Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica

Nuevas estrategias de mejora de la migración de los cardiomesoangioblastos

Papel de las citoquinas, moléculas de adhesión y ultrasonidos pulsados de baja intensidad

Tesis Doctoral
Aurora Bernal Mera

Madrid, 2015

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Nuevas estrategias de mejora de la migración de los cardiomesoangioblastos

Papel de las citoquinas, moléculas de adhesión y ultrasonidos pulsados de baja intensidad

Tesis Doctoral

Aurora Bernal Mera
Licenciada en Biología

Director:
Dra. Beatriz González Gálvez

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares – CNIC
Instituto de Salud Carlos III – ISCIII
Madrid, 2015

Doña **Beatriz González Gálvez**, investigadora principal en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), del Instituto de Salud Carlos III de Madrid, CERTIFICA que:

doña **Aurora Bernal Mera**, licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "**NUEVAS ESTRATEGIAS DE MEJORA DE LA MIGRACIÓN DE LOS CARDIOMESOANGIOBLASTOS. PAPEL DE LAS CITOQUINAS, MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y ULTRASONIDOS PULSADOS DE BAJA INTENSIDAD"**

y considera que el trabajo realizado reúne todas las condiciones requeridas, así como la originalidad y calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firma la presente en Madrid, a 18 de Febrero del 2015.

Vº Bº del Director de la Tesis

Fdo: Beatriz González Gálvez
Directora de la Tesis Doctoral

A mis padres,
que me enseñaron a ser libre.

Y a Bubú,
que creció conmigo.

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Estos años han estado llenos de ciencia, de aventuras y de todos aquellos que han venido conmigo en la mochila, y han hecho, de alguna manera, posible este viaje. Ha sido todo un placer compartir este camino con todos ellos.

En primer lugar, me gustaría agradecerle a Bea toda su confianza. Sin ella este proyecto no podría haberse llevado a cabo. Su tiempo, su dedicación, su paciencia, su sabiduría, su entrega, su rigor, su dignidad, me han enseñado todo lo que sé hasta hoy. Cada gesto, cada razonamiento, cada idea, cada decisión, me han permitido ir más allá y aprender de cada momento. Ha sido un placer trabajar juntas durante estos cinco años. A ella, que me vio llegar como una cría, y me ve hoy ante este proyecto que hemos hecho realidad juntas, le agradezco todo lo que me ha enseñado y, sobretodo, le agradezco que confiara en mí.

He de darle las gracias también a Bea por crear esa pequeña familia de las Bea's Girls, formada por aquellas que hemos convivido juntas estos años. Nuria me dio la mano cuando llegué, me enseñó cómo hacer todo lo que sé hacer ahora, me dedicó horas y horas sin fin y me regaló su confianza. Juntas hemos compartido momentos especiales en nuestras vidas y se ha convertido en esa hermana mayor que no tengo. Laura y yo hemos crecido juntas en el laboratorio. Hemos trabajado mano a mano hasta emborracharnos de cansancio, hemos sufrido juntas de desesperación, hemos llorado de alegría y nos hemos reído juntas un millón de veces. Y Beita, la pequeñita del grupo, llenó todo de frescura e ilusión cuando llegó. Su madurez, sus ideas y sus ganas de aprender han venido conmigo durante todo este tiempo. No sé si ellas imaginan todo lo que hemos aprendido unas de otras, pero es, sin duda, una inmensidad. Gracias a las Bea's Girls por su apoyo, sus consejos y su ayuda infinita, y por formar parte de esto, allá dónde estemos. Ha sido un placer vivir estos años con ellas.

A mi lado, desde que llegué al laboratorio ha habido siempre un par de columnas que lo sustentaban todo, como un templo griego, María y Fran. A Mery quiero darle las gracias por haberme hecho sentir siempre especial, por contar siempre conmigo, por enseñarme el lado bueno de las cosas, por sus consejos, por secar mis lágrimas y por reír, cantar y bailar conmigo como si cada noche fuera la última. A Flan le agradezco que haya estado siempre ahí y todas las veces que nos hemos reído juntos; sus ánimos, sus sonrisas en cualquier momento, su capacidad de hacer todo un poquito más fácil y su entereza ante las adversidades.

También han estado cerca estos años Yaima, que siempre ha cuidado de mí y a la que agradezco muchísimo su cariño y su calor; y Juan Carlos, a quien le doy las gracias por enseñarme a reír incluso en los momentos más complicados. Además, me gustaría darle las

gracias a Rosa, por su infinito cariño y su dulzura; a Diego, por sus risas; a Ana Martín por hacernos reír a carcajadas; a Juan Quintana, porque su chispa nos salva a todos. Al equipo de gaditanos, Susana, Juan, Marta y Paco; y a Nines; les doy las gracias por hacer el día a día más fácil y divertido. A Aida por su paciencia conmigo, y a Raúl por su cariño. A Susana Cañón por sus ganas de todo, a Teresus por confiar en mí y abrirme su mundo, a Melisa por sus abrazos, a Julio por contagiarme esa intensidad de vivir, y a Sergio por su alegría. A Xavi, por el brillo de su mirada. A Antonio Bernad por cuidar de nosotras, y por su cariño. A Ana Cervera por compartir nuestras incertidumbres, y a Kenneth por dejarme aprender a escribir. A Miguel Manzanares por sus consejos y por haber seguido tan de cerca mis pasos. Y gracias a todos los que algún día formaron parte de la 3sur, y han aportado su granito de arena a este proyecto, a mi día a día, y a mí.

Estos años en el CNIC han estado aliñados con el cariño de Laura, de Tania, de Belén, de Teresa y de Giovanna, y a ellas les quiero agradecer que hayan cuidado de mí. Además, quiero darle las gracias a Jaime, por su franqueza, sus ánimos y su complicidad. A Guille, por MariPili; y a Marcos, por MariPili2.0. A Cris por esa locura suya llena amor y por esa falda verde de lunares gigantes.

Por otro lado, quiero darle las gracias a La Manu y al Bobo, y a Pepe y a Encar, por la niña que fui. A la tía Consuelo, y al Tío, por su cariño incondicional. A la tita Dosi, por ra-re-ri-ro-ru-rosi-ramón; y por todos los kikis que me hizo de pequeña. A la tita Carmen por su emotividad y su intensidad. A Carmelo por Artora, y a Pepe por su pasión por comer. A Carmelo, y Arancha, por sus preguntas científicas. A Mamen, a Alberto y a Berta, porque sí, por su cariño. A Mariqui y al Chu por Gogi *y por llorar de risa con mis quedadas. A la Eli y al Rober por ser mis gestores de gafas y, claro, por los manolitos. A Víctor por Pou. A mi primo el bajito, y a toda la tropa de Malagón por los buenos momentos. Y a Con, por su valor y su cariño.*

Y como durante estos años han danzado junto a mí, quiero darle las gracias a los del barrio, Tillo, Pelos, Durán, Nuria, Olga, Mari, Andrea, Nekane, Javi y Ana. También, a Juanin, por enseñarme que tot el camí que feim será per anar endavant *y por todo; a Ana, porque nunca fue tan fácil perderse por cualquier carretera comarcal, y por darle, siempre, una vez más, al play. A Francesc,* per els seus sorolls en catalá *y por su brisa mediterránea. A Alfredi, por salvarme la vida. A Cris por nuestras conversaciones eternas, y a Mari Paz por La Casa Verde. A ellas dos, por los Martes de Nutella. A Jaime por abrir tanto los ojos cada vez que me ve, a Isidro por sus Audoditas, y a Pablo, por su ternura. A David por esas conversaciones infinitas en mitad de la nada. A Manuel por Berlín, pero sobretodo por Madrid. A Susanne, por ser mi gemela berlinesa. A Anke por cuidar de mí en el frío berlinés, y a los chicos del*

laboratorio de Berlín, por tratarme como una más. A Kay por dejar que su laboratorio fuera como mi casa. A Anabela, Josefine, Danijela y Aish por compartir nuestras experiencias, pero sobretodo, por nuestra complicidad.

A Carol y a los chicos de la fundación de investigación del Hospital de Getafe, por enseñarme cuando aún era muy cría; y al Dr. Esteban y a la Dra. Fernández Segoviano por la oportunidad. A Paloma, Bego, Miguel, Joaquina, Rosa, Pepe Martín, Carmen, Jaime y Altea, por dejarme ser una más; a Jonás por su rigor, y a Paqui por los hielitos; y, sobretodo, a Pepe por su confianza en mí y por convertirme en una más de la familia de chorttipus *y* wolbachia*. A Victoria, porque fue ella quien me enseñó a amar la biología, por su emotividad y sus abrazos. Y a Alberto porque él fue quien me enseñó a pensar, y por contagiarme su honestidad y su dignidad.*

Y siempre, incondicionalmente, vienen conmigo las nenitas, Elena y Raquel. Siempre están ahí, no son sólo amigas y no son sólo familia, son algo diferente. Y juntas le hacemos frente a todo lo que se nos cruce en el camino. A ellas les agradezco haber estado a mi lado todo este tiempo.

A Javi, parte de mi fuerza, de mi felicidad y de mi vida; le agradezco que se acerque al mirador de la ciencia de mi mano, y que me lleve en bici por sus caminos interminables. Y que conmigo se enfrente al mundo, diciendo que sí, como quien decide echar a volar. Sé que juntos todo será pan comido.

Al pequeño gran Bubú, que siempre viaja en mi bolsillo, siempre a mano, para cuando lo necesite. Él, que, a pesar de ser más pequeño, es el hermano mayor. Por su mente crítica, por su música y por todas nuestras risas y lágrimas. No sólo por estos años, por todos, gracias.

Y a quien le debo todo lo que soy hoy, desde la niña que fui y aquella que creció y en quien me he convertido hoy, es a mis padres. Ellos, que me enseñaron a ser feliz, a ser independiente, a ser crítica conmigo y con la vida, que me enseñaron a ser perseverante y a pelear por lo que uno quiere, que me enseñaron que en la vida todo vale un esfuerzo, que me mostraron unos valores y unos principios, el placer de disfrutar y conocer cosas nuevas; ellos que han compartido su vida conmigo, que tanto me quieren, ellos, los responsables de todo. A ellos les doy las gracias por su amor.

Resumen

RESUMEN

La terapia celular es una aproximación prometedora para el tratamiento de múltiples enfermedades, incluyendo el daño cardiaco. Los cardiomesoangioblastos (CMAs), procedentes de ratón y de humano, son células precursoras de origen mesenquimal, residentes en el corazón, capaces de diferenciarse a cardiomiocitos y restaurar una parte significativa del miocardio tras un infarto. Sin embargo, queda por resolver la baja eficiencia del suministro celular a la región dañada. Para incrementar la eficiencia de estos protocolos de suministro de células sería necesario potenciar la migración de las células y su mantenimiento en el corazón. Con este objetivo, en este trabajo se han desarrollado dos estrategias: I) investigar el papel de las citoquinas y moléculas de adhesión en la migración de los CMAs *in vitro* e *in vivo*; y II) estudiar el papel de los ultrasonidos pulsados de baja intensidad (LIPUS), fuerzas mecánicas no invasivas, en la migración, diferenciación y mantenimiento de los CMAs en el corazón tras un infarto.

La expresión de L-selectina junto con el pretratamiento de los CMAs con Sdf-1 aumenta la capacidad de migración y el *homing* de los CMAs a la zona dañada del miocardio, y mejora la función cardiaca. Por otra parte, la estimulación de los CMAs con LIPUS provoca una serie de modificaciones celulares beneficiosas, incluyendo un aumento de la maleabilidad y de la migración celular. Asimismo, la estimulación con LIPUS está relacionada con la presencia de células binucleadas e inducen la diferenciación de los CMAs a linaje cardiaco, mostrando unos efectos comparables a los del tratamiento de los CMAs con 5'azacitidina. Además, los LIPUS promueven que los CMAs migren de un modo más eficiente al corazón tras producirse un daño cardiaco. La estimulación de los CMAs con LIPUS activa la ruta de señalilzación de las BMP-pSmad, lo que conlleva un aumento de la cadena ligera de la miosina 2, de β1-integrina y de RhoA, mostrando un papel potencialmente importante en la reorganización del citoesqueleto.

Esta tesis pone de manifiesto la necesidad de aumentar la migración de los CMAs a la zona dañada del corazón y propone la combinación de citoquinas y moléculas de adhesión así como la estimulación de los CMAs con LIPUS como nuevas estrategias para mejorar el desarrollo de protocolos en el ámbito de la terapia celular cardiaca.

Summary

SUMMARY

Cell-based therapy is a promising approach for the treatment of many diseases, including ischemic heart disease. Cardiac mesoangioblasts (CMAs), derived from mouse and human, are committed vessel-associated progenitors that can differentiate into cardiomyocytes and restore to a significant, although partial, extent, heart structure and function after myocardial infarction. However efficient delivery of stem cells to heart regions is still a major problem for cell therapy. It would be essential to increase their homing and survival in the heart. To this aim, in this work we have developed two strategies: I) to investigate the role of some cytokines and adhesion molecules in the CMAs migration *in vitro* and *in vivo*; and II) to study the role of low-intensity pulse of ultrasounds (LIPUS) in CMAs migration, differentiation and maintenance at the heart after cardiac damage.

Both expression of L-selectin and exposure of CMAs to Sdf-1 increase cell migration *in vitro* and the homing of CMAs to the infarcted area of the heart as well as improve the recovery of motion after infarction. LIPUS stimulation of CMAs results in significant cellular modifications that provide beneficial effects to the cells, including increased malleability and improved cell migration and invasion. Additionally, LIPUS stimulation increases the number of binucleated CMAs and induces cardiac differentiation to an extent comparable with 5-azacytidine treatment. Furthermore, *in vivo* administration of LIPUS-stimulated CMAs results in greater retention and incorporation into cardiotoxin-damaged hearts. Mechanistically, LIPUS stimulation activates the BMP-Smad signalling pathway and increases the expression of myosin light chain-2 together with upregulation of β1-integrin and RhoA, highlighting a potentially important role for cytoskeleton reorganization.

This study shows the requirements for efficient homing of CMAs to the damaged heart after cardiac damage and suggests that the combination of both cytokines with adhesion molecules and LIPUS stimulation might be potential tools to improve cardiac cell therapies.

Índices

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS xv
RESUMEN xxi
SUMMARY xxv
ÍNDICE DE CONTENIDOS xxix
ÍNDICE DE TABLAS xxxv
ÍNDICE DE FIGURAS xxxvii
ABREVIATURAS 3
INTRODUCCIÓN 11
1. El corazón 11
1.1. Anatomía 11
1.2. Organografía 11
1.3. Histología y citología 11
2. Patologías cardiacas 12
2.1. Infarto agudo de miocardio 12
2.2. Tratamiento 13
3. Terapia celular 13
4. Capacidad regenerativa del corazón 14
4.1. El corazón como un órgano terminalmente diferenciado 14
4.2. Homeostasis estática vs. autorrenovación del corazón 14
4.3. El corazón como un órgano dinámico 15
5. Células madre para la terapia celular cardiaca 15
5.1. Células madre embrionarias y células pluripotentes inducidas 16
5.2. Células madre mesenquimales 16
5.3. Células madre cardiacas 17
5.4. Poblaciones de células madre cardiacas residentes en el corazón 17
6. Tipos de procesos de reparación 18
6. 1. Proceso de reparación celular 18
6.2. Proceso de reparación paracrino 18
7. Resultados experimentales de la terapia celular cardiaca 19
7.1. Células madre mesenquimales 19
7.2. Células madre cardiacas ckit+ 21
7.3. Progenitores Sca1+ 21

7.4. Cardiomesoangioblastos (CMAs) 21
7.5. Cardiosferas 21
8. Terapia celular cardiaca en ensayos clínicos 22
9. Mecanismos para potenciar la terapia celular cardiaca 22
9.1. microARNs 23
9.2. Mejora de los protocolos de diferenciación celular 24
9.3. Utilización de matrices. Bioingeniería tisular 25
9.4. Células pluripotentes inducidas (iPS) 25
9.5. Migración celular / *Homing* 25
9.6. Tecnología de ondas de choque de baja energía (*Low-energy shock wave*) 26
10. Migración y *homing* 27
10.1. *Homing* 27
10.2. Citoquinas y moléculas de adhesión 27
11. Nuevas tecnologías aplicadas en biomedicina: ultrasonidos 28
11.1. Ultrasonidos 28
11.2. Ultrasonidos pulsados de baja intensidad (LIPUS) 29
OBJETIVOS 33
MATERIALES Y MÉTODOS 39
I. Modelos animales y cultivos celulares 39
1. Modelos animales 39
2. Líneas celulares 39
2.1. Cardiomesoangioblastos (CMAs) 39
2.2. CMA-GFP+ 39
2.3. Otras líneas 40
3. Aislamiento de CMAs. Método Explante 41
4. Condiciones de cultivo 42
5. Caracterización celular 42
II. Tratamientos celulares 44
1. Pretratamiento con citoquinas 44
2. Transfecciones 44
3. Estimulación con LIPUS 45
3.1. Equipo de estimulación 45
3.2. Determinación de la dosis 47
3.3. Condiciones de la estimulación con LIPUS 47
3.3.1. Parámetros físicos 47

3.3.2. Parámetros fisiológicos 47
3.4. Procedimiento de la estimulación con LIPUS 47
III. Ensayos y experimentos 48
1. Estudio de la proliferación celular y de la apoptosis 48
1.1. Análisis de la proliferación celular: ensayo de incorporación de BrdU 48
1.2. Análisis de la apoptosis: método ratiométrico por citometría de flujo 49
2. Estudio de la estructura celular 49
2.1. Morfología celular: observación de las células en cultivo 49
2.2. Cuantificación de células binucleadas en cultivo 49
2.3. Caracterización del citoesqueleto de F-actina 49
3. Estudio de las propiedades biomecánicas de la membrana celular 50
3.1. Viscosidad y maleabilidad de la membrana celular: ensayo de microaspiración capilar 50
3.2. Determinación de la capacidad de adhesión celular a la MEC 51
4. Expresión génica 52
4.1. Estudio genómico de expresión: *microarrays* 52
4.1.1. *Microarray* de 125 genes de moléculas de adhesión y MEC 52
4.1.2. *Microarray* de expresión génica 52
4.2. Caracterización del perfil de expresión génica 53
4.2.1. Aislamiento de ARN 53
4.2.2. RT- PCR 54
4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 54
4.2.4. Visualización en gel de agarosa 55
5. Estudio de la expresión de proteinas 55
5.1. Expresión y cuantificación de proteínas mediante *western blot* 55
5.1.1. Aislamiento de proteínas 55
5.1.1.1. Aislamiento de proteínas de CMA-GFP+ inyectados en corazones de ratón 55
5.1.1.2. Aislamiento de proteínas a partir de CMAs en cultivo 56
5.1.2. Electroforesis, transferencia, inmunodetección y revelado 56
5.1.3. Cuantificación 57
5.2. Inmunocitofluorescencias 57
6. Medidas de las citoquinas 58
7. Ensayo de diferenciación 59
8. Estudio de la motilidad celular 59

8.1. Migración 59
8.1.1. Ensayo de migración por *Wound – Healing* 59
8.1.2. Ensayo de migración por *Transwell* 59
8.2. Invasión 61
9. Ensayo de trasplante celular 61
9.1. Suministro de células 61
9.2. Recogida de muestras 62
9.3. Cuantificación de los niveles de GFP+ en los corazones 62
9.3.1. Aislamiento de ARN 62
9.3.2. RT-PCR 62
9.3.3. qRT-PCR 63
9.4. Inmunohistofluorescencias 64
10. Ecocardiografía 65
IV. Análisis estadístico 65
RESULTADOS 71
1. Aislamiento y caracterización de cardiomesoangioblastos de ratón y humano 71
Estrategia I: Estudio del papel de las citoquinas y moléculas de adhesión en la migración de los CMAs. 73
2. La presencia de CMCs neonatales y de Sdf-1 favorece la migración de los mCMAs *in vitro* 73
3. Migración de los mCMAs *in vivo* 74
4. El pretratamiento de los mCMAs con Sdf-1 aumenta su capacidad de migración 76
5. La L-selectina es necesaria para la migración eficiente de los mCMAs *in vitro* e *in vivo* 80
6. El pretratamiento con Sdf-1 de mCMAs que expresan L-selectina aumenta la migración al corazón *in vivo* 82
7. Efecto de Sdf-1 y L-selectina en la reparación del tejido cardiaco a largo plazo 83
8. La migración de los hCMA al corazón también es susceptible de ser regulada por el pretratamiento con Sdf-1 y la expresión de L-selectina 85
Estrategia II: Estudio de los efectos de la estimulación de los CMAs con ultrasonidos pulsados de baja intensidad (LIPUS) 89
9. La estimulación con LIPUS modifica las propiedades estructurales de los CMAs 89
10. La estimulación con LIPUS no afecta a la viabilidad celular 92
11. La estimulación con LIPUS aumenta la motilidad de los CMAs 94
12. La estimulación con LIPUS potencia la diferenciación de los CMAs 98

13. La estimulación con LIPUS favorece el mantenimiento de los CMAs en el corazón..... 100
14. La estimulación con LIPUS aumenta la expresión de algunas proteínas implicadas en la diferenciación a CMCs, a través de la ruta de señalización de las BMPs, y en la motilidad de la actina a través de Rho..... 105
DISCUSIÓN..... 115
1. Utilización de los CMAs como modelo celular. Desarrollo del método explante..... 116
Estrategia I: Estudio del papel de las citoquinas y moléculas de adhesión en la migración de los CMAs..... 119
2. La capacidad de migración *in vitro* de los mCMAs..... 119
3. La capacidad de migración *in vivo* de los mCMAs al corazón..... 120
4. Aumento de la migración de los mCMAs..... 120
5. Aumento de la migración de los hCMAs..... 121
Estrategia II: Estudio de los efectos de la estimulación con ultrasonidos pulsados de baja intensidad (LIPUS) en CMA..... 123
6. Los LIPUS inducen modificaciones celulares que mejoran las propiedades de los CMAs..... 123
7. Modelo del mecanismo de mecanotransducción de los LIPUS en los CMAs..... 125
CONCLUSIONES..... 135
REFERENCIAS..... 139
ANEXO..... 157
Artículos publicados como resultado de este proyecto de Tesis Doctoral:..... 157
Otros artículos publicados durante el desarrollo del proyecto:..... 157

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla. 1. Poblaciones de células madre cardiacas residentes en el corazón y derivados. 20
Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la caracterización de los marcadores de superficie de los CMAs mediante citometría de flujo. 44
Tabla 3. Secuencia de los cebadores utilizados en las PCRs. 55
Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados para *western blot*. 57
Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados para *western blot*. 57
Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados para inmunocitofluorescencia e inmunohistofluorescencia. 64
Tabla 7. Anticuerpos secundarios utilizados para inmunocitofluorescencia e inmunohistofluorescencia. 65
Tabla 8. Caracterización fenotípica de los CMAs. 72
Tabla 9. Ecocardiografías. 85
Tabla 10. Análisis de *microarray* para examinar los genes diferencialmente expresados entre CTRL-mCMAs y US-mCMAs. 105
Tabla 11. Rutas de señalización canónicas relacionadas con la expresión génica de los US-mCMAs. 105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos para potenciar la terapia celular cardiaca..... 24
Figura 2. Esquema del vector lentiviral utilizado para la obtención de la población de CMA-GFP+. 40
Figura 3. Esquema del procedimiento del método explante. 42
Figura 4. Anticuerpos y fluorocromos utilizados en citometría de flujo para la caracterización de los marcadores de superficie de los CMAs. 43
Figura 5. Esquema del equipo de estimulación con LIPUS. 46
Figura 6. Elementos considerados en el cálculo de la viscosidad de los CMAs. 51
Figura 7. Esquema del ensayo de migración celular *in vitro* mediante *Transwell*. 61
Figura 8. Esquema del ensayo de trasplante celular con US-CMA-GFP+. 63
Figura 9. Aislamiento de CMAs, mediante el método de explante. 71
Figura 10. Caracterización fenotípica de los CMAs. 72
Figura 11. Efecto de las citoquinas en la migración de mCMAs *in vitro* (I). 74
Figura 12. Efecto de las citoquinas en la migración de mCMAs *in vitro* (II). 75
Figura 13. Migración in vivo de mCMAs (I). 76
Figura 14. Migración *in vivo* de mCMAs (II). 76
Figura 15. Sdf-1 mejora la capacidad de migración *in vitro* de los mCMAs. 77
Figura 16. Sdf-1 mejora la capacidad de migración *in vivo* de los mCMAs. 78
Figura 17. Sdf-1 aumenta la expresión de *caveolina1*, *CD44*, *Itgαv*, *MMP2* y *MMP9*. 79
Figura 18. Sdf-1 mejora la capacidad de migración de los mCMAs mediante CD44, MMPs y caveolina 1. 79
Figura 19. La expresión de L-selectina aumenta la migración *in vitro* de los mCMAs. 80
Figura 20. La expresión de L-selectina aumenta la migración *in vivo* de los mCMAs. 81
Figura 21. La expresión de L-selectina aumenta la migración *in vitro* de los mCMAs y tiene un efecto sinérgico con el pretratamiento de las células con Sdf-1. 81
Figura 22. La expresión de L-selectina aumenta la migración *in vivo* de los mCMAs y tiene un efecto sinérgico con el pretratamiento de las células con Sdf-1. 82
Figura 23. El pretratamiento de mCMAs mejora su mantenimiento en el corazón. 84
Figura 24. El pretratamiento de mCMAs mejora la regeneración del miocardio. 86
Figura 25. El pretratamiento de hCMAs mejora la migración *in vitro* al corazón. 87
Figura 26. El pretratamiento de hCMAs mejora la migración *in vivo* al corazón. 88
Figura 27. La estimulación con LIPUS modifica la morfología de los CMAs. 90

Figura 28. La estimulación con LIPUS induce la reorganización del citoesqueleto de F-actina de los CMAs. 90
Figura 29. La estimulación con LIPUS aumenta la maleabilidad de los CMAs. 91
Figura 30. La estimulación con LIPUS disminuye la capacidad de adhesión de los CMAs a la MEC. 92
Figura 31. La estimulación con LIPUS no afecta a la proliferación celular pero sí disminuye la apoptosis de los CMAs. 93
Figura 32. La estimulación con LIPUS aumenta la motilidad de los CMAs. 95
Figura 33. La estimulación con LIPUS aumenta la capacidad de migración *in vitro* de los CMAs (I). 96
Figura 34. La estimulación con LIPUS aumenta la capacidad de migración *in vitro* de los CMAs (II). 97
Figura 35. La estimulación con LIPUS aumenta la capacidad de invasión de los CMAs (I). 97
Figura 36. La estimulación con LIPUS aumenta la capacidad de invasión de los CMAs (II). 98
Figura 37. La estimulación con LIPUS activa la expresión de marcadores cardiacos. 99
Figura 38. La estimulación con LIPUS activa la expresión de proteínas cardiacas. 100
Figura 39. La estimulación con LIPUS promueve la presencia d células binucleadas en los cultivos de CMAs. 101
Figura 40. La estimulación con LIPUS potencia la diferenciación cardiaca de los CMAs. 102
Figura 41. La estimulación con LIPUS favorece el mantenimiento de los CMAs en el corazón (I). 103
Figura 42. La estimulación con LIPUS favorece el mantenimiento de los CMAs en el corazón (II). 104
Figura 43. La estimulación con LIPUS aumenta la expresión de Myl2. 106
Figura 44. La estimulación con LIPUS aumenta la expresión de Bmp2 y de p-Smad 1, 5, 8. 107
Figura 45. La estimulación con LIPUS aumenta la expresión de RhoA y de β1-integrina. 108
Figura 46. El receptor de Bmp2 y β1-integrina colocalizan en los CMAs. 110
Figura 47. Modelo del mecanismo de mecanotransducción del efecto de la estimulación de CMAs con LIPUS. 128

Abreviaturas

ABREVIATURAS

A488	fluorcromo Alexa488.
Abcg2	del inglés *ATP-binding cassette subfamily G, member 2.*
ADN	ácido desoxirribonucleico.
ADNa	ADN amplificado.
ADNc	ADN complementario.
ANOVA	análisis de la varianza, del inglés *Analysis of variance.*
APC	fluorocromo aloficocianina, del inglés *allophycocyanin.*
ARN	ácido ribonucleico.
ARNm	ácido ribonucleico mensajero.
miARN	micro ARN.
siARN	ARN pequeño de interferencia, del inglés *small interfering*.
5'-aza	5'azacitidina.
Bcl-2	gen del linfoma de células B, del inglés *B-cell lymphoma 2.*
BLAST	del inglés *basic local alignment search.*
BMP	proteína morfogénica ósea, del inglés *bone morphogenetic protein.*
BMP2	proteína morfogenética ósea 2, del inglés *Bone morphogenetic protein 2*.
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina.
BSA	albúmina de suero bovino, del inglés *bovine serum albumin.*
CAL	ligación de la arteria coronaria, del inglés *coronary artery ligation*.
Cdtx	cardiotoxina.
CD31	molécula cluster de diferenciación 31, del inglés c*luster of differentiation 31*. También conocido como PECAM, del inglés *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1c.*
CD34	molécula cluster de diferenciación 34, del inglés c*luster of differentiation 34.* Marcador mesenquimal.
CD45	molécula cluster de diferenciación 45, del inglés c*luster of differentiation 45*. (Proteina tirosina fosfatasa, receptor tipo C). También conocido como el antígeno común de leucocitos. Marcador hematopoiético.
Cdk2	quinasa dependiente de la ciclina 2, del inglés *cyclin-dependent kinase 2.*
ckit	proteina tirosin-kinasa kit, marcador de células madre.
CMA	cardiomesoangioblasto, de ratón y de humano.
CMA-GFP+	población de CMAs que expresan GFP.
CTRL-CMA	CMA no estimulado con LIPUS.
hCMA	cardiomesoangioblasto de humano.
hCMA-GFP+	población de cardiomesoangioblastos de humano que expresan GFP.
mCMA-GFP+	población de cardiomesoangioblastos de ratón que expresan GFP.
mCMA	cardiomesoangioblasto de ratón.
mCMA-GFP+	población de cardiomesoangioblastos de ratón que expresan GFP.
US-CMA	CMA estimulado con LIPUS
CMC	cardiomiocito.
Conn43	conexina 43.
CSC	célula madre cardiaca, de inglés *cardiac stem cell*.

DAPI	4 ',6-diamino-2-fenilindol, del inglés *4',6-diamidino-2-phenylindole.*
DMEM	medio de cultivo, del inglés *Dulbecco's modified eagle medium*.
DMSO	dimetil-sulfóxido, del inglés *dimethyl sulfoxide*.
dNTP	desoxirribonucleótidos trifosfato, del inglés *deoxyribonucleotide triphosphate.*
EF	fracción de eyección, del inglés *ejection fraction*.
ESC	célula madre embrionaria, del inglés *embryonic stem cell.*
FACS	selección de células por fluorescencia, del inglés *fluorescence-activated cell sorting*.
FBS	suero fetal bovino, del inglés *fetal bovine serum*.
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés *fibroblasts growth factor.*
FITC	isotiocianato de fluoresceína, del inglés *fluorescein isothiocyanate.*
FS	fracción de acortamiento, del inglés *fractional shortening*.
GFP	proteína verde fluorescente, del inglés *green fluorescen protein*.
GFP+	población de células que expresan GFP.
eGFP	proteína verde fluorescente potenciadora, del inglés *enhanced green fluorescen protein*.
H_2Od	agua destilada.
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico, del inglés *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.*
Hmgb-1	proteína del grupo 1 de alta movilidad, del ingles *high-mobility group*.
HRP	peroxidasa de rábano picante, del ingles *horseradish peroxidase.*
IGF1	factor de crecimiento insulínico tipo 1, del inglés *insulin-like growth factor-1.*
IL8	interleuquina 8.
IPA	del inglés *Ingenuity pathway analysis software*.
iPS	células madre pluripotentes, del inglés *induce pluripotent stem cells.*
Itgαv	integrina alpha v.
LIPUS	ultrasonidos pulsados de baja intensidad, del inglés *low intensity-pulsed of ultrasounds.*
LVAWThd	grosor de la pared anterior del ventrículo izquierdo en diástole, del inglés *left ventricle anterior wall diastolic thickness.*
LVIDd	diámetro del ventrículo izquierdo en diástole, del inglés *left ventricle diastolic diameter*
MCM5	del inglés *minichromosome maintenance complex component 5.*
MCP-1	proteína quimiotáctica de monocitos 1, del inglés *monocyte chemotactic protein 1*. También conocida como quimoquina motivo C-C 2 (CCL2).
MEC	matriz extracelular.
Mef2c	factor potenciador específico de miocito 2c, del inglés *myocyte-specific enhancer factor 2C*.
MMP2	metaloproteinasa de matriz 2.
MMP9	metaloproteinasa de matriz 9.
MSC	célula madre mesenquimal, del inglés *mesenchymal stem cell.*
Myl2	cadela ligera de la miosina 2, del inglés *myosin light chain 2.*
NCBI	*National center for biotechnology information.*
PBS	tampón fosfato salino, del inglés *phosphate buffered saline*.
PBS-BSA	tampón fosfato salido con albúmina de suero bovino.

PBS-T	tampón fosfato salino con *Tween*, del inglés *Tween phosphate-buffered saline.*
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PE	ficoeritrina, del inglés *phycoerythrin*.
PECy7	ficoeritrina conjugada con cianina 7, del inglés *phycoerytrin-cyanin 7.*
PFA	paraformaldehído.
PI	ioduro de propidio, del inglés *propidium iodide.*
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real.
ROCK1	proteína quinasa 1 asociada a Rho, del inglés *Rho-associated, coiled-coil containing proteina kinase 1.*
rpm	revoluciones por minuto.
RT-PCR	retrotranscripción por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
Sca1	antígeno 1 de células madre, del inglés *stem cell antigen-1*. También conocido como Ly6a.
SCID	ratones con enfermedad severa de inmunodeficiencia combinada, del inglés *severe combined immunodeficient disease.*
SCID-CAL	ratones SCID sometidos a ligación de la arteria coronaria.
Sdf-1	factor 1 derivado de células estromales, del inglés *stromal derived factor 1*. También conocido como citoquina motivo C-X-C 12 (CXCL12).
SDS	dodecilsulfato sódico, del inglés s*odium dodecyl sulfate.*
SEM	error estándar de la media, del inglés *standard error of the mean.*
siARN	ARN de silenciamiento.
SMC	célula del músculo liso, del inglés *smooth muscle cell.*
SW	ondas de choque extracorporales, del inglés *shock wave.*
TBS	tampón Tris salino, del inglés *Tris-buffered saline.*
Tbx5	T-box 5.
TGF-β	factor de crecimiento transformante beta, del inglés *transforming growth factor beta.*
TNF-α	factor de necrosis tumoral alpha, del inglés *tumor necrosis factor*.
TnT	troponina T.
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano.
UI	cantidad de sustancia, unidad internacional de medida utilizada en farmacología, basada en la actividad biológica o efecto de la sustancia.
US	se refiera a ultrasonidos pulsados de baja intensidad, del inglés *low intensity-pulsed of ultrasounds*.
v450	flurocromo de cumarina
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular, del inglés *vascular endotelial growth factor.*
wo	sin, del inglés *without.*
WT	fenotipo salvaje, del inglés *wild type.*

Quan surts per fer el viatge cap a Ítaca,
has de pregar que el camí sigui llarg,
ple d'aventures, ple de coneixences.
Has de pregar que el camí sigui llarg,
que siguin moltes les matinades
que entraràs en un port que els teus ulls ignoraven
i vagis a ciutats per aprendre dels que saben.
Tingues sempre al cor la idea d'Ítaca.

Cuando emprendas el viaje hacia Ítaca
ruega que sea largo el camino,
lleno de aventura y conocimiento.
Ruega que sea largo el camino,
que sean muchas las madrugadas
que entrarás en un puerto que tus ojos ignoraban
que vayas a ciudades a aprender de los que saben.
Ten siempre en el corazón la idea de Ítaca.

Lluís Llach,
adaptación de Ítaca de Kavafis.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. El corazón

1.1. Anatomía

El corazón es el órgano principal del sistema circulatorio. Es un órgano musculoso, hueco, situado en el mediastino anterior. Está formado por cuatro cavidades: las dos aurículas, en la parte superior; y los dos ventrículos, en la parte inferior. El corazón funciona como una bomba impulsando la sangre cada vez que se contrae a través de los vasos sanguíneos hacia el resto de órganos y tejidos del organismo (Mohrman and Heller, 1997).

1.2. Organografía

El corazón está estructurado en tres capas tisulares bien diferenciadas: endocardio, miocardio y epicardio. El endocardio, la capa más interna, es una membrana serosa de endotelio y tejido conectivo que reviste la parte interna del corazón. El miocardio es el músculo cardiaco y su contracción bombea la sangre al resto del organismo. El pericardio, la capa más externa, es una membrana fibroserosa formada por dos estratos, el visceral seroso o epicardio, y el fibroso o parietal, que envuelve al corazón y a los grandes vasos (Vegue, 2010).

1.3. Histología y citología

El corazón está formado por varios tipos celulares, los cardiomiocitos (CMCs), responsables de la contracción del corazón; las células endoteliales y las células del músculo liso, que forman parte de los vasos de la circulación coronaria fundamentalmente, y los fibroblastos, que forman el tejido conectivo.

Los CMCs tienen unas estructuras denominadas sarcómeros, que son complejos multiproteicos formados principalmente por actina y miosina, y otras proteínas, entre las cuales destacan la troponina y la tropomiosina. Los sarcómeros son las unidades responsables de la contracción celular, que se realiza mediante el deslizamiento de las fibras de miosina sobre las de actina (Alberts et al., 2013).

2. Patologías cardiacas

Las enfermedades cardiovasculares, como la isquemia cardiaca, el ictus, la hipertensión, la insuficiencia cardiaca y el infarto agudo de miocardio, entre otras; constituyen una de las principales causas de mortalidad en los países desarrollados (www.who.int).

2.1. Infarto agudo de miocardio

El infarto agudo de miocardio se produce por la obstrucción de las arterias coronarias lo que supone una disminución del riego sanguíneo del miocardio, es decir, una isquemia. La falta de oxígeno prolongada provoca una lesión en el miocardio que promueve la muerte de los CMCs (Chen et al., 2013) y provoca la necrosis de la zona afectada, acompañada de una respuesta inflamatoria. Los CMCs necróticos son sustituidos por fibroblastos y matriz extracelular (MEC), que forman una cicatriz en el tejido cardiaco. La pérdida irreversible de miocardio es reemplazada por este tejido cicatricial, rico en colágeno, que se deposita en la pared del ventrículo, y provoca disfunción contráctil de la región afectada (Huang et al., 2011), que se traduce en una insuficiencia cardiaca del paciente, dado que el corazón no es capaz de bombear el volumen suficiente de sangre. Además, se genera un remodelamiento del corazón, que puede derivar en la degeneración progresiva del miocardio que no había sido afectado (Sutton and Sharpe, 2000, Laugwitz et al., 2005, Linke et al., 2005, Messina et al., 2004). Asimismo, se produce la dilatación de la cavidad ventricular y el desarrollo de angiogénesis dentro del tejido de cicatrización (Itescu S et al., 2003).

El infarto de miocardio es una causa importante de mortalidad, y los pacientes que sobreviven a un episodio de este tipo presentan un diagnóstico marcado por la reducción del número de CMCs y la pérdida parcial de la función cardiaca (Huang et al., 2011). La cicatriz supone una solución rápida, aunque inútil funcionalmente debido a que el tejido cicatricial no es contráctil. De hecho, la cicatrización cardiaca debilita el corazón y aumenta la susceptibilidad a la aparición de patologías compensatorias, a sufrir aneurisma, a nuevos eventos de infarto adicionales y a episodios de insuficiencia cardiaca (Kikuchi K and Poss KD, 2012).

2.2. Tratamiento

El infarto agudo de miocardio requiere una intervención rápida y el pronóstico de los pacientes mejora considerablemente si se trata en el momento (Boersma et al., 1996, Bruyninckx et al., 2008). No obstante, actualmente se llevan a cabo diferentes tipos de tratamientos en función de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente. En la fase aguda se aumenta la saturación de oxígeno, se controlan las arritmias iniciales y se lleva a cabo el tratamiento de la fibrilación ventricular con desfibriladores y la reperfusión precoz. La terapia de reperfusión puede ser farmacológica o mediante angioplastia coronaria (Serra-Peñaranda et al., 2007). También se llevan a cabo tratamientos farmacológicos, basados en antiagregantes (Bhatt et al., 2006, Mehta and Yusuf, 2003), anticoagulantes, β-bloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina o antagonistas de receptores de angiotensina (Frishman WH, 2013). Sin embargo, cuando el daño cardiaco es muy severo, los tratamientos habituales no son suficientes para tratar la enfermedad. La alternativa en estos casos es realizar un trasplante de corazón. Este procedimiento presenta muchas limitaciones debido, no sólo a su dificultad, sino también a la escasez de donantes, a la posibilidad de rechazo, y a las patologías derivadas secundariamente de la inmunosupresión crónica a la que se somete al paciente para evitar el rechazo.

3. Terapia celular

Los tratamientos actuales para el infarto agudo de miocardio, basados en la revascularización del miocardio y en el suministro de fármacos, han conseguido disminuir la morbilidad a corto plazo y la mortalidad de los pacientes (Freemantle et al., 1999, Afilalo et al., 2007, Franzosi et al., 1998). No obstante, este tipo de tratamientos no es suficiente para impedir la degeneración del corazón tras sufrir un daño cardiaco. Por eso, en los últimos años ha surgido la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas que permitan mejorar el pronóstico de los pacientes. De hecho, el desarrollo de nuevas terapias que puedan aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes de infarto supondría un gran impacto a nivel social y económico.

La medicina regenerativa es un área multidisciplinar, basada en la terapia celular, cuyo objetivo es mejorar la función del corazón tras sufrir un daño mediante la utilización de distintos tipos de células y la bioingeniería tisular de biomateriales como posibles herramientas, con el objetivo de desarrollar nuevos tratamientos aplicables después de un daño cardiaco. Dada la poca capacidad regenerativa del corazón de los mamíferos adultos, se han llevado a cabo considerables esfuerzos para intentar estimular de alguna manera, endógena o exógena, la reparación o la formación de nuevo tejido muscular en la zona afectada (Kikuchi K and Poss KD, 2012).

4. Capacidad regenerativa del corazón

4.1. El corazón como un órgano terminalmente diferenciado

El concepto de que el corazón es un órgano terminalmente diferenciado, incapaz de reemplazar los CMCs dañados, ha sido el centro de la investigación cardiovascular y el desarrollo terapéutico de la última mitad del siglo XX (MacLellan WR and Schneider MD, 2000). Analizando la capacidad de regeneración del corazón tras una lesión (Rumyantsev PP, 1977) se determinó que, a pesar de que en la etapa fetal los CMCs son células mononucleadas y proliferativas, tras la etapa postnatal, la replicación del ADN de los CMCs se produce sin citocinesis o sin kariocinesis. De esta manera, la mayor parte de los CMCs en el corazón adulto son binucleados con núcleos diploides, o mononucleados con núcleos poliploides (Laflamme MA and Murry CE, 2011). Tras el cambio de dinámica mitótica postnatal, es raro que los CMCs entren en el ciclo celular. Y, por tanto, se considera que el factor limitante clave para la regeneración del músculo cardiaco probablemente sea la escasa capacidad proliferativa de los CMCs adultos (Kikuchi K and Poss KD, 2012).

A pesar de que algunos trabajos documentan la activación de la maquinaria del ciclo celular en una subploblación de CMCs, la resistencia a un cambio en el paradigma ha sido enorme (Beltrami et al., 2003, Urbanek K et al., 2006).

4.2. Homeostasis estática vs. autorrenovación del corazón

El cambio de concepto que se tenía del corazón ha ido cambiando poco a poco

(Rumyantsev PP, 1977, Beltrami et al., 2003). Varios estudios han aportado pruebas de que los CMCs mueren y que otros nuevos se forman constantemente en el corazón no sólo en la etapa neonatal (Anversa P et al., 2006). En los últimos años se ha documentado la presencia de CMCs con ciclo celular activo en el corazón de mamíferos adultos sanos y patológicos (Beltrami et al., 2003, Quaini F et al., 2002). Las primeras observaciones sugieren que la lesión puede influir en la propensión a la proliferación de los CMCs adultos (Rumyantsev PP, 1977, Kajstura J et al., 2010).

Este punto de vista alternativo a la homeostasis cardiaca plantea muchas cuestiones, ya que requiere la conciliación de dos hipótesis aparentemente contradictorias: la salida irreversible de los CMCs del ciclo celular en la etapa postnatal, por un lado, y la presencia de CMCs con capacidad de entrar en mitosis y citocinesis por otro (Beltrami et al., 2003).

4.3. El corazón como un órgano dinámico

Algunos estudios han sugerido que el corazón podría ser un órgano dinámico: la sobreexpresión de IGF1 (Anversa P et al., 2006), la telomersa (Oh H et al., 2001), la ciclina D (Pasumarthi KB et al., 2005), bcl-2 (Limana F et al., 2002) o cdk2 (Liao HS et al., 2001) se asocian con un aumento de CMCs y con una mayor tolerancia a una situación patológica. Algunos grupos mantienen que el número de CMCs aumenta desde el nacimiento hasta la edad adulta y que el marcaje de BrdU, MCM5, Ki67 o timidina sigue siendo detectable (Anversa P et al., 2006).

No está todavía claro si los CMCs se renuevan a través de la diferenciación a una población de células progenitoras, ya sea a través de la división celular de los CMCs ya existentes o a partir de una desdiferenciación de los CMCs, caracterizada por la reducción de los sarcómeros y por la expresión de marcadores fetales (Kikuchi K and Poss KD, 2012).

5. Células madre para la terapia celular cardiaca

La regeneración cardiaca requiere la formación de CMCs y vasos coranarios, y una célula ya comprometida a linaje cardiaco no podría lograrlo. Por tanto, lo ideal sería

utilizar una célula multipotente que pueda diferenciarse en los principales linajes de células cardiacas: CMCs, células de músculo liso y células endoteliales (Bernal and Galvez, 2013). Para ello se han utilizado gran variedad de tipos de células madre en modelos experimentales (Chen et al., 2013). Aunque, se ha obtenido sólo un éxito parcial y variable (Oh et al., 2003, Linke et al., 2005, Beltrami et al., 2003). Esa es la razón por la que resulta necesario comprender las características de los diferentes tipos de células madre para desarrollar una herramienta más eficiente para la terapia celular cardiaca.

5.1. Células madre embrionarias y células pluripotentes inducidas

Las células madre embrionarias (ESCs) son capaces de diferenciarse a todas las células adultas (Thomson JA et al., 1998), aunque su uso terapéutico está limitado debido a la formación de teratomas y a la necesidad de utilizar una fuente celular alogénica (Nussbaum J et al., 2007). A partir de las propiedades y las limitaciones de las ESCs, se desarrollaron las células pluripotentes inducidas (iPS), como una nueva tecnología en terapia celular.

La tecnología de las iPS se desarrolló con el objetivo de evitar los obstáculos de la utilización de las ESCs. Las iPS se han generado a partir de diferentes tipos de tejidos adultos de ratón por la expresión ectópica de los factores de transcripción de la pluripotencia Oct3/4, Sox2, Kfl4 (Takahashi K and Yamanaka S, 2006, Takahashi K et al., 2007). Las iPS se pueden utilizar como sustitutas de las ESCs y generar un linaje específico, y no presentan los problemas inmunológicos asociados a las ESCs, porque se pueden obtener del propio paciente (Nam YJ et al., 2013).

5.2. Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (MSCs) son adherentes y tienen una morfología similar a los fibroblastos. Aunque originalmente se aislaron de la médula ósea, posteriormente se han aislado de muchos otros tejidos como músculo esquelético, tejido adiposo, cordón umbilical, líquido amniótico o pulmón. Las MSCs son capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos, y secretan diferentes factores

que tienen un efecto paracrino en la reparación tisular, en la proliferación y en la diferenciación celular, así como en la respuesta inmune (Li M and Ikehara S, 2013, Orlic D et al., 2001a, Orlic D et al., 2001b, Orlic D et al., 2001c, Toma C et al., 2002, Huang et al., 2011, Mirotsou M et al., 2007, Wang M et al., 2009, Uemura R et al., 2006).

5.3. Células madre cardiacas

Hasta hace poco tiempo, se mantenía el concepto de que el corazón estaba formado por CMCs diferenciados, y fuera del ciclo celular desde la etapa postnatal (Bergmann et al., 2009). Se consideraba, por tanto, un órgano post-mitótico sin capacidad de autorrenovación después de sufrir una lesión (He et al., 2011, Towbin and Bowles, 2002).

Sin embargo, este paradigma fue cuestionado por el trabajo de Beltrami (Beltrami et al., 2003) que describió la presencia de células especializadas en el corazón que expresan marcadores de células madre (ckit, Sca1 y MDR1). Estas células, conocidas como células madre cardiacas adultas (CSCs), presentan las propiedades típicas de las células madre (He et al., 2011). Varios trabajos han descrito la presencia de este tipo celular en el corazón adulto (Oh et al., 2003, Beltrami et al., 2003). Hasta el momento, distintos grupos de investigación han conseguido aislar CSCs de diversas especies, basándose en la expresión de Sca1 (Oh et al., 2003, Matsuura et al., 2004, Smits AM et al., 2009), Abcg2 (Martin et al., 2004, Pfister et al., 2005) y ckit (Linke et al., 2005, Beltrami et al., 2003). Las CSCs se acumulan en nichos y controlan la rotación fisiológica de los CMCs, el crecimiento y la migración (Urbanek K et al., 2006). Las CSCs están involucradas en la renovación de los CMCs, de las células endoteliales y de las de músculo liso del corazón (Linke et al., 2005, Beltrami et al., 2003, Bearzi C et al., 2007, Leri A et al., 2011, Bearzi C et al., 2009).

5.4. Poblaciones de células madre cardiacas residentes en el corazón

Se han descrito al menos siete tipos diferentes de células madre cardiacas residentes en el corazón y derivados, incluyendo las células madre cardiacas ckit+ (CSC) (Bearzi C et al., 2007, Beltrami et al., 2003), las células madre Sca1+ (Oh et al., 2003, Matsuura

et al., 2004), las células madre Isl1+ (Laugwitz et al., 2005, Bu et al., 2009), los cardiomesoangioblastos (CMAs) (Galvez et al., 2008, Vanelli et al., 2012), la población de células madre secundarias, más conocidas como *side-population* (Abcg2+/Mdr1) (Pfister et al., 2005, Pfister et al., 2010, Hierlihy et al., 2002), las cardiosferas (ckit+, Sca1+, Flk1+) (Messina et al., 2004, Smith et al., 2007), y los progenitores epicárdicos (Cai et al., 2008, Castaldo et al., 2008). Estas células han sido asiladas y caracterizadas por diferentes laboratorios (Bearzi C et al., 2007, Barile et al., 2007, Bolli and Chaudhry, 2010, Bollini et al., 2011) (tabla 1).

6. Tipos de procesos de reparación

6. 1. Proceso de reparación celular

La maduración y la supervivencia de los CMCs que quedan tras producirse el infarto dependen de la disponibilidad de oxígeno en la zona afectada. Para recuperar el tejido muerto se tienen que formar vasos coronarios y estructuras capilares, para establecer comunicación con los vasos que irrigan la parte del órgano no afectada. Además, en caso de suministro celular, la nueva vascularización tiene que llegar a los CMCs implantados para preservar su supervivencia, favorecer su crecimiento, su capacidad de diferenciación y su función contráctil (Anversa P et al., 2006).

6.2. Proceso de reparación paracrino

Varios trabajos sugieren que la diferenciación de las células implantadas juegan un papel menos importante en la mediación de la protección cardiaca de lo que se pensaba. Dado que es necesario un periodo de tiempo de al menos varios días para que se produzca la diferenciación de las CSCs, parece que antes de que las células se diferencien en CMCs funcionales, podrían secretar algunas moléculas, que podrían tener un efecto protector ante una situación de daño cardiaco (Huang et al., 2011). Algunos estudios indican que las células madre tienen un efecto beneficioso debido a la producción de factores paracrinos. Las moléculas protectoras secretadas por las células madre aumentan la supervivencia de las células, reducen la respuesta

inflamatoria, promueven angiogénesis local y mejoran la función cardiaca tras un infarto (Mirotsou M et al., 2007, Uemura R et al., 2006).

De hecho, es evidente que los factores paracrinos juegan un papel importante en la protección cardiaca mediada por células madre después de un infarto (Huang et al., 2011). Se ha documentado que muchos factores de crecimiento y citoquinas derivadas de células madre mejoran la función miocárdica, promueven la supervivencia celular, potencian la remodelación ventricular y disminuyen el daño tisular tras un episodio de isquemia. Por ejemplo, el VEGF es un factor crítico en la angiogénesis y se ha demostrado que está implicado en la protección tisular de un modo paracrino (Uemura R et al., 2006). Sdf-1 también es un factor implicado en este proceso, aunque sus efectos beneficiosos han sido principalmente atribuidos a la movilización y al reclutamiento de CSCs en el corazón infartado (Saxena A et al., 2008). Además cabe destacar que las CSCs son capaces de producir cantidades sustanciales de factores paracrinos (Matsuura K et al., 2009, Chimenti I et al., 2010, Miyamoto S et al., 2010), lo que apoya el papel que se les atribuye en el proceso de reparación paracrino.

7. Resultados experimentales de la terapia celular cardiaca

7.1. Células madre mesenquimales

La primera vez que se consiguió diferenciar una población de células madre a CMCs fue a partir de un subconjunto de células madre mesenquimales (MSCs) de la médula ósea (Leri A et al., 2005). Los estudios de trasplante celular mostraron que los CMCs procedían de las células trasplantadas, pero con una tasa muy baja de éxito (Jackson KA et al., 2001). Sin embargo, otros estudios no han conseguido diferenciar estas células a CMCs ni mejorar la función cardiaca tras una lesión (Leri A et al., 2011).

Por otra parte, las MSCs pueden diferenciarse a CMCs en condiciones específicas *in vitro* (Wollert KC and Drexler H, 2005). Las MSCs ejercen un efecto paracrino en las células afectadas, y este podría ser el mecanismo principal del efecto beneficioso de las MSCs. En la actualidad, no existe consenso acerca de si estas células tienen la capacidad de diferenciarse a CMCs *in vivo* o no.

Células madre cardiacas residentes o derivados	Marcadores	Tipos celulares a los que potencialmente se diferencian	Método de diferenciación a linaje cardiaco	Características que muestran una vez diferenciadas	Resultados *in vivo*	Ensayos clínicos
Células madre cardíacas ckit+ Lin-	• ckit+, Lin-, CD31+, Nkx2.5+, Mef2c+, Nkx2.5.	• CMCs • SMCs • ECs	• 5'azacitidina • dexametasona	• marcadores de CMCs, sarcómeros, potencial de acción.	• mejora la recuperación y la función carciaca.	+
Progenitores Sca1+	• Sca1+, ckit-, CD31+, Lin-, Mef2c+, Nkx2.5+.	• CMCs	• 5'azacitidina • oxitocina	• marcadores de CMCs, sarcómeros.	• migran a la zona infartada y se diferencian.	-
Células madre Isl1+	• Isl1+, Sca1-, Nkx2.5+, ckit-, GATA4+, Mef2c+.	• CMCs • SMCs • ECs	• cocultivos con CMCs neonatales	• marcadores de CMC, sarcómeros, potencial de acción, transmisión de Ca^{2-}.	• no determinado.	–
CMAs	• Sca1+, ckit+, Isl1+, Nkx2.5+, GATA4+, Mef2c+, Cn43+.	• CMCs	• cocultivos con CMCs neonatales • 5'azacitidina	• marcadores de CMC, sarcómeros, potencial de acción, latidos.	• mejora la recuperación y la función carciaca.	–
Células secundarias (*Side populations*)	• Abgc2+, Bcrp1+, Sca1+, ckit+, Nkx2.5-, Mef2c+.	• CMCs	• cocultivos con CMCs adultos	• propiedades moleculares y funcionales de CMCs.	• no determinado.	-
Cardiosferas	• ckit+, Sca1+, cTnt+, Cn43+.	• CMCs • SMCs • ECs	• cocultivos con CMCs neonatales	• marcadores de CMCs, sarcómeros.	• efectos paracrinos indirectos.	–
Progenitores epicárdicos	• ckit+, WT1+.	• no se diferencian. • contribución al linaje epicárdico.	• no se diferencian.	• no se diferencian.	• migran a la zona infartada.	–

Tabla. 1. Poblaciones de células madre cardiacas residentes en el corazón y derivados.

7.2. Células madre cardiacas ckit+

Las CSCs ckit+/Lin- tienen las propiedades típicas de las células madre, y algunos estudios han demostrado que el trasplante de estas células mejora la función cardiaca en varios modelos animales de infarto. Sin embargo, los resultados obtenidos con estas CSCs son variables. Algunos estudios describen una mejora significativa de la función cardiaca (Matsuura K et al., 2009, Tang XL et al., 2010, Oh et al., 2003, Beltrami et al., 2003), mientras que otros describen la ausencia de efecto alguno (Smith et al., 2007, Barile et al., 2007). No obstante, algunos autores han descrito un efecto beneficioso de estas células en modelos de daño cardiaco en humanos (Bearzi C et al., 2007) y en perros (Linke et al., 2005). Por tanto, aunque es bastante controvertido, algunos autores consideran esta población celular como una herramienta prometedora en la regeneración cardiaca (Miyamoto S et al., 2010, Huang et al., 2011).

7.3. Progenitores Sca1+

Los progenitores cardiacos Sca1+ aislados de corazones de ratones adultos pueden dar lugar a CMCs funcionales *in vitro* (Matsuura et al., 2004). Aunque el efecto de la utilización en un modelo de isquemia de estas células parece ser más limitado que el obtenido con las CSCs ckit+ (Oh et al., 2003).

7.4. Cardiomesoangioblastos (CMAs)

Los cardiomesoangioblastos (CMAs) son capaces de diferenciarse eficientemente a CMCs (Galvez et al., 2008), aunque su potencial de diferenciación parece ser dependiente de la carga mitocondrial (San Martin et al., 2011). Los CMAs son capaces de restaurar la estructura del corazón significativamente en un modelo de ratón de infarto, si bien es cierto que no inducen mejoras importantes en la función cardiaca (Galvez et al., 2008).

7.5. Cardiosferas

El efecto provocado por las cardiosferas en modelos animales se atribuye a mecanismos indirectos paracrinos (Chimenti I et al., 2010).

En resumen, diferentes tipos de células madre derivadas del corazón muestran

resultados variables para su uso en terapia celular cardiaca. Por lo tanto, es necesario continuar explorando todas las posibles fuentes celulares para desarrollar una herramienta eficiente para ser utilizada en los protocolos de terapia celular cardiaca.

8. Terapia celular cardiaca en ensayos clínicos

Varias poblaciones de células madre, como las CSCs ckit+ (Bolli et al., 2011) y MSCs de la médula ósea (Assmus B et al., 2013, Janssens S et al., 2006) han sido utilizadas en ensayos clínicos en pacientes con enfermedades del corazón (Britten MB et al., 2003, Stamm C et al., 2003, Perin EC et al., 2003, Tse HF et al., 2003), y muestran en los resultados previos solo una leve mejora en la regeneración del miocardio (Orlic D et al., 2001a).

Algunos ensayos clínicos sugieren que la terapia celular basada en la utilización de precursores endoteliales puede mejorar la función miocárdica. Hasta ahora, la mayoría de los ensayos clínicos han utilizado MSCs mononucleares de médula ósea y no muestran ningún beneficio significativo, aunque se considera que las mínimas mejoras detectadas pueden tener un impacto importante clínicamente (Bernal and Galvez, 2013). Los autores atribuyen la mejora detectada a la liberación de factores de crecimiento y citoquinas por parte de las células suministradas. Algunos estudios importantes son el REPAIR-AMI, que ha demostrado una mejora de la función microvascular, el C-Cure y el ESCIPIÓN (Erbs S et al., 2007, Bartunek J et al., 2013, Bolli et al., 2011).

En resumen, se han llevado a cabo enormes esfuerzos en el tratamiento de las enfermedades cardiacas basados en terapia celular, que han generado nuevas cuestiones que, una vez resueltas, podrían mejorar la eficacia de los resultados.

9. Mecanismos para potenciar la terapia celular cardiaca

Varios tipos de células madre parecen promover experimental y clínicamente efectos beneficiosos ante una situación de daño cardiaco. Sin embargo, parece que estos efectos han sido modestos y sólo parciales. En la literatura se pueden encontrar diferentes aproximaciones y metodologías para modificar y mejorar las propiedades de células madre, con el fin de conseguir potenciar la eficiencia de su utilización (figura 1).

9.1. microARNs

Los microARNs (miARNs) son pequeños ARNs no codificantes conservados evolutivamente, formados por intrones y regiones intergénicas que modulan la expresión génica silenciando la expresión post-trancriptionalmente, ya sea por inhibición o por degradación del ARNm (Latronico MV and Condorelli G, 2009). Los miARNs están implicados en el control del desarrollo, la homeostasis tisular, la modulación de la diferenciación, la proliferación, la apoptosis y el desarrollo de diferentes enfermedades (Brett JO et al., 2011, Glass C and Singla DK, 2011, Juan AH and Sartorelli V, 2010, Bauersachs J, 2010).

Además, los miARNs están involucrados en el control de pluripotencia (Wang Y et al., 2008), la autorrenovación y la diferenciación de ESCs (Martinez NJ and Gregory RI, 2010). Los miARNs también son capaces de inducir la diferenciación de CSCs. En concreto, los principales miARNs implicados en la diferenciación cardiaca son miR-1, miR-133, miR-208 y miR-499, conjunto conocido como el "mio-miARNs" (Sluijter JP et al., 2010). Por tanto, los miARNs pueden ser utilizados como herramientas potentes para aumentar la diferenciación cardiaca. La expresión combinada de miARNs específicos mejora la eficacia terapéutica del tratamiento de enfermedades isquémicas del corazón, debido a que su sobreexpresión mejora el trasplante de las CSCs suministradas (Heinrich and Dimmeler, 2012).

También se ha demostrado que los miARNs pueden promover la reprogramación de fibroblastos humanos (Subramanyam D et al., 2011) en CMCs, tanto *in vitro* como *in vivo* (Jayawardena TM et al., 2012, Nam YJ et al., 2013).

Por otra parte, las células madre pueden secretar exosomas, vesículas formadas a partir de membrana, de 40-100 nm de tamaño, que contienen miARN (Biancone L et al., 2012). Cada vez se conocen más evidencias que sugieren que los exosomas juegan un papel importante en la comunicación entre las células donantes y los tejidos receptores (Stoorvogel W, 2012). El efecto paracrino mediado por los exosomas podría ser un nuevo mecanismo para explicar el efecto beneficioso del trasplante de CSCs. De hecho, hay datos que sugieren que los exosomas de MSCs pueden reducir la lesión de miocardio en un modelo *ex vivo* (Chen et al., 2013, Roubille F et al., 2011).

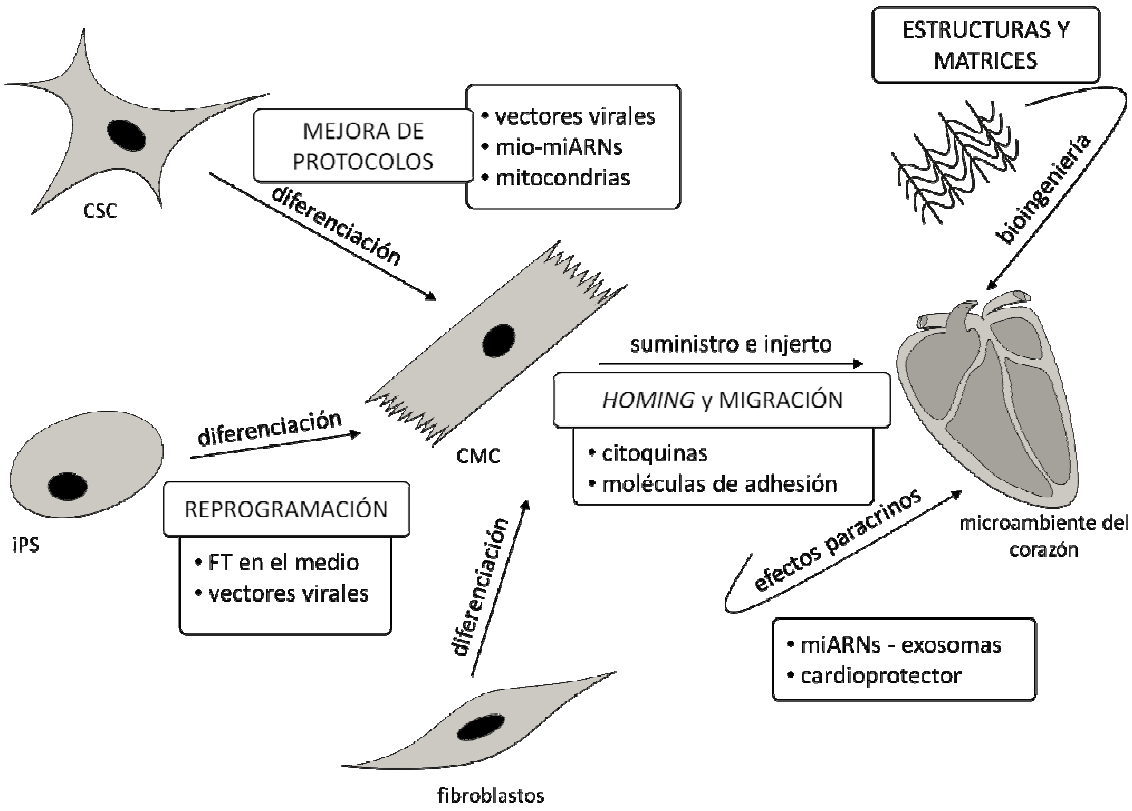


Figura 1. Mecanismos para potenciar la terapia celular cardiaca.

9.2. Mejora de los protocolos de diferenciación celular

Se han explorado distintos tipos de estrategias con el fin de mejorar la capacidad de diferenciación celular. No sólo el co-cultivo celular en presencia de CMCs, neonatales o adultos, sino también se ha llevado a cabo el tratamiento químico de las células con 5'azacitidina, fármaco que activa la expresión de factores de transcripción cardiacos induciendo diferenciación celular.

Por otra parte, la terapia génica permite la diferenciación cardiaca a través de la sobreexpresión de marcadores cardiacos específicos, y el silenciamiento de los de células madre (Nam YJ et al., 2013, Sluijter JP et al., 2010, Heinrich and Dimmeler, 2012) modificando el perfil de expresión génico de las células utilizando vectores virales o miARNs mediante reprogramación celular (Kral and Kraitchman, 2013).

Por otra lado, se ha atribuido un papel clave a la cantidad de mitocondrias en la capacidad de diferenciación cardiaca (San Martin et al., 2011), lo que podría suponer la base de una nueva herramienta para desarrollar en el ámbito de la terapia celular cardiaca para la mejora de los protocolos de diferenciación.

9.3. Utilización de matrices. Bioingeniería tisular

También se han explorado las posibilidades de la bioingeniería de tejidos como alternativa o estrategia complementaria en terapia celular cardiaca. Se han utilizado diferentes tipos de biomateriales desarrollando protocolos de ingeniería de tejido cardiaco *in situ,* tanto como una solución no-celular como una terapia combinada con células y otras estrategias terapéuticas. Los biomateriales se pueden utilizar *in situ* para aumentar el espesor de la pared ventricular, con el fin de restaurar la geometría del corazón, y para proporcionar apoyo al ventrículo lesionado (Christman KL and Lee RJ, 2006). También se están desarrollando diferentes estrategias basadas en la producción de polímeros naturales tales como colágeno y el quitosano. En concreto, los parches cardiacos procedentes de parches derivados de ESCs han resultado exitosos, así como el uso de polímeros sintéticos, como hidrogeles, y otros polímeros naturales, como la fibrina o el colágeno I (Di Felice V et al., 2013).

9.4. Células pluripotentes inducidas (iPS)

Una nueva propuesta en el ámbito de la terapia celular cardiaca relacionada con la tecnología de reprogramación celular es el desarrollo de CMCs *de novo* como una posible fuente alternativa de reprogramación directa de fibroblastos cardiacos de ratón y otro tipo de células adultas a CMCs mediante la utilizanción de factores de transcripción típicamente cardiacos como GATA4, Mef2C y Tbx5 (Ieda M et al., 2010). Esta aproximación permite la reprogramación de fibroblastos para ser utilizados para la regeneración *in vivo* utilizando estos factores de transcripción (Burridge et al., 2012, Efe JA et al., 2011).

9.5. Migración celular / *Homing*

Tras producirse un daño tisular, las nuevas células que reemplazan a las muertas migran desde nichos específicos presentes en el tejido o desde entornos lejanos, como, por ejemplo, desde la médula ósea, proceso conocido como *homing* (Palumbo et al., 2007). Se han utilizado diferentes mecanismos para aumentar la migración y el *homing* de las células madre. En los últimos años se ha estudiado el papel de las citoquinas y las moléculas de adhesión presentes en la superficie de las células

(Palumbo et al., 2007, Galvez et al., 2006), y, en concreto, será objeto de estudio en este trabajo.

9.6. Tecnología de ondas de choque de baja energía (*Low-energy shock wave*)

La aplicación de ondas de choque extracorporales de alta energía (SW) es un tratamiento utilizado en nefrología para la fragmentación de cálculos renales (Chaussy et al., 1982). Esta misma tecnología utilizando niveles más bajos de energía tiene efectos vasculares, como el aumento de la neovascularización documentado en un modelo porcino de infarto de miocardio (Nishida et al., 2004). Por otro lado, un estudio clínico con pacientes con enfermedad severa coronaria mostró que el tratamiento repetitivo con SW podría mejorar los síntomas clínicos de los pacientes (Fukumoto et al., 2006). Algunos autores apuntan a que estos efectos podrían estar mediados por la expresión de VEGF y óxido nítrico (Wang et al., 2003). En estas premisas, y argumentando que VEGF actúa como factor quimioatrayente de las células progenitoras; se basó el grupo de Dimmeler para utilizar el SW como pretratamiento tisular para potenciar el reclutamiento de las células progenitoras endoteliales suministradas intravenosamente, en un modelo de isquemia en las extremidades posteriores (Aicher et al., 2006). Los autores describen un aumento de la expresión de VEGF y Sdf-1 en el tejido y una mejora en el reclutamiento de las células progenitoras endoteliales. Este trabajo supuso el *proof-of-principle* para la utilización del SW como pretratamiento en combinación con el suministro de MSCs de médula ósea para potenciar la neovascularización y mejorar los resultados de la terapia celular. A partir de este trabajo se diseñó el ensayo clínico CELLWAVE (Assmus B et al., 2013), cuyos resultados apuntan a una mejora de la función contráctil del ventrículo izquierdo en pacientes con daño cardiaco crónico.

No obstante, los autores ponen de manifiesto la necesidad de estudiar en profundidad los efectos secundarios de esta tecnología, a pesar de una aparente tolerancia en los pacientes y de que a priori es una técnica no invasiva. Si bien es cierto que el SW genera altas presiones positivas y negativas, que suponen la formación de burbujas que podrían tener un efecto de cavitación en el tejido que aumenta la permeabilidad de la membrana celular (Aicher et al., 2006).

10. Migración y *homing*

10.1. *Homing*

Homing es el proceso por el cual las células alcanzan un tejido específico, conocido como tejido diana, a través de la circulación general. Este mecanismo, que consiste en una interacción, llamada *rolling*, en la cual las células avanzan sobre el endotelio, seguido de la adhesión firme y la transmigración en el tejido (Grabovsky et al., 2000, Peled et al., 2000, Springer, 1994); ha sido estudiado extensamente tanto *in vitro* como *in vivo* en diferentes tipos de células, como leucocitos o células madre hematopoyéticas (Butcher, 1991, Fu and Liesveld, 2000), y se cree que depende de las moléculas de adhesión, de las citoquinas y de sus receptores.

El *homing* de las células madre se lleva a cabo en varios pasos que comparten algunas características con la migración de los leucocitos a las zonas de inflamación y a los nódulos linfáticos (Peled et al., 2000, Butcher and Picker, 1996). Primero las células suministradas migran a través de la circulación sanguínea, e interaccionan con las células endoteliales. Esto resulta en el *rolling* celular mediante la E-selectina, y la P-selectina, seguido de una adhesión resistente a la pared de los vasos. (Frenette et al., 1998). Estas interacciones están mediadas por la acción coordinada de moléculas de adhesión y la activación de procesos desencadenados específicamente por citoquinas y ligandos vasculares (Schweitzer et al., 1996). Finalmente las células se extravasan atravesando la pared del endotelio. Diferentes moléculas de adhesión, como la β2-integrina, están involucradas en la fase de extravasación (Yong et al., 1998).

10.2. Citoquinas y moléculas de adhesión

El repertorio de la expresión de citoquinas del tejido diana y la expresión de los respectivos receptores en las células influyen en la eficiencia del *homing*. Durante la inflamación que se produce como consecuencia de una lesión, las citoquinas están involucradas no sólo en el reclutamiento de leucocitos, sino también en el de células madre en circulación (Campbell et al., 1998, Wright et al., 2002). De hecho, Sdf-1 y VEGF favorecen el reclutamiento de los progenitores en el endotelio vascular, mientras que IL8 promueve la movilización de células madre desde la médula ósea (Peled et al., 1999, Laterveer et al., 1996, Grunewald et al., 2006), y Hmgb1 y TNF-α actúan como

señales que inducen la migración de diferentes tipos de MSCs (Galvez et al., 2009b, Galvez et al., 2006, Palumbo et al., 2004).

Estos mecanismos se han descrito en gran medida en leucocitos, y no se conoce en profuncidad cómo se produce en los diferentes tipos de células madre, lo que limita la posibilidad de aumentar la eficiencia de su capacidad de migración al tejido diana.

De hecho se ha demostrado que los CMAs son capaces de restaurar la estructura y función de un área considerable del corazón en un modelo de ratón de infarto (Galvez et al., 2008), y se cree que el efecto parcial observado en este modelo podría deberse a la capacidad limitada de *homing* de los CMAs (Galvez et al., 2008). Para aumentar la eficiencia de los CMAs en el proceso de reparación sería necesario potenciar su capacidad de *homing* y su mantenimiento y supervivencia en el tejido una vez alcanzado el corazón.

Por tanto, es necesario conocer el papel de determinadas citoquinas y moléculas de adhesión en la migración de los CMAs de ratón y humano, tanto *in vitro* como *in vivo*, en un modelo de infarto de corazón. El pretratamiento de las células madre con citoquinas es un procedimiento simple, y la inclusión de una cantidad relativamente pequeña de ADNc en un vector viral, para inducir la expresión de determinadas moléculas de adhesión, es también un procedimiento factible en el contexto de la terapia celular autóloga con células madre. La estrategia desarrollada en este trabajo constituye un método simple y nuevo para mejorar el potencial de los CMAs para reparar el tejido cardiaco dañado y para aumentar la zona de regeneración, y podría adaptarse en el futuro para diferentes tipos de células madre en los protocolos de terapia celular clínicos.

11. Nuevas tecnologías aplicadas en biomedicina: ultrasonidos

11.1. Ultrasonidos

Los ultrasonidos son ondas acústicas cuya frecuencia es de 20000 Hz, superior a la que el oído humano es capaz de detectar. Los ultrasonidos tienen distintos efectos biológicos, dependiendo de los parámetros que se apliquen y, por tanto, del tipo de ultrasonido del que se trate (ter Haar, 2007, Miller et al., 2012). Por ejemplo, las propiedades mecánicas de los ultrasonidos mejoran la elasticidad de los tejidos, razón

por la cual se utilizan en procedimientos fisioterapéuticos (Padilla et al., 2014). Por otra parte, debido al efecto de las ondas acústicas en los tejidos, los ultrasonidos permiten reconstruir imágenes y, por tanto, se utilizan como método de diagnóstico por imagen. Debido a la interacción de las ondas acústicas en el tejido, se puede llegar a obtener información de alteraciones en la MEC, de la orientación de las fibras de colágeno y de la densidad del tejido, además de información relativa al número, tamaño y morfología de las células (Raum et al., 2007). Asimismo, los ultrasonidos también pueden aumentar la permeabilidad de la membrana celular, y, por tanto, se utilizan para el desarrollo de nuevas técnicas que permitan aumentar la eficiencia del suministro específico de fármacos en células y tejidos, aplicable en terapia antitumoral (Shohet et al., 2000, Christiansen et al., 2003, Bekeredjian et al., 2003, Pozzi et al., 2011). También, cabe destacar que la energía de los ultrasonidos puede convertirse en calor, y, entonces, según la primera ley de termodinámica, aumentaría las vibraciones, lo que supondría un incremento de la velocidad de las reacciones, traduciéndose en un incremento de la velocidad de los procesos biológicos (Scarponi et al., 2009).

11.2. Ultrasonidos pulsados de baja intensidad (LIPUS)

Los ultrasonidos pulsados de baja intensidad (LIPUS) constituyen un estímulo mecánico no invasivo, ni dañino, ni tóxico; que se transmite transcutaneamente a los tejidos como ondas acústicas de presión de alta frecuencia y baja amplitud (Qin et al., 2006). Los LIPUS no afectan a la viabilidad ni a las propiedades inmunomoduladoras de las células (Scarponi et al., 2009). La estimulación con LIPUS acelera la maduración del tejido óseo en modelos animales (Mayr et al., 2001) y en procedimientos clínicos (El-Mowafi and Mohsen, 2005), y cada vez se utiliza más como terapia no invasiva para promover la cicatrización de lesiones óseas y musculares (Romano et al., 2009). De hecho, la estimulación con LIPUS induce una serie de eventos intra, extra e intercelulares que resultan en una mejora de la reparación ósea y de los tejidos blandos (Padilla et al., 2014). La estimulación de células con LIPUS tiene varios efectos a diferentes niveles. La estimulación con LIPUS promueve la proliferación celular y la síntesis de ADN en fibroblastos dérmicos (Zhou et al., 2004), osteogénesis (Schortinghuis et al., 2005), síntesis de proteínas (Suzuki et al., 2009b, Suzuki et al.,

2009a), y consumo de calcio en osteoblastos, fibroblastos gingivales y células del periósteo (Leung et al., 2004), pero no en condrocitos (Zhang et al., 2003). Además, la estimulación con LIPUS induce la reorganización de las fibras de actina que forman las adhesiones focales y el citoesqueleto de las células (Zhou et al., 2004). Por otro lado, un estudio reciente apunta a un aumento de la angiogénesis tras estimular células endoteliales en un modelo porcino de isquemia crónica del miocardio (Hanawa et al., 2014). Estos atributos apuntan a que los LIPUS podrían suponer una nueva metodología beneficiosa para reparar el daño en diferentes tejidos. De hecho, el potencial de la estimulación con LIPUS en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares se desconoce.

La hipótesis se basa en que los efectos de los LIPUS en la piel y el tejido óseo, en concreto, la diferenciación celular y la reorganización del citoesqueleto, sean reproducibles en el corazón, de tal manera que se pudieran utilizar los LIPUS para modificar los CMAs desarrollando, así, una nueva estrategia en el ámbito de la terapia celular cardiaca. En este trabajo se ha aplicado de manera novedosa la estimulación con LIPUS sobre CMAs, se han analizado las modificaciones inducidas en las células y se ha descrito un modelo del mecanismo subyacente por el cual los LIPUS inducen modificaciones beneficiosas en las células.

Objetivos

OBJETIVOS

El infarto de miocardio es actualmente una de las mayores causas de fallo cardiaco y una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Los protocolos de terapia celular utilizando diferentes tipos de células madres, han alcanzado sólo un éxito parcial. La migración y el potencial de diferenciación de las células madre, así como su capacidad de regeneración o reparación del tejido son puntos clave que aún quedan por resolver para poder implementar los protocolos de terapia celular desarrollados en investigación básica en el ámbito clínico. El objetivo de este trabajo es desarrollar una nueva herramienta útil para el tratamiento del daño cardiaco en el ámbito de la terapia celular.

Los CMAs son células madre mesenquimales residentes en el corazón, capaces de diferenciarse a CMCs y de restaurar parcialmente el tejido dañado del corazón en un modelo de infarto en ratón. El éxito parcial de los CMAs se atribuye a la capacidad limitada de *homing* de estas células.

Considerando que tanto las citoquinas como algunas moléculas de adhesión, presentes en la superficie de las células, son imprescindibles para el proceso de migración celular, y que se ha demostrado que los LIPUS son capaces de inducir modificaciones a nivel de la proliferación celular, del citoesqueleto y de la expresión génica, y con el fin de potenciar las propiedades de los CMAs y su eficiencia, se proponen, además del aislamiento de los CMAs, dos estrategias experimentales, que constituyen los objetivos de esta tesis:

- Aislamiento y caracterización de los CMAs, procedentes de ratón y humano.

Estrategia I: Estudio del papel de las citoquinas y moléculas de adhesión en la migración de los CMAs.

- Estudio del papel de las citoquinas en la migración de los CMAs.
- Estudio del papel de las moléculas de adhesión en la migración de los CMAs.
- Diseño de un protocolo basado en el papel de las citoquinas y las moléculas de adhesión, para aumentar la capacidad migratoria de los CMAs.

Estrategia II: Estudio de los efectos de la estimulación de los CMAs con LIPUS.

- Determinación de la dosis óptima del tratamiento de estimulación de los CMAs con LIPUS.
- Análisis de los efectos de la estimulación con LIPUS en la viabilidad, la migración y la capacidad de diferenciación de los CMAs, así como en el potencial de reparación de los CMAs.
- Descripción del mecanismo por el cual los LIPUS inducen modificaciones en las propiedades de los CMAs.

La inspiración existe, pero tiene que encontrarte trabajando.

Pablo Picasso.

Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Modelos animales y cultivos celulares

1. Modelos animales

En este trabajo utilizaron ratones C57BL/10, C57BL/6 y SCID-beige, procedentes de los Laboratorios Charles River (Wilmington, MA, EE.UU.) y ratones Homo-eGFP de los laboratorios The Jackson (Bar Harbor, ME, EE.UU.).

2. Líneas celulares

2.1. Cardiomesoangioblastos (CMAs)

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando células de ratón y de humano. Para ello, se aislaron CMAs a partir de corazones de ratón (mCMAs) y a partir de muestras humanas de tejido cardiaco (hCMAs). Los mCMAs se obtuvieron de ratones C57BL/6 de tres meses. Los animales fueron sacrificados mediante cámara de CO_2 siguiendo los procedimientos del Instituto Nacional de Salud y Cuidado Animal. Los hCMAs se obtuvieron a partir de muestras de tejido cardiaco tomadas de pacientes, de ambos sexos, de entre 56 y 76 años sometidos a cirugía torácica cardiaca en el Hospital San Raffaele de Milán (Italia), tras el consentimiento informado y siguiendo los principios de *WMA Declaration of Helsinki and the NIH Belmont Report*.

2.2. CMA-GFP+

Para la obtención de poblaciones GFP+, los CMAs fueron transducidos con un vector lentiviral de tercera generación pRRL-sin-18-CMV-XB-eGFP (figura 2). Para optimizar la eficiencia de la infección viral las células fueron tratadas con polibreno (8 μg/ml). Las células GFP+ fueron seleccionadas y separadas mediante citometría de flujo. Estas células fueron expandidas y mantenidas en cultivo estableciendo las poblaciones de mCMA-GFP+ y hCMA-GFP+.

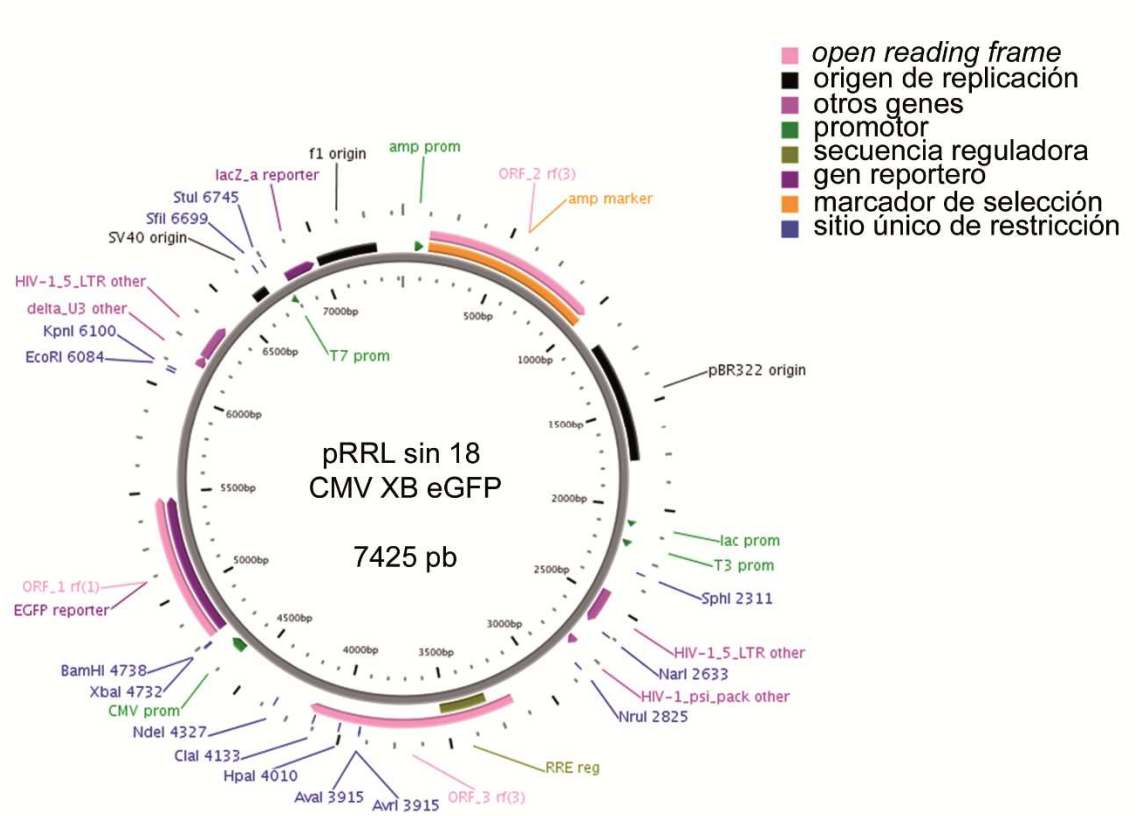


Figura 2. Esquema del vector lentiviral utilizado para la obtención de la población de CMA-GFP+.

2.3. Otras líneas

Los CMCs neonatales de ratón se aislaron siguiendo el procedimiento descrito por Messina (Messina et al., 2004). Los CMCs se mantuvieron en cultivo en medio de cultivo estándar *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM) con suero fetal bovino (FBS) al 20 % (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.), 2 mM de L-glutamina (Lonza; Basilea, Suiza), 105 U/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza; Basilea, Suiza) y HEPES al 10 % (Lonza; Basilea, Suiza).

Se utilizó una línea estándar de células endoteliales de ratón de la microvasculatura. Estas células se mantuvieron en cultivo en DMEM con FBS al 10 % (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.), 2 mM de L-glutamina (Lonza; Basilea, Suiza), 105 U/ml de penicilina / estreptomicina (Lonza; Basilea, Suiza) y HEPES al 10 % (Lonza; Basilea, Suiza).

Los fibroblastos utilizados fueron de una línea comercial de fibroblastos NIH 3T3 (Lonza; Basilea, Suiza). Los fibroblastos se mantuvieron en cultivo en DMEM con FBS al 10 % (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.), 2 mM de L-glutamina (Lonza;

Basilea, Suiza), 105 U/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza; Basilea, Suiza) y HEPES al 10 % (Lonza; Basilea, Suiza).

3. Aislamiento de CMAs. Método Explante

Los CMAs se aislaron a partir de corazones de ratón y a partir de muestras humanas de tejido cardiaco, tomadas del ventrículo, mediante el método explante (Galvez et al., 2008, Bernal et al., 2012a) (véase el Anexo I). El método explante fue propuesto para el aislamiento de mesoangioblastos por Minasi (Minasi et al., 2002), diseñado específicamente para el aislamiento de CMAs por Gálvez (Galvez et al., 2008) y posteriormente modificado y puesto a punto para la obtención de precursores mesenquimales de diferentes tejidos adultos (Bernal et al., 2012a) (véase el Anexo I).

Para llevar a cabo el método explante se utilizaron placas multipocillo de 24 pocillos. En el contorno del fondo de cada pocillo se distribuyeron 100 µl de *Matrigel* (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), y se dejó gelificar en el incubador a 37 °C. El *Matrigel* previamente había sido preparado con DMEM (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.) en relación 1:1.

Para obtener los mCMAs se procedió al sacrificio de los ratones siguiendo los procedimientos del Instituto Nacional de Salud y Cuidado Animal. Se extrajo el corazón y se separó el ventrículo, a partir del cual se aíslan los CMAs. Para obtener los hCMA, se utilizaron biopsias de tejido cardiaco procedentes del ventrículo. Ambos tipos de muestras fueron disgregadas en pequeños fragmentos con el fin de facilitar la salida de las células. Una vez disgregados, se colocaron dos o tres fragmentos de tejido en el centro de cada pocillo y sobre ellos se añadió suavemente medio de cultivo DMEM suplementado con FBS al 10 % (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.), 2 mM de L-glutamina (Lonza; Basilea, Suiza), 105 U/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza; Basilea, Suiza) y HEPES al 10 % (Lonza; Basilea, Suiza), denominado en este trabajo medio completo. Los explantes se mantuvieron en el incubador a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO_2, 21 % de O_2 y 95 % de humedad (figura 3).

A los pocos días empezaron a salir del explante unas células pequeñas, redondeadas y refringentes sobre una monocapa de fibroblastos. Estas células fueron recogidas mediante pipeteo suave y clonadas por dilución límite, obteniendo unidades

formadoras de colonias, y permitiendo posteriormente la formación de éstas. Así se aisló la población de CMAs. Los CMAs procedentes de ratón se han denominado mCMAs y los procedentes de tejido humano hCMAs. El término CMAs se ha utilizado para referirse a mCMAs y hCMAs en conjunto.

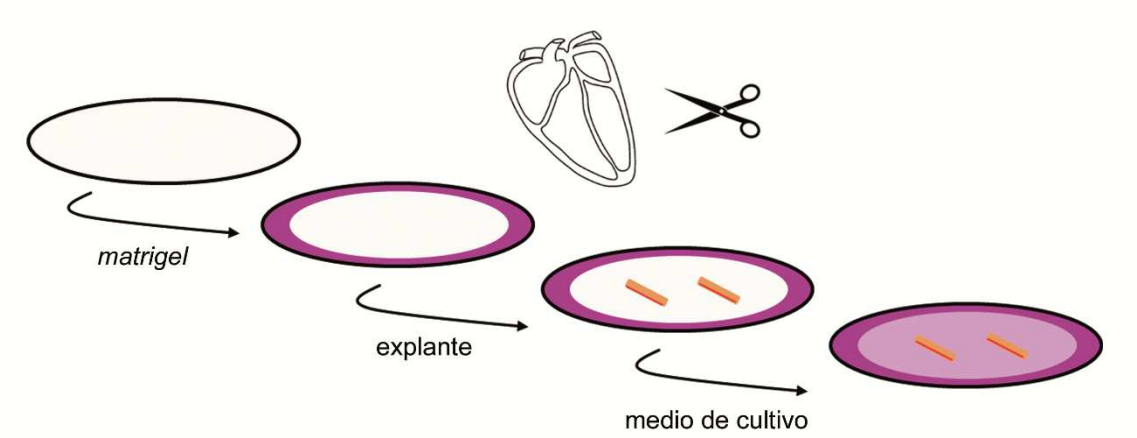


Figura 3. Esquema del procedimiento del método explante. El método explante se utilizó para el aislamiento de CMAs a partir de corazones de ratón y muestras de tejido cardiaco humano.

4. Condiciones de cultivo

Los CMAs fueron expandidos y mantenidos en cultivo, utilizando placas convencionales de cultivo celular (BD Biosciences; San José, CA, EE.UU.) y medio de cultivo completo: DMEM suplementado con FBS al 10 % (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.), 2 mM de L-glutamina (Lonza, Basilea, Suiza), 105 U/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza; Basilea, Suiza) y HEPES al 10 % (Lonza; Basilea, Suiza). Los cultivos celulares se mantuvieron en las siguientes condiciones de cultivo: en el incubador a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO_2, 21 % de O_2 y 95 % de humedad.

5. Caracterización celular

Los CMAs fueron caracterizados según los marcadores de superficie (tabla 2) mediante citometría de flujo. Para la caracterización de los marcadores de superficie se pasaron por el citómetro tres tipos de tubos con diferente contenido (figura 4). Uno de ellos contenía sólo células y se ha utilizado como control negativo para normalizar la autofluorescencia de las células (figura 4, Tubo I). Los otros dos tubos contenían

células y anticuerpos para la detección de los marcadores de superficie (tabla 2). Uno de estos tubos contenía células y el anticuerpo anti-CD44 conjugado al fluorocromo Alexa488 (A488) (figura 4, Tubo II); y el otro contenía células y la mezcla de anticuerpos para la caracterización del resto de marcadores considerados (figura 4, Tubo III). La incubación con el anticuerpo anti-CD44, considerado como control positivo de los CMAs porque es un marcador mesenquimal, se llevó a cabo en un tubo independiente porque el fluorocromo utilizado (A488) ocupa el mismo rango en el espectro que FITC, el fluorocromo conjugado al anticuerpo anti-CD31 que se utilizó.

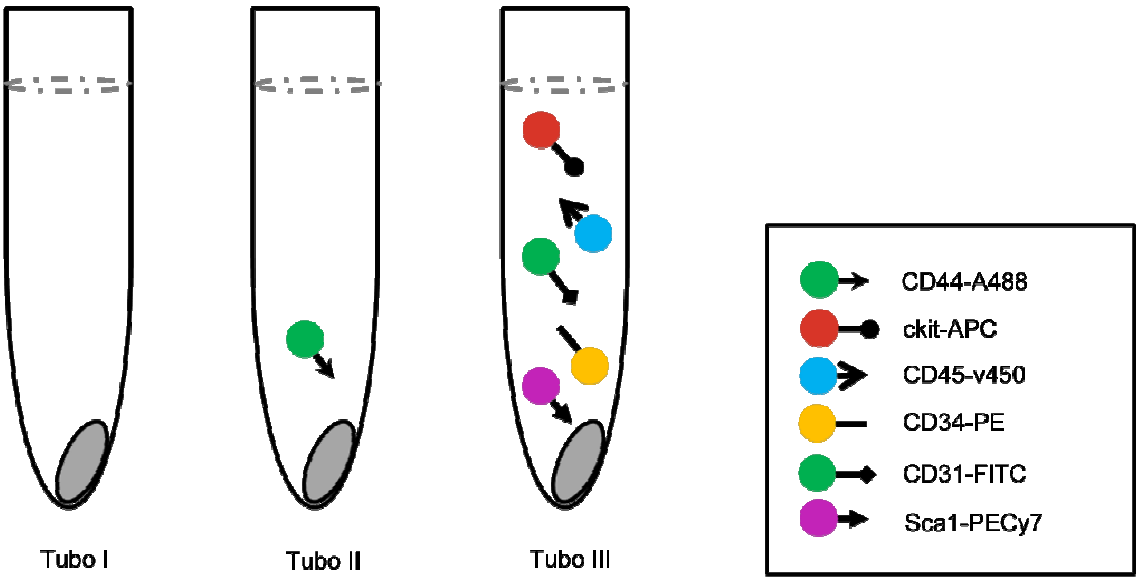


Figura 4. Anticuerpos y fluorocromos utilizados en citometría de flujo para la caracterización de los marcadores de superficie de los CMAs.

Se prepararon 10^6 células/tubo de citometría en PBS con albúmina de suero bovino (PBS-BSA) al 0.1 %. Las células fueron bloqueadas incubándolas con anti-Fc (1:400) en PBS-BSA al 0.1 % durante 15 min en hielo y oscuridad. Tras un lavado con PBS-BSA al 0.1 % y una centrifugación a 1200 rpm, durante 5 min, a 4 °C; el precipitado celular del control negativo fue incubado con PBS-BSA al 0.1 %. Los otros dos precipitados fueron incubados con PBS-BSA al 0.1 % junto al anticuerpo (tubo II) o mezcla de anticuerpos (tubo III) en dilución 1:100 en PBS (tabla 2). La incubación tuvo lugar en hielo y oscuridad durante 15 min. Por último, las células se lavaron con PBS-BSA al 0.1 %, y se centrifugaron a 1200 rpm, durante 5 min, a 4 °C. Los precipitados

celulares se resuspendieron en PBS-BSA al 0.1 % y se mantuvieron en hielo y oscuridad hasta su análisis en el citómetro.

Para la caracterización celular según los marcadores de superficie mediante citometría de flujo se utilizó el citómetro de flujo *LSRFortessa Analyzer* (BD Biosciences; San Jose, CA, EE.UU.), y los resultados se analizaron con el programa *BD FACSDiva*.

Antígeno	Marcador	Fluorocromo	Casa comercial
CD44	mesenquimal	Alexa488	Biolegend; San Diego,CA, EE.UU.
c-Kit (CD117)	células madre	APC	BD Biosciences; Franklin Lakes NJ, EE.UU.
CD45 (LCA)	hematopoiético	v450	BD Biosciences; Franklin Lakes NJ, EE.UU.
CD34	mesenquimal	PE	BD Biosciences; Franklin Lakes NJ, EE.UU.
CD31	endotelial	FITC	BD Biosciences; Franklin Lakes NJ, EE.UU.
Sca1 (Ly6A/E)	células madre	PE-Cy7	BD Biosciences; Franklin Lakes NJ, EE.UU.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la caracterización de los marcadores de superficie de los CMAs mediante citometría de flujo.

II. Tratamientos celulares

1. Pretratamiento con citoquinas

Los CMAs fueron pretratados, después de un ensayo dosis-respuesta (datos no mostrados), durante 12 h en condiciones de cultivo, con las siguientes citoquinas (Peprotech Inc.; Rocky Hill, NJ, EE.UU.): Sdf-1 e IL-8 (50 ng/ml), Mcp-1 (80 ng/ml), y TNF-α y FGF (30 ng/ml). Tras este pretratamiento las células fueron utilizadas en diferentes experimentos.

2. Transfecciones

Los CMAs fueron modificados para la expresión de L-Selectina y β2-integrina. Para ello el ARN de ambas moléculas de adhesión fue clonado en un vector pT7T3D-Pac1 (Galvez et al., 2006). Los insertos fueron clonados en un vector de expresión pIRES2-eGFP (Clontech Laboratories; Madison, WI, EE.UU.) y transfectados cada uno por separado y juntos, en CMAs con lipofectamina (Invitrogen; Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.). Los CMA-GFP+ fueron seleccionados y separados por citometría de flujo, y posteriormente, utilizados en diferentes experimentos.

3. Estimulación con LIPUS

3.1. Equipo de estimulación

Los CMAs fueron estimulados con el equipo de estimulación de LIPUS, diseñado y desarrollado por el Profesor Raum (figura 5). Este equipo está compuesto por una cubeta de agua (1), colocada sobre una placa térmica (2) para mantener el agua a 37 ºC; una plataforma (3) que acoge la cámara de incubación (4) en la que se coloca la placa (5) dónde se siembran las células; y una estructura motriz (6) a la que está acoplado el transductor de ultrasonidos (7). Este equipo cuenta con un controlador motriz (8) que permite y dirige el movimiento en tres planos de la estructura (6), a la que está acoplado al transductor de ultrasonidos (7). El equipo cuenta con un generador de ultrasonidos (9) y un amplificador de la señal acústica (10), además de dos aparatos de calibración de la señal acústica (11), que determinan el punto en el plano *z* en el cual se tiene que disponer la placa (5) para que la señal de ultrasonidos llegue a las células con unos parámetros determinados. Además, está conectado a dos aparatos que mantienen los niveles de CO_2 al 5 % (12), y de humedad al 95 % (13) dentro de la cámara (4). Todo el equipo está conectado a un ordenador (14), con el cual se ordenan las instrucciones programadas en *MatLab*, para llevar a cabo la calibración de la señal acústica, la calibración de la posición *z* de la placa y, finalmente, la estimulación de las células con LIPUS.

Para la estimulación, la placa multipocillos de 24 pocillos se colocó en la cámara de incubación (4), que está en el plano de traslación vertical de la estructura. El transductor de ultrasonidos (centro de frecuencia: 5 MHz; diámetro: 15 mm; distancia focal 16.5 mm; ancho del haz en el plano focal: 0.48 mm; STT Richter, Muehlanger, Alemania) fue montado en el plano de traslación horizontal en dos ejes y sumergido en un baño de agua estéril, desionizada y desgasificada, a 37 ºC. El sistema de movimiento permite el posicionamiento preciso de la cámara de incubación y el transductor con una precisión de 1 µm.

Para la estimulación, el transductor se colocó por debajo de la placa, centrado respecto a un pocillo en concreto y 13.3 mm por encima del punto focal del transductor. La distancia correcta fue determinada en función el tiempo de transmisión de la señal reflejada en la superficie inferior de la placa multipocillo.

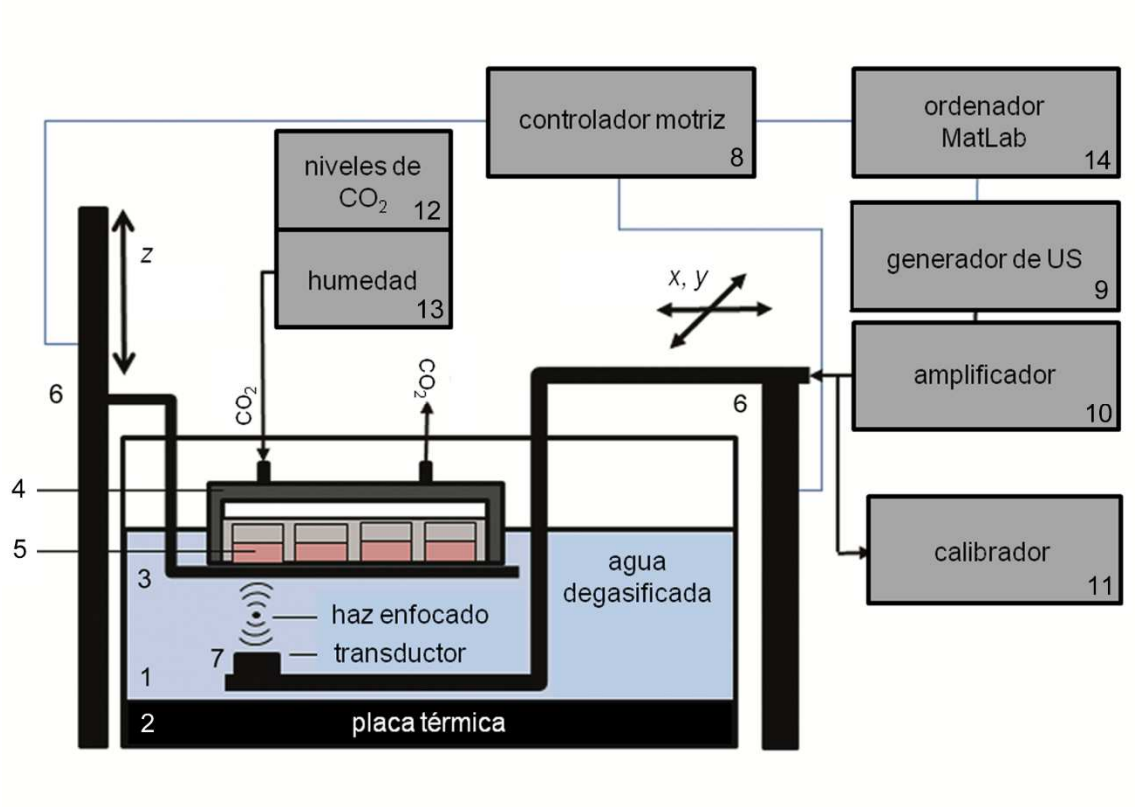


Figura 5. Esquema del equipo de estimulación con LIPUS. 1, cubeta de agua estéril, desinizada y desgasificada; 2, placa térmica; 3, plataforma; 4, cámara de incubación; 5, placa multipocillo de 24 pocillos; 6, estructura motriz; 7, transductor de ultrasonidos (US); 8, controlador motriz; 9, generador de ultrasonidos (US); 10, amplificador; 11, calibrador; 12, aparato de mantenimiento de CO2 al 5 %; 13, aparato de mantenimiento de la humedad al 95 %; 14, ordenador. La placa multipocillo se coloca en la cámara durante la estimulación. El transductor, bajo la placa multipocillo y colocado en el centro de un pocillo, emite esféricamente las ondas acústicas a 5 MHz. La distancia entre el transductor y la parte inferior de la placa multipocillo se ajusta en el eje *z* en base al tiempo de reflexión de la onda acústica desde el transductor a la placa multipocillo. El posicionamiento y la señal acústica son controlados por un ordenador mediante un paquete de herramientas personalizado y desarrollado a través de *MatLab*.

Esta configuración asegura el acoplamiento directo de las ondas de sonido a la parte inferior de la placa a través del agua, así como un haz acústico divergente homogéneo, con una superficie haz -6 dB efectiva de 1,9 cm² en la parte inferior de la placa. El transductor se excita por un generador arbitrario de ondas acústicas (33522A, Agilent Keysight Technologies; Santa Rosa, CA, EE.UU,) con una señal de ráfaga de 5 MHz de 2 ms de duración (pulsado 80% on, 20% off) a una tasa de repetición de 100 Hz durante 20 min. La amplitud de salida fue de 170 mV en el generador, y fue amplificado por un amplificador de potencia (325LA, E&I, Rochester, NY, EE.UU.). Los componentes de hardware, el posicionamiento y la estimulación se controlan mediante un ordenador utilizando un paquete de herramientas personalizado y

desarrollado a través de *MatLab* (Mathworks, Natick, MA, EE.UU.). La potencia de salida acústica de 83 mW/cm^2 después de la propagación a través de la parte inferior de placa multipocillos se midió usando un blanco de espuma absorbente conectado a una resistencia (Lewin et al., 2003).

3.2. Determinación de la dosis

La dosis de LIPUS se determinó considerando la supervivencia de las células y la ausencia de efectos tóxicos, y teniendo en cuenta, además, los resultados de la tinción del citoesqueleto de F-actina con faloidina conjugada a rodamina, y los resultados de los ensayos de migración *in vitro* por *Transwell*.

Para determinar la dosis de LIPUS más adecuada para la estimulación de los CMAs, se estimularon mCMAs y hCMAs con LIPUS con una frecuencia de 5 MHz durante 20 min (pulsado 80 % on, 20 % off), variando los niveles de intensidad y duración del tratamiento. Los LIPUS fueron aplicados a 30 mW/cm^2 o 83 mW/cm^2 de intensidad, durante uno, dos o tres días. Finalmente, tanto la reorganización del citoesqueleto de actina como el aumento significativo de la capacidad de migración de los CMAs estimulados con LIPUS a 83 mW/cm^2 durante 3 días (datos no mostrados), determinaron la dosis que se eligió para estimular los CMAs.

3.3. Condiciones de la estimulación con LIPUS

3.3.1. Parámetros físicos

Los CMAs fueron estimulados con LIPUS a una intensidad de 83 mW/cm^2, con una frecuencia de 5 MHz, 20 min al día (pulsado 80 % *on*, 20 % *off*), durante 3 días.

3.3.2. Parámetros fisiológicos

Los CMAs se mantuvieron en todo momento en medio de cultivo completo, y en condiciones de cultivo, tanto fuera en el incubador como en la cámara del equipo de estimulación.

3.4. Procedimiento de la estimulación con LIPUS

Para llevar a cabo la estimulación con LIPUS, se sembraron 2.5·10^3 células/pocillo en

placas multipocillo de 24 pocillos con medio de cultivo completo. Los CMAs se mantuvieron en el incubador durante 24h. Después, la placa se metió dentro de la cámara y ésta se colocó en la plataforma del equipo. De los 24 pocillos de la placa, 20 recibieron LIPUS y 4 no. Antes de cada estimulación, se calibró el punto *z* en el que había que colocar la placa con las células. El equipo se calibró colocando dentro de la cámara una placa multipocillo de 24 pocillos con agua. Utilizando el calibrador, se emitió y se detectó la señal acústica para determinar el punto *z* en el cual se recibe la señal con un tiempo de transmisión de 48 µs y con una intensidad ± 0.1. Entre cada estimulación, las células se han mantenido en el incubador en condiciones de cultivo. 24 h después del tercer día de estimulación las células fueron criopreservadas en FBS con 10 % de DMSO y conservadas a -80 ºC.

Para realizar todos los ensayos experimentales, los CMAs fueron descongelados en un baño de agua a 37 ºC y sembrados en medio de cultivo completo. Las células de los 20 pocillos que recibieron LIPUS son células estimuladas con LIPUS (US-CMAs), y las de los otros 4 pocillos que no han recibido LIPUS son células control (CTRL-CMAs). Las células utilizadas para los ensayos fueron mantenidas en cultivo entre 1 y 5 pases tras la estimulación. Para el desarrollo de este trabajo se han llevado a cabo más de cinco rondas independientes de estimulación con LIPUS tanto en mCMAs como en hCMAs.

III. Ensayos y experimentos

1. Estudio de la proliferación celular y de la apoptosis

1.1. Análisis de la proliferación celular: ensayo de incorporación de BrdU

La proliferación celular de los CMAs se cuantificó mediante la incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) utilizando el kit comercial "*BrdU Incorporation Assay kit*" (Merck Millipore; Billerica, MA, EE.UU.). Brevemente, se sembraron $5{\cdot}10^3$ células/pocillo en una placa multipocillo de 96 pocillos y se incubaron con BrdU durante 24 h en condiciones de cultivo. A continuación, se fijaron las células y se incubaron con un anticuerpo primario anti-BrdU. Después, las células se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). La incorporación celular de BrdU se midió con el espectrofotómetro *Benchmark Plus microplate* (Bio Rad; Hercules, CA, EE.UU.) a 450 y 540 nm.

1.2. Análisis de la apoptosis: método ratiométrico por citometría de flujo

Para cuantificar la presencia de células apoptóticas en el cultivo celular, se evaluó la asimetría de la membrana celular mediante citometría de flujo. Para ello, las células se procesaron siguiendo las instrucciones del kit comercial "*Violet Ratiometric Membrane Asymetry Probe / Dead Cell Apoptosis Kit*" (Invitrogen, Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.) (Shynkar et al., 2007). Brevemente, las células en cultivo fueron levantadas con tripsina y lavadas con PBS. Se prepararon 10^6 células/tubo de citometría y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Posteriormente, las células se incubaron con los reactivos F2N12S 200nM y SYTOX *Advanced* (1 mM) durante 5 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Después, las células se analizaron en el citómetro de flujo *LSRFortessa Analyzer* (BD Biosciences; San Jose, CA, EE.UU.) a 405 y 488 nm, y los resultados fueron analizados con el programa *BD FACSDiva*.

2. Estudio de la estructura celular

2.1. Morfología celular: observación de las células en cultivo

Los CMAs se sembraron en condiciones de cultivo y 24 h después se observaron a través de un microscopio invertido IX51 (Olympus America Inc.; Center Valley, PA, EE.UU.) a 10x.

2.2. Cuantificación de células binucleadas en cultivo

Los CMAs se sembraron en condiciones de cultivo y se observaron a través de un microscopio invertido de contraste de fase IX51 (Olympus America Inc.; Center Valley, PA, EE.UU.) a 20x. Para cuantificar la presencia de células con dos núcleos se tomaron imágenes de 5 campos aleatorios en cada muestra y se contó el número de células binucleadas.

2.3. Caracterización del citoesqueleto de F-actina

La caracterización del citoesqueleto de F-actina se realizó mediante la tinción de CMAs con faloidina conjugada con rodamina (*phalloidin-TRITC*) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.). Para ello, se sembraron $2.5 \cdot 10^4$ células/cristalito de cultivo de 12 mm de diámetro (Thermo Scientific; Waltham, MA, EE.UU.), recubiertos con gelatina al 0.1 %,

y se mantuvieron en condiciones de cultivo. Tras 24 h, los cristalitos se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con PFA al 4 % durante 10 min a temperatura ambiente y oscuridad. Tras 2 lavados por inmersión en PBS y uno en TBS, las células fueron incubadas con faloidina conjugada con rodamina durante 1 h. A continuación, los cristalitos se lavaron 3 veces por inmersión en TBS y se incubaron con *4', 6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride* (DAPI) (300nM) (Invitrogen, Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.) durante 30 min. Tras 3 lavados por inmersión en TBS los cristalitos se montaron en portas utilizando el medio de montaje *ProLong Antifade* (Invitrogen, Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.). Todo el proceso de tinción se realizó en cámara húmeda, a temperatura ambiente y en oscuridad. Las imágenes se tomaron con el microscopio confocal Leica DM2500/TCS SPE (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania).

3. Estudio de las propiedades biomecánicas de la membrana celular

3.1. Viscosidad y maleabilidad de la membrana celular: ensayo de microaspiración capilar

La maleabilidad de la membrana celular de los CMAs se evaluó a través del ensayo de microaspiración capilar (Hochmuth, 2000, Plaza et al., 2014) (véase el Anexo II) utilizando un equipo similar al descrito por Trickey (Trickey et al., 2000) y microcapilares con un diámetro interno de 10 µm, a partir de células en cultivo. Las células se levantaron con tripsina y se centrifugaron a 800 rpm durante 5 min. El precipitado celular fue resuspendido en medio de cultivo. A continuación, se prepararon las muestras con 0.5 ml de suspensión celular y se colocaron en un microscopio óptico invertido Leica DMI3000B (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania). El microcapilar se conectó a un depósito de agua destilada y se aplicó presión diferencial por una diferencia en la altura entre el depósito y las células. Esta presión diferencial ΔP se aplicó para facilitar la manipulación en dos pasos: al inicio del experimento (t=0) a 150 Pa y 20 s después (t=20s) a 400 Pa. Las células fueron analizadas durante las primeras 3 h tras ser levantadas con tripsina. Todo el proceso se llevó a cabo a 25 ºC.

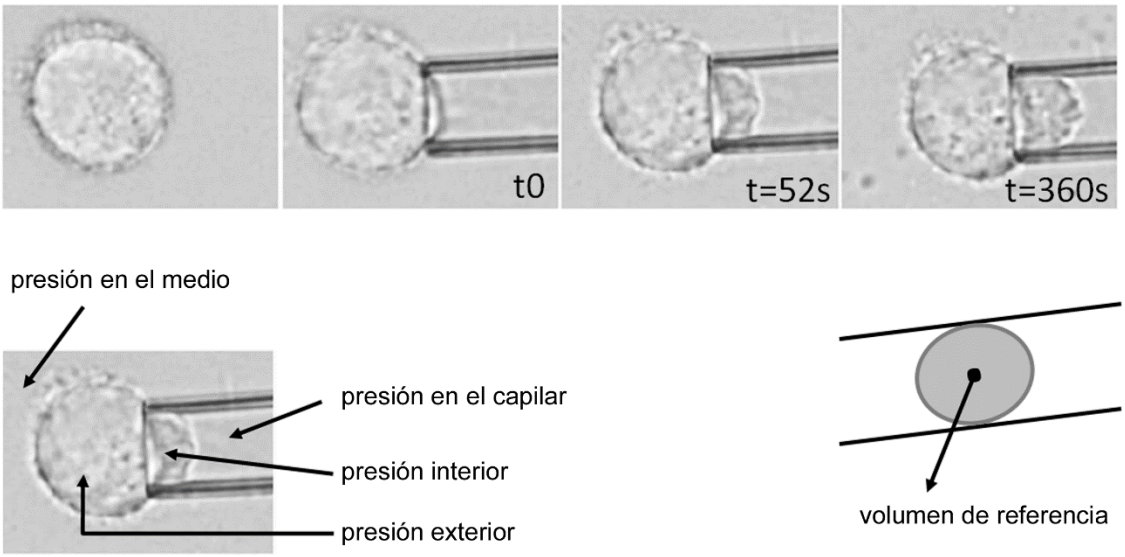


Figura 6. Elementos considerados en el cálculo de la viscosidad de los CMAs.

El proceso de aspiración se monitorizó tomando imágenes para medir el volumen de la célula dentro de un microcapilar. Para cuantificar los volúmenes en la situación final, el volumen dentro del microcapilar se aproximó por un cilindro y una semiesfera, y el volumen fuera del microcapilar se aproximó por un elipsoide. El volumen aspirado, considerado el volumen del interior, y se calculó como el volumen dentro del microcapilar (el cilindro más la semiesfera) menos la parte esférica correspondiente al volumen inicial de la célula dentro del microcapilar (figura 6). Finalmente, la viscosidad de las células fue cuantificada utilizando una ecuación lineal obtenida de Needham and Hochmuth (Yeung and Evans, 1989).

3.2. Determinación de la capacidad de adhesión celular a la MEC

La capacidad de adhesión celular de los CMAs a diferentes componentes de la MEC se determinó utilizando el kit comercial "*CytoSelect 48-well Cell Adhesion Assay*" (Cell Biolabs; San Diego, CA, EE.UU.) (Cervera et al., 2008). Brevemente, se sembraron $1{\cdot}10^5$ células/pocillo en medio completo en una placa multipocillo de 48 pocillos. Esta placa estaba pretratada con fibronectina, colágeno I, colágeno IV, laminina y fibrinógeno, así como con pocillos sin matriz. Después de una hora de incubación en condiciones de cultivo, se retiró el medio por inversión de placa y las células que quedaron adheridas fueron teñidas y, a continuación, desteñidas para cuantificar las células adheridas por

espectofotometría. La cuantificación se llevó a cabo en el espectofotómetro *Benchmark Plus microplate* (Bio Rad; Hercules, CA, EE.UU.), a 560 nm.

4. Expresión génica

4.1. Estudio genómico de expresión: *microarrays*

4.1.1. *Microarray* de 125 genes de moléculas de adhesión y MEC

Para el análisis del ARN, se extrajo todo el ARN de CMAs utilizando TRIzol (Invitrogen, Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.). El ADNc se obtuvo mediante retrotranscripción y se hibridó en una matriz de expresión *GEArray MM-010* para moléculas de adhesión y de la MEC (SuperArray Bioscience Corporation; Frederick, MD, EE.UU.), siguiendo las indicaciones proporcionadas por la casa comercial. Los datos fueron analizados por densitometría utilizando el *GEAarray Expression Analysis Suite* (SuperArray Bioscience Corporation; Frederick, MD, EE.UU.). Los niveles de ARN fueron expresados como la densidad relativa después de normalizarlos con la señal de hibridación a β-actin. Los resultados fueron confirmados por *western blot*.

4.1.2. *Microarray* de expresión génica

Las muestras de ARN se obtuvieron a partir de mCMAs sometidos a cuatro rondas independientes de tratamiento con LIPUS. El aislamiento de ARN se realizó a partir de células en cultivo, a las cuales se les retiró el medio y se les añadió 1 ml de *Trizol Reagent* (Invitrogen, Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.) que se extendió homogéneamente por la superficie de cultivo. Con la ayuda de un raspador celular (BD Biosciences; San José, CA, EE.UU.), se levantaron las células y se recogieron en un tubo *eppendorf*. El aislamiento de ARN se llevó a cabo mediante el kit comercial "*Direct-zol RNA MiniPrep*" (Zymo Research; Irvine CA, EE.UU.), siguiendo el prodecimiento indicado por la casa comercial. La integridad de ARN total purificado fue analizada con el Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies; Palo Alto, CA, EE.UU.). Una vez aislado el ARN se conservó a -80 °C hasta su procesamiento.

El ARN se amplificó y se marcó para el análisis de la expresión génica utilizando un *microarray* de un solo color (Agilent Technologies; Palo Alto, CA, EE.UU.). Brevemente, 200 ng del ARN total se retrotranscribió utilizando el cebador del

promotor T7 y MMLV-RT. A continuación, el ADNc se pasó a ARNa utilizando una ARN polimerasa T7, que amplifica simultáneamente las muestras marcadas e incorpora el marcaje Cy3 a la citidinatrifosfato. Las muestras fueron hibridadas a un *microarray* de ratón *Mouse GE 4x44K v2 Microarrays* (G2519F-026655, Agilent Technologies; Palo Alto, CA, EE.UU.). 1.65 µg de ARNa marcado con Cy3 fue hibridado durante 17 h, a 65 ºC, en un horno de hibridación (G2545A, Agilent Technologies; Palo Alto, CA, EE.UU.) a 10 rpm, en una concentración final 1x de tampón de hibridación *GEx Hybridization Buffer HI-RPM*, siguiendo las instrucciones de la casa comercial *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis* (Agilent Technologies; Palo Alto, CA, EE.UU.). Los *microarrays* fueron lavados y secados por centrifugación. Después, se escanearon a 5µm de resolución en un escanear de *microarrays Agilent DNA Microarray Scanner* (G2565BA, Agilent Technologies; Palo Alto, CA, EE.UU.) utilizando el formato para 4x44k de *arrays* de un solo color. Las imágenes proporcionadas por el escáner fueron analizadas mediante el programa *Feature Extraction V10* (Agilent Technologies; Palo Alto, CA, EE.UU.). Los datos fueron importados al programa *GeneSpring® GX version 12.5* (Agilent Technologies; Palo Alto, CA, EE.UU.). Posteriormente, se realizó la normalización de los cuartiles y los valores obtenidos para cada sonda se expresaron en log2. Las sondas fueron también marcadas (detectado, no detectado) utilizando la configuración predeterminada de *GeneSpring®* (Pradervand et al., 2009). Los datos obtenidos del *microarray* fueron analizados utilizando el programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA).

4.2. Caracterización del perfil de expresión génica

4.2.1. Aislamiento de ARN

El aislamiento de ARN se realizó a partir de CMAs en cultivo, a los que se retiró el medio y se añadió 1 ml de *Trizol Reagent* (Invitrogen, Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.) que se extendió homogéneamente por la superficie de cultivo. Con la ayuda de un raspador celular (BD Biosciences; San José, CA, EE.UU.), se levantaron las células y se recogieron en un tubo *eppendorf*. Después, se añadieron 0.2 ml de cloroformo y se agitó suavemente. La mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente y, posteriormente, se centrifugó 12000 rpm, durante 15 min a 4 ºC. A continuación, se

separó la fase acuosa del resto de la mezcla en un nuevo tubo *eppendorf* y se añadieron 0.5 ml de isopropanol. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 rpm, durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugó a 8800 rpm, durante 5 min, a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el precipitado se dejó secar al aire. Después, se resuspendió en 40 µl de H_2O milliQ sin ARNasas.

La concentración del ARN se cuantificó con un espectofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Thermo Scientific; Waltham, MA, EE.UU.), y se comprobó su integridad por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, utilizando un transiluminador. Las muestras se criopreservaron a -80 °C hasta su uso.

4.2.2. RT- PCR

La síntesis del ADNc a partir del ARN aislado se realizó utilizando el kit comercial de transcripción reversa "*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*" (Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.). Brevemente, se preparó una mezcla de reacción con 2 µl de un tampón estándar, 2 µl de cebadores aleatorios 10 nM, 0.8 µl de una mezcla de desoxinucleótidos de adenina, timidina, guanina y citosina 25 nM y 1 µl de enzima retrotranscriptasa *Multiscript RT* con H_2O sin ARNasa. A esta mezcla se le añadió 1 µg de ARN en un volumen final de 20 µl de reacción. A continuación, la mezcla de reacción se calentó a 25°C durante 10 min, a 37°C durante 2 h y a 85 °C durante 5 min. Después la mezcla se incubó a 4 °C durante 5 min.

La concentración del ADNc se cuantificó con un espectofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Thermo Scientific; Waltham, MA, EE.UU.). Las muestras se criopreservaron a -20 °C hasta su uso.

4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador *Veriti* de 96 pocillos (Applied Biosystems, Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.). Los cebadores utilizados fueron diseñados utilizando el programa *Prime3* y comprobados con la herramienta de alineamiento genómico *BLAST* del *NCBI* para su uso en muestras de ratón y de humano (tabla 3). La mezcla de reacción contenía 1 µl de los cebadores

correspondientes (10 nM), 10 µl tampón de reacción *MasterMix* (5Prime, Hamburgo, Alemania) y agua. Se añadió a la mezcla de reacción 1.5 µl ADNc (1 µg) correspondiente. Las mezclas de reacción fueron sometidas a 94ºC durante 90 s, y a continuación a 35 ciclos compuestos por 45 s a 94 ºC, 45 s a la temperatura específica de alineamiento de cada cebador y 60 s a 72 ºC para la elongación. Después de los 35 ciclos, las mezclas de reacción se mantuvieron 10 min a 72 ºC y, finalmente, se enfriaron a 4 ºC.

Gen	Cebador hacia adelante (5'-3')	Cebador hacia detrás (5'-3')
β-actina	CACGATGGAGGGGCCGGACTCAT	TAAAGACCTCTATGCCAACACAG
Gapdh	AATGCATCCTGCACCACCAA	GTGGCAGTGATGGCATGGAC
Nkx2.5	CAGTGGAGCTGGACAAAGCC	TAGCGACGGTTCTGGAACCA
Gata4	CAGCATCTCTGTGGTCCTGA	GATGTTGTTGTGGCAAGTGG
c-actina	GTGCCAGGATGTGTGACGA	CTGTCCCATACCCACCATGAC
Mef2c	AACACGGGGACTATGGGGATGGTA	TATGGCTGGACACTGGGATGGTA
Conn43	GGACTGCTTCCTCTCACGTC	TTTGGAGATCCGCAGTCTTT
Tnt	CCACACGCCAAGAAAAAGTC	CGGCATAAGTCCTGAAGCTC
α-actinina	TGGTGTCTTGGTCTACCGACG	TGGTGTCTTGGTCTACCGACG
GFP	AAGTTCATCTGCACCACCG	GTGGCAGTGATGGCATGGAC

Tabla 3. Secuencia de los cebadores utilizados en las PCRs.

4.2.4. Visualización en gel de agarosa

Posteriormente, los productos de amplificación fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y teñidos con bromuro de etidio para su detección. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

5. Estudio de la expresión de proteinas

5.1. Expresión y cuantificación de proteínas mediante *western blot*

5.1.1. Aislamiento de proteínas

5.1.1.1. Aislamiento de proteínas de CMA-GFP+ inyectados en corazones de ratón

Las proteínas se obtuvieron a partir de fracciones de CMA-GFP+ seleccionadas y separadas mediante citometría de flujo, a partir de corazones. Para ello, los corazones fueron disgregados suavemente y digeridos con colagenasa/dispasa (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.). La digestión se llevó a cabo durante 30 min a 37 ºC, a una concentración de 0.8 UI/mg. La suspensión celular fue filtrada para eliminar los restos de tejido. Las células aisladas fueron resuspendidas en 1 ml de PBS con solución 5

µg/ml de ioduro de propidio (PI) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.), para proceder a la selección y separación de células mediante citometría de flujo. Las células fueron separadas por su expresión de GFP (FL1) y PI (FL3) y recogidas para cuantificar mediante *western blot*. A las fracciones celulares se les añadió 1ml de tampón *Laemmli* y con ayuda de un raspador celular (BD Biosciences; San José, CA, EE.UU.) se levantaron los extractos proteicos, que se mantuvieron a -20 ºC hasta su uso.

5.1.1.2. Aislamiento de proteínas a partir de CMAs en cultivo

Las proteínas se obtuvieron a partir de CMAs en cultivo en subconfluencia (90 %), a los que se retiró el medio y se lavaron con PBS a 4 ºC. A continuación, se añadió 1 ml de tampón *Laemmli* y con ayuda de un raspador celular (BD Biosciences; San José, CA, EE.UU.) se levantaron los extractos celulares, que se mantuvieron a -20 ºC hasta su uso.

5.1.2. Electroforesis, transferencia, inmunodetección y revelado

Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6x (375mM Tris-HCl pH 6.8, 12 % SDS, 30 % glicerol, 10 % β-mercaptoetanol, 0,075 % azul de bromofenol) y se desnaturalizaron por choque térmico a 99 ºC, 5 min y 4 ºC, 1 min.

Los extractos proteicos fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS a un porcentaje de 8, 10 ó 12 % dependiendo del tamaño de la proteína que se fuera a analizar, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare; Little Chalfont, Reino Unido). La transferencia se realizó en condiciones húmedas, a un voltaje constante de 85 V durante 90 min. Una vez terminada la transferencia, la membrana se bloqueó con PBS y leche en polvo al 5 % durante 1 h a temperatura ambiente. Después, la membrana se incubó con los correspondientes anticuerpos primarios en una solución de PBS a 4 ºC durante la noche (tabla 4). A continuación, la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween20 (PBS-T) al 0.1 % durante 5 min a temperatura ambiente, y se incubó durante 40 min a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario (tabla 5) marcado con HRP (Dako; Carpinteria, CA, EE.UU.), en una solución de PBS. La membrana se lavó 3 veces con PBS-T al 0.1 % durante 5 min a temperatura ambiente.

Antígeno	Dilución	Especie	Casa commercial
Myl2	1:1000	conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
RhoA	1:1000	conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
β1-integrina	1:500	conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
β-actina	1:1000	conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Bmp2	1:500	ratón	R&D Systems (Minneapolis, MN, EE.UU.)
p-Smad 1, 5, 8 (Ser463/465) /Smad-5 (Ser463/465) / Smad-8 (ser426-428)	1:1000	conejo	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.)

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados para *western blot*.

Antígeno	Dilución	Especie	Casa comercial
Conejo-HRP	1:10000	cabra	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Ratón-HRP	1:1000	cabra	Dako (Dako; Carpinteria, CA, EE.UU.)

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados para *western blot*.

Para revelar la membrana se incubó con el sistema de detección quimioluminiscente ECL (GE Healthcare) durante 1 min a temperatura ambiente. A continuación, se colocó la membrana en un casete de revelado con una película radiográfica (AGFA; Mortsel, Bélgica) entre 10 s y 2 min dependiendo de la proteína. El proceso se realizó en la máquina de revelado *Kodak x-Omat* 2000.

5.1.3. Cuantificación

Las películas radiográficas fueron sometidas a diferentes tiempos de exposición para asegurar que las bandas no estuvieran saturadas. La intensidad relativa de las bandas específicas fue cuantificada por densitometría utilizando el programa *ImageJ* (http://rsb.info.nih.gov/ij).

5.2. Inmunocitofluorescencias

Para detectar la presencia, y observar la localización celular y el patrón de expresión de diferentes proteínas se realizaron varias inmunofluorescencias. Para ello, se sembraron $2.5 \cdot 10^4$ células/cristalito de cultivo de 12 mm de diámetro (Thermo Scientific; Waltham, MA, EE.UU.), recubiertos con gelatina al 0.1 %, y se mantuvieron en condiciones de cultivo. Tras 24 h, los cristalitos se lavaron 3 veces con PBS y se

fijaron con PFA al 4 % durante 10 min. Tras 2 lavados de inmersión en PBS y uno en TBS, las células fueron tratadas con un tampón de citrato a pH6 para desenmascarar los antígenos durante 5 min. Tras 3 lavados por inmersión en PBS las células fueron bloqueadas con PBS y suero de burro al 1 % durante 1 h. Después de 3 lavados por inmersión en PBS, las células se incubaron con el anticuerpo primario específico de cada proteína (tabla 6) en PBS durante 1 h y, posteriormente, con el anticuerpo secundario anti-conejo-Alexa488 o anti-ratón-Alexa594, ambos de cabra, diluidos 1:500 en PBS durante 1 h (Tabla 7). Tras 3 lavados por inmersión en PBS, se llevó a cabo una contratinción nuclear incubando las células con DAPI 300nM durante 30 min. Después de 3 lavados por inmersión en PBS se montaron las preparaciones en portas utilizando el medio de montaje *ProLong Antifade* (Invitrogen, Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.). Todo el proceso se llevó a cabo en cámara húmeda, a temperatura ambiente y en oscuridad. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Leica DM2500/TCS SPE (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania) o con un confocal Leica SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

6. Medidas de las citoquinas

Las citoquinas presentes en el medio de cultivo de fibroblastos y CMCs se midieron mediante el sistema de detección *Mouse Multi-cytokine* de Millipore (Billerica, MA, EE.UU.) siguiendo las indicaciones proporcionadas por la casa comercial. Para ello se recogieron los medios de cultivo de ambos tipos celulares tras 4 días en cultivo, y fueron analizados.

Para medir la concentración de las citoquinas presentes en la pared libre de los corazones de ratones sanos (WT) y sometidos a ligación de la arteria coronaria (CAL), los corazones fueron homogeneizados en tampón de lisis con 1 % de igepal, y la concentración de proteína total fue cuantificada por espectofotometría mediante el kit *DC Protein Assay* (BioRad; Hercules, CA, EE.UU.) en un espectofotómetro (BioRad; Hercules, CA, EE.UU.). Las muestras de los corazones fueron diluidas en tampón de lisis y preparadas a una concentración final de proteína total de 500 g/ml. Las citoquinas fueron cuantificadas utilizando el mismo kit descrito para la cuantificación de las citoquinas en los medios de cultivo. La concentración de las citoquinas está

representada en pg/ml para los valores de las citoquinas en los medios de cultivo, y en pg/mg para los valores de las citoquinas en tejido.

7. Ensayo de diferenciación

El ensayo de diferenciación se realizó a partir de CMAs en cultivo, sembrados en medio de cultivo sin suero y con 5'-azacitidina (10 µM), durante 7 días.

8. Estudio de la motilidad celular

8.1. Migración

8.1.1. Ensayo de migración por *Wound – Healing*

Para estudiar la capacidad de migración celular de los CMAs en dos dimensiones, las células se sembraron en placas multipocillo de 24 pocillos. Después de 24 h en condiciones de cultivo y en confluencia celular, se realizó la herida utilizando una punta de pipeta estéril. Para eliminar las células que se hubieran levantado, cada pocillo se lavó con PBS. Las células se mantuvieron en el incubador en condiciones de cultivo con medio de cultivo completo.

La migración de las células se monitorizó durante 24 h mediante un microscopio IX52 Olympus (Olympus America Inc.; Melville, NY, EE.UU.) a 4x. Se tomaron fotos cada hora durante 24 h. La capacidad de migración celular se calculó como el porcentaje de cierre de la herida, cuantificado midiendo el área de la herida en cada imagen con el programa *ImageJ* (http://rsb.info.nih.gov/ij).

8.1.2. Ensayo de migración por *Transwell*

La capacidad de migración de los CMAs se evaluó mediante la utilización de cámaras de migración *Transwell* de 6,5 mm de espesor con un tamaño de poro de 8 µm (Corning Incorporated, Acton, MA) (figura 7). Para ello, se añadieron 600 µl de medio completo en la cámara inferior del *Transwell* y se sembraron $2 \cdot 10^4$ células en 80 µl en la cámara superior. Las células fueron incubadas durante 24 h en condiciones de cultivo para permitir la migración a través de la membrana. Después de 6 ó 24 h en cultivo, según el caso, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 4 % en PBS durante 2 h, a temperatura ambiente, y teñidas con azul de toluidina al 2 % en H_2Od

durante la noche. Las membranas se lavaron con H_2Od corriente y las células de la cara superior de la membrana fueron eliminadas con un bastoncillo de algodón. Se tomaron imágenes de cinco campos aleatorios de cada membrana utilizando un microscopio de campo claro Nikon 90i (Nikon Instrumnets; Burgerweeshuispad, Amsterdam, Holanda). La capacidad de migración celular se calculó como el porcentaje de células migradas del total de células sembradas en la cámara superior del *Transwell* o contando el número de células en la cara inferior de la membrana en cada campo.

En parte de los ensayos las membranas fueron recubiertas con gelatina al 1 % y sobre ellas se sembraron células endoteliales microvasculares, que previamente habían sido preactivadas por exposición a TNF-α durante 12 h para inducir la expresión de los antígenos de superficie y las moléculas de adhesión requeridas para la extravasación. Los *Transwell* se incubaron durante 24 h para permitir que las células endoteliales llegaran al estado de confluencia, recubriendo la membrana de los *Tranwells* por completo. Tras 24 h, se sembraron los CMAs en 80 µl en la cámara superior del *Transwell*, y éstos se colocaron en pocillos con 600 µl de medio.

Se evaluó la capacidad migración de los CMAs en función de diferentes estímulos, como la presencia de CMCs neonatales, para lo cual se sembraron CMCs neonatales en una placa multipocillo de 24 pocillos con un medio de diferenciación durante 4 días. En presencia del cultivo de CMCs neonatales, también se utilizó un antagonista de CXCR4, receptor de Sdf-1 (AMD3100, 10 ng/ml) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.). Asimismo, y como control positivo, se utilizó FGF (30 ng/ml). Además, para estudiar el efecto quimioatrayente de las citoquinas en la migración celular, en la cámara inferior del *Transwell* se añadió Mcp-1 (80 ng/ml), Sdf-1 (50 ng/ml), Tnf-α (30 ng/ml), Hmgb-1 (50 ng/ml) o IL-8 (50 ng/ml). También, se evaluó la capacidad de migración de CMAs control, pretratados con Sdf-1, modificados para la expresión de L-Selectina o β2-integrina o ambos, así como CMAs modificados para la expresión de L-Selectina y pretratados con Sdf-1.

Por otro lado, también se realizó este ensayo en presencia de anticuerpos anti-CD44 o anti-αv-integrina (Serotech; Raleigh, NC, EE.UU.), o en presencia de un inhibidor de metaloproteinasas (GM1489) (Calbiochem; EMD Biosciences Inc., Darmstadt, Alemania) o de un ARN pequeño de interferencia de caveolina-1

(AAATGAATTAAAGTGGACCAA) (Ambion; Austin, TX, EE.UU.) sintetizado según las instrucciones de la casa comercial (Galvez et al., 2004). Parte de los ensayos de migración por *Transwell* se llevaron en paralelo con CMAs y con fibroblastos, con el fin de comparar resultados.

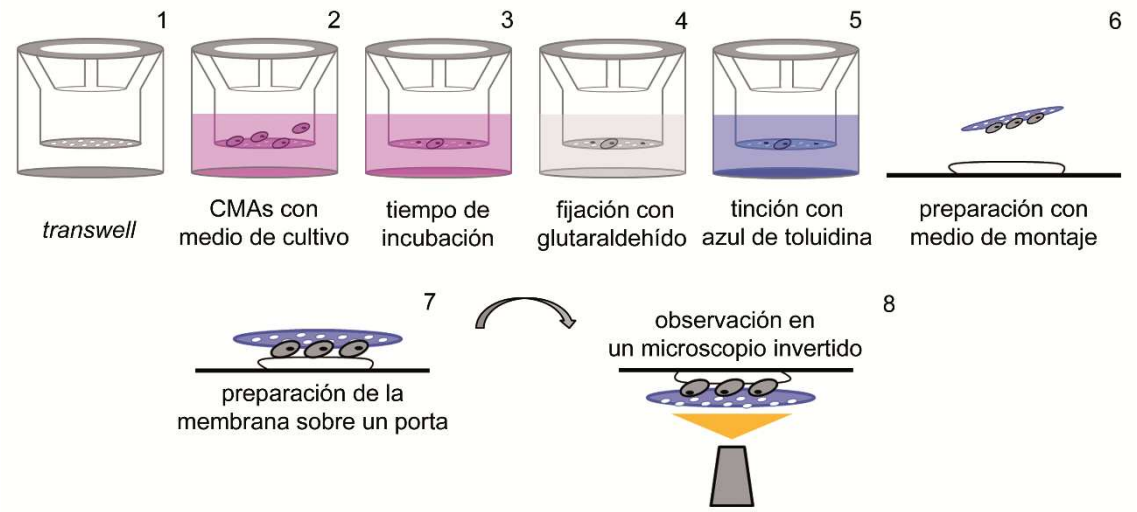


Figura 7. Esquema del ensayo de migración celular *in vitro* mediante *Transwell*.

8.2. Invasión

La capacidad de invasión de los CMAs se analizó mediante la utilización de cámaras de migración *Transwell* pretretadas con gelatina al 1 % en PBS durante 1 h a 37 ºC. Los CMAs fueron tratados siguiendo el mismo procedimiento del ensayo de migración por *Transwell*.

9. Ensayo de trasplante celular

9.1. Suministro de células

Para los experimentos de trasplante de células se utilizaron ratones C57BL/6. Los ratones fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de suero fisiológico (10 ml/kg), con una mezcla de ketamina (5 mg/ml) y xilazyna (1 mg/ml). Además de ratones sanos, se han utilizado dos modelos de ratón sometidos a daño cardiaco mediante ligación de la arteria coronaria (CAL), o mediante inyección de 25µl de cardiotoxina (cdtx) (2,2 mg/ml) (Wang et al., 2005). $5{\cdot}10^5$ CMAs control, o pretratados con Sdf-1, o modificados para la expresión de L-Selectina o de β2-integrina o de

ambos, o modificados para la expresión de L-Selectina y pretratados con Sdf-1, o tratados con LIPUS (figura 8), preparados en suero salino fueron inyectados en el ventrículo izquierdo, utilizando una aguja de 0.20 mm de diámetro. Cada grupo experimental estuvo formado por 3 individuos.

9.2. Recogida de muestras

Los ratones fueron sacrificados 6, 12, 24, 48h, 21 ó 42d después de haber inyectado las células en los corazones. Los animales fueron sacrificados en una cámara de CO_2 siguiendo los procedimientos del Instituto Nacional de Salud y Cuidado Animal. Se recogieron los corazones con el fin de aislar el ARN para cuantificar los niveles de expresión de GFP, y para realizar inmunohistofluorescencias con el fin de localizar la presencia de CMA-GFP+. También se recogieron los órganos filtradores para cuantificar la presencia de CMA-GFP+ en ellos.

9.3. Cuantificación de los niveles de GFP+ en los corazones

9.3.1. Aislamiento de ARN

El aislamiento de ARN se realizó a partir de los corazones extraídos de los ratones, a los que se les había inyectado CMAs control, o pretratados con Sdf-1, o modificados para la expresión de L-Selectina o β2-integrina o ambos, o modificados para la expresión de L-Selectina y pretratados con Sdf-1, o tratados con LIPUS. Cada muestra se preparó en un tubo *eppendorf*, en hielo, y se le añadió 1 ml de *Trizol Reagent* (Invitrogen, Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.). El tejido fue disgregado utilizando un homogeneizador *Polytron* PT1200E (Kinematica; Littau-Lucerna, Suiza). Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm, durante 10 min a 4 ºC. Se recogió el sobrenadante y se llevó a nuevo tubo *eppendorf*. A continuación, las células se procesaron siguiendo el mismo procedimiento descrito en el estudio de la expresión génica (véase materiales y métodos, pág. 46).

9.3.2. RT-PCR

La síntesis del ADNc a partir del ARN aislado se realizó utilizando el kit comercial de retrotranscripción "*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*" (Life Technologies;

Carlsbad, CA, EE.UU.), siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para la retrotranscripción del ARN aislado a partir de células (véase material y métodos, pág. 46).

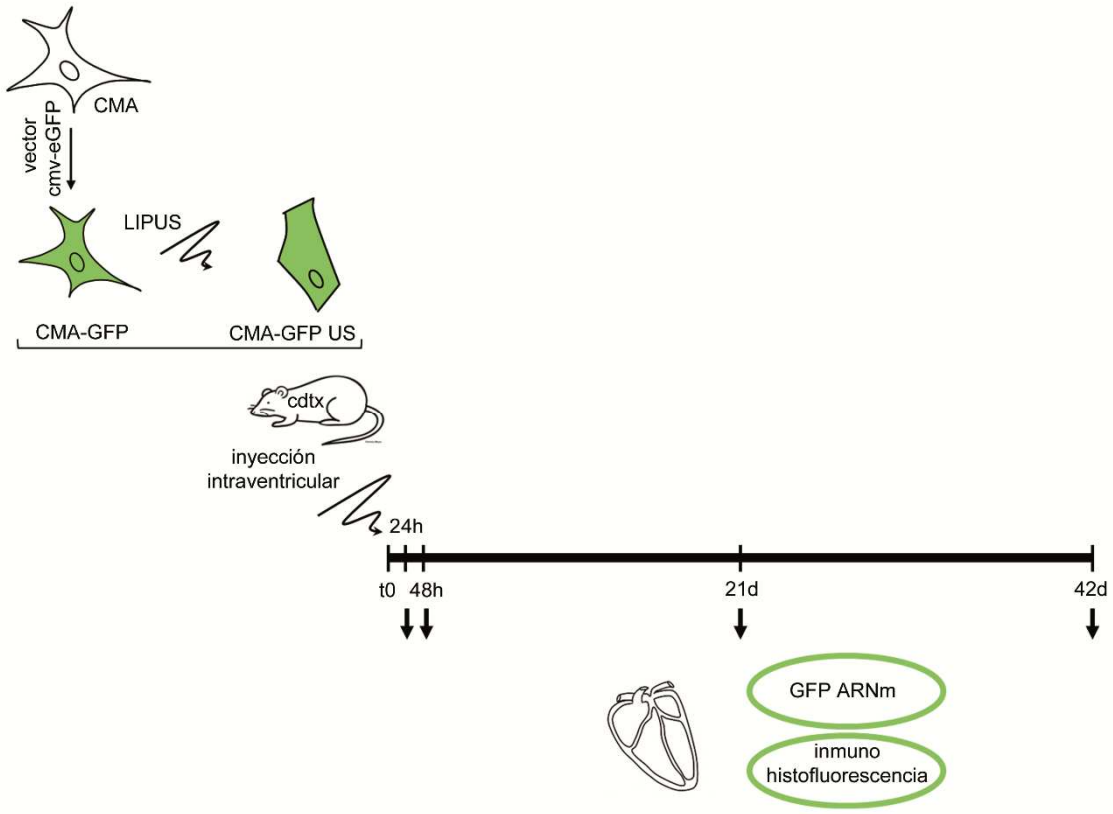


Figura 8. Esquema del ensayo de trasplante celular con US-CMA-GFP+. Los CMAs fueron transfectados con un vector lentiviral para la expresión de eGFP. Una vez separada la población de CMA-GFP+ por citometría de flujo, los CMA se estimularon con LIPUS. CTRL-CMA-GFP+ y US-CMA-GFP+ se inyectaron en ratones sometidos a daño cardiaco por tratamiento con cardiotoxina. Se recogieron los corazones 24h, 48h, 21d y 42d después del suministro de células. Se cuantificaron los niveles de expresión de eGFP y se hicieron cortes de los corazones e inmunohistofluorescencias.

9.3.3. qRT-PCR

La cuantificación relativa de los niveles de expresión génica de GFP se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa a tiempo real utilizando el termociclador *ABI PRISM 7700 sequence detection* (Applied Biosystems, Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.). Se prepararon las mezclas de reacción compuestas por 5 µl de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.), 1 µl de los cebadores específicos para cada gen (tabla 3), a la cual se añadió 1 µl del ADNc

correspondiente y se completó con H_2Od hasta un volumen final de 10 µl. Las muestras se sometieron a 40 ciclos, cada uno de ellos compuesto por 10 min a 94 °C, para la desnaturalización inicial; seguido de 15 s a 94 °C, para la desnaturalización; y 1 min a 60 °C para el alineamiento y la elongación. La qRT-PCR se realizó con triplicados de cada muestra. La qRT-PCR se monitorizó y se analizó mediante el programa SDS 2.0 (Applied Biosystems).

Antígeno	Dilución	Especie	Casa comercial
Myl2	1:100	conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Laminina	1:100	conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
GFP	1:100	conejo	Clontech Laboratories (Madison, WI, EE.UU.)
Troponina	1:100	conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Actina sarcomérica	1:100	conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Ocludina	1:100	conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
BMPR1A	1:200	conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
β1-integrina	1:200	ratón	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Conexina43	1:100	conejo	Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, EE.UU.)
α-actinina	1:100	conejo	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.)
p-Smad 1, 5, 8 (Ser463/465) /Smad-5 (Ser463/465) / Smad-8 (ser426-428)	1:100	conejo	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.)

Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados para inmunocitofluorescencia e inmunohistofluorescencia.

9.4. Inmunohistofluorescencias

Los corazones fueron crioincluídos en OCT y conservados a -80°C hasta su procesamiento. Se realizaron cortes seriados de 5 µm que fueron fijados, permeabilizados y bloqueados con TNB (reactivo para bloqueo (PerkinElmer), Tris pH7.5 150 nM al 0.5 % en H_2Od, NaCl 150 nM y Tritón-100 al 0.1%). Posteriormente, las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (tabla 6) diluidos en TNB durante la noche, a 4 °C en oscuridad. Tras un lavado por inmersión en TNB, las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (tabla 7) durante 1 h, a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de un lavado por inmersión en TNB, se realizó una contratinción nuclear con DAPI 300 nM durante 30 min. Finalmente, se montaron las preparaciones utilizando el medio de montaje (Dako; Carpinteria, CA, EE.UU.). Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Leica SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Antígeno	Dilución	Especie	Casa comercial
conejo-Alexa488	1:500	cabra	Invitrogen, Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.
ratón-Alexa594	1:500	cabra	Invitrogen, Life Technologies; Carlsbad, CA, EE.UU.

Tabla 7. Anticuerpos secundarios utilizados para inmunocitofluorescencia e inmunohistofluorescencia.

10. Ecocardiografía

Las ecocardiografías se realizaron 2 meses después de la inyección de los mCMAs. Para realizar las ecocardiografías, los ratones fueron anestesiados por inhalación de isofluorano/oxígeno (1.25 % / 98.75 %). Una vez anestesiados, se llevó a cabo la ecocardiografía transtorácica a 30 MHz. Las imágenes fueron obtenidas mediante Vevo 770 (VisualSonics; Toronto, Canadá). Para realizar el análisis se grabaron las imágenes del eje corto y el eje largo en modo B y modo M en dos dimensiones. A partir de estas imágenes se estimó la función del ventrículo izquierdo mediante tres métodos validados como el SF, calculado según las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía; y la fracción de eyección obtenida a partir de las imágenes obtenidas en modo M, fracción de eyección cuantitativa a partir del modo B y la valoración visual del modo B por parte de un experto en ecocardiografía en estudio ciego. También se tomaron medidas de las segmentaciones manuales diastólicas y sistólicas del ventrículo izquierdo del borde endocárdico en visualizaciones de las cuatro cámaras cardiacas.

IV. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el programa *GraphPad Prism* (GraphPad, San Diego, EE.UU.), y la comparación de grupos se ha hecho mediante el análisis de la varianza (ANOVA), después de testar la normalidad y la homocedasticidad de los datos. En los experimentos en los que había más de un factor, se ha realizado el análisis de la varianza de dos factores, y en los casos en los que había más de un grupo se realizó el test de contraste de Bonferroni de comparaciones múltiples. Los resultados se han considerado significativos cuando $p < 0.05$.

Las representaciones gráficas están expresadas como la media aritmética de valores obtenidos de entre 3 y 5 experimentos independientes, y el error estándar de su media (SEM). Todos los experimentos se han llevado a cabo realizando réplicas.

Sofia var spinning alle disse spørsmålene. Han åpnet konvolutten og leste notatet.
Sofía daba vueltas a todas esas preguntas. Abrió el sobre y leyó la nota.

Jostein Gaarder, de El Mundo de Sofía.

Resultados

RESULTADOS

1. Aislamiento y caracterización de cardiomesoangioblastos de ratón y humano

Los CMAs fueron aislados mediante el método explante (Bernal et al., 2012a) (véase el Anexo I), según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (véase materiales y métodos pág. 34). Los ventrículos de los corazones extraídos de ratón se fragmentaron y se disgregaron, así como las muestras de tejido procedentes de corazón de humano. Estos fragmentos se colocaron en placas de cultivo con *Matrigel*. Después de 7 días en cultivo empezaron a salir células redondeadas (figura 9). Estas células fueron preseleccionadas, expandidas y mantenidas en condiciones de cultivo. Las células obtenidas por este procedimiento a partir de muestras de ratón se han denominado mCMAs y las procedentes de tejido humano hCMAs.

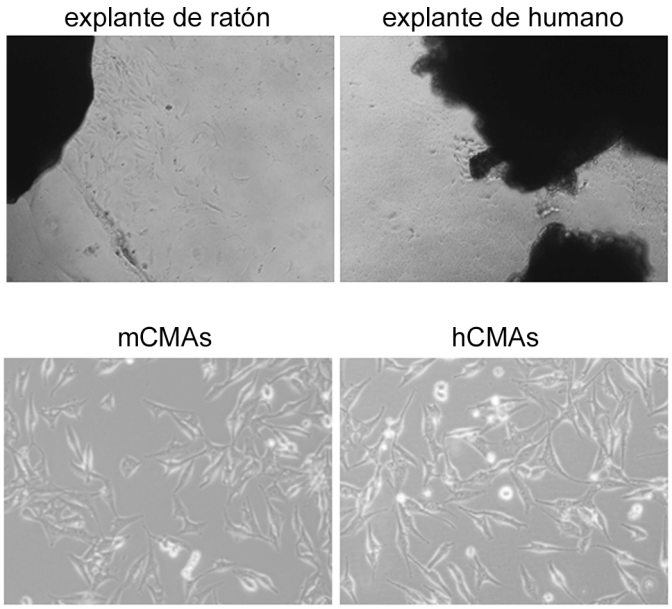


Figura 9. Aislamiento de CMAs, mediante el método de explante. Cardiomesoangioblastos de ratón (mCMAs) emergiendo del explante de corazón, y cardiomesoangioblastos de humano (hCMAs) emergiendo del explante de biopsia de tejido cardiaco humano. mCMAs y hCMAs en cultivo tras el explante.

Los CMAs son un tipo de células madre que se caracterizan por la expresión de determinados marcadores de superficie como CD44, CD34, CD31, ckit y Sca1; y por la ausencia de expresión de CD45 (figura 10, tabla 8), quedando definidas, por tanto, como una población de células madre mesenquimales, no hematopoiéticas. Además, estas células tienen la capacidad de diferenciarse a CMCs maduros y de participar en procesos de regeneración de daño tisular cardiaco como anteriormente se ha

publicado (Galvez et al., 2008). Sin embargo, la capacidad de los CMAs para migrar y llegar con éxito al tejido dañado está limitada por su naturaleza. Por ello, esta tesis tiene como objeto mejorar sus propiedades migratorias con el fin de generar células más potentes, con mayor capacidad de migrar y extravasarse al tejido, para que lleguen de un modo más eficiente a la zona de daño tisular y, así favorecer la regeneración y la reparación tisular.

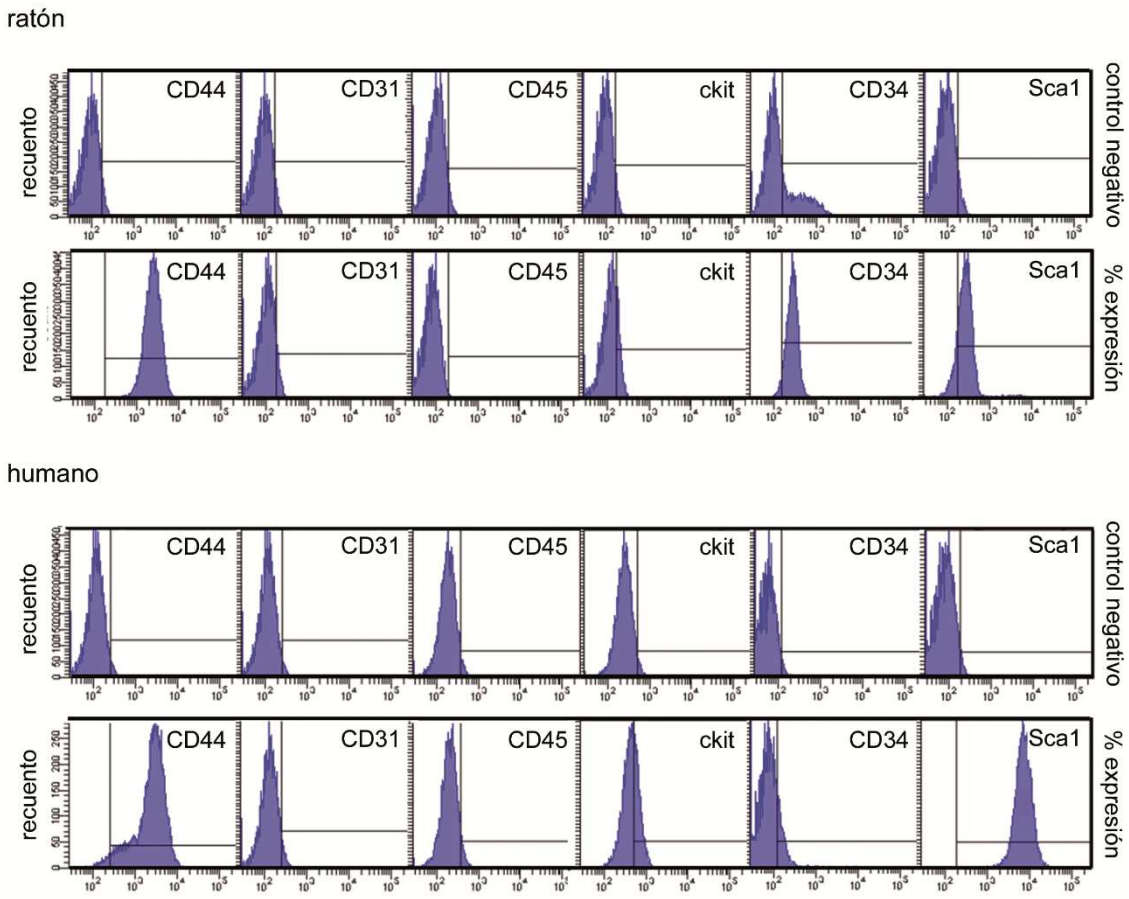


Figura 10. Caracterización fenotípica de los CMAs. Los CMAs se caracterizaron mediante citometría de flujo, según la intensidad de fluorescencia detectada de los antígenos de superficie marcados. Se muestran los resultados de un experimento representativo de cinco experimentos independientes.

Antígeno (%)	mCMAs	hCMAs
CD44	100	98.6
CD31	7.3	5.3
CD45	0.6	2.7
ckit	20.3	36.7
CD34	95.4	16.8
Sca1	95.4	100

Tabla 8. Caracterización fenotípica de los CMAs. La tabla muestra la media de intensidad de los antígenos de superficie marcados con fluorescencia detectada mediante citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de cinco experimentosindependientes.

Para ello, se proponen dos estrategias fundamentales que a continuación se detallan: I) estudiar el papel de las citoquinas y las moléculas de adhesión en la migración de los CMAs; y II) estudiar los efectos de la estimulación con LIPUS en estas células.

Estrategia I: Estudio del papel de las citoquinas y moléculas de adhesión en la migración de los CMAs.

2. La presencia de CMCs neonatales y de Sdf-1 favorece la migración de los mCMAs *in vitro*

Para estudiar la capacidad de migración de los mCMAs, se realizó un ensayo de migración *in vitro* mediante *Transwell* (véase materiales y métodos, pág. 52). El ensayo se llevó a cabo en un ambiente artificial recreando la situación fisiológica, en el que la membrana del *Transwell* estaba recubierta de células endoteliales, previamente activadas por exposición a TNF-α, en presencia de CMCs neonatales, o de citoquinas en la cámara inferior del *Transwell*, o de FGF.

Los mCMAs apenas fueron capaces de migrar en ausencia de estímulo (figura 11). Sin embargo, la presencia de CMCs en la cámara inferior del *Transwell* activó significativamente la migración de los mCMAs, aunque no tuvo ningún efecto en los fibroblastos. El efecto de la presencia de los CMCs fue más fuerte que el inducido por la presencia de FGF. También se realizó el ensayo en presencia de algunas citoquinas en la cámara inferior del *Transwell*, como Sdf-1, Mcp-1 y TNF-α, que previamente han sido descritas como potenciadores de la migración de los mesoangioblastos (Galvez et al., 2006) (figura 11). La presencia de Sdf-1 en la cámara inferior provocó un aumento de la migración celular, más fuerte que el inducido por FGF, Mcp-1 o TNF-α. Además, se realizó el ensayo de migración en presencia de CMCs en la cámara inferior utilizando AMD3100, un antagonista de CXCR4, receptor de Sdf-1 (figura 11). En este caso, el efecto de la presencia de los CMCs en la capacidad de migración de los mCMAs disminuyó un 40 %. Estos resultados muestran una correlación directa entre Sdf-1 y la capacidad de migración de los mCMAs.

Debido al incremento de la migración de los mCMAs inducido por la presencia de CMCs en la cámara inferior de los *Transwell*, y el efecto quimioatrayente de Sdf-1 y

Mcp-1 observado en la migración de los mCMAs, se cuantificaron las concentraciones de algunas citoquinas presentes tanto en el medio de cultivo de los CMCs como en el de los fibroblastos tras mantenerlos 4 días en cultivo (véase materiales y métodos, pág. 51). La concentración de Sdf-1, Mcp-1 y TNF-α fue significativamente más alta en el medio de cultivo de los CMCs que en el de los fibroblastos (figura 12). Estos resultados sugieren que los CMCs podrían secretar citoquinas como Sdf-1 o Mcp-1 que favorecieran la migración de los mCMAs mediante un efecto quimioatrayente o por modificación de la barrera endotelial.

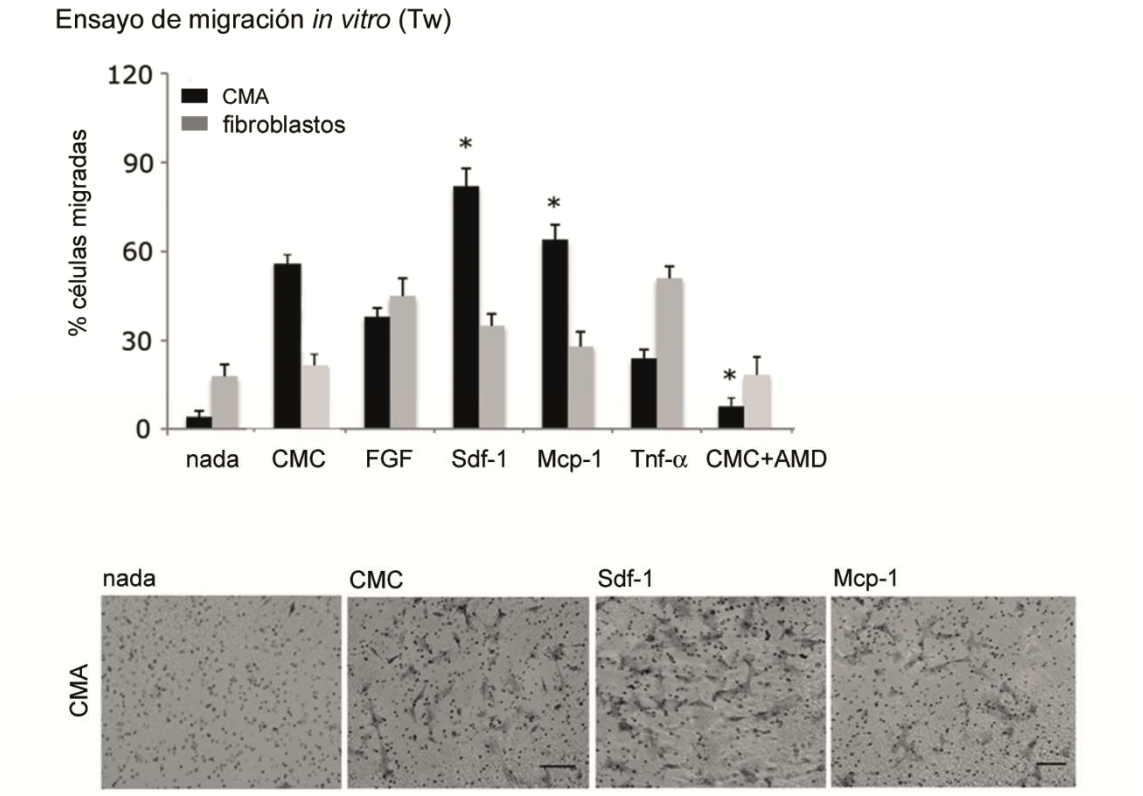


Figura 11. Efecto de las citoquinas en la migración de mCMAs *in vitro* (I). mCMAs y fibroblastos fueron sembrados en *Transwell* recubiertos con células endoteliales e inducidos a migrar durante 6 h en presencia de CMCs o diferentes citoquinas: FGF (30 ng/ml), Sdf-1 (50 ng/ml), Mcp-1 (80 ng/ml); TNF-α (30 ng/ml); AMD3100, antagonista del receptor de Sdf-1, CXCR4 (10 ng/ml). Se muestran los resultados de un experimento representativo de 5 experimentos independientes, realizados con duplicados (*$p < 0.02$). Imágenes representativas de las células migradas en presencia de CMCs, Sdf-1 o Mcp-1. Barra, 30 µm.

3. Migración de los mCMAs *in vivo*

Para analizar la capacidad de migración *in vivo* de los mCMAs, se inyectaron $5 \cdot 10^5$ mCMA-GFP+ en el ventrículo izquierdo de ratones C57 sanos (WT) y de ratones C57 a

los que unas horas antes se les había sometido a un daño cardiaco inducido por la ligación de la arteria coronaria (CAL). Los ratones fueron sacrificados después de 6, 12 ó 24 h, y se recogieron los corazones y los órganos filtradores (hígado, bazo y pulmones), de los cuales se extrajo el ARN para cuantificar la presencia de mCMAs según los niveles de expresión de GFP (véase materiales y métodos, pág. 53).

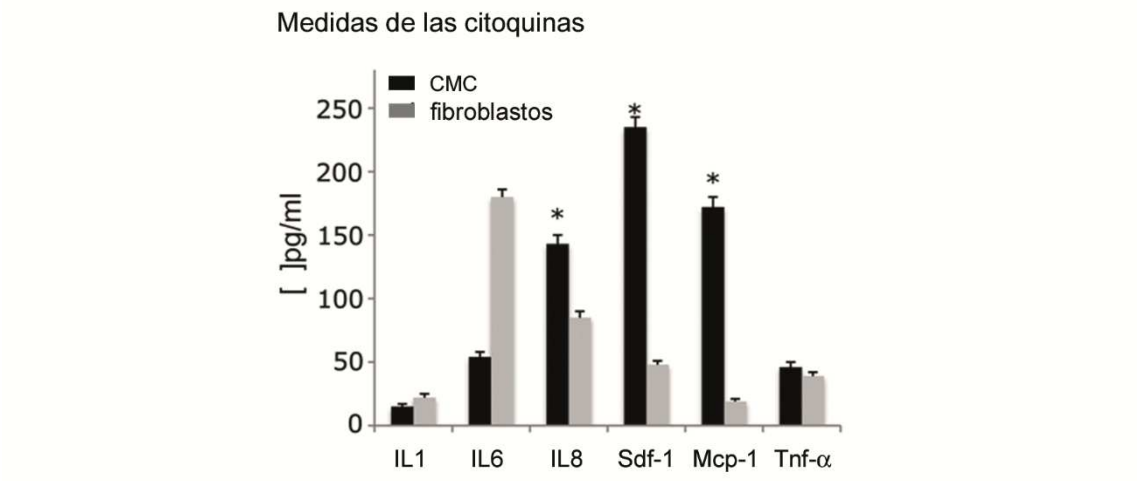


Figura 12. Efecto de las citoquinas en la migración de mCMAs *in vitro* (II). Se recogió el medio de cultivo de fibroblastos y CMCs tras 4 días en cultivo, y se cuantificó la concentración de diferentes citoquinas, utilizando un sistema de detección multipanel. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes, realizados con triplicados (*p < 0.025).

Tras 6 h, sólo el 5 % de los mCMA-GFP+ inyectados en los ratones WT migraron al corazón, mientras que la mayor parte de las células inyectadas quedaron retenidas en los órganos filtradores, sin alcanzar el corazón (figura 13). Sin embargo, la presencia de daño cardiaco en los ratones CAL indujo un aumento del número de mCMAs que alcanzaron la zona de infarto, el doble comparado con los WT. También en este caso, la mayoría de las células quedaron retenidas en los órganos filtradores, pero el 10 % de los mCMA-GFP+ inyectados alcanzaron el área dañada del corazón.

Por otra parte, se cuantificó la concentración de diferentes citoquinas en la pared libre de los corazones de ratones WT y CAL (véase materiales y métodos, pág. 51). Los corazones de los ratones CAL presentaron concentraciones más altas de Sdf-1, IL-8 y Mcp-1, en comparación con los ratones WT (figura 14). Estos resultados podrían explicar porqué los mCMA-GFP+ inyectados en ratones CAL alcanzan el corazón de más eficientemente que en los ratones WT.

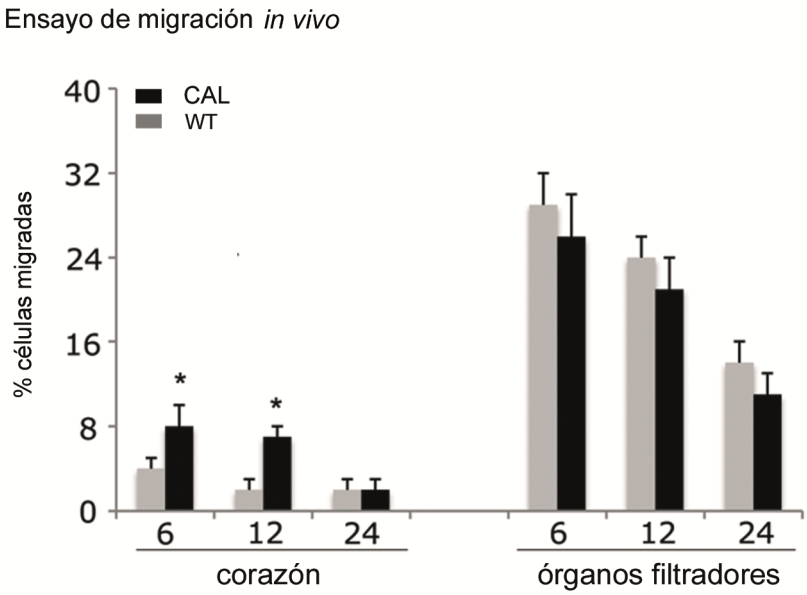


Figura 13. Migración in vivo de mCMAs (I). Los mCMAs fueron inyectados en el ventrículo izquierdo de ratones sometidos a ligación de la arteria coronaria (CAL) y de ratones sanos (WT). Los ratones fueron sacrificados tras 6, 12 ó 24 h y se recogieron los corazones y los órganos filtradores para cuantificar la presencia de células migradas (mCMA-GFP+) mediante qRT-PCR. Se muestra la media de tres experimentos independientes, realizados con triplicados (*p < 0.03).

4. El pretratamiento de los mCMAs con Sdf-1 aumenta su capacidad de migración

A raíz de los resultados observados en la capacidad migratoria de los mCMAs, tanto *in vitro* como *in vivo*, y con el objetivo de aumentar el número de mCMAs que alcanzan la zona infartada, se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales.

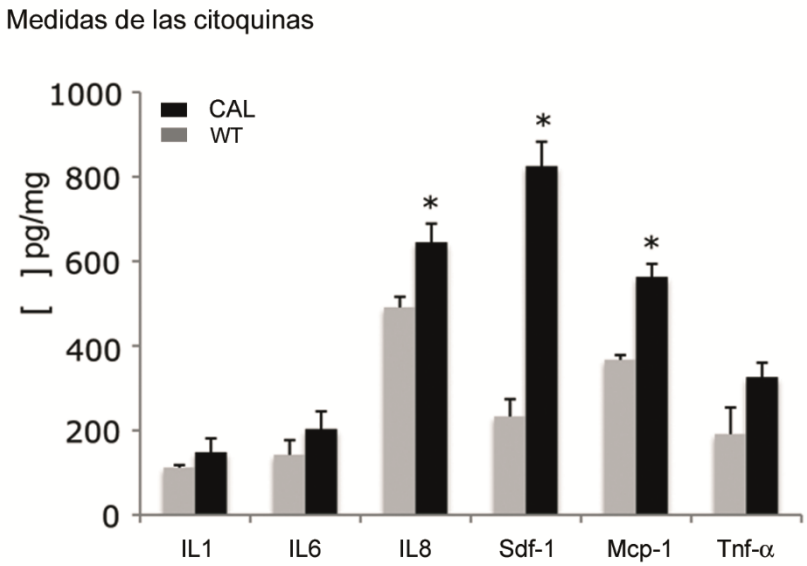


Figura 14. Migración *in vivo* de mCMAs (II). Los corazones de ratones WT o CAL de dos meses fue homogeneizada y se analizó la expresión de diferentes citoquinas mediante un sistema de detección multipanel. La concentración se normalizó según la proteína total. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes, realizados con triplicados. (*p < 0.025).

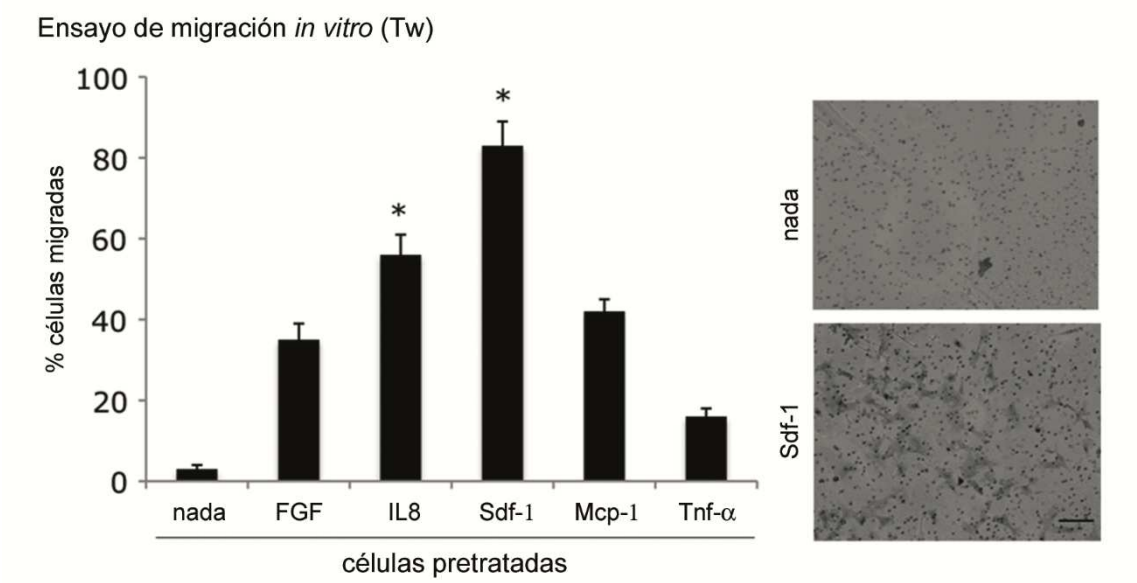


Figura 15. Sdf-1 mejora la capacidad de migración *in vitro* de los mCMAs. mCMAs pretratados con diferentes citoquinas: IL-8 y Sdf-1 (50 ng/ml); Mcp-1 (80 ng/ml); TNF-α y FGF (30 ng/ml); fueron sembrados en *Transwell* recubiertos con células endoteliales, e inducidos a migrar durante 6 horas en presencia de CMCs en la cámara inferior del *Transwell*. FGF se utilizó como control positivo. Se muestran los resultados de un experimento representativo de cinco experimentos independientes, realizados con duplicados (*p < 0.01). Imágenes representativas de los mCMAs pretratados y no pretratados con Sdf-1 que han migrado. Barra, 30µm.

En primer lugar, los mCMAs fueron pretratados con citoquinas (véase materiales y métodos, pág. 37) y, a continuación, se realizó un ensayo de migración *in vitro* mediante *Transwell* (véase materiales y métodos, pág. 52). El pretratamiento con Sdf-1 incrementó la capacidad de migración de los mCMAs alcanzando niveles similares a los observados en los ensayos de migración *in vitro* mediante *Transwell* en presencia de Sdf-1 en la cámara inferior (figura 15). Por lo tanto, se pretrataron mCMA-GFP+ con Sdf-1 y, posteriormente, se inyectaron en el ventrículo izquierdo de ratones WT y CAL, que fueron sacrificados 6 h después. Se recogieron los corazones y los órganos filtradores, y se analizó la presencia de mCMA-GFP+ (véase materiales y métodos, pág. 55). El pretratamiento con Sdf-1 aumentó tres veces la migración de los mCMAs al corazón en los ratones CAL (figura 16). Asimismo, el número de mCMA-GFP+ detectados en los órganos filtradores de los ratones CAL se redujo casi a la mitad de los niveles detectados en los ratones WT.

En segundo lugar, se trató de identificar las moléculas de superficie que podrían estar implicadas en los cambios observados en la capacidad de migración de los

mCMAs tras el pretratamiento con Sdf-1. Para ello, en colaboración con el laboratorio de Tagliafico y Cossu, se realizó un análisis de *microarray* de 125 genes, entre los cuales se encontraban receptores de superficie (véase materiales y métodos, pág. 45). Se encontraron 5 genes diferencialmente expresados tras el pretratamiento de los mCMAs con Sdf-1: *MMP-2*, *MMP9*, *CD44*, *caveolina-1* y la *αv-integrina* (*Itgαv*) (figura 17).

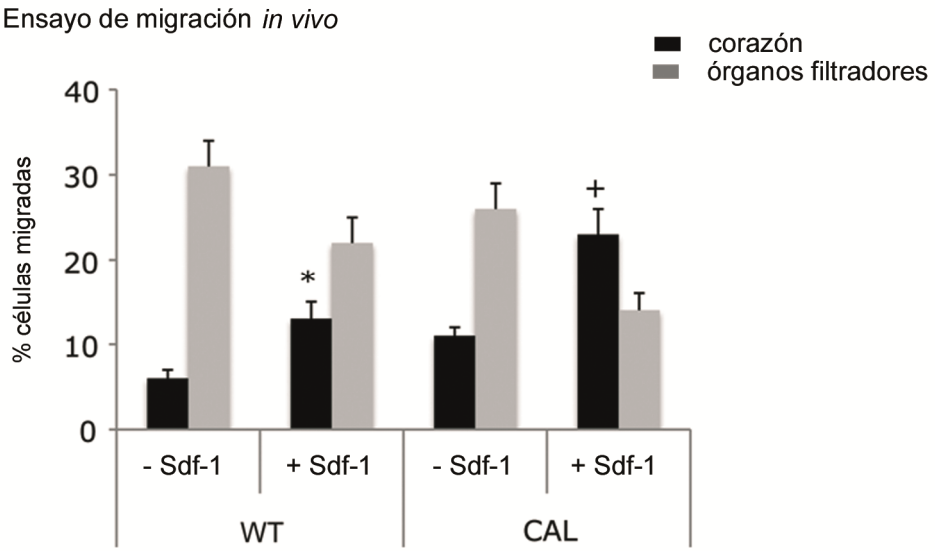


Figura 16. Sdf-1 mejora la capacidad de migración *in vivo* de los mCMAs. mCMA-GFP+ pretratados con Sdf-1 (50 ng/ml) fueron inyectados en el ventrículo izquierdo de ratones sometidos a ligación de la arteria coronaria (CAL) y de ratones sanos (WT). Los ratones fueron sacrificados 6 h después, y se recogieron los corazones y los órganos filtradores para cuantificar la presencia de células migradas (mCMA-GFP+) mediante qRT-PCR. Se muestra la media de tres experimentos independientes, realizados con triplicados (*$p < 0.03$, + $p < 0.02$).

Para verificar el papel de estas moléculas en la migración de los mCMAS, se analizó la capacidad de migración de mCMAs pretratados con Sdf-1 realizando un ensayo de migración *in vitro* mediante *Transwell* en presencia de anticuerpos anti CD44 ó anti α5-integrina, o en presencia de GM1489, un inhibidor de metaloproteinasas para MMP-2 y MMP-9, o de un ARN pequeño de interferencia (siARN) de caveolina-1 (véase materiales y métodos, pág. 52). El anticuerpo anti CD44 y el siARN de caveolina-1 inhibieron significativamente la capacidad de migración inducida por el pretratamiento de los mCMAs con Sdf-1 (figura 18). Por otra parte, el bloqueo de las metaloproteinasas disminuyó ligeramente la capacidad de migración inducida por el pretratamiento de Sdf-1. En conjunto, estos resultados sugieren que

Sdf-1 aumentaría la migración de los mCMAs, *in vitro* e *in vivo*, incrementando la expresión de algunas moléculas de migración.

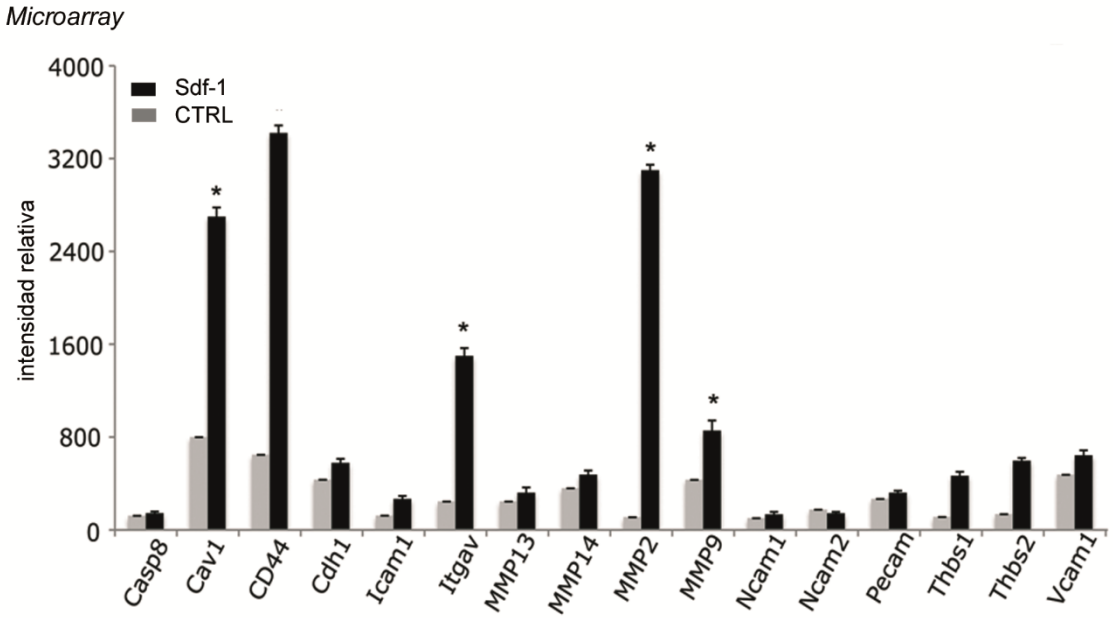


Figura 17. Sdf-1 aumenta la expresión de *caveolina1*, *CD44*, *Itgαv*, *MMP2* y *MMP9*. Se realizó un *array* de expresión de diferentes moléculas de adhesión de ratón con muestras de ADNc retrotranscritas de mCMAs pretratados con Sdf-1. Se muestran los niveles relativos de ARN, normalizados con la expresión de β-actina. Se muestra la media de dos experimentos independientes ($p < 0.01$).

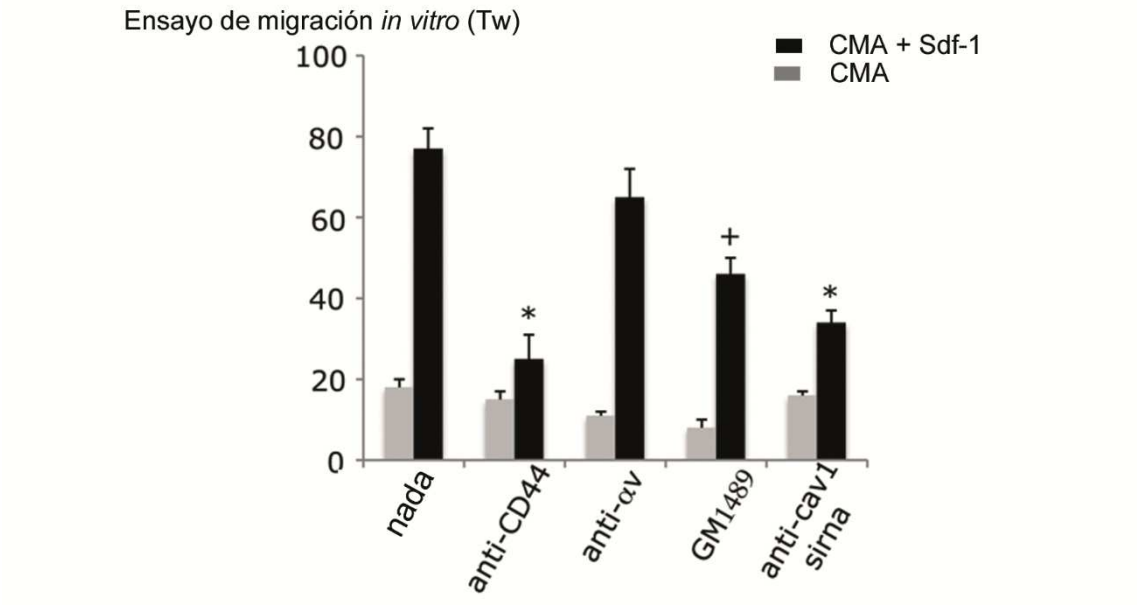


Figura 18. Sdf-1 mejora la capacidad de migración de los mCMAs mediante CD44, MMPs y caveolina 1. mCMAs pretratados con Sdf-1 fueron incubados con un inhibidor de MMPs (GM1489), o con siARN de caveolina-1, o con anticuerpos anti CD44 y anti α5-integrina, y sembrados en *Transwell* recubiertos con células endoteliales en presencia de CMCs en la cámara inferior del *Transwell*. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes, realizados con duplicados (*$p < 0.02$, + $p < 0.005$).

5. La L-selectina es necesaria para la migración eficiente de los mCMAs *in vitro* e *in vivo*

A partir de los datos del análisis de *microarray*, realizado en colaboración con el laboratorio de Tagliafico y Cossu, se comprobó que los mCMAs no expresaban algunas moléculas claves en el control del *rolling* y la extravasación de los leucocitos, como la L-selectina o la β2-integrina (Butcher, 1991, Springer, 1994).

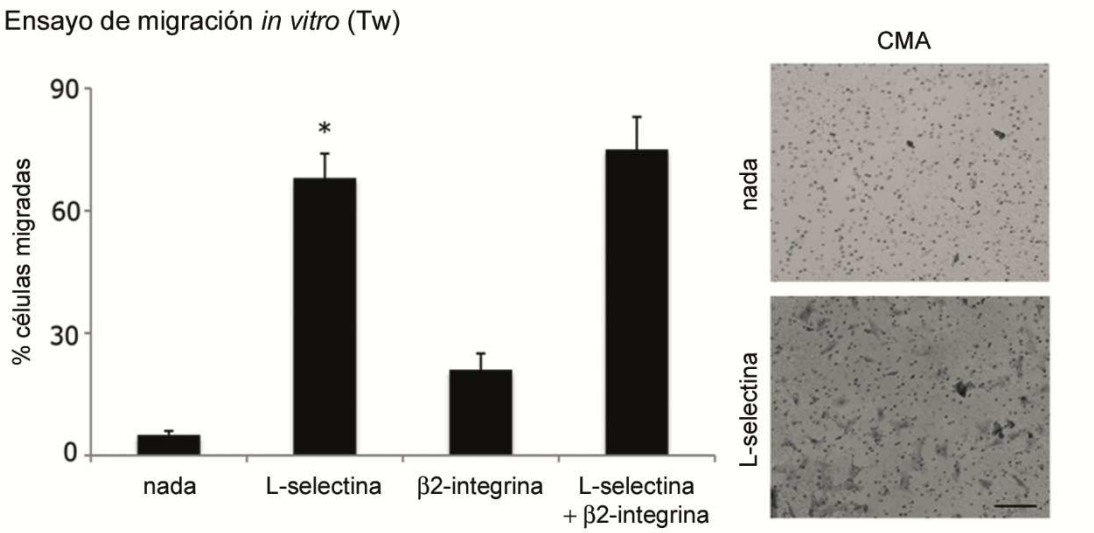


Figura 19. La expresión de L-selectina aumenta la migración *in vitro* de los mCMAs. Los mCMAs fueron transfectados con uno o dos vectores para la expresión de diferentes moléculas de superficie además de eGFP, y fueron sembrados en *Transwell* recubiertos con células endoteliales, e inducidos a migrar durante 6 h en presencia de CMCs en la cámara inferior del *Transwell*. Se muestran los resultados de un experimentos representativo de cinco experimentos independientes, realizados con duplicados (*p < 0.01). Imágenes representativas de mCMAs sin ninguna modificación y de CMAs transfectados con un vector para la expresión con L-selectina que han migrado. Barra, 30 µm.

Con el fin de determinar si estas moléculas mejoran la eficiencia de la capacidad de migración de estas células, los mCMAs fueron modificados para inducir la expresión de L-selectina, o de β2-integrina o de ambas. Para ello, las células fueron transfectadas con vectores para la expresión de estas moléculas así como para eGFP, descritos por Gálvez (Galvez et al., 2006) (véase materiales y métodos, pág. 37). Una vez conseguidos los mCMAs que expresaban L-selectina, o β2-integrina o ambas, se realizó un ensayo de migración *in vitro* mediante *Transwell* recubiertos de células endoteliales (véase materiales y métodos, pág. 52). La expresión de la L-selectina aumentó significativamente la migración de los mCMAs, 6 veces más respecto al control (figura 19). Sin embargo, la expresión de β2-integrina aumentó la migración sólo dos veces respecto al control. Asimismo, la cotransfección de ambas

construcciones para la expresión de ambas moléculas no tuvo efectos acumulativos significativos.

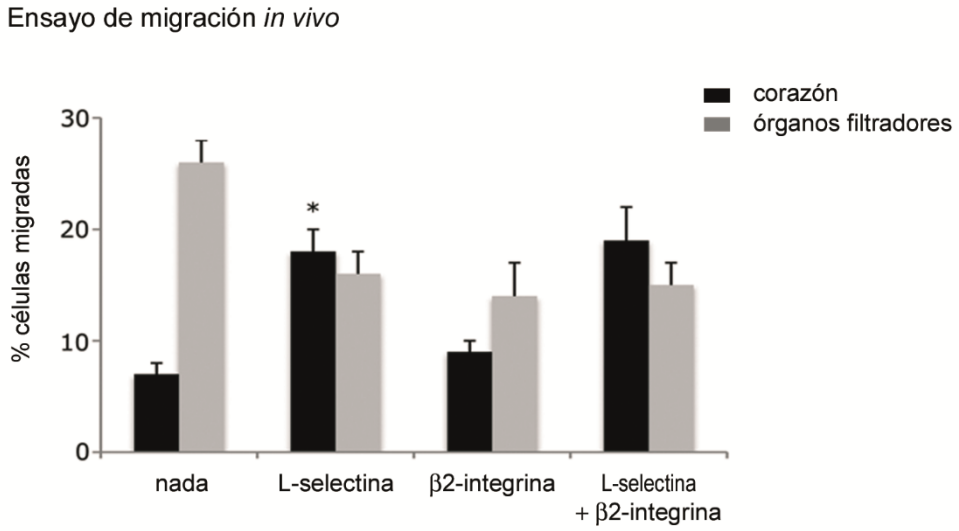


Figura 20. La expresión de L-selectina aumenta la migración *in vivo* de los mCMAs. mCMAs transfectados con vectores para la expresión de L-selectina y/o β2-integrina fueron inyectados en el ventrículo izquierdo de ratones sometidos a ligación de la arteria coronaria (CAL). Los ratones fueron sacrificados tras 6 h y se recogieron los corazones y los órganos filtradores para cuantificar la presencia de células migradas (mCMA-GFP+) mediante qRT-PCR. Se muestra la media de tres experimentos independientes, realizados con triplicados (*p < 0.02).

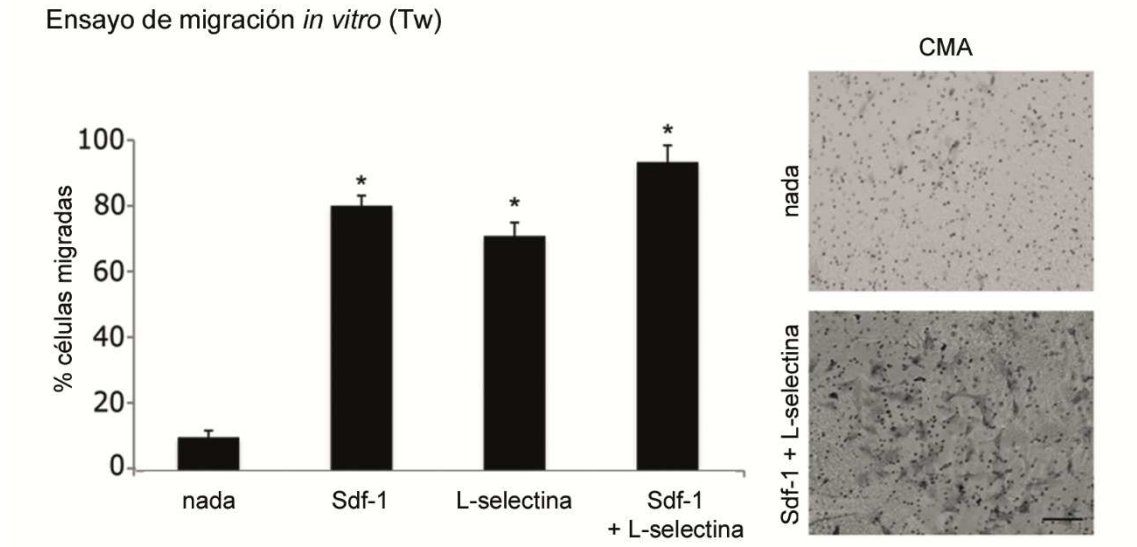


Figura 21. La expresión de L-selectina aumenta la migración *in vitro* de los mCMAs y tiene un efecto sinérgico con el pretratamiento de las células con Sdf-1. mCMAs pretratados con Sdf-1, transfectados o no con vectores para la expresión de L-selectina y GFP, fueron sembrados en *Transwell* recubiertos con células endoteliales, e inducidos a migrar durante 6 h en presencia de CMCs en la cámara inferior del *Transwell*. Se muestra la media de tres experimentos independientes, realizados con duplicados (*p < 0.01). Imágenes representativas de mCMAs sin ninguna modificación y de mCMAs transfectados con L-selectina y pretratados con Sdf-1, que han migrado. Barra, 30 µm.

Entonces, se procedió a inyectar mCMAs modificados para la expresión de L-selectina, o de β2-integrina o de ambas en ratones CAL (véase materiales y métodos, pág. 37). El número de mCMAs L-selectina+ que alcanzaron el corazón aumentó significativamente (Figura 20), efecto que no se observó en los mCMAs que expresaban β2-integrina. Del mismo modo, no se observaron efectos acumulativos por la expresión de ambas moléculas. Por tanto, parece que la expresión de L-selectina en los mCMAs aumenta su capacidad de migración *in vitro* e *in vivo*, posiblemente favoreciendo la interacción con ligandos endoteliales.

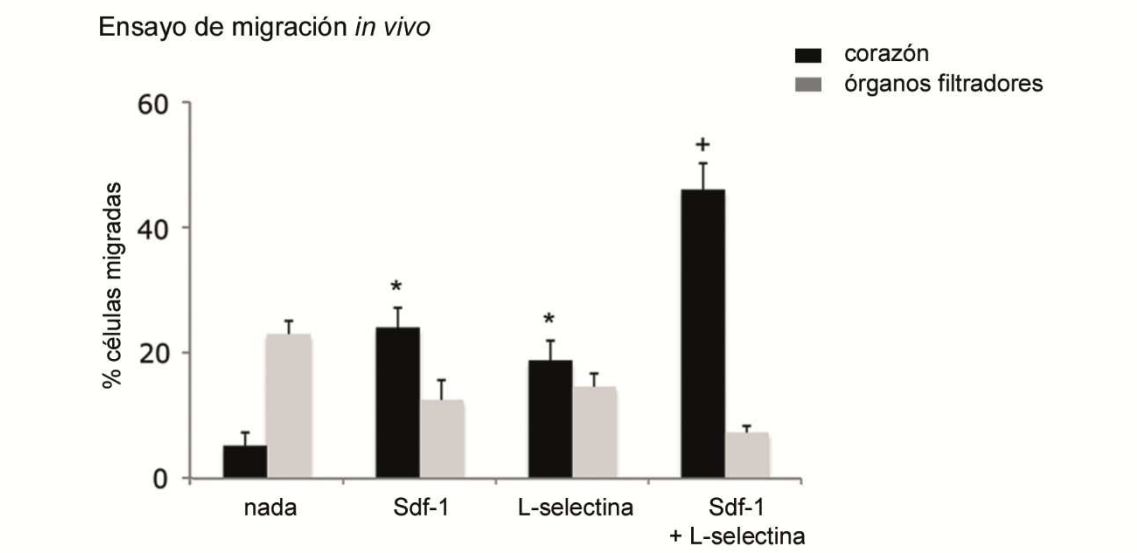


Figura 22. La expresión de L-selectina aumenta la migración *in vivo* de los mCMAs y tiene un efecto sinérgico con el pretratamiento de las células con Sdf-1. mCMAs transfectados o no con vectores para la expresión de L-selectina y eGFP, y pretratados o no con Sdf-1 fueron inyectados en el ventrículo izquierdo de ratones sometidos a ligación de la arteria coronaria (CAL). Los ratones fueron sacrificados 6 h después, y se recogieron los corazones y los órganos filtradores para cuantificar la presencia de células migradas (mCMA-GFP+) mediante qRT-PCR. Se muestra la media de seis experimentos independientes, realizados con triplicados (*$p < 0.01$).

6. El pretratamiento con Sdf-1 de mCMAs que expresan L-selectina aumenta la migración al corazón *in vivo*

Como se ha descrito más arriba, tanto el pretratamiento de las células con Sdf-1, como la expresión de la L-selectina aumenta la migración de los mCMAs. Para determinar si existe un efecto aditivo o sinérgico entre las dos aproximaciones llevadas a cabo, los mCMAs modificados para la expresión de L-selectina fueron pretratados con Sdf-1 y, a continuación, se sembraron en *Transwell* recubiertos con células endoteliales (véase materiales y métodos, pág. 52). El mismo ensayo se llevó a cabo con mCMAs sin

ninguna modificación, con mCMAs sólo pretratados con Sfd-1, y con mCMAs modificados para la expresión de L-selectina. La combinación de la expresión de L-selectina junto con el pretratamiento con Sdf-1 mostró un ligero efecto sinérgico *in vitro*, aumentando 15 veces la eficiencia de la capacidad de migración respecto a los mCMAs sin ninguna modificación (Figura 21). Por tanto, estas células fueron inyectadas en el ventrículo izquierdo de ratones CAL (véase materiales y métodos, pág. 54). Casi el 50 % de las células inyectadas alcanzaron la zona dañada del corazón después de 6 h, a la vez que se redujo el número de mCMAs detectados en los órganos filtradores (figura 22). Del mismo modo que se había observado *in vitro*, la expresión de L-selectina y el pretratamiento de las células con Sdf-1 tienen un efecto sinérgico en la capacidad de migración de los mCMAs *in vivo*.

7. Efecto de Sdf-1 y L-selectina en la reparación del tejido cardiaco a largo plazo

Para determinar si los mCMAs no sólo tienen la capacidad de migrar *in vivo* al corazón, sino también si son capaces de reparar el tejido dañado, se inyectaron $5{\cdot}10^5$ mCMA-GFP+ modificados conjuntamente por ambas aproximaciones (modificados para la expresión de L-selectina y pretratados con Sdf-1) y mCMA-GFP+ sin ninguna modificación (control), en el ventrículo izquierdo de ratones CAL. Los ratones fueron sacrificados a las 6 semanas y se recogieron los corazones y los órganos filtradores para el aislamiento de ARN, para cuantificar la presencia de mCMA-GFP+ (véase materiales y métodos, pág. 55).

Los resultados mostraron que el 10 % de los mCMAs control llegaron al corazón, y más del 35 % en el caso de los mCMAs modificados para la expresión de L-selectina y pretratados con Sdf-1 (figura 23, A). Además, mediante inmunohistofluorescencia se observó que los mCMAs control se concentraban principalmente en la pared del ventrículo (flechas), mientras que los mCMAs modificados para la expresión de L-selectina y pretratados con Sdf-1 colonizaban zonas más profundas en el miocardio (figura 24, A).

Asimismo, mediante inmunohistofluorescencia y *western blot* a partir de la extracción de proteínas de los corazones de ratones CAL (véase materiales y métodos, pág. 57; pág 48) se comprobó que los mCMAs expresaban actina sarcomérica (figura

24, B, C, D), y genes tardíos de diferenciación cardiaca (figura 24, E) y que, por tanto, podían diferenciarse a CMCs y reparar el tejido dañado.

Por otra parte, antes de sacrificar a los ratones, se llevó a cabo un estudio de la actividad cardiaca mediante ecocardiografía 6 semanas después de haber inyectado mCMAs modificados para la expresión de L-selectina y pretratados con Sdf-1 (véase materiales y métodos, pág. 37). El análisis de este estudió mostró una ligera mejora en el grosor de la pared del ventrículo (LVAWThd), el aumento del doble de la fracción de eyección (EF) y de la fracción de acortamiento (SF), así como un menor cambio en el diámetro del ventrículo izquierdo (LVIDd), (Tabla 1).

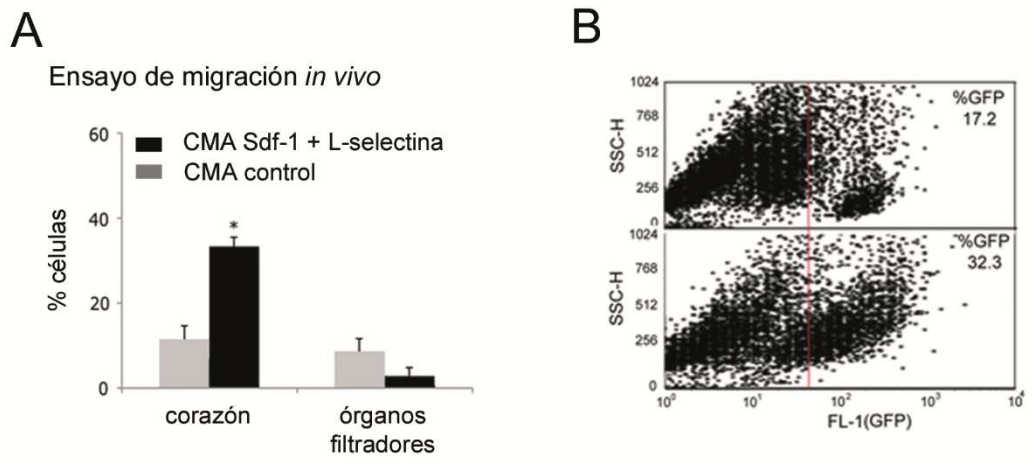


Figura 23. El pretratamiento de mCMAs mejora su mantenimiento en el corazón. (a) Corazones infartados en los cuales se habían inyectado mCMAs transfectados con un vector para la expresión de L-selectina y eGFP, que fueron pretratados con Sdf-1, fueron recogidos 6 semanas después para cuantificar la presencia de células migradas (mCMA-GFP+) mediante qRT-PCR. Se muestra la media de siete experimentos independientes, realizados con triplicados (*p < 0.02). (b) Corazones infartados en los cuales se habían inyectado mCMAs transfectados con un vector para la expresión de L-selectina y eGFP, que fueron pretratados con Sdf-1, o mCMAs sin ninguna modificación fueron recogidos 6 semanas después. Se realizó una digestión del tejido y mediante citometría de flujo se seleccionaron y separaron los mCMA-GFP+. Se muestra un gráfico representativo de cuatro experimentos independientes.

Para verificar estos resultados, se inyectaron mCMA-GFP+ modificados conjuntamente por ambas aproximaciones (modificados para la expresión de L-selectina y pretratados con Sdf-1) y mCMA-GFP+ sin ninguna modificación (control) en el ventrículo izquierdo de ratones CAL. Estos ratones fueron sacrificados 6 semanas después, y la fracción de células GFP+ fue seleccionada y separada por citometría de flujo (véase materiales y métodos, pág. 48). La población de células GFP+ fue dos veces más abundante en el caso de los mCMA modificados para la expresión de L-selectina y pretratados con Sdf-1 (Figura 23, B).

Por lo tanto, la combinación de la expresión de L-selectina y el pretratamiendo con Sdf-1 de los mCMAs aumenta la calidad de las células que llegan al tejido dañado y mejora la estructura del corazón.

	PBS (n=8)	CMAs (n=8)	Sdf-1 + L-selectina CMAs (n=6)	P-valor CMAs modificados vs. PBS
LVIDd (mm)	4.32	4.73	4.89	0.43
EF (%)	27.12	34.28	41.17	0.032
SF (%)	17.65	25.47	33.10	0.0204
LVAWThd (mm)	0.49	0.60	0.72	0.0415

Tabla 9. Ecocardiografías. Valores de las ecocardiografías realizadas en ratones 6 semanas después de haber inyectados los mCMAs control y mCMAs modificados para la expresión de L-selectina y pretratado con Sdf-1. LVIDd, diámetro del ventrículo izquierdo en diástole; EF, fracción de eyección; SF, fracción de acortamiento; LVAWThd, grosor de la pared del ventrículo izquierdo anterior en diástole.

8. La migración de los hCMA al corazón también es susceptible de ser regulada por el pretratamiento con Sdf-1 y la expresión de L-selectina

Los hCMAs tienen una morfología y un perfil de expresión génica similar a los mCMAs, tienen la capacidad de diferenciarse a CMCs y son capaces de reconstituir el miocardio cuando son inyectados en ratones SCID (Galvez et al., 2009a) y, como los mCMAs, tampoco expresan L-selectina (datos del *microarray* realizado en colaboración con el laboratorio de Tagliafico y Cossu). Por tanto, se analizó si la estrategia de combinación del pretratamiento de Sdf-1 y la expresión de L-selectina llevada a cabo en mCMAs con resultados satisfactorios, tenía el mismo efecto en hCMAs. Para ello, hCMAs sin ninguna modificación (control), hCMAs pretratados con Sdf-1, hCMA modificados para la expresión de L-selectina y pretratados con Sdf-1 (véase materiales y métodos, pág. 37), así como hCMAs en presencia de CMCs se sembraron en *Transwell* recubiertos con células endoteliales y se dejaron migrar durante 6 h (véase materiales y métodos, pág. 52). Los hCMAs apenas migraron en ausencia de estímulo. Sin embargo, los CMCs y el pretratamiento

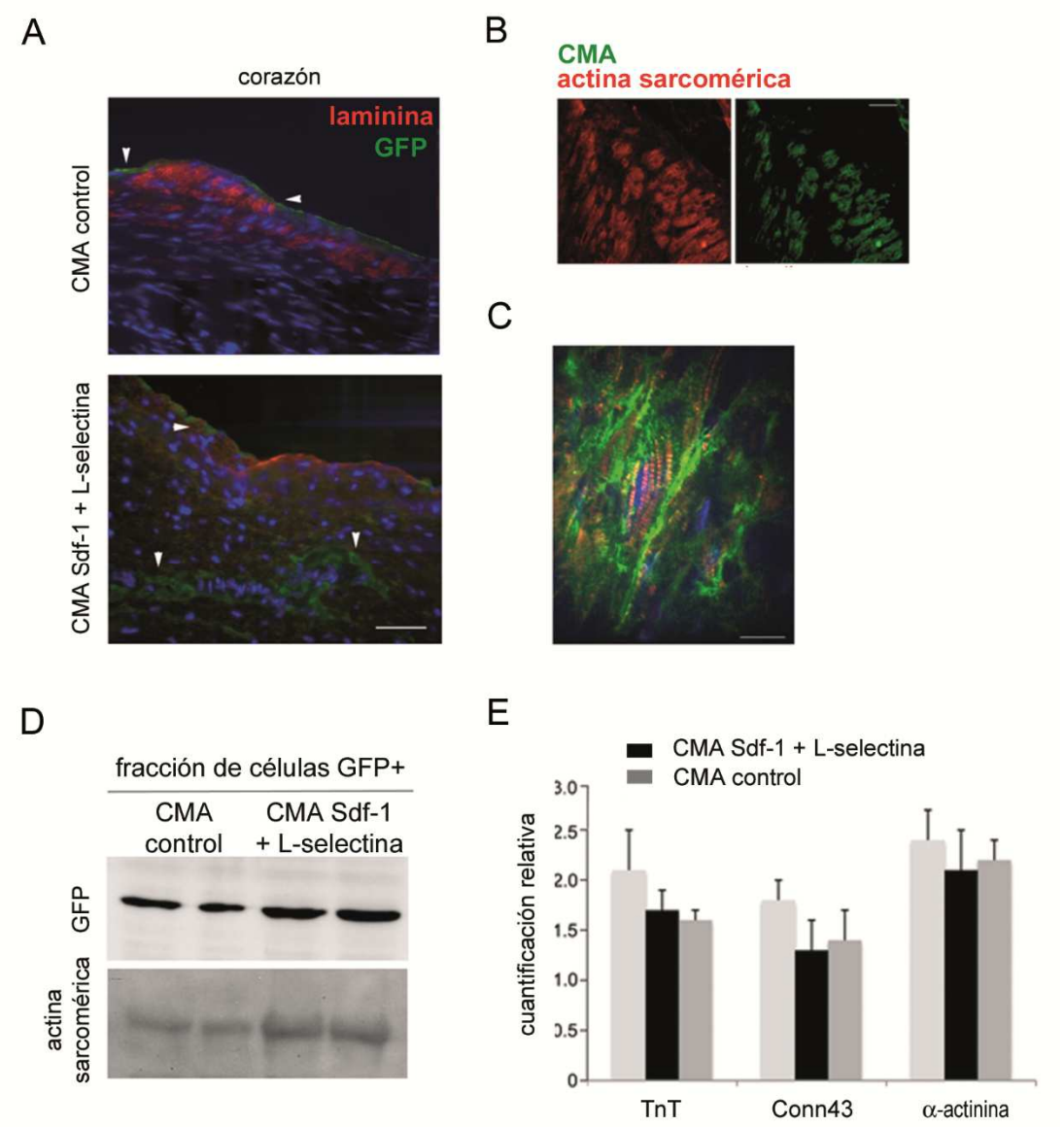


Figura 24. El pretratamiento de mCMAs mejora la regeneración del miocardio. (a) Inmunohistofluorescencia de la pared libre del corazón 6 semanas después de inyectar los mCMAs control o los mCMAs transfectados con un vector para la expresión de L-selectina y eGFP y pretratados con Sdf-1. En rojo se observa la laminina y en azul el núcleo, teñido con *Hoechst*. Aumento, 450x. Barra, 100 µm. (b) Inmunohistofluorescencia para GFP y actina sarcomérica (en rojo) de un corazón de un ratón CAL 6 semanas después de haber inyectado los mCMAs transfectados con un vector para la expresión de L-selectina y GFP, y pretratados con Sdf-1. Los núcleos fueron teñidos con Hoetchs (azul). Barra, 100 µm. (c) Un aumento mayor de la inmunohistofluorescencia para GFP y actina sarcomérica (en rojo) de un corazón de un ratón CAL, 6 semanas después de haber inyectado los mCMAs transfectados con un vector para la expresión de L-selectina y GFP, y pretratados con Sdf-1. Los núcleos fueron teñidos con Hoetchs (azul). Barra, 20 µm. (c) *Western blot* para GFP y actina sarcomérica total de la fracción de mCMA-GFP+ seleccionada y separada por citometría de flujo, procedentes de ratones CAL 6 semanas después de haber sido inyectados mCMA-GFP sin ninguna modificación o mCMA-GFP transfectados con un vector para la expresión de L-selectina y pretratados con Sdf-1. (e) qRT-PCR para la determinación de la expresión de algunos genes tardíos de diferenciación cardiaca en CMCs y en la fracción de mCMA-GFP+ seleccionada y separada por citometría de flujo, procedentes de ratones CAL, 6 semanas después de haber inyectado mCMA-GFP sin ninguna modificación o mCMA-GFP transfectados con un vector para la expresión de L-selectina y pretratados con Sdf-1. Se muestran los resultados de un experimento representativo de cinco experimentos independientes, realizados con triplicados.

de las células con Sdf-1 aumentaron significativamente la capacidad de migración de los hCMAs (figura 25). No obstante, el mayor aumento de la migración celular fue inducido por la combinación de ambas aproximaciones, siendo los hCMAs modificados para la expresión de L-selectina y pretratados con Sdf-1 los que mostraron mayor capacidad de migración.

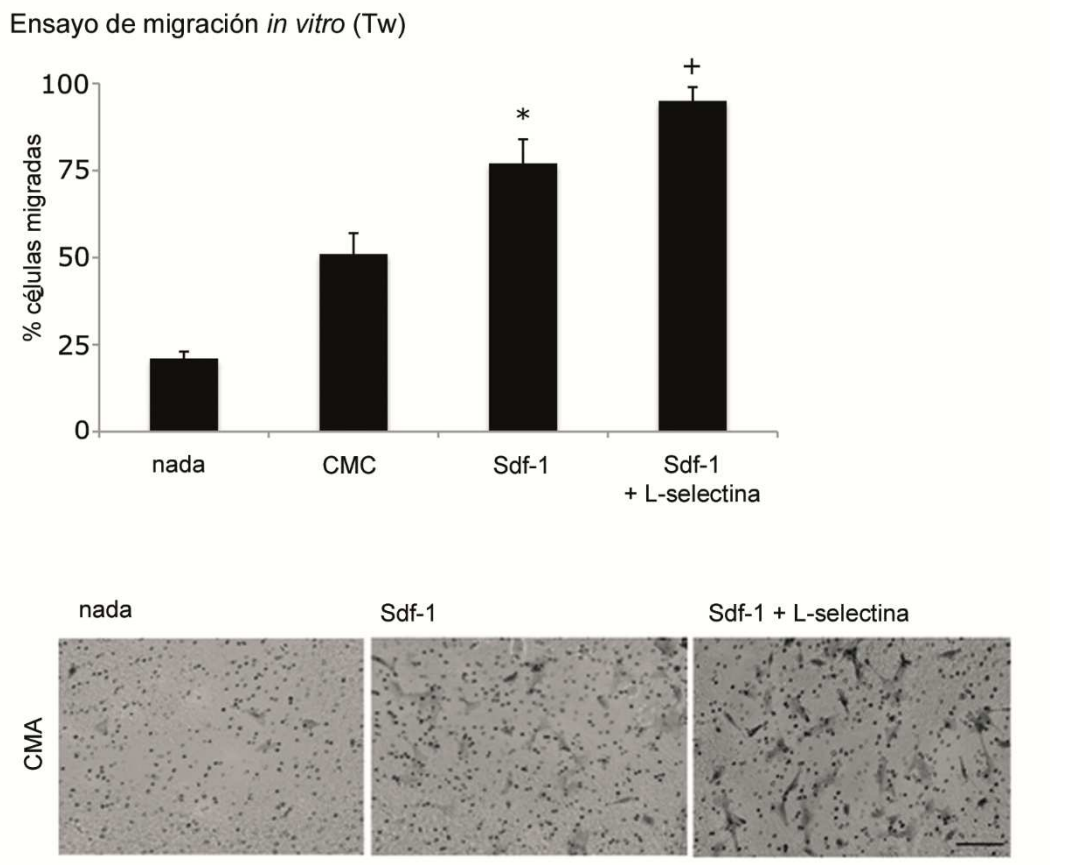


Figura 25. El pretratamiento de hCMAs mejora la migración *in vitro* al corazón. hCMAs pretratados con Sdf-1 o transfectados con un vector para la expresión de L-selectina fueron sembrados en *Transwell* recubiertos con células endoteliales, e inducidos a migrar durante 6 h en presencia de CMCs en la cámara inferior del *Transwell*. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes, realizados con duplicados (*p < 0.02; +p < 0.01). Imágenes representativas de hCMAs sin ninguna modificación, de hCMAs pretratados con Sdf-1 y de hCMAs transfectados con un vector para expresión L-selectina y pretratados con Sdf-1. Barra, 30 µm.

Con el fin de determinar si los resultados obtenidos *in vitro* en cuanto al aumento de la capacidad de migración de los hCMAs eran trasladables al modelo *in vivo* de infarto, hCMAs pretratados con Sdf-1, hCMAs modificados para la expresión de L-selectina y pretratados con Sdf-1; y hCMAs sin ninguna modificación fueron inyectados en el ventrículo izquierdo de ratones SCID-CAL (véase materiales y

métodos, pág. 55). Casi el 45 % de los hCMAs modificados para la expresión de L-selectina y pretratados con Sdf-1 alcanzaron el corazón (figura 26). Asimismo, se observó una disminución en el número de hCMAs modificados detectados en los órganos filtradores. Todos estos resultados muestran que es posible aumentar la migración de los hCMAs *in vivo*, a la zona de tejido dañado, siguiendo un procedimiento similar al desarrollado en mCMAs.

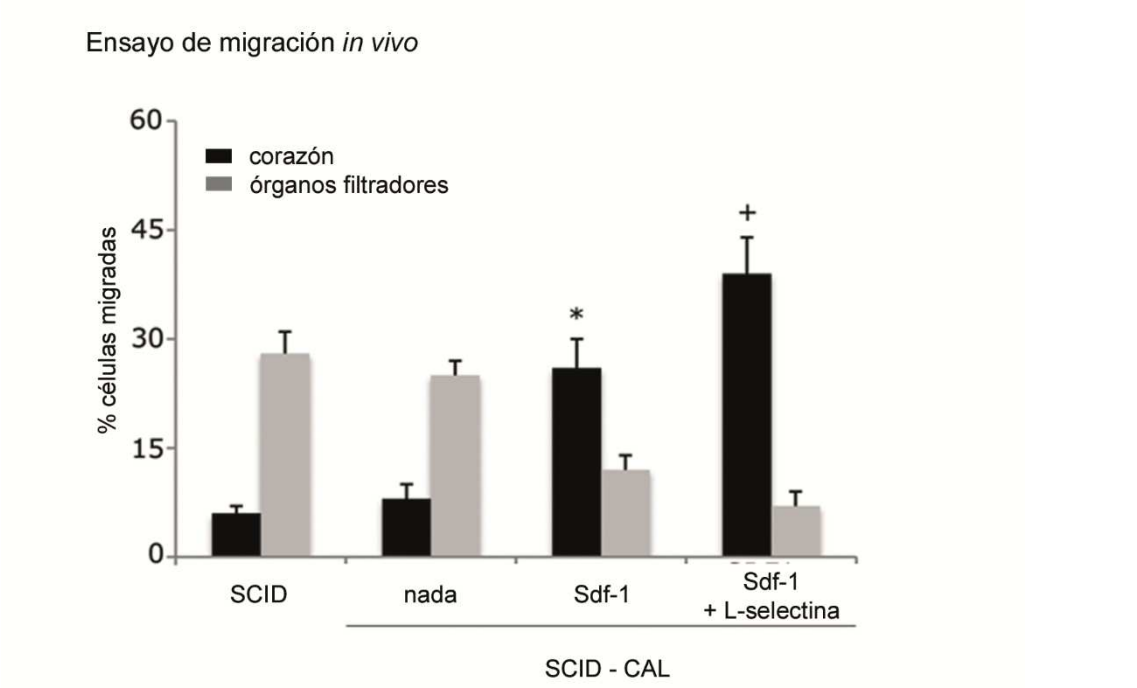


Figura 26. El pretratamiento de hCMAs mejora la migración *in vivo* al corazón. hCMAs transfectados con un vector para la expresión de L-selectina y GFP, posteriormente, pretratados con Sdf-1 fueron inyectados en el ventrículo izquierdo de ratones SCID sometidos a ligación de la arteria coronaria (CAL-SCID) y después de 6 h fueron recogidos para cuantificar la presencia de células migradas (hCMA-GFP+) mediante qRT-PCR. Se muestra la media de cinco experimentos independientes, realizados con triplicados (*$p < 0.025$; +$p < 0.015$).

En conjunto, estos resultados demuestran que esta estrategia, basada en el pretratamiento de los CMAs con Sdf-1 junto a la inducción de la expresión de la L-selectina tiene un efecto positivo en la capacidad migratoria de estas células, que permite aumentar la eficiencia de su participación en el proceso de reparación tras producirse un daño cardiaco.

Estrategia II: Estudio de los efectos de la estimulación de los CMAs con ultrasonidos pulsados de baja intensidad (LIPUS)

Una vez confirmado el éxito de los resultados de la primera estrategia, y con el objetivo de llevar a cabo una investigación más traslacional, que permitiera aplicar estos resultados a la clínica, en este trabajo se marcó un nuevo desafío, que favoreciera la utilización de los CMAs en este tipo de protocolos. Para ello, se planteó el objetivo de aumentar la capacidad migratoria de estas células consiguiendo disminuir tanto como fuera posible su manipulación, y desarrollar así un método menos invasivo y, a la vez, útil y eficaz en terapia celular. Con el fin de evitar el pretratamiento de las células con Sdf-1, y la transfección con vectores para la expresión de L-selectina, se han buscado aproximaciones biológicas, bioquímicas, técnicas y tecnológicas que permitieran alcanzar este objetivo. Por tanto, se propone esta segunda estrategia, basada en la estimulación de los CMAs con ultrasonidos pulsados de baja intensidad (LIPUS).

Tanto mCMAs como hCMAs fueron estimulados con LIPUS 20 min al día, durante 3 días. 24 h después de la última estimulación, los CMAs que fueron estimulados con LIPUS (US-CMAs) y los que no (CTRL-CMAs) se criopreservaron y, tras descongelarlos se sembraron en condiciones de cultivo y se llevaron a cabo diferentes ensayos y experimentos para identificar el efecto que tiene en los CMAs la estimulación con LIPUS (véase materiales y métodos, pág. 38).

9. La estimulación con LIPUS modifica las propiedades estructurales de los CMAs

En primer lugar se ha estudiado la apariencia de las células en cultivos. Se observó que, mientras los CTRL-CMAs presentan la morfología típica de células mesenquimales y crecen homogéneamente formando un monocapa, los US-CMAs muestran una forma poligonal y crecen formando agrupaciones celulares (figura 27).

Considerando que los US-CMAs muestran un cambio de morfología, más poligonal, se tiñeron las células con F-actina conjugada a rodamina (véase materiales y métodos, pág. 42), para determinar si los LIPUS inducen, también, modificaciones en el citoesqueleto de los CMAs. Los US-CMAs no sólo presentan un forma poligonal y crecen formando agrupaciones celulares, uniéndose unas células a otras

estrechamente (figura 28, agrupaciones); sino que además muestran una reorganización de las fibras del citoesqueleto de actina (Figura 28, fibras).

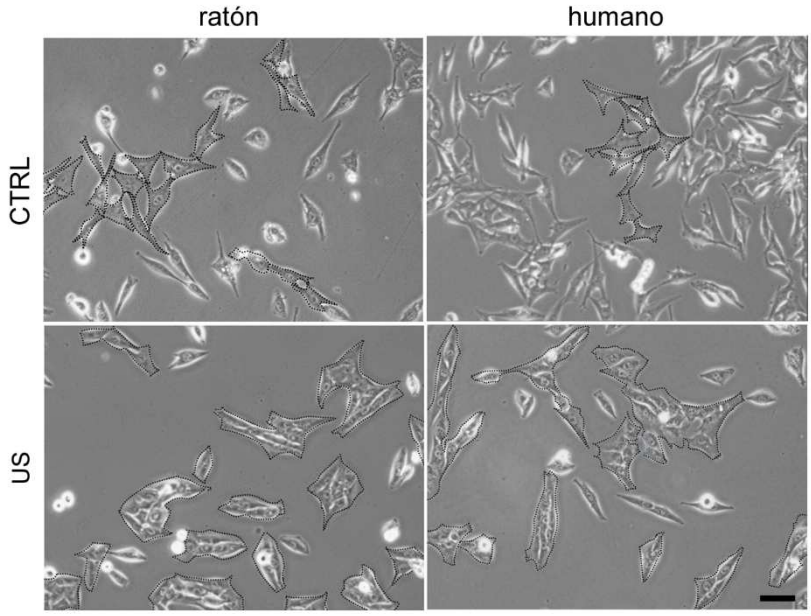


Figura 27. La estimulación con LIPUS modifica la morfología de los CMAs. CTRL-CMAs y US-CMAs en cultivo fueron observados mediante microscopía de contraste de fase. Barra, 10 µm.

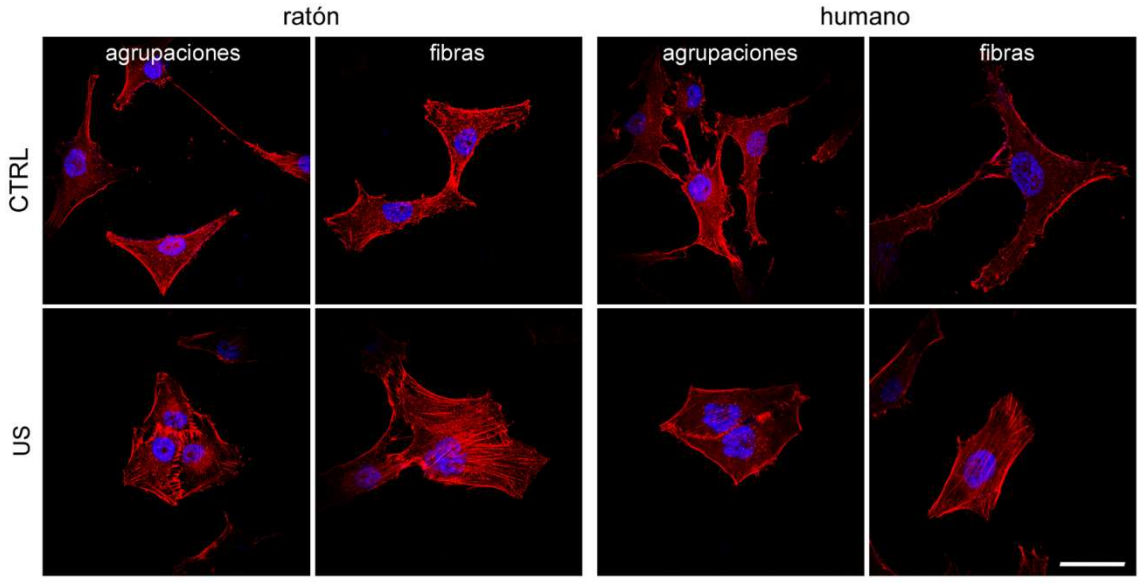


Figura 28. La estimulación con LIPUS induce la reorganización del citoesqueleto de F-actina de los CMAs. Imágenes de CTRL-CMAs y US-CMAs teñidos con faloidina-rodamina para marcar la F-actina (rojo). El núcleo está contrateñido con DAPI (azul). Se muestran dos imágenes representativas de las células formando agrupaciones (agrupaciones) y de la reorganización del citoesqueleto (fibras). Barra, 10 µm.

Teniendo en cuenta los cambios observados en la morfología y en la reorganización del citoesqueleto de F-actina, se planteó la posibilidad de que los LIPUS pudieran inducir modificaciones en las propiedades estructurales de las células. Para determinar el efecto de los LIPUS en las propiedades estructurales de los CMAs, se ha analizado la maleabilidad celular, mediante un ensayo de microaspiración capilar (véase materiales y métodos, pág. 43), que cuantifica la viscosidad de las células (Hochmuth, 2000, Plaza et al., 2014). Los resultados muestran que los US-CMAs son significativamente menos viscosos que los CTRL-CMAs, lo que supone una mayor maleabilidad celular (figura 29).

Además, se ha analizado la capacidad de adhesión de los CMAs, sembrando las células sobre diferentes matrices que forman parte de la MEC (véase materiales y métodos, pág. 44). En este caso, los US-CMAs mostraron significativamente menor capacidad de adhesión a fibronectina, a colágeno I y IV, y a fibrinógeno, que los CTRL-CMAs, mientras que no se apreciaron diferencias significativas en cuanto a la capacidad de adhesión a laminina (figura 30).

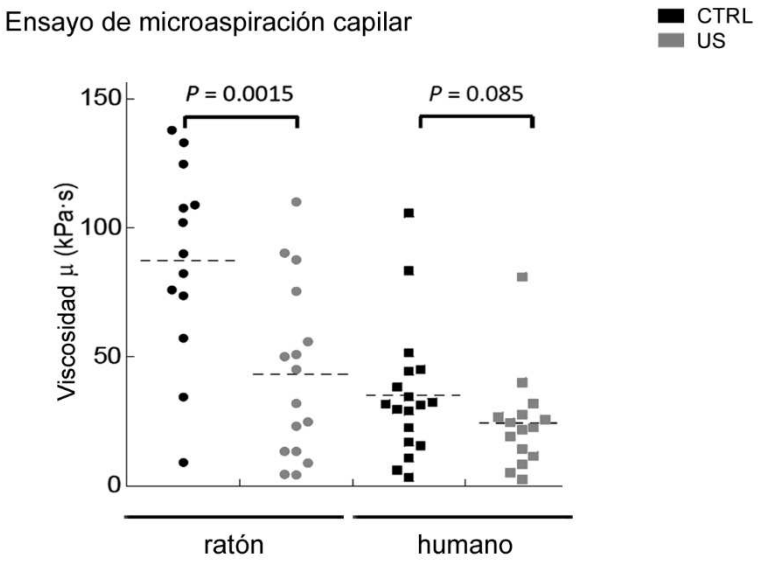


Figura 29. La estimulación con LIPUS aumenta la maleabilidad de los CMAs. La maleabilidad celular de CTRL-CMAs y US-CMAs cuantificada mediante el ensayo de microaspiración capilar. Se muestran los resultados de un experimento representativo, indicando la viscosidad celular, que es indirectamente proporcional a la maleabilidad celular. La línea discontinua marca la media de los datos.

Estos resultados muestran que los LIPUS inducen un cambio de morfología celular y crecimiento, formando agrupaciones celulares, así como una reorganización

en el citoesqueleto de F-actina. Además, la estimulación con LIPUS parece aumentar la maleabilidad de las células, a la vez que disminuye su capacidad de adhesión a determinadas proteínas de la matriz.

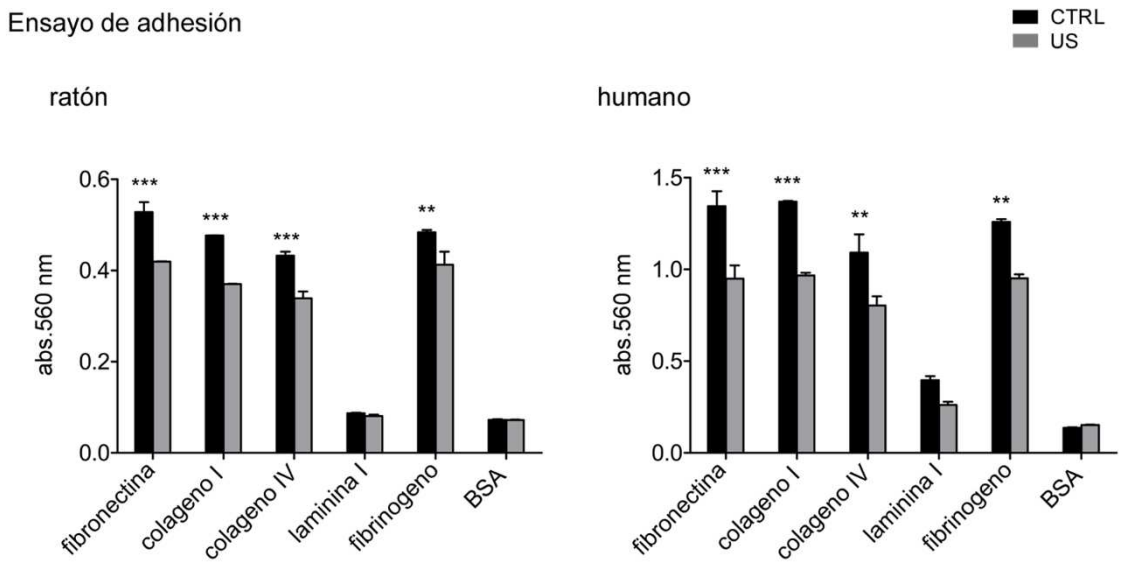


Figura 30. La estimulación con LIPUS disminuye la capacidad de adhesión de los CMAs a la MEC. La capacidad de adhesión celular de CTRL-CMAs y US-CMAs evaluada a través de un ensayo de adhesión celular a la MEC *in vitro*, sembrando las células sobre fibronectina, colágeno I, colágeno IV, laminina I y fibrinógeno; el BSA se utilizó como control de la capacidad de la adhesión celular sin matriz. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes, realizados con triplicados, indicando la media ± SEM de la absorbancia a 560 nm de muestras por triplicado. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

10. La estimulación con LIPUS no afecta a la viabilidad celular

Con el fin de determinar si la estimulación con LIPUS afecta a la viabilidad de los CMAs se ha analizado la capacidad de proliferación celular mediante un ensayo de incorporación de BrdU (véase materiales y métodos, pág. 41), en cuyos resultados no se apreciaron diferencias significativas entre US-CMAs y CTRL-CMA (Figura 31, A). Asimismo, se ha comprobado si los LIPUS inducen apoptosis en los CMAs, evaluando la simetría de la membrana celular mediante un método ratiométrico a través de citometría de flujo (véase materiales y métodos, pág. 42). Los US-CMAs presentaron un número significativamente mayor de células vivas y, consistentemente, menor número de células apoptóticas que los CTRL-CMAs, mostrando que los LIPUS no sólo no inducen apoptosis, sino que parecen reducirla. Cabe destacar que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a las células necróticas (figura 31, B).

Estos resultados indican que, a pesar de que los LIPUS no tienen ningún efecto sobre la proliferación celular, sí parecen inducir una disminución de la apoptosis de los CMAs.

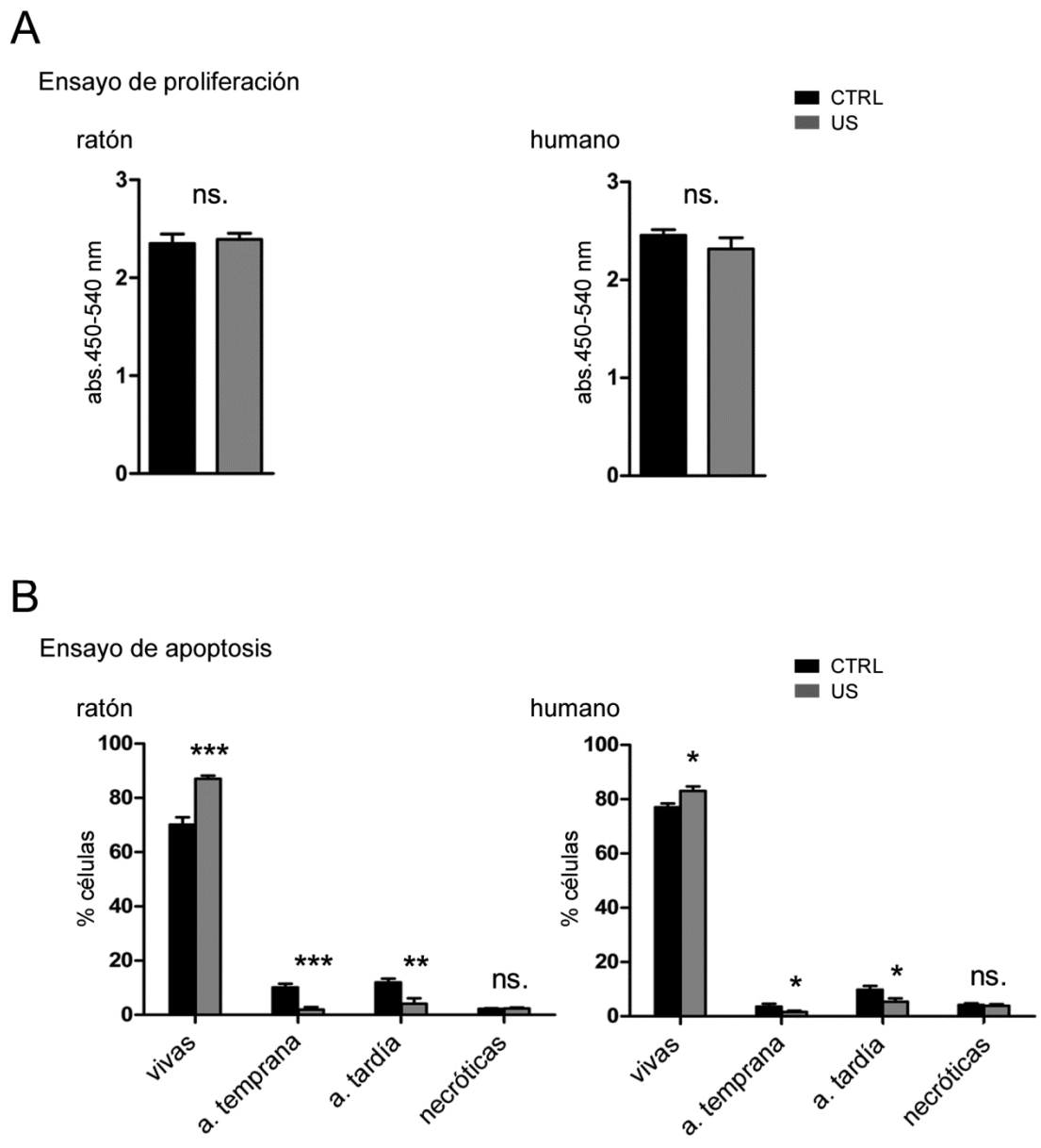


Figura 31. La estimulación con LIPUS no afecta a la proliferación celular pero sí disminuye la apoptosis de los CMAs. (a) La proliferación se calculó a través de un ensayo de incorporación de BrdU en CTRL-CMAs y US-CMAs. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes, realizados con triplicados. (b) La apoptosis se cuantificó mediante un ensayo ratiométrico mediante citometría de flujo. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes, realizados con triplicados, indicando la media ± SEM de los triplicados. ns, no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

11. La estimulación con LIPUS aumenta la motilidad de los CMAs

Los LIPUS, además de inducir una reorganización en el citoesqueleto de F-actina, generan una serie de cambios en algunas propiedades estructurales como la maleabilidad y la adhesión a la MEC, que podrían afectar a las propiedades biomécanicas y motrices de las células. Por eso, se ha estudiado la capacidad de migración y de invasión de los CMAs. En primer lugar, se ha analizado la capacidad de migración en el ensayo de *Wound-Healing*, eliminando una franja de una monocapa confluente de células (véase materiales y métodos, pág. 52). Los US-CMAs fueron significativamente más eficientes que los CTRL-CMAs en el proceso de cierre de la herida, en concreto durante las primeras 12 h en el caso los US-mCMA, a diferencia de los US-hCMA que mostraron significativamente mayor capacidad para cerrar la herida durante las 24 h (figura 32).

Asimismo, se ha analizado la capacidad de migración de los CMAs *in vitro* sembrando las células en *Transwell* y dejándolas migrar durante 24 h (véase materiales y métodos, pág. 52). Los US-CMAs migraron significativamente más que los CTRL-CMAs (figura 33).

Con el fin de determinar si se podría producir un efecto sinérgico o acumulativo entre el efecto quimioatrayente de algunas citoquinas como Sdf-1 (Bernal et al., 2012b) y la estimulación con LIPUS, se sembraron CMAs en *Transwell* en presencia de una serie de citoquinas en la cámara inferior del *Transwell*. La capacidad migratoria de las células aumentó significativamente en presencia de las citoquinas tanto en CTRL-mCMA como en CTRL-hCMA, en comparación con las células que se sembraron en *Transwell* en ausencia de citoquinas. Como también se había observado ya, los US-CMA mostraron significativamente más capacidad de migración que las CTRL-CMA. Sin embargo, los LIPUS no mostraron ningún efecto aditivo ni sinérgico con el efecto quimioatrayente de las citoquinas, aunque la capacidad de migración de los US-mCMAs en presencia de Hmgb-1 fue casi tres veces superior respecto a los CMAs sin ningún estímulo, así como la de los US-hCMAs en presencia de Mcp-1 (figura 34).

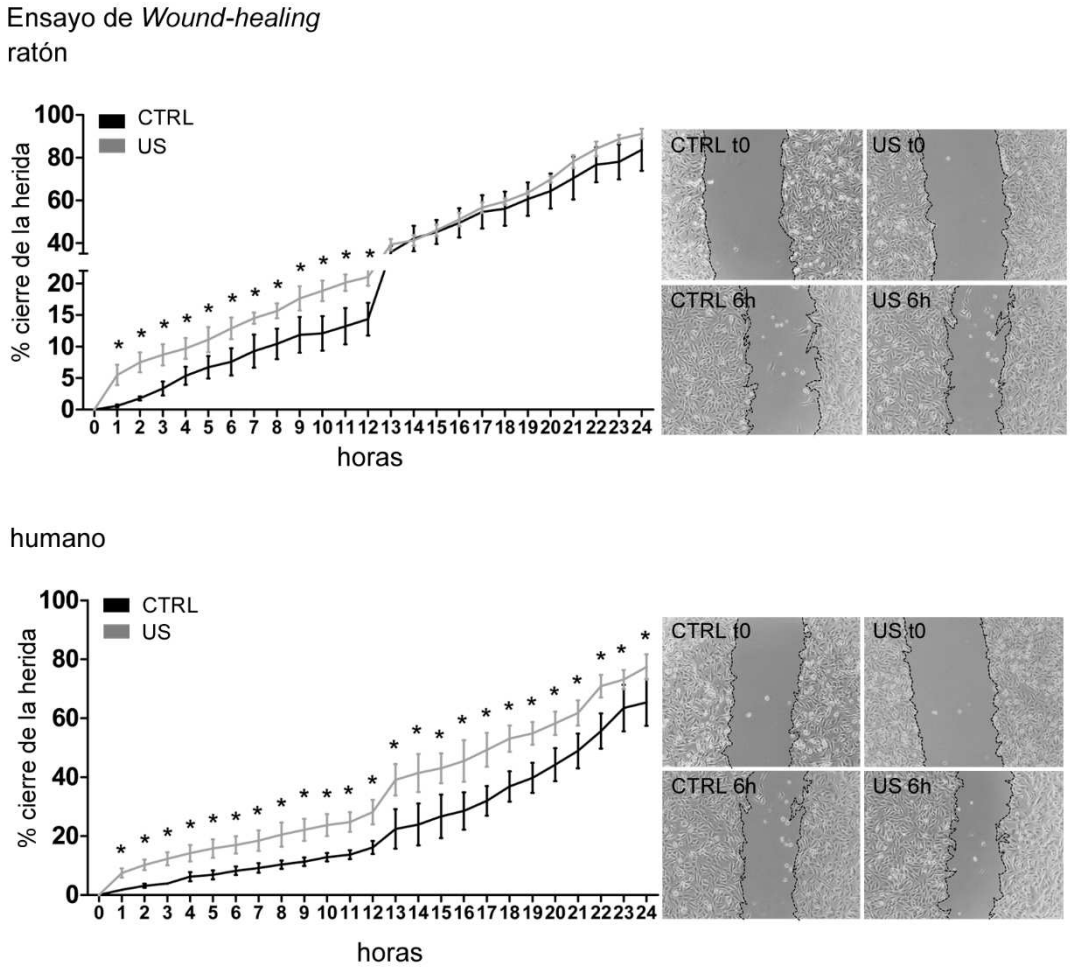


Figura 32. La estimulación con LIPUS aumenta la motilidad de los CMAs. Ensayo de *Wound-healing* llevado a cabo con CTRL-CMAs y US-CMAs. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes, realizados con triplicados, indicando la media ± SEM del porcentaje de cierre de la herida de los triplicados, cada hora durante 24 h. Se muestra una imagen (4x) representativa de CTRL-CMAs y de US-CMAs después de realizar la herida (t0) y 6 h después (6h). La línea discontinua marca el borde de la herida, * $p < 0.05$.

Para determinar el efecto de los LIPUS en la capacidad de invasión de estas células, se sembraron CMAs en *Transwell* recubiertos con gelatina al 1 %, y se dejaron migrar 24 h (véase materiales y métodos, pág. 54). Los resultados fueron consistentes con el efecto observado en la migración celular. Los US-CMA mostraron un aumento significativo en la capacidad de invasión respecto a los CTRL-CMA (figura 35).

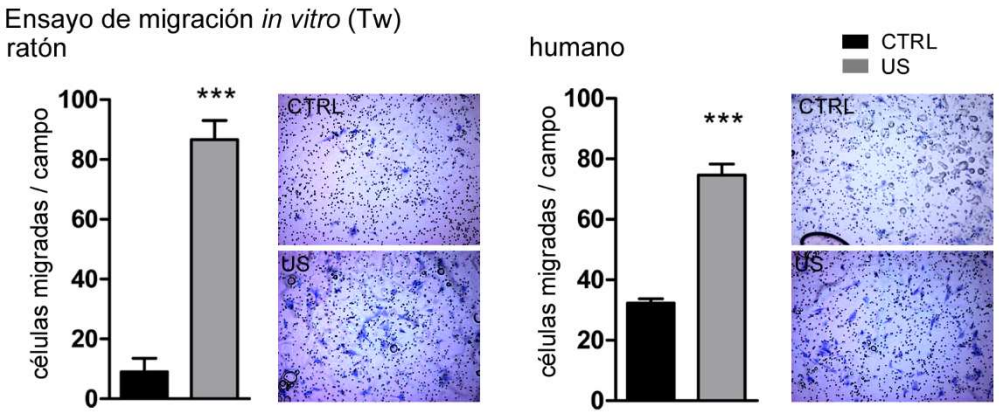


Figura 33. La estimulación con LIPUS aumenta la capacidad de migración *in vitro* de los CMAs (I). Ensayo de migración *in vitro* por *Transwell* realizado en CTRL-CMAs y US-CMAs. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes, realizados con triplicados, indicando la media ± SEM de las células migradas por campo de los triplicados. Se muestra una imagen (10x) representativa de uno de los cinco campos de una membrana de *Transwell* donde se sembraron CTRL-CMAs y de otra donde se sembraron US-CMAs. *** $p < 0.001$.

Con el fin de determinar si se podría producir un efecto sinérgico o acumulativo entre efecto quimioatrayente de algunas citoquinas como Sdf-1 y la estimulación con LIPUS, se sembraron CMAs en *Transwell* en presencia de una serie de citoquinas en la cámara inferior del *Transwell*. La capacidad de invasión de las células aumentó en presencia de las citoquinas tanto en CTRL-mCMA como en CTRL-hCMA, en comparación con las células que se sembraron en *Transwell* en ausencia de citoquinas, así como los US-CMA mostraron más capacidad de invasión que las CTRL-CMA. Además, no se observó ningún efecto aditivo entre los LIPUS y el efecto quimioatrayente de las citoquinas, a excepción de la combinación de Mcp-1 y estimulación con LIPUS (figura 36). Sin embargo, el efecto de las citoquinas en mCMAs fue bastante menor en los hCMAs, a excepción de Hmgb-1, que mostró un aumento significativo de la capacidad de invasión en US-mCMA.

En conjunto, estos resultados muestran que la estimulación con LIPUS aumenta significativamente la capacidad de migración e invasión de los CMAs.

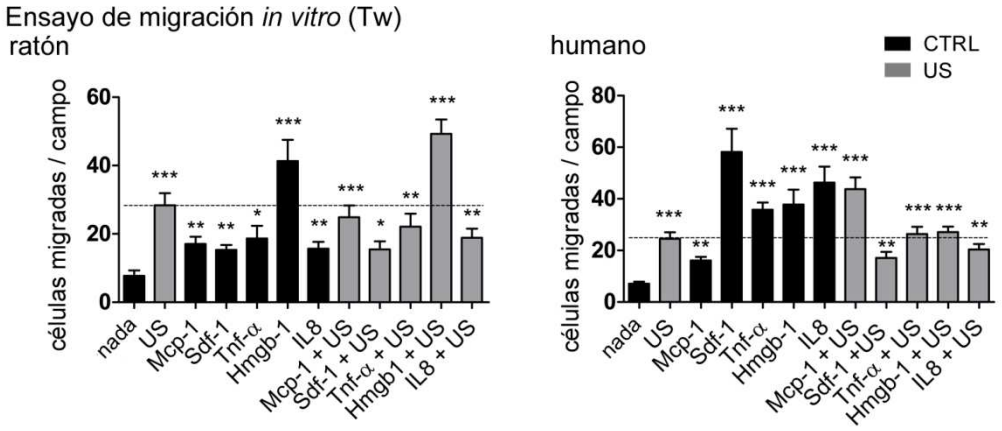


Figura 34. La estimulación con LIPUS aumenta la capacidad de migración *in vitro* de los CMAs (II). CTRL-CMAs y US-CMAs fueron inducidos a migrar en presencia de diferentes citoquinas en la cámara inferior del *Transwell*: Mcp-1 (80 ng/ml); Sdf-1 e IL8 (50 ng/ml); Tnf-α (30 ng/ml); Hmgb-1 (50 ng/ml), y en ausencia de citoquinas como control (nada). Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes, realizados con triplicados, indicando la media ± SEM de las células migradas por campo. La línea discontinua marca la capacidad de migración de los US-CMAs. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

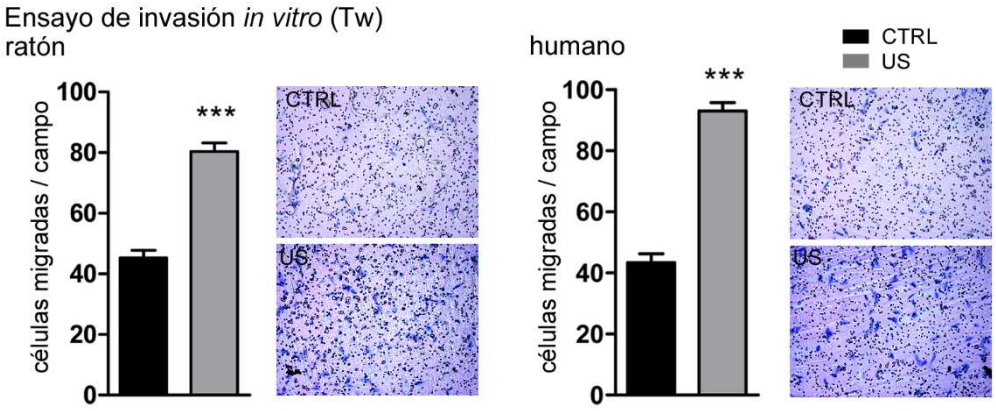


Figura 35. La estimulación con LIPUS aumenta la capacidad de invasión de los CMAs (I). Ensayo de invasión *in vitro* por *Transwell* realizado en CTRL-CMAs y US-CMAs. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes, realizados con triplicados, indicando la media ± SEM de las células migradas por campo. Se muestra una imagen (10x) representativa de uno de los cinco campos de una membrana de *Transwell* donde se sembraron CTRL-CMAs y de otra donde se sembraron US-CMAs. *** $p < 0.001$.

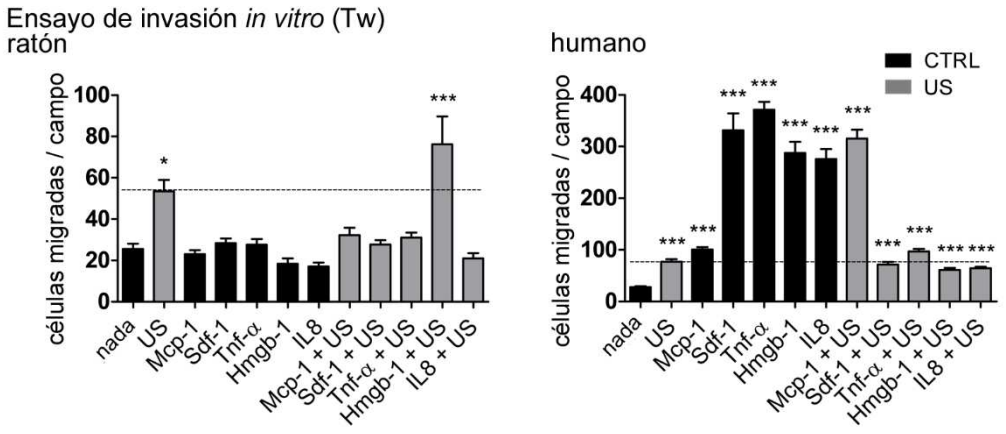


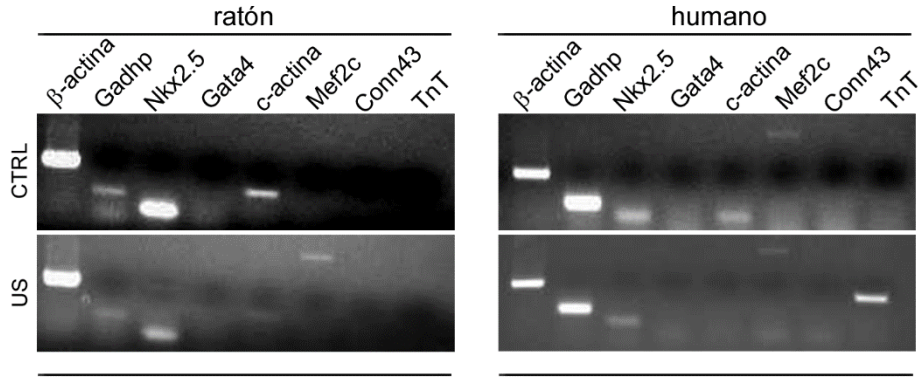
Figura 36. La estimulación con LIPUS aumenta la capacidad de invasión de los CMAs (II). CTRL-CMAs y US-CMAs fueron inducidos a migrar en presencia de diferentes citoquinas en la cámara inferior del *Transwell*: Mcp-1 (80 ng/ml); Sdf-1 e IL8 (50 ng/ml); Tnf-α (30 ng/ml); Hmgb-1 (50 ng/ml), y en ausencia de citoquinas como control (nada). Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes, realizados con triplicados, indicando la media ± SEM de las células migradas por campo de los triplicados. La línea discontinua marca la capacidad de migración de los US-CMAs. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

12. La estimulación con LIPUS potencia la diferenciación de los CMAs

Los CMAs son precursores mesenquimales precomprometidos a linaje cardiaco que expresan algunos factores de transcripción cardiacos (San Martin et al., 2011). Para evaluar si los LIPUS modulan el carácter precomprometido de estas células a linaje cardiaco, se ha estudiado el perfil de expresión génica de marcadores cardiacos mediante PCR (véase materiales y métodos, pág. 46). Los US-CMAs expresan Mef2c, Nkx2.5 y c-actina, a diferencia de los CTRL-CMAs, y los US-hCMA, expresan, además, troponina (figura 37).

Además, mediante inmunocitofluorescencia (véase materiales y métodos, pág. 50), se detectó más expresión de proteínas estructurales cardiacas, como conexina43, troponina T, α-actinina sarcomérica, actinina y ocludina en los US-CMAs, comparado con los CTRL-CMAs (figura 38). Además, las inmunocitofluorescencias mostraron el mismo patrón de la morfología celular descrito anteriormente.

Por otro lado, una observación más detallada de las células en cultivo (véase materiales y métodos, pág. 42) reveló la presencia de células binucleadas en los cultivos de US-CMAs (figura 39). No obstante, aunque no se detectó su presencia en los cultivos de CTRL-CMAs, la presencia de células binucleadas en los cultivos de US-mCMA fue del 12 % y del 8 % en el caso de los US-hCMAs.



ratón	CTRL	US
β-actina	+	+
Gadhp	+	+
Nkx2.5	+	+
Gata4	-	-
c-actina	+	+
Mef2c	-	+
Conn43	-	-
TnT	-	-

humano	CTRL	US
β-actina	+	+
Gadhp	+	+
Nkx2.5	+	+
Gata4	-	-
c-actina	+	-
Mef2c	+	+
Conn43	-	-
TnT	-	+

Figura 37. La estimulación con LIPUS activa la expresión de marcadores cardiacos. La expresión de los marcadores génicos cardiacos: Nkx2.5, Gata4, c-actin, Mef2c, Conexina43 y troponinaT, así como β-actina y Gapdh fue examinada por PCR en CTRL-CMAs y US-CMAs. Se muestra un gel de electroforesis en agarosa representativo de tres experimentos independientes. Los resultados están recogidos en las tablas, donde se indica si un gen se expresa (+) o si no se expresa (-).

Considerando que la estimulación con LIPUS podría estar induciendo la diferenciación de los CMAs, se ha comparado el efecto de los LIPUS y el del tratamiento de los CMAs con 5'azacitidina (véase materiales y métodos, pág. 52), compuesto químico utilizado en los protocolos de diferenciación cardiaca (Bernal and Galvez, 2013). Los cambios observados en los CTRL-CMAs tratados con 5'azacitidina fueron similares a los observados en los US-CMAs en ausencia de 5'azacitidina, mostrando una morfología poligonal y con la presencia de células binucleadas en el cultivo (figura 39).

Además, se analizó el perfil de expresión génica referente a los marcadores cardiacos, que confirmó que la estimulación con LIPUS puede activar la expresión de marcadores de linaje cardiaco y mostró que los efectos de la estimulación con LIPUS son similares a los del tratamiento de CMAs con 5'azacitidina (figura 40). Estos resultados sugieren que la estimulación con LIPUS podría emular los efectos de la 5'azacitidina en los CMAs, sugiriendo que los LIPUS podrían potenciar la diferenciación a linaje cardiaco.

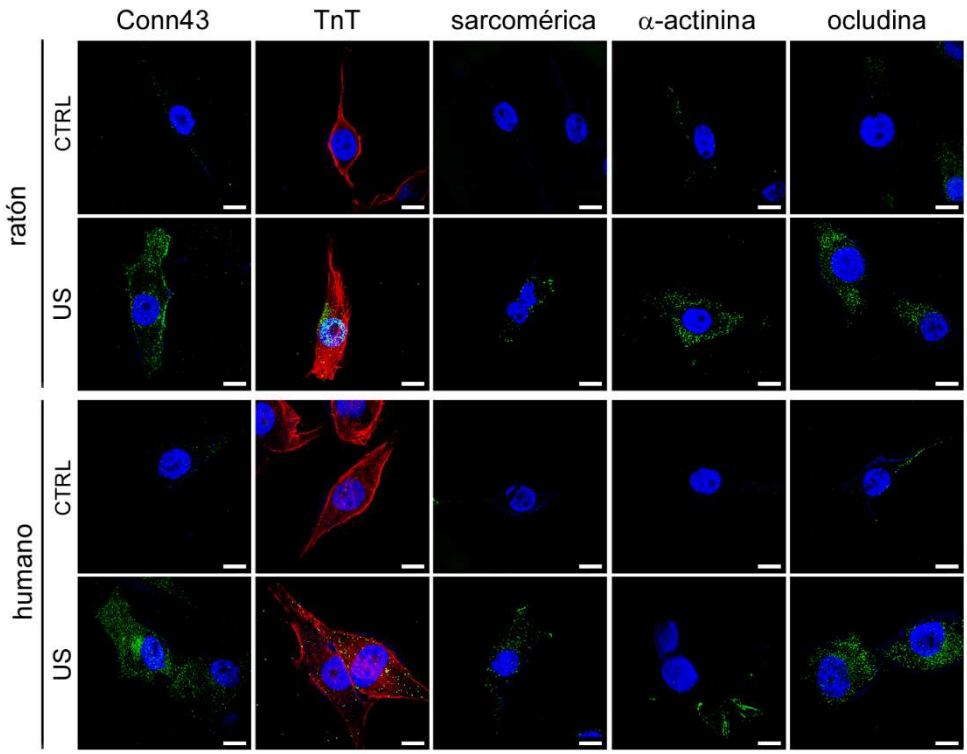


Figura 38. La estimulación con LIPUS activa la expresión de proteínas cardiacas. Inmunocitofluorescencias de CTRL-CMAs y US-CMAs para conexina43, troponinaT, actinina sarcomérica, α-actinina y ocludina (verde). La F-actina fue teñida con rodamina-faloidina (rojo); el núcleo fue contrateñido con DAPI (azul). Se muestra una imagen de microscopía confocal representativa de tres experimentos independientes. Barra, 10 µm.

13. La estimulación con LIPUS favorece el mantenimiento de los CMAs en el corazón

Tras comprobar que la estimulación con LIPUS mejora la capacidad de migración y de diferenciación *in vitro* de los CMAs, se ha explorado el papel que podría tener la estimulación con LIPUS en los protocolos de terapia celular. Por tanto, se ha evaluado si la estimulación con LIPUS podría tener efectos positivos en la reparación del daño tisular. Para ello, los CMAs fueron transducidos con un vector para la expresión de GFP (véase materiales y métodos, pág. 32), y una vez seleccionados y separados los CMA-GFP+ por citometría de flujo, fueron estimulados con LIPUS. A continuación, los CTRL-CMA-GFP+ y los US-CMA-GFP+ fueron inyectados en el ventrículo izquierdo de ratones a los que previamente se les había inducido un daño cardiaco por inyección de cardiotoxina (Wang et al., 2005). Los ratones fueron sacrificados 24 h, 48 h, 21 días y 42 días después de haber inyectado las células. Los corazones fueron procesados para el aislamiento de ARN y la cuantificación de la presencia de GFP, y para histología (véase material y métodos, pág. 53). 24 h después de haber inyectado las células se

detectaron niveles más altos de US-CMA-GFP+ que de CTRL-CMA-GFP+, y en ambos casos estos niveles aumentaron en los corazones de los ratones sacrificados a las 48 h (figura 41). Sin embargo, a los 21 días de haber inyectado las células no se detectó apenas expresión de GFP, mientras que en los corazones de los ratones sacrificados a los 42 días, la expresión de GFP incrementó respecto a detectada a los 21 días, y fue más alta en los corazones que recibieron US-CMA-GFP+, aunque fue considerablemente más baja que la detectada a las 24 h.

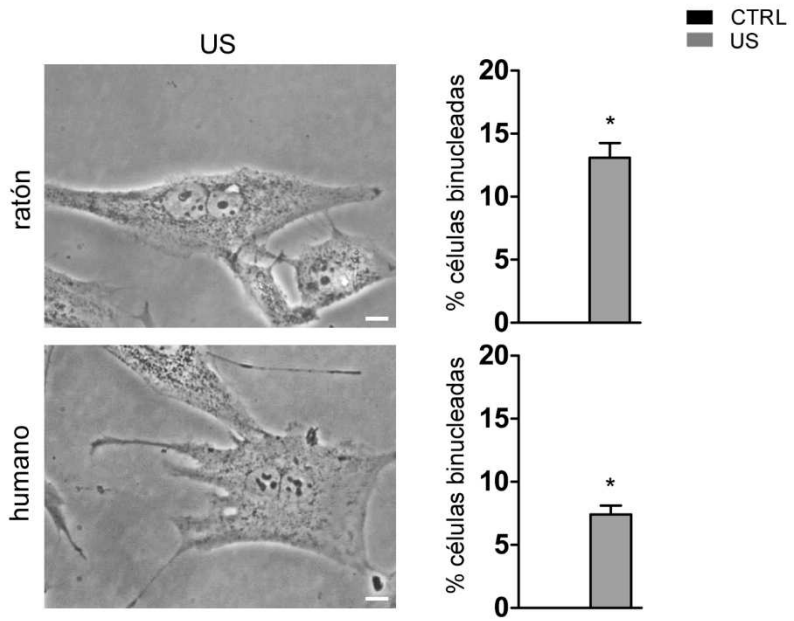
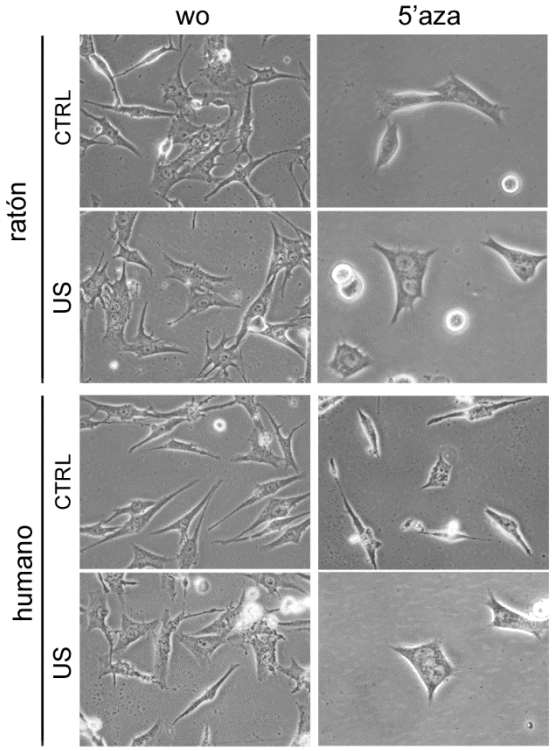


Figura 39. La estimulación con LIPUS promueve la presencia d células binucleadas en los cultivos de CMAs. Células binucleadas presentes en los cultivos de US-CMAs, observados en cultivos mediante microscopía de contraste de fase. Se muestran dos imágenes representativas (40x) de uno de los cinco campos seleccionados al azar de US-CMAs binucleados. Se muestran los resultados de la media del número de células binucleadas/campo ± SEM presentes en cinco campos seleccionados al azar en campos 20x de tres experimentos independientes, realizados con triplicados. Barra, 2.5 µm. * $p < 0.05$.

Para confirmar estos resultados, se realizaron inmunohistofluorescencias en cortes de los corazones de los ratones sacrificados 42 días después de haber inyectado las células (véase materiales y métodos, pág. 54). Mientras que los CTRL-CMA-GFP+ aparecían escasamente en las secciones de los corazones, los US-CMA-GFP+ aparecieron en mayor cantidad y, además, mostrando la estructura sarcomérica típica de los CMCs, sugiriendo que los US-CMAs se habrían podido diferenciar a CMCs llegando a integrarse en el tejido cardiaco.



ratón	CTRLÍ		US	
	wo	5'aza	wo	5'aza
β-actina	+	+	+	+
Nkx2.5	+	++	+	++
Gata4	-	-	-	-
c-actina	+	++	+	+
Mef2c	-	+	+	++
Conn43	-	+	+	+
TnT	-	+	+	+

humano	CTRL		US	
	wo	5'aza	wo	5'aza
β-actina	+	+	+	+
Nkx2.5	+	++	++	++
Gata4	-	-	-	-
c-actina	+	+	+	+
Mef2c	-	+	+	+
Conn43	-	+	+	+
TnT	-	+	+	+

Figura 40. La estimulación con LIPUS potencia la diferenciación cardiaca de los CMAs. CTRL-CMAs y US-CMAs fueron tratados con 5'azacitidina (10μM) para inducir su diferenciación a linaje cardiaco. Se muestran dos imágenes representativas (4x y 10x) de tres experimentos independientes, realizados con triplicados. Estas imágenes muestran el cambio de morfología celular y la presencia de células binucleadas en el cultivo. El perfil de expresión génica de los marcadores cardiacos Nkx2.5, Gata4, c-actina, Mef2c, Conexina43 (Conn43) y troponinaT, así como β-actina y Gapdh fue analizado por PCR en CTRL-CMAs y US-CMAs en presencia (5'-aza) o ausencia (wo) de 5'azacitidina (10 μM). Los resultados están recogidos en las tablas, donde se indica si un gen se expresa (+), si se expresa altamente (++), o si no se expresa (-).

Estos resultados, indican que la estimulación con LIPUS favorece en el mantenimiento de estas células en el corazón, después de un daño cardiaco.

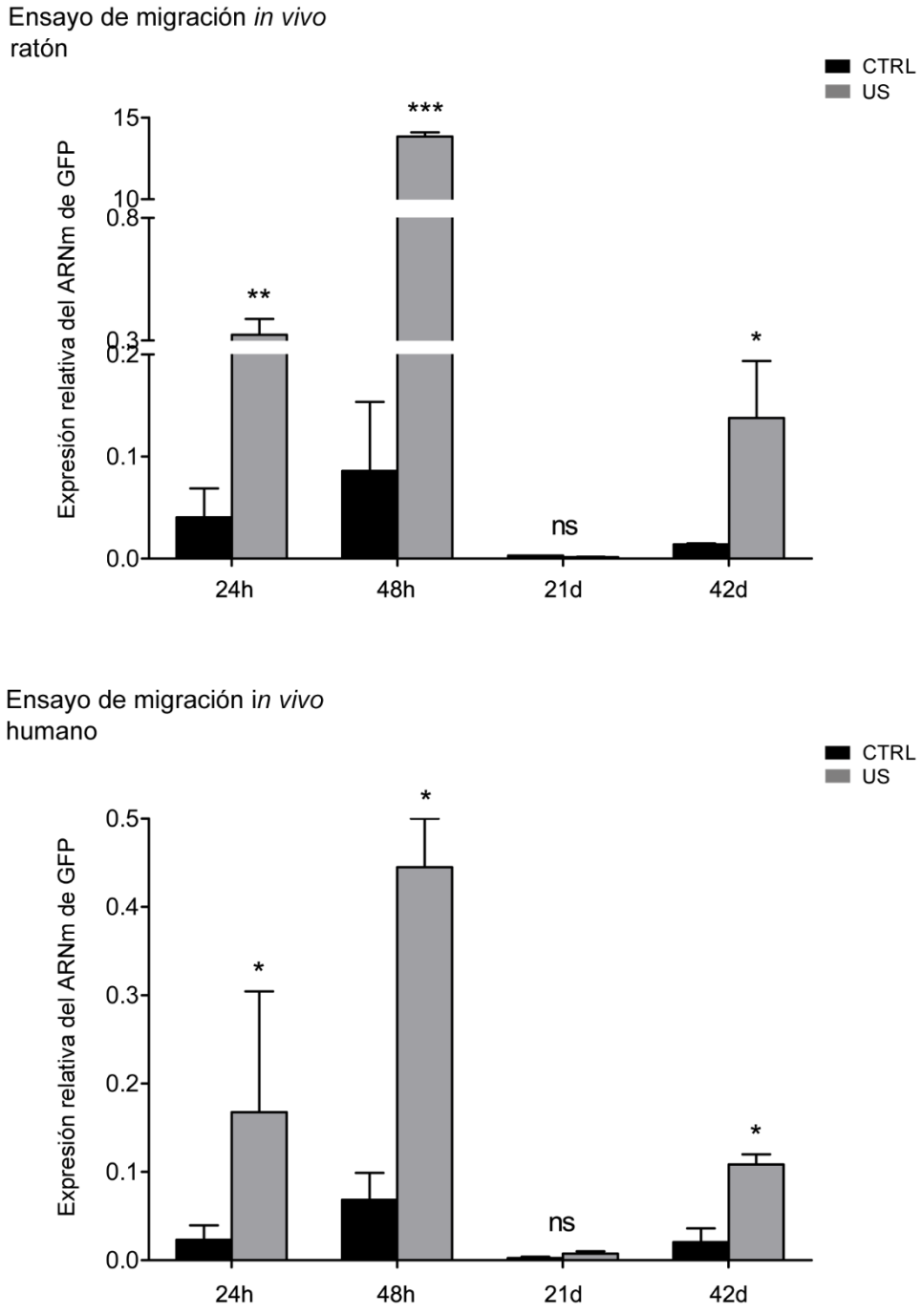


Figura 41. La estimulación con LIPUS favorece el mantenimiento de los CMAs en el corazón (I). CTRL-CMA-GFP+ y US-CMA-GFP+ fueron inyectados en el ventrículo izquierdo del corazón de ratones sometidos a daño cardiaco por inyección de cardiotoxina. Los ratones fueron sacrificados 24 h, 48 h, 21 y 42 días después de haber inyectado las células, y se recogieron los corazones. La expresión relativa de GFP fue cuantificada por qRT-PCR. Se muestran los resultado de un experimento represantativo, de tres experimentos independientes. ns, no significativo; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

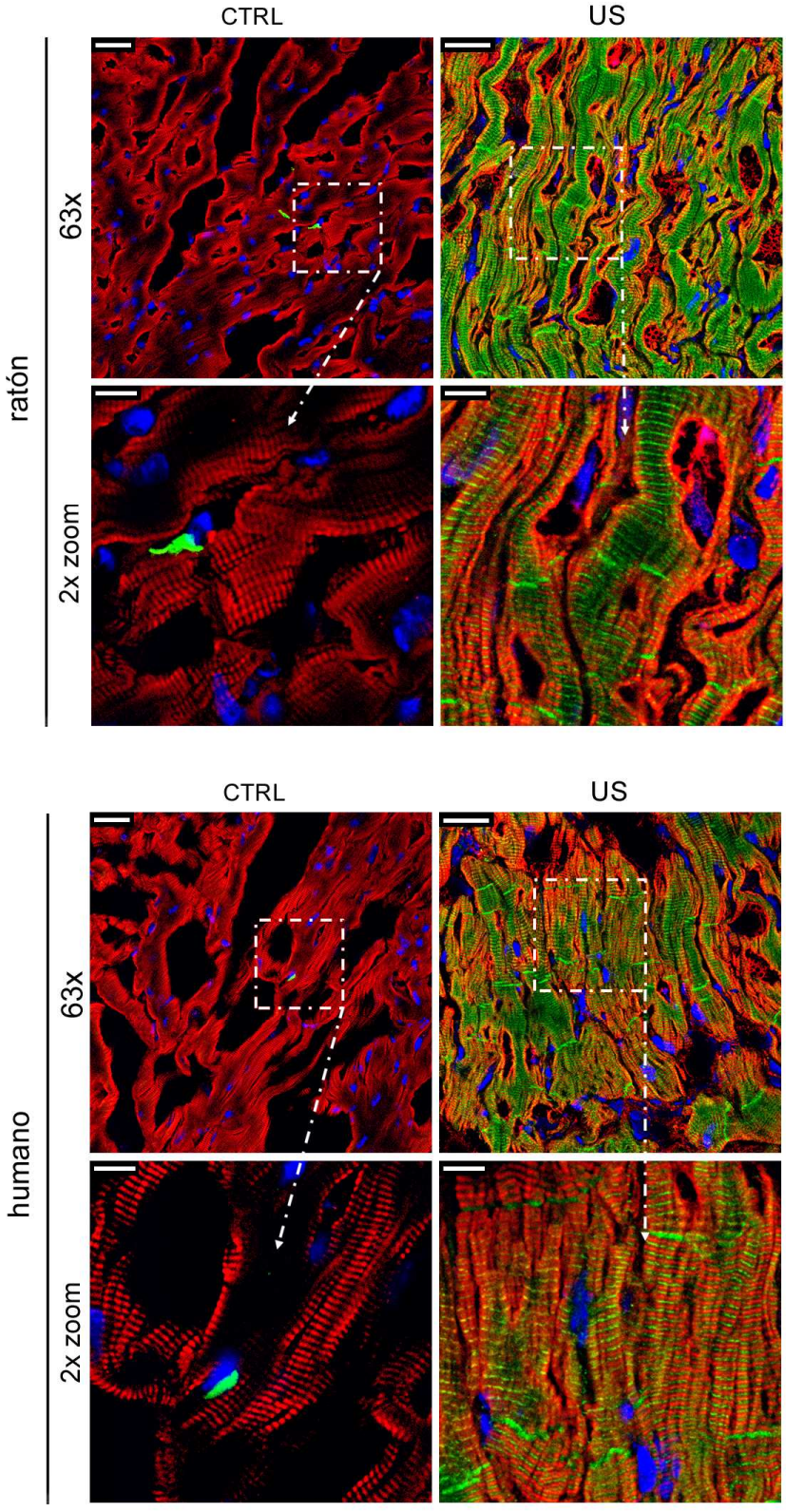


Figura 42. La estimulación con LIPUS favorece el mantenimiento de los CMAs en el corazón (II). Inmunohistofluorescencia en cortes de corazones de ratones sacrificados 42 días después de haber inyectado en el ventrículo izquierdo CTRL-CMA-GFP+ y US-CMA-GFP+. Se observa la troponina (rojo), los CMA-GFP+ (verde) y los núcleos, contrateñidos con DAPI (azul) La línea discontinua marca la zona de ampliada. Barra, 25 µm; barra de la zona ampliada, 7.5 µm.

14. La estimulación con LIPUS aumenta la expresión de algunas proteínas implicadas en la diferenciación a CMCs, a través de la ruta de señalización de las BMPs, y en la motilidad de la actina a través de Rho

Con el objetivo de explorar el mecanismo subyacente a la estimulación con LIPUS, se ha realizado un análisis de *microarray* de expresión para determinar los genes diferencialmente expresados entre CTRL-mCMAs y US-mCMAs (véase materiales y métodos, pág. 45). Los resultados fueron confirmados con qRT-PCR (datos no mostrados), y analizados con el software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). El gen más sobre-expresado en US-mCMA fue el de la cadena ligera de la miosina, *Myl2* (tabla 10). El análisis funcional que se llevó a cabo con IPA identificó el proceso del desarrollo y funcionamiento del sistema cardiovascular como la red funcional significativamente más asociada con la sobreexpresión de *Myl2*, y como rutas de señalización canónicas relacionadas con los resultados del *microarray*, la diferenciación a CMCs a través de los receptores de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), la señalización por citoquinas y la regulación de la motilidad de la actina a través de Rho (tabla 11).

Gen		valor de expresión	
Myl2	cadena ligera de la miosina	↑	3.451
Kcnj11	canal de potasio J, 11	↓	-1.277
Mcf2l	secuencia transformadora derivada de línea celular	↓	-1.177
Pax3	Paired box3	↓	-1.049

Tabla 10. Análisis de *microarray* para examinar los genes diferencialmente expresados entre CTRL-mCMAs y US-mCMAs. El IPA indica los genes sobreexpresados (flecha roja), y los menor expresados (flecha roja). La tabla muestra que el gen más sobreexpresado en los US-mCMAs es la *Myl2* (flecha roja).

Rutas de señalización canónicas relacionadas con la expresión génica de los US-mCMAs
• diferenciación a CMCs a través de los receptores de las BMPs. • señalización por citoquinas. • regulación de la motilidad de la actina a través de Rho. • factores promotores de cardiogénesis en vertebrados. • rutas de señalización de PAK.

Tabla 11. Rutas de señalización canónicas relacionadas con la expresión génica de los US-mCMAs. Rutas de señalización canónicas relacionadas con los resultados proporcionados por el IPA relativos a la expresión génica diferencial de los CTRL-mCMAs y los US-mCMAs.

Para confirmar el dato de la sobreexpresión de *Myl2* en los US-CMAs, se cuantificó la cantidad de proteína Myl2 mediante *western blot* (véase materiales y métodos, pág. 48), que confirmó que los US-CMAs tienen mayor cantidad de Myl2 (figura 43). Asimismo, se comprobó mediante inmunocitofluorescencia (véase materiales y métodos, pag. 50) que estas células expresan más Myl2, a diferencia de los CTRL-CMAs, que la expresan más débilmente (figura 43).

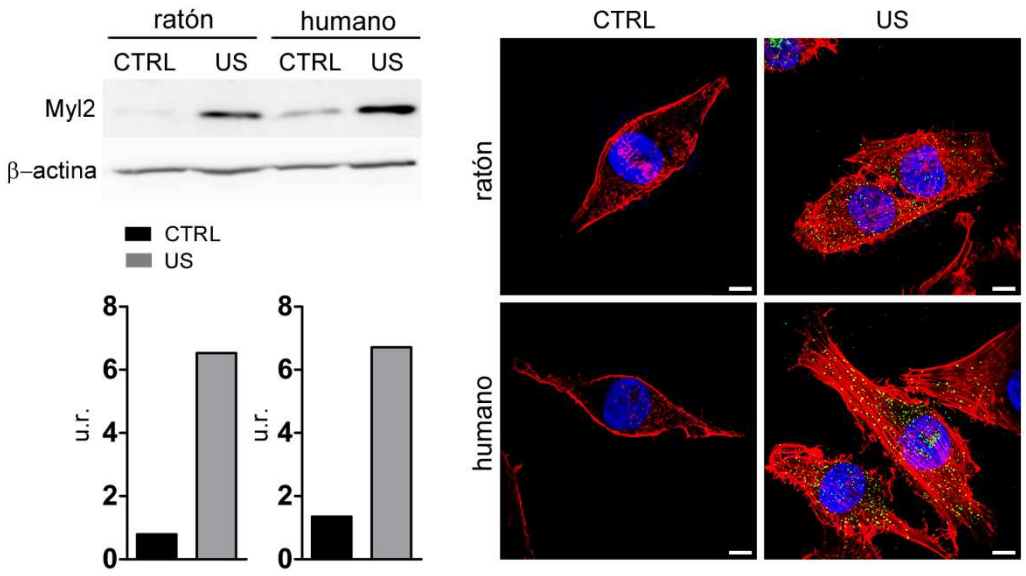


Figura 43. La estimulación con LIPUS aumenta la expresión de Myl2. La expresión de Myl2 en CTRL-CMAs y US-CMAs fue cuantificada por *western blot* y examinada por microscopía confocal. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes y representan la cantidad relativa de Myl2 normalizada frente a la β-actina. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. El punteado de la Myl2 (verde) se observa en los US-CMAs, pero no en los CTRL-CMAs. La F-actina fue teñida con faloidina-rodamina (rojo); y el núcleo fue contrateñido con DAPI (azul). Barra, 10µm.

Las BMPs están involucradas en la regulación de numerosos procesos celulares, algunos de ellos implicados en el desarrollo cardiovascular (Schultheiss et al., 1997). La ruta de señalización de las BMPs implicada en la diferenciación de las células a CMCs típicamente se inicia con la unión del ligando Bmp2 a los receptores de las BMPs, que activan el complejo p-Smad 1, 5 y 8, que, una vez traslocado al núcleo desencadena la diferenciación cardiaca (van Wijk et al., 2007). Con el fin de analizar si esta ruta se modifica por la estimulación con LIPUS, se cuantificó mediante *western blot* la cantidad de algunas proteínas implicadas en esta ruta (véase materiales y métodos, pag. 48).

Los US-CMAs presentan niveles más altos de Bmp2 (figura 44, A) y de p-Smad 1, 5, 8 (figura 44, B), en comparación con los CTRL-CMAs.

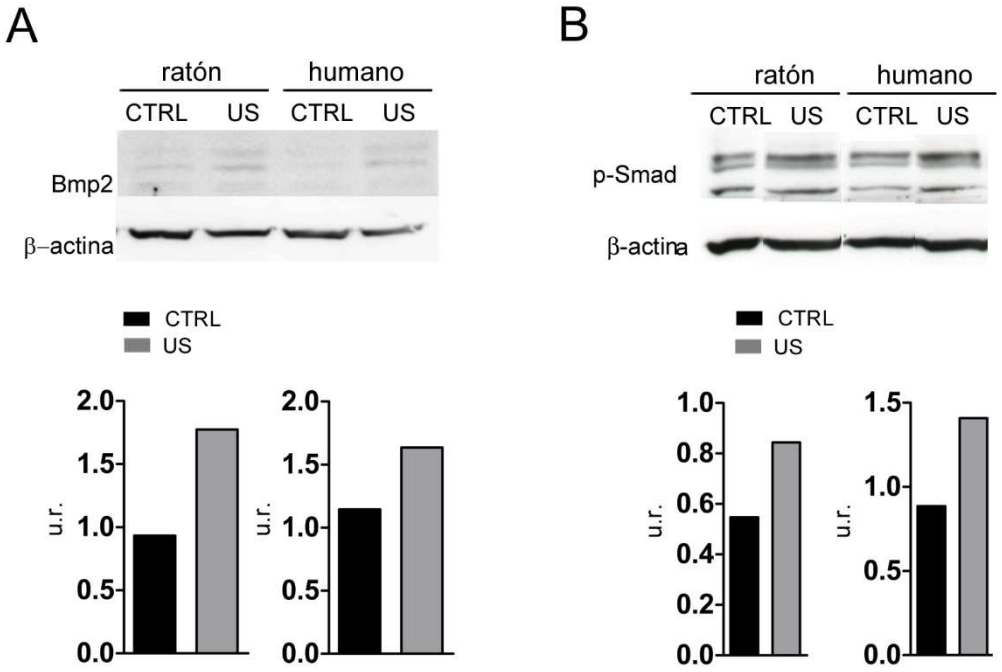


Figura 44. La estimulación con LIPUS aumenta la expresión de Bmp2 y de p-Smad 1, 5, 8. (a) *Western blot* para cuantificar la expresión de Bmp2 en CTRL-CMAs y US-CMAs. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos y representan la cantidad de Bmp2 normalizada frente a β-actina. (b) *Western blot* para cuantificar la expresión de p-Smad en CTRL-CMAs y US-CMAs. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos y representan la cantidad de p-Smad 1, 5, 8 normalizada frente a la β-actina.

Por otra parte, las integrinas son elementos clave en la transducción de la señal de ultrasonidos (Pounder and Harrison, 2008) y estudios recientes han mostrado un aumento de β1-integrina en MSCs sometidas a un estímulo mecánico (Watabe et al., 2011). Además, se ha descrito que las fuerzas de tensión y rigidez son suficientes para la activación mecánica de β1-integrina (Friedland et al., 2009), y debido al cambio conformacional que experimenta cuando se activa, por colocalización promueve la activación de los receptores de las BMPs (Lai and Cheng, 2005). Por tanto, se ha cuantificado la cantidad de esta proteína mediante *western blot* (véase materiales y métodos, pág. 48). Los US-CMAs presentan más cantidad de β1-integrina que los CTRL-CMAs (figura 45, A).

Además, para comprobar que ambas proteínas colocalizan en los CMAs se ha llevado a cabo una inmunocitofluorescencia (véase materiales y métodos, pág. 50).

Efectivamente, se han detectado regiones de las células en las que los receptores de las BMPs y β1-integrina colocalizan (figura 46).

Asimismo, cabe tener en cuenta que β1-integrina se une a la F-actina y forma las adhesiones focales, que actúan como puente de unión entre el dominio citoplasmático de β1-integrina y el citoesqueleto (Ziegler et al., 2008). Además, β1-integrina también activa rutas de señalización asociadas a integrinas como algunas en las que está implicada Rho (Riveline et al., 2001), y se sabe que la estimulación mecánica puede inducir la formación de fibras de estrés y adhesiones focales (Pavalko et al., 1998).

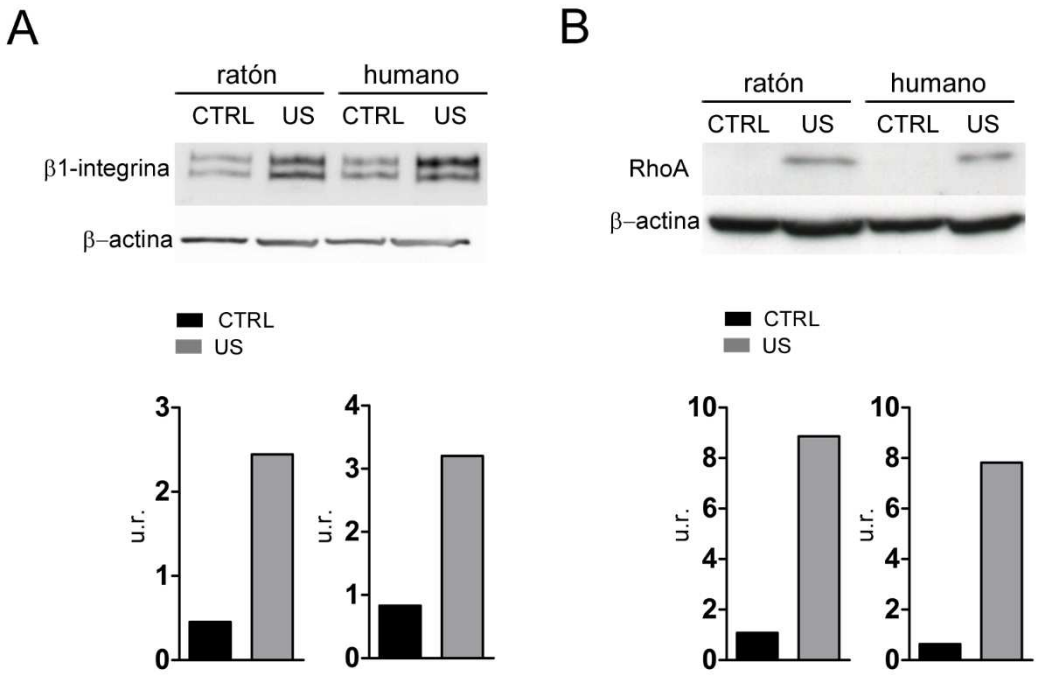


Figura 45. La estimulación con LIPUS aumenta la expresión de RhoA y de β1-integrina. (a) *Western blot* para cuantificar la expresión de β1-integrina en CTRL-CMAs y US-CMAs. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos y representan la cantidad de β1-integrina normalizada frente a la β-actina. (b) *Western blot* para cuantificar la expresión de RhoA en CTRL-CMAs y US-CMAs. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos y representan la cantidad de RhoA normalizada frente a la β-actina.

Por tanto, y como los resultados del *microarray* analizados mediante el IPA, apuntaron a la regulación de la motilidad de la actina a través de Rho como una de la rutas más importantes relacionadas con los cambios de expresión detectados en los US-CMAs, y, considerando, además, que Rho/ROCK están implicadas en la reorganización de los componentes del citoesqueleto (Ridley and Hall, 1992, Hotchin

and Hall, 1995), se han cuantificado los niveles de RhoA mediante *western blot* (véase materiales y métodos, pag. 48). Así, se comprobó que los US-CMAs presentan más cantidad de RhoA que los CTRL-CMAs (figura 45, B).

En conjunto, estos resultados sugieren que la estimulación con LIPUS induce una potenciación de la diferenciación a CMCs, al menos en parte a través de la ruta de señalización de los receptores de las BMPs, debido a un incremento en los niveles de Bmp2, el cual una vez fuera de las células se uniría a su receptor, que promovería la activación del complejo p-Smad 1, 5, 8, desencadenando la diferenciación a linaje cardiaco. Estos resultados sugieren que β1-integrina podría estar actuando como mecanorreceptor de los LIPUS, y que estaría activando a RhoA, implicado en la reorganización del citoesqueleto de actina.

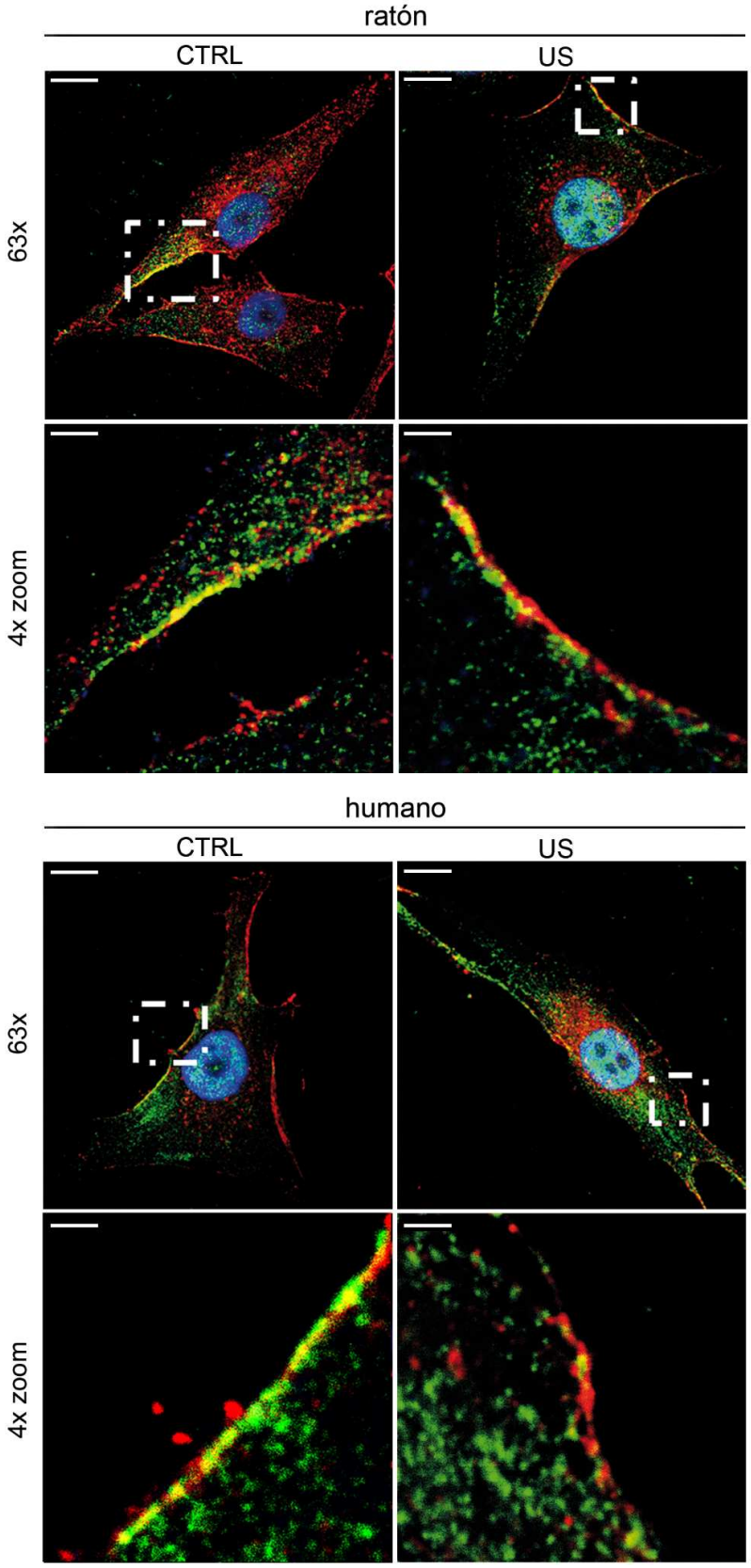


Figura 46. El receptor de Bmp2 y β1-integrina colocalizan en los CMAs. Inmunohistofluorescencia de CTRL-CMAs y US-CMAs. Se observa el receptor de Bmp2 (en verde) y la β1-integrina (en rojo), que colocalizan mostrando señal amarilla. El núcleo está contrateñido con DAPI (azul). La línea discontinua marca la zona ampliada. Barra 10 µm, barra de la zona ampliada 2.5 µm.

Quem deu a sua vida construindo um caminho que se inicia num campo e que fosse dar a meio de outro; que, prolongado, seria inútil, mas que se ficaria sublimemente, em apenas metade do caminho.

Quién diera su vida construyendo un camino empezado en medio de un campo y que fuese a dar en medio otro; que, prolongado, sería inútil, pero que se quedaría sublime, en apenas la mitad del camino.

Fernando Pessoa, del Libro del Desasosiego.

Discusión

DISCUSIÓN

La enfermedad isquémica del corazón es actualmente una de las mayores causas de fallo cardiaco y una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Los protocolos de terapia celular, utilizando diferentes tipos de células madres, han alcanzado sólo un éxito parcial (Beltrami et al., 2003, Caplice and Deb, 2004, Dawn et al., 2005, Linke et al., 2005, Oh et al., 2003, Urbanek et al., 2005). Hasta ahora, el suministro intravascular o intramiocárdico de células al corazón parece ser una las aproximaciones más prometedoras porque aunque permite conseguir un éxito parcial de la restauración de la estructura y la función cardiaca, éste es significativo,. Sin embargo, la migración y el potencial de diferenciación de las células madre, así como su capacidad de regeneración o reparación del tejido son puntos clave que aún quedan por resolver para poder implementar en el ámbito clínico los protocolos de terapia celular desarrollados desde el punto de vista de la investigación básica.

En este trabajo se proponen dos estrategias experimentales novedosas que permiten aumentar la eficiencia de las propiedades de los CMAs, una población de células madre mesenquimales residentes en el corazón, aisladas mediante el método explante (Bernal et al., 2012a) (véase anexo I), que tienen la capacidad de diferenciarse a CMCs y de restaurar parcialmente tanto la estructura como la función cardiaca en un modelo de infarto cardiaco (Galvez et al., 2008). Una de las estrategias pretende incrementar la migración de los CMAs mediante el uso de citoquinas y moléculas de adhesión. Determinadas citoquinas pueden modificar la capacidad de migración de las células madre (Galvez et al., 2006, Palumbo et al., 2007), además de otras muchas funciones, como la inmunorregulación (Palumbo et al., 2004, Laterveer et al., 1996, Peled et al., 1999, Kyurkchiev et al., 2014). En el proceso de migración y *homing* (Butcher, 1991, Fu and Liesveld, 2000, Peled et al., 1999, Grabovsky et al., 2000), aparte de las citoquinas, se sabe que también algunas moléculas de adhesión, presentes en la superficie de las células, son imprescindibles para el proceso de extravasación que completa la migración celular, (Butcher, 1991, Springer, 1994, Greenwood et al., 1995, Bevilacqua and Nelson, 1993, Stoolman, 1989). Por tanto, esta estrategia consiste en el pretratamiento de los CMAs con citoquinas y en la modificación de estas células para inducir la expresión de ciertas moléculas de

adhesión en la superficie celular. La segunda estrategia supone un paso más allá y explora la posibilidad de promover ciertas modificaciones en las células de un modo primario y no invasivo que permitan aumentar todas aquellas propiedades de los CMAs útiles en un modelo de terapia celular, incluyendo no sólo la migración sino también la diferenciación celular. Esta segunda estrategia está basada en las modificaciones celulares que inducen los LIPUS en diferentes tipos celulares (Suzuki et al., 2009b, Suzuki et al., 2009a, Zhou et al., 2004, Padilla et al., 2014, Xu et al., 2012, Nakamura et al., 2011, Li M and Ikehara S, 2013, Lv et al., 2013, Jiang et al., 2012, Kusuyama et al., 2014, Ying et al., 2012), y consiste en la estimulación no invasiva de los CMAs. Ambas estrategias se han desarrollado para mejorar y potenciar la capacidad de migración de los CMAs a la zona de daño cardiaco, así como su potencial de diferenciación, con el objetivo final de aumentar la eficiencia de estas células en la reparación y regeneración del tejido cardiaco, lo que supondría el desarrollo de una nueva herramienta útil y eficiente para la terapia celular cardiaca.

1. Utilización de los CMAs como modelo celular. Desarrollo del método explante.

La reparación del miocardio requiere la formación de CMCs y vasos coronarios (Bernal and Galvez, 2013). Hace unos años la sociedad científica se marcó como objetivo a largo plazo encontrar un método que permitiese aumentar el número de CMCs, o bien recuperar su función, después de producirse un daño cardiaco. En el ámbito de la terapia celular cardiaca se han utilizado distintos tipos de células en varios modelos experimentales, como células madre embrionarias (ESCs), células madre pluriporentes inducidas (iPS), células madre somáticas de diferentes tejidos como las células madre mesenquimales (MSCs), las MSCs derivadas de la médula (BMSCs), los precursores endoteliales o las células madre derivadas del corazón (Chen et al., 2013). Las propiedades reguladoras del sistema inmune que presentan algunas poblaciones como las MSCs, y algunos tipos de células madre comprometidos como las ckit+, las células madre cardiacas en general o las células madre de pulmón; suponen una ventaja considerable para explorar su utilización en los modelos de terapia celular (Di Trapani et al., 2013). La terapia basada en la utilización de células madre ha sido considerada

muy prometedora y ha creado muchas expectativas de desarrollo de tratamientos para el daño cardiaco debido a su potencial de reparación tisular (Huang et al., 2011). Sin embargo, los diversos protocolos de terapia celular que se han llevado a cabo utilizando diferentes tipos de células madre han alcanzado un éxito parcial y variable (Oh et al., 2003, Linke et al., 2005, Beltrami et al., 2003). Por esta razón es necesario profundizar en el entendimiento de las propiedades de los diferentes tipos de células que potencialmente se podrían explotar para, así, desarrollar herramientas útiles más eficientes en el campo de la terapia celular cardiaca.

Hasta hace unos años (Bergmann et al., 2009) se pensaba que el corazón era un órgano completamente formado por CMCs, que salen del ciclo celular tras el periodo postnatal. Se consideraba que era un órgano sin capacidad de autorrenovación tras un daño cardiaco (He et al., 2011), y que este daño provocaba una pérdida permanente del miocardio y, por tanto, pérdida de la función cardiaca (Towbin and Bowles, 2002). Sin embargo, este concepto fue cuestionado por el trabajo de Berltrami (Beltrami et al., 2003), que por primera vez describió la presencia de células en el corazón que expresaban marcadores típicos de células madre (ckit, Sca1 y MDR1). En general, estas células son conocidas como células madre cardiacas, y presentan las propiedades típicas de las células madre, como la capacidad de autorrenovación, la clonogenicidad y la multipotencialidad (Bergmann et al., 2009). Posteriormente, otros estudios demostraron que, efectivamente, el corazón contiene una pequeña cantidad de células que expresan estos marcadores generales (Galvez et al., 2009a, Galvez et al., 2008, Beltrami et al., 2003, Oh et al., 2003). Hasta ahora, diferentes grupos han descrito varios métodos de aislamiento de CSCs de diversas especies como ratón, rata, perro, cerdo y humano, basados en los antígenos de superficie celular Sca-1 (Galvez et al., 2009a, Vanelli et al., 2012), Abcg2 (Martin et al., 2004, Pfister et al., 2005) y ckit (Beltrami et al., 2003, Linke et al., 2005). Se han descrito al menos siete tipos diferentes de CSC, aislados a partir de corazones y caracterizados por diferentes laboratorios (Bearzi C et al., 2007, Barile et al., 2007, Bolli and Chaudhry, 2010, Bollini et al., 2011), incluyendo las células que expresan el marcador general de células madre ckit (Beltrami et al., 2003), que en el campo de las CSCs puede resultar controvertido,

debido a la variabilidad de los niveles de expresión; las células Sca1+ (Matsuura et al., 2004, Oh et al., 2003), las Isl1+ (Bu et al., 2009, Laugwitz et al., 2005), las células secundarias o *side population* (Abcg2+/Mdr+) (Pfister et al., 2005, Pfister et al., 2010, Hierlihy et al., 2002), las cardioesferas (ckit+/Sca1+/Flk+) (Messina et al., 2004, Smith et al., 2007), los progenitores epicárdicos (Cai et al., 2008, Castaldo et al., 2008), y los CMAs (Galvez et al., 2008, Vanelli et al., 2012).

En concreto, los CMAs son células madre mesenquimales residentes en el corazón, asociadas a los vasos, que derivan de la aorta dorsal embrionaria (Galvez et al., 2008, Minasi et al., 2002), de la aorta postnatal (Berry et al., 2007), del corazón (Galvez et al., 2008, Galvez et al., 2009a, Vanelli et al., 2012), y son capaces de diferenciarse de manera eficiente en CMCs maduros. Estos estudios indican la presencia de una población de células madre con una morfología y unas plasticidad común que reside en múltiples tejidos, de un modo similar a las MSCs y a las células progenitoras adultas multipotentes. Los CMAs son CD44+, CD34+, CD31+, Sca1+, ckit+, Isl1+, Abcg2+ y CD45-, lo que las define como una población de células madre mesenquimales no hematopoiéticas, y pueden expresar Gata4, Nkx2.5 y conexina43, así como α-actinina y troponina en condiciones de diferenciación (Galvez et al., 2008, Wang et al., 2012). Además, los CMAs pueden mantenerse en cultivo fácilmente. Todo esto supone un conjunto de características que hace de los CMAs unos buenos candidatos para ser utilizados como herramienta para el desarrollo de protocolos de terapia celular (Bernal and Galvez, 2013).

Los CMAs utilizados en este trabajo se aislaron mediante el método explante general desarrollado para la obtención de precursores mesenquimales precomprometidos procedentes de diferentes tejidos adultos (Bernal et al., 2012a) (véase anexo I), a partir de fragmentos tisulares tomados de corazón de ratón (mCMAs) y de biopsias cardiacas de humano (hCMAs). Esta técnica simple, eficiente, no enzimática y mínimamente invasiva, está basada en el método explante que propuso Minasi (Minasi et al., 2002), y modificada ligeramente para aumentar la eficiencia de la obtención de las células y para conseguir aislar precursores mesenquimales procedentes no sólo de corazón, sino de diferentes tejidos adultos, como piel, pulmón o tejido adiposo (Bernal et al., 2012a, Galvez et al., 2009b) (véase

anexo I) en cantidad suficiente y corto tiempo, para que en un futuro pudieran ser empleadas en protocolos de terapia celular. Considerando la facilidad y eficiencia de obtención de los CMAs mediante este método y teniendo en cuenta, además, las propiedades migratorias de estas células y su capacidad de diferenciación a CMCs, el método explante y los CMAs resultan ser unos buenos candidatos para explorar las posibilidades de su utilización en una aproximación traslacional para desarrollar una estrategia clínica empleando células autólogas como herramienta en terapia celular.

Una vez aislados y siguiendo el citado procedimiento, los CMAs fueron caracterizados (Galvez et al., 2009a, Galvez et al., 2008) y utilizados para llevar a cabo los ensayos experimentales.

Estrategia I: Estudio del papel de las citoquinas y moléculas de adhesión en la migración de los CMAs

2. La capacidad de migración *in vitro* de los mCMAs

En este trabajo, en primer lugar, se ha estudiado la capacidad de migración de los mCMAs mediante *Transwell*, técnica considerada como un buen modelo y un indicador fiable de los mecanismos que rigen el tráfico celular *in vivo* (Aiuti et al., 1997). Los CMAs atraviesan el endotelio y migran a través de los CMCs maduros, situación que se recrea *in vitro* creando un microambiente similar en el *Transwell*. Probablemente, algunos factores secretados por los CMCs maduros estimulan la migración de los CMAs, como ha sido descrito en el caso de otros tipos celulares (Abbott et al., 2004, Chavakis et al., 2005, Kocher et al., 2006). El análisis de *microarray* de expresión mostró que los mCMA expresan receptores para algunas citoquinas y que, por tanto, podrían responder a factores liberados por células inflamatorias o por CMCs cuando se produce un infarto de miocardio. Se ha descrito la presencia de Sdf-1 en la zona de infarto (Grunewald et al., 2006), y, en efecto, como se muestra en este trabajo, Sdf-1 es la citoquina que induce mayor aumento en la capacidad de migración de los mCMAs, más que TNF-α, que ha sido descrito en la literatura como un factor quimioatrayente de los mesoangioblastos de músculo esquelético (Galvez et al., 2006),

de las MSCs de tejido adioposo (Galvez et al., 2009b), o de otros tipos celulares (Peled et al., 2000).

3. La capacidad de migración *in vivo* de los mCMAs al corazón

La migración *in vivo* de los CMAs al corazón, o *homing*, es un proceso que se puede producir a través de distintos mecanismos (Butcher and Picker, 1996, Fu and Liesveld, 2000). Cuando los mCMAs sin ninguna modificación (control), fueron inyectados en el ventrículo izquierdo de ratones sanos (WT) o de ratones sometidos a un infarto de miocardio por ligación de la arteria coronaria (CAL), sólo un porcentaje muy pequeño de las células inyectadas fue capaz de alcanzar el miocardio dañado, mientras que la mayoría de ellas quedaron atrapadas en los órganos filtradores. El porcentaje de células que pudieron ser recuperadas de la zona infartada del corazón fue significativamente más alto que el procedente del miocardio no afectado o el procedente de los corazones de ratones sanos, debido, posiblemente, a un patrón diferente en la expresión de citoquinas de los CMCs expuestos a la lesión cardiaca (Chang et al., 2007, Chavakis et al., 2007, Jujo et al., 2008). De hecho, cuando los mCMAs se inyectan en el ventrículo izquierdo, se acumulan en el primer filtro capilar que encuentran y migran fuera del torrente sanguíneo, pero sólo en situación de inflamación, como ocurre en el caso de un corazón infartado. En efecto, los mCMAs expresan muchos receptores para citoquinas inflamatorias y migran *in vitro* e *in vivo* en respuesta a diferentes estímulos.

4. Aumento de la migración de los mCMAs

Previamente, se ha descrito que algunos factores como Hmgb-1 o Tnf-α estimulan la proliferación y la migración de los mesoangioblastos de músculo esquelético en situación de distrofia muscular (Palumbo et al., 2004, Galvez et al., 2006). Como en el caso de los mesoangioblastos de músculo esquelético, en este trabajo se plantea la posibilidad de que diferentes células utilicen diferentes receptores de citoquinas para su migración al tejido de interés, o *homing* al tejido dañado, en este caso, al corazón infartado. En el caso de los mCMAs, como se ha descrito en este trabajo, Sdf-1 es la molécula que ejerce mayor efecto quimioatrayente. Este trabajo muestra que el

pretratamiento de las células con esta citoquina es suficiente para aumentar la expresión de ciertas proteínas de superficie que son necesarias para la migración y la extravasación celular. Además, se han estudiado los mecanismos involucrados en esta mejora de la capacidad de migración, realizando el ensayo de migración a través de una matriz con mCMAs pretratados con Sdf-1. Este experimento reveló que Sdf-1 actúa a través de CD44, molécula implicada en la ayuda de la laminación y extravasación de células inflamatorias (Mylona et al., 2006, Zoller et al., 2007). Sin embargo, los CMAs normalmente no expresan muchas de las moléculas que utilizan los leucocitos para llevar a cabo eficientemente el proceso de extravasación (Butcher, 1991, Springer, 1994), como L-selectina y β2-integrina, lo que podría explicar por qué la mayoría de las células inyectadas queda atrapadas en los órganos filtradores.

Por tanto, los mCMAs fueron modificados para conseguir la expresión de L-selectina y β2-integrina para estudiar su papel en la migración de estas células. La expresión de L-selectina resultó en un aumento de la migración tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que aumentó significativamente el número de células que alcanzaron el corazón infartado, y disminuyó la cantidad de células retenidas en los órganos filtradores. La combinación de ambas estrategias (el pretratamiento de los CMAs con Sdf-1 y su modificación para la expresión de L-selectina) supuso un aumento de la capacidad migratoria de los mCMAs tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, en este trabajo se demuestra que los mCMAs modificados no son sólo capaces de llegar al corazón sino que también son capaces de colonizar amplias áreas del miocardio dónde pueden diferenciarse en CMCs maduros y reparar el tejido dañado.

5. Aumento de la migración de los hCMAs

Con el fin de conseguir una herramienta traslacional y útil en los protocolos de terapia celular aplicables en procedimientos clínicos, se ha analizado si el mismo protocolo descrito y testado con mCMAs se podría utilizar con hCMAs.

Para ello, los hCMAs fueron pretratados con Sdf-1 y modificados para la expresión de L-selectina, y bajo estas condiciones fueron capaces de alcanzar el tejido cardiaco dañado en ratones SCID de un modo significativamente más eficiente que las células control. Aunque estos datos sugieren que aún es necesario trabajar más en

esta estrategia para optimizar la migración *in vivo* de los hCMAs al corazón, o *homing*, indican claramente que los mecanismos básicos de la migración de los CMAs son similares en el modelo de ratón y en el de humano, y, por tanto, son igualmente susceptibles a la mejora de la estrategia, para conseguir herramientas útiles, eficientes y menos invasivas que permitan potenciar la capacidad de migración *in vivo* de los CMAs, y así conseguir que lleguen a la zona dañada del corazón después de producirse un infarto de miocardio.

En conclusión, los resultados de esta primera estrategia sugieren que el pretratamiento de los CMAs con Sdf-1 y la presencia de L-selectina son necesarios para que el suministro intravascular de las células madre sea eficiente en una situación de daño cardiaco. El pretratamiendo de las células madre con citoquinas es un procedimiento simple, y la inclusión de un ADNc relativamente pequeño en un vector viral es un procedimiento viable en el contexto de la terapia celular autóloga con ingeniería de células madre. En conjunto, ambas estrategias representan un nuevo método simple para la mejora de la migración *in vivo* de las células madre al corazón dañado y un aumento del área de reparación tisular, y constituyen un protocolo que podría ser adaptado en el futuro en el ámbito de la terapia celular cardiaca.

Si bien la primera estrategia proporcionó buenos resultados, considerando que requiere el pretratamiento de las células madre aisladas así como el uso de construcciones y transfecciones; todo el proceso conllevaría bastante manipulación celular que podría comprometer la esterilidad de las células a tratar y, al mismo tiempo, requeriría un tiempo más largo hasta poder realizar el protocolo de terapia celular, siendo en muchos casos inviable esta espera. Por todo ello, se tomó la decisión de diseñar otro método no invasivo y lo más eficaz posible que proporcionara resultados similares.

Estrategia II: Estudio de los efectos de la estimulación con ultrasonidos pulsados de baja intensidad (LIPUS) en CMA

Una vez comprobado el éxito de los resultados de la primera estrategia, y con el objetivo de llevar a cabo una investigación más traslacional, que permitiera utilizar estos resultados en clínica, se planteó el objetivo de aumentar la capacidad migratoria de estas células consiguiendo disminuir tanto como fuera posible la manipulación de las mismas, y desarrollar así un método menos invasivo, útil y eficiente en terapia celular. Con el fin de evitar el pretratamiento de las células con Sdf-1, y la transfección con vectores para la expresión de L-selectina, se buscaron aproximaciones biológicas, bioquímicas, técnicas y tecnológicas que permitieran alcanzar el objetivo. De esta manera, se propone esta segunda estrategia, basada en la estimulación de las células con LIPUS.

6. Los LIPUS inducen modificaciones celulares que mejoran las propiedades de los CMAs

Los resultados de la segunda estrategia, basada en la estimulación de los CMAs con LIPUS, demuestran que éstos inducen una serie de efectos beneficiosos sobre los CMAs que favorecen y potencian la migración y la diferenciación celular. Las propiedades que se ven modificadas por el efecto de los LIPUS, en concreto la migración y la diferenciación celular, son factores claves para conseguir que esta estrategia suponga la base de una nueva herramienta útil para el tratamiento del daño cardiaco en el ámbito de la terapia celular.

Como se ha descrito en este trabajo, aunque se ha observado que la estimulación con LIPUS reduce la apoptosis de los CMAs, no se ha observado ningún efecto en la proliferación celular, a diferencia de lo que aparece descrito en la literatura referente a fibroblastos de piel (Zhou et al., 2004, Cui et al., 2007) y en osteoblastos (Suzuki et al., 2009a). No obstante, el efecto de los LIPUS en la proliferación celular es controvertido (Padilla et al., 2014), y, por tanto, no está confirmado, al menos de un modo general para diversos tipos celulares, que los LIPUS tengan un efecto directo en la proliferación celular (Hasegawa et al., 2009).

Por otra parte, cabe destacar que varios autores han descrito que los LIPUS inducen un estrés mecánico en las células que puede desencadenar el proceso de mecanotransducción (Whitney et al., 2012). Se sabe que el ambiente mecánico juega un papel importante en la regulación de la función y el comportamiento celular, incluyendo la proliferación, la apoptosis, la migración y la diferenciación celular (Yim and Sheetz, 2012, Du et al., 2011, Discher et al., 2005, Zajac and Discher, 2008). Además, teniendo en cuenta que la estimulación mecánica puede traducirse en un efecto en la periferia celular que, además, puede llegar hasta el núcleo y regular la expresión génica (Jaalouk and Lammerding, 2009), en este trabajo se han estudiado algunos parámetros de los CMAs relacionados con los efectos de la posible mecanotransducción de la señal de los LIPUS. Los resultados descritos en este trabajo muestran que los CMAs estimulados con LIPUS no sólo presentan un cambio de morfología, más poligonal, sino que, además, modifican el patrón de crecimiento del cultivo celular formando agrupaciones celulares. Además, los CMAs estimulados con LIPUS muestran una reorganización del citoesqueleto de F-actina, consistente con las observaciones descritas en fibroblastos de piel (Zhou et al., 2004, Holle and Engler, 2011). Por otra parte, las células tratadas con LIPUS son más maleables y son menos adherentes a los componentes de la MEC. Estos cambios se correlacionan con el aumento de la capacidad de migración e invasión de los CMAs tratados con LIPUS, procesos que requieren una alta tasa de la dinámica de la membrana celular para la adhesión y desunión a la MEC (Horwitz and Parsons, 1999, Cramer, 2013, Larsen et al., 2003), indicando un aumento de la motilidad celular debido al efecto de los LIPUS. Por otro lado, el tratamiento de los CMAs con LIPUS promueve la aparición de células binucleadas en el cultivo, con una morfología característica que recuerda a los CMCs. A ello se suma la activación de la expresión de genes marcadores cardiacos, efecto similar al producido por el tratamiento de estas células con 5'azacitidina, de uso habitual en los protocolos de diferenciación a linaje cardiaco (Bernal and Galvez, 2013). Estas modificaciones son debido al tratamiento de las células con LIPUS, que parecen inducir el proceso de diferenciación de los CMAs a CMCs. Estos resultados apuntan a que los LIPUS estarían desencadenando la diferenciación de los CMAs a CMCs, y podría considerarse como una analogía del efecto atribuido a los LIPUS en la

inducción de la diferenciación osteogénica de las MSCs (Suzuki et al., 2009b, Uddin and Qin, 2013, Jiang et al., 2012). Además, como se ha descrito anteriormente, los CMAs se integran en el corazón después de sufrir un daño (Galvez et al., 2008) y los resultados de este trabajo demuestran, además, que los LIPUS aumentan la eficiencia de este proceso y parece que, además, podrían estar potenciando la diferenciación de los CMAs a CMCs bien estructurados.

Considerando que la estimulación con LIPUS es un tratamiento no invasivo, resulta ser el método más eficiente y potencialmente más exitoso de entre los ya propuestos (Galvez et al., 2006, Bernal et al., 2012b) para conseguir aumentar la capacidad de migración de los CMAs a la zona de daño cardiaco. En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la conveniencia de utilizar esta estrategia basada en el tratamiento de los CMAs con LIPUS para reforzar las propiedades de estas células para su utilización en protocolos de terapia celular para la reparación del tejido dañado del corazón.

7. Modelo del mecanismo de mecanotransducción de los LIPUS en los CMAs

Aunque el mecanismo de acción de los LIPUS está todavía por describir en profundidad, los resultados de este trabajo apuntan a que β1-integrina podría estar actuando como mecanorreceptor. De hecho, las fluctuaciones regulares del fluido generadas por los LIPUS, creadas bien por la corriente acústica primaria o bien por microcorrientes secundarias, pueden modular la MEC y, de hecho, constituyen fuerzas mecánicas, en concreto tensión de cizallamiento, y pueden activar mecanorreceptores presentes en la membrana celular (Padilla et al., 2014). Varios tipos de proteínas presentes en la membrana celular, como los canales iónicos, las proteínas G acopladas a receptores, las proteínas que forman parte del citoesqueleto como la talina y la filnanina (del Rio et al., 2009, Gillespie and Walker, 2001, Rognoni et al., 2012) y las integrinas han sido propuestas como candidatos para actuar como mecanorreceptores (Hoffman et al., 2011, Huang and Ogawa, 2010, Friedland et al., 2009). Sin embargo, hay suficientes indicios que apuntan a las integrinas como los mejores candidatos para actuar como sensores a estímulos derivados de la MEC y para convertirlos en señales

bioquímicas (Shyy and Chien, 1997, Ingber, 2003). En efecto, las integrinas parecen actuar en respuesta además de al estiramiento mecánico (Kippenberger et al., 2000) y a los campos magnéticos cíclicos, también a las fuerzas mecánicas de cizalla (Weyts et al., 2002), que inducen una cambio de conformación en las integrinas (Vogel, 2006, Hoffman et al., 2011). Por otra parte, algunos autores han propuesto que los LIPUS podrían generar deformaciones mecánicas capaces de activar receptores de las membranas celulares, como las integrinas, y activar, así, diferentes rutas de señalización celular (Hu et al., 2007, Tang et al., 2006, Yang et al., 2005). En concreto, se cree que las integrinas juegan un papel clave en la transducción de la señal de ultrasonidos (Pounder and Harrison, 2008) y estudios recientes muestran un aumento de la cantidad de β1-integrina en MSCs tras haber recibido estimulación mecánica (Watabe et al., 2011, Tang et al., 2006, Yang et al., 2005). Además, está demostrado que las fuerzas de tensión y resistencia son suficientes para la activación de esta proteína (Friedland et al., 2009). De hecho, algunos autores sugieren que la señal de mecanotransducción llega desde las integrinas a la actina (Ciobanasu et al., 2013, Butler et al., 2006, Romet-Lemonne and Jegou, 2013), lo cual concuerda con el papel que ambos elementos juegan en la dinámica de la adhesión celular y en la formación de estructuras motrices, que se traducen en el aumento de la migración observada en los CMAs estimulados con LIPUS.

En base a los datos de la literatura y a los resultados obtenidos en este trabajo, se propone un modelo del mecanismo por el cual los LIPUS inducen modificaciones en los CMAs (figura 47). Según este modelo los LIPUS llegan a la membrana celular y una vez en ella producen un cambio conformacional en β1-integrina a la forma activa (Vogel, 2006, Hoffman et al., 2011). Una vez activa β1-integrina, se une a la F-actina a través de la talina, la vinculina y la actinina, estableciendo las adhesiones focales (Sastry and Burridge, 2000) a la vez que promueve la activación de los receptores de las BMPs, con los que colocaliza, como está descrito en la literatura (Lai and Cheng, 2005) y en los resultados de este trabajo. Los receptores de las BMPs, una vez activos, activan las p-Smad 1, 5 y 8 (Monzen et al., 2002, Bonor et al., 2012, Euler-Taimor and Heger, 2006). Un aumento en la ruta de señalización de las BMPs-pSmad supone un incremento en la activación de algunos factores de transcripción cardiacos como

Nkx2.5, Mef2c y Myl2 (van Wijk et al., 2007). Este fenómeno establece una retroalimentación positiva a partir de las p-Smad 1, 5 y 8 porque están implicadas en la transcripción del ligando Bmp2, debido a que Bmp2 también regula la actividad del promotor Cbfa/Runx2 (Sant'Anna et al., 2005, Suzuki et al., 2009a, Lee et al., 2003), que una vez trascrito, sale de la célula a través del péptido señal, y puede actuar como ligando y unirse a su receptor (Bonor et al., 2012). De hecho, algunos autores han descrito un efecto sinérgico entre las fuerzas mecánicas generadas y el tratamiento de las células con Bmp2 tanto *in vitro* como *in vivo* (Kopf et al., 2012, Schwarz et al., 2013), así como, en concreto, por los LIPUS y el tratamiento con Bmp2 (Lee et al., 2013) de acuerdo con los resultados de este trabajo. Por otra parte, la activación de β1-integrina por los LIPUS conlleva el establecimiento de las adhesiones focales, en las cuales β1-integrina queda unida finalmente a la F-actina (Ziegler et al., 2008), así como la activación de rutas de señalización relacionadas con las integrinas, y también aquellas en las que está involucrada Rho (Riveline et al., 2001, Clark et al., 1998, DeMali et al., 2003). La estimulación mecánica puede inducir la formación de fibras de estrés y de adhesión focales (Pavalko et al., 1998), formadas por fibras de actina que forman el citoesqueleto, que experimenta una reorganización tras la estimulación mecánica (Hu et al., 2007). En este trabajo se ha comprobado que la estimulación de los CMAs con LIPUS induce un aumento de la cantidad de RhoA, proteína involucrada en la reorganización de los componentes del citoesqueleto (Amano et al., 2010, Hotchin and Hall, 1995, Ridley and Hall, 1992), y que activa a ROCK. ROCK, por un lado fosforila a Myl2 activándola, y por otro, fosforila a la fosfatasa de la Myl2 inactivándola, lo que, en conjunto, supone más cantidad de Myl2 y menos de su fosfatasa, que la inactiva, y en consecuencia supondrá más cantidad Myl2 (Wang et al., 2009). Altos niveles de Myl2 inducen un aumento de fibras de estrés, de adhesiones focales y de contractibilidad celular (Lee et al., 2013), como muestran los CMAs estimulados con LIPUS. Otros autores han apuntado también al efecto que tiene la mecanotransducción en la activación y regulación de Rho (Schoenwaelder and Burridge, 1999, Lessey et al., 2012, Marjoram et al., 2014), lo que apoya los resultados de este trabajo; y, además, han sugerido que moléculas motoras de la familia de la

miosina son capaces de transmitir fuerzas mecánicas a lo largo de los filamentos de actina, como respuesta a un estímulo mecánico.

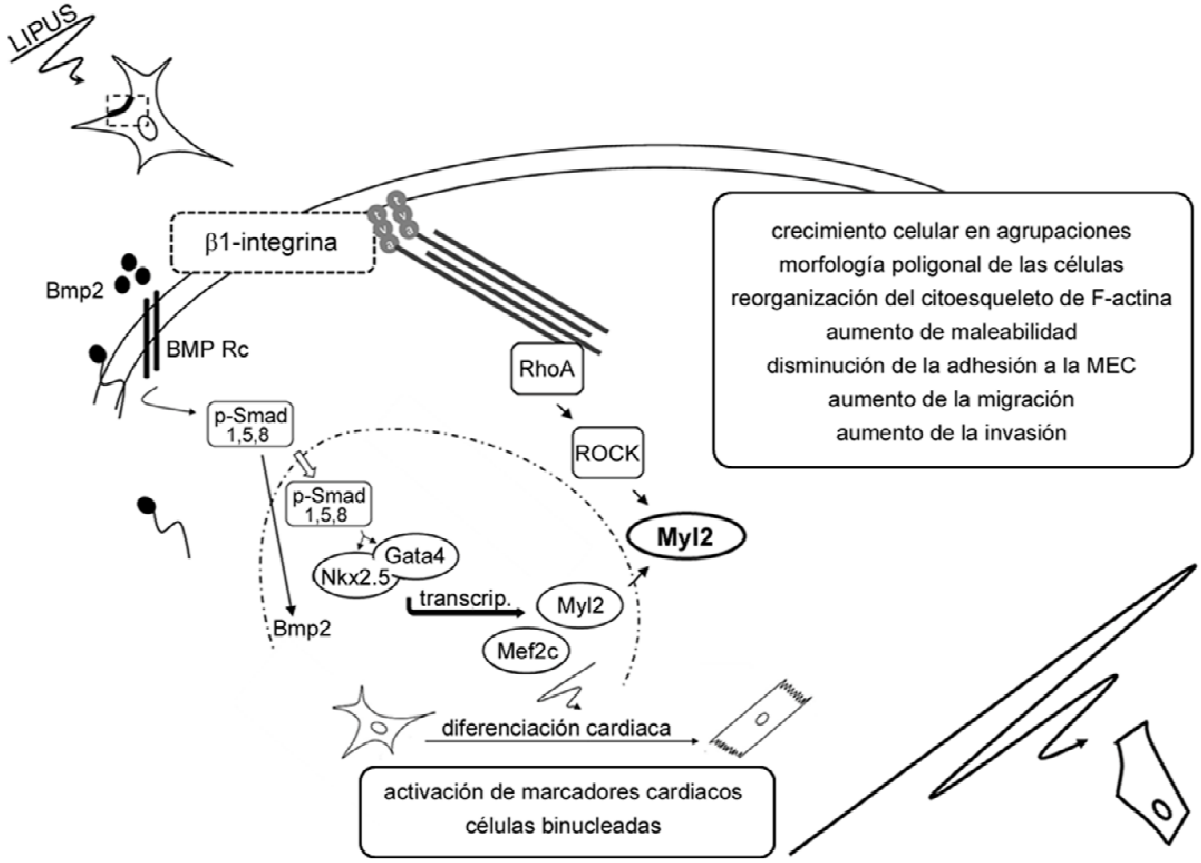


Figura 47. Modelo del mecanismo de mecanotransducción del efecto de la estimulación de CMAs con LIPUS.

En resumen, β1-integrina actuaría como mecanorreceptor de los LIPUS, que desencadenan dos rutas de señalización, por un lado la diferenciación de los CMAs a CMCs a través de la ruta de los receptores de las BMPs y, por otro, la reorganización del citoesqueleto de la F-actina a través de RhoA. Ambas rutas convergen en la activación de la Myl2. La diferenciación de los CMAs a CMCs a través de la ruta de los receptores de las BMPs resultaría en la activación de expresión de marcadores cardiacos y la aparición de células binucleadas que recuerdan a CMCs. Y la reorganización del citoesqueleto de la F-actina a través de RhoA originaría los cambios estructurales relacionados con el aumento de la maleabilidad celular y la disminución

de la adhesión de las células a la MEC, ambas modificaciones estarían favoreciendo la motilidad celular.

En conclusión, la estimulación de los CMAs con LIPUS induce una serie de efectos beneficiosos en los CMAs potenciando propiedades ventajosas para la utilización de estas células después de que se produzca un daño cardiaco. Los resultados descritos en este trabajo muestran que los LIPUS podrían ser una nueva herramienta útil a explorar en el desarrollo de protocolos de terapia celular cardiaca.

O caos é uma ordem por decifrar.
El caos es un orden aún por descifrar.

José Saramago, de El hombre duplicado.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis permiten obtener las siguientes conclusiones:

- El pretratamiento de los CMAs con Sdf-1 aumenta su capacidad de migración, y, por otra parte, la expresión de L-selectina en los CMAs, también, incrementa su capacidad de migración.

- La combinación de la expresión de L-selectina y el pretratamiendo con Sdf-1 de los CMAs aumenta su capacidad de migración y la calidad de las células que llegan al tejido dañado, y mejora la estructura y la función del corazón.

- Los CMAs estimulados con LIPUS presentan un cambio de morfología, más poligonal; un cambio en el crecimiento del cultivo, mostrando agrupaciones celulares; un aumento de la maleabilidad de la membrana y una disminución de la adhesión celular a la matriz extracelular. Los LIPUS aceleran el proceso de cicatrización *in vitro* de los CMAs, y aumentan eficientemente la capacidad de migración e invasión de los CMAs.

- Los CMAs estimulados con LIPUS no sufren ningún cambio en la proliferación celular, aunque sí muestran una disminución de la apoptosis. Los LIPUS activan la expresión de algunos marcadores cardiacos, como Mef2c y troponina; inducen la presencia de células binucleadas en los cultivos celulares de CMAs que se asemejan a CMCs, y emulan el efecto de la 5'azacitidina, promoviendo la diferenciación de los CMAs a linaje cardiaco. Además, los LIPUS favorecen el mantenimiento de los CMAs en el corazón y su integración tras un daño cardiaco.

- Los LIPUS ejercen un efecto en los CMAs mediante un fenómeno de mecanotransducción, en el cual la β1-integrina actuaría como mecanorreceptor de los LIPUS, que desencadenan dos rutas de señalización, por un lado, la diferenciación de los CMAs a CMCs a través de la ruta de los receptores de las BMPs y, por otro, la reorganización del citoesqueleto de la F-actina a través de RhoA. Ambas rutas convergen en la activación de la Myl2. La diferenciación de los CMAs a CMCs a través de la ruta de los receptores de las BMPs da lugar a la activación de la expresión de marcadores cardiacos y la aparición de células

binucleadas. Por otra parte, la reorganización del citoesqueleto de la F-actina a través de RhoA origina cambios estructurales relacionados con el aumento de la maleabilidad celular y la disminución de la adhesión de las células a la matriz extracelular, favoreciendo, en último término, la motilidad celular.

- La combinación de la expresión de L-selectina y el pretratamiendo con Sdf-1 de los CMAs constituye un nuevo protocolo que podría ser adaptado en el ámbito de la terapia celular cardiaca.

- La estimulación de los CMAs con LIPUS induce una serie de beneficios en los CMAs potenciando propiedades ventajosas para la utilización de estas células después de que se produzca un daño cardiaco. La estimulación con LIPUS supone una nueva herramienta útil a explorar en el desarrollo de nuevos protocolos de terapia celular cardiaca para el tratamiento de patologías con daño cardiaco.

Referencias

REFERENCIAS

ABBOTT, J. D., HUANG, Y., LIU, D., HICKEY, R., KRAUSE, D. S. & GIORDANO, F. J. 2004. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation,* 110**,** 3300-5.

AFILALO, J., MAJDAN, A. A. & EISENBERG, M. J. 2007. Intensive statin therapy in acute coronary syndromes and stable coronary heart disease: a comparative meta-analysis of randomised controlled trials. *Heart,* 93**,** 914-21.

AICHER, A., HEESCHEN, C., SASAKI, K., URBICH, C., ZEIHER, A. M. & DIMMELER, S. 2006. Low-energy shock wave for enhancing recruitment of endothelial progenitor cells: a new modality to increase efficacy of cell therapy in chronic hind limb ischemia. *Circulation,* 114**,** 2823-30.

AIUTI, A., WEBB, I. J., BLEUL, C., SPRINGER, T. & GUTIERREZ-RAMOS, J. C. 1997. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med,* 185**,** 111-20.

ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. 2013. *Essential Cell Biology, Fourth Edition*, Taylor & Francis Group.

AMANO, M., NAKAYAMA, M. & KAIBUCHI, K. 2010. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken),* 67**,** 545-54.

ANVERSA P, LERI A & KAJSTURA J 2006. Cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol,* 47**,** 1769-1776.

ASSMUS B, WALTER DH, SEEGER FH, LEISTNER DM, STEINER J, ZIEGLER I, LUTZ A, KHALED W, KLOTSCHE J, TONN T, DIMMELER S & ZEIHER AM 2013. Effect of shock wave-facilitated intracoronary cell therapy on LVEF in patients with chronic heart failure: the CELLWAVE randomized clinical trial. *JAMA,* 309**,** 1622-1631.

BARILE, L., CHIMENTI, I., GAETANI, R., FORTE, E., MIRALDI, F., FRATI, G., MESSINA, E. & GIACOMELLO, A. 2007. Cardiac stem cells: isolation, expansion and experimental use for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med,* 4 Suppl 1**,** S9-S14.

BARTUNEK J, BEHFAR A, DOLATABADI D, VANDERHEYDEN M, OSTOJIC M, DENS J, NAKADI BE, BANOVIC M, BELESLIN B, VROLIX M, LEGRAND V, VRINTS C, VANOVERSCHELDE JL, CRESPO-DIAZ R, HOMSY C, TENDERA M, WALDMAN S, WIJNS W & TERZIC A 2013. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure The C-CURE multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol,* S0735-1097**,** 01397-1.

BAUERSACHS J 2010. Regulation of myocardial fibrosis by MicroRNAs. *J Cardiovasc Pharmacol,* 56**,** 454-459.

BEARZI C, LERI A, LO MONACO F, ROTA M, GONZALEZ A, HOSODA T, PEPE M, QANUD K, OJAIMI C, BARDELLI S, D'AMARIO D, D'ALESSANDRO DA, MICHLER RE, DIMMELER S, ZEIHER AM, URBANEK K, HINTZE TH, KAJSTURA J & ANVERSA P 2009. Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 106**,** 15885-15890.

BEARZI C, ROTA M, HOSODA T, TILLMANNS J, NASCIMBENE A, DE ANGELIS A, YASUZAWA-AMANO S, TROFIMOVA I, SIGGINS RW, LECAPITAINE N, CASCAPERA S, BELTRAMI AP, D'ALESSANDRO DA, ZIAS E, QUAINI F, URBANEK K, MICHLER RE, BOLLI R, KAJSTURA J, LERI A & ANVERSA P 2007. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Aug 28;104(35):14068-73. Epub 200,* 104**,** 14068-14073.

BEKEREDJIAN, R., CHEN, S., FRENKEL, P. A., GRAYBURN, P. A. & SHOHET, R. V. 2003. Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation,* 108**,** 1022-6.

BELTRAMI, A. P., BARLUCCHI, L., TORELLA, D., BAKER, M., LIMANA, F., CHIMENTI, S., KASAHARA, H., ROTA, M., MUSSO, E., URBANEK, K., LERI, A., KAJSTURA, J., NADAL-

GINARD, B. & ANVERSA, P. 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell,* 114**,** 763-76.

BERGMANN, O., BHARDWAJ, R. D., BERNARD, S., ZDUNEK, S., BARNABE-HEIDER, F., WALSH, S., ZUPICICH, J., ALKASS, K., BUCHHOLZ, B. A., DRUID, H., JOVINGE, S. & FRISEN, J. 2009. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science,* 324**,** 98-102.

BERNAL, A., FERNANDEZ, M., PEREZ, L. M., SAN MARTIN, N. & GALVEZ, B. G. 2012a. Method for obtaining committed adult mesenchymal precursors from skin and lung tissue. *PLoS One,* 7**,** e53215.

BERNAL, A. & GALVEZ, B. G. 2013. The potential of stem cells in the treatment of cardiovascular diseases. *Stem Cell Rev,* 9**,** 814-32.

BERNAL, A., SAN MARTIN, N., FERNANDEZ, M., COVARELLO, D., MOLLA, F., SOLDO, A., LATINI, R., COSSU, G. & GALVEZ, B. G. 2012b. L-selectin and SDF-1 enhance the migration of mouse and human cardiac mesoangioblasts. *Cell Death Differ,* 19**,** 345-55.

BERRY, S. E., LIU, J., CHANEY, E. J. & KAUFMAN, S. J. 2007. Multipotential mesoangioblast stem cell therapy in the mdx/utrn-/- mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Regen Med,* 2**,** 275-88.

BEVILACQUA, M. P. & NELSON, R. M. 1993. Selectins. *J Clin Invest,* 91**,** 379-87.

BHATT, D. L., FOX, K. A., HACKE, W., BERGER, P. B., BLACK, H. R., BODEN, W. E., CACOUB, P., COHEN, E. A., CREAGER, M. A., EASTON, J. D., FLATHER, M. D., HAFFNER, S. M., HAMM, C. W., HANKEY, G. J., JOHNSTON, S. C., MAK, K. H., MAS, J. L., MONTALESCOT, G., PEARSON, T. A., STEG, P. G., STEINHUBL, S. R., WEBER, M. A., BRENNAN, D. M., FABRY-RIBAUDO, L., BOOTH, J. & TOPOL, E. J. 2006. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med,* 354**,** 1706-17.

BIANCONE L, BRUNO S, DEREGIBUS MC, TETTA C & CAMUSSI G 2012. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrol Dial Transplant,* 27**,** 3037-3042.

BOERSMA, E., MAAS, A. C., DECKERS, J. W. & SIMOONS, M. L. 1996. Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour. *Lancet,* 348**,** 771-5.

BOLLI, P. & CHAUDHRY, H. W. 2010. Molecular physiology of cardiac regeneration. *Ann N Y Acad Sci,* 1211**,** 113-26.

BOLLI, R., CHUGH, A. R., D'AMARIO, D., LOUGHRAN, J. H., STODDARD, M. F., IKRAM, S., BEACHE, G. M., WAGNER, S. G., LERI, A., HOSODA, T., SANADA, F., ELMORE, J. B., GOICHBERG, P., CAPPETTA, D., SOLANKHI, N. K., FAHSAH, I., ROKOSH, D. G., SLAUGHTER, M. S., KAJSTURA, J. & ANVERSA, P. 2011. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet,* 378**,** 1847-57.

BOLLINI, S., SMART, N. & RILEY, P. R. 2011. Resident cardiac progenitor cells: at the heart of regeneration. *J Mol Cell Cardiol,* 50**,** 296-303.

BONOR, J., ADAMS, E. L., BRAGDON, B., MOSEYCHUK, O., CZYMMEK, K. J. & NOHE, A. 2012. Initiation of BMP2 signaling in domains on the plasma membrane. *J Cell Physiol,* 227**,** 2880-8.

BRETT JO, RENAULT VM, RAFALSKI VA, WEBB AE & BRUNET A 2011. The microRNA cluster miR-106b~25 regulates adult neural stem/progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *Aging (Albany NY),* 3**,** 108-124.

BRITTEN MB, ABOLMAALI ND, ASSMUS B, LEHMANN R, HONOLD J, SCHMITT J, VOGL TJ, MARTIN H, SCHÄCHINGER V, DIMMELER S & ZEIHER AM 2003. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation,* 108**,** 2212-2218.

BRUYNINCKX, R., AERTGEERTS, B., BRUYNINCKX, P. & BUNTINX, F. 2008. Signs and symptoms in diagnosing acute myocardial infarction and acute coronary syndrome: a diagnostic meta-analysis. *Br J Gen Pract,* 58**,** 105-11.

BU, L., JIANG, X., MARTIN-PUIG, S., CARON, L., ZHU, S., SHAO, Y., ROBERTS, D. J., HUANG, P. L., DOMIAN, I. J. & CHIEN, K. R. 2009. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature,* 460**,** 113-7.

BURRIDGE, P. W., KELLER, G., GOLD, J. D. & WU, J. C. 2012. Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell,* 10**,** 16-28.

BUTCHER, E. C. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell,* 67**,** 1033-6.

BUTCHER, E. C. & PICKER, L. J. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science,* 272**,** 60-6.

BUTLER, B., GAO, C., MERSICH, A. T. & BLYSTONE, S. D. 2006. Purified integrin adhesion complexes exhibit actin-polymerization activity. *Curr Biol,* 16**,** 242-51.

CAI, C. L., MARTIN, J. C., SUN, Y., CUI, L., WANG, L., OUYANG, K., YANG, L., BU, L., LIANG, X., ZHANG, X., STALLCUP, W. B., DENTON, C. P., MCCULLOCH, A., CHEN, J. & EVANS, S. M. 2008. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature,* 454**,** 104-8.

CAMPBELL, J. J., HEDRICK, J., ZLOTNIK, A., SIANI, M. A., THOMPSON, D. A. & BUTCHER, E. C. 1998. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science,* 279**,** 381-4.

CAPLICE, N. M. & DEB, A. 2004. Myocardial-cell replacement: the science, the clinic and the future. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med,* 1**,** 90-5.

CASTALDO, C., DI MEGLIO, F., NURZYNSKA, D., ROMANO, G., MAIELLO, C., BANCONE, C., MULLER, P., BOHM, M., COTRUFO, M. & MONTAGNANI, S. 2008. CD117-positive cells in adult human heart are localized in the subepicardium, and their activation is associated with laminin-1 and alpha6 integrin expression. *Stem Cells,* 26**,** 1723-31.

CERVERA, A. M., APOSTOLOVA, N., CRESPO, F. L., MATA, M. & MCCREATH, K. J. 2008. Cells silenced for SDHB expression display characteristic features of the tumor phenotype. *Cancer Res,* 68**,** 4058-67.

CIOBANASU, C., FAIVRE, B. & LE CLAINCHE, C. 2013. Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: the multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions. *Eur J Cell Biol,* 92**,** 339-48.

CLARK, E. A., KING, W. G., BRUGGE, J. S., SYMONS, M. & HYNES, R. O. 1998. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol,* 142**,** 573-86.

CRAMER, L. P. 2013. Mechanism of cell rear retraction in migrating cells. *Curr Opin Cell Biol,* 25**,** 591-9.

CUI, J. H., PARK, S. R., PARK, K., CHOI, B. H. & MIN, B. H. 2007. Preconditioning of mesenchymal stem cells with low-intensity ultrasound for cartilage formation *in vivo*. *Tissue Eng,* 13**,** 351-60.

CHANG, K. H., CHAN-LING, T., MCFARLAND, E. L., AFZAL, A., PAN, H., BAXTER, L. C., SHAW, L. C., CABALLERO, S., SENGUPTA, N., LI CALZI, S., SULLIVAN, S. M. & GRANT, M. B. 2007. IGF binding protein-3 regulates hematopoietic stem cell and endothelial precursor cell function during vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 104**,** 10595-600.

CHAUSSY, C., SCHMIEDT, E., JOCHAM, D., BRENDEL, W., FORSSMANN, B. & WALTHER, V. 1982. First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *J Urol,* 127**,** 417-20.

CHAVAKIS, E., AICHER, A., HEESCHEN, C., SASAKI, K., KAISER, R., EL MAKHFI, N., URBICH, C., PETERS, T., SCHARFFETTER-KOCHANEK, K., ZEIHER, A. M., CHAVAKIS, T. & DIMMELER, S. 2005. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med,* 201**,** 63-72.

CHAVAKIS, E., HAIN, A., VINCI, M., CARMONA, G., BIANCHI, M. E., VAJKOCZY, P., ZEIHER, A. M., CHAVAKIS, T. & DIMMELER, S. 2007. High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells. *Circ Res,* 100**,** 204-12.

CHEN, L., WANG, Y., PAN, Y., ZHANG, L., SHEN, C., QIN, G., ASHRAF, M., WEINTRAUB, N., MA, G. & TANG, Y. 2013. Cardiac progenitor-derived exosomes protect ischemic myocardium from acute ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun,* 431**,** 566-71.

CHIMENTI I, SMITH RR, LI TS, GERSTENBLITH G, MESSINA E, GIACOMELLO A & MARBÁN E 2010. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res. 2010 Mar 19;106(5):971-80. doi: 10.1161/CIRCRESA,* 106**,** 971-980.

CHRISTIANSEN, J. P., FRENCH, B. A., KLIBANOV, A. L., KAUL, S. & LINDNER, J. R. 2003. Targeted tissue transfection with ultrasound destruction of plasmid-bearing cationic microbubbles. *Ultrasound Med Biol,* 29**,** 1759-67.

CHRISTMAN KL & LEE RJ 2006. Biomaterials for the treatment of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol,* 48**,** 907-913.

DAWN, B., STEIN, A. B., URBANEK, K., ROTA, M., WHANG, B., RASTALDO, R., TORELLA, D., TANG, X. L., REZAZADEH, A., KAJSTURA, J., LERI, A., HUNT, G., VARMA, J., PRABHU, S. D., ANVERSA, P. & BOLLI, R. 2005. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 102**,** 3766-71.

DEL RIO, A., PEREZ-JIMENEZ, R., LIU, R., ROCA-CUSACHS, P., FERNANDEZ, J. M. & SHEETZ, M. P. 2009. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science,* 323**,** 638-41.

DEMALI, K. A., WENNERBERG, K. & BURRIDGE, K. 2003. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol,* 15**,** 572-82.

DI FELICE V, SERRADIFALCO C, RIZZUTO L, DE LUCA A, RAPPA F, BARONE R, DI MARCO P, CASSATA G, PULEIO R, VERIN L, MOTTA A, MIGLIARESI C, GUERCIO A & ZUMMO G 2013. Silk fibroin scaffolds enhance cell commitment of adult rat cardiac progenitor cells. *J Tissue Eng Regen Med*.

DI TRAPANI, M., BASSI, G., RICCIARDI, M., FONTANA, E., BIFARI, F., PACELLI, L., GIACOMELLO, L., POZZOBON, M., FERON, F., DE COPPI, P., ANVERSA, P., FUMAGALLI, G., DECIMO, I., MENARD, C., TARTE, K. & KRAMPERA, M. 2013. Comparative study of immune regulatory properties of stem cells derived from different tissues. *Stem Cells Dev,* 22**,** 2990-3002.

DISCHER, D. E., JANMEY, P. & WANG, Y. L. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science,* 310**,** 1139-43.

DU, J., CHEN, X., LIANG, X., ZHANG, G., XU, J., HE, L., ZHAN, Q., FENG, X. Q., CHIEN, S. & YANG, C. 2011. Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 108**,** 9466-71.

EFE JA, YUAN X, JIANG K & DING S 2011. Development unchained: how cellular reprogramming is redefining our view of cell fate and identity. *Sci Prog,* 94**,** 298-322.

EL-MOWAFI, H. & MOHSEN, M. 2005. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on callus maturation in tibial distraction osteogenesis. *Int Orthop,* 29**,** 121-4.

ERBS S, LINKE A, SCHÄCHINGER V, ASSMUS B, THIELE H, DIEDERICH KW, HOFFMANN C, DIMMELER S, TONN T, HAMBRECHT R, ZEIHER AM & SCHULER G 2007. Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial. *Circulation,* 116**,** 366-374.

EULER-TAIMOR, G. & HEGER, J. 2006. The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res,* 69**,** 15-25.

FRANZOSI, M. G., SANTORO, E., DE VITA, C., GERACI, E., LOTTO, A., MAGGIONI, A. P., MAURI, F., ROVELLI, F., SANTORO, L., TAVAZZI, L. & TOGNONI, G. 1998. Ten-year follow-up of the first megatrial testing thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction: results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto-1 study. The GISSI Investigators. *Circulation,* 98**,** 2659-65.

FREEMANTLE, N., CLELAND, J., YOUNG, P., MASON, J. & HARRISON, J. 1999. beta Blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis. *BMJ,* 318**,** 1730-7.

FRENETTE, P. S., SUBBARAO, S., MAZO, I. B., VON ANDRIAN, U. H. & WAGNER, D. D. 1998. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 95**,** 14423-8.

FRIEDLAND, J. C., LEE, M. H. & BOETTIGER, D. 2009. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science,* 323**,** 642-4.

FRISHMAN WH 2013. β-Adrenergic Blockade in Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*.

FU, S. & LIESVELD, J. 2000. Mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood Rev,* 14**,** 205-18.

FUKUMOTO, Y., ITO, A., UWATOKU, T., MATOBA, T., KISHI, T., TANAKA, H., TAKESHITA, A., SUNAGAWA, K. & SHIMOKAWA, H. 2006. Extracorporeal cardiac shock wave therapy ameliorates myocardial ischemia in patients with severe coronary artery disease. *Coron Artery Dis,* 17**,** 63-70.

GALVEZ, B. G., COVARELLO, D., TOLORENZI, R., BRUNELLI, S., DELLAVALLE, A., CRIPPA, S., MOHAMMED, S. A., SCIALLA, L., CUCCOVILLO, I., MOLLA, F., STASZEWSKY, L., MAISANO, F., SAMPAOLESI, M., LATINI, R. & COSSU, G. 2009a. Human cardiac mesoangioblasts isolated from hypertrophic cardiomyopathies are greatly reduced in proliferation and differentiation potency. *Cardiovasc Res,* 83**,** 707-16.

GALVEZ, B. G., MATIAS-ROMAN, S., YANEZ-MO, M., VICENTE-MANZANARES, M., SANCHEZ-MADRID, F. & ARROYO, A. G. 2004. Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. *Mol Biol Cell,* 15**,** 678-87.

GALVEZ, B. G., SAMPAOLESI, M., BARBUTI, A., CRESPI, A., COVARELLO, D., BRUNELLI, S., DELLAVALLE, A., CRIPPA, S., BALCONI, G., CUCCOVILLO, I., MOLLA, F., STASZEWSKY, L., LATINI, R., DIFRANCESCO, D. & COSSU, G. 2008. Cardiac mesoangioblasts are committed, self-renewable progenitors, associated with small vessels of juvenile mouse ventricle. *Cell Death Differ,* 15**,** 1417-28.

GALVEZ, B. G., SAMPAOLESI, M., BRUNELLI, S., COVARELLO, D., GAVINA, M., ROSSI, B., CONSTANTIN, G., TORRENTE, Y. & COSSU, G. 2006. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol,* 174**,** 231-43.

GALVEZ, B. G., SAN MARTIN, N. & RODRIGUEZ, C. 2009b. TNF-alpha is required for the attraction of mesenchymal precursors to white adipose tissue in Ob/ob mice. *PLoS One,* 4**,** e4444.

GILLESPIE, P. G. & WALKER, R. G. 2001. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature,* 413**,** 194-202.

GLASS C & SINGLA DK 2011. ES cells overexpressing microRNA-1 attenuate apoptosis in the injured myocardium. *Mol Cell Biochem,* 357**,** 135-141.

GRABOVSKY, V., FEIGELSON, S., CHEN, C., BLEIJS, D. A., PELED, A., CINAMON, G., BALEUX, F., ARENZANA-SEISDEDOS, F., LAPIDOT, T., VAN KOOYK, Y., LOBB, R. R. & ALON, R. 2000. Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med,* 192**,** 495-506.

GREENWOOD, J., WANG, Y. & CALDER, V. L. 1995. Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. off. *Immunology,* 86**,** 408-15.

GRUNEWALD, M., AVRAHAM, I., DOR, Y., BACHAR-LUSTIG, E., ITIN, A., JUNG, S., CHIMENTI, S., LANDSMAN, L., ABRAMOVITCH, R. & KESHET, E. 2006. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell,* 124**,** 175-89.

HANAWA, K., ITO, K., AIZAWA, K., SHINDO, T., NISHIMIYA, K., HASEBE, Y., TUBURAYA, R., HASEGAWA, H., YASUDA, S., KANAI, H. & SHIMOKAWA, H. 2014. Low-intensity pulsed ultrasound induces angiogenesis and ameliorates left ventricular dysfunction in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *PLoS One,* 9**,** e104863.

HASEGAWA, T., MIWA, M., SAKAI, Y., NIIKURA, T., KUROSAKA, M. & KOMORI, T. 2009. Osteogenic activity of human fracture haematoma-derived progenitor cells is stimulated by low-intensity pulsed ultrasound in vitro. *J Bone Joint Surg Br,* 91**,** 264-70.

HE, J. Q., VU, D. M., HUNT, G., CHUGH, A., BHATNAGAR, A. & BOLLI, R. 2011. Human cardiac stem cells isolated from atrial appendages stably express c-kit. *PLoS One,* 6**,** e27719.

HEINRICH, E. M. & DIMMELER, S. 2012. MicroRNAs and stem cells: control of pluripotency, reprogramming, and lineage commitment. *Circ Res,* 110**,** 1014-22.

HIERLIHY, A. M., SEALE, P., LOBE, C. G., RUDNICKI, M. A. & MEGENEY, L. A. 2002. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett,* 530**,** 239-43.

HOCHMUTH, R. M. 2000. Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech,* 33**,** 15-22.

HOFFMAN, B. D., GRASHOFF, C. & SCHWARTZ, M. A. 2011. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature,* 475**,** 316-23.

HOLLE, A. W. & ENGLER, A. J. 2011. More than a feeling: discovering, understanding, and influencing mechanosensing pathways. *Curr Opin Biotechnol,* 22**,** 648-54.

HORWITZ, A. R. & PARSONS, J. T. 1999. Cell migration--movin' on. *Science,* 286**,** 1102-3.

HOTCHIN, N. A. & HALL, A. 1995. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol,* 131**,** 1857-65.

HU, K., JI, L., APPLEGATE, K. T., DANUSER, G. & WATERMAN-STORER, C. M. 2007. Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science,* 315**,** 111-5.

HUANG, C., GU, H., YU, Q., MANUKYAN, M. C., POYNTER, J. A. & WANG, M. 2011. Sca-1+ cardiac stem cells mediate acute cardioprotection via paracrine factor SDF-1 following myocardial ischemia/reperfusion. *PLoS One,* 6**,** e29246.

HUANG, C. & OGAWA, R. 2010. Mechanotransduction in bone repair and regeneration. *FASEB J,* 24**,** 3625-32.

IEDA M, FU JD, DELGADO-OLGUIN P, VEDANTHAM V, HAYASHI Y, BRUNEAU BG & SRIVASTAVA D 2010. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell,* 142**,** 375-386.

INGBER, D. E. 2003. Mechanosensation through integrins: cells act locally but think globally. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 100**,** 1472-4.

ITESCU S, SCHUSTER MD & KOCHER AA 2003. New directions in strategies using cell therapy for heart disease. *J Mol Med (Berl),* 81**,** 288-296.

JAALOUK, D. E. & LAMMERDING, J. 2009. Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 10**,** 63-73.

JACKSON KA, MAJKA SM, WANG H, POCIUS J, HARTLEY CJ, MAJESKY MW, ENTMAN ML, MICHAEL LH, HIRSCHI KK & GOODELL MA 2001. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest,* 107**,** 1395-1402.

JANSSENS S, DUBOIS C, BOGAERT J, THEUNISSEN K, DEROOSE C, DESMET W, KALANTZI M, HERBOTS L, SINNAEVE P, DENS J, MAERTENS J, RADEMAKERS F, DYMARKOWSKI S, GHEYSENS O, VAN CLEEMPUT J, BORMANS G, NUYTS J, BELMANS A, MORTELMANS L, BOOGAERTS M & VAN DE WERF F 2006. Autologous bone marrow-derived stem-cell

transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet,* 367**,** 113-121.

JAYAWARDENA TM, EGEMNAZAROV B, FINCH EA, ZHANG L, PAYNE JA, PANDYA K, ZHANG Z, ROSENBERG P, MIROTSOU M & DZAU VJ 2012. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res,* 110**,** 1465-1473.

JIANG, T., XU, T., GU, F., CHEN, A., XIAO, Z. & ZHANG, D. 2012. Osteogenic effect of low intensity pulsed ultrasound on rat adipose-derived stem cells in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci,* 32**,** 75-81.

JUAN AH & SARTORELLI V 2010. MicroRNA-214 and polycomb group proteins: a regulatory circuit controlling differentiation and cell fate decisions. *Cell Cycle. 2010 Apr 15;9(8):1445-6. Epu,* 9**,** 1445-1446.

JUJO, K., II, M. & LOSORDO, D. W. 2008. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol,* 45**,** 530-44.

KAJSTURA J, URBANEK K, PERL S, HOSODA T, ZHENG H, OGÓREK B, FERREIRA-MARTINS J, GOICHBERG P, RONDON-CLAVO C, SANADA F, D'AMARIO D, ROTA M, DEL MONTE F, ORLIC D, TISDALE J, LERI A & ANVERSA P 2010. Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circ Res,* 107**,** 305-315.

KIKUCHI K & POSS KD 2012. Cardiac regenerative capacity and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol,* 28**,** 719-741.

KIPPENBERGER, S., BERND, A., LOITSCH, S., GUSCHEL, M., MULLER, J., BEREITER-HAHN, J. & KAUFMANN, R. 2000. Signaling of mechanical stretch in human keratinocytes via MAP kinases. *J Invest Dermatol,* 114**,** 408-12.

KOCHER, A. A., SCHUSTER, M. D., BONAROS, N., LIETZ, K., XIANG, G., MARTENS, T. P., KURLANSKY, P. A., SONDERMEIJER, H., WITKOWSKI, P., BOYLE, A., HOMMA, S., WANG, S. F. & ITESCU, S. 2006. Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines. *J Mol Cell Cardiol,* 40**,** 455-64.

KOPF, J., PETERSEN, A., DUDA, G. N. & KNAUS, P. 2012. BMP2 and mechanical loading cooperatively regulate immediate early signalling events in the BMP pathway. *BMC Biol,* 10**,** 37.

KRAL, B. G. & KRAITCHMAN, D. L. 2013. From mice to men: gene therapy's future for treatment of myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Imaging,* 6**,** 360-2.

KUSUYAMA, J., BANDOW, K., SHAMOTO, M., KAKIMOTO, K., OHNISHI, T. & MATSUGUCHI, T. 2014. Low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) influences the multilineage differentiation of mesenchymal stem and progenitor cell lines through ROCK-Cot/Tpl2-MEK-ERK signaling pathway. *J Biol Chem,* 289**,** 10330-44.

KYURKCHIEV, D., BOCHEV, I., IVANOVA-TODOROVA, E., MOURDJEVA, M., ORESHKOVA, T., BELEMEZOVA, K. & KYURKCHIEV, S. 2014. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells,* 6**,** 552-70.

LAFLAMME MA & MURRY CE 2011. Heart regeneration. *Nature,* 473**,** 326-35.

LAI, C. F. & CHENG, S. L. 2005. Alphavbeta integrins play an essential role in BMP-2 induction of osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res,* 20**,** 330-40.

LARSEN, M., TREMBLAY, M. L. & YAMADA, K. M. 2003. Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 4**,** 700-11.

LATERVEER, L., LINDLEY, I. J., HEEMSKERK, D. P., CAMPS, J. A., PAUWELS, E. K., WILLEMZE, R. & FIBBE, W. E. 1996. Rapid mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by a single intravenous injection of interleukin-8. *Blood,* 87**,** 781-8.

LATRONICO MV & CONDORELLI G 2009. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat Rev Cardiol,* 6**,** 419-429.

LAUGWITZ, K. L., MORETTI, A., LAM, J., GRUBER, P., CHEN, Y., WOODARD, S., LIN, L. Z., CAI, C. L., LU, M. M., RETH, M., PLATOSHYN, O., YUAN, J. X., EVANS, S. & CHIEN, K. R. 2005. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature,* 433**,** 647-53.

LEE, M. H., KIM, Y. J., KIM, H. J., PARK, H. D., KANG, A. R., KYUNG, H. M., SUNG, J. H., WOZNEY, J. M. & RYOO, H. M. 2003. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem,* 278**,** 34387-94.

LEE, S. Y., KOH, A., NIIKURA, T., OE, K., KOGA, T., DOGAKI, Y. & KUROSAKA, M. 2013. Low-intensity pulsed ultrasound enhances BMP-7-induced osteogenic differentiation of human fracture hematoma-derived progenitor cells in vitro. *J Orthop Trauma,* 27**,** 29-33.

LERI A, KAJSTURA J & ANVERSA P 2005. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev,* 85**,** 1373-1416.

LERI A, KAJSTURA J & ANVERSA P 2011. Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ Res,* 109**,** 941-961.

LESSEY, E. C., GUILLUY, C. & BURRIDGE, K. 2012. From mechanical force to RhoA activation. *Biochemistry,* 51**,** 7420-32.

LEUNG, K. S., CHEUNG, W. H., ZHANG, C., LEE, K. M. & LO, H. K. 2004. Low intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic activity of human periosteal cells. *Clin Orthop Relat Res***,** 253-9.

LEWIN, P. A., BARRIE-SMITH, N., IDE, M., HYNYNEN, K. & MACDONALD, M. 2003. Interlaboratory acoustic power measurement. *J Ultrasound Med,* 22**,** 207-13.

LI M & IKEHARA S 2013. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem Cells Int,* 2013**,** 132642.

LIAO HS, KANG PM, NAGASHIMA H, YAMASAKI N, USHEVA A, DING B, LORELL BH & IZUMO S 2001. Cardiac-specific overexpression of cyclin-dependent kinase 2 increases smaller mononuclear cardiomyocytes. *Circ Res,* 88**,** 443-450.

LIMANA F, URBANEK K, CHIMENTI S, QUAINI F, LERI A, KAJSTURA J, NADAL-GINARD B, IZUMO S & ANVERSA P 2002. bcl-2 overexpression promotes myocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 99**,** 6257-6262.

LINKE, A., MULLER, P., NURZYNSKA, D., CASARSA, C., TORELLA, D., NASCIMBENE, A., CASTALDO, C., CASCAPERA, S., BOHM, M., QUAINI, F., URBANEK, K., LERI, A., HINTZE, T. H., KAJSTURA, J. & ANVERSA, P. 2005. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 102**,** 8966-71.

LV, Y., ZHAO, P., CHEN, G., SHA, Y. & YANG, L. 2013. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on cell viability, proliferation and neural differentiation of induced pluripotent stem cells-derived neural crest stem cells. *Biotechnol Lett,* 35**,** 2201-12.

MACLELLAN WR & SCHNEIDER MD 2000. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu Rev Physiol,* 62**,** 289-319.

MARJORAM, R. J., LESSEY, E. C. & BURRIDGE, K. 2014. Regulation of RhoA activity by adhesion molecules and mechanotransduction. *Curr Mol Med,* 14**,** 199-208.

MARTIN, C. M., MEESON, A. P., ROBERTSON, S. M., HAWKE, T. J., RICHARDSON, J. A., BATES, S., GOETSCH, S. C., GALLARDO, T. D. & GARRY, D. J. 2004. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol,* 265**,** 262-75.

MARTINEZ NJ & GREGORY RI 2010. MicroRNA gene regulatory pathways in the establishment and maintenance of ESC identity. *Cell Stem Cell,* 7**,** 31-35.

MATSUURA K, HONDA A, NAGAI T, FUKUSHIMA N, IWANAGA K, TOKUNAGA M, SHIMIZU T, OKANO T, KASANUKI H, HAGIWARA N & KOMURO I 2009. Transplantation of cardiac

progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest,* 119**,** 2204-2217.

MATSUURA, K., NAGAI, T., NISHIGAKI, N., OYAMA, T., NISHI, J., WADA, H., SANO, M., TOKO, H., AKAZAWA, H., SATO, T., NAKAYA, H., KASANUKI, H. & KOMURO, I. 2004. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem,* 279**,** 11384-91.

MAYR, E., LAULE, A., SUGER, G., RUTER, A. & CLAES, L. 2001. Radiographic results of callus distraction aided by pulsed low-intensity ultrasound. *J Orthop Trauma,* 15**,** 407-14.

MEHTA, S. R. & YUSUF, S. 2003. Short- and long-term oral antiplatelet therapy in acute coronary syndromes and percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol,* 41**,** 79S-88S.

MESSINA, E., DE ANGELIS, L., FRATI, G., MORRONE, S., CHIMENTI, S., FIORDALISO, F., SALIO, M., BATTAGLIA, M., LATRONICO, M. V., COLETTA, M., VIVARELLI, E., FRATI, L., COSSU, G. & GIACOMELLO, A. 2004. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res,* 95**,** 911-21.

MILLER, D. L., SMITH, N. B., BAILEY, M. R., CZARNOTA, G. J., HYNYNEN, K. & MAKIN, I. R. 2012. Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *J Ultrasound Med,* 31**,** 623-34.

MINASI, M. G., RIMINUCCI, M., DE ANGELIS, L., BORELLO, U., BERARDUCCI, B., INNOCENZI, A., CAPRIOLI, A., SIRABELLA, D., BAIOCCHI, M., DE MARIA, R., BORATTO, R., JAFFREDO, T., BROCCOLI, V., BIANCO, P. & COSSU, G. 2002. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development,* 129**,** 2773-83.

MIROTSOU M, ZHANG Z, DEB A, ZHANG L, GNECCHI M, NOISEUX N, MU H, PACHORI A & DZAU V 2007. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 104**,** 1643-1648.

MIYAMOTO S, KAWAGUCHI N, ELLISON GM, MATSUOKA R, SHIN'OKA T & KUROSAWA H 2010. Characterization of long-term cultured c-kit+ cardiac stem cells derived from adult rat hearts. *Stem Cells Dev,* 19**,** 105-116.

MOHRMAN, D. E. & HELLER, L. J. 1997. *Cardiovascular Physiology*, McGraw-Hill, Health Professions Division.

MONZEN, K., NAGAI, R. & KOMURO, I. 2002. A role for bone morphogenetic protein signaling in cardiomyocyte differentiation. *Trends Cardiovasc Med,* 12**,** 263-9.

MYLONA, E., JONES, K. A., MILLS, S. T. & PAVLATH, G. K. 2006. CD44 regulates myoblast migration and differentiation. *J Cell Physiol,* 209**,** 314-21.

NAKAMURA, T., FUJIHARA, S., YAMAMOTO-NAGATA, K., KATSURA, T., INUBUSHI, T. & TANAKA, E. 2011. Low-intensity pulsed ultrasound reduces the inflammatory activity of synovitis. *Ann Biomed Eng,* 39**,** 2964-71.

NAM YJ, SONG K, LUO X, DANIEL E, LAMBETH K, WEST K, HILL JA, DIMAIO JM, BAKER LA, BASSEL-DUBY R & OLSON EN 2013. Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 11**,** 5588-5593.

NISHIDA, T., SHIMOKAWA, H., OI, K., TATEWAKI, H., UWATOKU, T., ABE, K., MATSUMOTO, Y., KAJIHARA, N., ETO, M., MATSUDA, T., YASUI, H., TAKESHITA, A. & SUNAGAWA, K. 2004. Extracorporeal cardiac shock wave therapy markedly ameliorates ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo. *Circulation,* 110**,** 3055-61.

NUSSBAUM J, MINAMI E, LAFLAMME MA, VIRAG JA, WARE CB, MASINO A, MUSKHELI V, PABON L, REINECKE H & MURRY CE 2007. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J,* 21**,** 1345-1357.

OH H, TAFFET GE, YOUKER KA, ENTMAN ML, OVERBEEK PA, MICHAEL LH & SCHNEIDER MD 2001. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 98**,** 10308-10313.

OH, H., BRADFUTE, S. B., GALLARDO, T. D., NAKAMURA, T., GAUSSIN, V., MISHINA, Y., POCIUS, J., MICHAEL, L. H., BEHRINGER, R. R., GARRY, D. J., ENTMAN, M. L. & SCHNEIDER, M. D. 2003. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 100**,** 12313-8.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, BODINE DM, LERI A & ANVERSA P 2001a. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci,* 938**,** 221-229.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B, PICKEL J, MCKAY R, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A & ANVERSA P 2001b. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature,* 410**,** 701-705.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, LIMANA F, JAKONIUK I, QUAINI F, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A & ANVERSA P 2001c. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 98**,** 10344-10349.

PADILLA, F., PUTS, R., VICO, L. & RAUM, K. 2014. Stimulation of bone repair with ultrasound: a review of the possible mechanic effects. *Ultrasonics,* 54**,** 1125-45.

PALUMBO, R., GALVEZ, B. G., PUSTERLA, T., DE MARCHIS, F., COSSU, G., MARCU, K. B. & BIANCHI, M. E. 2007. Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation. *J Cell Biol,* 179**,** 33-40.

PALUMBO, R., SAMPAOLESI, M., DE MARCHIS, F., TONLORENZI, R., COLOMBETTI, S., MONDINO, A., COSSU, G. & BIANCHI, M. E. 2004. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol,* 164**,** 441-9.

PASUMARTHI KB, NAKAJIMA H, NAKAJIMA HO, SOONPAA MH & FIELD LJ 2005. Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circ Res,* 96**,** 110-118.

PAVALKO, F. M., CHEN, N. X., TURNER, C. H., BURR, D. B., ATKINSON, S., HSIEH, Y. F., QIU, J. & DUNCAN, R. L. 1998. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am J Physiol,* 275**,** C1591-601.

PELED, A., GRABOVSKY, V., HABLER, L., SANDBANK, J., ARENZANA-SEISDEDOS, F., PETIT, I., BEN-HUR, H., LAPIDOT, T. & ALON, R. 1999. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest,* 104**,** 1199-211.

PELED, A., KOLLET, O., PONOMARYOV, T., PETIT, I., FRANITZA, S., GRABOVSKY, V., SLAV, M. M., NAGLER, A., LIDER, O., ALON, R., ZIPORI, D. & LAPIDOT, T. 2000. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood,* 95**,** 3289-96.

PERIN EC, DOHMANN HF, BOROJEVIC R, SILVA SA, SOUSA AL, MESQUITA CT, ROSSI MI, CARVALHO AC, DUTRA HS, DOHMANN HJ, SILVA GV, BELÉM L, VIVACQUA R, RANGEL FO, ESPORCATTE R, GENG YJ, VAUGHN WK, ASSAD JA, MESQUITA ET & WILLERSON JT 2003. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation. 2003 May 13;107(18):2294-302. E,* 107**,** 2294-2302.

PFISTER, O., MOUQUET, F., JAIN, M., SUMMER, R., HELMES, M., FINE, A., COLUCCI, W. S. & LIAO, R. 2005. CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res,* 97**,** 52-61.

PFISTER, O., OIKONOMOPOULOS, A., SERETI, K. I. & LIAO, R. 2010. Isolation of resident cardiac progenitor cells by Hoechst 33342 staining. *Methods Mol Biol,* 660**,** 53-63.

PLAZA, G. R., MARI, N., GALVEZ, B. G., BERNAL, A., GUINEA, G. V., DAZA, R., PEREZ-RIGUEIRO, J., SOLANAS, C. & ELICES, M. 2014. Simple measurement of the apparent viscosity of a cell from only one picture: Application to cardiac stem cells. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys,* 90**,** 052715.

POUNDER, N. M. & HARRISON, A. J. 2008. Low intensity pulsed ultrasound for fracture healing: a review of the clinical evidence and the associated biological mechanism of action. *Ultrasonics,* 48**,** 330-8.

POZZI, D., FATTIBENE, P., VISCOMI, D., DI GIAMBATTISTA, L., GRIMALDI, P., UDROIU, I., BEDINI, A., GILIBERTI, C., PALOMBA, R. & CONGIU CASTELLANO, A. 2011. Use of EPR and FTIR to detect biological effects of ultrasound and microbubbles on a fibroblast cell line. *Eur Biophys J,* 40**,** 1115-20.

PRADERVAND, S., WEBER, J., THOMAS, J., BUENO, M., WIRAPATI, P., LEFORT, K., DOTTO, G. P. & HARSHMAN, K. 2009. Impact of normalization on miRNA microarray expression profiling. *RNA,* 15**,** 493-501.

QIN, L., FOK, P., LU, H., SHI, S., LENG, Y. & LEUNG, K. 2006. Low intensity pulsed ultrasound increases the matrix hardness of the healing tissues at bone-tendon insertion-a partial patellectomy model in rabbits. *Clin Biomech (Bristol, Avon),* 21**,** 387-94.

QUAINI F, URBANEK K, BELTRAMI AP, FINATO N, BELTRAMI CA, NADAL-GINARD B, KAJSTURA J, LERI A & ANVERSA P 2002. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med,* 346**,** 5-15.

RAUM, K., HOFMANN, T., LEGUERNEY, I., SAIED, A., PEYRIN, F., VICO, L. & LAUGIER, P. 2007. Variations of microstructure, mineral density and tissue elasticity in B6/C3H mice. *Bone,* 41**,** 1017-24.

RIDLEY, A. J. & HALL, A. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell,* 70**,** 389-99.

RIVELINE, D., ZAMIR, E., BALABAN, N. Q., SCHWARZ, U. S., ISHIZAKI, T., NARUMIYA, S., KAM, Z., GEIGER, B. & BERSHADSKY, A. D. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol,* 153**,** 1175-86.

ROGNONI, L., STIGLER, J., PELZ, B., YLANNE, J. & RIEF, M. 2012. Dynamic force sensing of filamin revealed in single-molecule experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 109**,** 19679-84.

ROMANO, C. L., ROMANO, D. & LOGOLUSO, N. 2009. Low-intensity pulsed ultrasound for the treatment of bone delayed union or nonunion: a review. *Ultrasound Med Biol,* 35**,** 529-36.

ROMET-LEMONNE, G. & JEGOU, A. 2013. Mechanotransduction down to individual actin filaments. *Eur J Cell Biol,* 92**,** 333-8.

ROUBILLE F, FRANCK-MICLO A, COVINHES A, LAFONT C, CRANSAC F, COMBES S, VINCENT A, FONTANAUD P, SPORTOUCH-DUKHAN C, REDT-CLOUET C, NARGEOT J, PIOT C & BARRÈRE-LEMAIRE S 2011. Delayed postconditioning in the mouse heart in vivo. *Circulation,* 124**,** 1330-1336.

RUMYANTSEV PP 1977. Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiact myogenesis and regeneration. *Int Rev Cytol,* 51**,** 186-273.

SAN MARTIN, N., CERVERA, A. M., CORDOVA, C., COVARELLO, D., MCCREATH, K. J. & GALVEZ, B. G. 2011. Mitochondria determine the differentiation potential of cardiac mesoangioblasts. *Stem Cells,* 29**,** 1064-74.

SANT'ANNA, E. F., LEVEN, R. M., VIRDI, A. S. & SUMNER, D. R. 2005. Effect of low intensity pulsed ultrasound and BMP-2 on rat bone marrow stromal cell gene expression. *J Orthop Res,* 23**,** 646-52.

SASTRY, S. K. & BURRIDGE, K. 2000. Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp Cell Res,* 261**,** 25-36.

SAXENA A, FISH JE, WHITE MD, YU S, SMYTH JW, SHAW RM, DIMAIO JM & SRIVASTAVA D 2008. Stromal cell-derived factor-1alpha is cardioprotective after myocardial infarction. *Circulation,* 117**,** 2224-2231.

SCARPONI, C., NASORRI, F., PAVANI, F., MADONNA, S., SESTITO, R., SIMONACCI, M., DE PITA, O., CAVANI, A. & ALBANESI, C. 2009. Low-frequency low-intensity ultrasounds do not influence the survival and immune functions of cultured keratinocytes and dendritic cells. *J Biomed Biotechnol,* 2009**,** 193260.

SCHOENWAELDER, S. M. & BURRIDGE, K. 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol,* 11**,** 274-86.

SCHORTINGHUIS, J., BRONCKERS, A. L., STEGENGA, B., RAGHOEBAR, G. M. & DE BONT, L. G. 2005. Ultrasound to stimulate early bone formation in a distraction gap: a double blind randomised clinical pilot trial in the edentulous mandible. *Arch Oral Biol,* 50**,** 411-20.

SCHULTHEISS, T. M., BURCH, J. B. & LASSAR, A. B. 1997. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev,* 11**,** 451-62.

SCHWARZ, C., WULSTEN, D., ELLINGHAUS, A., LIENAU, J., WILLIE, B. M. & DUDA, G. N. 2013. Mechanical load modulates the stimulatory effect of BMP2 in a rat nonunion model. *Tissue Eng Part A,* 19**,** 247-54.

SCHWEITZER, K. M., DRAGER, A. M., VAN DER VALK, P., THIJSEN, S. F., ZEVENBERGEN, A., THEIJSMEIJER, A. P., VAN DER SCHOOT, C. E. & LANGENHUIJSEN, M. M. 1996. Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am J Pathol,* 148**,** 165-75.

SERRA-PEÑARANDA, A., MIRANDA-GUARDIOLA, F. & VENEGAS-ARAVENA, R. 2007. Análisis y características de los stents farmacoactivos disponibles en la actualidad. Futuros desarrollos. *Revista Española de Cardiología,* 7**,** 8-28.

SHOHET, R. V., CHEN, S., ZHOU, Y. T., WANG, Z., MEIDELL, R. S., UNGER, R. H. & GRAYBURN, P. A. 2000. Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. *Circulation,* 101**,** 2554-6.

SHYNKAR, V. V., KLYMCHENKO, A. S., KUNZELMANN, C., DUPORTAIL, G., MULLER, C. D., DEMCHENKO, A. P., FREYSSINET, J. M. & MELY, Y. 2007. Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis. *J Am Chem Soc,* 129**,** 2187-93.

SHYY, J. Y. & CHIEN, S. 1997. Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr Opin Cell Biol,* 9**,** 707-13.

SLUIJTER JP, VAN MIL A, VAN VLIET P, METZ CH, LIU J, DOEVENDANS PA & GOUMANS MJ 2010. MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 30**,** 859-868.

SMITH, R. R., BARILE, L., CHO, H. C., LEPPO, M. K., HARE, J. M., MESSINA, E., GIACOMELLO, A., ABRAHAM, M. R. & MARBAN, E. 2007. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation,* 115**,** 896-908.

SMITS AM, VAN LAAKE LW, DEN OUDEN K, SCHREURS C, SZUHAI K, VAN ECHTELD CJ, MUMMERY CL, DOEVENDANS PA & GOUMANS MJ 2009. Human cardiomyocyte progenitor cell transplantation preserves long-term function of the infarcted mouse myocardium. *Cardiovasc Res,* 83**,** 527-535.

SPRINGER, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell,* 76**,** 301-14.

STAMM C, WESTPHAL B, KLEINE HD, PETZSCH M, KITTNER C, KLINGE H, SCHÜMICHEN C, NIENABER CA, FREUND M & STEINHOFF G 2003. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet,* 361**,** 45-46.

STOOLMAN, L. M. 1989. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell,* 56**,** 907-10.

STOORVOGEL W 2012. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood,* 119**,** 646-648.

SUBRAMANYAM D, LAMOUILLE S, JUDSON RL, LIU JY, BUCAY N, DERYNCK R & BLELLOCH R 2011. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol,* 29**,** 443-448.

SUTTON, M. G. & SHARPE, N. 2000. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation,* 101**,** 2981-8.

SUZUKI, A., TAKAYAMA, T., SUZUKI, N., KOJIMA, T., OTA, N., ASANO, S. & ITO, K. 2009a. Daily low-intensity pulsed ultrasound stimulates production of bone morphogenetic protein in ROS 17/2.8 cells. *J Oral Sci,* 51**,** 29-36.

SUZUKI, A., TAKAYAMA, T., SUZUKI, N., SATO, M., FUKUDA, T. & ITO, K. 2009b. Daily low-intensity pulsed ultrasound-mediated osteogenic differentiation in rat osteoblasts. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),* 41**,** 108-15.

TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K & YAMANAKA S 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72.,* 131**,** 861-872.

TAKAHASHI K & YAMANAKA S 2006. nduction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell,* 126**,** 663-676.

TANG, C. H., YANG, R. S., HUANG, T. H., LU, D. Y., CHUANG, W. J., HUANG, T. F. & FU, W. M. 2006. Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt pathway in osteoblasts. *Mol Pharmacol,* 69**,** 2047-57.

TANG XL, ROKOSH G, SANGANALMATH SK, YUAN F, SATO H, MU J, DAI S, LI C, CHEN N, PENG Y, DAWN B, HUNT G, LERI A, KAJSTURA J, TIWARI S, SHIRK G, ANVERSA P & BOLLI R 2010. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation* 121**,** 293-305.

TER HAAR, G. 2007. Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol,* 93**,** 111-29.

THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS & JONES JM 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science,* 282**,** 1145-1147.

TOMA C, PITTENGER MF, CAHILL KS, BYRNE BJ & KESSLER PD 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation,* 105**,** 93-98.

TOWBIN, J. A. & BOWLES, N. E. 2002. The failing heart. *Nature,* 415**,** 227-33.

TRICKEY, W. R., LEE, G. M. & GUILAK, F. 2000. Viscoelastic properties of chondrocytes from normal and osteoarthritic human cartilage. *J Orthop Res,* 18**,** 891-8.

TSE HF, KWONG YL, CHAN JK, LO G, HO CL & LAU CP 2003. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet. 2003 Jan 4;361(9351):47-9.,* 361**,** 47-49.

UDDIN, S. M. & QIN, Y. X. 2013. Enhancement of osteogenic differentiation and proliferation in human mesenchymal stem cells by a modified low intensity ultrasound stimulation under simulated microgravity. *PLoS One,* 8**,** e73914.

UEMURA R, XU M, AHMAD N & ASHRAF M 2006. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res,* 98**,** 1414-1421.

URBANEK K, CESSELLI D, ROTA M, NASCIMBENE A, DE ANGELIS A, HOSODA T, BEARZI C, BONI A, BOLLI R, KAJSTURA J, ANVERSA P & LERI A 2006. Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 103**,** 9226-9231.

URBANEK, K., TORELLA, D., SHEIKH, F., DE ANGELIS, A., NURZYNSKA, D., SILVESTRI, F., BELTRAMI, C. A., BUSSANI, R., BELTRAMI, A. P., QUAINI, F., BOLLI, R., LERI, A.,

KAJSTURA, J. & ANVERSA, P. 2005. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 102**,** 8692-7.

VAN WIJK, B., MOORMAN, A. F. & VAN DEN HOFF, M. J. 2007. Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation. *Cardiovasc Res,* 74**,** 244-55.

VANELLI, A., PENNAROSSA, G., MAFFEI, S., GALVEZ, B. G., COSSU, G., RAHAMAN, M., GANDOLFI, F. & BREVINI, T. A. 2012. Isolation, characterization and differentiation potential of cardiac progenitor cells in adult pigs. *Stem Cell Rev,* 8**,** 706-19.

VEGUE, J. B. 2010. *Atlas de histologia y organografia microscopica / Atlas of Histology and Microscopic Organography*, Editorial Medica Panamericana Sa de.

VOGEL, V. 2006. Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu Rev Biophys Biomol Struct,* 35**,** 459-88.

WANG, C. J., WANG, F. S., YANG, K. D., WENG, L. H., HSU, C. C., HUANG, C. S. & YANG, L. C. 2003. Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits. *J Orthop Res,* 21**,** 984-9.

WANG, C. H., MONETTE, R., LEE, S. C., MORLEY, P. & WU, W. G. 2005. Cobra cardiotoxin-induced cell death in fetal rat cardiomyocytes and cortical neurons: different pathway but similar cell surface target. *Toxicon,* 46**,** 430-40.

WANG, L., KAMATH, A., FRYE, J., IWAMOTO, G. A., CHUN, J. L. & BERRY, S. E. 2012. Aorta-derived mesoangioblasts differentiate into the oligodendrocytes by inhibition of the Rho kinase signaling pathway. *Stem Cells Dev,* 21**,** 1069-89.

WANG M, TAN J, WANG Y, MELDRUM KK, DINARELLO CA & MELDRUM DR 2009. IL-18 binding protein-expressing mesenchymal stem cells improve myocardial protection after ischemia or infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 106**,** 17499-17504.

WANG Y, BASKERVILLE S, SHENOY A, BABIARZ JE, BAEHNER L & BLELLOCH R 2008. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet,* 40**,** 1478-1483.

WANG, Y., ZHENG, X. R., RIDDICK, N., BRYDEN, M., BAUR, W., ZHANG, X. & SURKS, H. K. 2009. ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells. *Circ Res,* 104**,** 531-40.

WATABE, H., FURUHAMA, T., TANI-ISHII, N. & MIKUNI-TAKAGAKI, Y. 2011. Mechanotransduction activates alpha(5)beta(1) integrin and PI3K/Akt signaling pathways in mandibular osteoblasts. *Exp Cell Res,* 317**,** 2642-9.

WEYTS, F. A., LI, Y. S., VAN LEEUWEN, J., WEINANS, H. & CHIEN, S. 2002. ERK activation and alpha v beta 3 integrin signaling through Shc recruitment in response to mechanical stimulation in human osteoblasts. *J Cell Biochem,* 87**,** 85-92.

WHITNEY, N. P., LAMB, A. C., LOUW, T. M. & SUBRAMANIAN, A. 2012. Integrin-mediated mechanotransduction pathway of low-intensity continuous ultrasound in human chondrocytes. *Ultrasound Med Biol,* 38**,** 1734-43.

WOLLERT KC & DREXLER H 2005. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res,* 96**,** 151-163.

WRIGHT, D. E., BOWMAN, E. P., WAGERS, A. J., BUTCHER, E. C. & WEISSMAN, I. L. 2002. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med,* 195**,** 1145-54.

XU, P., GUL-ULUDAG, H., ANG, W. T., YANG, X., HUANG, M., MARQUEZ-CURTIS, L., MCGANN, L., JANOWSKA-WIECZOREK, A., XING, J., SWANSON, E. & CHEN, J. 2012. Low-intensity pulsed ultrasound-mediated stimulation of hematopoietic stem/progenitor cell viability, proliferation and differentiation in vitro. *Biotechnol Lett,* 34**,** 1965-73.

YANG, R. S., LIN, W. L., CHEN, Y. Z., TANG, C. H., HUANG, T. H., LU, B. Y. & FU, W. M. 2005. Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. *Bone,* 36**,** 276-83.

YEUNG, A. & EVANS, E. 1989. Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets. *Biophys J,* 56**,** 139-49.

YIM, E. K. & SHEETZ, M. P. 2012. Force-dependent cell signaling in stem cell differentiation. *Stem Cell Res Ther,* 3**,** 41.

YING, Z. M., LIN, T. & YAN, S. G. 2012. Low-intensity pulsed ultrasound therapy: a potential strategy to stimulate tendon-bone junction healing. *J Zhejiang Univ Sci B,* 13**,** 955-63.

YONG, K. L., WATTS, M., SHAUN THOMAS, N., SULLIVAN, A., INGS, S. & LINCH, D. C. 1998. Transmigration of CD34+ cells across specialized and nonspecialized endothelium requires prior activation by growth factors and is mediated by PECAM-1 (CD31). *Blood,* 91**,** 1196-205.

ZAJAC, A. L. & DISCHER, D. E. 2008. Cell differentiation through tissue elasticity-coupled, myosin-driven remodeling. *Curr Opin Cell Biol,* 20**,** 609-15.

ZHANG, Z. J., HUCKLE, J., FRANCOMANO, C. A. & SPENCER, R. G. 2003. The effects of pulsed low-intensity ultrasound on chondrocyte viability, proliferation, gene expression and matrix production. *Ultrasound Med Biol,* 29**,** 1645-51.

ZHOU, S., SCHMELZ, A., SEUFFERLEIN, T., LI, Y., ZHAO, J. & BACHEM, M. G. 2004. Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. *J Biol Chem,* 279**,** 54463-9.

ZIEGLER, W. H., GINGRAS, A. R., CRITCHLEY, D. R. & EMSLEY, J. 2008. Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin. *Biochem Soc Trans,* 36**,** 235-9.

ZOLLER, M., GUPTA, P., MARHABA, R., VITACOLONNA, M. & FREYSCHMIDT-PAUL, P. 2007. Anti-CD44-mediated blockade of leukocyte migration in skin-associated immune diseases. *J Leukoc Biol,* 82**,** 57-71.

Anexos

ANEXO

Artículos publicados como resultado de este proyecto de Tesis Doctoral:

- **Bernal, A.**, and Galvez, B.G. (2013). The potential of stem cells in the treatment of cardiovascular diseases. Stem Cell Rev *9*, 814-832.

- **Bernal, A.**, Fernandez, M., Perez, L.M., San Martin, N., and Galvez, B.G. (2012a). Method for obtaining committed adult mesenchymal precursors from skin and lung tissue. PLoS One *7*, e53215.

- **Bernal, A.**, San Martin, N., Fernandez, M., Covarello, D., Molla, F., Soldo, A., Latini, R., Cossu, G., and Galvez, B.G. (2012b). L-selectin and SDF-1 enhance the migration of mouse and human cardiac mesoangioblasts. Cell Death Differ *19*, 345-355.

Otros artículos publicados durante el desarrollo del proyecto:

- Pérez LM; **Bernal A**; Lucas Moreno B; San Martin N; Mastrangelo A; García A; Barbas C; Galvez BG. Altered metabolic and stemness capacity of adipose tissue-derived stem cells from obese mouse and human. Plos One. In Press, 2015.

- Plaza, G.R., Mari, N., Galvez, B.G., **Bernal, A.**, Guinea, G.V., Daza, R., Perez-Rigueiro, J., Solanas, C., and Elices, M. (2014). Simple measurement of the apparent viscosity of a cell from only one picture: Application to cardiac stem cells. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys *90*, 052715.

- Perez, L.M., **Bernal, A.**, San Martin, N., and Galvez, B.G. (2013a). Obese-derived ASCs show impaired migration and angiogenesis properties. Arch Physiol Biochem 119, 195-201.

- Perez, L.M., **Bernal, A.**, San Martin, N., Lorenzo, M., Fernandez-Veledo, S., and Galvez, B.G. (2013b). Metabolic rescue of obese adipose-derived stem cells by Lin28/Let7 pathway. Diabetes 62, 2368-2379.