

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**



TITULO:

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES A CARDIOMIOCITOS MEDIANTE LA SOBREEXPRESIÓN
DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN MESP1 Y KLF15.**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA
GENÉTICA**

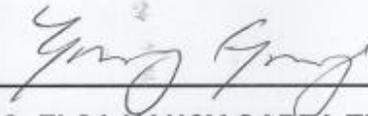
Presentado por:

Méd. Pablo Alfonso Carriquiry Chequer

Monterrey, Nuevo León a 22 de Noviembre de 2022

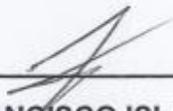
**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE CELULAS MADRE
MESENQUIMALES A CARDIOMIOCITOS MEDIANTE LA SOBREEXPRESIÓN
DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN MESP1 Y KLF15.**

Aprobación de la tesis:



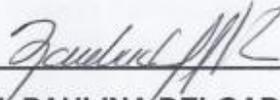
DRA.C. ELSA NANCY GARZA TREVIÑO

Directora de Tesis



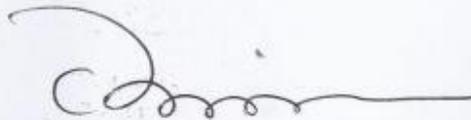
DR.C. JOSÉ FRANCISCO ISLAS CISNEROS

Codirector de Tesis



DRA. Med. PAULINA DELGADO GONZALEZ

Miembro de la Comisión de Tesis



DR. Med FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

Esta investigación se llevó a cabo en la **Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González”, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.**

Bajo la dirección de:

- Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño.
Directora
- Dr. C. José Francisco Islas Cisneros
Co-Director
- Dra. Paulina Delgado González
Asesora

Con la colaboración de las siguientes dependencias:

- Centro de Investigación e Innovación en Virología Molecular (CIIViM).
- Departamento de Histología.

Colaboradores:

- Dra. C. Sonia Lozano Sepúlveda – CIIViM
- Dr. C. Daniel Arellanos Soto - CIIViM
- Dr. C. Adolfo Soto Dominguez – Departamento de Histología
- M.C. Antonio Rojas Murillo – Laboratorio de Terapia Celular
- M.C. Adriana Quiroz Reyes – Laboratorio de Terapia Celular
- M.C. Tania Guadalupe Heredia Torres - CIIViM
- QFB. Jimena Mares – Pasante Servicio Social Lab. Terapia Celular

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el número de registro BI-000026 y financiado gracias al apoyo de los programas de ciencia de fronteras y CONACYT.

Agradecimientos:

Profesionales:

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por facilitarnos sus aulas e infraestructura tan necesarias para el desarrollo de este proyecto.

Al departamento de Bioquímica y Medicina Molecular por la educación brindada de mano de profesores altamente capacitados; por haberme permitido la experiencia de realizar mi posgrado en investigación con ustedes, fui afortunado de nutrirme en un ambiente altamente interdisciplinario y con alto grado de exigencia en el aprendizaje.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada.

A mi directora de tesis, Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño, por abrirme las puertas a su línea y equipo de investigación, por todo el apoyo recibido y sus sabios consejos profesionales, ya que gracias a ellos fue posible anteponernos a todos los posibles contratiempos logrando completar mi posgrado en tiempo y forma, le agradezco infinitamente su paciencia y toda la dedicación que le impregna a su equipo y trabajo de investigación.

A mi codirector de tesis, el Dr. C. José Francisco Islas Cisneros, por permitirme colaborar en su proyecto científico; por compartir su visión y su vasta experiencia con una cálida fraternidad, sin menoscabar toda la confianza brindada, atesoro su compañía y amistad.

A mi asesora de tesis, la Dra. Paulina Delgado, por su valiosa colaboración en este proyecto, agradezco mucho sus consejos y sus atenciones.

A mis compañeros de laboratorio, M.C. Antonio Rojas, M.C. Adriana Reyes, M.C. Tania Heredia, M.C. Martín García, por toda la guianza recibida, sabios consejos y el mejor compañerismo que uno puede pedir, les deseo siempre éxitos.

A la Dirección y Subdirección de Posgrado, así como al profesorado de otras orientaciones que participa en nuestro programa, técnicos y personal administrativo de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Personales:

A mi padre y a mi madre, que ésta y todas mis obras sean fruto de todo el esfuerzo que han depositado con el deseo de impulsarme personal y profesionalmente a lo largo de mi camino, soy sumamente afortunado de poder contar con ustedes. Las gracias no alcanzan, siempre llevaré conmigo la calidad humana, la entereza y la integridad que los caracteriza.

A mis hermanas, por enriquecer mi vida en cada una de las etapas que pasamos como familia, gracias por hacerme parte de sus vidas, deseo siempre llenarlas de orgullo.

A los amigos y aquellas personas que me acompañaron durante este periodo lleno de aprendizajes. Agradecimiento con especial cariño a la familia De la Puente Mendirichaga.

ÍNDICE

Resumen.....	viii
Abreviaturas.....	ix
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas.....	xiii
Capítulo I: Introducción	1
1.1 Desarrollo embrionario	2
1.1.1 MESP1.....	7
1.1.2 KLF15.....	7
1.2 Malformaciones cardiacas.....	9
1.3 Mecanismos de reparación posteriores al daño cardíaco.....	10
1.4 Insuficiencia cardiaca	12
1.4.1 Abordajes terapéuticos a la enfermedad cardiovascular.....	13
1.5 Terapia celular cardiovascular	14
1.5.1 Células madre mesenquimales.....	14
1.5.2 Células progenitoras cardiacas	16
1.6 Estrategias de cultivo In vitro para la diferenciación de SCs a cardiomiocitos.....	17
1.6.1 Estrategias para la entrega de genes	17
1.6.2 Estrategias de inducción a la diferenciación	20
1.6.3 Cultivo tridimensional de esferoides.....	21
1.6.4 Reprogramación de fibroblastos cardíacos.....	24
1.6.5 Estrategias de diferenciación a CM por silenciamiento de RNAs.....	25
1.7 Medicina Regenerativa.....	25
Capítulo II. Antecedentes.....	26
2.1 Directos.....	26
2.2 Indirectos.....	28
Capítulo III: Justificación.....	29
Capitulo IV: Hipótesis.....	30

Capítulo V: Objetivos	30
5.1 General.....	30
5.2 Específicos.....	30
Capítulo VI: Estrategia experimental	31
Capítulo VII: Materiales y Métodos.....	32
7.1 Obtención de bacterias <i>E coli DH5α</i>	32
7.2 Acondicionamiento <i>E coli DH5α</i> a calcio-competencia.....	32
7.3 Transformación bacteriana <i>E coli DH5α</i> con plásmidos de expresión MESP1/KLF15.....	33
7.4 Purificación plásmidos.....	33
7.5 Cuantificación, pureza e integridad ADN plasmídico.....	33
7.6 Caracterización de los vectores plasmídicos de expresión MESP1/KLF15.....	34
7.7 Caracterización de células madre mesenquimales de ratón (mMSCs) derivadas de medula ósea.....	35
7.8 Condiciones de cultivo de mMSCs.....	35
7.9 Transfección de células mMSCs con plásmidos MESP1/KLF15.....	36
7.10 Inducción de la diferenciación de mMSCs por medio de la formación de esferoides.....	36
7.11 Diferenciación de mMSCs.....	38
7.12 Extracción de RNA total.....	38
7.13 Síntesis de cDNA.....	38
7.14 RTqPCR.....	38
7.15 Electroforesis en gel de agarosa	40
7.16 Inmunohistoquímica.....	40
7.17 Obtención de células cardíacas.....	40

Capítulo VIII. Resultados.....	41
8.1 Establecimiento y caracterización del sistema de expresión plasmídico.....	41
8.2 Establecimiento de las condiciones de cultivo de mMSCs	45
8.3 Estandarización del ensayo de transfección.....	46
8.4 Ensayo de viabilidad para la determinación de la eficiencia de transfección con el agente de selección Hygromicina.....	56
8.5 Establecimiento de condiciones para la diferenciación cardíaca por medio de la formación de esferoides con la metodología de Hanging drops.....	58
8.6 Validación de los biomarcadores de pluripotencia de mMSCs.....	59
8.7 Obtención de controles de expresión cardíaca.....	60
8.8 Validación de biomarcadores de desarrollo cardíaco por PCR punto final y tiempo real.	62
8.9 Diferenciación de mMSCs a cardiomiocitos mediante la sobreexpresión de factores de transcripción y el cultivo de esferoides.....	64
8.10 Resultados de la expresión de biomarcadores cardíacos por qPCR para la validación del proceso de diferenciación.....	67
Capítulo IX. Discusión.....	69
Capítulo X. Conclusión... ..	72
Capitulo XI. Perspectivas.....	72
Capitulo XII. Referencias Bibliográficas	72

Resumen

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A CARDIOMIOCITOS MEDIANTE LA SOBREENEXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN MESP1 Y KLF15.

Méd. Pablo Alfonso Carriquiry Chequer.

Introducción: La insuficiencia cardíaca secundaria a lesiones isquémicas constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Debido a la pobre capacidad que tiene el corazón de reemplazar el tejido lesionado se generan secuelas fibróticas y como resultado pierde su contractilidad y con ello su función de bomba. En la actualidad se han diseñado diversas estrategias para la diferenciación de células pluripotentes hacia células progenitoras cardíacas con la intención de restablecer la anatomía lesionada y con ello mejorar la función vital del órgano. **Objetivos:** Evaluar la diferenciación cardíaca obtenida tras la sobreexpresión de los factores de transcripción MESP1 y KLF15 en una línea de células madre mesenquimales de ratón (mMSCs) obtenidas a partir de un aspirado de médula ósea. **Materiales y métodos:** Los grupos experimentales fueron generados mediante la transfección de la línea celular con diferentes combinaciones de plásmidos que contienen las secuencias de interés de los factores de transcripción MESP1 y KLF15. Posterior a la transfección las mMSCs se inducen a la diferenciación cardíaca por medio del cultivo tridimensional de esferoides y habiendo transcurrido 3 días de crecimiento en suspensión se cultivan en adherencia para ser evaluadas a los 6, 8 y 10 días. El grado de diferenciación hacia cardiomiocitos fue evaluado por la expresión de los biomarcadores cardíacos: GATA4, MEF2C, TBX5 y NKX2.5, por medio de PCR en tiempo real (qPCR). El análisis estadístico se realizó mediante el cálculo de la expresión relativa por el método de $\Delta\Delta CT$ utilizando como gen endógeno a GAPDH. Se compararon los grupos: mMSCs sin transfectar, mMSCs que sobre expresan alguno o ambos de los factores de transcripción (KLF15 y MESP1) contra la expresión basal de los biomarcadores en tejido cardíaco. **Resultados:** El cultivo de esferoides por si solo es capaz de inducir la expresión de biomarcadores de progenitores cardíacos en mMSCs. La sobreexpresión de MESP1 promueve la expresión de los biomarcadores cardíacos GATA4 y NKX2.5. KLF15 promueve activación importante de los genes GATA4, MEF2C, TBX5 y de NKX2.5. El efecto combinatorio, simultáneo y transitorio de MESP1 y KLF15 no parece traer efectos sinérgicos a concentraciones equimolares. **Conclusiones:** KLF15 resulto ser más potente que MESP1 como activador de los genes centrales de diferenciación cardíaca que participan en el desarrollo cardiovascular.

Dra. C Elsa Nancy Garza Treviño

Directora de Tesis

ABREVIATURAS

ADA-SCID: Inmunodeficiencia combinada severa por déficit de adenosina desaminasa
ADN: Ácido desoxirribonucleico
bHLH: basic helix-loop-helix
BME: Beta-mercaptoetanol
BMP: Proteína morfogénica de hueso
BrER: Bromuro de etidio
CDKs: Inhibidores de ciclina dependientes de cinasa
ADNc: ADN circular
CE: Células endoteliales
CF: Fibroblastos cardiacos
CM: Cardiomiocitos
Co-Smad: Smad mediadora Común
CPC: Células cardiacas progenitoras
cTnT: Troponina T
DGAT2: Diacilglicerol-acetil-transferasa-2
EB: Cuerpos embrionarios/esferoides
ECM: Matriz extracelular
EMT: Transición epitelio mesenquimal
ESCs: Células madre embrionarias
FBS: Suero Fetal Bovino
FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos-
FHF: Progenitores del campo cardiogénico primario
GATA: Factor de transcripción de dedos de zinc
Gja5: Proteína de unión de huesos conexina 40
HAND1/2: Heart and Neural Crest Derivates Expressed ½
HIF: Factores inducibles por hipoxia
HLA: Antígenos de leucocitarios humanos
HSL: Inhibición de la lipasa sensible a hormonas
IC: Insuficiencia cardiaca
iPSCs: Inducción a pluripotencia de células madre
ISL1: ISL Homeobox 1
I-Smad: Inhibidores Smad
LIF: Factor Inhibición de leucemia
MEC: Matriz extracelular
Medio LB: Medio Luria-Bertani
MEF2: Factor de potenciador de miocitos 2
MEF2C: Myocyte enhancer factor 2c
MESP1: Mesoderm posterior 1
miRNA: microARNs
mMSC: Células madre mesenquimales derivadas de medula ósea de ratón

MSCs: Células madre mesenquimales

MYL-2/MLC2V: Cadena ligera de miosina-2v
NKX2.5: NK2 Homeobox 5
Nppa: Péptido natriurético A
Nrg1: Neuregulina 1
PCR: Reacción en cadena polimerasa
PS: Línea primitiva
qPCR: Reacción en cadena polimerasa cuantitativa
RNA: Ácido ribonucleico
RNAi: Ácido ribonucleico de interferencia
R-Smad: Receptor-regulador
RTqPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa con Transcriptasa Inversa
SCNT-SCs: Transferencia nuclear de células somáticas
SCs: Células madre
SCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular
SHF: Progenitores del campo cardiogénico secundario
siRNA: ARNs pequeños de interferencia
SMCs: Células musculares lisas
TALE: Three-amino-acid-loop-extension
TBX: Factor de transcripción T-box
TERT: Telomerasa transcriptasa inversa
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
 α -HHC-CFP: Proteína fluorescente cian impulsada por cadena pesada de miosina

Lista de Figuras.

Figura 1. Etapas del cardiodesarrollo con sus principales biomarcadores.....	6
Figura 2. Actividad biológica de las MSCs	15
Figura 3 Fuentes de obtención de MSCs, biomarcadores de identidad y tejidos para diferenciación.....	16
Figura 4. Diversos sistemas de entrega de genes.....	20
Figura 5. Técnica de formación de esferoides.....	22
Figura 6. Transdiferenciación de Fibroblastos de piel a CPCs mediante sobreexpresión de los factores ETS2/MESP1.....	28
Figura 7. Estrategia experimental general.....	31
Figura 8. Esquema gráfico del proceso experimental para la obtención de CPCs.....	32
Figura 9. Mapa del plásmido EF1a_ MESP1 y sitios de corte por enzimas de restricción <i>EcoRI</i> ...	34
Figura 10. Mapa del plásmido EF1a_KLF15 y sitios de corte de las enzimas de restricción <i>EcoRI</i> ...	35
Figura 11. Condiciones de cultivo de esferoides.....	37
Figura 12. Cultivos bacterianos	42
Figura 13 Resultado de la purificación del vector de expresión de MESP1	43
Figura 14 Resultado de la purificación del vector de expresión de KLF15	43
Figura 15. Electroforesis de los productos plasmídicos purificados por diversos métodos	44
Figura16. Electroforesis de los productos de la digestión con la enzima de restricción <i>EcoRI</i> para los vectores de KLF15 y MESP1.....	45
Figura 17 Microscopia óptica del cultivo de mMSCs en condiciones estándar	46
Figura 18 Cuantificación de ADN plasmídico control interno pTRACER.	47
Figura 19. Cuantificación del ARN obtenido post transfección control negativo sin vector.....	48

Figura 20 Cuantificación del ARN obtenido para la condición 1 µg vector pTRACER.....	48
Figura 21. Cuantificación del ARN obtenido para la condición 2.5 µg vector pTRACER.....	49
Figura.22 Microscopia de fluorescencia 48 h post transfección del control interno pTRACER.....	49
Figura 23 Cuantificación de ARN de mMSCs	50
Figura 24. Electroforesis de productos de PCR y material genómico.....	51
Figura 25. Cuantificación de ARN obtenido 24 horas post transfección del plásmido MESP1	52
Figura 26. Cuantificación del ARN obtenido 48 horas post transfección del plásmido MESP1	52
Figura 27. Cuantificación del ARN obtenido 72 horas post transfección del plásmido MESP1	53
Figura 28 Cuantificación de ADNc	53
Figura 29. Resultados de expresión de MESP1 en mMSCs a las 24, 48, 72 horas post transfección.....	54
Figura 30. Resultados de expresión de KLF15 en mMSCs a las 24, 48, 72 horas post transfección.....	55
Figura 31. Resultados de la expresión basal de MESP1 y KLF15 en mMSCs.....	55
Figura 32. Ensayo de viabilidad CellTiter-Glo®.....	57
Figura 33. Gráfico de % de viabilidad celular.....	57
Figura 34. Generación de esferoides	58
Figura 35. Microscopia óptica de esferoides.....	59
Figura 36. Validación de biomarcadores de pluripotencia y del gen endógeno en mMSCs.....	60
Figura 37. Obtención de controles internos de diferenciación	61
Figura 38. RNA obtenido de muestras de corazón	61
Figura 39. Productos de amplificación de genes endógenos y de diferenciación cardíaca.....	63
Figura 40. Resultados del panel de los biomarcadores de diferenciación cardíaca.....	64
Figura 41. Protocolo de diferenciación de mMSCs a CPC.....	65
Figura 42. Validación del proceso de diferenciación.....	67

Lista de Tablas

Tabla 1. Escala de valoración funcional de la NHYA.....	12
Tabla 2. Lista de cebadores.....	39

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardíacas representan uno de los principales problemas de salud pública en la actualidad. Con una prevalencia estimada de 37.7 millones de afectados globalmente (Ziaeeian & Fonarow, 2016). Se sitúa como la primera causa de muerte en el mundo. El estimado de defunciones anuales es de 17 millones de individuos globalmente, las cuales son atribuibles principalmente a causa de insuficiencia cardíaca, la cuál es condicionada por cardiopatías hipertróficas, así como lesiones isquémicas y valvulares (Valente Echeverri-Rico et al., 2014). Los factores de riesgo fuertemente asociados a la aparición de enfermedades cardiovasculares son la diabetes, el tabaquismo, alcoholismo, obesidad y sedentarismo (Timmis et al., 2020).

En cuanto a células, el 30% del tejido cardíaco corresponde a cardiomiocitos (CM), mientras que el 70% restante a células endoteliales (CE), células musculares lisas (SMCs), fibroblastos cardíacos (CF), células inmunitarias y células progenitoras cardíacas (CPCs). Los CM representan la unidad encargada de la contracción por tal motivo son células metabólicamente muy activas, mientras que las CE y CF se encargan de regular la homeostasis mediante cambios en la matriz extracelular y de promover angiogénesis. Las CE y SMCs se encargan de la regulación del flujo sanguíneo y del transporte a través de la barrera endotelial en conjunto con pericitos (Roacho-Pérez et al., 2022).

Dichas células se encuentran embebidas dentro de una matriz extracelular, la cual brinda soporte al andamiaje celular, está compuesta por una variedad de proteínas de colágeno y laminina. Además del soporte estructural, la matriz extracelular permite la transducción de señales que permite el adecuado funcionamiento del microambiente y la supervivencia de las células (Frangogiannis, 2017).

La matriz extracelular (ECM) produce cambios en su composición que pueden perturbar la función sistólica o diastólica. Ejemplos de condiciones que modifican la ECM son la sobrecarga de volumen, lesiones isquémicas, infecciones o respuestas inflamatorias. La gran mayoría de procesos patológicos conllevan cambios en la ECM.

La ECM normal comprende principalmente fibras de colágeno que se interconectan en 3 niveles: el endomisio que envuelve a los CM individualmente, el perimisio que engloba fascículos principales y el epimisio que envuelve completamente al músculo cardíaco. Adicional a las fibras de colágeno, la ECM contiene fibronectina, glucosaminoglicanos y proteoglicanos, así como también sirve como reservorio para factores de crecimiento y proteasas, que se almacenan en la ECM de forma normal y que pueden activarse tras una lesión (Frangogiannis, 2017).

1.1 Desarrollo embrionario

El corazón es el primer órgano que se forma después de la gastrulación a partir de la especificación o diferenciación del mesendodermo temprano hacia células cardíacas progenitoras (CPCs) que se van especializando para dar lugar a cada uno de los diferentes tejidos que comprenden el sistema cardiovascular.

Esto se logra gracias a complejas redes de señalización que regulan la especificación del mesodermo temprano el día E.5 aproximadamente. La inducción del mesodermo inicia con la señal NODAL, que se expresa en la línea primitiva, lugar donde las células del epiblasto comienzan a entrar en el embrión y éstas se diferencian en las tres capas germinales embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. La vía de señalización NODAL mantiene la expresión de BMP4 en la región proximal del epiblasto. BMP4 actúa induciendo la expresión de Wnt3. Alrededor del día E5.5 los inhibidores de NODAL *Lefty1* y *Cer1* y el inhibidor de la vía Wnt *DKK1* migran hacia el mesodermo visceral anterior restringiendo la expresión de NODAL y Wnt únicamente al epiblasto posterior. Esta señal de NODAL + Wnt en el epiblasto posterior induce la expresión de los factores transcripción T y Eomes. Estos genes que expresan los factores de transcripción T (*brachyury*) y Eomes son esenciales para la migración del mesodermo y la especificación del endodermo definitivo durante la gastrulación ya que están involucrados en el proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT) (Costello et al., 2011)(Parikh et al., 2015).

La expresión de *Eomes* dentro de la estría primitiva marca el mesodermo cardíaco más temprano y promueve la formación de progenitores cardiovasculares mediante la activación directa río arriba de *MESP1*, conocido como el gen regulador del programa cardiovascular (Bondue et al., 2008; Sun & Kontaridis, 2018). *MESP1* dirige la diferenciación cardíaca mediante la inhibición de la señalización de Wnt vía *DKK1* de forma bifásica. La expresión de *Eomes* es regulada por la señalización canónica de la vía Wnt/ β -catenina, se induce y aumenta en la línea primitiva anterior, dando lugar al endodermo definitivo y al mesodermo cardíaco (Sun & Kontaridis, 2018). *MESP1* entonces aparece como el primer marcador de linaje cardiovascular durante el proceso de gastrulación en el día E5.75. La expresión temprana de *MESP1* *In vivo* dirige río abajo la expresión de diversos factores de transcripción (TBX5, NKX2.5, MEF2C, GATA4, HAND2, MyocD, Isl1 y Foxh1) con la cual se obtienen los primeros campos cardíacos (Chiapparò et al., 2016; Bondue and Blandpain 2010).

En el ratón, los progenitores del campo cardiogénico primario (FHF por sus siglas en inglés) son los primeros en llegar a la placa anterolateral tras la migración de las células mesodérmicas. Éstos reciben señales de BMP2, FGF8 y Wnt no canónico del endodermo subyacente para promover su diferenciación y activar TBX5. A su vez, TBX5 interactúa con GATA4 y NKX2.5 para impulsar el desarrollo del músculo cardíaco y la especificación del ventrículo izquierdo a través de la inducción de varios genes cardíacos integrales, incluyendo el péptido natriurético A (Nppa) y la proteína de unión de huesos conexina 40 (Gja5) (Bondue et al., 2008; Sun & Kontaridis, 2018). GATA4 y NKX2.5 reprimen el programa hemangiogénico, regulando al mismo tiempo los genes específicos del corazón que incluyen HAND1, MEF2C y la cadena ligera de miosina-2v (MYL-2, también conocida como MLC2V), todos ellos componentes de la maquinaria necesaria para la estructura y la función normal de los cardiomiocitos (Sun & Kontaridis, 2018).

Las principales familias de factores que se han encontrado que intervienen en este proceso y su desarrollo han sido genes homeóticos (NKX2.5, PITX2 e IRX4), GATA, bHLH, y MEF2C (Diego Franco et al., 2002). Dentro de los genes homeóticos,

NKX2.5 se expresa en las crestas precordíacas; PITX2 se expresa en cresta precordíacas izquierda, pero no en la derecha, siendo así, el primer signo de asimetría molecular durante el desarrollo cardíaco e IRX4 tiene una expresión restringida a la región anterior de las crestas (Diego Franco et al., 2002).

Los miembros de la familia GATA (GATA4,5 y 6) se expresan homogéneamente en las crestas precordíacas y desempeñan un papel primordial en la especificación miocárdica. GATA4 es imprescindible en los primeros estadios de gestación dado que su ausencia revierte la formación de cardia bífida (Diego Franco et al., 2002), regula la expresión miocárdica y se requiere para la fusión de los tubos del corazón. Además, esta familia interactúa con otros miembros de la familia NKX para promover la diferenciación de células cardíacas como cardiomiocitos, células del músculo liso y endodermo.

La familia de factores de transcripción bHLH (*basic helix-loop-helix*) incluye factores de transcripción específicos de musculatura estriada. MyoD, Myf5 y Mrf-4 regulan la expresión en la musculatura esquelética; dHAND y eHAND se expresan en el corazón embrionario y desempeñan un papel en la morfogénesis cardíaca (Diego Franco et al., 2002). Por otra parte, MEF2C (del inglés *myocyte enhancer factor 2c*) se expresa en la cresta precordíacas de forma homogénea durante los primeros estadios del desarrollo cardíaco. (Diego Franco et al., 2002) (Sun & Kontaridis, 2018).

Dentro de las vías de señalización se incluyen factores de la familia TGF β , proteínas morfogénicas de hueso (BMP), miembros de la familia del sitio de integración de MMTV como el WNT3A y factores de crecimiento de fibroblastos (FGF). La regulación de las vías de señalización de los factores de transcripción incluye el factor de transcripción T-box (TBX), MESP1 (del inglés, *Mesoderm posterior 1*), HAND1/2 (del inglés, *Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 1/2*), NKX2.5 (NK2 *Homeobox 5*), GATA (factor de transcripción de dedos de zinc), ISL1 (ISL *Homeobox 1*), MEF2C (Sun & Kontaridis, 2018). ISL1 activa el FGF y la BMP, vías génicas que modulan la proliferación y diferenciación de las células progenitoras cardíacas. Junto con GATA4, ISL1 activa MEF2C para inducir la expresión de

HAND2, un factor de transcripción importante para el desarrollo del ventrículo derecho. A medida que los progenitores del SHF continúan diferenciándose, se induce NKX2.5, reprimiendo ISL1 y haciendo que las células progenitoras pasen de un estado de proliferación a uno de diferenciación. Es importante destacar que la represión directa de ISL1 por NKX2.5 es necesaria para el desarrollo de los cardiomiocitos ventriculares (Cai et al., 2003; Sun & Kontaridis, 2018).

Los progenitores del campo cardiogénico secundario (SHF por sus siglas en inglés) están marcados por la expresión de ISL1 (Cai et al., 2003) y dan lugar al ventrículo derecho, el septo, a los tractos de salida y a una parte de las aurículas. Éstos reciben señales del FGF, la vía *Sonic-hedgehog* y de la WNT/ β -catenina canónica para promover la proliferación y la diferenciación multilineal. Los progenitores del SHF contribuyen al crecimiento del tubo cardíaco y forman los tractos de entrada y salida, migrando y diferenciándose finalmente en cardiomiocitos, células endoteliales y células musculares lisas (Sun & Kontaridis, 2018).

La señalización de las BMP es fundamental para una diferenciación cardíaca eficiente debido a que es capaz de dirigir la diferenciación extraembrionaria y la formación de otros órganos mesodérmicos. La transducción de señal involucra subconjuntos de ligandos de la superfamilia TGF- β (BMP2, BMP4 y BMP5-8) que se unen a receptores específicos de la superficie celular que conducen a la activación de Smad-1, -5 y -8, que a menudo forman complejos con Smad-4 para la translocación nuclear y la actividad transcripcional. Las señales BMP y TGF β son necesarias para la transición epitelial-mesenquimal (EMT) y la formación de la línea primitiva y posteriormente para la diferenciación cardíaca del mesodermo posterior (Parikh et al., 2015).

La familia de proteínas Smad se divide en tres grupos (Duan et al., 2017):

1. Receptor-regulador (R-Smad): Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, and Smad8 (también conocida como Smad9). Están en citoplasma.
2. Smad mediadora Común (Co-Smad): Smad4. Están en citoplasma y núcleo.
3. Inhibidores Smad (I-Smads): Smad6 y Smad7. Están en el núcleo.

Las Smads transducen las señales extracelulares de los ligandos del TGF- β al núcleo, donde activan la transcripción de los genes posteriores. TGF- β 1 está involucrado en el remodelamiento ventricular al promover la fibrosis miocárdica (Zhao et al., 2015, Edgley et al., 2012, Khan et al., 2016) y mediar la apoptosis de los cardiomiocitos (Schneiders et al., 2005) o la hipertrofia cardíaca (Huntgeburth et al., 2011). También se ha reportado que Smad1 se une a la proteína canónica Wnt *Disheveled*, inhibiendo la señalización Wnt/ β -catenina en las células madre mesenquimales (Parikh et al., 2015).

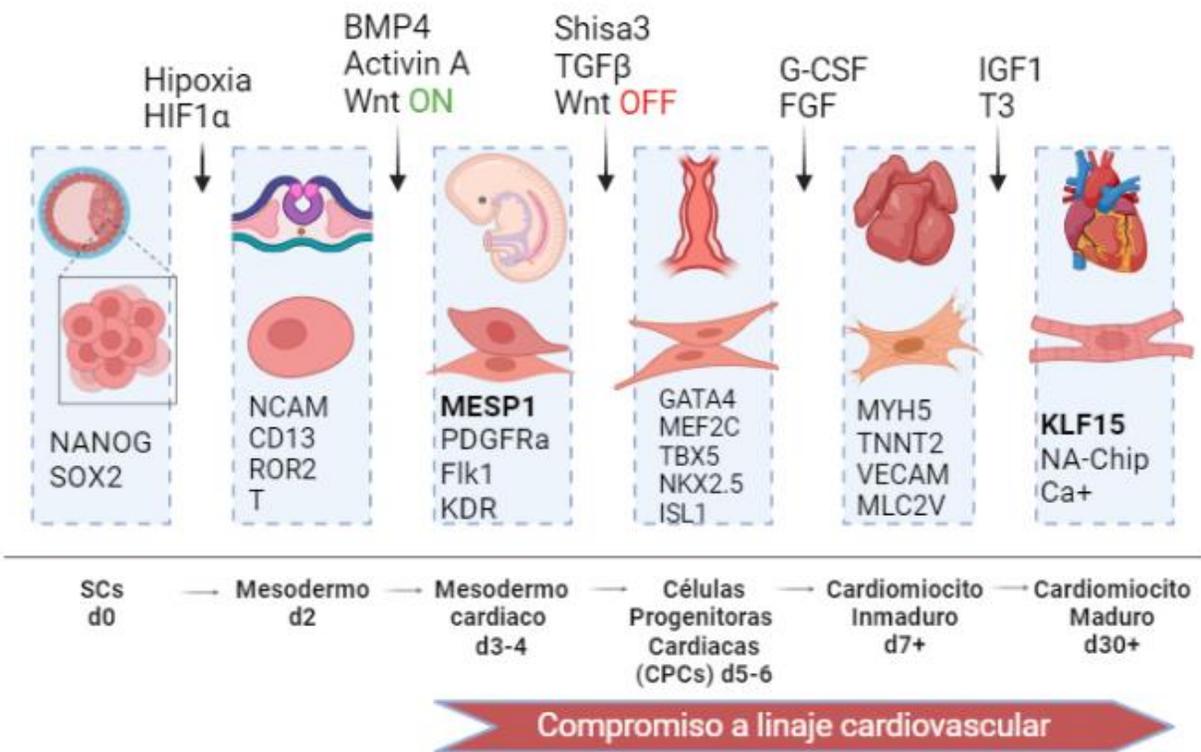


Figura 1. Etapas del cardiodesarrollo con sus principales biomarcadores.

(Modificado de *Burridge et al., 2017*)

1.1.1 Mesoderm posterior 1

MESP1 es un factor de transcripción de tipo hélice-loop-hélice (bHLH), participa como regulador transcripcional de la especificación de progenitores cardiovasculares. Se encuentra en la parte más alta de la jerarquía transcripcional durante el desarrollo embrionario y la diferenciación de células madre embrionarias. Representa el primer marcador de progeie cardiovascular apareciendo aproximadamente al día E5.75. Se expresa en el mesodermo naciente en el escenario de la gastrulación (E.5), específicamente en las células que migran desde la línea primitiva (PS) hacia el mesodermo posterior, la razón de su nombre (Bondué & Blanpain, 2010; BurrIDGE et al., 2012; den Hartogh et al., 2016).

Experimentos de rastreo de linajes permitieron la demostración definitiva que las células MESP1+ dan lugar al sistema cardiovascular. Utilizando un sistema de recombinasa CRE asociado a un reportero de LacZ pudieron demostrar mediante la tinción con B-gal que las células derivadas del linaje de MESP1 corresponden al corazón, aorta dorsal, vasos craneales e intervertebrales y al amnios que se encuentra contiguo al intestino anterior. Células teñidas B-gal positivas estuvieron presentes en todos los linajes cardiacos que incluyen al miocardio, endocardio, epicardio y sistema de conducción (Y. Liu et al., 2016).

1.1.2 Krüppel-Like Factor 15

El factor de transcripción KLF15 es uno de los 17 miembros de la familia de factores de transcripción denominados *Krüppel-Like Factors*, que contienen dominios conservados de dedos de zinc, con lo tienen la capacidad de interactuar con la mayoría de las biomoléculas. Estos factores se expresan en múltiples órganos y actúan regulando diversos procesos celulares como crecimiento, desarrollo, diferenciación y embriogénesis (Zhao et al., 2019). KLF15 ha demostrado tener actividad en riñones, hígado, pulmones y corazón. Particularmente en el corazón adulto su participación es esencial ya que se encarga de mantener la función normal del órgano regulando la proliferación celular y la hipertrofia mediante la supresión de la vía corazón-específica de Wnt/ β -catenina, relacionada a procesos de

reprogramación de cardiomiocitos y remodelado de la pared miocárdica, que de no ser suprimida condiciona fenotipos patológicos de hipertrofia cardiaca (Noack et al., 2019).

Se ha reportado que mediante el silenciamiento de KLF15 en células madre embrionarias se obtienen células con capacidad de diferenciación hacia las 3 líneas germinales con una observada tendencia para la derivación mesodérmica hacia células endoteliales más que a cardiomiocitos (Noack et al., 2017). KLF15 recluta a la enzima remodeladora de cromatina p300, la cual tiene actividad inhibitoria sobre dos genes responsables de la proliferación miocárdica, la proteína de unión a caja GATA 4 (GATA4) y el factor potenciador de miocitos 2 (MEF2) actuando como reguladores negativos de la proliferación celular en situaciones de sobrecarga miocárdica (Zhao et al., 2019). Más recientemente se demostró que KLF15 suprime otra vía recién descrita denominada *Shisa3* que participa en la proliferación tisular posterior al daño inflamatorio, la cual también está involucrada en la diferenciación del endotelio en el periodo fetal (Noack et al., 2017; Noack, et al., 2019; Yester & Kühn, 2017).

Adicionalmente a su participación en la regulación de la proliferación celular, KLF15 también juega un papel importante en la regulación de genes que codifican enzimas para las diversas vías metabólicas. KLF15 promueve la movilización de reservas energéticas activando la vía lipogénica en el tejido adiposo para la síntesis de triglicéridos en situaciones de ayuno, regulando la actividad de *diacilglicerol-acetiltransferasa-2* (DGAT2) mediante la inhibición de la lipasa sensible a hormonas (HSL). También inhibe la lipasa de triglicéridos mediante el aumento en la expresión del gen *G0S2*, que funciona como interruptor de cambio de fase del ciclo celular G0/G1 (Zhao et al., 2019). Además, KLF15 funciona como regulador de la ritmicidad circadiana del miocardio al regular la repolarización mediante el control de la expresión de canales iónicos de sodio KChIP2. Tanto la deficiencia como el exceso de estimulación por Klf15 puede causar variaciones en la duración del segmento QT y condicionar una predisposición hacia arritmias ventriculares o generar la aparición de repolarizaciones aberrantes según lo reportado en corazones de ratones neonatales (Yuping et al., 2018; Zhao et al., 2019).

1.2 Malformaciones cardiacas

Las malformaciones cardiacas congénitas son las malformaciones que se presentan más frecuentemente en el nacimiento. Se han descrito algunas vías señalizadoras extrínsecas que regulan la diferenciación y la migración durante la embriogénesis, como es el caso de la vía de Wnt, FGF y BMP; sin embargo, muchos de los mecanismos intrínsecos que regulan la migración y los vínculos entre las subpoblaciones tisulares aún permanecen pendientes por elucidar. (Kosovsky, 2013)

La inactivación de MESP1^{-/-} produce malformaciones cardiacas severas conocidas como "cardia bífida", llevando a la letalidad embrionica alrededor del día E10.5 a causa de una falta de fusión de las células mesodérmicas que conforman los campos cardiacos. En la ausencia de MESP1, su homólogo más cercano MESP2 es capaz de compensar por la pérdida de MESP1 mostrando signos de diferenciación miocárdica y endocárdica. MESP2 se encuentra localizado en el mismo cromosoma separado por 23 Kb. La expresión de MESP2 se da principalmente en la región presomítica alrededor del día E8.5. La inactivación por *Knockout* de MESP2 no genera malformaciones cardiacas sino defectos severos en la somitogénesis y la segmentación, dicha condición puede ser revertida insertando 4 copias de MESP1 en el locus de MESP2 lo que demuestra un traslape funcional entre estos dos genes durante el desarrollo embrionario. La inactivación de MESP1 y MESP2 simultánea induce defectos profundos en la gastrulación, llevando a la letalidad embrionaria alrededor del día E9.5, interesantemente, se forma la línea primitiva, pero las células mesodérmicas no migran fuera de la línea primitiva. (Bondue et al., 2010)

Es por esto que las características de pluripotencialidad de las células embrionarias las convierte en un estándar de oro para el estudio de los procesos de diferenciación, ya que permite analizar objetivamente la extensa red conservada de factores de crecimiento regulados por múltiples cascadas de señalización (Kosovsky, 2013). Sin embargo, debido a que la obtención y manipulación de

células embrionarias humanas trae consigo cuestionamientos éticos y morales, en algunos países la investigación con células embrionarias se encuentra regulada (Lo & Parham, 2009).

1.3 Mecanismos de reparación posteriores al daño cardíaco

Posterior a una lesión isquémica se produce una pérdida de CM, así como la formación de una cicatriz causada por la activación de CF que eventualmente generan fibrosis y disfunción ventricular llevando hacia la insuficiencia cardiaca (IC) (Riching & Song, 2021). El corazón de los mamíferos, a diferencia de los anfibios, carece de capacidades regenerativas que puedan revertir la cicatriz fibrosa y restablecer la población de CM y con ello la función cardiaca. Los mecanismos intrínsecos de estas diferencias no se encuentran claramente elucidadas. (de Bakker et al., 2021). En peces cebra se observó que el factor de transcripción Prrx1b promueve la actividad de la Neuregulina 1 (Nrg1) la cuál actúa como un potente mitógeno que activa la proliferación de CMs (Gemberling et al., 2015).

El tejido cardiaco adulto de los mamíferos posee mínimas capacidades regenerativas debido a la baja reserva poblacional de células cardíacas progenitoras (CPCs), y en gran parte también a la nula capacidad proliferativa de las células musculares cardíacas terminalmente diferenciadas (Locatelli et al., 2018).

En respuesta a una lesión o sobrecarga, los CM comúnmente reinician la síntesis de ADN sin realizar división celular, causando un crecimiento hipertrófico principalmente a causa de una ineficiente citocinesis y a un bloqueo en la progresión del ciclo celular, teniendo que adaptar diferentes grados de poliploidía para el mantenimiento de las funciones metabólicas y celulares (Laflamme & Murry, 2014).

Todas estas condiciones mantienen a los CM en un estado de diferenciación terminal, la cual se caracteriza por la expresión del gen regulador del ciclo celular Meis1, que mantiene al CM en un estado quiescente o de arresto celular. Este gen codifica un factor de transcripción tipo ‘‘TALE; (*Three-amino-acid-loop-extension*)’’ que regula las proteínas del ciclo celular p15, p16 y p21, todas éstas pertenecientes

a la familia Cip/Kip de Inhibidores de ciclina dependientes de cinasa (CDKIs), que regulan las fases de progresión del ciclo celular G1/S y G2/M. La proteína p21 muestra niveles detectables durante en el desarrollo fetal pero su expresión aumenta dramáticamente en el periodo posnatal y posterior a una lesión isquémica. La delección de Meis1 en roedores extiende el periodo posnatal de proliferación de CM. El silenciamiento de Meis1 permite a los CM pasar por un estado de desdiferenciación y reentrada en el ciclo celular (Hesham A. & Ahmed I., 2013).

Se sabe que el estado proliferativo de los CM humanos disminuye drásticamente después del nacimiento, pero un recambio de CM permanece activo a lo largo de la vida, mostrando una tasa de recambio del 1% de CM a los 25 años, con un decremento de 0.45% del recambio a los 75 años (Heart et al., 2015). Esta información sugiere que menos del 50% de los CM serán recambiados durante la vida y más del 55% consisten en CM persistentes del nacimiento (Bergmann et al., 2009).

Adicionalmente, pese a la variabilidad que pudiera existir en la tasa de recambio de CMs del adulto, sigue siendo insuficiente para ejercer un desenlace funcionalmente favorable fuera del periodo posnatal temprano. Diversas observaciones realizadas durante el periodo posnatal temprano en roedores indican un aumento en la metilación global de muestras de tejido cardiaco obtenidas a diferentes tiempos, coincidiendo con el aumento en procesos de binucleación y disminución de la tasa de proliferación de los CM, lo que sugiere que se pudieran estar llevando a cabo procesos de señalización epigenética que regulan la proliferación y diferenciación de CM (Locatelli et al., 2018; Riching & Song, 2021).

1.4 Insuficiencia Cardíaca

La insuficiencia cardiaca (IC) es la principal complicación de las enfermedades cardiovasculares. Se define como una alteración en la estructura o función del corazón cuyo desenlace es la incapacidad de éste para proporcionar una adecuada perfusión orgánica. (Valente Echeverri-Rico et al., 2014). La disfunción orgánica

puede ser de dos tipos, sistólica o diastólica; en la sistólica existe una disminución de la fracción de eyección por efecto de hipertrofia miocárdica y subsecuente disminución de los tamaños cavitarios; en contraste, la disfunción diastólica se presenta con trastornos en la relajación transitoria de las paredes miocárdicas y con aumentos de presión intracavitarios debido a cambios fibróticos. Ambas disfunciones pueden coexistir generando un mayor deterioro en el grado funcional, el cual hace referencia a las diferentes etapas clínicas de la historia natural de la enfermedad y condicionando un peor pronóstico conforme se avanza en la estratificación funcional. Las clasificaciones más comúnmente usadas son la NYHA y la ACC/AHA (Ommen et al., 2020).

Tabla 1. Escala de Valoración funcional de la Asociación del Corazón de Nueva York
(*New York Heart Association*)

Clase	Escala de Valoración funcional NYHA
I	Sin limitación de la actividad física. La actividad ordinaria no ocasiona excesiva fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso.
II	Ligera limitación de la actividad física. Asintomáticos en reposo. La actividad ordinaria ocasiona fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso.
III	Marcada limitación de la actividad física. Únicamente asintomáticos en reposo. Actividad física menor que la ordinaria ocasiona fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso.
IV	Incapacidad para llevar a cabo cualquier actividad física sin disconfort. Los síntomas de insuficiencia cardíaca o de síndrome anginoso pueden estar presentes incluso en reposo. Si se realiza cualquier actividad física, el disconfort aumenta.

El diagnóstico de IC suele ser realizado por el médico de atención primaria, éste consiste en la aparición clínica de un síndrome que incluye signos y síntomas de disfunción cardíaca y que requiere de exámenes paraclínicos complementarios y/o pruebas terapéuticas para poder ser realizado. Habitualmente la IC suele ser una condición crónica en la cual surgen episodios de descompensación que requieren

visitas al médico u hospitalización. Sin embargo, a menudo es frecuente encontrar dicha entidad en pacientes con pocos signos o síntomas, únicamente presentado aumento de peso o pobre condición física, enfermedad pulmonar o eventos isquémicos; Por esto, se sugiere que la evaluación inicial incluya adicionalmente valoración de las concentraciones de péptido natriurético auricular ya que la elevación de este representa la antesala para el desarrollo de Insuficiencia cardíaca (Mosterd et al., 2007).

1.4.1 Abordajes terapéuticos actuales para la IC

En la actualidad existen pocas opciones terapéuticas para el control de dichas complicaciones quedando limitados al manejo farmacológico paliativo y en muy pocos casos seleccionados la realización de trasplantes de corazón y de asistencia mecánica con ayuda de dispositivos mecánicos de implantación quirúrgica. Sin embargo, la tasa de aplicación es muy baja, cifras actuales reportan 208 trasplantes realizados en todo 2020 para la totalidad de España, el cual representa un número muy inferior al de pacientes afligidos por estas patologías. (González-Vílchez et al., 2021)

El objetivo de las terapias farmacológicas actuales es frenar el deterioro clínico de los pacientes evitando la progresión de la enfermedad y el remodelamiento cardíaco, sin embargo, a largo plazo son ineficientes para revertir la pérdida de tejido cardíaco funcional.

En la actualidad se están desarrollando líneas de investigación en ingeniería de tejidos que emplean diversos tipos de abordajes con la intención de proveer al tejido cardíaco lesionado de nuevas fuentes de materiales biológicos, sintéticos o artificiales que sean capaces de producir interacciones intercelulares y reparación tisular (Roacho-Pérez et al., 2022). Se han realizado diferentes esfuerzos para llevar células madre mesenquimales al tejido cardíaco dañado, dichos abordajes han consistido en la inyección intramiocárdica, la aplicación de dispositivos biomédicos tipo parches y la inyección de células por vía intravascular con la premisa de

asegurar la llegada y la correcta integración de las células madre al tejido lesionado para su reparación (Szydlak, 2019).

1.5 Terapia Celular Cardiovascular

La terapia con células madre o *stem cells* (SCs) representa una de las opciones más prometedoras para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y de las cardiopatías congénitas debido a la capacidad que tienen estas células de diferenciarse a los diferentes tipos de linajes celulares. Se les atribuye también una gran capacidad regenerativa por su acción antiinflamatoria al ser capaces de secretar diversos factores tróficos, integrarse al tejido miocárdico lesionado y diferenciarse en los diferentes componentes del sistema cardiovascular evitando así la cicatriz fibrótica y la remodelación posterior a las lesiones isquémicas (Y. Liu & Schwartz, 2012).

1.5.1 Células madre mesenquimales

En 1970, Friedenstein y colaboradores fueron los primeros en realizar una identificación funcional de células madre no hematopoyéticas derivadas de médula ósea, a las que actualmente se denominan células madre mesenquimales (MSCs). Se han logrado aislar MSCs de prácticamente todos los tejidos, inclusive aquellos en los que se pensaba tenían nula capacidad regenerativa como es el caso de sistema nervioso central, músculo cardíaco y esquelético (**Figura 2**)(Chen, 2019). Thomson y colaboradores aislaron en 1998 las primeras células madre a partir de la masa celular interna del blastocisto en células embrionarias en etapa preimplantacional definiendo a este subtipo de células como células madre embrionarias (ESCs)(Thomson et al., 1998).

Existen 4 métodos de obtener células pluripotentes: mediante el aislamiento de células madre embrionarias (ESCs), aislamiento de células madre mesenquimales (MSCs), mediante la inducción a pluripotencia (iPSCs) (descrita más adelante) y mediante la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT-SCs), ésta última

técnica consiste en la transferencia del material nuclear de una célula somática al interior del núcleo de un ovocito no fecundado en una etapa específica del desarrollo y fue la metodología que permitió la clonación de la oveja Dolly en 1996 . (Eguizabal et al., 2019; Takahashi et al., 2007; Thomson et al., 1998).

Las MSCs han cobrado mucho interés en diferentes áreas de la investigación biomédica debido a su relevancia clínica y actividad biológica (**Figura 3**), ya que son fáciles de obtener, expandir y manipular; También dada su alta capacidad proliferativa y secretora las hace una opción prometedora para su empleo en los campos de la medicina regenerativa. Es por eso importante destacar la importancia de contar con protocolos estrictos de aislamiento y caracterización que permitan asegurar la identidad de estas células y con ello obtener afirmar la reproducibilidad en los resultados publicados.

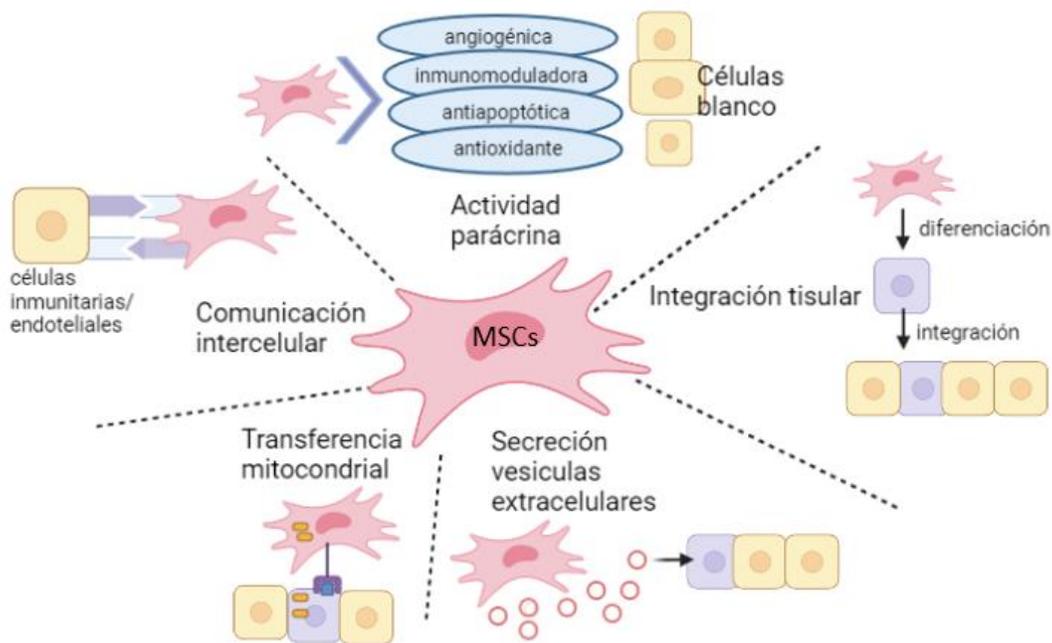


Figura 2. Actividad biológica de las MSCs. (Modificado de *Fan et al 2020*)

En 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (SCT) define a las MSCs con las siguientes características: capacidad de adherencia a poliestireno en condiciones de cultivo celular, contar con la presencia de los marcadores de

superficie estromales (CD105, CD90, CD73) y ausencia de los marcadores de superficie sanguíneos (CD34, CD45), y tener capacidad de diferenciación a cualquiera de las 3 capas germinales (endodermo, mesodermo, ectodermo) (Figura 3) (Chen, 2019; Dominici et al., 2006)

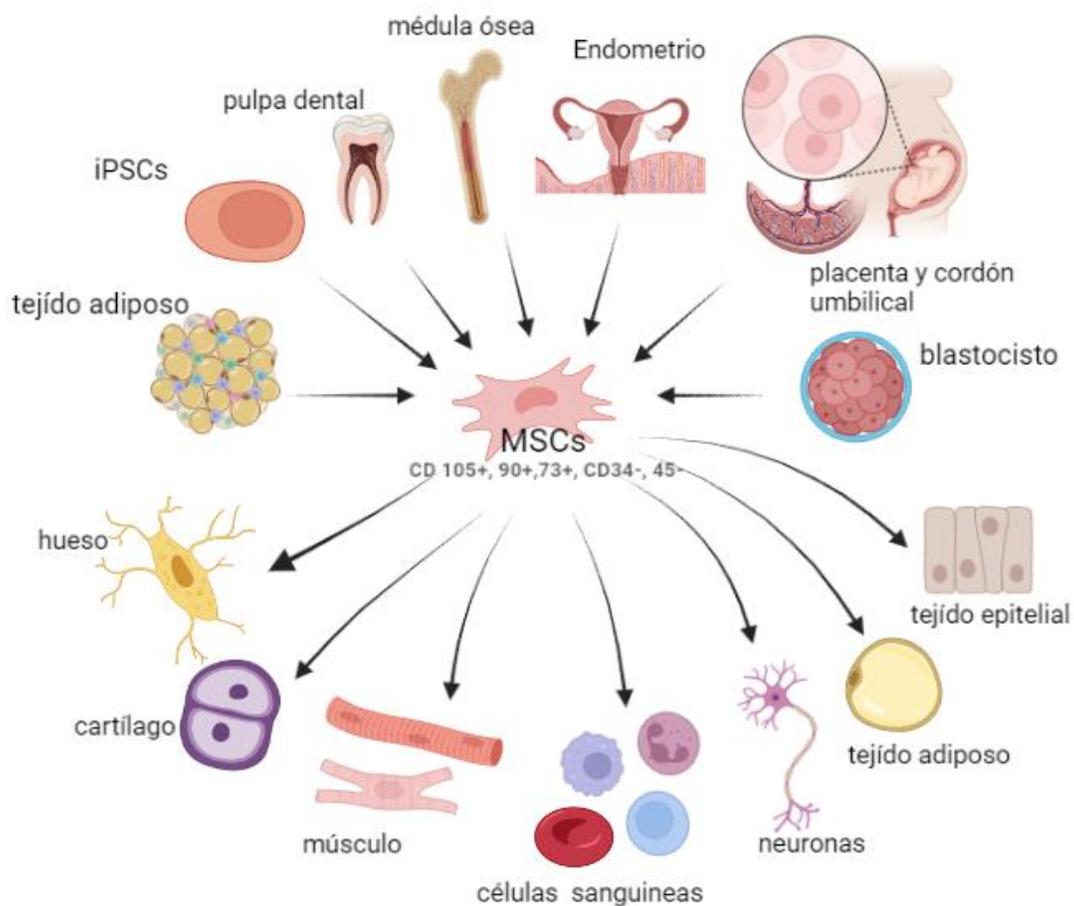


Figura 3. Fuentes de obtención de MSCs, biomarcadores de identidad y tejidos para diferenciación. (modificado de *Fan et al 2020*)

1.5.2 Células progenitoras cardíacas

Recientemente se reportaron poblaciones de células madre residentes del tejido cardíaco adulto con capacidad de inducir la proliferación celular y que muestran una elevada actividad de telomerasa (TERT), expresando marcadores de pluripotencialidad como Sca-1⁺, c-kit, Isl-1, GATA4, TBX5. A éstas poblaciones les

denominaron células cardíacas progenitoras (CPC), la activación de dichas poblaciones de células en el corazón adulto es un atractivo blanco para el desarrollo de terapias que promuevan la reparación (Fu et al., 2018.; Noack et al., 2019; Oh & Schneider, 2009). El mantenimiento y diferenciación de CPCs es regulado a través de la vía de señalización NOTCH vía DAPT, la cual substancialmente incrementa la unión de MEF2C a su blanco génico resultando en diferenciación cardíaca demostrado por el incremento en el flujo intracelular de Ca^{+2} y el número de colonias que presentan latido cardíaco espontáneo. (Abad et al., 2017).

1.6 Estrategias de cultivo *in vitro* para la diferenciación de SCs a cardiomiocitos

1.6.1 Estrategias para la entrega de genes

La terapia génica hace referencia a las técnicas utilizadas para hacer llegar moléculas génicas con actividad biológica a las células del huésped para inducir cambios en la expresión de genes. En la medicina se reservan para patologías que no tienen otra técnica que produzca curación, como lo son enfermedades genéticas mono alélicas, para inactivar o disminuir la expresión de un gen mutado y para la introducción de nuevos genes que protejan de alguna enfermedad. Las moléculas deben ser capaces de llegar al núcleo de la célula para inducir la expresión de genes, producción de proteínas, modulación de procesos patológicos. Para poder ser empleados se requiere una comprensión extensiva y completa de todas las interacciones que se producen entre la célula blanco y el sistema de entrega de genes.

Los sistemas de entregas de genes consisten en tres componentes: un sistema de vector o plásmido que controle la función de un gen dentro de la célula blanco, un gen que codifique para una proteína específica y un sistema que controle la entrega del plásmido o vector a una ubicación específica. Un sistema de entrega de genes eficiente requiere que la molécula añadida permanezca estable dentro del huésped.

Los primeros vectores para la expresión de transgenes reportados fueron de tipo vector viral, en 1984, se utilizó el virus de vaccinia para proteger chimpancés sobre la infección del virus de hepatitis B. Este tipo de sistemas virales se fundamenta en la habilidad del virus para replicar su material genético dentro de la célula huésped y además de prevenir la degradación del ADN exógeno por acción lisosomal. Algunos de los virus comúnmente utilizados como vectores incluyen retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados y virus herpes simple.

El primer paciente que recibe terapia celular con éxito y que demostró expresión persistente a largo plazo se observó en un ensayo clínico realizado en 1990 donde se trató un caso de inmunodeficiencia combinada severa por déficit de adenosina desaminasa (ADA-SCID), donde se utilizó un vector retroviral para la transducción e integración del material genético en linfocitos T de manera *Ex vivo* seguido de un trasplante alogénico. En 2000, Fischer et al, desarrollan una terapia para la inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X utilizando el trasplante autólogo de SCs derivadas de médula ósea modificadas con tecnología retroviral.

Strimbelis et al 2016 reciben la aprobación en Europa para utilizar vectores retrovirales con capacidad integrativa en pacientes con ADA-SCID para los cuales no existan opciones de donadores de SCs por incompatibilidad en los antígenos leucocitarios humanos (HLA) y constituyen la primera terapia celular ex vivo con SCs.

Los vectores de expresión de tipo viral pueden ser de dos tipos: basados en ADN o basados en ARN, los primeros integran sus secuencias en el genoma del huésped, por lo que su expresión permanece por más tiempo (lentivirus, poxvirus, virus adeno-asociados, retrovirus, herpes virus, spumavirus). Los virus basados en ARN se desarrollan por su habilidad de generar transcritos de ARN directamente en el huésped dando como resultado una expresión transitoria y no permanente. Para la terapia oncológica se desarrollan en la actualidad virus oncolíticos que tengan la capacidad de replicarse eficientemente en el huésped y dirigirse hacia las células tumorales y generar apoptosis de estas (**Figura 4**).

Existen también sistemas de entrega de genes o vectores de tipo no viral, éstos se fundamentan en la capacidad de lograr la introducción del material genético a través de las membranas celulares mediante métodos artificiales fisicoquímicos. Este tipo de sistemas poseen la característica de generar mucha menor respuesta inmunitaria en el huésped por utilizar sistemas biocompatibles como vesículas lipídicas (Lipofección), ADN desnudo en forma de cromosomas (plásmidos), microARNs (miRNA) y ARNs pequeños de interferencia (siRNA), polímeros catiónicos y diversos complejos conjugados. Algunos métodos comúnmente utilizados para la entrega de vectores no virales incluyen inyección por aguja, inyección de ADN, sonoporación, fotoporación, magnetofección e hidroporación.

Los vectores no virales generan expresión transitoria, poseen baja inmunogenicidad, pueden ser diseñados para poseer sistemas de regulación que les brinde mayor seguridad y no existe un límite en el tamaño para las secuencias de ADN incluidas en el vector. Idealmente, para la terapia génica deben poseer alta capacidad de carga útil, tropismo específico a tipos celulares **(Figura 4)**.

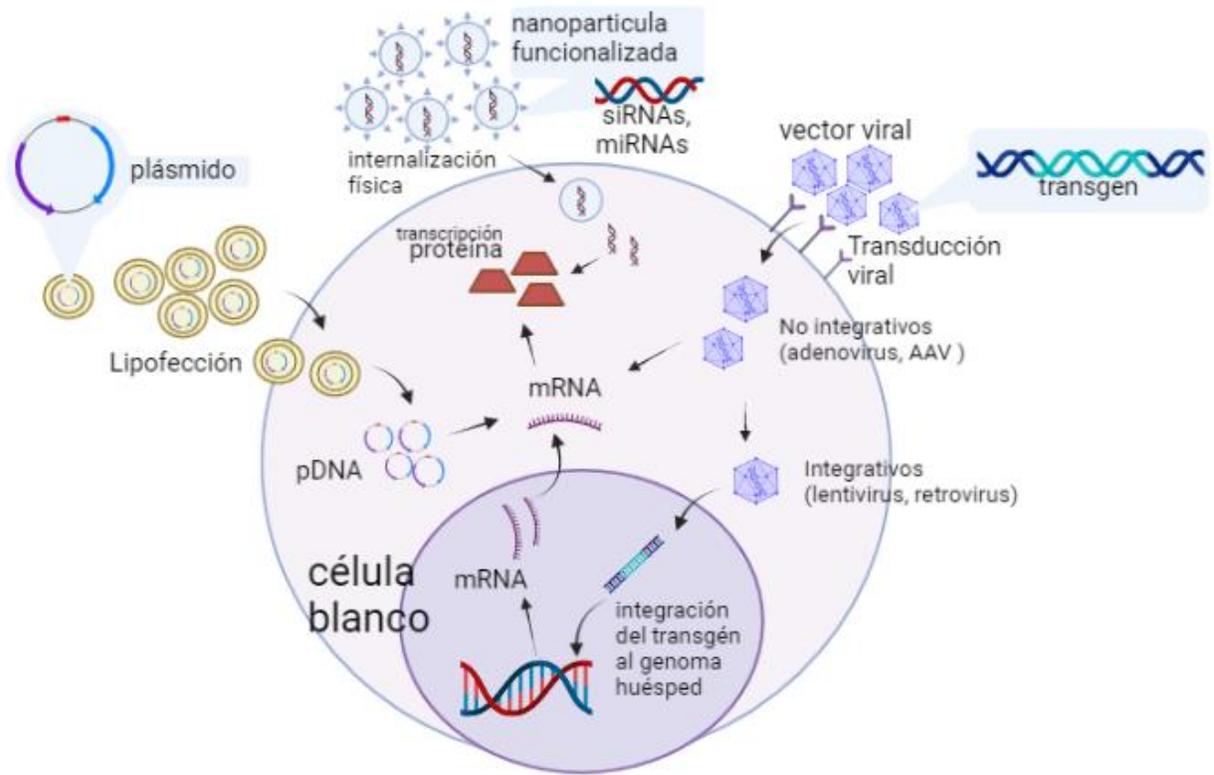


Figura 4. Diversos sistemas de entrega de genes. De izquierda a derecha: Lipofección de plásmidos transportados a través de la membrana por complejos lipídicos; Nanopartículas funcionalizadas internalizadas por endocitosis facilitada por métodos fisicoquímicos (fotoporación, sonoporación, electroporación, magnetofección, etc.); Sistemas virales de transducción génica, internalizados por receptores de membrana, de tipo integrativo y no integrativo.

(Modificado de Athanopoulos et al., 2017.)

1.6.2 Estrategias de Inducción para la diferenciación cardíaca

Previo a la diferenciación es necesario siempre generar la expansión de la línea celular a tratar. Esto se logra manteniendo las células en un estado indiferenciado mediante la adición de diferentes factores inhibidores de la diferenciación, como el caso de la proteína recombinante LIF (Factor inhibidor de leucemia), para células madre embrionarias. De no adicionar LIF al medio de cultivo las células forman agregados tridimensionales y se induce a una diferenciación espontánea. (Wang & Yang, 2008)

Tradicionalmente existen tres tipos de inducción para la diferenciación de células madre (SCs): a través de la formación de cuerpos embrionarios o también llamados esferoides (EB), a través del cultivo celular en presencia de elementos de la matriz extracelular (MEC) nativa, y un tercer método que consiste en el cultivo con la adición de capas de alimentación de células estromales o fibroblastos. (Kosovsky, 2013)

1.6.3 Cultivo tridimensional de esferoides

La formación de cuerpos embrionarios o esferoides se realiza por medio del cultivo de células en suspensión, cultivo en presencia de metilcelulosa o mediante la técnica de *Hanging drops* (gota colgante), este último siendo el más utilizado (Wang & Yang, 2008). La gran mayoría de los métodos descritos están basados en la formación de agregados tridimensionales. Dichas técnicas producen rendimientos variables en los patrones de diferenciación según la combinación de factores y en todos genera pérdidas celulares por efecto de la tripsinización. (Kokkinopoulos et al., 2016)(Mummery et al., 2012a)(Pucéat, 2008)

La heterogeneidad que resulta de producir esferoides o agregados de distintos tamaños puede generar diferentes patrones de diferenciación. De tal forma, en ocasiones es necesario suplementar los esferoides con moléculas bioactivas o factores de transcripción, biomateriales o componentes de la matriz extracelular que potencien la diferenciación. Por ejemplo, la suplementación de colágena-fibronectina promueve la diferenciación hacia células endoteliales mientras que la suplementación con colágena-laminina promueve la diferenciación hacia cardiomiocitos. (Kosovsky, 2013).

La formación de esferoides por *Hanging drops* diferencia hasta un 3% de ESCs a precursores cardiacos de forma espontánea, sin embargo, con la inducción de la diferenciación mediante la sobreexpresión de factores de transcripción durante la formación de esferoides se obtienen porcentajes superiores. (Kokkinopoulos et al., 2016; Lynch et al., 2001). La sobreexpresión de MESP1 durante la formación de esferoides acelera la aparición de áreas con latido cardiaco y promueven la aparición de troponina cardio-específica (cTnT) y otros biomarcadores de

diferenciación cardiaca como KDR+, CD31, Flk1+, PDGFRa+, and CXCR4+ (Chiapparo et al., 2016).

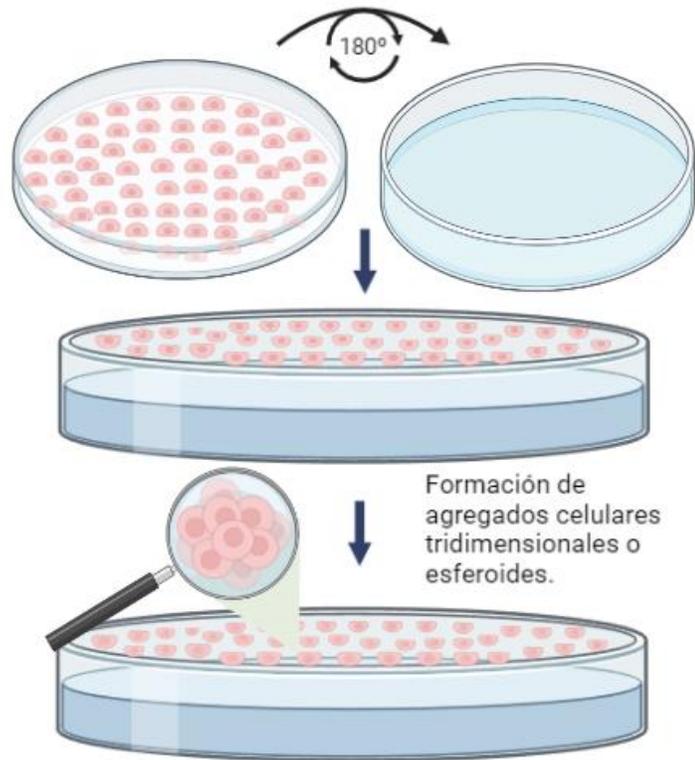


Figura 5. Técnica de formación de esferoides.

A nivel celular, los factores inducibles por hipoxia (HIF) son algunos de los reguladores transcripcionales de la respuesta hipóxica que aparecen tras la formación de agregados tridimensionales. Específicamente HIF-1, HIF-2 y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) juegan un papel importante en la señalización dependiente de hipoxia para el desarrollo de vasos coronarios, estructura y funcionamiento óptimo del corazón. (Medley et al.,2013)

Los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF), como su nombre lo indica, se encargan de censar y generar adaptación a las bajas de concentración de oxígeno tisular. Esta familia de factores está constituida por dos subunidades: la

subunidad alfa funciona como sensor de oxígeno, y la subunidad beta constitutiva se une a cualquiera de las posibles isoformas de HIF alfa (HIF-1alfa, HIF-2alfa, HIF-3alfa, IPAS y NEPAS). Los complejos proteicos de HIF-1 y HIF-2 se expresan constitutivamente en el tejido cardiaco (Medley et al.,2013).

En condiciones normóxicas la vida media de HIF-1alfa es de 5 minutos, en condiciones de hipoxia HIF-1alfa se estabiliza y se transloca al núcleo donde se dimeriza con la subunidad HIF-1beta para activar genes de respuesta hipóxica. Más de 70 genes se han asociado con angiogénesis, inhibición de la apoptosis de CM y cardiogénesis (Medley et al.,2013).

La formación de esferoides por el método de *hanging drops* produce condiciones de hipoxia transitoria, se ha demostrado que miembros de la vía Wnt canónica elevan su expresión al someter células pluripotentes indiferenciadas a estas condiciones y dichos niveles de Wnt regresan a su expresión basal cuando se regresan las condiciones normóxicas. Adicionalmente, tras la exposición a hipoxia, se demostró una marcada reducción de los reguladores negativos del ciclo celular, así como de los inhibidores de la señalización de Wnt, incluyendo la proteína fosfatasa 2 subunidad reguladora a (Ppp2r1a), proteína secretora 4 relacionada a *Frizzle* (Sfrp4). Se demuestra que la hipoxia produce un patrón complejo de alteraciones en la expresión de factores de la vía de señalización Wnt dependientes de la activación de HIF (Medley et al.,2013).

Se ha observado que la mitosis de las células cardiacas se da principalmente en condiciones de hipoxia. Utilizando la histona3 ser10 (Ph3) como marcador de la progresión de la fase G2-M se demostró que la hipoxia promueve la mitosis y la adición de ROS reduce la mitosis sin aumentar la apoptosis lo que indica que las condiciones normóxicas mantienen a los cardiomiocitos en arresto celular (Yester & Kühn 2017).

1.6.4 Reprogramación de CF

Los CF representan una fuente ideal de células para la regeneración cardíaca debido a su relativa abundancia en el tejido. El descubrimiento que estableció un punto de referencia para la reprogramación de células a un estado pluripotente surgió en 2007 de mano de *Yoshida y Yamanaka*, al ser capaces de reprogramar CF a un estado pluripotente mediante la sobreexpresión de 4 factores de transcripción (Sox2, Klf4, C-Myc, Oct3/4) obteniendo células madre inducidas a pluripotencia (iPSCs). Ieda y colaboradores identificaron un set de genes centrales cardiogénicos (GATA4, MEF2C, TBX5) que promueve la expresión de troponina T (cTnT) en CF de ratón. Como hemos visto estos genes centrales son parte de un set conservado evolutivamente relacionados al desarrollo cardíaco (Ieda et al., 2010).

La sobreexpresión de los factores de transcripción centrales "GMT" son suficientes para inducir la expresión de estructuras sarcoméricas en fibroblastos, pero la adición de HAND2 a la combinación mejora significativamente la eficiencia en la reprogramación de CF a CPCs. Estas células en un estado de diferenciación pre-terminal mejoran la funcionalidad al ser implantadas directamente al tejido cardíaco inducido a lesiones isquémicas agudas (Song et al., 2012).

La combinación de butirato de sodio (inhibidor de desacetilasa de histonas) + ICG-001 (inhibidor de Wnt) + ácido retinoico (regulador de crecimiento cardíaco) + sobreexpresión de GMT mejora la generación de poblaciones de CPCs en comparación a la sobreexpresión de los factores GMT por si solos ($23\pm 1.5\%$ vs $3.3\pm 0.2\%$; $P < 0.0001$) (Singh et al., 2020).

Con la sobreexpresión de los genes centrales GMT + MESP1 + MYOCD se obtuvo un incremento en la expresión de cTnT y α -actina del $\sim 5\text{--}6\%$, y aproximadamente el 1% de estas células sobreexpresaron paneles de genes relacionados a la estructura sarcomérica en comparación con los grupos control que únicamente sobreexpresaban GMT y el control negativo que utilizaba vector vacío. (Wada et al., 2013).

1.6.5 Estrategias de diferenciación a CM por silenciamiento de RNAs

Con el advenimiento de las técnicas de silenciamiento por RNAs de interferencia RNAi se ha logrado el desarrollo de estrategias que van encaminadas al silenciamiento o apagado de vías de señalización específicas. La diferenciación celular se da en este caso al dirigir la degradación de RNA mensajero mediante la transfección de secuencias de RNA de interferencia que van dirigidas hacia transcriptos que funcionan como reguladores del ciclo celular. Estas secuencias utilizadas son denominadas microRNA's (**Figura 4**). Al utilizar la combinación de miR-1, miR-133, miR-208 y miR-499 se obtuvo expresión de miosina pesada (α MHC-CFP) en 1.5-7.7% de CF neonatales *In vitro*; la administración directa de ésta misma combinación en tejido miocárdico lesionado de ratón promovió la conversión o transdiferenciación de CF a CM *In situ* (Jayawardena et al., 2012).

La entrega de miR-106b~25 en el corazón de ratón provoca la proliferación de CM ya que actúa sobre una red de reguladores negativos del ciclo celular que incluyen a E2f5, Cdkn1c, Ccne1 and Wee1. Posterior a la lesión isquémica inducida se observó que miR-106b~25 provocó una regeneración casi completa del tejido miocárdico adulto (Raso et al., 2021).

Se ha descubierto que tres diferentes miRNAs son capaces de inhibir post transcripcionalmente al gen antimitótico Meis1, éstos son miR-548c-3p, miR-509-3p y miR-23b-3p; con esto son capaces de inducir la proliferación de CM (Pandey et al., 2017).

1.7 Medicina Regenerativa

Como se puede apreciar, diversos enfoques como la diferenciación de células pluripotentes hacia progenitores cardiacos, la reprogramación de fibroblastos cardiacos, la utilización de andamios biocompatibles en ingeniería de tejidos, así como el silenciamiento de reguladores antimitóticos comienzan a brindar resultados pre-clínicos alentadores en el campo de la regeneración cardiaca con terapia celular. Múltiples retos han de sobrellevarse antes que se traduzca en terapias

novedosas para la regeneración del corazón humano. Actualmente uno de los retos de la medicina regenerativa en la terapia celular cardiaca consiste en lograr la sincronización y el acoplamiento de los procesos electromecánicos entre las células implantadas con aquellas del tejido del huésped (Oh & Schneider, 2009b)(Y. Liu & Schwartz, 2012a).

En términos generales, es importante el mantenimiento de los ciclos celulares para el correcto funcionamiento de las diversas actividades celulares. Existen evidencias que afirman que para una adecuada reprogramación de la identidad es necesario sincronizar la velocidad de los ciclos de replicación; y para la propagación de una identidad a lo largo de las generaciones es necesario que se restauren los patrones de control epigenético tras cada ciclo de mitosis, ya que cualquier desviación en estos patrones puede condicionar la deriva hacia el cambio destino celular (Hu et al., 2019). (Kosovsky, 2013)

En vista de estos hallazgos es necesario continuar ampliando nuestro conocimiento sobre las propiedades y funciones de las diferentes subpoblaciones celulares, así como del microambiente dinámico que gobierna el comportamiento celular.

II. Antecedentes

Con la utilización de diversos sistemas de transporte de genes es posible guiar el destino de los tejidos simulando las condiciones naturales del proceso de embriogénesis (Islas et al., 2012).

2.1 Antecedentes directos

En 2012, Islas y colaboradores logran la transdiferenciación de fibroblastos dérmicos hacia células progenitoras cardiacas, para lograrlo emplearon un sistema lentiviral de entrega de genes y la adición de factores de transcripción obtenidos por purificación proteica, con lo que lograron la sobreexpresión de dos factores de transcripción importantes en el cardiodesarrollo, MESP1 y ETS2. (Figura 6). La selección de estos genes fue realizada en base a resultados previos de los genes homólogos de cardiodesarrollo del organismo cordado *C. Intestinalis*.

La combinación de los factores MESP1/ETS2 permitió la transdiferenciación de fibroblastos a cardiomiocitos progenitores que expresaron los biomarcadores cardíacos KDR+ y PECAM1, sin embargo, ninguno de estos factores por sí solo permite la generación de cardiomiocitos *De novo* a partir de fibroblastos. La sobreexpresión de ETS2 por sí sola fue capaz de enriquecer transcritos de múltiples componentes centrales de la vía Nodal/Activina (ACVR2B, TDGF1, CITED2 y LEFTY1), esenciales para la aparición de progenitores cardíacos; la ausencia de estos factores desvía la diferenciación a programa de diferenciación hacia tejido neural. Adicionalmente, ETS2 logra la expresión de los genes centrales de diferenciación cardíaca NKX2.5, MESP1, MEF2C, GATA4 y ISL1, datos que soportan la teoría que los factores de transcripción ETS son capaces de regular a GATA4. MESP1 al igual que ETS2 bloquean la aparición de la proteína morfogenética de hueso 2 (BMP2), BMP4 y PDGFRa, esto genera ausencia en la expresión de genes de músculo liso, probablemente a través de la inhibición de las vías de señalización BMP-SMAD. Combinando la sobreexpresión de MESP1 y ETS2 con la adición de los péptidos BMP2 y Activina A permitió la reprogramación directa de fibroblastos dérmicos hacia células progenitoras cardíacas caracterizadas por la expresión de NKX2.5, ISL-2, TBX5, MEF2C, dHAND, GATA4, CX43, CX45, BMP2, WNT11.

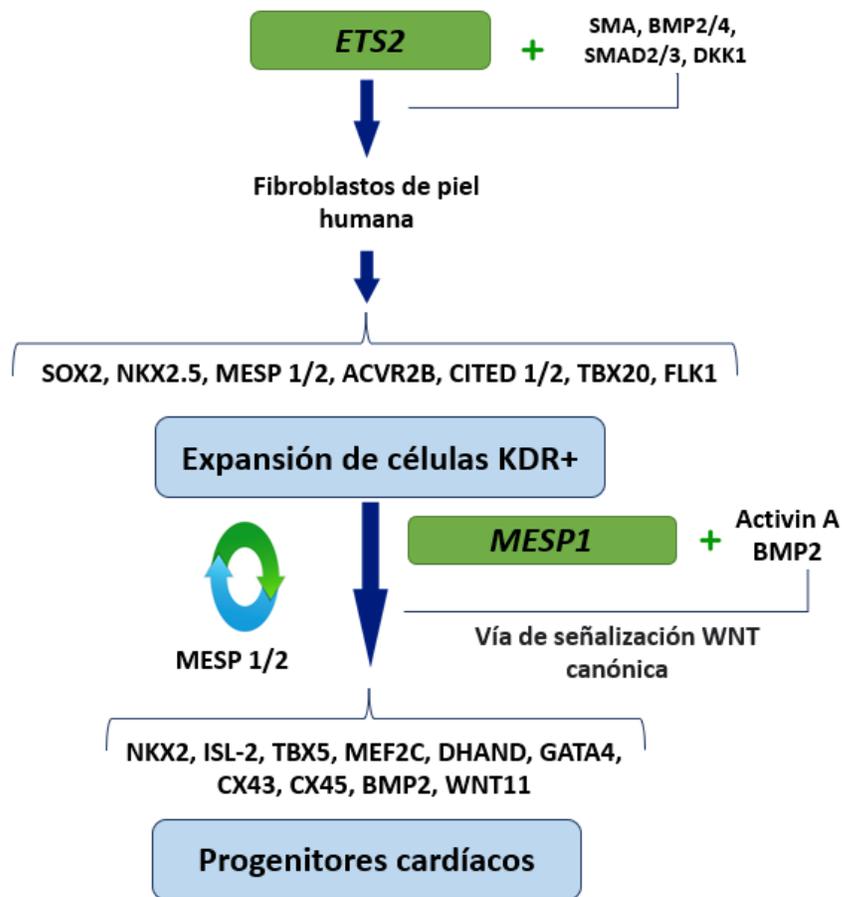


Figura 6. Transdiferenciación de Fibroblastos de piel a CPCs mediante sobrepresión de los factores ETS2/MESP1.

(Modificado de *Islas et al., 2012*)

2.2 Antecedentes Indirectos

Medley et al., 2013 realizó la diferenciación in vitro de iPSCs a CM mediante la técnica de formación de esferoides por el método de *Hanging drops*; utilizaron medio de cultivo para diferenciación que incluye DMEM, 15% FBS, L-glutamina, aminoácidos no esenciales, beta-mercaptoetanol (BME) y antibióticos. Las células fueron depositadas en gotas de 10µL que contenían aproximadamente 800 células. Se dejaron en suspensión invertida por 2 días y posteriormente 2 días en cultivo en suspensión en placas de ultra baja adherencia. Los agregados tridimensionales

(esferoides) se sembraron posteriormente en placas recubiertas con gelatina y permanecieron en cultivo en adherencia por 14 días. Bajo estas condiciones mencionadas ellos obtuvieron expresión de biomarcadores de compromiso cardíaco T (brachyury), Isl-1, TBX5, MEF2C, así como expresión de proteínas de estructuras sarcoméricas β -MHC, Titina. (Medley et al., 2013)

En 2015 Soibam y colaboradores generaron una línea de células madre embrionarias modificadas mediante el sistema de Cre recombinasa que permite el rastreo del linaje de células que expresan Mesp1+ por medio la aparición de una señal de fluorescencia en el locus constitutivo de Rosa26; gracias a esta metodología pudieron demostrar que las poblaciones de progenitores cardíacos marcadas Mesp1+ fueron capaces de diferenciarse a las diferentes estructuras cardíacas correspondientes a tejido endotelial, músculo liso y tejido miocárdico y producir una recuperación funcional en el modelo animal (Y. Liu et al., 2016; Soibam et al., 2015). Adicionalmente, en este trabajo se establecen condiciones para la diferenciación de células madre embrionarias hacia cardiomiocitos progenitores *In vitro* mediante la inducción por la formación de esferoides por *Hanging drops* y la activación bifásica de la vía de Wnt/B-canónica gracias a la acción de péptidos inhibidores de las vías de Wnt.

III. Justificación

Existe una fuerte necesidad de desarrollar nuevas estrategias para mitigar el daño crónico que converge posteriormente en diferentes cardiopatías. En las últimas décadas se han realizado grandes esfuerzos en desarrollar terapias celulares con células madre y progenitores cardíacas que permiten la reversión del daño y la restauración de la funcionalidad.

Las células mesenquimales tienen una alta relevancia clínica debido a su fácil obtención, manipulación, expansión y alta capacidad proliferativa, por lo que es una opción prometedora para regeneración cardiovascular. La sobreexpresión de los

factores de transcripción de MESP1 y KLF15 podría mejorar el proceso de diferenciación y compromiso hacia el linaje cardiovascular.

Debido a la escasez de trasplantes disponibles en la actualidad y a la baja tasa de aplicación de dispositivos de asistencia ventricular, el desarrollo de terapias celulares cobra importancia, ya que el objetivo de estas terapias consiste en obtener una recuperación funcional de estos pacientes y con ello mejorar la calidad y la sobrevida global; Con ello, disminuir la mortalidad y los costos asociados a la atención e incapacidad laboral.

IV. Hipótesis de trabajo:

La expresión de MESP1 y KLF15 contribuye a la optimización de la diferenciación celular de células madre mesenquimales de ratón hacia cardiomiocitos.

V. Objetivos

5.1 Objetivo General:

Evaluar el papel de la sobreexpresión de KLF15 y MESP1 en el proceso de diferenciación de células madre mesenquimales hacia cardiomiocitos

5.2 Objetivos específicos:

1. Caracterizar y purificar los vectores de expresión plasmídicos que contienen los factores de transcripción MESP1 y KLF15.
2. Caracterizar y expandir células madre mesenquimales derivadas de médula ósea de ratón (mMSC).
3. Establecer las condiciones de diferenciación de células madre mesenquimales a cardiomiocitos por cultivo en esferoides y sobreexpresión de los factores de transcripción MESP1 y KLF15.
4. Validar el proceso de diferenciación de mMSC hacia cardiomiocitos mediante el análisis de expresión de biomarcadores cardiacos por RTqPCR e inmunofluorescencia.

VI. Estrategia experimental

La estrategia experimental consiste en 3 fases delimitadas de la siguiente forma:

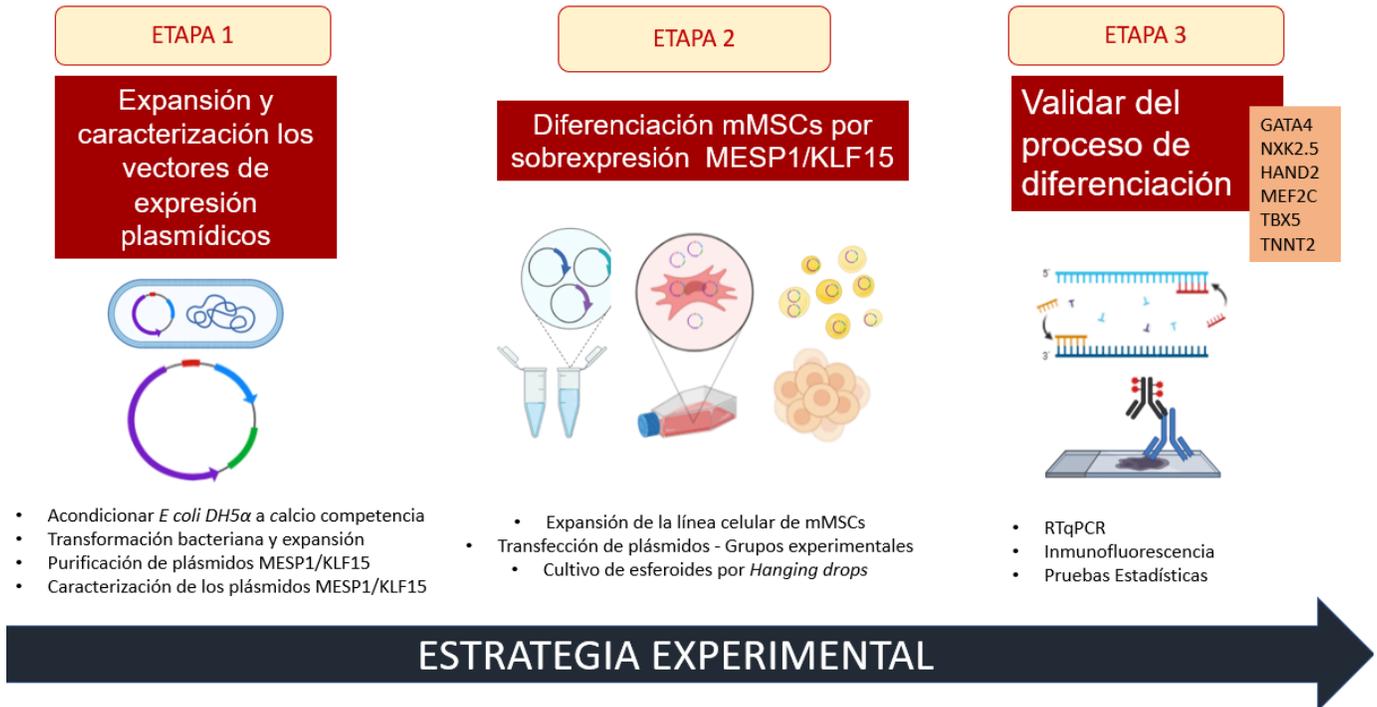


Figura 7. Estrategia experimental general.

ETAPA 1: Expansión y caracterización de los vectores de expresión plasmídicos por medio de transformación bacteriana y su purificación mediante lisis alcalina.

ETAPA 2: Diferenciación de células madre mesenquimales de ratón hacia cardiomiocitos mediante la sobreexpresión de MESP1 y KLF15 en conjunto con el cultivo de esferoides. (Figura. Experimento General)

ETAPA 3: Validar el proceso de diferenciación de células madre mesenquimales de ratón hacia cardiomiocitos por medio de RTqPCR e Inmunofluorescencia.

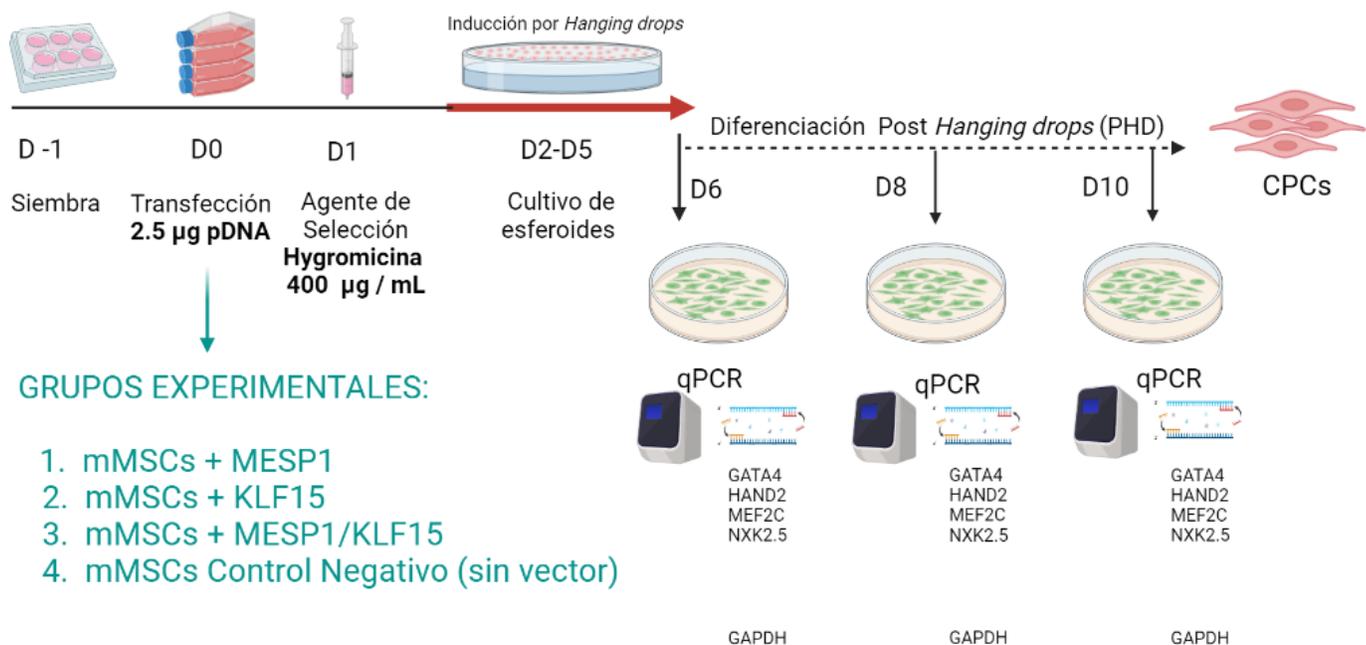


Figura 8. Esquema gráfico del proceso experimental para la obtención de CPCs.

Correspondiente a las etapas 2 y 3.

VII. Materiales y Métodos

7.1. Obtención de bacterias E coli DH5a. Las bacterias fueron obsequiadas en viales congelados a -80 °C por parte de otro investigador perteneciente al departamento.

7.2. Acondicionamiento E coli DH5a a calcio-competencia. Se realizó mediante raspado con puntillas estériles sobre un vial de bacterias congelado. Se dejó caer la puntilla inoculada dentro de un tubo Falcon de 15 mL estéril con 5 mL de suspensión con medio LB (Luria-Bertani). La suspensión fue incubada a 37°C de 12 a 15 horas, hasta observar turbidez. Se tomaron 100 µL y se inocularon en 100 mL de medio LB estéril en un matraz. Se detuvo la incubación una vez llegada a la densidad óptica deseada ($DO_{600}=0.6$) colocando el matraz en hielo por 15 minutos. El contenido fue dividido en dos tubos Falcon de 50mL para ser posteriormente

centrifugados a 5000 rpm x 3 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las pastillas en 200 µL de solución de CaCl₂ 0.1 M, se colectaron ambos volúmenes en un solo tubo y se aforaron a 30 mL en la misma solución. Se incubaron en hielo por 30 minutos. Se realizó centrifugado a 3000 rpm x 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y la pastilla fue resuspendida en 1 mL de solución de CaCl₂ 0.1M. Se generaron múltiples alícuotas en tubos eppendorf de 1.2 mL.

7.3. Transformación bacteriana *E coli-DH5a* con plásmidos de expresión MESP1/KLF15. Fue añadido 1 µL de ADN plasmídico [200 ng - 1 µg / µL] a cada alícuota de 1.2 mL con bacterias *E coli-DH5a* calcio-competentes, éstas fueron incubadas en hielo por 30 minutos. El choque térmico se realizó mediante inmersión de los viales en un baño de agua a 40°C por 32 segundos para posteriormente ser incubados nuevamente en hielo por 5 minutos. Se inocularon inicialmente sobre un volumen de 5 mL de medio LB del cuál se forman alícuotas para trabajo y almacenamiento. Posteriormente se escalaron a volumen de 200 mL de LB en presencia del antibiótico de resistencia incluido en el plásmido (Ampicilina). Se realiza este protocolo para cada uno de los plásmidos para obtener dos cepas transformadas distintas, una con MESP1 y otra con KLF15. Los plásmidos provinieron de la casa comercial *Addgene*, Trono LAB. (EF1a_MESP1 cat. No #120459; y EF1a_KLF15 cat. No #120501)

7.4. Purificación plásmidos. La purificación de los plásmidos de expresión fue realizada utilizando el kit comercial *QIAGEN plasmid maxi kit*® a partir de un subcultivo en 200 mL de medio LB de bacterias transformadas en presencia del antibiótico de resistencia.

7.5. Cuantificación, pureza e integridad ADN plasmídico. Los análisis para cuantificación y pureza del ADN obtenido tras la extracción fueron realizados utilizando el instrumento *Nanodrop3000*® a las diferentes longitudes de onda y coeficientes de absorbancia 260/230 280/260. La integridad fue evaluada por medio de la realización de una electroforesis en gel de agarosa.

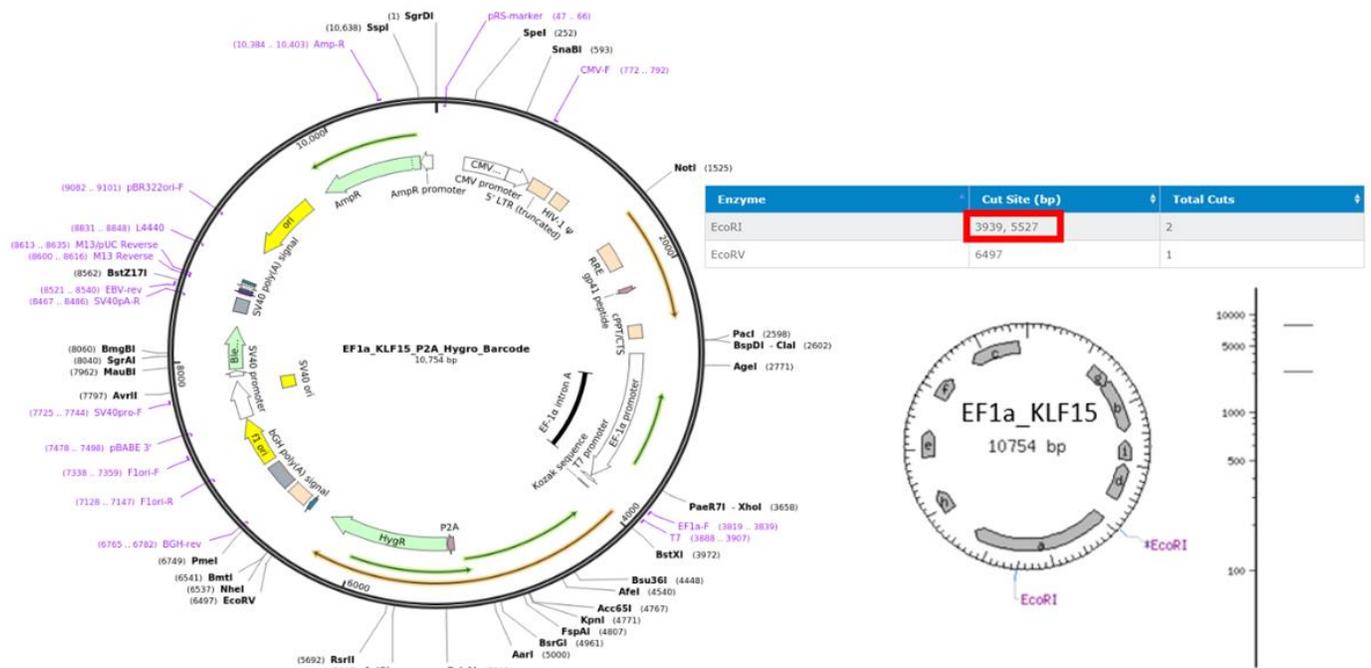


Figura10: Mapa del plásmido EF1a_KLF15 y sitios de corte por enzimas de restricción *EcoRI*
(Obtenido de Addgene®)

7.7. Caracterización de mMSC derivadas de medula ósea. La caracterización del fenotipo fue realizada con el kit comercial de inmunohistoquímica *Mouse and Rabbit HRP/DAB (ABC) detection IHC kit*® [Abcam] y el kit *Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit* (R&D Systems®) para la identificación de los marcadores CD105 (1:25) CD90 (1:200) CD34 (1:100).

7.8. Condiciones de cultivo de mMSCs. Las células madre mesenquimales de ratón derivadas de medula ósea fueron cultivadas en adherencia en cajas de poliestireno tipo Corning® T- 25 y T- 75. Se utilizó como medio de crecimiento *Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM High Glucose*®, 10% FBS (Suero Fetal Bovino), 1% Penicilina [10,000U/ml]/ Streptomycin [10,000 U/ml] 1% Anfotericina B, 1% NEA (*Non-Essential Aminoacids*®)

7.9. Transfección de células mMSCs con plásmidos MESP1/KLF15. Se siguieron las recomendaciones del fabricante para realizar el ensayo de transfección con Lipofectamina 3000® (*Invitrogen*®). Día 0: Se Inicio con la previa expansión de la línea celular de mMSCs en condiciones de cultivo estándar. Día 1: Las mMSCs fueron sembradas en una caja de cultivo de 6 pozos a una densidad de 3×10^6 células por pozo y fueron cultivadas en medio de cultivo en ausencia de antibiótico y antimicótico (DMEM + 10% FBS + 1%NEA). Se obtuvo una confluencia de 70-90% a las 24 horas. Día 2: Se diluyeron en un tubo A 3.75 μ L de Lipofectamina 3000® con 125 μ L de OPTI-MEM y en otro tubo B el ADN plasmídico (2.5 μ g) con 125 μ L de OPTIMEM® + 1 μ L de *P300 reagent*® por cada 500 μ g de ADN plasmídico (total 5 μ L). El contenido de ambos tubos A y B fue mezclado y homogenizado con ayuda de un vórtice por 2-3 segundos y posteriormente permanecieron en incubación por 10-15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el medio de crecimiento de cada pozo y se añadieron 250 μ L de los complejos lípidos (Lipofectamina + pDNA + P300) en cada pozo. Las células fueron incubadas en condiciones estándar de crecimiento y transcurridas 4 horas de la transfección se añadió el volumen restante de medio de crecimiento a cada pozo (1.5 mL). Con esta metodología fueron generados los diferentes grupos experimentales, los cuales constan: grupo experimental 1 transfectadas con pDNA de MESP1, grupo 2 transfectadas con pDNA de KLF15, grupo experimental 3 transfectadas con pDNA de MESP1 y pDNA de KLF15, grupo experimental 4 control negativo protocolo de transfección sin vector plasmídico. Adicionalmente se realizó una validación técnica de la metodología en la misma línea celular empleando el vector plasmídico pTRACER que expresa como reportero una proteína verde fluorescente (pTRACER™-CMV2 *Mammalian Expression Vector*, Número de catálogo: V88520).

7.10. Inducción de la diferenciación de mMSCs por medio de la formación de esferoides. Transcurridas 24 horas posterior a la transfección las células fueron tripsinizadas, centrifugadas y resuspendidas en 1 mL de medio para luego ser contadas con un hematocitómetro. Una vez obtenido el conteo celular se añadió el volumen apropiado de medio de cultivo para obtener una suspensión celular de

1500 células/ 20 μL de medio. Los esferoides fueron generados por pipeteo, depositando gotas de 20 μL de las células en suspensión sobre la parte interna de la tapa de una placa de cultivo, las gotas se fueron depositadas separadas unas de otra aproximadamente 3mm cubriendo aproximadamente el 80% de la totalidad de la tapa. Se añadieron 20 mL de buffer PBS 1x estéril en el interior de cada caja de cultivo de poliestireno de 60mm para proveer de humedad y evitar la evaporación del medio para los esferoides. La tapa fue invertida con cuidado para lograr el cierre de cada de una de las placas de cultivo, el procedimiento completo fue realizado dentro de la campana de bioseguridad y posteriormente fueron transportadas al interior de incubadora. Aproximadamente 5×10^6 células en esferoides por caja. Los esferoides permanecieron 3 días en cultivo en suspensión invertido en condiciones de crecimiento estándar.

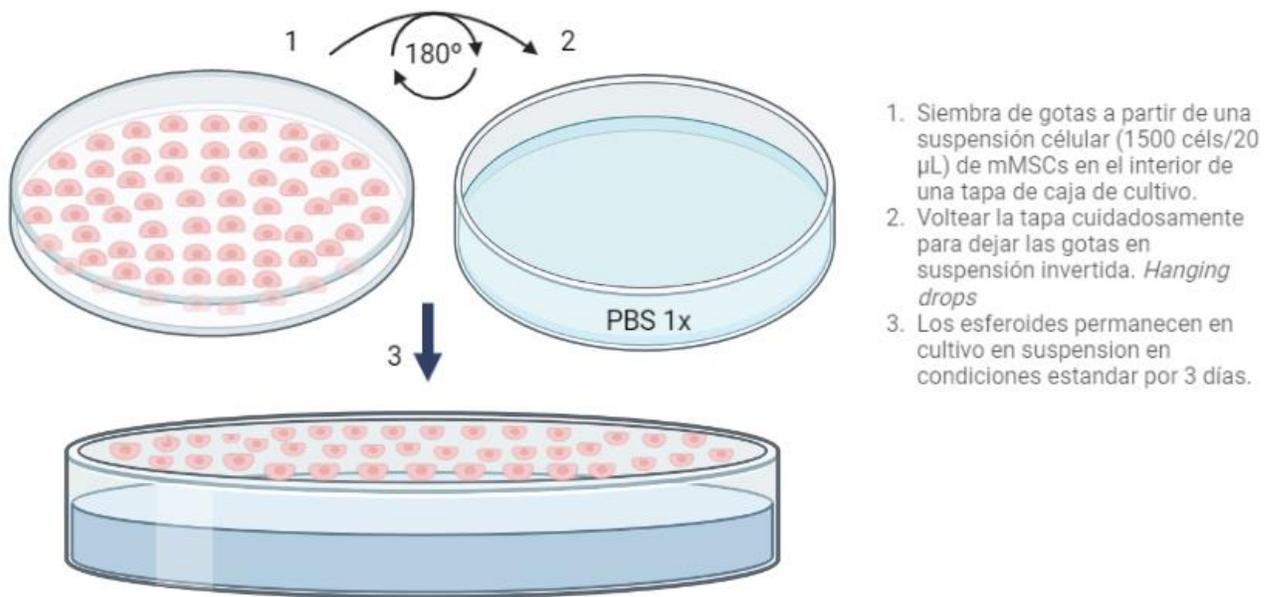


Figura 11. Condiciones de cultivo de esferoides.

7.11. Diferenciación de mMSCs. Una vez cumplidos 3 días de cultivo en suspensión invertida los esferoides se recolectaron realizando un barrido por arrastre con medio de cultivo. La suspensión con esferoides fue recolectada en una caja de cultivo de 60mm. Se incuban en condiciones de cultivo estándar por 5 días.

7.12. Extracción de RNA total. Las extracciones de RNA fueron realizadas con el kit comercial *QIAGEN RNeasy® Mini Kit*. Las células fueron lisadas directamente en las superficies de cultivo utilizando 350 µL de buffer RLT y 10 µL de BME. La suspensión de lisis obtenida fue centrifugada en una columna y se descartó el sobrenadante. Posteriormente fueron añadidos 700 µL del amortiguador RW1® a la columna, fue centrifugada a ≥ 8000 g por 15 segundos y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se añadieron 500 µL del amortiguador RPE®, se centrifugó a ≥ 8000 g por 15 segundos y se descartó el sobrenadante. Las extracciones fueron realizadas a diferentes tiempos: 24 horas antes de la transfección (basal) y posterior a la inducción a los días 1, 3 y 5 de cultivo en adherencia.

7.13. Síntesis de cDNA. La síntesis de la cadena sencilla de ADN complementario se realizó utilizando el kit comercial *SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)*. Fueron utilizados 250 ng- 2.5 µg de muestra de RNA con parámetros de calidad $A_{260}/A_{280}=1.8-2.0$ como templado. La reacción fue realizada en frío mezclando 4 µL de 5X VILO™ Reaction Mix, 2 µL 10X SuperScript™ Enzyme Mix, RNA y agua libre de nucleasas para una reacción de 20 µL. La reacción fue mezclada gentilmente y se incubó en un termociclador con el siguiente programa de temperaturas: 25 °C por 10 minutos, 42 °C por 60 minutos, 85 °C por 5 minutos.

7.14. RTqPCR. Las reacciones de amplificación fueron realizadas utilizando el kit comercial *FAST SYBR® Green Master Mix*. Se realizó la optimización de los componentes para una reacción de 20 µL en tubos de 0.6 mL de los cuales fueron

añadidos 10 µL de *Fast SYBR® Green Master Mix (2X)*, 1 µL FWD primer 10 µM, 1 µL REV primer 10 µM, 500 ng de templado cDNA, y H2O libre de nucleasas. El análisis fue realizado con ayuda del instrumento *7500 Fast* de *Applied Biosystems*. A continuación, se indica el programa de temperaturas: 95 °C por 20 segundos, 95 °C por 3 segundos, 60 °C por 30 segundos x 40 ciclos. Se validó la integridad de los productos de amplificación por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se analizó la expresión de los siguientes biomarcadores: GATA4, MEF2C, NKX2.5, TBX5, NANOG, OCT3/4, MESP1, KLF15. La expresión relativa de dichos biomarcadores fue cuantificada empleando el método $\Delta\Delta Ct$ utilizando GAPDH como gen endógeno. Los cambios en la expresión

$$\Delta Ct = Ct (\text{Gen interés}) - Ct (\text{endógeno})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Muestra}) - \Delta Ct (\text{Media del Control})$$

$$\text{Fold change} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

Tabla 2. Lista de cebadores. (Validados por *Harvard primer bank*)

Gen	5' - FWD	5' - REV
GATA4	CCCTACCCAGCCTACATGG	ACATATCGAGATTGGGGTGTCT
MEF2C	ATCCCGATGCAGACGATTGAG	AACAGCACACAATCTTTGCCT
NKX2.5	GACAAAGCCGAGACGGATGG	CTGTGCTTGCACCTGTAGC
TBX5	ATGGCCGATACAGATGAGGG	TTCGTGGAACCTCAGCCACAG
NANOG	TCTTCCTGGTCCCACAGTTT	GCAAGAATAGTTCTCGGGATGAA
SOX2	GCGGAGTGGAACCTTTGTCC	CGGGAAGCGTGTACTTATCCTT
OCT3/4	GGCTTCAGACTTCGCCTCC	AACCTGAGGTCCACAGTATGC
MESP1	GTCACCTCGGTCCTGGTTAAG	ACGATGGGTCCCACGATTCT
KLF15	GAGACCTTCTCGTCACCGAAA	GCTGGAGACATCGCTGTCAT
KLF4	GTGCCCCGACTAACCGTTG	GTCGTTGAACTCCTCGGTCT
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
PGK1	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

7.15. Electroforesis en gel de agarosa. Para la validación de la integridad de los vectores plasmídicos y de los diferentes fragmentos de amplificación fue utilizada la técnica de electroforesis en gel de agarosa a concentraciones 0.8- 2% utilizando el reactivo comercial Invitrogen™ Agarosa UltraPure™ realizando las diferentes diluciones con buffer TAE. La validación del tamaño de fragmentos fue realizada mediante la comparación con los fragmentos de la escalera de peso molecular *Invitrogen™ Estándar de ADN 1 Kb Plus*. Las muestras fueron cargadas al gel utilizando el buffer de carga BlueJuice™ (10X). Fueron utilizados 2 µL de solución de bromuro de etidio (BrEt) como agente intercalante para la visualización de los fragmentos en el gel de agarosa bajo luz UV. Las condiciones de corrida en la fuente de poder *PowerPac Mini Power Supply Biorad®* correspondieron a voltaje de 90V/h con una duración de corrida de 60 – 80 min dependiendo del tamaño de los fragmentos. (100-300 pb productos amplificación vs >10 Kb vectores plasmídicos)

7.16. Inmunofluorescencia. Para la preparación de las laminillas fue realizada la inmersión de portaobjetos en poly-L-lisina por 30 minutos y posterior secado en campana con Luz UV por 30 min. Fueron añadidos 500 µL de células en suspensión sobre el portaobjetos. Se incuban las laminillas dentro de la incubadora en condiciones estándar por 2 horas. Tras haber observado la adherencia de las células se realizó la fijación mediante inmersión en formaldehído al 3.7% por 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la permeabilización de las laminillas con tritón X100 al 0.25% por 10 minutos a temperatura ambiente. La incubación con anticuerpos primarios fue realizada por 2 horas a temperatura ambiente en presencia de solución de bloqueo. La incubación con los anticuerpos secundarios fue realizada por 15 horas en frío (4°C). Se realizó la contra tinción añadiendo 7 µL de DAPI por muestra. La microscopia de fluorescencia fue realizada empleando el Instrumento *Axioscope 5 de Carl Zeiss®* y utilizando el software IMAGE J.

7.17. Obtención de células cardiacas. Se obtuvieron piezas histológicas de corazón de ratón provenientes del bioterio de la facultad de Medicina y fueron

utilizadas para la generación de controles positivos con el perfil de expresión de biomarcadores cardiacos. Los órganos fueron procurados quirúrgicamente *post mortem* por un médico veterinario siguiendo los lineamientos aprobados por el comité de bioética de la Universidad con respecto al manejo de animales de experimentación. El tejido tras su procuración quirúrgica fue inmediatamente suspendido en solución salina 0.9% y solución RNlater® y preservado en frío. El aislamiento de células cardiacas fue realizado por disgregación enzimática utilizando una pieza de 20mg de tejido cardiaco previamente lavada con buffer PBS en contacto con 1 mL de solución enzimática *Roche-Collagenase/Dispase®* que contiene Colagenasa: ≥ 0.1 U/ml PBS + Dispasa®: ≥ 0.8 U/ml PBS. La muestra permaneció en agitación por una hora a 37°C y las células disgregadas fueron colectadas mediante pipeteo de los precipitados obtenidos tras una centrifugación de la muestra a 2000 rpm x 5 min. Fueron colectadas células a dos tiempos distintos (20 y 40 minutos), y éstas posteriormente fueron sembradas en cajas de cultivo con medio de crecimiento acondicionado *Claycomb media Sigma-Aldrich®* en condiciones de crecimiento estándar. La extracción de RNA se realiza de manera similar bajo condiciones asépticas y libre de nucleasas bajo campana de bioseguridad para la extracción de material genético siguiendo el protocolo de tejidos recomendado por el kit *QIAGEN RNeasy® Mini Kit*.

VIII. Resultados

8.1 Establecimiento y caracterización del sistema de expresión plasmídico.

En cuanto al proceso de obtención de material genético plasmídico que será utilizado para los ensayos de transfección podemos demostrar los siguientes resultados: Se observó crecimiento de las dos cepas de *E. coli DH5α* transformadas con los plásmidos EF1a_MESP1 y EF1a_KLF15. Los cultivos primarios permanecieron 15 horas en cultivo a 37 °C en agitación y en presencia del antibiótico de resistencia ampicilina, (**Figura 12.A**) a partir del cultivo inicial se inocularon a volúmenes superiores para obtener mayor biomasa bacteriana y mejorar el rendimiento en las técnicas de purificación de plásmidos. Se observó crecimiento

de los subcultivos tras 15 horas de cultivo a 37 °C en agitación y en presencia del antibiótico de resistencia ampicilina. **(Figura 12.B)**

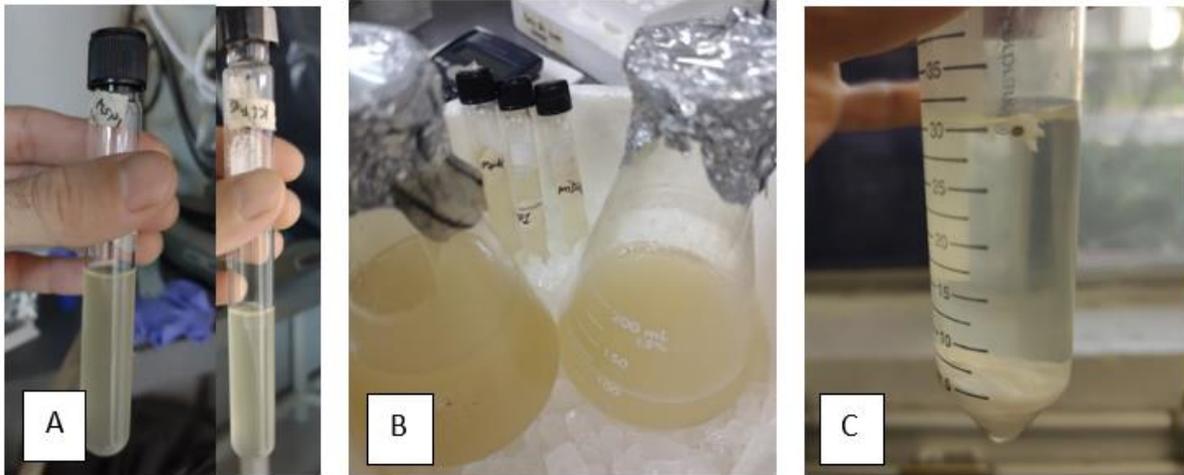


Figura 12. Cultivos bacterianos. **A)** Cultivo de 15 h de bacterias *E coli* calcio-competentes transformadas con vectores MESP1 y KLF15. **B)** Subcultivo de 24 h de bacterias transformadas con vectores MESP1 y KLF15. **C)** Sobrenadante obtenido durante el proceso de purificación de plásmidos con el kit *QIAGEN Maxiprep®*.

Se realizaron varias repeticiones de este proceso para realizar subsecuentemente la purificación de plásmidos por diferentes métodos. El método que brindo mejor rendimiento fue el kit comercial de *QIAGEN Maxiprep®* **(Figura 12.C)** del cuál se obtuvieron 844 ng/ μ L para la cepa de *E coli* transformada con EF1a_MESP1 y 805 ng/ μ L para la cepa de *E coli* transformada con EF1a_KLF15. Los parámetros de calidad obtenidos corresponden a material plasmídico sin contaminantes y alto grado de pureza **(Figura 13 y 14)**.

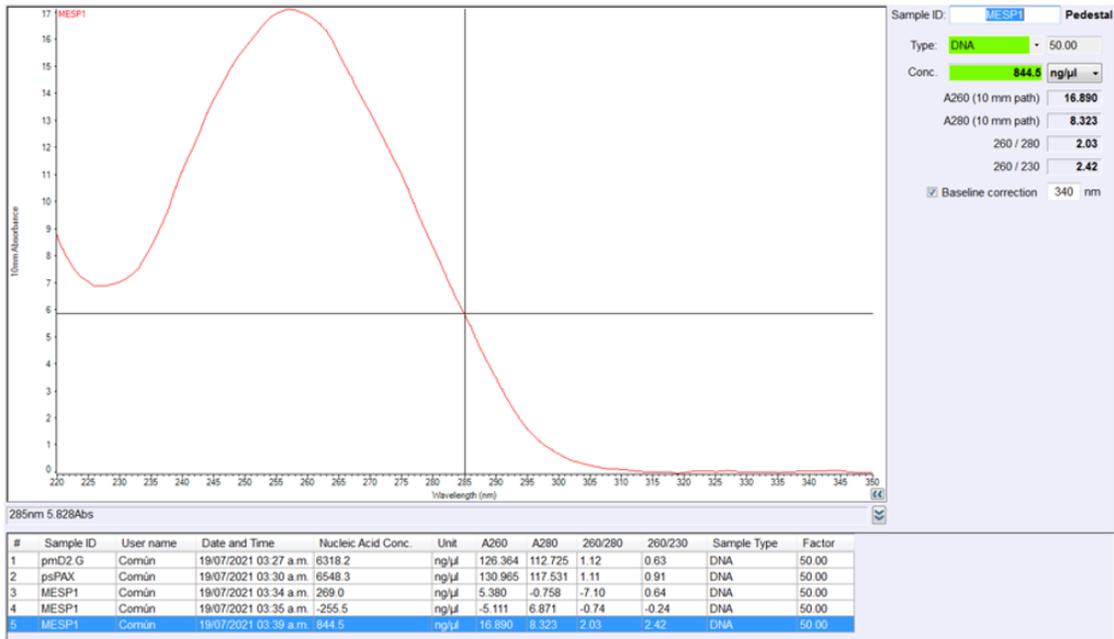


Figura 13. Resultado de la purificación del vector de expresión de MESP1. Análisis por espectrofotometría con Nanodrop 3000.

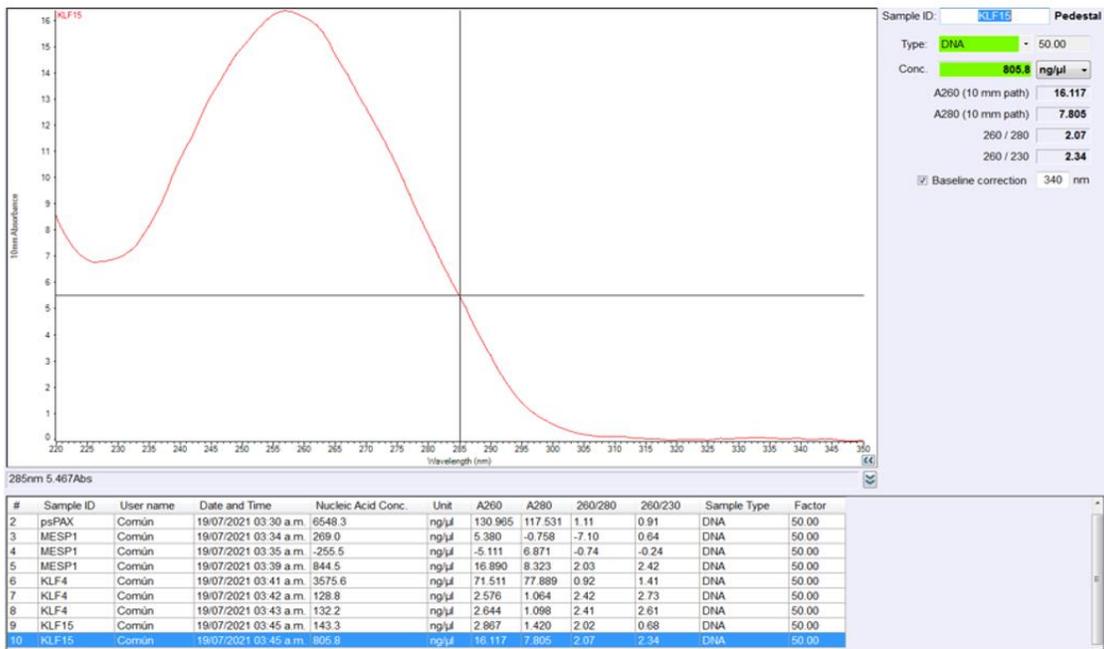


Figura 14. Resultado de la purificación del vector de expresión de KLF15. Análisis por espectrofotometría con Nanodrop 3000.

Se analizó la integridad de los vectores por electroforesis en gel de agarosa como se muestra en la Figura 15, corroborándose el tamaño de >10Kb según lo indicado por la casa comercial. Posteriormente con los vectores purificados procedimos a su caracterización por medio del ensayo de digestión con la enzima de restricción *EcoRI*, que fue seleccionada por ser capaz de generar únicamente dos cortes en el plásmido, de los cuales uno se genera en el sitio de la secuencia de interés y otro en un fragmento fuera de la secuencia, con lo nos permite obtener dos fragmentos que pueden ser evaluados por tamaño por medio de electroforesis en gel de agarosa según se indica en la **Figura 9 y 10** y tal cual se muestra como resultado en la **Figura 16**.

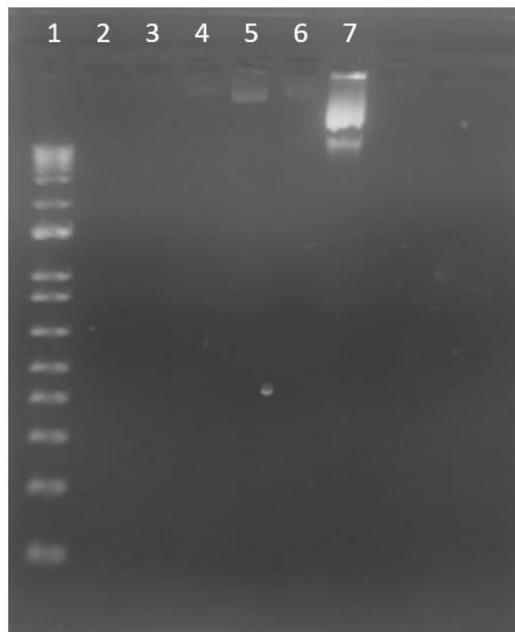


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de productos plasmídicos purificados por diversos métodos; Carril 1: escalera peso molecular 10Kb plus. Carril 2-3: vacío. Carril 4-5: MESP1 pDNA Qiagen Miniprep. Carril 6: MESP1 pDNA Qiagen Maxiprep vacuum. Carril 7: MESP1 pDNA Qiagen Maxiprep column (pDNA correspondiente al tamaño 10kb)

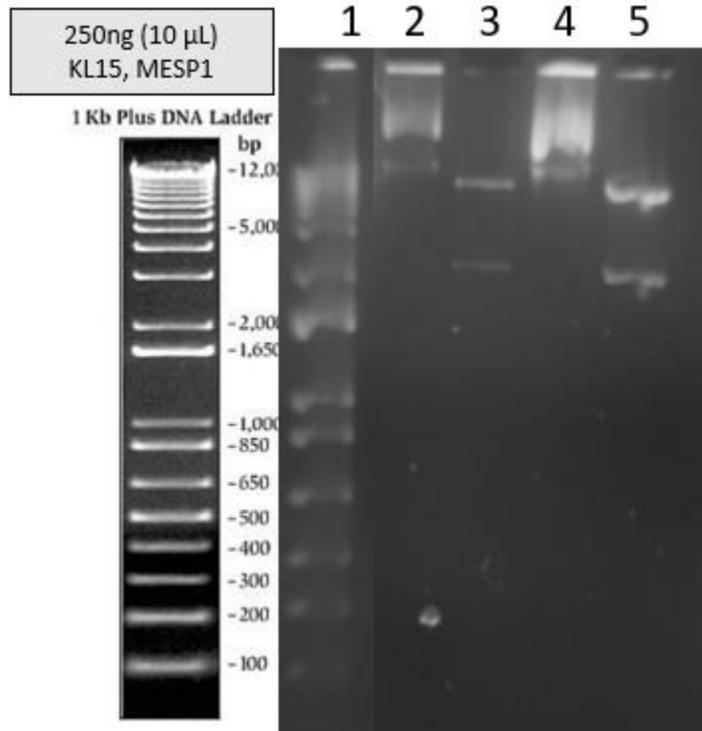


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de los productos de la digestión con la enzima de restricción *EcoRI* para los vectores plasmídicos de KLF15 y MESP1.

Carril 1: Escalera 10kb plus. **Carril 2:** pDNA KLF15 sin digestión. **Carril 3:** KLF15 + *EcoRI*.

Carril 4: pDNA MESP1 sin digestión. **Carril 5:** MESP1 + *EcoRI*

8.2 Establecimiento de las condiciones de cultivo de mMSCs

Se obtuvo viabilidad de la línea de células madre mesenquimales de ratón derivadas de médula ósea que se obtuvieron a partir de un vial se encontraba en crio preservación en un 3er pase. Las células crecen en adherencia al plástico con alta capacidad proliferativa como se observa en la **Figura 17**, donde se puede apreciar la formación de un patrón reticular de crecimiento donde cada célula tiene un aspecto fibroblastoide con prolongaciones y de aspecto organizado, observando un alto grado de confluencia. Se incubaron en condiciones estándar de crecimiento 37 °C, 5% CO₂.



Figura 17. Microscopía óptica del cultivo de mMSCs en condiciones estándar. (10x)

8.3 Estandarización del ensayo de transfección.

Se realizaron ensayos de estandarización de la técnica de transfección con Lipofectamina 3000 iniciales utilizando el vector plasmídico pTRACER que tras su expresión se obtiene la producción de proteína verde fluorescente que funciona como reportero. Se transfectó el vector pTRACER sobre la línea de mMSCs con la intención de obtener múltiples estandarizaciones: 1) Validación técnica del protocolo de lipofección mediante la visualización de un reportero con ayuda de microscopía de fluorescencia 2) Estandarización de condiciones de siembra, confluencia y transfección de la línea celular de mMSCs. 3) Determinar la cantidad aproximada de RNA obtenido para cada condición experimental previo y posterior a la transfección. Para esto, inicialmente se cuantificó el material genómico del vector pTRACER de nuestro *stock* por Espectrofotometría y se realizan las diluciones necesarias para obtener las concentraciones de trabajo para la estandarización del ensayo de transfección. **(Figura 18)**

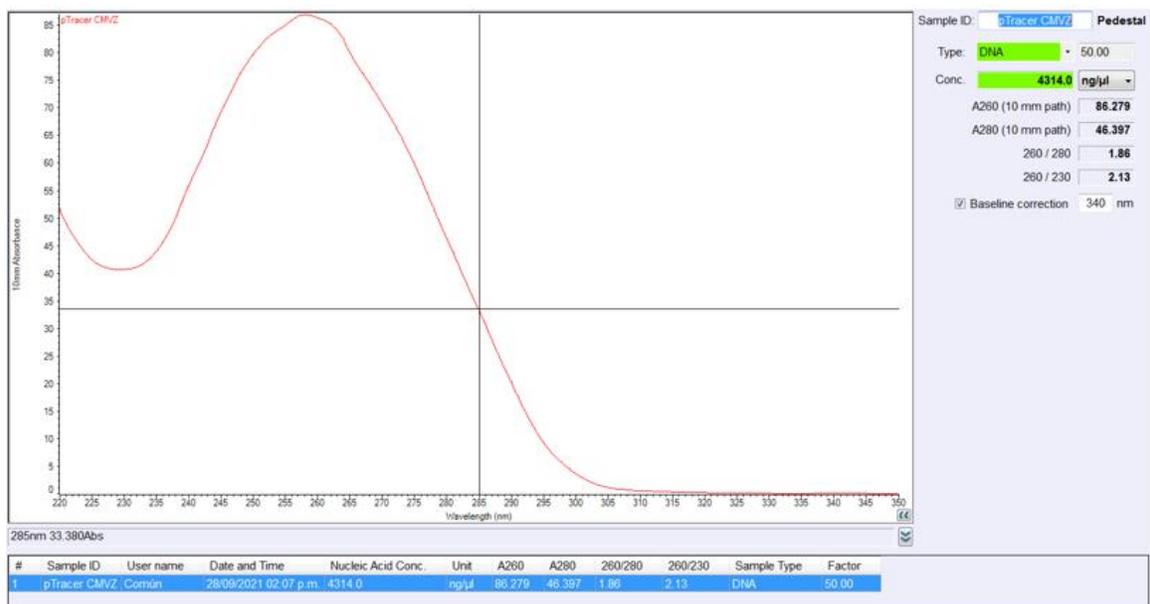


Figura 18. Cuantificación de ADN plasmídico control interno pTRACER. Análisis por espectrofotometría con Nanodrop 3000.

La estandarización del ensayo de transfección con Lipofectamina 3000® se probaron inicialmente bajo dos condiciones distintas recomendadas por el fabricante del kit: la cantidad de plásmido a transfectar fue de 1 μg y 2.5 μg respectivamente y se utilizó un control negativo que no incluye vector de DNA plasmídico. La línea celular fue sembrada sobre cubreobjetos de vidrio esterilizados y previamente tratados con poly-L-lisina que fueron depositados en el interior de una caja de cultivo de 35mm. Transcurridas 48 horas de la transfección se confirmó la viabilidad de la línea celular y la adherencia sobre el cubreobjetos por lo que procedió a retirar los portaobjetos, teñirlos con DAPI y fijarlos para la detección de la señal de fluorescencia de las diferentes condiciones. Se observó mayor intensidad en la señal de fluorescencia en las células transfectadas con 2.5 μg . (**Figura 22**). Las células transfectadas que permanecieron adheridas a la caja de cultivo se utilizaron para evaluar el rendimiento de RNA obtenido en una superficie de 35mm por medio del kit comercial *RNeasy® Mini kit* del cual se obtuvieron rendimientos de 66ng/ μL para el control negativo en el cual se realizó el protocolo de transfección sin incluir vector, 59 ng/ μL al grupo que se transfectó con 1 μg de pTRACER y 32.5 ng/ μL de RNA para el grupo que se transfectó con 2.5 μg de pTRACER (**Figuras 19, 20, 21**).

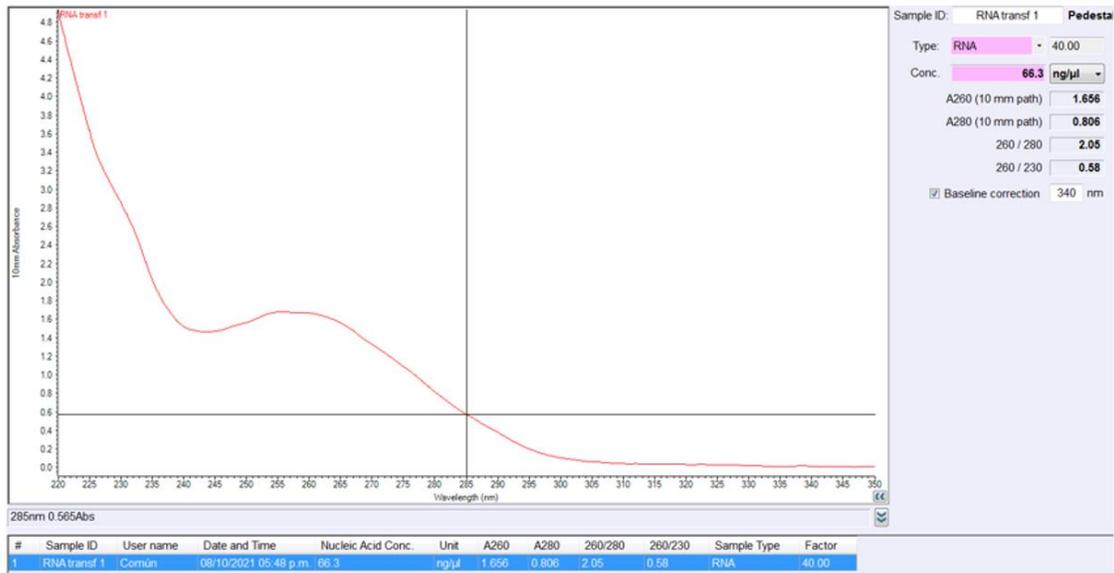


Figura 19. Cuantificación del ARN obtenido post transfección para control negativo (Sin vector pDNA- pTRACER) Análisis por espectrofotometría con Nanodrop 3000.

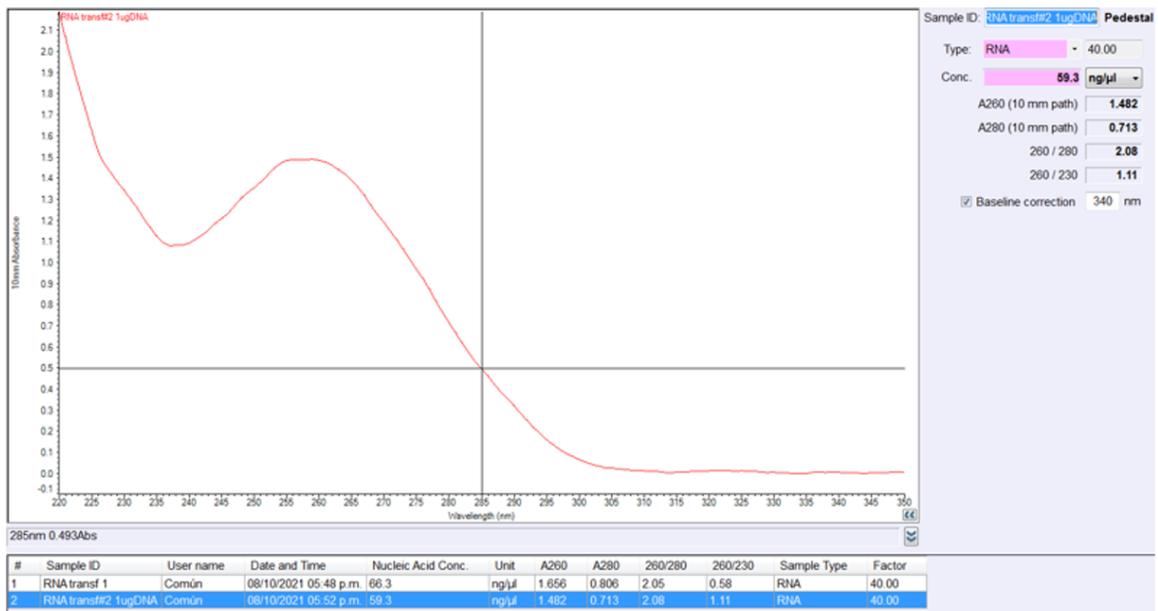


Figura 20. Cuantificación del ARN obtenido post transfección para la condición 1 µg pDNA vector pTRACER. Análisis por espectrofotometría con Nanodrop 3000.

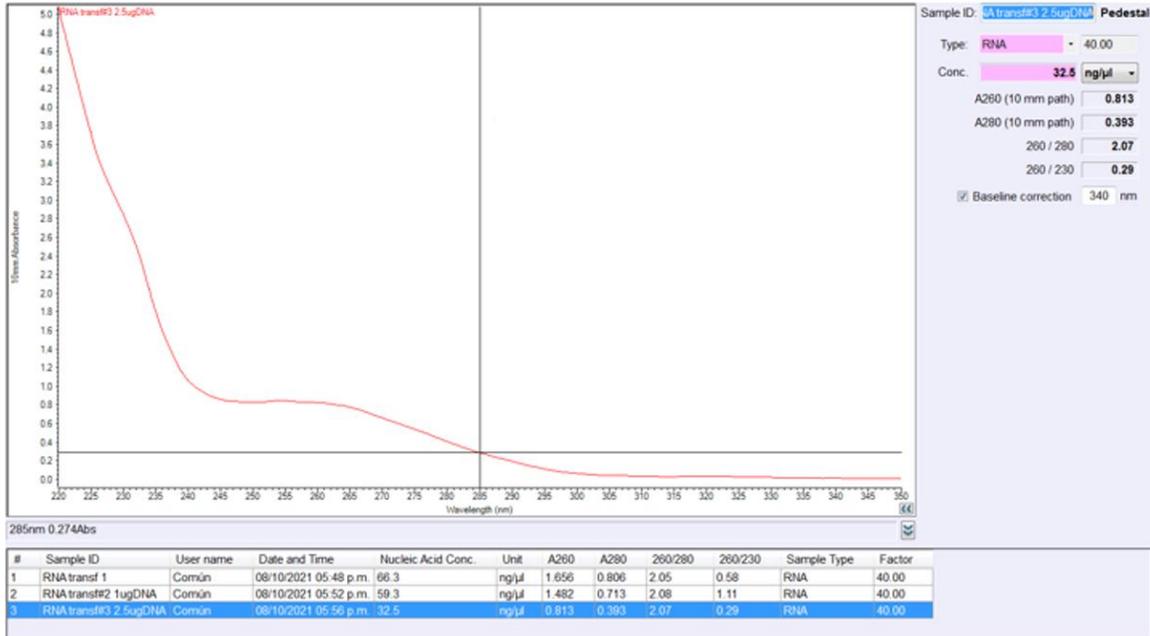


Figura 21. Cuantificación del RNA obtenido post transfección para la condición 2.5 µg pDNA vector pTRACER. Análisis por espectrofotometría con Nanodrop 3000. Extracción RNA realizada con el kit *QIAGEN RNeasy®*

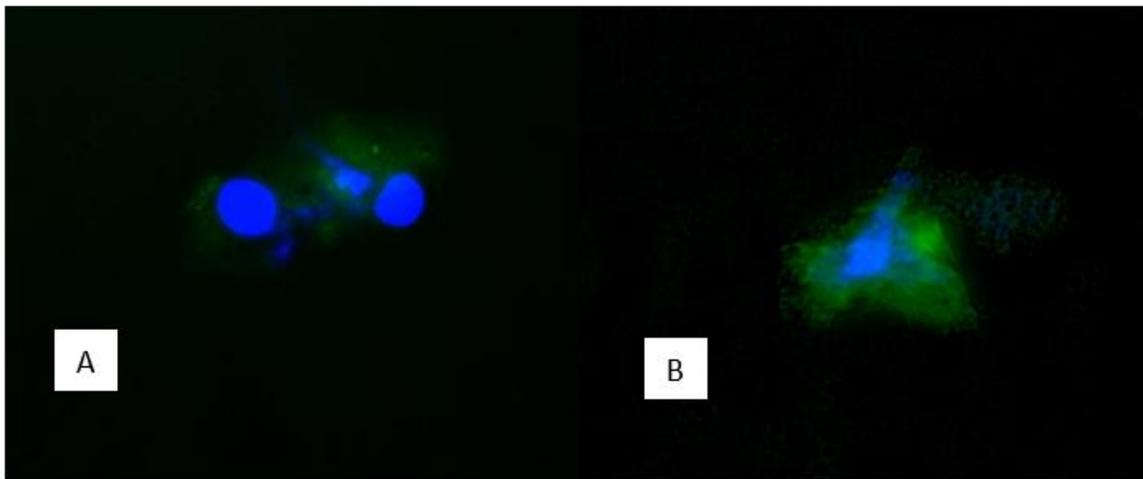


Figura 22. Microscopia de fluorescencia 48 h post transfección del control interno plásmido pTRACER. (co-localización de señales verde fluorescente GFP y azul DAPI). **A)** 1 µg pTRACER **B)** 2.5 µg pTRACER.

Para validar que la cantidad de RNA obtenido de células en crecimiento en confluencia en una superficie de 35mm corresponde a 1- 1.2 millones de células se realizó una extracción de RNA usando el kit comercial *RNeasy mini kit*[®] a partir de una suspensión de 1 millón de células que fueron contadas con ayuda de un hematocitómetro. De dicha extracción se obtuvieron cantidades similares de RNA de calidad a las obtenidas previamente en la transfección de una superficie de 35mm. **(Figura 23)**

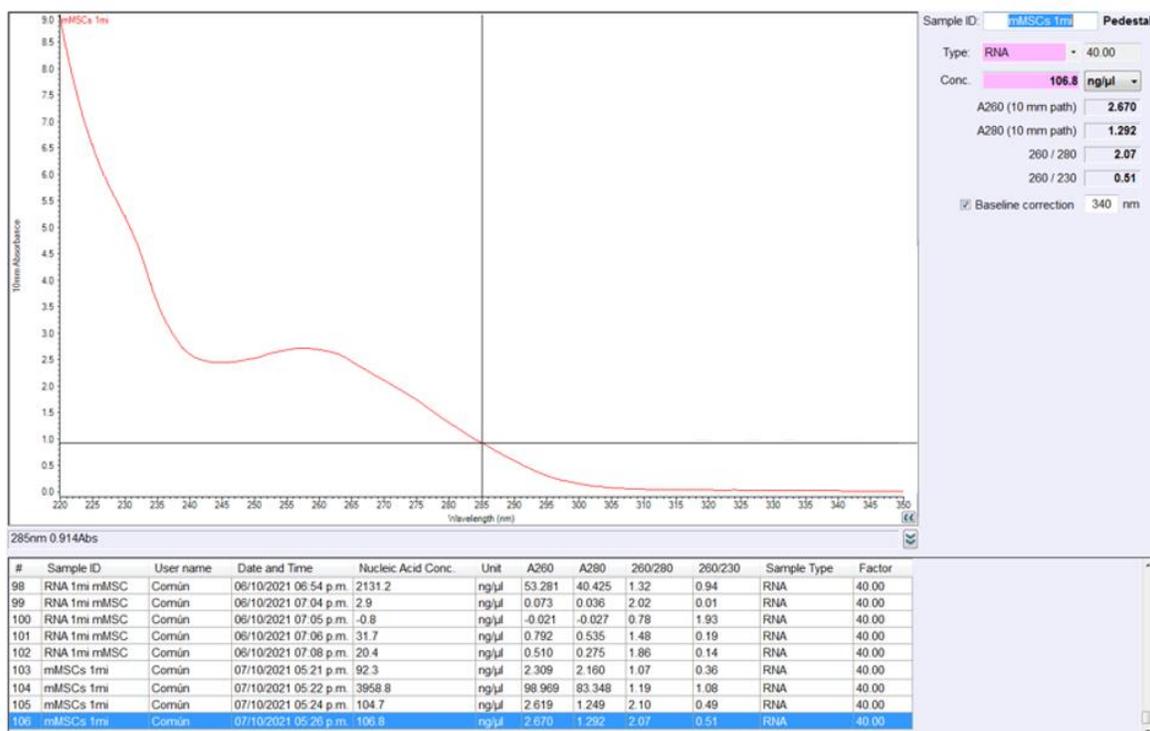


Figura 23. Cuantificación del ARN obtenido de 1 pozo correspondiente a la cantidad de 1 millón de mMSCs. Estandarización de las condiciones del ensayo de transfección. Análisis por espectrofotometría con Nanodrop 3000.

Posteriormente se analizó la integridad del RNA obtenido de dichos ensayos de estandarización por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se puede apreciar la integridad del RNA destacando la presencia de las bandas ribosomales 18s y 28s. **(Figura 24)**

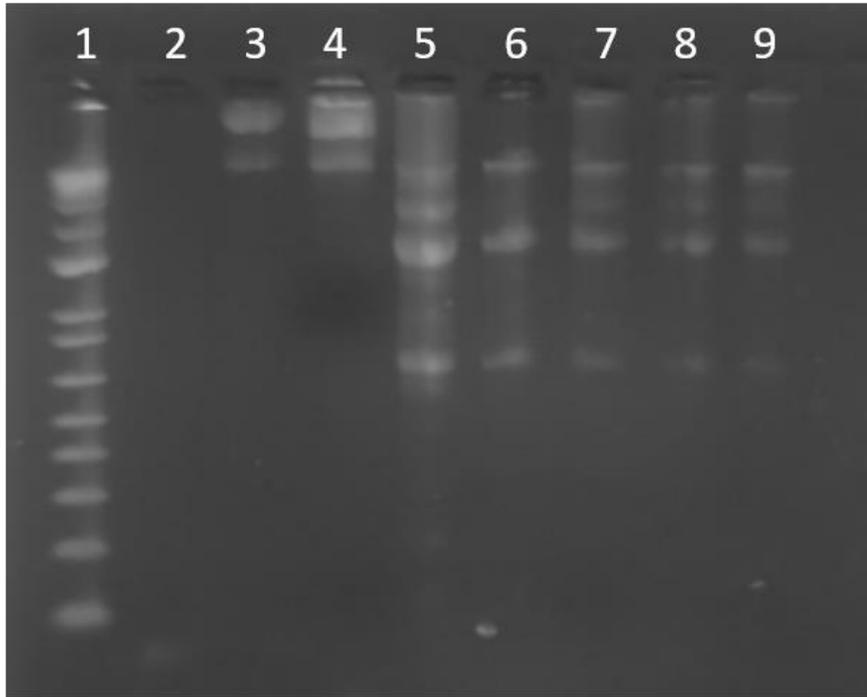


Figura 24. Electroforesis de gel de agarosa al 2% de productos de PCR y extracciones de RNA pre y postransfección. Carril 1: escalera molecular de 100pb-10Kb, **Carril 2:** vacío. **Carriles 3-4:** productos de PCR punto final de MESP1, **Carriles 5-6:** extracción RNA 1 millón mMSCs pre-transfección. **Carriles 7-8-9:** extracciones de RNA de las transfecciones con el control interno pTRACER. (de izq. a der: control negativo sin plásmido, condición #1 con 1µg plásmido, condición #2 con 2.5 µg plásmido)

Una vez habiendo validado el ensayo de transfección con el vector pTRACER procedimos a realizar cambio del vector y evaluar por medio de RTqPCR la temporalidad en la expresión transitoria de los vectores EF1a_MESP1 y EF1a_KLF15. Se realizaron las transfecciones de células madre mesenquimales transfectadas con 2.5 µg del vector de DNA plasmídico EF1a_MESP1 y EF1a_KLF15 y se realizaron las extracciones de RNA a las 24, 48 Y 72 hrs (**Figuras 25, 26 y 27**) donde se obtuvieron muestras de buena calidad para los ensayos subsecuentes de retro transcripción y el análisis por RTqPCR.

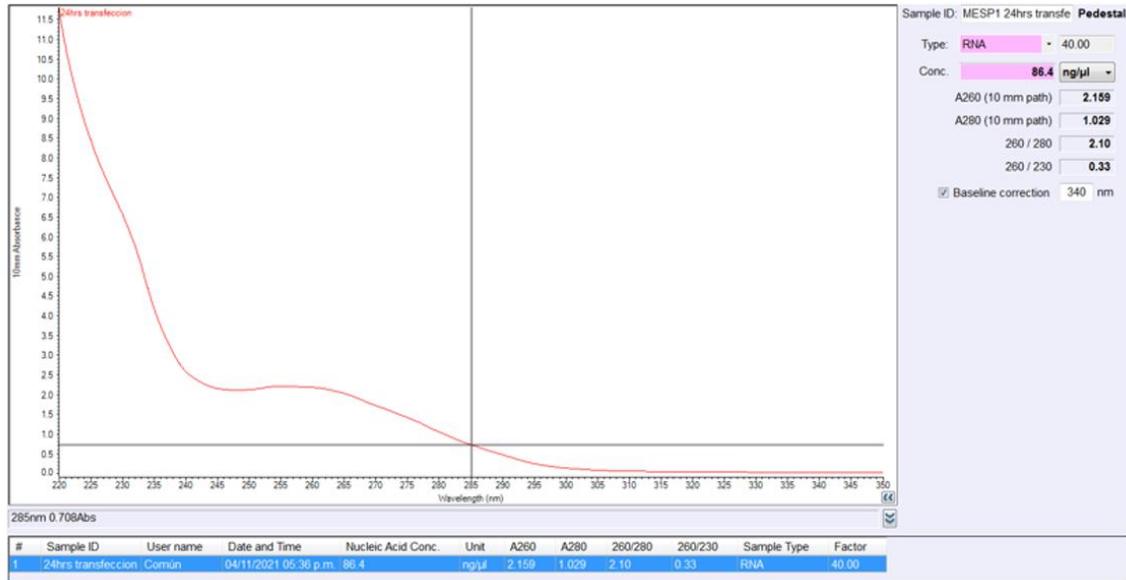


Figura 25. Cuantificación del ARN obtenido 24 horas posterior a la transfección con el plásmido de MESP1. Análisis por espectrofotometría con Nanodrop 3000.

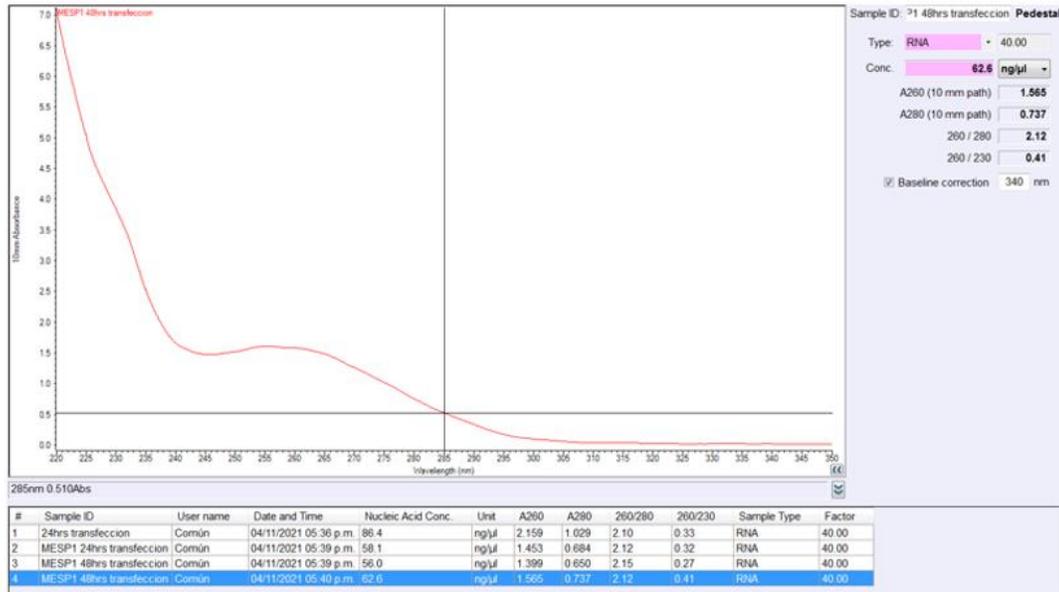


Figura 26. Cuantificación del ARN obtenido 48 horas posterior a la transfección con el plásmido de MESP1. Análisis por espectrofotometría con Nanodrop 3000.

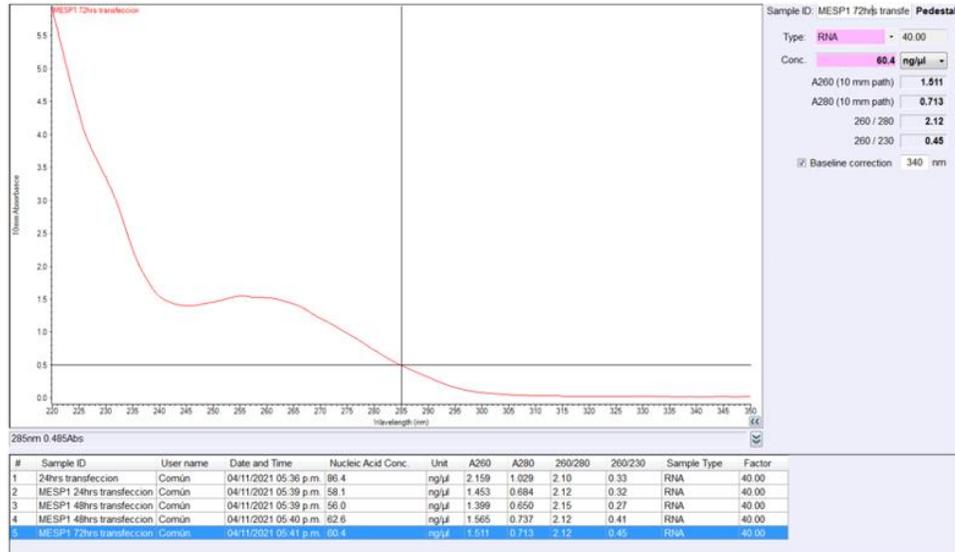


Figura 27. Cuantificación del ARN obtenido 72 horas posterior a la transfección con el plásmido de MESP1 por espectrofotometría. Análisis por espectrofotometría con Nanodrop 3000.

Se realizó la síntesis de cDNA utilizando el kit *Superscript VILO®* utilizando 250 ng de RNA templado para las diferentes muestras de MESP1 y KLF15 a las 24, 48, 72 hrs y se cuantificó el material de cDNA obtenido por espectrofotometría con nanodrop. **(Figura 28)**

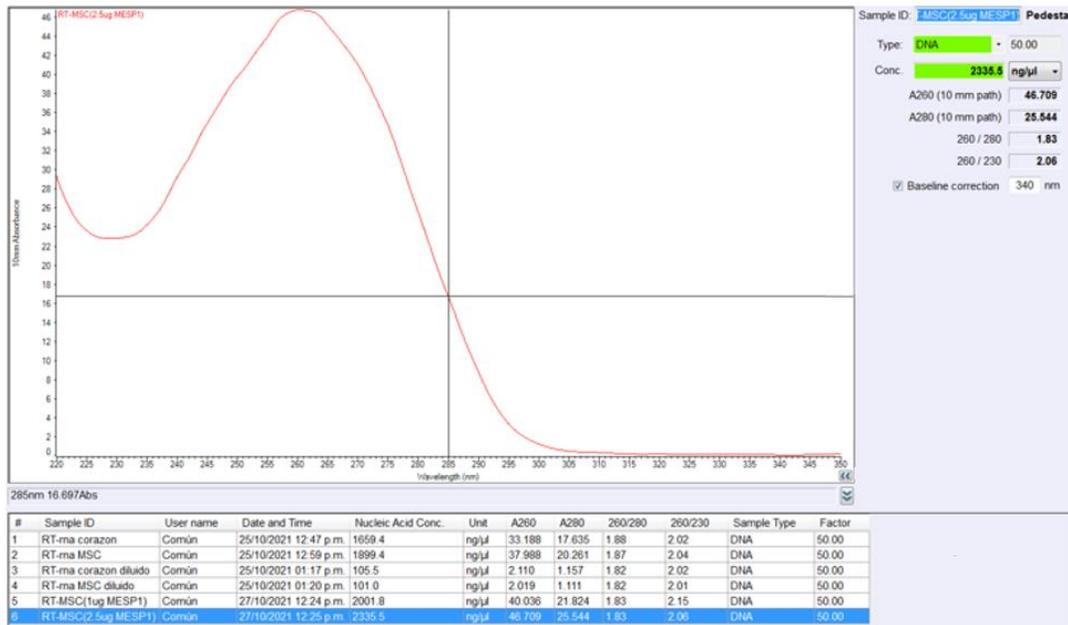


Figura 28. Cuantificación de ADNc post RT a partir de RNA extraído de MSCs transfectadas con 2.5 µg de vector de MESP1. Análisis por espectrofotometría con Nanodrop 3000.

Posteriormente se realizan las reacciones de amplificación por qPCR para evaluar la expresión de MESP1 y KLF15 en mMSCs transfectadas con el protocolo de Lipofectamina3000®. Con esto se pretende evaluar la temporalidad de la expresión de los plásmidos en la línea celular mMSCs a las 24, 48 y 72 horas así como la funcionalidad de los cebadores. Se observó una expresión sostenida de MESP1 y KLF15 a lo largo de los 3 días de muestreo mostrando señal de amplificación a CTs similares para los tres tiempos en ambos plásmidos (**Figura 30**). Es de suma importancia conocer la temporalidad de la sobreexpresión debido a que los tiempos evaluados corresponden al tiempo que pasarán las células en inducción por medio de la técnica de esferoides posterior a la transfección y selección de las células transfectadas.

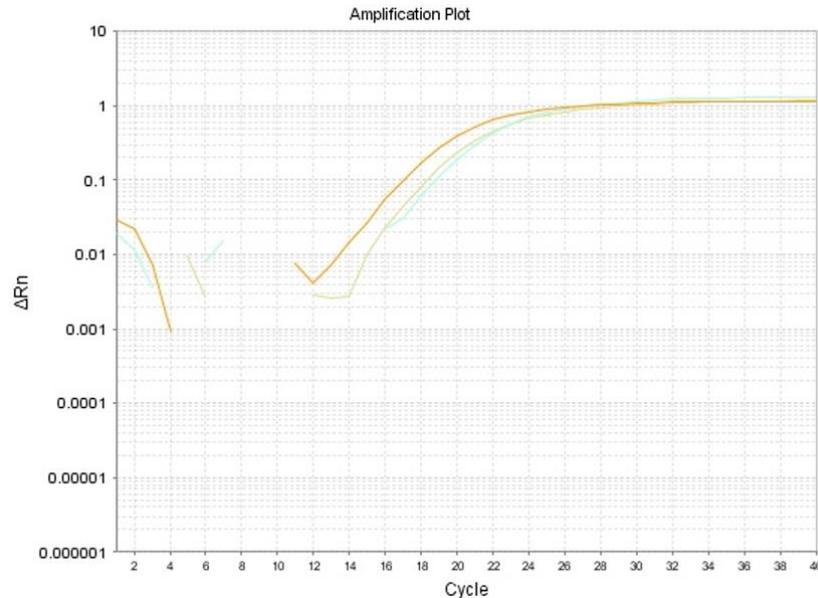


Figura 29. Resultados de expresión de MESP1 por RTqPCR mMSCs a las 24, 48, 72 horas post transfección. 7500 Fast Applied Biosystems®

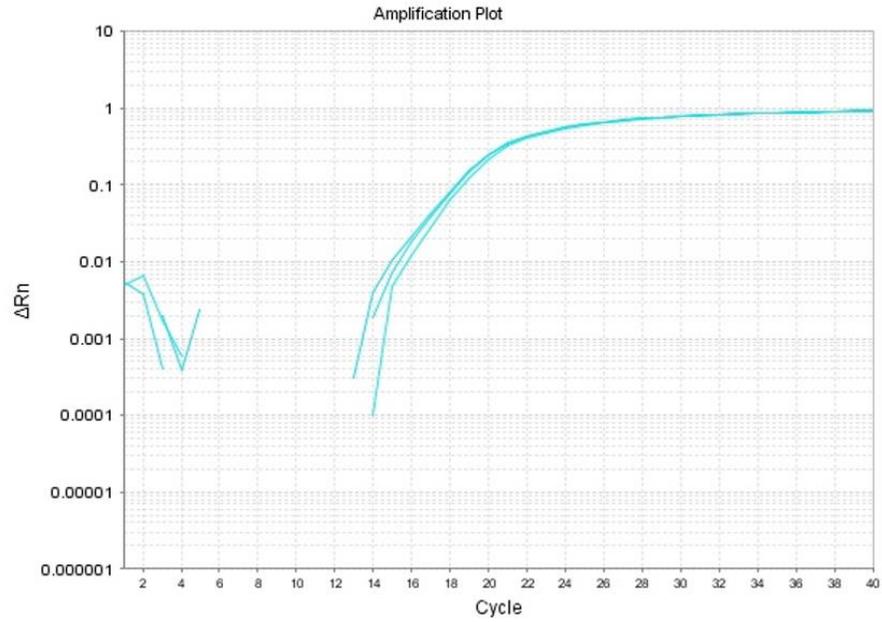


Figura 30. Resultados de expresión de KLF15 por RTqPCR en mMSCs a las 24, 48, 72 horas post transfección. 7500 Fast Applied Biosystems®

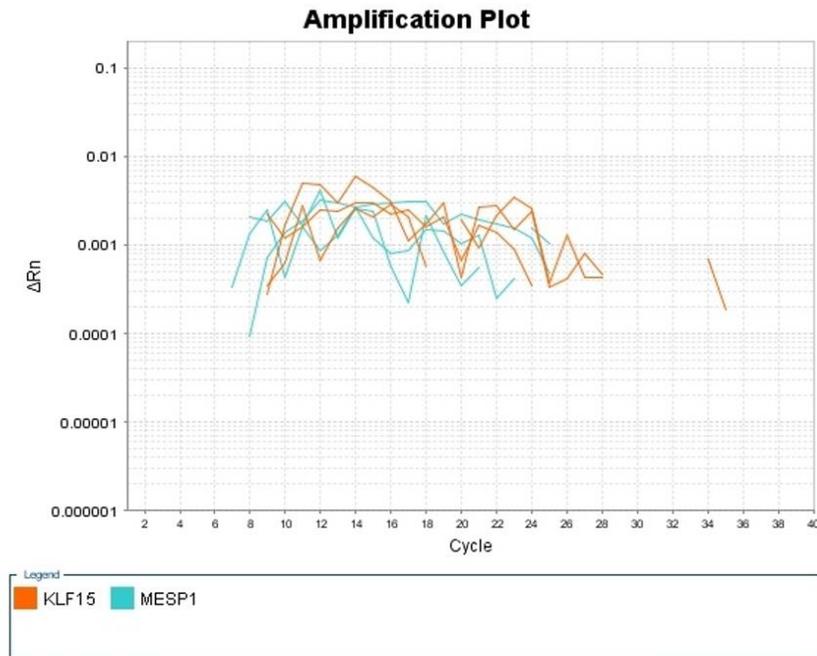


Figura 31. Resultados de la expresión basal de MESP1 y KLF15 en mMSCs. 7500 Fast Applied Biosystems®

Adicionalmente a esto, destacar que no existe una expresión basal o constitutiva de MESP1 y KLF15 en células mesenquimales de ratón (**Figura 31**). Con estos resultados podemos validar que la metodología de transfección realizada con nuestro sistema de plásmido de expresión transitoria cumple la temporalidad necesaria para generar la expresión de los genes en cuestión. Por lo tanto procedemos a realizar el ensayo de viabilidad para evaluar la eficiencia de transfección así como pruebas técnicas para la formación de esferoides mediante la técnica de cultivo de *hanging drops*.

8.4 Ensayo de viabilidad para la determinación de la eficiencia de transfección con el agente de selección Hygromicina.

Para evaluar la eficiencia de la transfección se realizó un ensayo de viabilidad utilizando el *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. Se evaluó el porcentaje de muerte celular obtenido tras añadir el agente de selección Hygromicina a 4 concentraciones ascendentes de 50 a 400 µg/mL en los dos diferentes grupos experimentales (Células transfectadas con el plásmido que incluye gen de resistencia para el agente de selección Hygromicina vs células no transfectadas sin resistencia a Hygromicina). Se incluyeron 2 mil células por pozo y se utilizó el medio de cultivo para la sustracción del blanco. La lectura de placa se realizó con el instrumento *Cytation®*. En el grupo transfectado se observó una diferencia significativa en el % de muerte a la concentración de 400 µg/mL con respecto al grupo control (42 vs 57% $p < 0.05$). Por tal motivo se selecciona esta condición para la selección de células transfectadas y así eliminar interferencia biológica de células no transfectadas en los procesos posteriores.

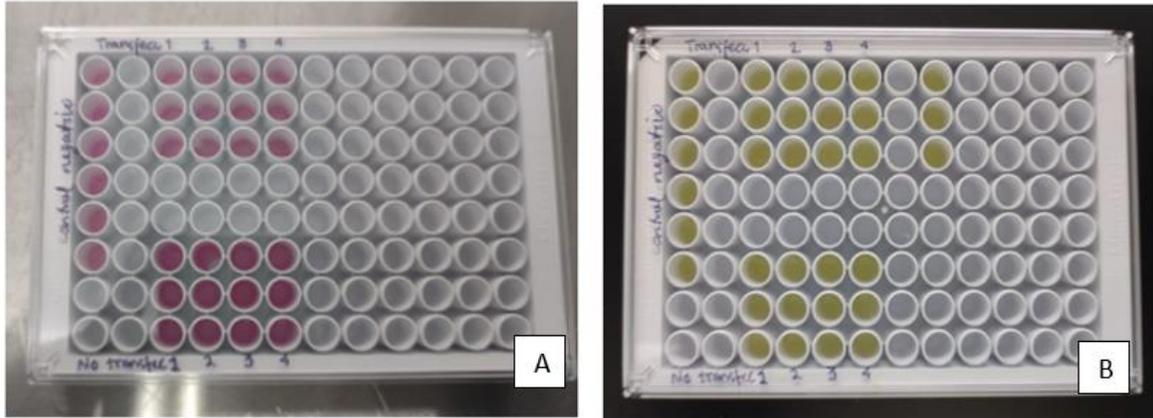


Figura 32. Ensayo de viabilidad *CellTiter-Glo*®. Cada grupo se analizó por triplicado. Se incluyen 6 pozos de control negativo sin transfectar, se compara grupo transfectado vs grupo sin transfectar a 4 concentraciones ascendentes de Higromicina a las 24 hrs (1, 2, 3, 4). Se utilizó medio de cultivo para la sustracción del blanco. **A)** previo a la reacción de la luciferina **B)** posterior a la adición de *CellTiter-Glo*® Reagent

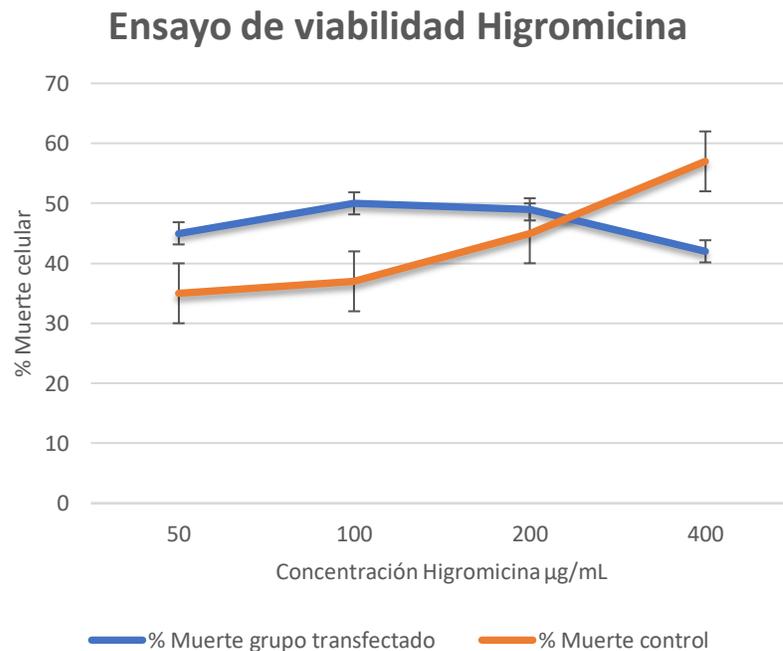


Figura 33. Gráfico de % de muerte celular. Se observa una mayor supervivencia a concentraciones de 50 a 150 µg/mL para el grupo no transfectado, sin embargo, a concentraciones de 400 µg/mL se invierte la supervivencia siendo mayor ahora en el grupo transfectado portador del gen de resistencia.

8.5 Establecimiento de condiciones de cultivo para la diferenciación cardíaca por medio de la formación de esferoides con la metodología de *Hanging drops*.

Para la formación de esferoides se realizó la siguiente técnica: Se tripsinizaron y centrifugaron las mMSCs creciendo en condiciones estándar de cultivo para posteriormente realizar un conteo celular con ayuda de un hematocitómetro y poder así generar una suspensión de 1500 células/20 μ L de medio de cultivo; lo que corresponde a 216,000 células en 2.8 mL de medio. La suspensión celular se homogenizó de manera constante y fue distribuida por pipeteo utilizando una micropipeta multicanal sobre la superficie interna de la tapa una caja de cultivo cuadrada de 120mm formando 12 hileras de 12 gotas de 20 μ L. Una vez distribuidas en la tapa, ésta se invierte cuidadosamente y se cierra sobre la caja de cultivo. Se agregaron 10 mL de PBS 1x en el interior de cada caja (**Figura 34.A**). Técnicamente fue posible la realización de ésta técnica de cultivo con varias repeticiones y se verificó la formación de esferoides por microscopía óptica en un microscopio invertido a las 72 horas (**Figura 34.B**).

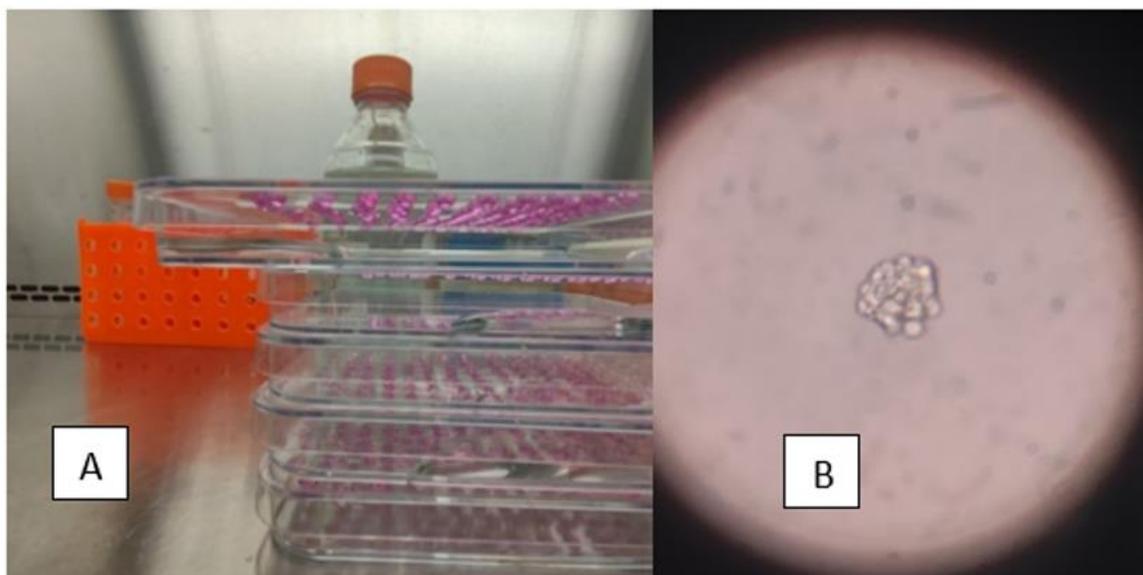


Figura 34. Generación de esferoides. A) Técnica de cultivo de esferoides por método de *Hanging drops*. **B)** Microscopía óptica 40x se observa un agregado celular tridimensional que corresponde a un esferoide de 72 horas. |

Transcurridos 5 días en cultivo en suspensión los cuerpos embrionarios fueron sembrados sobre placas de cultivo de 60mm bajo condiciones estándar y se observó viabilidad demostrada por su adherencia a la superficie. Cabe resaltar que el patrón de organización y crecimiento que se observó con los esferoides una vez adheridos a la superficie de cultivo aparenta tener sutiles cambios con respecto a las células mesenquimales de ratón que no son sujetas a este proceso de inducción. En estos esferoides se percibe una capacidad proliferativa ligeramente disminuida con respecto al cultivo primario y éstas células creciendo en adherencia presentan una cierta organización o patrón de crecimiento radial, donde las prolongaciones aparentan estar organizadas por grupos de células, además destacar la presencia de uniones intercelulares más estrechas. **(Figura 35 A y B)**

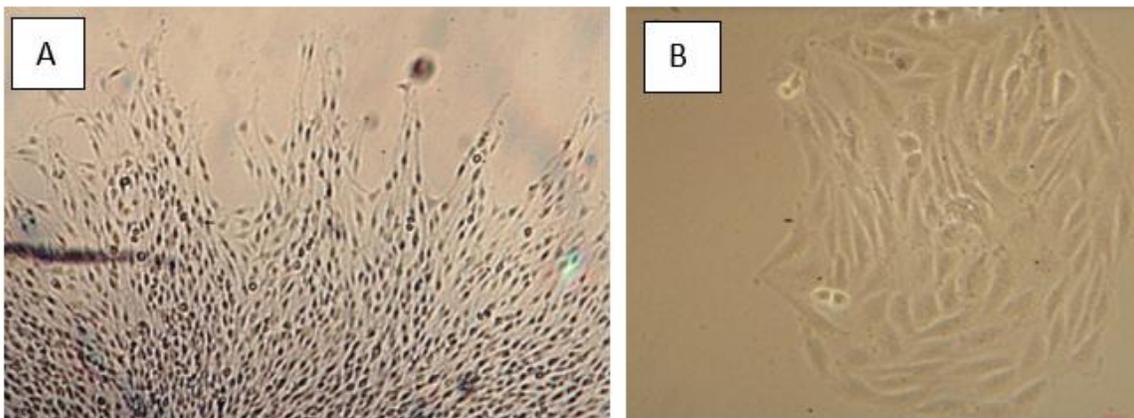


Figura 35. Microscopia óptica de esferoides en adherencia. A) Microscopia optica 10x esferoide de 5 días creciendo en adherencia. **B)** Microscopia optica 40x esferoide de 5 días: organización interna del esferoide.

8.6 Validación de los biomarcadores de pluripotencia de mMSCs.

Adicional a la realización de los esferoides por *Hanging drops* fue necesario realizar pruebas para la validación de primers por RTqPCR del gen endógeno GAPDH y de los genes de pluripotencia correspondientes a Nanog y Oct3/4. Se realizó a partir de la extracción de RNA y retrotranscripción de material obtenido de mMSCs en

condiciones de crecimiento estándar sin ningún tipo de inducción de la diferenciación ni transfección. Se obtuvo expresión de los genes de pluripotencia, así como también se validó la funcionalidad de los primers del gen endógeno GAPDH.

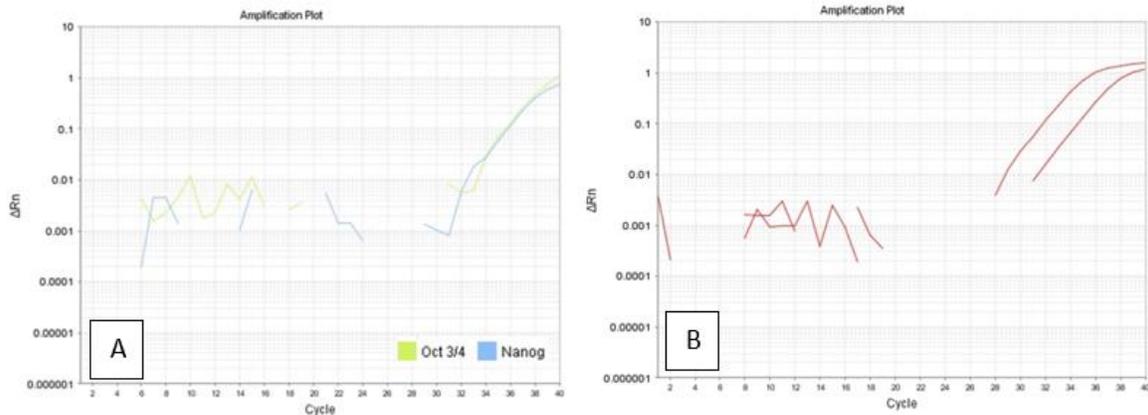


Figura 36. Resultados de la validación de la expresión de los genes de pluripotencia Oct3/4 y Nanog (A) y del gen endógeno GAPDH (B) en mMSCs. 7500 Fast Applied Biosystems®

8.7 Obtención de controles de expresión cardíaca

Adicionalmente fue necesario obtener tejido cardíaco proveniente de ratón para poder validar la expresión de biomarcadores cardíacos y el validar el funcionamiento de los cebadores, por lo cual fue necesario realizar el sacrificio de animales de experimentación cumpliendo con la normativa y aprobación del comité de bioética de la institución. Se obtuvieron por donación muestras de tejido cardíaco provenientes de ratones juveniles de 2 semanas de vida provenientes del bioterio de nuestra institución (**Figura 38.A**). A la muestra se le realizó un ensayo de disgregación celular enzimática con una solución de colagenasa y dispasa para el aislamiento de cardiomiocitos. Se logró el aislamiento de células cardíacas sin embargo su viabilidad se vio comprometida a largo plazo probablemente debido a

la falta de nutrientes presentes en la composición del medio acondicionado empleado.

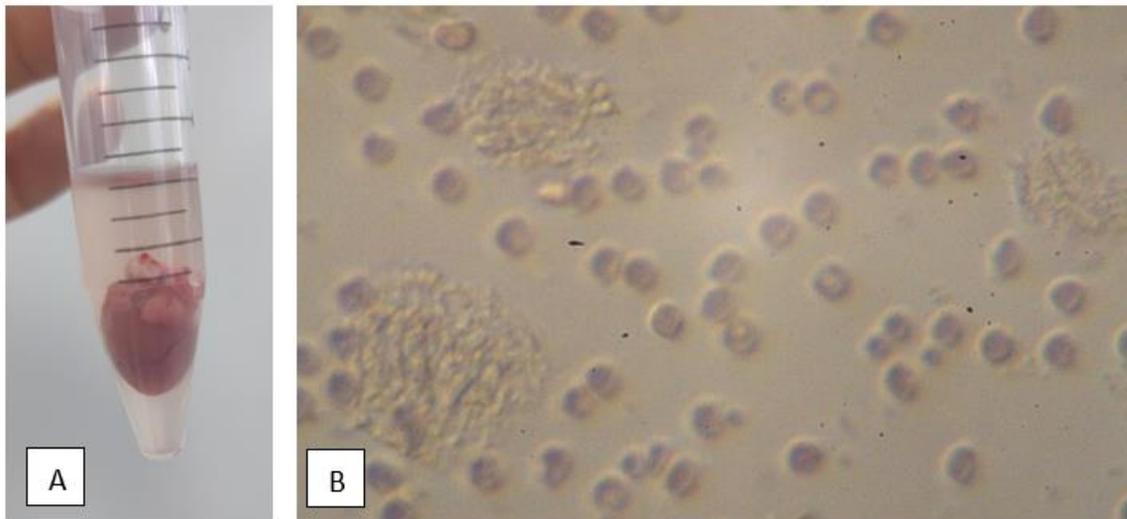


Figura 37. Obtención de muestras para el control positivo de diferenciación **A)** Corazón murino en suspensión con PBS1x. **B)** Aislamiento de cardiomiocitos a partir del órgano en fresco. Imagen obtenida posterior al ensayo de disgregación enzimática con Colagenasa/Dispasa.

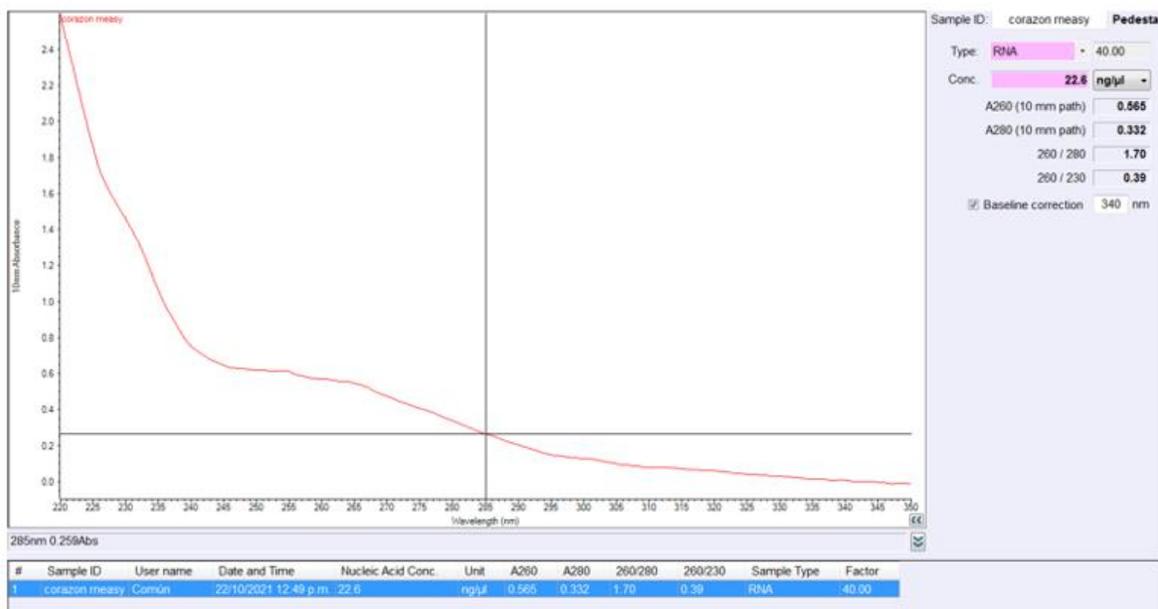


Figura 38. RNA obtenido de muestras de corazón. Extracción realizada con el kit *QIAGEN RNeasy*.

Posterior a la disgregación enzimática se realizó homogenización del tejido con nitrógeno líquido para la obtención de ARN siguiendo las recomendaciones del protocolo de *QIAGEN RNeasy® Mini kit* para muestras de tejidos. Se obtuvo un rendimiento de 22.6 ng/μL (**Figura 39**), tras varias repeticiones del protocolo, obteniendo material con la calidad necesaria para poder realizar la retro transcripción y posteriormente las pruebas por PCR para validar la expresión de genes de cardio especificación y del gen endógeno GAPDH (**Figura 40**).

8.8 Validación de biomarcadores de desarrollo cardíaco por PCR punto final y tiempo real.

A partir de la extracción de RNA de las muestras de tejido cardiaco se realizan las reacciones de retro transcripción con el kit *SuperScript VIL0®*. Se obtiene el cDNA, se cuantifica y posteriormente fueron realizadas las reacciones de amplificación para el gen endógeno GAPDH y uno de los biomarcadores cardíacos TBX5 por PCR en punto final. Se obtuvo amplificación de las secuencias blanco; para GAPDH se obtuvo un amplicón correspondiente a 123 pares de bases, y para TBX5 el fragmento esperado de 207 pares de bases (**Figura 40**).

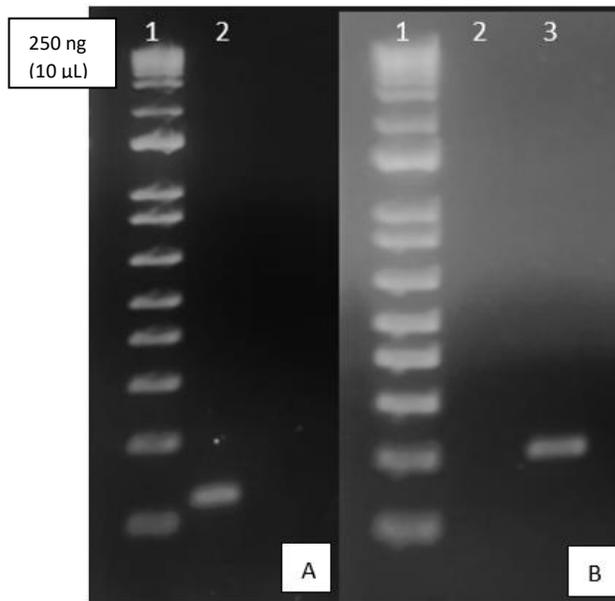


Figura 39. Productos de amplificación PCR punto final para GAPDH y TBX5. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. **A)** Carril 1: Escalera de peso molecular *1Kb plus – invitrogen®*. Carril 2: producto de amplificación del gen endógeno GAPDH por PCR punto final correspondiente al fragmento esperado de 123 pb. **B)** Carril 1: Escalera de peso molecular *1Kb plus – invitrogen®*. Carril 2: vacío. Carril 3: Producto de amplificación correspondiente gen cardíaco TBX5 del tamaño esperado 207 pb.

Posteriormente se realizaron los análisis de expresión del panel de los biomarcadores de cardio desarrollo por PCR en tiempo real incluyendo los genes GATA4, MEF2C, TBX5, NKX2.5 a partir de las muestras de tejido cardíaco juvenil de murino. Se obtuvo amplificación de los diferentes biomarcadores de diferenciación cardíaca. Tras el cálculo y la optimización de la concentración de cebadores se obtuvieron las curvas de disociación con picos únicos para las diferentes combinaciones de cebadores.

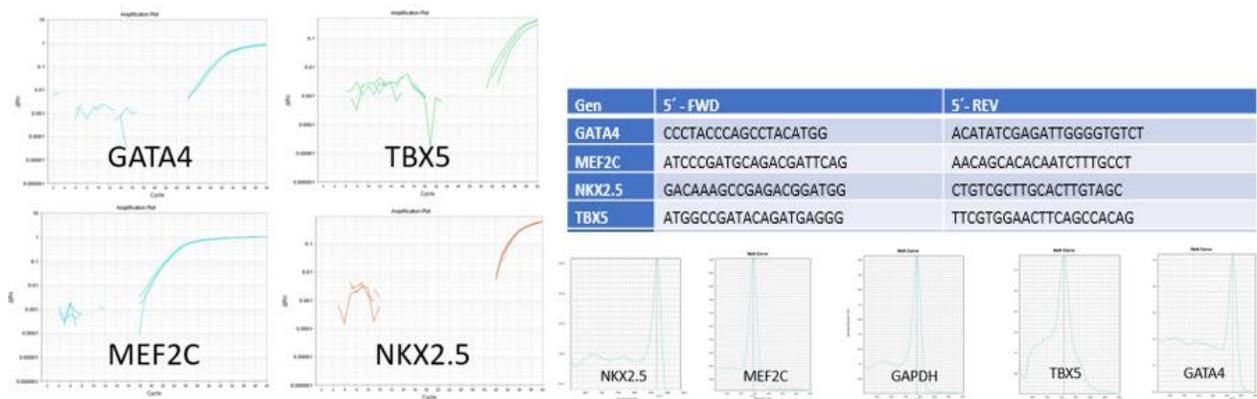


Figura 40. Resultados del panel de los biomarcadores de diferenciación cardiaca. Análisis de expresión a partir de las muestras del control de diferenciación (tejido cardiaco). *7500 Fast Applied Biosystems®*

8.9 Diferenciación de mMSCs a cardiomiocitos mediante la sobreexpresión de factores de transcripción y el cultivo de esferoides.

Una vez obtenida la purificación y caracterización de los plásmidos de MESP1 y KLF15, así como las condiciones para el cultivo de mMSCs, las condiciones para transfección de mMSCs y la técnica formación de esferoides se procedió a la realización de los triplicados biológicos combinando todas estas etapas en una estrategia o experimento general.

Como se observa en la **Figura 42**, se obtuvieron los grupos experimentales mediante la transfección de diferentes combinaciones de plásmidos en la línea celular de mMSCs: un grupo transfectado con MESP1, otro grupo transfectado con KLF15, otro grupo transfectado con ambos plásmidos de MESP1 y KLF15 a concentraciones equimolares y un último grupo transfectado sin incluir ningún vector. Para esto se sembraron un día previo 350,000 células por superficie. Aproximadamente a las 24 horas después las células se encontraron en una confluencia superior al 75% y se realizó la transfección de los complejos lipídicos (**Figura 42**). Al día siguiente se agregó el agente de selección y transcurridas 24 horas adicionales las células se tripsinizaron y centrifugaron para posteriormente ser contadas y generarse las suspensiones celulares a una concentración

aproximada de 1500 cels/20 μ L = 216,000 cels/2.8mL de la cual se generaron los esferoides por el método de *Hanging drops* previamente descrito.

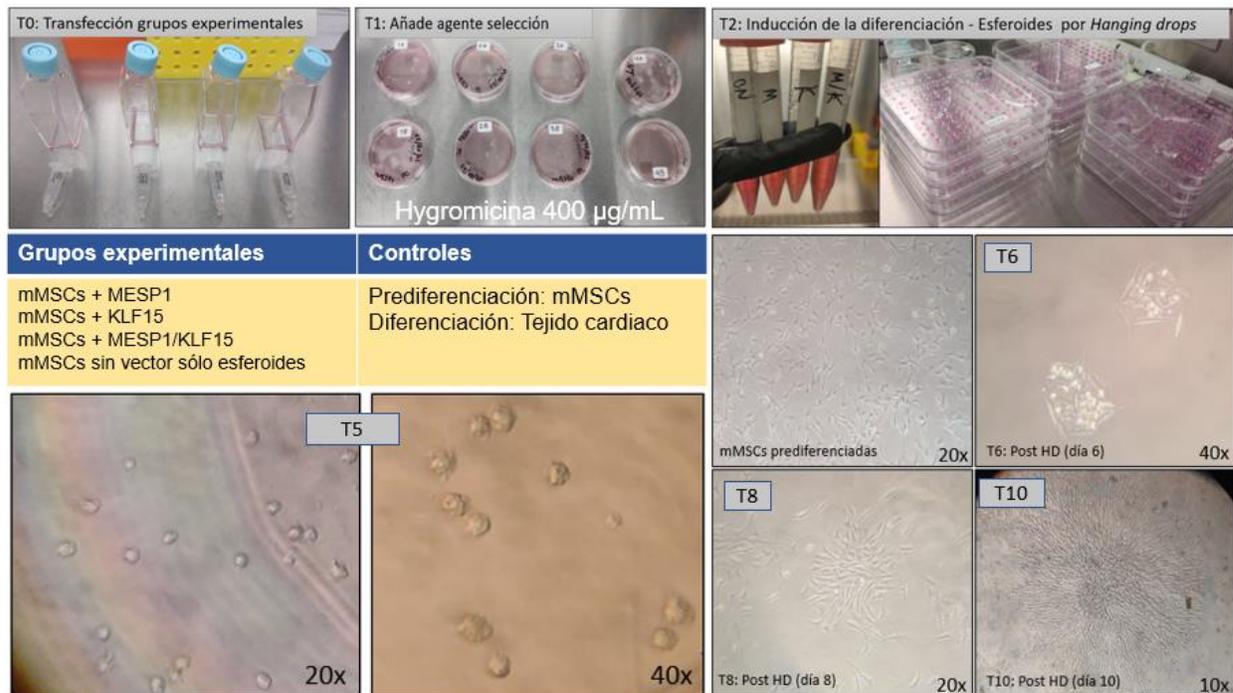


Figura 41. Protocolo de diferenciación de mMSCs a CPC. T0: Se generan los grupos experimentales mediante transfección de las distintas combinaciones de plásmidos. T1: Se añade el agente de selección a una concentración de 400 μ g/mL habiendo transcurridas 24 horas posterior a la transfección. T2: Las células viables son tripsinizadas, centrifugadas, contadas y resuspendidas para generar las suspensiones celulares de cada grupo experimental y proceder a la formación de esferoides. T5: los esferoides son colectados sobre nuevas placas y visualizados por microscopía óptica (20x y 40x). T6: Se observan los esferoides adheridos a la superficie de cultivo y con alta actividad mitótica y baja confluencia. T8: Se observan colonias de esferoides creciendo en adherencia el día 8 post transfección con grado de confluencia intermedia. T10: Se observan colonias de esferoides con alto grado de confluencia y empalizadas celulares a nivel central.

Una vez transcurrido el tiempo necesario en suspensión invertida los diferentes grupos experimentales los esferoides fueron colectados por arrastre sobre nuevas placas y visualizados por microscopía óptica (**Figura 42**). Se demostró la formación de múltiples agregados tridimensionales correspondientes a los esferoides o cuerpos embrionarios para cada una de las condiciones experimentales (**Figura 42**). Posteriormente cada grupo permaneció en cultivo en crecimiento en adherencia y se realizaron las extracciones de RNA para los análisis de expresión a los diferentes

tiempos los días 6, 8 y 10. Se obtuvieron colonias de células con morfología alargada y en estrecha relación unas con otras a diferencia del cultivo primario; se aprecian centros activos en el centro de una estructura con apariencia de volcán de donde aparentemente emana la mayor capacidad proliferativa de estas colonias (**Figura 42**).

8.10 Resultados de la expresión de biomarcadores cardiacos por qPCR para la validación del proceso de diferenciación.

Para el análisis de expresión de biomarcadores cardiacos se procesaron triplicados biológicos para cada condición experimental. De ellas se generaron las extracciones. Cada una de estas muestras después de procesadas se analizó por triplicado por medio de qPCR. El cálculo de la expresión relativa fue realizado mediante el cálculo del $\Delta\Delta Ct$ para así obtener el cambio en la expresión o el *Fold Change*. Los resultados se presentan a continuación a manera de mapa de calor donde se permite observar los mecanismos de activación a lo largo de los tiempos evaluados (**Figura 43**). Los colores se representan mediante una escala colorimétrica que simboliza los cambios en la expresión obtenidos del *Fold Change*. Para TBX5, se observó expresión constitutiva en tejido cardiaco; expresión constitutiva ausente en la línea mMSCs pre diferenciadas; el grupo transfectado con KLF15 mostro la activación más importante de TBX5 a partir del día 6 de forma sostenida en los tiempos evaluados con un cambio en la expresión estadísticamente significativo ($FC = >1.2$, $p < 0.05$) (**Figura 43**). El grupo transfectado con MESP1 no logra la sobreexpresión de TBX5 a ninguno de los tiempos evaluados. La combinación de MESP1 Y KLF15 no pareció traer consigo aumento en la expresión de TBX5. La técnica de inducción a la diferenciación por medio de formación de esferoides fue capaz de aumentar la expresión de TBX5 al último tiempo evaluado (D10)(**Figura 43**).

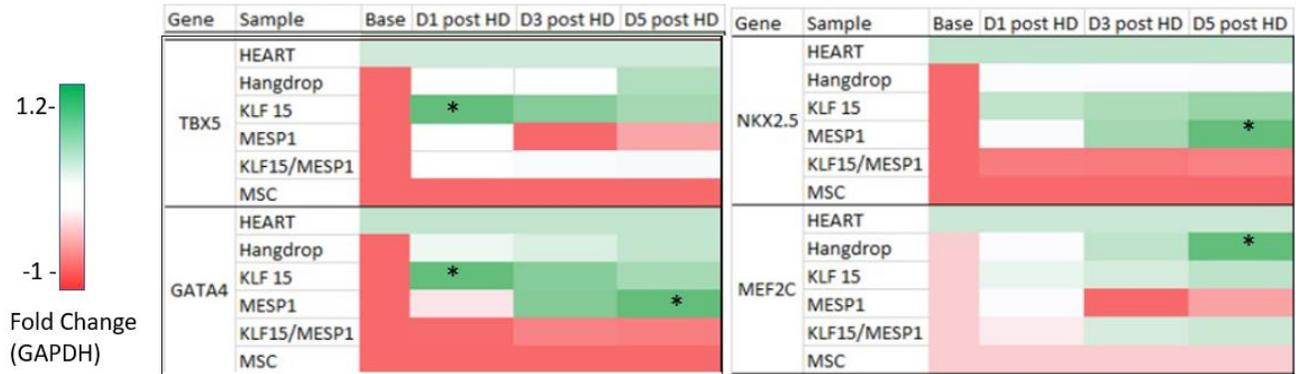


Figura 42. Validación del proceso de diferenciación. Mapa de calor que muestra los cambios de expresión de los diferentes biomarcadores de desarrollo cardiaco por qPCR. (*Post HD** = posterior al cultivo en *Hanging drops*).

Para NKX2.5 se observó expresión constitutiva en tejido cardiaco; expresión constitutiva ausente en la línea mMSCs pre diferenciadas; el grupo de esferoides sin transfección de vector no produce aumento en la expresión de NKX2.5; el grupo transfectado con KLF15 logra un aumento en la expresión de NKX2.5 sin embargo lo hace a partir del día 6 (D1 PHD) a diferencia del grupo transfectado con MESP1, del cual también se observó produce un aumento la expresión de NKX2.5 pero a partir del día 8, sin embargo al día 10 logra la mayor activación siendo estadísticamente significativa ($FC = >1.2$, $p < 0.05$) (**Figura 43**).

Con GATA4 se observó expresión constitutiva en las células de tejido cardiaco; no se encontraron cambios en la expresión en la línea mMSCs pre diferenciadas; el grupo transfectado como KLF15 muestra una sobreexpresión significativa de GATA4, más acentuada al día 6 pero que permaneció latente hasta el día 10; el grupo transfectado con MESP1 produce sobreexpresión significativa de GATA4 para el día 10 ($FC = >1.2$, $p < 0.05$). El grupo transfectado con ambos vectores paradójicamente no produce el efecto en la sobreexpresión de GATA4. (**Figura 43**)

Para MEF2C también se observó expresión constitutiva en tejido cardiaco; expresión ausente en la línea de mMSCs; se obtuvo sobreexpresión de MEF2C de forma significativa en el grupo transfectado sin vector que únicamente fue influido por las condiciones de cultivo en *hanging drops* ($FC = >1.2$, $p < 0.05$). Del grupo

transfectado con KLF15 se obtuvo también un perfil de sobreexpresión que permaneció a lo largo de los tiempos evaluados; El grupo transfectado con MESP1 no fue capaz de promover la sobreexpresión del factor de transcripción MEF2C (**Figura 43**).

IX. Discusión

La obtención de CPCs a partir de MSCs representa una opción prometedora en el tratamiento de secuelas cardiovasculares debido a la capacidad que tienen estas células de integrarse en el tejido lesionado y promover efectos regenerativos. Como se viene mencionando estas células pluripotentes pueden aislarse de múltiples tejidos y manipularse para dirigir su diferenciación; La capacidad que tienen para diferenciarse con facilidad a los derivados mesodérmicos las hace un blanco atractivo para desarrollo de terapias celulares que se basen en diferenciación celular (Liu et al 2016).

Existen múltiples enfoques y protocolos existentes para la diferenciación de células madre pluripotentes a CPCs. Aquellos que emplean la transfección como método de entrega de genes producen rendimientos variables, pese a ser un procedimiento sencillo, particularmente en MSCs (Carvalho et. al 2018). En contraste con los vectores virales, los plásmidos de expresión presentan una menor eficiencia de transfección sin embargo en términos generales suele ser más seguro el trabajar con plásmidos, ya que poseen baja inmunogenicidad y poca capacidad oncogénica. Además, el proceso de generación de las partículas virales también suele ser un proceso complicado y tedioso que requiere de muchos controles. Como aproximación inicial consideramos adecuado el empleo de plásmidos de expresión para observar el efecto de la sobreexpresión de MESP1 y KLF15 en el proceso de diferenciación cardíaca (Hartman et al., 2014).

Nosotros evaluamos la eficiencia de la transfección mediante supervivencia de la línea celular en presencia del agente de selección. Utilizando el método de protocolo de Lipofectamina obtuvimos una eficiencia de aproximadamente hasta 58% en

MSCs muy similar con respecto a lo reportado en otras líneas celulares (10-40%). En la actualidad no existen muchos protocolos con transfección de MSCs (de Carvalho et al., 2018; Y. W. Liu et al., 2018).

Los factores de transcripción que nosotros utilizamos pertenecen a distintas etapas del desarrollo embrionario cardiaco y ambas tienen efecto sobre la vía de señalización de Wnt, el efecto que produce MESP1 promueve la diferenciación del mesodermo cardiaco hacia un cambio de clase que permite el desarrollo de estructuras miofibrilares en el interior de la célula permitiendo la especificación del músculo cardíaco. Más adelante en el proceso de maduración KLF15 es un importante regulador de la proliferación del músculo cardiaco en el periodo posnatal y por ello al combinar estos factores se pretende llevar a la célula pluripotente a un perfil de expresión similar al periodo perinatal (Burridge et al., 2011).

Nuestros resultados indican que la combinación de la sobreexpresión MESP1 y KLF15 a los mismos tiempos no produce un mayor efecto sinérgico en comparación a los efectos promovidos por cada uno de estos factores de transcripción *per se*.

La técnica de formación de esferoides por *Hanging drops* promueve la expresión de biomarcadores de desarrollo cardiaco en células mesenquimales de ratón de forma similar a lo reportado en iPSCs. Se ha observado que células inducidas a la diferenciación por medio de la formación de esferoides generan cambios en la expresión que resultan en latido espontaneo tras el cultivo (Medley et al 2013).

Resulta necesario en base a lo obtenido en nuestros experimentos extender los tiempos de evaluación para observar la movilización de genes y la expresión de proteínas que se logra con esta técnica a días posteriores. A si mismo explorar la reproducibilidad en distintas líneas celulares (embrionarias, mesenquimales humanas, fibroblastos) (Kokkinopoulos et al., 2016b; Medley et al., 2013; Mummery et al., 2012b; Pucéat, 2008).

Nuestro método produce expresión transitoria; como aproximación inicial permite conocer mecanismos de activación y vías de señalización, pero desarrollar sistemas de expresión constitutiva y regulados como lo son sistemas lentivirales permitiría

obtener perfiles de expresión más estables y con ello obtener una idea más clara de los eventos modificadores de la diferenciación. El promotor EF1a se ha reportado estable y que produce alta eficiencia de transfección, alto número de copias y estabilidad del transgén en condiciones de cultivo prolongado inclusive sin generar la presión selectiva de un agente de selección. Nosotros decidimos realizar la selección con Hygromicina para eliminar la posible interferencia biológica en la expresión que pudieran estar generando células mesenquimales no transfectadas. Quizás estas características de la región promotora sean responsables de la ausencia de sinergia entre ambos vectores de expresión (Wang et al., 2017).

La utilización de péptidos de señalización es otro enfoque bastante común, sin embargo, la producción de proteína recombinante es costosa, por tal motivo la suplementación con péptidos no fue el enfoque inicial que se decidió tener en primera instancia (Y. Liu & Schwartz, 2012).

La intención de este trabajo consistió en utilizar combinaciones de genes alternativos a GMT para buscar promover la diferenciación de células cardíacas. Resulta muy importante continuar la búsqueda de nuevos blancos génicos para la reprogramación de células cardíacas a CPCs. El apoyo con herramientas bioinformáticas es crucial para el desarrollo de estas terapias y tecnologías que lleven a cabo procesos complejos (den Hartogh et al., 2016a; Islas et al., 2012).

Una optimización profunda de la diferenciación de mayor profundidad pudiera involucrar péptidos inhibidores, silenciamiento por RNAi y cultivo en presencia de elementos de la matriz extracelular, así como suplementos adicionados al medio de cultivo (Aminas, Insulina, "Claycomb") (de Carvalho et al., 2018; Francisco et al., 2012; Qian et al., 2012).

X. Conclusión

mMSCs en su estado basal no expresan MESP1 ni KLF15.

La sobreexpresión transitoria de MESP1 y/o KLF15 posterior a la formación de esferoides indujo a la activación temprana de genes de compromiso cardiaco (GMT).

KLF15 resultó ser más potente que MESP1 como activador de los genes centrales de compromiso cardiaco.

La expresión transitoria de ambos vectores de expresión MESP1 y KLF15 a concentraciones equimolares no produce efectos sinérgicos en la diferenciación cardiaca en las condiciones analizadas.

XI . Perspectivas

No se había utilizado MESP1 y KLF15 previamente para la diferenciación de células mesenquimales hacia progenitoras cardiacas.

Estos resultados permiten avanzar la experimentación hacia el análisis de expresión proteica y posteriormente el reto en el modelo animal.

Por su relevancia clínica, la diferenciación de células madre mesenquimales a progenitores cardiacos permite ofrecer nuevas soluciones para los problemas actuales.

XII. Referencias :

- Abad, M., Hashimoto, H., Zhou, H., Morales, M. G., Chen, B., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2017). Notch Inhibition Enhances Cardiac Reprogramming by Increasing MEF2C Transcriptional Activity. *Stem Cell Reports*, 8(3), 548–560. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.025>
- Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Jovinge, S., Frisén, J., Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabheider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., ... Frisén, J. (2009). Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science*, 324(5923), 98–102. <https://doi.org/10.1126/science.1164680.Evidence>
- Bondue, A., & Blanpain, C. (2010). Mesp1: A key regulator of cardiovascular lineage commitment. In *Circulation Research* (Vol. 107, Issue 12, pp. 1414–1427). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227058>
- Bondue, A., Lapouge, G., Paulissen, C., Semeraro, C., Iacovino, M., Kyba, M., & Blanpain, C. (2008). Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell*, 3(1), 69–84. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.06.009>
- Burridge, P. W., Keller, G., Gold, J. D., & Wu, J. C. (2011). Review Production of De Novo Cardiomyocytes : Human Pluripotent Stem Cell Differentiation and Direct Reprogramming. *Stem Cell*, 10(1), 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.12.013>
- 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. In *Cell Stem Cell* (Vol. 10, Issue 1, pp. 16–28). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.12.013>
- Cai, C. L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P. H., Pfaff, S. L., Chen, J., & Evans, S. (2003). Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Developmental Cell*, 5(6), 877–889. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00363-0](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00363-0)
- Chen, X. (2019). A Roadmap to Non-Hematopoietic Stem Cell-based Therapeutics. In *A Roadmap to Non-Hematopoietic Stem Cell-based Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/c2016-0-02041-7>
- Chiapparo, G., Lin, X., Lescroart, F., Chabab, S., Paulissen, C., Pitisci, L., Bondue, A., & Blanpain, C. (2016). Mesp1 controls the speed, polarity, and directionality of cardiovascular progenitor migration. *Journal of Cell Biology*, 213(4), 463–477. <https://doi.org/10.1083/jcb.201505082>
- de Bakker, D. E. M., Bouwman, M., Dronkers, E., Simões, F. C., Riley, P. R., Goumans, M. J., Smits, A. M., & Bakkens, J. (2021). Prrx1b restricts fibrosis and promotes Nrg1-dependent cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration. *Development (Cambridge)*, 148(19), 1–13. <https://doi.org/10.1242/DEV.198937>

- de Carvalho, T. G., Pellenz, F. M., Laureano, A., da Rocha Silla, L. M., Giugliani, R., Baldo, G., & Matte, U. (2018). A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells. *Biotechnology Letters*, 40(3), 617–622. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2505-8>
- den Hartogh, S. C., Wolstencroft, K., Mummery, C. L., & Passier, R. (2016a). A comprehensive gene expression analysis at sequential stages of in vitro cardiac differentiation from isolated MESP1-expressing-mesoderm progenitors. *Scientific Reports*, 6(November 2015), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep19386>
- den Hartogh, S. C., Wolstencroft, K., Mummery, C. L., & Passier, R. (2016b). A comprehensive gene expression analysis at sequential stages of in vitro cardiac differentiation from isolated MESP1-expressing-mesoderm progenitors. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep19386>
- Diego Francoa, Jorge Domínguez, María del Pilar de Castro, & Amelia Aránega. (2002). *Regulación de la expresión génica en el miocardio durante el desarrollo cardíaco | Revista Española de Cardiología*. <https://www.revespcardiol.org/es-regulacion-expresion-genica-el-miocardio-durante-articulo-13026389>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Duan, Y., Zhu, W., Liu, M., Ashraf, M., & Xu, M. (2017). The expression of smad signaling pathway in myocardium and potential therapeutic effects. In *Histology and Histopathology* (Vol. 32, Issue 7, pp. 651–659). Histology and Histopathology. <https://doi.org/10.14670/HH-11-845>
- Eguizabal, C., Aran, B., Lopes, S. M. C. D. S., Geens, M., Heindryckx, B., Panula, S., Popovic, M., Vassena, R., & Veiga, A. (2019). *Two decades of embryonic stem cells : a historical overview*. 1–17. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoy024>
- Francisco, J., Liu, Y., Weng, K., Robertson, M. J., Zhang, S., & Prejusa, A. (2012). *Transcription factors ETS2 and MESP1 transdifferentiate human dermal fibroblasts into cardiac progenitors*. 2–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120299109/-/DCSupplemental>. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1120299109
- Frangogiannis, N. G. (2017a). The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 127, Issue 5, pp. 1600–1612). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI87491>
- Frangogiannis, N. G. (2017b). The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 127, Issue 5, pp. 1600–1612). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI87491>
- Fu, X., Zhao, A., & Hu, T. (n.d.). *Cellular Dedifferentiation and Regenerative Medicine*.

- Gemberling, M., Karra, R., Dickson, A. L., & Poss, K. D. (2015). *Nrg1 is an injury-induced cardiomyocyte mitogen for the endogenous heart regeneration program in zebrafish*. 1–17. <https://doi.org/10.7554/eLife.05871>
- González-Vílchez, F., Almenar-Bonet, L., Crespo-Leiro, M. G., Gómez-Bueno, M., González-Costello, J., Pérez-Villa, F., Delgado-Jiménez, J. F., Arizón del Prado, J. M., Sobrino-Márquez, J. M., & Valero-Masa, M. J. (2021). Spanish Heart Transplant Registry. 32nd Official Report of the Heart Failure Association of the Spanish Society of Cardiology. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 74(11), 962–970. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2021.08.001>
- Hartman, M. E., Librande, J. R., Medvedev, I. O., Ahmad, R. N., Moussavi-Harami, F., Gupta, P. P., Chien, W. M., & Chin, M. T. (2014). An optimized and simplified system of mouse embryonic stem cell cardiac differentiation for the assessment of differentiation modifiers. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093033>
- Heart, H., Bergmann, O., Zdunek, S., Felker, A., Jovinge, S., Druid, H., Frise, J., Bergmann, O., Zdunek, S., Felker, A., Salehpour, M., Alkass, K., & Bernard, S. (2015). *Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Article Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart*. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.026>
- Hesham A., S., & Ahmed I., M. (2013). Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/nature12054>.Meis1
- Hu, X., Eastman, A. E., & Guo, S. (2019). Cell cycle dynamics in the reprogramming of cellular identity. *FEBS Letters*, 593(20), 2840–2852. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13625>
- Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., & Srivastava, D. (2010). Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 142(3), 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.002>
- Islas, J. F., Liu, Y., Weng, K. C., Robertson, M. J., Zhang, S., Prejusa, A., Harger, J., Tikhomirova, D., Chopra, M., Iyer, D., Mercola, M., Oshima, R. G., Willerson, J. T., Potaman, V. N., & Schwartz, R. J. (2012a). Transcription factors ETS2 and MESP1 transdifferentiate human dermal fibroblasts into cardiac progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(32), 13016–13021. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120299109>
- Islas, J. F., Liu, Y., Weng, K. C., Robertson, M. J., Zhang, S., Prejusa, A., Harger, J., Tikhomirova, D., Chopra, M., Iyer, D., Mercola, M., Oshima, R. G., Willerson, J. T., Potaman, V. N., & Schwartz, R. J. (2012b). Transcription factors ETS2 and MESP1 transdifferentiate human dermal fibroblasts into cardiac progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(32), 13016–13021. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120299109>
- Kokkinopoulos, I., Ishida, H., Saba, R., Coppen, S., Suzuki, K., & Yashiro, K. (2016a). Cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cells using a simple and defined protocol. *Developmental Dynamics*, 245(2), 157–165. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24366>
- Kokkinopoulos, I., Ishida, H., Saba, R., Coppen, S., Suzuki, K., & Yashiro, K. (2016b). *Cardiomyocyte Differentiation From Mouse Embryonic Stem Cells Using a Simple and Defined Protocol*. 157–165. <https://doi.org/10.1002/DVDY.24366>

- Kosovsky, M. (2013). Culture Conditions and ECM Surfaces Utilized for the Investigation of Stem Cell Differentiation. *Corning Incorporated*, 1–16.
- Laflamme, M. A., & Murry, C. E. (2014). Heart Regeneration. *Nature*, *473*(7347), 326–335. <https://doi.org/10.1038/nature10147.Heart>
- Liu, Y., Chen, L., Diaz, A. D., Benham, A., Xu, X., Wijaya, C. S., Fa'Ak, F., Luo, W., Soibam, B., Azares, A., Yu, W., Lyu, Q., Stewart, M. D., Gunaratne, P., Cooney, A., McConnell, B. K., & Schwartz, R. J. (2016a). Mesp1 Marked Cardiac Progenitor Cells Repair Infarcted Mouse Hearts. *Scientific Reports*, *6*(July), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep31457>
- Liu, Y., Chen, L., Diaz, A. D., Benham, A., Xu, X., Wijaya, C. S., Fa'Ak, F., Luo, W., Soibam, B., Azares, A., Yu, W., Lyu, Q., Stewart, M. D., Gunaratne, P., Cooney, A., McConnell, B. K., & Schwartz, R. J. (2016b). Mesp1 Marked Cardiac Progenitor Cells Repair Infarcted Mouse Hearts. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep31457>
- Liu, Y., & Schwartz, R. J. (2012a). *Commentaries on Cutting Edge Science Reprogrammed Cardiac Fibroblasts to the Rescue of Heart Failure*. 831–832. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.279745>
- Liu, Y., & Schwartz, R. J. (2012b). *Commentaries on Cutting Edge Science Reprogrammed Cardiac Fibroblasts to the Rescue of Heart Failure*. 831–832. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.279745>
- Liu, Y. W., Chen, B., Yang, X., Fugate, J. A., Kalucki, F. A., Futakuchi-Tsuchida, A., Couture, L., Vogel, K. W., Astley, C. A., Baldessari, A., Ogle, J., Don, C. W., Steinberg, Z. L., Seslar, S. P., Tuck, S. A., Tsuchida, H., Naumova, A. v., Dupras, S. K., Lyu, M. S., ... Murry, C. E. (2018). Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nature Biotechnology*, *36*(7), 597–605. <https://doi.org/10.1038/nbt.4162>
- Lo, B., & Parham, L. (2009). Ethical issues in stem cell research. *Endocrine Reviews*, *30*(3), 204–213. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0031>
- Locatelli, P., Giménez, C. S., Vega, M. U., Crottogini, A., & Belaich, M. N. (2018). Targeting the Cardiomyocyte Cell Cycle for Heart Regeneration. *Current Drug Targets*, *20*(2), 241–254. <https://doi.org/10.2174/1389450119666180801122551>
- Lynch, A. T., Mazzota, S., & Hoppler, S. (2001). Chapter 4. Cardiomyocyte Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells. *Language, Society and Power. An Introduction*, *3*(Chapter 4), 56–74.
- Medley, T. L., Furtado, M., Lam, N. T., Idrizi, R., Williams, D., Verma, P. J., Costa, M., & Kaye, D. M. (2013). *Effect of Oxygen on Cardiac Differentiation in Mouse iPS Cells : Role of Hypoxia Inducible Factor-1 and Wnt / Beta- Catenin Signaling*. *8*(11), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080280>
- Mummery, C. L., Zhang, J., Ng, E., Elliott, D. A., Elefanty, A. G., & Kamp, T. J. (2012a). Differentiation of Human ES and iPS Cells to Cardiomyocytes: A Methods Overview.

- Circulation Research*, 111(July 2012), 344–358.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227512.Differentiation>
- Mummery, C. L., Zhang, J., Ng, E., Elliott, D. A., Elefanty, A. G., & Kamp, T. J. (2012b). Differentiation of Human ES and iPS Cells to Cardiomyocytes: A Methods Overview. *Circulation Research*, 111(July 2012), 344–358.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227512.Differentiation>
- Noack, C., Haupt, L. P., Zimmermann, W. H., Streckfuss-Bömeke, K., & Zelarayán, L. C. (2017a). Generation of a KLF15 homozygous knockout human embryonic stem cell line using paired CRISPR/Cas9n, and human cardiomyocytes derivation. *Stem Cell Research*, 23, 127–131.
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.07.007>
- Noack, C., Iyer, L. M., Liaw, N. Y., Schoger, E., Khadjeh, S., Wagner, E., Woelfer, M., Milting, H., Sossalla, S., Streckfuss-boemeke, K., & Zimmermann, W. (2019). *KLF15-Wnt – Dependent Cardiac Reprogramming Up-Regulates SHISA3 in the Mammalian Heart*. 74(14).
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.07.076>
- Noack, C., Iyer, L. M., Liaw, N. Y., Schoger, E., Khadjeh, S., Wagner, E., Woelfer, M., Zafiriou, M. P., Milting, H., Sossalla, S., Streckfuss-Boemeke, K., Hasenfuß, G., Zimmermann, W. H., & Zelarayán, L. C. (2019a). KLF15-Wnt–Dependent Cardiac Reprogramming Up-Regulates SHISA3 in the Mammalian Heart. *Journal of the American College of Cardiology*, 74(14), 1804–1819. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.07.076>
- Noack, C., Iyer, L. M., Liaw, N. Y., Schoger, E., Khadjeh, S., Wagner, E., Woelfer, M., Zafiriou, M. P., Milting, H., Sossalla, S., Streckfuss-Boemeke, K., Hasenfuß, G., Zimmermann, W. H., & Zelarayán, L. C. (2019b). KLF15-Wnt–Dependent Cardiac Reprogramming Up-Regulates SHISA3 in the Mammalian Heart. *Journal of the American College of Cardiology*, 74(14), 1804–1819. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.07.076>
- Oh, H., & Schneider, M. (2009a). Cardiac muscle plasticity in adult embryo by Hearth-derived progenitor cells. *Annals New York Academy of Science*, 67, 1–8.
- Oh, H., & Schneider, M. (2009b). Cardiac muscle plasticity in adult embryo by Hearth-derived progenitor cells. *Annals New York Academy of Science*, 67, 1–8.
- Ommen, S. R., Mital, S., Burke, M. A., Day, S. M., Deswal, A., Elliott, P., Evanovich, L. L., Hung, J., Joglar, J. A., Kantor, P., Kimmelstiel, C., Kittleson, M., Link, M. S., Maron, M. S., Martinez, M. W., Miyake, C. Y., Schaff, H. V., Semsarian, C., & Sorajja, P. (2020). 2020 AHA/ACC Guideline for the Diagnosis and Treatment of Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(25), e159–e240.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.08.045>
- Parikh, A., Wu, J., Blanton, R. M., & Tzanakakis, E. S. (2015a). Signaling Pathways and Gene Regulatory Networks in Cardiomyocyte Differentiation. In *Tissue Engineering - Part B: Reviews* (Vol. 21, Issue 4, pp. 377–392). Mary Ann Liebert Inc.
<https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0662>

- Parikh, A., Wu, J., Blanton, R. M., & Tzanakakis, E. S. (2015b). Signaling Pathways and Gene Regulatory Networks in Cardiomyocyte Differentiation. In *Tissue Engineering - Part B: Reviews* (Vol. 21, Issue 4, pp. 377–392). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0662>
- Pucéat, M. (2008a). *Protocols for cardiac differentiation of embryonic stem cells*. 45, 168–171. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.03.003>
- Pucéat, M. (2008b). *Protocols for cardiac differentiation of embryonic stem cells*. 45, 168–171. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.03.003>
- Qian, L., Huang, Y., Spencer, C. I., Foley, A., Vedantham, V., Liu, L., Conway, S. J., Fu, J. D., & Srivastava, D. (2012). In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*, 485(7400), 593–598. <https://doi.org/10.1038/nature11044>
- Raso, A., Dirkx, E., Sampaio-Pinto, V., el Azzouzi, H., Cubero, R. J., Sorensen, D. W., Ottaviani, L., Olieslagers, S., Huibers, M. M., de Weger, R., Siddiqi, S., Moimas, S., Torrini, C., Zentillin, L., Braga, L., Nascimento, D. S., da Costa Martins, P. A., van Berlo, J. H., Zacchigna, S., ... de Windt, L. J. (2021). A microRNA program regulates the balance between cardiomyocyte hyperplasia and hypertrophy and stimulates cardiac regeneration. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25211-4>
- Riching, A. S., & Song, K. (2021). Cardiac Regeneration: New Insights Into the Frontier of Ischemic Heart Failure Therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(January). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.637538>
- Roacho-Pérez, J. A., Garza-Treviño, E. N., Moncada-Saucedo, N. K., Carriquiry-Chequer, P. A., Valencia-Gómez, L. E., Matthews, E. R., Gómez-Flores, V., Simental-Mendía, M., Delgado-Gonzalez, P., Delgado-Gallegos, J. L., Padilla-Rivas, G. R., & Islas, J. F. (2022). Artificial Scaffolds in Cardiac Tissue Engineering. In *Life* (Vol. 12, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/life12081117>
- Singh, V. P., Pinnamaneni, J. P., Pugazenthi, A., Sanagasetti, D., Mathison, M., Wang, K., Yang, J., & Rosengart, T. K. (2020). Enhanced generation of induced cardiomyocytes using a small-molecule cocktail to overcome barriers to cardiac cellular reprogramming. *Journal of the American Heart Association*, 9(12). <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.015686>
- Soibam, B., Benham, A., Kim, J., Weng, K. C., Yang, L., Xu, X., Robertson, M., Azares, A., Cooney, A. J., Schwartz, R. J., & Liu, Y. (2015). Genome-wide identification of MESP1 targets demonstrates primary regulation over mesendoderm gene activity. *Stem Cells*, 33(11), 3254–3265. <https://doi.org/10.1002/stem.2111>
- Sun, C., & Kontaridis, M. I. (2018a). Physiology of cardiac development: from genetics to signaling to therapeutic strategies. In *Current Opinion in Physiology* (Vol. 1, pp. 123–139). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2017.09.002>
- Sun, C., & Kontaridis, M. I. (2018b). Physiology of cardiac development: from genetics to signaling to therapeutic strategies. In *Current Opinion in Physiology* (Vol. 1, pp. 123–139). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2017.09.002>

- Szydlak, R. (2019). *Mesenchymal stem cells ' homing and cardiac tissue repair **. 66(4), 483–489.
- 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*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Thomson, J. A., Itskovitz-eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). *Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts*. 282(November), 1145–1148.
- Timmis, A., Townsend, N., Gale, C. P., Torbica, A., Lettino, M., Petersen, S. E., Mossialos, E. A., Maggioni, A. P., Kazakiewicz, D., May, H. T., De Smedt, D., Flather, M., Zuhlke, L., Beltrame, J. F., Huculeci, R., Tavazzi, L., Hindricks, G., Bax, J., Casadei, B., ... Bardinet, I. (2020). European society of cardiology: Cardiovascular disease statistics 2019. *European Heart Journal*, 41(1), 12–85. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz859>
- Valente Echeverri-Rico, J., Aceves-Millán, R., Amezcua-Gómez, L., Haroldo Ixcamparij-Rosales, C., Ruiz-Rivero, A., Torres, A., & Majluf-Cruz, A. (2014). Temas de actualidad Insuficiencia cardiaca Trascendencia y utilidad de la evaluación ecocardiográfica. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 52(2), 188–191.
- Wada, R., Muraoka, N., Inagawa, K., Yamakawa, H., Miyamoto, K., Sadahiro, T., Umei, T., Kaneda, R., Suzuki, T., Kamiya, K., Tohyama, S., Yuasa, S., Kokaji, K., Aeba, R., Yozu, R., Yamagishi, H., Kitamura, T., Fukuda, K., & Ieda, M. (2013). Induction of human cardiomyocyte-like cells from fibroblasts by defined factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(31), 12667–12672. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304053110>
- Wang, X., Xu, Z., Tian, Z., Zhang, X., Xu, D., Li, Q., Zhang, J., & Wang, T. (2017). The EF-1 α promoter maintains high-level transgene expression from episomal vectors in transfected CHO-K1 cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(11), 3044–3054. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13216>
- Wang, X., & Yang, P. (2008). In vitro differentiation of mouse embryonic stem (mES) cells using the hanging drop method. *Journal of Visualized Experiments*, 17, 2–3. <https://doi.org/10.3791/825>
- Yester, J. W., & Kühn, B. (2017). Mechanisms of Cardiomyocyte Proliferation and Differentiation in Development and Regeneration. In *Current Cardiology Reports* (Vol. 19, Issue 2). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11886-017-0826-1>
- Yuping, Y., Hua, C., & Qing, Z. (2018). Advances in the relationship between Kruppel-like factor 15 and cardiovascular disease research. *Cardiovascular Endocrinology and Metabolism*, 7(2), 37–41. <https://doi.org/10.1097/XCE.0000000000000140>
- Zhao, Y., Song, W., Wang, L., Rane, M. J., Han, F., & Cai, L. (2019). Multiple roles of KLF15 in the heart: Underlying mechanisms and therapeutic implications. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 129(January), 193–196. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.01.024>

Ziaeian, B., & Fonarow, G. C. (2016). Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, 13(6), 368–378. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.25>

