, s'ha demostrat que indueix l'angiogènesis en membranes corioalantoides de pollastres¹⁹⁴, i estimula la proliferació, migració i diferenciació microvascular de les cèl·lules endotelials¹⁹⁵. L'administració exògena subcutània de fibrina en conills d'índia també ha demostrat el seu potencial com inductor angiogènic¹⁹⁶. D'altra banda, també s'ha demostrat la seva capacitat com a reservori de varis factors de creixement¹⁹⁷ i d'enzims fibrinolítics¹⁹⁸.

La davallada en la viabilitat cel·lular de les ATDPCs cardíques i subcutànies podria ser la causa que l'aport cel·lular en la millora cardíaca esdevingui de poca importància, tot i la diferenciació al llinatge endotelial i cardíac de les cèl·lules implantades. És per això que es es va plantejar millorar la supervivència cel·lular utilitzant tipus cel·lulars amb major capacitat de proliferació, tals com les UCBMSCs. Estudis recents han demostrat tan la seva elevada capacitat de proliferació *in vitro*, així com la resistència a l'aparició de canvis morfològics i de senescència en temps prolongats de cultiu^{57, 58}. No obstant, hi han pocs estudis pel que fa a la seva capacitat de diferenciació^{199, 200}. En els estudis realitzats es varen marcar les UCBMSCs i ATDPCs amb els traçadors quimèrics indicadors de la proliferació cel·lular i diferenciació cel·lular al llinatge endotelial i es van injectar subcutàniament en matrius tridimensionals de matrigel. De la monitorització en el temps per BLI de la diferenciació al llinatge endotelial, s'observa un augment significatiu en els dos tipus cel·lulars als 5 dies post implantació, així com un augment significativament superior en les UCBMSCs respecte les ATDPCs subcutànies.

Aquests resultats es validaren mitjançant estudis posteriors d'expressió gènica per PCR a temps real i de funcionalitat microvascular. Pel que fa a l'expressió gènica s'observa en conjunt una major expressió de marcadors endotelials en les UCBMSCs respecte a les ATDPCs, excepte en l'expressió del gen CD34. En el cas concret de l'expressió del gen PECAM-1 s'observa 9,9 vegades més d'expressió en les UCBMSCs, respecte a les ATDPCs. Una dada particularment interessant és la major expressió per part de les UCBMSCs del

gen SDF-1 α , relacionat amb la supervivència cel·lular, migració i reclutament de cèl·lules progenitores endotelials (SDF-1).

L'estudi de la microvasculatura funcional de nova formació, mitjançant el traçador verd fluorescent, ens mostra un tram vascular en tot el polímer de matrigel amb UCBMSCs, que és pràcticament inexistent en les matrius de matrigel amb ATDPCs subcutànies. A la vegada, una observació més detallada ens va permetre identificar les UCBMSCs formant part de l'estructura dels vasos, el que confirma els resultats registrats per BLI i PCR a temps real.

L'aplicació posterior del conjunt fibrina més UCBMSCs per a la regeneració cardíaca post infart, ens confirma el potencial d'aquestes cèl·lules com a eina terapèutica. En aquests experiments la monitorització per BLI de les cèl·lules implantades ens mostra un patró de supervivència cel·lular superior en la primera (100%), segona (12,08%), tercera (12,69%) i quarta setmana (2,96%), respecte les ATDPCs cardíques (8,48%, 1,28%, 0,90%, N.D (no detecció)%) i subcutànies (16,45%, 3,33%, 1,61%, N.D)) (**Fig. 70**).

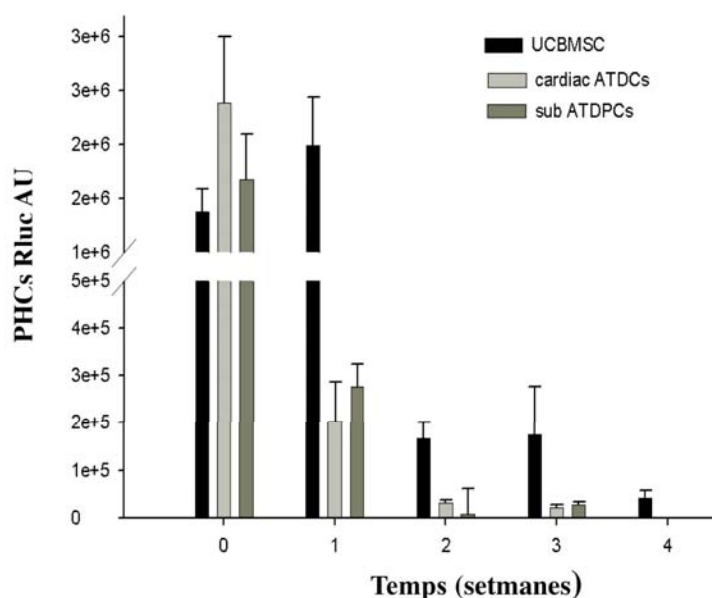


Figura 70. Supervivència dels diferents tipus cel·lulars en matrius de fibrina i MI. L'histograma mostra els valors de RLuc obtinguts de les imatges per BLI al llarg del temps ($n=4$). Els valors es representen com la mitjana \pm SD. PHC, "photon counts". AU, "arbitrary light units".

La monitorització per BLI de la diferenciació cel·lular al llinatge endotelial ens indica una activació en les UCBMSCs a partir de la segona setmana post implantació, tendència que es mantingué i augmentà fins a la quarta setmana. En general, els valors registrats per BLI de la diferenciació cel·lular al llinatge endotelial són molt similars en els tres tipus cel·lulars estudiats fins ara. L'anàlisi posterior de l'expressió de diferents gens endotelials per PCR a temps real a les 4 setmanes post implantació, ens mostra una activació similar a la registrada en les ATDPCs cardíacques i subcutànies, validant els resultats de BLI. Una dada addicional als resultats és la que s'aporta en l'anàlisi per immunofluorescència de la localització i expressió del marcador endotelial PECAM-1. De la mateixa manera que les ATDPCs cardíacques i subcutànies, les UCBMSCs presenten un patró de diferenciació al llinatge endotelial molt similar i una incapacitat de migració a la zona de la cicatriu pràcticament nul·la. No obstant, en aquests experiments el conjunt fibrina més UCBMSCs va generar una densitat vascular en la zona del infart (**Fig. 71A**) i una reducció de la mida del infart (**Fig. 71B**) significativament superiors als altres dos tipus cel·lulars estudiats i a la fibrina sola.

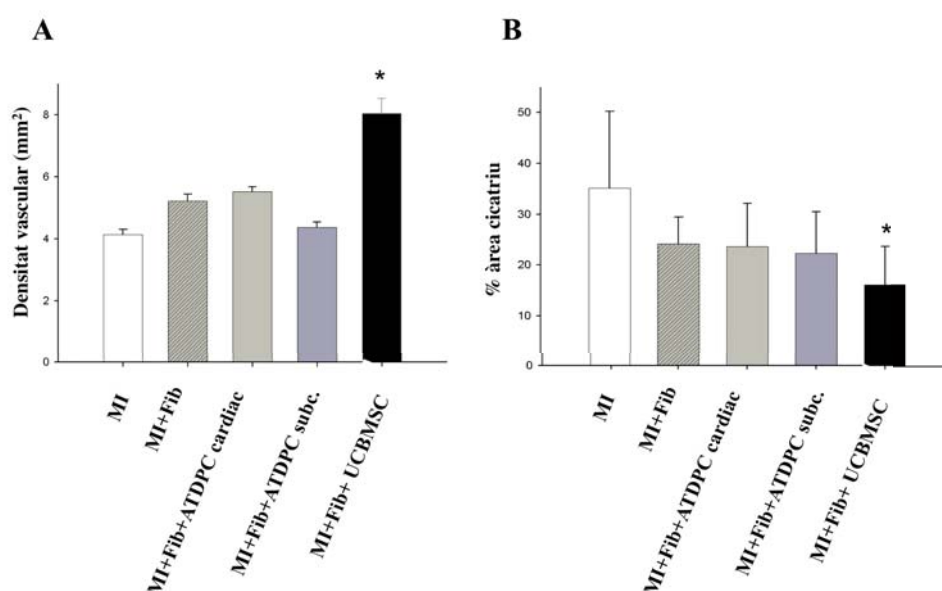


Figura 71. Histograma amb el percentatge d'àrea amb vasos en els grups control i tractats (**A**). Histograma amb la representació dels valors registrats en l'àrea de cicatriu dels infarts en els grups control i tractats (**B**). Els valors es representen com la mitjana \pm SD. * $p < 0.05$.

Donada la similitud entre la capacitat de diferenciació endotelial dels tres tipus cel·lulars i la seva incapacitat de migrar al miocardi adjacent, aquests resultats suggereixen que la major viabilitat cel·lular i la corresponent prolongació d'un efecte paracrí amb l'aport de factors angiogènics i antiapoptòtics²⁰¹, podria ser la causa principal de la major capacitat terapèutica.

En resum, els resultats obtinguts per BLI ens han permès avaluar en el temps la supervivència y diferenciació cel·lular *in vivo*. Pel que fa a la supervivència cel·lular s'ha pogut identificar la necessitat d'utilitzar biomaterials que millorin la supervivència cel·lular durant les primers setmanes de l'implant, així com el potencial dels procediments d'imatge per aquesta finalitat. En relació a l'estudi de la diferenciació cel·lular monitoritzada per BLI i validada per tècniques de PCR a temps real, microscòpia per confocal i immunofluorescència, ens ha permès definir la major capacitat de diferenciació al llinatge cardíac de les ATDPCs d'origen epicàrdic respecte les d'origen subcutani, així com la mateixa capacitat de diferenciació al llinatge endotelial per part dels tres tipus cel·lulars estudiats (ATDPCs cardíques, ATDPCs subcutànies i UCBMSCs) i la seva associació a un sistema vascular funcional. En aquest apartat queda per explorar la capacitat de diferenciació al llinatge cardíac per part de les UCBMSCs.

Dels tres tipus cel·lulars estudiats, les UCBMSCs són les que mostren una major capacitat terapèutica, essent estadísticament superior al de la matriu de fibrina per si sola tan pel que fa en la inducció de la vascularització del miocardi adjacent a l'implant, com en la reducció de la mida del infart. No obstant, en cap cas s'ha observat migració de les cèl·lules implantades cap a la zona del miocardi adjacent. En aquest sentit, caldria acabar de confirmar aquesta major capacitat terapèutica per part de les UCBMSCs a partir de l'anàlisi funcional per ecocardiografia.

Que les UCBMSCs presentin el millor efecte terapèutic pot ser degut a l'efecte paracrí més prolongat que exerceixen sobre el miocardi adjacent. Aquesta possible causa es veu reforçada pels valors de BLI registrats que ens indiquen la major supervivència de les UCBMSCs respecte els altres tipus cel·lulars, així com per la similitud en la capacitat de diferenciació al llinatge endotelial en els

tres tipus cel·lulars i la falta de tropisme en tots ells cap a la zona del miocardi adjacent.

VIII. CONCLUSIONS

1. S'ha demostrat la capacitat de monitoritzar *in vitro* i *in vivo* la proliferació i diferenciació cel·lular mitjançant la BLI. Utilitzant dues luciferases, una regulada per un promotor constitutiu i una altra regulada per un promotor específic, es fa possible obtenir informació dels canvis d'expressió gènica per cèl·lula, evitant artefactes produïts per la mort i/o la proliferació cel·lular.
2. La utilització de traçadors quimèrics que donen lloc a proteïnes bioluminescents i fluorescents, permet la utilització de la fluorescència per a la selecció per FACS de cèl·lules transfectades, per a la localització en els teixits i per a la determinació del seu estat de diferenciació per histologia. Al ser la proteïna reporter quimèrica (un únic polipèptid) i estar regulada per un sol promotor, s'assegura l'expressió conjunta i en la mateixa proporció d'activitat fluorescent i bioluminescent.
3. L'aplicació de la BLI en l'estudi de la capacitat de regeneració cardíaca del conjunt fibrina més cèl·lules, ens ha permès monitoritzar la supervivència i diferenciació cel·lular en UCBMSCs i ATDPCs d'origen epicàrdic i subcutani. Els valors de BLI s'han validat per tècniques de PCR a temps real, microscòpia de confocal i immunofluorescència.
4. La supervivència cel·lular és clarament superior en les UCBMSCs i la diferenciació cel·lular al llinatge endotelial és similar en els tres tipus cel·lulars. La diferenciació cel·lular al llinatge cardíac, només estudiada en ATDPCs cardíques i subcutànies, és estadísticament superior en les primeres.
5. La matriu de fibrina aporta millora terapèutica en la regeneració cardíaca al estimular l'angiogènesi en la zona de l'implant.
6. Les UCBMCs amb fibrina presenten una major capacitat terapèutica respecte els altres tipus cel·lulars i la matriu de fibrina sola, com a

conseqüència d'una major supervivència cel·lular i un possible efecte paracrí més prolongat.

IX. APÈNDIX

Descripció dels marcadors endotelials analitzats:

EGR-3: De l'anglès *early growth response factor 3*, forma part de la família Egr, que actuen com a mitjancers de respostes primerenques o immediates, desencadenades per l'activació de receptors de superfície, en una àmplia varietat de tipus cel·lulars. És un candidat com a mediador primerenc de l'angiogènesi induïda per VEGF¹⁵⁷.

Factor von Willebrand (vWF): És una glicoproteïna imprescindible per a una homeòstasi normal. Està sintetitzat per les cèl·lules endotelials, els megacariòcits i el teixit connectiu subendotelial^{202, 203, 204}. vWF procura l'adhesió de les plaquetes al subendoteli després d'una lesió vascular²⁰⁴ i també té un paper important en la interacció entre les cèl·lules endotelials i la seva matriu²⁰⁵. La manca o deficiència d'aquest factor desencadena la malaltia de von Willebrand i està implicat en un gran nombre d'altres malalties²⁰⁴.

CD34: És una molècula present en diversos tipus cel·lulars. És una glicoproteïna de superfície que té funcions en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula²⁰⁶. També participa en la unió entre les cèl·lules mare i la matriu extracel·lular del moll d'os o directament amb les cèl·lules estromals²⁰⁷. CD34 és expressat per cèl·lules hematopoètiques del cordó umbilical i del moll d'os, cèl·lules progenitores endotelials i cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis, entre d'altres^{208, 209, 210}.

CD31: També anomenat PECAM-1 (de l'anglès *platelet endothelial cell adhesion molecule*), té un paper clau en l'eliminació dels neutròfils vells de l'organisme. S'expressa en gran quantitat en cèl·lules endotelials, però també en plaquetes, macròfags, fibroblasts i osteoclasts, entre d'altres. CD31 participa en les unions cèl·lula-cèl·lula, en la migració transendotelial dels neutròfils i està implicat en l'angiogènesi^{156, 211, 212}.

CD102 (ICAM-2): És una proteïna transmembrana que s'expressa de forma constitutiva en cèl·lules de l'endoteli vascular i també en algunes poblacions de

limfòcits i monòcits. CD102 té un paper clau en l'adhesió de les cèl·lules endotelials a integrines²¹³. També participa en la transmigració i activació limfocitària.

CD36: És una proteïna de superfície, membre de la família de receptors *scavenger*. S'expressa en molts tipus cel·lulars i interactua amb un gran nombre de lligands, incloent-hi el col·lagen²¹⁴, LDL oxidada²¹⁵, lipoproteïnes natives²¹⁶, etc. El CD36 està implicat en l'homeòstasi, trombosi, inflamació, metabolisme dels lípids i de la glucosa^{217, 218} i aterogènesi²¹⁹.

SDF-1 (CXCL12): De l'anglès *stromal derived factor-1*, és una potent molècula quimiotàctil per als limfòcits²²⁰. La interacció de SDF-1 amb CXCR4 activa diferents vies implicades en la supervivència, proliferació, adhesió i migració²²¹. En l'adult té un paper important en l'angiogènesi reclutant les cèl·lules progenitores endotelials del moll d'os en un mecanisme dependent de CXCR4²²².

VEGF: Entre els inductors de l'angiogènesi, el VEGF (de l'anglès *vascular endothelial growth factor*), és el més ben caracteritzat i segurament la molècula més important. El VEGF està implicat en la regulació de múltiples passos en l'angiogènesi. Afavoreix la vasodilatació inicial augmentant la permeabilitat de les cèl·lules endotelials i afavorint el transport de proteïnes plasmàtiques²²³. El VEGF també augmenta els activadors del plasminogen i MMP-1 en les cèl·lules endotelials²²⁴ així com la seva proliferació i migració i a més, en redueix l'apoptosi^{225, 226}.

EphB2: És un receptor de membrana de la família de les ephrines-B. La seva expressió està associada al desenvolupament endotelial arterial²²⁷. Estudis amb ratolins deficients en l'expressió de *ephrin-B2* mostren la disrupció del desenvolupament vascular embrionari com a conseqüència de la deficient reestructuració de la trama vascular primogènica²²⁸.

HIF-1 α : La subunitat alfa del factor 1 induïble per hipòxia és una proteïna que juntament a la subunitat beta formen el domini HIF1. La subunitat alfa és un factor de transcripció sobreexpressat en cèl·lules de mamífers que es troben en condicions de baixa concentració d'oxigen. Joga un paper essencial en la resposta cel·lular i sistèmica a la hipòxia²²⁹.

Descripció dels marcadors cardíacs analitzats:

GATA-4: Forma part d'una família de factors de transcripció formada per sis proteïnes (GATA-1-6), totes implicades en el desenvolupament embrionari i la generació de tipus cel·lulars específics²³⁰. GATA-4 és un dels primers factors expressats en el desenvolupament de les cèl·lules cardíques²³¹ i continua present en els cardiòcits durant la vida adulta²³², on regula l'expressió de gens cardíacs^{233, 234} i és necessari per a la viabilitat dels miòcits²³⁵. En el cor adult, GATA-4 juga un paper important en la regulació de l'expressió gènica per al manteniment de l'homeòstasi cardíaca, ja que promou la supervivència cel·lular i inhibeix l'apoptosi²³⁵, i també en la regulació del creixement hipertròfic²³⁶. GATA-4 regula la transcripció de nombrosos gens cardíacs, incloent-hi el factor natriurètic auricular²³⁷, pèptid natriurètic tipus b (BNP), cadena pesada de l' α -miosina, β -MHC, cTnl i molts d'altres²³⁸. Es creu que GATA-4 podria ser un mediador de l'angiogènesi al cor després d'una lesió²³⁹.

Nkx2.5: Factor de transcripció també conegut com a Csx, és un regulador crític de l'expressió gènica cardíaca i del desenvolupament del cor. Nkx2.5 és altament expressat per les cèl·lules progenitores del cor primerenc quan es comprometen cap al llinatge cardíac durant l'embriogènesi i es continua expressant al cor a l'edat adulta^{240, 241}. A l'edat adulta, s'ha vist que Nkx-2.5 regula l'organització sarcomèrica en els cardiòcits²⁴² i l'expressió de proteïnes cardíques clau, com la connexina-43²⁴³. El seu paper al cor adult només es coneix parcialment, i s'hipotetitza que també podria participar en la resposta hipertròfica cardíaca²⁴⁴. Per altra banda hi ha evidències que podria actuar com un factor de supervivència i cardioprotecció²⁴⁵.

Tbx5: Tbx5 o T-Box 5 forma part de la família dels gens T-box que codifiquen per factors de transcripció implicats en diversos aspectes dels patrons de formació en els embrions, tant vertebrats com invertebrats, i que es caracteritzen per un domini d'unió a l'ADN molt conservat²⁴⁶. Té un paper clau en el desenvolupament cardíac primerenc²⁴⁷. Tbx5 s'associa amb Nkx2.5 i sinèrgicament promouen la diferenciació cardiomiogènica²⁴⁸. Ambdós s'uneixen directament al promotor del gen per la proteïna cardioespecífica, anomenada precursor del pèptid natriurètic tipus A (NPPA). Tbx5 també interacciona amb GATA4 i, fins i tot, sembla que forma un triple complex amb Nkx2.5 que seria el que regularia un seguit de gens cardíacs específics²⁴⁹.

α -actinina sarcomèrica: És una proteïna de 100 KDa que forma part del citoesquelet d'actina de les cèl·lules musculars. Concretament, la α -actinina sarcomèrica uneix els filaments d'actina entre si en zig-zag, un patró conegut com a filaments Z^{250, 251}.

Troponina I cardíaca: La troponina I és la subunitat inhibidora del complex de tres proteïnes implicat en la regulació mitjançant el calci de l'actomiosina ATPasa durant la contracció muscular. Concretament, el paper de la troponina I és la d'unir-se a l'actina per mantenir el complex troponina-tropomiosina al lloc correcte. La isoforma cardíaca de la troponina I es diferencia de les altres dues presents al múscul esquelètic per una cua d'uns 30 aminoàcids que conté uns residus de serina que en ser fosforilats faciliten la relaxació muscular miocàrdica²⁵².

SERCA2 (*sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺*): És una bomba de calci la funció de la qual és transportar el calci des del citoplasma al reticle sarcoplasmàtic. SERCA2 és una proteïna transmembrana d'uns 100 KDa que forma part d'una família d'isoenzims molt conservada²⁵³. SERCA2 té 2 isoformes fruit de l'*splicing* alternatiu. SERCA2a s'expressa predominantment al cor i al múscul esquelètic²⁵⁴, i SERCA2b s'expressa a la musculatura llisa i a la majoria de teixits no musculars^{255,256}.

Connexina-43 (Cx-43): És una proteïna de 43 KDa que forma part d'una família de proteïnes estructurals transmembrana. A partir de la unió de 6 molècules de connexina formen unes estructures anomenades *gap junctions* essencials per a molts processos fisiològics, com la despolarització coordinada del múscul cardíac. Cx-43 també s'expressa a les cèl·lules de l'estroma del moll d'os, on s'ha vist que podria ser crucial en el desenvolupament d'una resposta eficient davant d'un estrès hematopoiètic²⁵⁷. Aquesta connexina s'expressa a la superfície dels vasos amb aterosclerosi, al cervell i la més abundant al cor, tant a la membrana citoplasmàtica dels cardiòcits com a les seves mitocòndries²⁵⁸.

Mef2C: El factor potenciador específic de miòcits 2C (de l'anglès *myocyte enhancer factor-2*) és un factor de transcripció de la família Mef2 associat al manteniment de l'estat de diferenciació en cèl·lules musculars. Estudis en ratolins deficients en Mef2C mostren anomalies cardíques i en els sistema vascular²⁵⁹.

Descripció de marcadors osteogènics i d'elements de resposta a la hipòxia:

Osteocalcina: És una hormona peptídica lineal formada per 49 aminoàcids i produïda pels osteoblastes durant la formació òssia, incorporant-se dins de la matriu òssia. Com a hormona en el cos, actua en les cèl·lules beta del pàncrees augmentant la producció d'insulina, i a la vegada actua en les cèl·lules grasses per l'alliberament de la hormona adiponectina, la qual augmenta la sensibilitat a la insulina²⁶⁰.

LDHA: L'enzim *lactat deshidrogenasa A* catalitza la conversió de la L-lactat i NAD^+ en piruvat i NADH en els últims passos de la glicòlisi anaeròbica. La seva expressió és induïda en condicions d'hipòxia²⁶¹.

PGK1: L'enzim *fosfoglicerat quinasa 1* catalitza la conversió del 1,3-difosfoglicerat a 3-fosfoglicerat en la glicòlisi anaeròbica. Igual que en el cas de la LDHA, la seva expressió és induïda en condicions d'hipòxia²⁶².

X. AGRAÏMENTS

Com ha passat el temps!!!!. Crec recordar que tenia més cabell al cap i menys panxa...Què hi farem, és el que toca. Sens dubte aquest temps passat s'ha pogut superar gràcies a totes aquelles persones amb les que he compartit dies de tristesa, alegria, frustració, més frustració, resignació, il·luminació, foscor, pluja, sol,...

Sou vosaltres qui heu donat sentit al fet d'aixecar-se després de caure. És per això que us considero co-autors d'aquesta tesis i els autèntics campions!!!!!!....

Apa doncs, aquests són els meus campions:

-Jerónimo i Núria, altrament coneguts com JeroNuri, unitat indivisible i pares científics. Segurament mai us ho he dit, però segur que els ulls m'han delatat cada vegada que parlàvem d'experiments o de l'últim documental vist. M'heu donat tot allò que es necessita per créixer com a persona; confiança i il·lusió. No sabeu fins a quin punt m'heu permès créixer i us estaré sempre agraïts. Si pogués us adoptava!!!!.

-Eli i Maria, també conegudes en companyia meva com les tres maries, la caca, la merda i la porqueria. Sens dubte heu estat els dos pilars que m'han permès aguantar tots aquells dies on la única sortida semblava sortir corrents. Varem començar com companys, però acabem com amics. Ara recordo tots els moments passats i la veritat és que se'm fa un nus a l'estómac. Us trobaré mooolt a faltar, pel que espero poder seguir rient amb la "zudoroza" i la "rusa" mentre fem un cafè. Gràcies per compartir les alegries i les penes del dia a dia i per estar al meu costat en moments difícils. Eli, estic segur que el projecte que estàs a punt de començar serà tot un èxit. T'ho mereixes, eres la "meor". Maria, "hija mía", estic segur que acabaràs sent una gran científica, espero que recordis "quien es tu padre" i acabis perfeccionant el llenguatge dels gats (miau, miau).

-Marta V, Irene, Olaia, Didac i Marta G, formeu o heu format part del grup i heu aportat grans moments que no oblidaré. Marta G, fa poc que ens coneixem però és com si et coneixes de tota la vida, et rius de les mateixes bromes i això té molt de mèrit. Espero conèixer aviat a la Pelma i al Nino, ah i com no en Quim.

-Carol S; l'àngel salvador, il·luminació científica i persona amb el cor més gran que he vist mai. Cris; "snif", "snif", com se t'ha trobat a faltar i que bé que ens

ho hem passat aquelles tardes de confidències i rasca-rasca. Carol G; la súper veterinària que ens ha fet riure sempre i veure les coses amb optimisme. Santi; el crack, ets un tros de pa i un científic excel·lent. En conjunt, amb l'Aida i en Toni, sou per mi part del grup i us he d'agrair bona part de la tesis.

-Chema, Pablo C, Rodri, Xevi, Anna G, Anna LL, Olivier, Laura C, Ricardo, Sandra C, Mar, Rosa A, Rosa S, Esther P, Gemma A, Gemma V, Maribel, Núria, Leif, Roberta, Blanca, Carolina, Esther, Quim, Anna N, Sílvia A, Ona, Lluís, Javier F, Javier C, Mónica, Javier R, Sónia V, Diana, Olaya G, Sónia V, Laura C, Javier C, Raquel, Maite, Maisa, Vicenta, Pablo A, Àngel, Oriol, Ma Àngels, Sergi, Ona, Sónia H, Patrícia, Maria, Pepi, Raul..... I en conjunt tot l'univers ICC-CESIC, amb qui no he pogut compartir tot el temps que m'hagués agradat, però a qui he d'agrair els somriures, ajuts i ànims que m'heu aportat. Pablo C i Chema, amb vosaltres si he pogut compartir més moments científics i alguns més de "coxondeo del bueno" que han desencallat moltes frustracions. Chema, gràcies per les correccions, m'han anat molt i molt bé.

-Iván i Román, gràcies per compartir en parella moments tan divertits i inoblidables. Espero seguir compartint grans moments plegats.

-Albert i Ernest, amics i companys de carrera, gràcies per aguantar tardes i trades de cafè on us confirmava per enèsima vegada que aquell any acabava la tesis.

-Sergio Padilla i Sergio Tejedor, gràcies per ser tan bons amics durant tots aquests anys i espero seguir compartint "for ever" la vostra companyia. Sergio Padilla, a tu especialment té d'agrair tots els moments que has compartit amb mi. No saps fins a quin punt m'has ajudat, ja no només solucionant greus problemes informàtics (per cert, encara et dec una....), si no sobretot escoltant-me sempre que t'he necessitat. Gràcies amic!!!.

-Ascenció, gràcies per tenir una filla tan preciosa i per compartir passejos i caps de setmana tan agradables.

-Bonnie i el Drogui, pares, patrocinadors, amics i confidents. Us dec massa per ser resumit en dues línies. Quantes coses ens han passat, bones i no tan bones, sempre plegats veient créixer aquesta família tan collonuda que porta la vostra signatura. És un plaer dir que sou els meus pares i les persones que

més han cregut amb mi, fins i tot quan no feia més que dormir i jugar al futbol. Quina paciència!!!!...

-Els meus germans, Mónica i Óscar. Amb vosaltres he crescut i descobert el que és compartir i disfrutar de la companyia. Gràcies per donar-me sempre ànims i considerar que el vostre germà petit no és tan totxo com sembla, tot i que es deixes clavar una grapa a la ma de forma accidental!!!!. Gràcies per compartir la vostra vida amb unes parelles de viatge tan fantàstics, en Manel i la Cris. Però sobretot, gràcies per donar vida a les coses més maques i ben parides del món, en Jan, la Laia, la Júlia i l'Ona.

-Nimfa, Zeus, Neptú, Horus, Lopes, Lolita, Pruna, Minnie i Sinatra. Qui ha dit que no es pot parlar amb els animals. Amb ells he tingut les converses més intel·ligents i profitoses de la meua vida. Heu estat els millors amics que podria tenir. Les vostres mirades, llepades, remenades de cua i converses m'han salvat de caure en depressions absurdes tots aquells dies en què res sortia, en què et contestaven per enèsima vegada que no acceptaven un article, en què t'enfadaves per qualsevol tonteria. Gràcies per ser la millor companyia.

-Finalment, la CAMPIONA número 1. Alícia, què he de dir de tu?. Que has tingut una paciència infinita a l'aguantar dia rere dia allò d'aquest any acabo la tesis. Que m'has animat en tot moment i aguantat els atacs de pànic, ira, bogeria, acudits dolents, més acudits dolents...Que no et canses de mi tot i la manca de virtuts. Que la falta de cabell i excés de panxa te'l mires amb un somriure. Que t'has casat amb mi!!!!. Que has aguantat les meves fugides cap el laboratori en caps de setmana i vacances, així com hores i hores d'ordinador. Que m'has fet veure les desgràcies com a portes a altres possibilitats. Per tot això i molt més, et dic un millor de gràcies, petons i pessigolles. T'estimo!!!.

XI. BIBLIOGRAFIA

- 1 Lysaght, M.J. & O'Loughlin, J.A., Demographic scope and economic
magnitude of contemporary organ replacement therapies. *ASAIO J* 46
(5), 515-521 (2000).
- 2 Robert Lanza, R.L., Joseph P. Vacanti, *Principles of tissue engineering*.
(2000).
- 3 Organització Mundial de la Salut, Available at <http://www.oms.org>.
- 4 New York Organ Donor Network, Available at
<http://www.donatelifeny.org/transplant/murray.html>.
- 5 Ogle, B.M. & Platt, J.L., Genetic therapies and xenotransplantation.
Expert Opin Biol Ther 2 (3), 299-310 (2002).
- 6 Treasure, T., Davies, M.K., & Hollman, A., Stamps in cardiology. Artificial
heart. *Heart* 92 (5), 584 (2006).
- 7 Hausmann, H., Siniawski, H., & Hetzer, R., Mitral valve reconstruction
and replacement for ischemic mitral insufficiency: seven years' follow up.
J Heart Valve Dis 8 (5), 536-542 (1999).
- 8 Radcliffe, C.W., The biomechanics of the Canadian-type hip-
disarticulation prosthesis. *Artif Limbs* 4 (2), 29-38 (1957).
- 9 Friedman, R.M., Gyimesi, I., Robinson, J.B., Jr., & Rohrich, R.J., Saline
made viscous with polyethylene glycol: a new alternate breast implant
filler material. *Plast Reconstr Surg* 98 (7), 1208-1213; discussion 1214-
1205 (1996).
- 10 Fox, R.S.a.C.F., Tissue engineering. *Alan R. Liss. New York* (1988).
- 11 Bell, E., Ehrlich, H.P., Buttle, D.J., & Nakatsuji, T., Living tissue formed in
vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*
211 (4486), 1052-1054 (1981).
- 12 Tissue Engineering, Cell Therapy and Transplantation: Products,
Technologies & Market Opportunities, Worldwide, 2009-2018 (2010).
- 13 Langer, R. & Vacanti, J.P., Tissue engineering. *Science* 260 (5110), 920-
926 (1993).
- 14 Strain, A.J. & Neuberger, J.M., A bioartificial liver--state of the art.
Science 295 (5557), 1005-1009 (2002).
- 15 Marcacci, M. *et al.*, Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation:
technical note. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 10 (3), 154-159
(2002).
- 16 Gallico, G.G., 3rd, O'Connor, N.E., Compton, C.C., Kehinde, O., &
Green, H., Permanent coverage of large burn wounds with autologous
cultured human epithelium. *N Engl J Med* 311 (7), 448-451 (1984).
- 17 Horner, P.J. & Gage, F.H., Regenerating the damaged central nervous
system. *Nature* 407 (6807), 963-970 (2000).
- 18 Thomson, J.A. *et al.*, Embryonic stem cell lines derived from human
blastocysts. *Science* 282 (5391), 1145-1147 (1998).
- 19 Laflamme, M.A. & Murry, C.E., Regenerating the heart. *Nat Biotechnol*
23 (7), 845-856 (2005).
- 20 Cowan, C.A. *et al.*, Derivation of embryonic stem-cell lines from human
blastocysts. *N Engl J Med* 350 (13), 1353-1356 (2004).
- 21 Odorico, J.S., Kaufman, D.S., & Thomson, J.A., Multilineage
differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19 (3),
193-204 (2001).

- 22 Vacanti, M.P., Roy, A., Cortiella, J., Bonassar, L., & Vacanti, C.A., Identification and initial characterization of spore-like cells in adult mammals. *J Cell Biochem* 80 (3), 455-460 (2001).
- 23 Zuk, P.A. *et al.*, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7 (2), 211-228 (2001).
- 24 Nakahara, H., Goldberg, V.M., & Caplan, A.I., Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res* 9 (4), 465-476 (1991).
- 25 De Bari, C., Dell'Accio, F., & Luyten, F.P., Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* 44 (1), 85-95 (2001).
- 26 De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., & Luyten, F.P., Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44 (8), 1928-1942 (2001).
- 27 Bosch, P. *et al.*, Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res* 18 (6), 933-944 (2000).
- 28 Young, H.E. *et al.*, Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 264 (1), 51-62 (2001).
- 29 Zvaifler, N.J. *et al.*, Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2 (6), 477-488 (2000).
- 30 Pittenger, M.F. *et al.*, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (5411), 143-147 (1999).
- 31 Noth, U. *et al.*, Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 20 (5), 1060-1069 (2002).
- 32 Osyczka, A.M., Noth, U., Danielson, K.G., & Tuan, R.S., Different osteochondral potential of clonal cell lines derived from adult human trabecular bone. *Ann N Y Acad Sci* 961, 73-77 (2002).
- 33 Caplan, A.I., Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9 (5), 641-650 (1991).
- 34 Caplan, A.I., Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213 (2), 341-347 (2007).
- 35 Parker, A.M. & Katz, A.J., Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert Opin Biol Ther* 6 (6), 567-578 (2006).
- 36 Kokai, L.E., Rubin, J.P., & Marra, K.G., The potential of adipose-derived adult stem cells as a source of neuronal progenitor cells. *Plast Reconstr Surg* 116 (5), 1453-1460 (2005).
- 37 Izadpanah, R. *et al.*, Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 99 (5), 1285-1297 (2006).
- 38 Romanov, Y.A., Darevskaya, A.N., Merzlikina, N.V., & Buravkova, L.B., Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bull Exp Biol Med* 140 (1), 138-143 (2005).
- 39 Zuk, P.A. *et al.*, Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13 (12), 4279-4295 (2002).

- 40 Musina, R.A., Bekchanova, E.S., & Sukhikh, G.T., Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med* 139 (4), 504-509 (2005).
- 41 Rehman, J. *et al.*, Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109 (10), 1292-1298 (2004).
- 42 Shirani, J., Berezowski, K., & Roberts, W.C., Quantitative measurement of normal and excessive (cor adiposum) subepicardial adipose tissue, its clinical significance, and its effect on electrocardiographic QRS voltage. *Am J Cardiol* 76 (5), 414-418 (1995).
- 43 Corradi, D. *et al.*, The ventricular epicardial fat is related to the myocardial mass in normal, ischemic and hypertrophic hearts. *Cardiovasc Pathol* 13 (6), 313-316 (2004).
- 44 Bayes-Genis, A. *et al.*, Human progenitor cells derived from cardiac adipose tissue ameliorate myocardial infarction in rodents. *J Mol Cell Cardiol* 49 (5), 771-780 (2010).
- 45 Mizuno, H., The potential for treatment of skeletal muscle disorders with adipose-derived stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 5 (2), 133-136 (2009).
- 46 Degano, I.R. *et al.*, The effect of self-assembling peptide nanofiber scaffolds on mouse embryonic fibroblast implantation and proliferation. *Biomaterials* 30 (6), 1156-1165 (2009).
- 47 Mazo, M., Gavira, J.J., Pelacho, B., & Prosper, F., Adipose-derived stem cells for myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res* 4 (2), 145-153 (2010).
- 48 Scholz, T., Sumarto, A., Krichevsky, A., & Evans, G.R., Neuronal differentiation of human adipose tissue-derived stem cells for peripheral nerve regeneration in vivo. *Arch Surg* 146 (6), 666-674 (2011).
- 49 Tousoulis, D., Briasoulis, A., Antoniadis, C., Stefanadi, E., & Stefanadis, C., Heart regeneration: what cells to use and how? *Curr Opin Pharmacol* 8 (2), 211-218 (2008).
- 50 Hass, R., Kasper, C., Bohm, S., & Jacobs, R., Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 9, 12 (2011).
- 51 Gang, E.J. *et al.*, Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 22 (4), 617-624 (2004).
- 52 Hu, S.L. *et al.*, Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury after transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Crit Care Med* 38 (11), 2181-2189 (2010).
- 53 Thein-Han, W. & Xu, H.H., Collagen-Calcium Phosphate Cement Scaffolds Seeded with Umbilical Cord Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A* (2011).
- 54 Oh, W., Kim, D.S., Yang, Y.S., & Lee, J.K., Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cell Immunol* 251 (2), 116-123 (2008).
- 55 Wang, M. *et al.*, The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Immunology* 126 (2), 220-232 (2009).

- 56 Hao, L. *et al.*, Human umbilical cord blood-derived stromal cells suppress xenogeneic immune cell response in vitro. *Croat Med J* 50 (4), 351-360 (2009).
- 57 La Rocca, G. *et al.*, Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol* 131 (2), 267-282 (2009).
- 58 Weiss, M.L. *et al.*, Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 24 (3), 781-792 (2006).
- 59 Kress, S., Neumann, A., Weyand, B., & Kasper, C., Stem Cell Differentiation Depending on Different Surfaces. *Adv Biochem Eng Biotechnol* (2011).
- 60 Ratner B., H.A.S., Schoen F.J., Lemons J.E.; , Biomaterials science. An introduction to materials in medicine. *Elsevier academic press* (2004).
- 61 Polak, J. & Hench, L., Gene therapy progress and prospects: in tissue engineering. *Gene Ther* 12 (24), 1725-1733 (2005).
- 62 Lee, C.R., Grodzinsky, A.J., & Spector, M., The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. *Biomaterials* 22 (23), 3145-3154 (2001).
- 63 Schoof, H., Apel, J., Heschel, I., & Rau, G., Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges. *J Biomed Mater Res* 58 (4), 352-357 (2001).
- 64 Tan, W., Krishnaraj, R., & Desai, T.A., Evaluation of nanostructured composite collagen--chitosan matrices for tissue engineering. *Tissue Eng* 7 (2), 203-210 (2001).
- 65 Vercruyse, K.P., Marecak, D.M., Marecek, J.F., & Prestwich, G.D., Synthesis and in vitro degradation of new polyvalent hydrazide cross-linked hydrogels of hyaluronic acid. *Bioconjug Chem* 8 (5), 686-694 (1997).
- 66 Gamini, A. *et al.*, Structural investigations of cross-linked hyaluronan. *Biomaterials* 23 (4), 1161-1167 (2002).
- 67 Miralles, G. *et al.*, Sodium alginate sponges with or without sodium hyaluronate: in vitro engineering of cartilage. *J Biomed Mater Res* 57 (2), 268-278 (2001).
- 68 Park, S.N., Park, J.C., Kim, H.O., Song, M.J., & Suh, H., Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials* 23 (4), 1205-1212 (2002).
- 69 Johnson, F.A., Craig, D.Q., & Mercer, A.D., Characterization of the block structure and molecular weight of sodium alginates. *J Pharm Pharmacol* 49 (7), 639-643 (1997).
- 70 Moller, L. *et al.*, Preparation and evaluation of hydrogel-composites from methacrylated hyaluronic acid, alginate, and gelatin for tissue engineering. *Int J Artif Organs* 34 (2), 93-102 (2011).
- 71 Venkatesan, J. & Kim, S.K., Chitosan composites for bone tissue engineering--an overview. *Mar Drugs* 8 (8), 2252-2266 (2010).
- 72 Ray, S.D., Potential aspects of chitosan as pharmaceutical excipient. *Acta Pol Pharm* 68 (5), 619-622 (2011).

- 73 Chenite, A. *et al.*, Novel injectable neutral solutions of chitosan form
biodegradable gels in situ. *Biomaterials* 21 (21), 2155-2161 (2000).
- 74 Suh, J.K. & Matthew, H.W., Application of chitosan-based polysaccharide
biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 21
75 (24), 2589-2598 (2000).
- 76 Kean, T. & Thanou, M., Biodegradation, biodistribution and toxicity of
chitosan. *Adv Drug Deliv Rev* 62 (1), 3-11 (2009).
- 77 Valbonesi, M., Fibrin glues of human origin. *Best Pract Res Clin
Haematol* 19 (1), 191-203 (2006).
- 78 Albala, D.M., Fibrin sealants in clinical practice. *Cardiovasc Surg* 11
Suppl 1, 5-11 (2003).
- 79 MacGillivray, T.E., Fibrin sealants and glues. *J Card Surg* 18 (6), 480-
485 (2003).
- 80 Kulkarni, R.K., Moore, E.G., Hegyeli, A.F., & Leonard, F., Biodegradable
poly(lactic acid) polymers. *J Biomed Mater Res* 5 (3), 169-181 (1971).
- 81 Herrmann, J.B., Kelly, R.J., & Higgins, G.A., Polyglycolic acid sutures.
Laboratory and clinical evaluation of a new absorbable suture material.
Arch Surg 100 (4), 486-490 (1970).
- 82 Langer, R., 1994 Whitaker Lecture: polymers for drug delivery and tissue
engineering. *Ann Biomed Eng* 23 (2), 101-111 (1995).
- 83 Levowitz, B.S. *et al.*, Biologic compatibility and applications of hydropolymer.
Trans Am Soc Artif Intern Organs 14, 82-88 (1968).
- 84 Freed, L.E. *et al.*, Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells
cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 27
(1), 11-23 (1993).
- 85 Karageorgiou, V. & Kaplan, D., Porosity of 3D biomaterial scaffolds and
osteogenesis. *Biomaterials* 26 (27), 5474-5491 (2005).
- 86 He, X. & Jabbari, E., Material properties and cytocompatibility of
injectable MMP degradable poly(lactide ethylene oxide fumarate)
hydrogel as a carrier for marrow stromal cells. *Biomacromolecules* 8 (3),
780-792 (2007).
- 87 Leker, R.R., Lasri, V., & Chernoguz, D., Growth factors improve
neurogenesis and outcome after focal cerebral ischemia. *J Neural
Transm* 116 (11), 1397-1402 (2009).
- 88 Farge, E., Mechanotransduction in development. *Curr Top Dev Biol* 95,
243-265 (2011).
- 89 Reyes, R. *et al.*, Effect of triple growth factor controlled delivery by a
brushite-PLGA system on a bone defect. *Injury* (2011).
- 90 Ertan, A.B. *et al.*, Effect of double growth factor release on cartilage
tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* (2010).
- 91 de la Puente, P. *et al.*, Autologous fibrin scaffolds cultured dermal
fibroblasts and enriched with encapsulated bFGF for tissue engineering.
J Biomed Mater Res A 99 (4), 648-654 (2011).
- 92 Hu, X., Cai, J., Yang, J., & Smith, G.M., Sensory axon targeting is
increased by NGF gene therapy within the lesioned adult femoral nerve.
Exp Neurol 223 (1), 153-165 (2009).
- 93 Li, S., Guan, J.L., & Chien, S., Biochemistry and biomechanics of cell
motility. *Annu Rev Biomed Eng* 7, 105-150 (2005).
- 94 Li, Q., Muragaki, Y., Ueno, H., & Ooshima, A., Stretch-induced
proliferation of cultured vascular smooth muscle cells and a possible

- involvement of local renin-angiotensin system and platelet-derived growth factor (PDGF). *Hypertens Res* 20 (3), 217-223 (1997).
- 94 Riha, G.M., Lin, P.H., Lumsden, A.B., Yao, Q., & Chen, C., Roles of hemodynamic forces in vascular cell differentiation. *Ann Biomed Eng* 33 (6), 772-779 (2005).
- 95 Chicurel, M.E., Chen, C.S., & Ingber, D.E., Cellular control lies in the balance of forces. *Curr Opin Cell Biol* 10 (2), 232-239 (1998).
- 96 Sawada, Y. & Sheetz, M.P., Force transduction by Triton cytoskeletons. *J Cell Biol* 156 (4), 609-615 (2002).
- 97 Cao, F. *et al.*, In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation* 113 (7), 1005-1014 (2006).
- 98 Danino, T., Volfson, D., Bhatia, S.N., Tsimring, L., & Hasty, J., In-silico patterning of vascular mesenchymal cells in three dimensions. *PLoS One* 6 (5), e20182.
- 99 Blasberg, R.G., In vivo molecular-genetic imaging: multi-modality nuclear and optical combinations. *Nucl Med Biol* 30 (8), 879-888 (2003).
- 100 Tress, B.M. & Brant-Zawadski, M., Nuclear magnetic resonance imaging. Basic principles. *Med J Aust* 142 (1), 21-24 (1985).
- 101 Yamamoto, Y.L., Thompson, C.J., Diksic, M., Meyer, E., & Feindel, W.H., Positron emission tomography. *Neurosurg Rev* 7 (4), 233-252 (1984).
- 102 Gyongyosi, M. *et al.*, Serial noninvasive in vivo positron emission tomographic tracking of percutaneously intramyocardially injected autologous porcine mesenchymal stem cells modified for transgene reporter gene expression. *Circ Cardiovasc Imaging* 1 (2), 94-103 (2008).
- 103 Jankowski, A. & Ferretti, G., [Volumetric computed tomography: Principles, parameters]. *Rev Mal Respir* 27 (8), 964-969 (2010).
- 104 Wells, P.N., Ultrasound imaging. *Phys Med Biol* 51 (13), R83-98 (2006).
- 105 Massoud, T.F. & Gambhir, S.S., Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 17 (5), 545-580 (2003).
- 106 Heim, R., Cubitt, A.B., & Tsien, R.Y., Improved green fluorescence. *Nature* 373 (6516), 663-664 (1995).
- 107 Campbell, R.E. *et al.*, A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (12), 7877-7882 (2002).
- 108 Goulding, A., Shrestha, S., Dria, K., Hunt, E., & Deo, S.K., Red fluorescent protein variants with incorporated non-natural amino acid analogues. *Protein Eng Des Sel* 21 (2), 101-106 (2008).
- 109 Jach, G., Pesch, M., Richter, K., Frings, S., & Uhrig, J.F., An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. *Nat Methods* 3 (8), 597-600 (2006).
- 110 Shaner, N.C., Patterson, G.H., & Davidson, M.W., Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* 120 (Pt 24), 4247-4260 (2007).
- 111 Shah, K., Jacobs, A., Breakefield, X.O., & Weissleder, R., Molecular imaging of gene therapy for cancer. *Gene Ther* 11 (15), 1175-1187 (2004).
- 112 Wu, J.C., Sundaresan, G., Iyer, M., & Gambhir, S.S., Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther* 4 (4), 297-306 (2001).

- 113 Ugurlucan, M., Yerebakan, C., Furlani, D., Ma, N., & Steinhoff, G., Cell sources for cardiovascular tissue regeneration and engineering. *Thorac Cardiovasc Surg* 57 (2), 63-73 (2009).
- 114 Bhaumik, S. & Gambhir, S.S., Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (1), 377-382 (2002).
- 115 Loening, A.M., Wu, A.M., & Gambhir, S.S., Red-shifted Renilla reniformis luciferase variants for imaging in living subjects. *Nat Methods* 4 (8), 641-643 (2007).
- 116 Vilalta, M. *et al.*, Dual luciferase labelling for non-invasive bioluminescence imaging of mesenchymal stromal cell chondrogenic differentiation in demineralized bone matrix scaffolds. *Biomaterials* 30 (28), 4986-4995 (2009).
- 117 Rome, C., Couillaud, F., & Moonen, C.T., Gene expression and gene therapy imaging. *Eur Radiol* 17 (2), 305-319 (2007).
- 118 Honigman, A. *et al.*, Imaging transgene expression in live animals. *Mol Ther* 4 (3), 239-249 (2001).
- 119 Blaese, M. *et al.*, Vectors in cancer therapy: how will they deliver? *Cancer Gene Ther* 2 (4), 291-297 (1995).
- 120 Kaji, E.H. & Leiden, J.M., Gene and stem cell therapies. *JAMA* 285 (5), 545-550 (2001).
- 121 Wolff, J.A. *et al.*, Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247 (4949 Pt 1), 1465-1468 (1990).
- 122 Hickman, M.A. *et al.*, Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum Gene Ther* 5 (12), 1477-1483 (1994).
- 123 Choate, K.A. & Khavari, P.A., Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease. *Hum Gene Ther* 8 (14), 1659-1665 (1997).
- 124 Liu, D., Ren, T., & Gao, X., Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem* 10 (14), 1307-1315 (2003).
- 125 Neu, M., Fischer, D., & Kissel, T., Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med* 7 (8), 992-1009 (2005).
- 126 Gao, X., Kim, K.S., & Liu, D., Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J* 9 (1), E92-104 (2007).
- 127 Liu, Q. *et al.*, The role of capsid-endothelial interactions in the innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 14 (7), 627-643 (2003).
- 128 Xiao, X., Li, J., & Samulski, R.J., Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72 (3), 2224-2232 (1998).
- 129 Winther, J.F. *et al.*, [Cancer in siblings of children with cancer]. *Ugeskr Laeger* 164 (23), 3073-3079 (2002).
- 130 Sinn, P.L. *et al.*, Gene transfer to respiratory epithelia with lentivirus pseudotyped with Jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein. *Hum Gene Ther* 16 (4), 479-488 (2005).
- 131 Lewis, P.F. & Emerman, M., Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 68 (1), 510-516 (1994).

- 132 Naldini, L. *et al.*, In vivo gene delivery and stable transduction of
nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272 (5259), 263-267
(1996).
- 133 Coffin John M, H.S.H., Varmus Harold E Retroviruses, edited by Cold
Spring Harbor Laboratory Press (1997).
- 134 Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., & Trono, D., Multiply
attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat*
Biotechnol 15 (9), 871-875 (1997).
- 135 Dull, T. *et al.*, A third-generation lentivirus vector with a conditional
packaging system. *J Virol* 72 (11), 8463-8471 (1998).
- 136 Zufferey, R. *et al.*, Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient
in vivo gene delivery. *J Virol* 72 (12), 9873-9880 (1998).
- 137 Salmon, P. *et al.*, Reversible immortalization of human primary cells by
lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol Ther* 2 (4), 404-414
(2000).
- 138 Salmon, P. *et al.*, High-level transgene expression in human
hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after
transduction with improved lentiviral vectors. *Blood* 96 (10), 3392-3398
(2000).
- 139 Mitta, B. *et al.*, Advanced modular self-inactivating lentiviral expression
vectors for multigene interventions in mammalian cells and in vivo
transduction. *Nucleic Acids Res* 30 (21), e113 (2002).
- 140 Mitta, B., Weber, C.C., Rimann, M., & Fussenegger, M., Design and in
vivo characterization of self-inactivating human and non-human lentiviral
expression vectors engineered for streptogramin-adjustable transgene
expression. *Nucleic Acids Res* 32 (12), e106 (2004).
- 141 Iwakuma, T., Cui, Y., & Chang, L.J., Self-inactivating lentiviral vectors
with U3 and U5 modifications. *Virology* 261 (1), 120-132 (1999).
- 142 Naldini, L., Blomer, U., Gage, F.H., Trono, D., & Verma, I.M., Efficient
transfer, integration, and sustained long-term expression of the
transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl*
Acad Sci U S A 93 (21), 11382-11388 (1996).
- 143 Martinez-Estrada, O.M., Munoz-Santos, Y., Julve, J., Reina, M., & Vilaro,
S., Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of
differentiation and expansion. *Cardiovasc Res* 65 (2), 328-333 (2005).
- 144 Kogler, G. *et al.*, A new human somatic stem cell from placental cord
blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200
(2), 123-135 (2004).
- 145 Trevisiol, C.H. *et al.*, Impaired osteoinduction in a rat model for chronic
alcohol abuse. *Bone* 41 (2), 175-180 (2007).
- 146 Phillips, B.W., Belmonte, N., Vernochet, C., Ailhaud, G., & Dani, C.,
Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells.
Biochem Biophys Res Commun 284 (2), 478-484 (2001).
- 147 Liu, J.W. *et al.*, Characterization of endothelial-like cells derived from
human mesenchymal stem cells. *J Thromb Haemost* 5 (4), 826-834
(2007).
- 148 Heydarkhan-Hagvall, S. *et al.*, Human adipose stem cells: a potential cell
source for cardiovascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs* 187
(4), 263-274 (2008).

- 149 Levenberg, S., Golub, J.S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., & Langer, R.,
Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl
Acad Sci U S A* 99 (7), 4391-4396 (2002).
- 150 Lin, G., Finger, E., & Gutierrez-Ramos, J.C., Expression of CD34 in
endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and
adult mouse tissues. *Eur J Immunol* 25 (6), 1508-1516 (1995).
- 151 Primo, L. *et al.*, Identification of CD36 molecular features required for its
in vitro angiostatic activity. *FASEB J* 19 (12), 1713-1715 (2005).
- 152 van Buul, J.D., Kanters, E., & Hordijk, P.L., Endothelial signaling by Ig-
like cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (9), 1870-
1876 (2007).
- 153 Carmeliet, P. & Collen, D., Molecular basis of angiogenesis. Role of
VEGF and VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci* 902, 249-262; discussion
262-244 (2000).
- 154 de Groot, P.G. *et al.*, von Willebrand factor synthesized by endothelial
cells from a patient with type IIB von Willebrand disease supports platelet
adhesion normally but has an increased affinity for platelets. *Proc Natl
Acad Sci U S A* 86 (10), 3793-3797 (1989).
- 155 Smadja, D.M. *et al.*, Increased VEGFR2 expression during human late
endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis
with up-regulation of integrin alpha(6). *J Cell Mol Med* 11 (5), 1149-1161
(2007).
- 156 DeLisser, H.M., Newman, P.J., & Albelda, S.M., Molecular and functional
aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 15 (10), 490-495 (1994).
- 157 Liu, D., Jia, H., Holmes, D.I., Stannard, A., & Zachary, I., Vascular
endothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells:
KDR-mediated induction of Egr3 and the related nuclear receptors
Nur77, Nurr1, and Nor1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (11), 2002-
2007 (2003).
- 158 Diehl, S. *et al.*, Altered expression patterns of EphrinB2 and EphB2 in
human umbilical vessels and congenital venous malformations. *Pediatr
Res* 57 (4), 537-544 (2005).
- 159 Vouret-Craviari, V., Boulter, E., Grall, D., Matthews, C., & Van
Obberghen-Schilling, E., ILK is required for the assembly of matrix-
forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells. *J
Cell Sci* 117 (Pt 19), 4559-4569 (2004).
- 160 Kanda, S., Mochizuki, Y., & Kanetake, H., Stromal cell-derived factor-
1alpha induces tube-like structure formation of endothelial cells through
phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 278 (1), 257-262 (2003).
- 161 Voyta, J.C., Via, D.P., Butterfield, C.E., & Zetter, B.R., Identification and
isolation of endothelial cells based on their increased uptake of
acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99 (6), 2034-2040 (1984).
- 162 Yeung, F. *et al.*, Regulation of human osteocalcin promoter in hormone-
independent human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277 (4), 2468-
2476 (2002).
- 163 Razorenova, O.V., Ivanov, A.V., Budanov, A.V., & Chumakov, P.M.,
Virus-based reporter systems for monitoring transcriptional activity of
hypoxia-inducible factor 1. *Gene* 350 (1), 89-98 (2005).

- 164 Gallo, P. *et al.*, A lentiviral vector with a short troponin-I promoter for tracking cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Gene Ther* 15 (3), 161-170 (2008).
- 165 Ray, P., De, A., Min, J.J., Tsien, R.Y., & Gambhir, S.S., Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. *Cancer Res* 64 (4), 1323-1330 (2004).
- 166 Becerra, J., Andrades, J.A., Ertl, D.C., Sorgente, N., & Nimni, M.E., Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: effect of age of cell donor. *J Bone Miner Res* 11 (11), 1703-1714 (1996).
- 167 Nimni, M.E. *et al.*, Ectopic bone formation is enhanced in senescent animals implanted with embryonic cells. *Clin Orthop Relat Res* (234), 255-266 (1988).
- 168 Pfeffer, M.A. *et al.*, Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44 (4), 503-512 (1979).
- 169 Michael, L.H. *et al.*, Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 269 (6 Pt 2), H2147-2154 (1995).
- 170 Fishbein, M.C., Maclean, D., & Maroko, P.R., Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 90 (1), 57-70 (1978).
- 171 Fishbein, M.C., Maclean, D., & Maroko, P.R., The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest* 73 (6), 843-849 (1978).
- 172 Litwin, S.E., Katz, S.E., Morgan, J.P., & Douglas, P.S., Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation* 89 (1), 345-354 (1994).
- 173 Augustin-Voss, H.G., Smith, C.A., & Lewis, R.M., Phenotypic characterization of normal and neoplastic canine endothelial cells by lectin histochemistry. *Vet Pathol* 27 (2), 103-109 (1990).
- 174 Asahara, T. *et al.*, Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 91 (11), 2793-2801 (1995).
- 175 Bryson, J.L., Coles, M.C., & Manley, N.R., A method for labeling vasculature in embryonic mice. *J Vis Exp* (56) (2011).
- 176 Thoma, D.S. *et al.*, Angiogenic activity of an enamel matrix derivative (EMD) and EMD-derived proteins: an experimental study in mice. *J Clin Periodontol* 38 (3), 253-260 (2011).
- 177 Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4), 402-408 (2001).
- 178 Hamdi, H. *et al.*, Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition? A head-to-head comparison. *Ann Thorac Surg* 87 (4), 1196-1203 (2009).
- 179 Bai, X. & Alt, E., Myocardial regeneration potential of adipose tissue-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 401 (3), 321-326 (2010).
- 180 Hankenson, K.D., Dishowitz, M., Gray, C., & Schenker, M., Angiogenesis in bone regeneration. *Injury* 42 (6), 556-561 (2011).
- 181 Tomanek, R.J. & Schatteman, G.C., Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *Anat Rec* 261 (3), 126-135 (2000).

- 182 Nessa, A. *et al.*, Angiogenesis-a novel therapeutic approach for ischemic
heart disease. *Mymensingh Med J* 18 (2), 264-272 (2009).
- 183 Tissue Engineering, Cell Therapy and Transplantation: Products,
Technologies & Market Opportunities, Worldwide, 2009-2018, Available
at <http://www.mediligence.com/rpt/rpt-s520.htm>, (2010).
- 184 European research animal use holds steady Available at
http://www.nature.com/news/2010/101007/full/news.2010.524.html?s=news_rss, (2010).
- 185 Kuhbier, J.W. *et al.*, [Stem cells from fatty tissue : A new resource for
regenerative medicine?]. *Chirurg* 81 (9), 826-832 (2010).
- 186 Hoke, N.N., Salloum, F.N., Loesser-Casey, K.E., & Kukreja, R.C.,
Cardiac regenerative potential of adipose tissue-derived stem cells. *Acta
Physiol Hung* 96 (3), 251-265 (2009).
- 187 Simpson, D., Liu, H., Fan, T.H., Nerem, R., & Dudley, S.C., Jr., A tissue
engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell
engraftment and improved myocardial remodeling. *Stem Cells* 25 (9),
2350-2357 (2007).
- 188 Giraud, M.N. *et al.*, Hydrogel-based engineered skeletal muscle grafts
normalize heart function early after myocardial infarction. *Artif Organs* 32
(9), 692-700 (2008).
- 189 Uemura, R., Xu, M., Ahmad, N., & Ashraf, M., Bone marrow stem cells
prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine
signaling. *Circ Res* 98 (11), 1414-1421 (2006).
- 190 Beltrami, A.P. *et al.*, Adult cardiac stem cells are multipotent and support
myocardial regeneration. *Cell* 114 (6), 763-776 (2003).
- 191 Mazo, M. *et al.*, Transplantation of adipose derived stromal cells is
associated with functional improvement in a rat model of chronic
myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 10 (5), 454-462 (2008).
- 192 Thiagarajan, P., Rippon, A.J., & Farrell, D.H., Alternative adhesion sites
in human fibrinogen for vascular endothelial cells. *Biochemistry* 35 (13),
4169-4175 (1996).
- 193 Vailhe, B., Ronot, X., Tracqui, P., Usson, Y., & Tranqui, L., In vitro
angiogenesis is modulated by the mechanical properties of fibrin gels
and is related to alpha(v)beta3 integrin localization. *In Vitro Cell Dev Biol
Anim* 33 (10), 763-773 (1997).
- 194 Thompson, W.D. *et al.*, Angiogenic activity of fibrin degradation products
is located in fibrin fragment E. *J Pathol* 168 (1), 47-53 (1992).
- 195 Bootle-Wilbraham, C.A., Tazzyman, S., Thompson, W.D., Stirk, C.M., &
Lewis, C.E., Fibrin fragment E stimulates the proliferation, migration and
differentiation of human microvascular endothelial cells in vitro.
Angiogenesis 4 (4), 269-275 (2001).
- 196 Dvorak, H.F. *et al.*, Fibrin containing gels induce angiogenesis.
Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest*
57 (6), 673-686 (1987).
- 197 Sahni, A., Odrliin, T., & Francis, C.W., Binding of basic fibroblast growth
factor to fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem* 273 (13), 7554-7559 (1998).
- 198 Harrison, P. & Cramer, E.M., Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 7 (1),
52-62 (1993).

- 199 Roura, S. *et al.*, Exposure to cardiomyogenic stimuli fails to transdifferentiate human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Basic Res Cardiol* 105 (3), 419-430 (2010).
- 200 Manca, M.F. *et al.*, Characterization of mesenchymal stromal cells derived from full-term umbilical cord blood. *Cytotherapy* 10 (1), 54-68 (2008).
- 201 Byeon, Y.E. *et al.*, Paracrine effect of canine allogenic umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells mixed with beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in ectopic implantations. *Cytotherapy* 12 (5), 626-636 (2010).
- 202 Jaffe, E.A., Hoyer, L.W., & Nachman, R.L., Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 52 (11), 2757-2764 (1973).
- 203 Nachman, R.L., Jaffe, E.A., & Weksler, B.B., Immunoinhibition of ristocetin-induced platelet aggregation. *J Clin Invest* 59 (1), 143-148 (1977).
- 204 Sadler, J.E., Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 67, 395-424 (1998).
- 205 Cheresh, D.A., Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (18), 6471-6475 (1987).
- 206 Gangenahalli, G.U. *et al.*, Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing. *Stem Cells Dev* 15 (3), 305-313 (2006).
- 207 Healy, L. *et al.*, The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (26), 12240-12244 (1995).
- 208 Fina, L. *et al.*, Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75 (12), 2417-2426 (1990).
- 209 Satterthwaite, A.B., Burn, T.C., Le Beau, M.M., & Tenen, D.G., Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics* 12 (4), 788-794 (1992).
- 210 Uchida, N. *et al.*, The characterization, molecular cloning, and expression of a novel hematopoietic cell antigen from CD34+ human bone marrow cells. *Blood* 89 (8), 2706-2716 (1997).
- 211 DeLisser, H.M. *et al.*, Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 151 (3), 671-677 (1997).
- 212 Newman, P.J., The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 99 (1), 3-8 (1997).
- 213 Li, R. *et al.*, A peptide from ICAM-2 binds to the leukocyte integrin CD11a/CD18 and inhibits endothelial cell adhesion. *J Biol Chem* 268 (23), 17513-17518 (1993).
- 214 Tandon, N.N., Kralisz, U., & Jamieson, G.A., Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem* 264 (13), 7576-7583 (1989).
- 215 Nicholson, A.C., Frieda, S., Pearce, A., & Silverstein, R.L., Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 (2), 269-275 (1995).

- 216 Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Suarez, Y., Lasuncion, M.A., & Vega,
M.A., Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins
HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res* 39 (4), 777-788 (1998).
- 217 Hajri, T., Han, X.X., Bonen, A., & Abumrad, N.A., Defective fatty acid
uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to
diet in CD36-null mice. *J Clin Invest* 109 (10), 1381-1389 (2002).
- 218 Pravenec, M. *et al.*, Transgenic expression of CD36 in the spontaneously
hypertensive rat is associated with amelioration of metabolic
disturbances but has no effect on hypertension. *Physiol Res* 52 (6), 681-
688 (2003).
- 219 Febbraio, M. *et al.*, Targeted disruption of the class B scavenger receptor
CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin
Invest* 105 (8), 1049-1056 (2000).
- 220 Bleul, C.C., Fuhlbrigge, R.C., Casasnovas, J.M., Aiuti, A., & Springer,
T.A., A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-
derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184 (3), 1101-1109 (1996).
- 221 Watt, S.M. & Forde, S.P., The central role of the chemokine receptor,
CXCR4, in haemopoietic stem cell transplantation: will CXCR4
antagonists contribute to the treatment of blood disorders? *Vox Sang* 94
(1), 18-32 (2008).
- 222 Zheng, H., Fu, G., Dai, T., & Huang, H., Migration of endothelial
progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4
via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J Cardiovasc
Pharmacol* 50 (3), 274-280 (2007).
- 223 Kohn, S., Nagy, J.A., Dvorak, H.F., & Dvorak, A.M., Pathways of
macromolecular tracer transport across venules and small veins.
Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab
Invest* 67 (5), 596-607 (1992).
- 224 Pepper, M.S., Ferrara, N., Orci, L., & Montesano, R., Vascular
endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and
plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells.
Biochem Biophys Res Commun 181 (2), 902-906 (1991).
- 225 Gerber, H.P. *et al.*, VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling,
ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat
Med* 5 (6), 623-628 (1999).
- 226 Dimmeler, S., Dernbach, E., & Zeiher, A.M., Phosphorylation of the
endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-
induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 477 (3), 258-262 (2000).
- 227 Wang, H.U., Chen, Z.F., & Anderson, D.J., Molecular distinction and
angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by
ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93 (5), 741-753 (1998).
- 228 Holder, N. & Klein, R., Eph receptors and ephrins: effectors of
morphogenesis. *Development* 126 (10), 2033-2044 (1999).
- 229 Ratcliffe, P.J., From erythropoietin to oxygen: hypoxia-inducible factor
hydroxylases and the hypoxia signal pathway. *Blood Purif* 20 (5), 445-
450 (2002).
- 230 Brivanlou, A.H. & Darnell, J.E., Jr., Signal transduction and the control of
gene expression. *Science* 295 (5556), 813-818 (2002).

- 231 Heikinheimo, M., Scandrett, J.M., & Wilson, D.B., Localization of
transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in
cardiac development. *Dev Biol* 164 (2), 361-373 (1994).
- 232 Arceci, R.J., King, A.A., Simon, M.C., Orkin, S.H., & Wilson, D.B., Mouse
GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor
expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 13
(4), 2235-2246 (1993).
- 233 Di Lisi, R. *et al.*, Combinatorial cis-acting elements control tissue-specific
activation of the cardiac troponin I gene in vitro and in vivo. *J Biol Chem*
273 (39), 25371-25380 (1998).
- 234 He, Q., Mendez, M., & LaPointe, M.C., Regulation of the human brain
natriuretic peptide gene by GATA-4. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283
(1), E50-57 (2002).
- 235 Oka, T. *et al.*, Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement
for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ Res* 98 (6),
837-845 (2006).
- 236 Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkela, R., & Ruskoaho, H., GATA
transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res*
63 (2), 196-207 (2004).
- 237 Lints, T.J., Parsons, L.M., Hartley, L., Lyons, I., & Harvey, R.P., Nkx-2.5:
a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells
and their myogenic descendants. *Development* 119 (3), 969 (1993).
- 238 Molkenin, J.D., The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -
5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene
expression. *J Biol Chem* 275 (50), 38949-38952 (2000).
- 239 Heineke, J. *et al.*, Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-
responsive regulator of angiogenesis in the murine heart. *J Clin Invest*
117 (11), 3198-3210 (2007).
- 240 Kasahara, H., Bartunkova, S., Schinke, M., Tanaka, M., & Izumo, S.,
Cardiac and extracardiac expression of Csx/Nkx2.5 homeodomain
protein. *Circ Res* 82 (9), 936-946 (1998).
- 241 Stanley, E.G. *et al.*, Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor
cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene Nkx2-5.
Int J Dev Biol 46 (4), 431-439 (2002).
- 242 Kasahara, H. *et al.*, Nkx2.5 homeoprotein regulates expression of gap
junction protein connexin 43 and sarcomere organization in postnatal
cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 35 (3), 243-256 (2003).
- 243 Teunissen, B.E. *et al.*, Analysis of the rat connexin 43 proximal promoter
in neonatal cardiomyocytes. *Gene* 322, 123-136 (2003).
- 244 Oka, T., Xu, J., & Molkenin, J.D., Re-employment of developmental
transcription factors in adult heart disease. *Semin Cell Dev Biol* 18 (1),
117-131 (2007).
- 245 Toko, H. *et al.*, Csx/Nkx2-5 is required for homeostasis and survival of
cardiac myocytes in the adult heart. *J Biol Chem* 277 (27), 24735-24743
(2002).
- 246 Takeuchi, J.K. *et al.*, Tbx5 specifies the left/right ventricles and
ventricular septum position during cardiogenesis. *Development* 130 (24),
5953-5964 (2003).
- 247 Horb, M.E. & Thomsen, G.H., Tbx5 is essential for heart development.
Development 126 (8), 1739-1751 (1999).

- 248 Hiroi, Y. *et al.*, Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes
cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* 28 (3), 276-280 (2001).
- 249 Hatcher, C.J., Diman, N.Y., McDermott, D.A., & Basson, C.T.,
Transcription factor cascades in congenital heart malformation. *Trends*
250 *Mol Med* 9 (12), 512-515 (2003).
- 250 Young, P., Ferguson, C., Banuelos, S., & Gautel, M., Molecular structure
of the sarcomeric Z-disk: two types of titin interactions lead to an
asymmetrical sorting of alpha-actinin. *EMBO J* 17 (6), 1614-1624 (1998).
- 251 Luther, P.K., Three-dimensional reconstruction of a simple Z-band in fish
muscle. *J Cell Biol* 113 (5), 1043-1055 (1991).
- 252 Barbato, J.C., Huang, Q.Q., Hossain, M.M., Bond, M., & Jin, J.P.,
Proteolytic N-terminal truncation of cardiac troponin I enhances
ventricular diastolic function. *J Biol Chem* 280 (8), 6602-6609 (2005).
- 253 Baker, D.L., Dave, V., Reed, T., Misra, S., & Periasamy, M., A novel E
box/AT-rich element is required for muscle-specific expression of the
sarcolemmal Ca²⁺-ATPase (SERCA2) gene. *Nucleic Acids*
254 *Res* 26 (4), 1092-1098 (1998).
- 254 Arai, M., Otsu, K., MacLennan, D.H., & Periasamy, M., Regulation of
sarcolemmal gene expression during cardiac and skeletal
muscle development. *Am J Physiol* 262 (3 Pt 1), C614-620 (1992).
- 255 Genteski-Hamblin, A.M., Greeb, J., & Shull, G.E., A novel Ca²⁺ pump
expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative
transcript of the slow-twitch muscle sarcolemmal Ca-ATPase
gene. Identification of cDNAs encoding Ca²⁺ and other cation-
transporting ATPases using an oligonucleotide probe derived from the
ATP-binding site. *J Biol Chem* 263 (29), 15032-15040 (1988).
- 256 Lytton, J., Zarain-Herzberg, A., Periasamy, M., & MacLennan, D.H.,
Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic
reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* 264 (12), 7059-7065 (1989).
- 257 Presley, C.A. *et al.*, Bone marrow connexin-43 expression is critical for
hematopoietic regeneration after chemotherapy. *Cell Commun Adhes* 12
258 (5-6), 307-317 (2005).
- 258 Fromaget, C., el Aoumari, A., & Gros, D., Distribution pattern of connexin
43, a gap junctional protein, during the differentiation of mouse heart
myocytes. *Differentiation* 51 (1), 9-20 (1992).
- 259 Bi, W., Drake, C.J., & Schwarz, J.J., The transcription factor MEF2C-null
mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac
expression of angiopoietin 1 and VEGF. *Dev Biol* 211 (2), 255-267
(1999).
- 260 Lee, N.K. *et al.*, Endocrine regulation of energy metabolism by the
skeleton. *Cell* 130 (3), 456-469 (2007).
- 261 Semenza, G.L. *et al.*, Hypoxia response elements in the aldolase A,
enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain
essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271
262 (51), 32529-32537 (1996).
- 262 Li, H., Ko, H.P., & Whitlock, J.P., Induction of phosphoglycerate kinase 1
gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J Biol Chem*
271 (35), 21262-21267 (1996).

