

Tesis Doctoral

Estudio de la participación de la citoquina LIF en el proceso de diferenciación de células madre embrionarias humanas a cardiomiocitos

Blüguermann, Carolina

2015-06-29

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Blüguermann, Carolina. (2015-06-29). Estudio de la participación de la citoquina LIF en el proceso de diferenciación de células madre embrionarias humanas a cardiomiocitos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Blüguermann, Carolina. "Estudio de la participación de la citoquina LIF en el proceso de diferenciación de células madre embrionarias humanas a cardiomiocitos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-06-29.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

***“Estudio de la participación de la citoquina LIF en el
proceso de diferenciación de células madre
embrionarias humanas a cardiomiocitos.”***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Biológica

Blüguermann Carolina

Director de Tesis: Dra. María Elida Scassa

Consejero de estudios: Dra. Elba Vázquez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Investigación Aplicada a Neurociencias (LIAN).
Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia
(FLENI). Sede Escobar

Buenos Aires, 2015.

“Estudio de la participación de la citoquina LIF en el proceso de diferenciación de células madre embrionarias humanas a cardiomiocitos.”

Las células madre embrionarias humanas (CMEh) se caracterizan por su capacidad para auto-renovarse, sin perder sus propiedades, casi ilimitadamente. Una de las principales propiedades de estas células es la pluripotencia, es decir la capacidad para diferenciarse y dar origen a las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. Debido a su capacidad de auto-renovación y a su naturaleza pluripotente las CMEh representan un modelo experimental único para numerosas áreas de investigación en biología y medicina.

Estudios recientes realizados para dilucidar los mecanismos que dirigen la diferenciación de CMEh a cardiomiocitos *in vitro*, han recapitulado muchos de los procesos que ocurren *in vivo* durante el desarrollo cardíaco temprano.

Numerosos trabajos han demostrado que el factor inhibitorio de leucemia (LIF por su nombre en inglés) puede promover la proliferación o inducir la diferenciación celular de manera específica, dependiendo del tipo celular o estadio del desarrollo en el que actúe. No obstante, poco se sabe acerca de la relevancia biológica de esta citoquina durante el proceso de diferenciación cardíaca humana.

El objetivo principal de nuestro proyecto de investigación consistió en estudiar el rol de LIF durante la generación y el mantenimiento de cardiomiocitos a partir de CMEh. Para ello, en primera instancia, desarrollamos un nuevo protocolo de diferenciación de CMEh a cardiomiocitos, que incluye el uso de un medio de composición definida y el agregado secuencial de factores específicos que dirigen la diferenciación hacia mesodermo cardíaco. A continuación, evaluamos el efecto del agregado de LIF en diferentes etapas de la diferenciación cardíaca.

Nuestros resultados nos permiten postular que la presencia de LIF a lo largo de la diferenciación cardíaca ejerce un efecto citoprotector que estaría asociado a una disminución de los niveles de apoptosis.

En una segunda etapa logramos generar en nuestro laboratorio una línea de células pluripotentes inducidas (CMPIs) a partir de la reprogramación de fibroblastos dérmicos y evaluamos su rendimiento al ser sometidas al protocolo de diferenciación cardíaca. Las CMPIs presentan expresión génica, proteica y modificaciones epigenéticas muy similares a las CMEh. Estas características las equiparan a las CMEh, y por ende son vistas como substitutos accesibles.

Palabras clave: Células madre embrionarias humanas, mesodermo, diferenciación cardíaca, LIF, gp130/STAT3, células madre pluripotentes inducidas.

Study of LIF cytokine involvement in the process of differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes."

Human embryonic stem cells (hESCs) are commonly defined as undifferentiated cells that can proliferate indefinitely and have the capacity of both self-renewal and differentiation, giving rise to all three germ layers: ectoderm, mesoderm and endoderm. Because of their capacity for self-renewal and their pluripotent nature, hESCs represent a unique experimental model for many areas of research in biology and medicine.

Recently, numerous studies on the mechanisms that direct the differentiation of hESCs into cardiomyocytes *in vitro*, have recapitulated many of the processes that occur *in vivo* during early cardiac development. However, one of the most important challenges that the application of stem cells in cardiovascular regenerative medicine faces, is the great difficulty to obtain these specialized cells in sufficient quantity and purity.

Numerous studies have shown that leukemia inhibitory factor (LIF) can promote proliferation or induce cell differentiation, depending on the cell type or stage of development in which it acts. However, little is known about the biological relevance of this cytokine during human cardiac differentiation.

The main objective of our research was to study the role of LIF in the generation and maintenance of cardiomyocytes from hESCs. To this end, we developed a new differentiation protocol of hESCs into cardiomyocytes, which includes the use of a defined composition medium and the sequential addition of specific factors (in restricted time windows) that direct differentiation into cardiac mesoderm. Finally, we evaluated the effect of the addition of LIF at various stages of cardiac differentiation. Our results allow us to postulate that the presence of LIF during cardiac differentiation exerts a cytoprotective effect as a consequence of the reduction in the level of apoptosis.

As a second objective, we generate in our laboratory, a line of induced pluripotent stem cells (hiPSC) from dermal fibroblasts and evaluate its performance when subjected to the cardiac differentiation protocol. hiPSC have very similar

gene, protein and epigenetic expression profile when compared to hESCs, and therefore, are considered as accessible substitutes.

Key words: Human embryonic stem cell, mesoderm, cardiac differentiation, LIF, gp130/STAT3, Induced pluripotent stem cells.

Agradecimientos.

Durante estos cinco años de Doctorado me han acompañado muchas personas y a todas ellas quiero agradecerles por haber transitado este camino conmigo.

En primer lugar quiero agradecer a todos los integrantes del LIAN. Especialmente a Santiago por confiar en mi y ofrecerme una beca después de un electrocardiograma y una entrevista. A Marie, por enseñarme, por la predisposición, por la paciencia y la malcrianza total. A Leo , por estar siempre dispuesto a las infinitas consultas y brindarme su aporte. A Willy por su contagiosa pasión por la ciencia; y a Darío por su eterna paciencia, buena predisposición y tantos cafés compartidos.

A Denis Evseenko, con quien aprendí nuevas maneras de pensar y entender la biología del desarrollo. Gracias por tanta generosidad .

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por haberme brindado el apoyo económico para la realización de esta Tesis.

A mis amigas, Jor, Carpi , Pau, Vane y La negra.....por estar, como siempre acompañándome, en cada etapa de mi vida.

A Caro G (la otra Caro) por las interminable charlas, los miles de mates y hacer que las horas en el labo se pasen volando.

A mi familia : San, Vivi, Sofi , Katy , Fer, Celi, Carlos y Santy gracias por compartir conmigo largo camino. En especial a mis padres Lidia y Jorge por dejarme elegir siempre y acompañarme en cada una de mis decisiones apoyándome y ayudándome siempre a crecer.

A Juani, mi compañero en esta vida. Gracias por el amor, la paciencia, las risas y los días compartidos. TE AMO.

A Leoncito, por portarse bien y dejarme escribir la tesis! (Gracias abuelas!)

Abreviaturas

α -MHC : Cadena pesada de la miosina alfa.

Bax : Del inglés, *Bcl-2-associated X protein*

Bcl-2 : Del inglés, *B-cell lymphoma 2*

Bcl-xl : Del inglés, *Bcl-2-like protein 1*, A1/Bfl-1

bFGF : Factor de crecimiento de fibroblastos básico, del inglés *basic fibroblast growth factor*

CCP : Campo cardiogénico primario

CCS : Campo cardiogénico secundario

CEs : Cuerpos embrioides.

CME : Células madre embrionarias

CMEh : Células madre embrionarias humanas

CMPIs : Células madre pluripotentes inducidas

CT-1: Cardiotrofina 1

cTnT : Cardiotroponina T

DAPI : 4-6-diamidino-2-fenil-indol

DKK1 : Del inglés, *Dickkopf-related protein 1*

DMEM : Del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Médium*

DMSO : Dimetilsulfóxido

ELISA : Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

FA : Fosfatasa Alcalina

FH : Fibroblastos humanos

gp-130 : Glicoproteína 130

IL-11 : Interleuquina 11

IL-6 : Interleuquina 6

IL11R : Receptor de la interleuquina 11.

IL6R : Receptor de la nterleuquina 6

Islet- 1: del Inglés *Insulin gene enhancer protein 1*

KSR : del inglés *Knock Out Serum Replacement*

LIF : Factor inhibitorio de leucemias

LIFR : Receptor del factor inhibitorio de leucemias

MAPK : Proteína quinasa activada por mitógenos

MEF : FDel inglés myocyte enhancer factor-2

MEFi : MEF irradiados

Mesp-1 : del inglés mesoderm posterior 1

OSM : Oncostatina M

OSMR : Receptor de la oncostatina M

PDFGR- α : Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas,

PE : Ficoeritrina

PFA : Paraformaldehido

PI3K : Fosfatidil-inositol-3-quinasa

SFB : Suero fetal bovino

SOX 17: Del inglés, sex Determining Region Y-Box 17

SSEA : Del inglés, *stage-specific embryonic antigens*

STAT3 : Transductor de señal y activador de la transcripción 3.

TNF : Factor de necrosis tumoral

TRA : Antígeno de rechazo tumoral, de inglés tumor rejection antigen

Wnt : Del inglés, *Wingless-type*

XTT : 2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida

Índice.

Introducción	12
Incidencia de enfermedades cardiovasculares.....	13
Desarrollo embrionario.....	13
Formación del corazón embrionario.....	15
Células madre.....	22
Nicho cardiogénico.....	26
Células madre pluripotentes inducidas.....	27
Aplicaciones de las CMPIs.....	30
Diferenciación <i>in vitro</i> de CMEh a CM.....	31
Caracterización de los CM derivados de CMEh.....	38
Citoquinas.....	39
Familia de citoquinas tipo Interleuquinas 6.....	39
Factor Inhibitorio de Leucemias.....	40
Mecanismo de acción: receptores y transducción de señales...	42
Vía de señalización LIF/gp130 en el corazón.....	45
Hipótesis y Objetivos	50
Resultados	54
Capítulo I	54
Validación del estado indiferenciado la línea de CMEh,WA09....	54
Validación de la capacidad pluripotente.....	56
Generación de líneas celulares reporteras	60
Diferenciación cardíaca dirigida.....	63
Interleuquinas de la familia tipo IL-6 y sus receptores.....	72

Vías de señalización río abajo de gp130 en CMEh.....	75
Localización subcelular de STAT3.....	77
LIF a lo largo del desarrollo cardíaco humano.....	79
Perfil de expresión de gp130, LIF y STAT3 en CEs contráctiles.....	84
LIF durante la diferenciación cardíaca de CMEh <i>in vitro</i>	84
Efecto de LIF en la diferenciación cardíaca <i>in vitro</i>	88
LIF no altera la tasa de proliferación celular.....	90
LIF ejerce un efecto citoprotector.....	91
LIF y la vía de señalización mediada por STAT3.....	98
Efecto de LIF en la especificación del mesodermo.....	100
Capítulo II	103
Células pluripotentes inducidas.....	103
Validación de las CMPIs.....	107
Diferenciación cardíaca dirigida de CMPIs.....	109
Familia de citoquinas tipo IL6 en CMPIs.....	112
Discusión	117
Materiales y Métodos	128
Bibliografía	157

Introducción

Incidencia de enfermedades cardiovasculares

El ventrículo derecho de un corazón adulto humano está compuesto por 2 a 4 mil millones de cardiomiocitos (CM) y en un infarto de miocardio puede perderse un 25% en apenas unas horas ⁽¹⁾. Desórdenes cardíacos como la hipertensión o enfermedades valvulares destruyen un gran número de CM lentamente a lo largo de los años ⁽²⁾, y se estima que en ausencia de alguna patología específica, solo por vejez, se pierde aproximadamente 1 gramo de miocardio por año ⁽³⁾.

Las enfermedades cardíacas son la causa más común de muerte en adultos en todo el mundo ⁽⁴⁾. Numerosas injurias, incluyendo la insuficiencia cardíaca, la enfermedad isquémica coronaria, la hipertensión, las mutaciones genéticas y la quimioterapia, pueden causar enfermedades del corazón, que se asocian con la pérdida o disfunción de las células del músculo cardíaco, la disminución en la función de bombeo, arritmias y eventual muerte. El corazón de los mamíferos adultos no puede generar de manera eficiente nuevas células del músculo cardíaco en respuesta a una lesión, y aunque numerosos medicamentos y dispositivos mecánicos pueden mejorar temporalmente la función cardíaca, tales terapias no sustituyen al músculo cardíaco perdido y son inevitablemente transitorias ⁽⁵⁾. Actualmente la única terapia para la insuficiencia cardíaca que aborda el problema fundamental de la pérdida de CM es el trasplante cardíaco; y debido a la escasez de donantes para trasplante, el desarrollo de terapias alternativas como el remplazo celular cardíaco se ha convertido en una materia urgente.

Lo expuesto en los párrafos precedentes pone de relieve la necesidad del desarrollo de estrategias innovadoras para la reparación del corazón. Nuevos descubrimientos sobre el potencial regenerativo de células madre y células progenitoras para el tratamiento y la prevención de la insuficiencia cardíaca a nivel experimental han llevado a una expansión de la investigación a nivel clínico ⁽⁶⁾. Las células madre en general, y los CM derivados de células madre en particular, se presentan como grandes candidatos para su aplicación en terapias de reemplazo celular ya que representan una fuente renovable de numerosos

tipos celulares cardíacos. También, proporcionan un novedoso modelo para el estudio de la organogénesis lo que resulta de suma importancia dada la alta incidencia de defectos cardíacos congénitos ⁽⁷⁾.

Sin embargo, además de considerar los problemas éticos asociados al uso de células madre embrionarias, uno debe reconocer que existe un gran número de cuestiones científicas que deben ser tenidas en cuenta antes de ser consideradas para su uso en ensayos clínicos como por ejemplo: demostrar su real capacidad para mejorar la función cardíaca a largo plazo, lograr una producción a gran escala que permita generar el número de células necesario para tratar un corazón humano y diversos aspectos de bioseguridad tanto en términos del potencial de las células trasplantadas de generar arritmias en el tejido huésped como la posibilidad de que existan células indiferenciadas residuales que puedan originar teratomas ⁽⁸⁾.

Desarrollo embrionario

Durante el desarrollo embrionario se inducen procesos de proliferación, muerte, diferenciación y migración celular, a través de los cuales, a partir de una única célula, el cigoto, se originan diferentes tipos celulares que se organizan para formar los órganos y tejidos que constituyen un individuo.

El cigoto es el resultado de la unión del óvulo (gameto femenino) y el espermatozoide (gameto masculino) durante la fecundación. En mamíferos, inmediatamente luego de la fecundación ocurre el clivaje del cigoto, que comprende una serie de divisiones mitóticas rápidas, en las que el gran volumen del cigoto se divide en numerosas células más pequeñas denominadas blastómeros. Al finalizar el clivaje queda establecida la blástula (figura 1), una esfera hueca formada por blastómeros que rodean una cavidad interna llena de líquido, el blastocelo, y una masa celular interna.

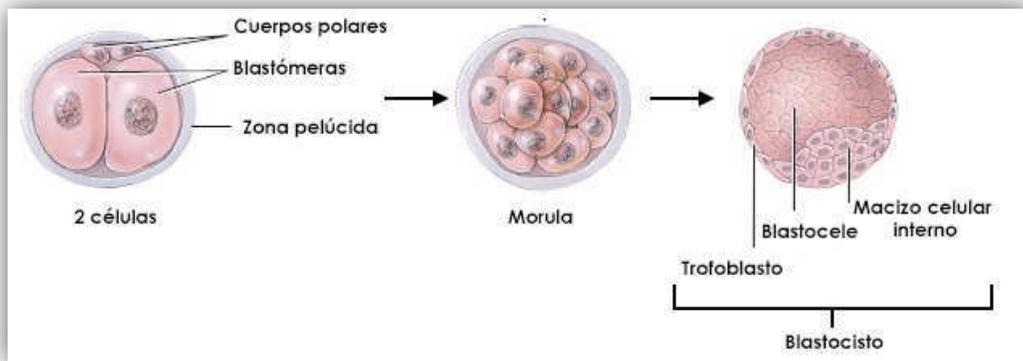


Figura 1. Esquema representativo de la formación del blastocisto.

Luego, la tasa de división mitótica se enlentece y los blastómeros comienzan a re-posicionarse. Este extenso re-arreglo celular se denomina gastrulación. Como resultado de la gastrulación, quedan establecidas las tres capas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo (Figura 2). Las células de las tres capas interactuarán entre sí y se reorganizarán dando lugar a la formación de tejidos y órganos, proceso denominado organogénesis. Muchos órganos contienen células provenientes de más de una capa germinal. Además, durante la organogénesis algunas células migran muy distalmente de su lugar de origen hasta la que será su ubicación final, como por ejemplo las células sanguíneas y las gametas.

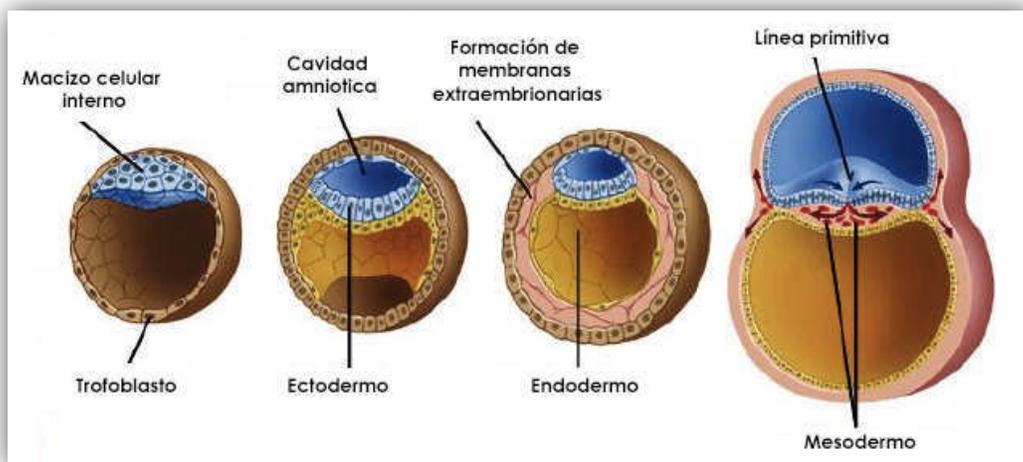


Figura 2. Esquema representativo de la gastrulación en mamíferos. Con el fin de la gastrulación quedan establecidas las tres capas embrionarias.

Formación del corazón embrionario

El desarrollo embrionario del corazón o cardiogénesis depende principalmente de la especificación temprana de CM a partir de precursores que derivan del mesodermo, de la incorporación exógena de otros precursores y de la integración espacial y temporal de señales transducidas a través de diferentes cascadas de señalización. En humanos, al cabo de dos semanas de iniciada la gestación, las células precursoras del tejido cardíaco migran durante la gastrulación por las regiones anteriores de la línea primitiva y se posicionan lateralmente para dar origen al mesodermo lateral anterior, donde se delimitan dos regiones ovaladas a los lados del nodo primitivo: los campos cardiogénicos primario (CCP) y secundario (CCS) ⁽⁹⁾. Los campos cardiogénicos albergan no sólo precursores de los linajes auricular, ventricular y del tracto de salida, sino también progenitores endoteliales. Los campos cardiogénicos luego migran y se fusionan formando la medialuna cardíaca dentro de la cual las células adquieren definitivamente la identidad cardíaca en respuesta a señales provenientes del endodermo anterior adyacente ⁽¹⁰⁾. El endodermo no sólo es importante para la diferenciación de los precursores cardíacos, sino que también es esencial para la migración del mesodermo cardíaco.

En este momento, en el mesodermo lateral se distinguen dos regiones: el mesodermo somático (parietal) que subyace al ectodermo y junto con el ectodermo forman la somatopleura, y el mesodermo ventral esplácnico, que recubre al endodermo y junto con el endodermo forman la esplacnopleura, dejando entre ambos un hueco que corresponde a la cavidad celómica ⁽¹¹⁾. El mesodermo esplácnico se corresponde con el mesodermo precardiogénico ⁽¹²⁾.

En la esplacnopleura, se forman pequeños islotes sanguíneos que coalescen y forman pequeños acúmulos angiogénicos que son los precursores de los primordios endocárdicos (Figura 3). Dorsalmente a los primordios endocárdicos, las células de la esplacnopleura forman el primordio miocárdico e inician su diferenciación a CM. Conforme se inicia la tubulación, etapa en la cual se adquiere una forma cilíndrica conformada por diferentes tubos, los primordios

mioendocárdicos son desplazados en dirección ventro-medial y se van aproximando entre sí.

Finalmente, en la semana 3 de gestación, los primordios mioendocárdicos se encuentran en la línea media ventral, se fusionan y forman un único tubo mioendocárdico. El tubo cardíaco primitivo queda así situado por delante del intestino primitivo y rodeado por el celoma embrionario que conformará la futura cavidad pericárdica ⁽¹³⁾. El extremo anterior del tubo dará origen al polo arterial o de salida, mientras que el extremo posterior originará el polo venoso o de entrada. La diferenciación celular se produce de forma independiente, mientras los dos primordios formadores del corazón migran el uno hacia el otro (Figura 3). Las células mesodérmicas ventrales comienzan a expresar N-caderina en la región apical, separándose de las células del mesodermo dorsal y uniéndose para formar un epitelio. La unión del mismo llevará a la formación de la cavidad pericárdica.

Posteriormente, una pequeña población celular regula negativamente la expresión de N-caderina y se delamina del epitelio para dar origen al endocardio (el revestimiento interno del corazón) ⁽¹⁴⁾. Las células epiteliales formarán el músculo cardíaco (miocardio). Las células endocárdicas darán origen a la mayoría de las válvulas del corazón. Estas células secretan las proteínas que regulan el crecimiento miocárdico y regulan la localización del tejido nervioso del corazón. El estadio en el cual el miocardio y el endocardio divergen aun no es claro, aunque se cree que éste último surge a partir de un tipo de progenitor vascular independiente ^(15, 16).

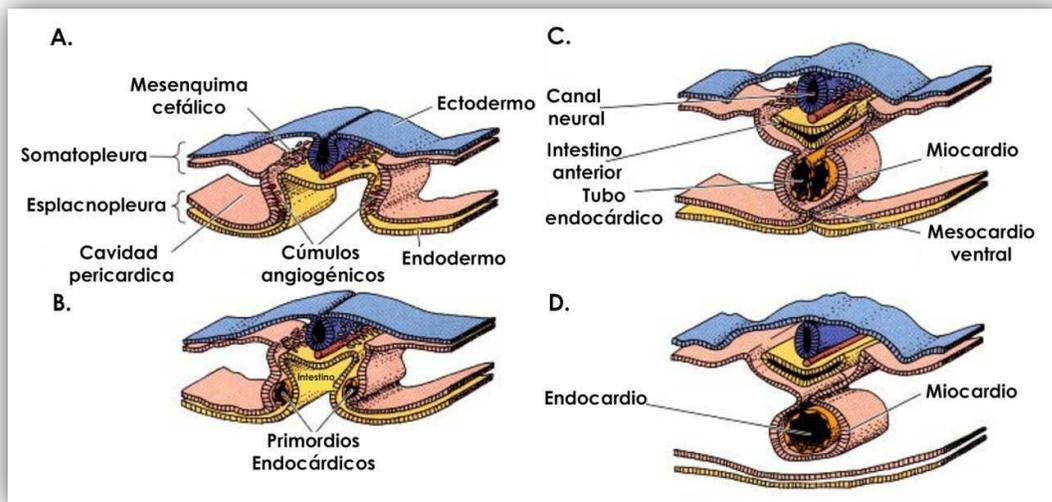


Figura 3. Formación del corazón de pollo desde la hoja esplácnica del mesodermo lateral. El endocardio forma el revestimiento interno del corazón, el miocardio forma el músculo cardíaco y el epicardio recubrirá el corazón. Figura adaptada de ⁽¹⁷⁾

En los campos cardiogénicos la especificación de las células cardíacas se produce gradualmente de modo antero-posterior, de tal manera que las futuras células ventriculares se especifiquen antes de que lo hagan las futuras células auriculares. La especificación y diferenciación cardíaca en el mesodermo esplácnico anterior es el resultado de una compleja interacción de señales positivas y negativas provenientes de distintos tipos celulares (Figura 4). Dentro de las señales que provienen del endodermo subyacente se encuentran factores que promueven la diferenciación como las proteínas morfogenéticas de huesos (BMPs), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) ⁽¹⁸⁾ y señales negativas que incluyen la vía de la β -catenina/Wnt (del inglés *Wingless-type*), provenientes del ectodermo cuya actividad es bloqueada por los inhibidores (pro-cardíacos) de la vía de Wnt, tales como Cerberus, Dickkopf y Crescent ⁽¹⁹⁾.

Colectivamente, todas estas señales son la que determinarán la región exacta en la que los genes cardíacos serán activados y determinarán los campos cardiogénicos primario y secundario, que conjuntamente formarán el mesodermo cardíaco. Las células mesodérmicas que ingresan a través de la línea primitiva expresan el factor de transcripción de la caja T/Brachyury, que es un blanco directo de la vía de Wnt ⁽²⁰⁾. β -catenina, un factor central en la vía de señalización de Wnt, ha demostrado ser esencial para la formación del mesodermo ya que

ratones deficientes en β -catenina no desarrollan ninguna estructura mesodérmica y tampoco expresan T/Brachyury ⁽²¹⁾.

De esta manera, el mesodermo es especificado de forma tal que se originan subgrupos celulares que se caracterizan por expresar la quinasa fetal de hígado 1 (FLK1, por su sigla en inglés) y el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDFGR- α , por su sigla en inglés)⁽²²⁾. De forma concomitante con el avance de la especificación mesodérmica, la expresión de T/Brachyury disminuye y se activan otros factores de transcripción como, por ejemplo, el factor de mesodermo posterior 1, Mesp1, que es el responsable de la activación del programa transcripcional cardíaco ⁽²³⁻²⁶⁾

Ante la ausencia de señales de Wnt, la vía de BMP resulta crucial para la inducción de la síntesis del factor de transcripción Nkx 2.5 en el mesodermo cardiogénico ⁽²¹⁾. Nkx 2.5 es crítico en la instrucción del mesodermo para que éste se convierta en tejido cardíaco. El factor de transcripción Nkx 2.5 ⁽²⁷⁾ junto con la proteína de la caja T 5 (Tbx-5) son los primeros marcadores del tejido cardíaco y se expresan prontamente luego de la formación de los campos cardiogénicos. Adicionalmente, Nkx 2.5 activa la expresión de otros factores de transcripción, en particular miembros de la familia de factores de transcripción de dedos de zinc: GATA y MEF2. Esta activación transcripcional conduce a la expresión de genes que codifican para proteínas estructurales específicas del músculo cardíaco, como la actina cardíaca, las cadenas pesadas de la α -miosina y la desmina. La cooperación entre Tbx5 y Nkx 2.5 también activa la expresión del factor natriurético auricular y la proteína de unión conexina 40. GATA-4 no sólo cumple un importante rol en la formación del tubo cardíaco mediante la regulación del endodermo extraembrionario ⁽²⁸⁾, sino también es esencial para la formación del pro-epicardio y el desarrollo del músculo cardíaco ^(29, 30). Asimismo, GATA-6 también juega un rol fundamental en la miogénesis ya que embriones sin GATA-4 y 6 no desarrollan tejido cardíaco⁽³¹⁾.

Numerosos trabajos han demostrado que, por ejemplo, la expresión de GATA-4, Tbx5 y la subunidad específica remodeladora de la cromatina cardíaca, SMARCD3, son suficientes para generar regiones cardíacas en otras zonas del embrión ⁽²²⁾, demostrando el rol fundamental de los mismos en el desarrollo

cardíaco. Además, GATA-4, Tbx5 y MEF2C permiten la transdiferenciación de fibroblastos cardíacos directamente a CM ⁽²³⁾.

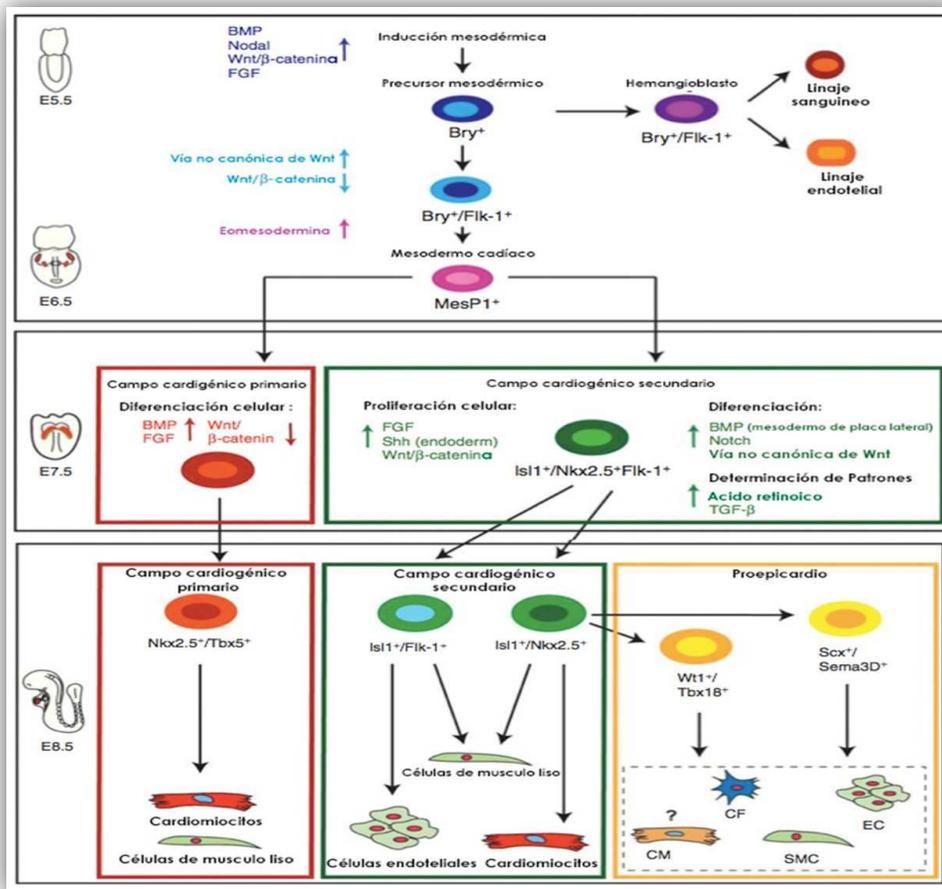


Figura 4. Especificación y jerarquía celular de los progenitores cardíacos en ratón. Numerosas vías de señalización (BMP, Nodal, Wnt/ β -catenina, FGF) interactúan para inducir la diferenciación a mesodermo. Los precursores mesodérmicos $Bra^+/Flk1^+$ se diferencian primero a células sanguíneas y endoteliales pasando por un primer estadio de hemangioblasto. Inmediatamente después en el desarrollo, la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina y la inducción de la vía no canónica de Wnt produce una segunda generación de células $Bra^+/Flk1^+$ que se diferenciarán a mesodermo cardíaco por la acción de la Eomesodermina. El mesodermo cardíaco está marcado por la expresión de *Mesp1* y los precursores cardíacos tempranos experimentarán una mayor restricción de linaje y se diferenciarán a progenitores pertenecientes a los campos cardiogénicos primario y secundario. Los progenitores del CCP se diferenciarán a CM y células de músculo liso por inducción de BMP y FGF, mientras que las células del CCS, por acción de Wnt/ β -catenina, FGF, y Shh proveniente del endodermo se mantendrán proliferativas. Las células del CCS se caracterizan por tener un perfil de expresión $Isl1^+/Nkx2.5^+/Flk1^+$. Los progenitores del CCS se restringirán aun más en su linaje conforme se adicionen al tubo cardíaco en elongación. Es posible distinguir dos poblaciones de CCS por su perfil de expresión: una población que expresa *Isl-1* y *Flk-1* que se diferenciará a células endoteliales y de músculo liso; y un segundo grupo, que expresa *Nkx2.5* e *Isl-1* y se diferenciará a células de músculo liso, CM y contribuirá a las células que conformarán el proepicardio. Estas poblaciones distintivas del CCS se diferenciarán por medio de la acción de las señales BMPs provenientes del mesodermo de placa lateral y también por la acción de Notch, la vía no canónica de Wnt, y señales mediadas por ácido retinoico y TGF- β . Figura adaptada de ⁽³²⁾.

La formación del asa cardíaca (torsión del tubo cardíaco) representa la primera manifestación morfológica de lateralidad en el embrión, convirtiendo la polaridad antero-posterior original en una polaridad derecha-izquierda (figura 5). La misma depende de las proteínas Nodal, Lefty-2 y Pitx-2, responsables del establecimiento de la asimetría derecha-izquierda del eje embrionario ⁽²⁴⁾. Dentro del primordio cardíaco, Nkx 2.5 regula la expresión de los factores de transcripción, Hand-1 y Hand-2, y aunque ambos se sintetizan a lo largo de todo el tubo cardíaco, la expresión de Hand-1 se restringe al futuro ventrículo izquierdo y la de Hand-2 al derecho a medida que comienza la formación del asa cardíaca ⁽²⁵⁾. Otro factor de transcripción crítico para la correcta formación del asa cardíaca es Pitx2, que se expresa sólo en el lado izquierdo de la lámina de mesodermo lateral y finalmente en el lado izquierdo del tubo cardíaco ⁽²⁶⁾. Concomitantemente con la torsión del tubo cardíaco, el mismo sufre un enorme aumento de su longitud. Esta elongación no se debe a la proliferación de las células que lo componen, sino principalmente a la adición de progenitores cardíacos en los polos arterial y venoso del tubo cardíaco. Estos progenitores se originan en el mesodermo esplácnico y pertenecen al campo cardiogénico secundario.

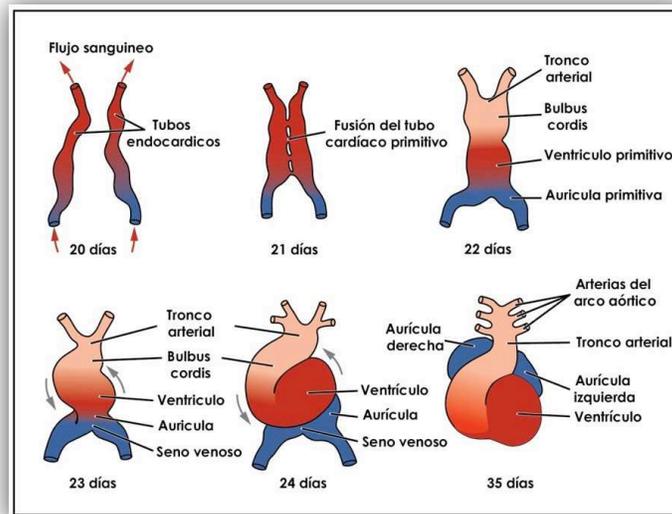


Figura 5. Gráfico esquemático de la formación y torsión del asa cardíaca en humanos. Figura adaptada de ⁽¹⁷⁾.

La aparición de septos y válvulas que separan y compartimentan las cavidades cardíacas también está controlada por factores de transcripción específicos, cuyos patrones de expresión se restringen a la porción anterior o posterior del tubo ⁽³³⁾. Entre la cuarta y quinta semana del desarrollo embrionario humano se produce la separación de las cavidades auriculares y ventriculares. Las células del endocardio, por inducción desde el miocardio adyacente, sufren una transición epitelio mesenquimal, perdiendo su adhesión lateral e invadiendo la gelatina cardíaca, ubicada entre ambas láminas celulares, y dando origen a las almohadillas endocárdicas ⁽³⁴⁾. A su vez, las aurículas primitivas son divididas por dos septos que crecen de manera ventral hacia las almohadillas endocárdicas, que poseen orificios a través de los cuales la sangre aún puede intercambiarse entre ambas cámaras. Este intercambio es necesario para la supervivencia del feto hasta que se establezca la circulación pulmonar. Con la primera respiración estos orificios se cierran quedando establecida de esta forma la circulación izquierda y derecha. Con la formación de los septos, el corazón se establece como una estructura tetra-cameral, con la arteria pulmonar conectada al ventrículo derecho y la aorta conectada al ventrículo izquierdo (figura 6).

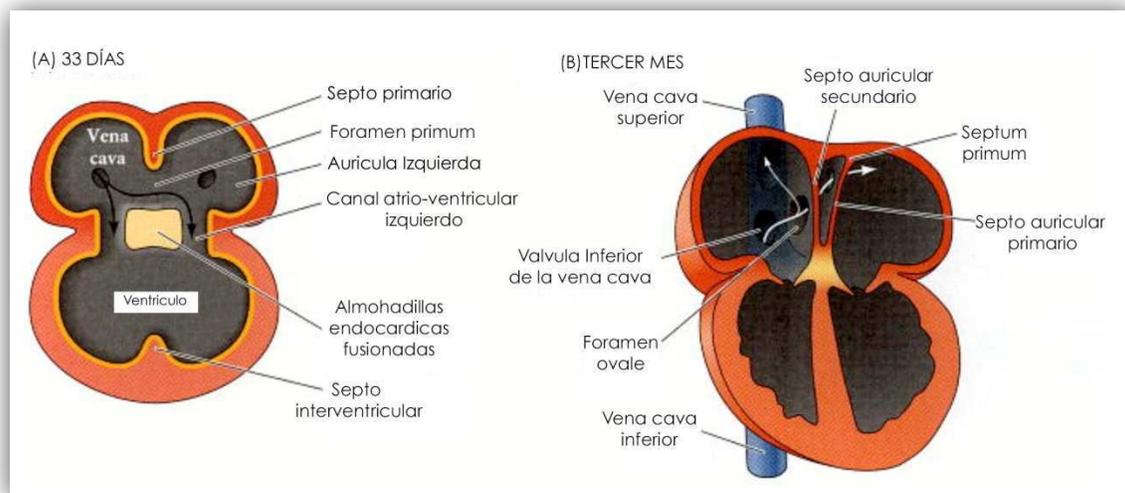


Figura 6. Formación de las cámaras del corazón. **A:** sección transversal esquemática del corazón humano de 4,5 semanas. Los tabiques auricular y ventricular están creciendo hacia la almohadilla endocárdica. **B :** Sección transversal del corazón humano durante el tercer mes de gestación. La sangre puede cruzar desde la derecha a la izquierda del corazón a través de aberturas en los tabiques primario y secundario. Figura adaptada de ⁽¹⁷⁾

Células madre.

La capacidad regenerativa presente en ciertos animales ha fascinado al hombre por mucho tiempo. La regeneración tisular es un fenómeno fisiológico extraordinario en el que las partes remanentes de un tejido se reorganizan para reformar la parte faltante del mismo ⁽³⁵⁾. Numerosos invertebrados, como el gusano *Planaria* y la *Hydra* ⁽³⁶⁾, tienen la capacidad de regenerar tejidos con gran velocidad y precisión, mientras que la mayoría de los vertebrados superiores son incapaces de cualquier forma de regeneración tisular completa, a pesar de contar con todas las instrucciones y maquinaria para generar dichos tejidos durante el desarrollo embrionario. Dentro de los vertebrados superiores, los mamíferos parecen haber perdido la mayoría de su capacidad regenerativa. El ejemplo más notable de la regeneración completa de todo un órgano en los seres humanos es la regeneración del hígado después de una hepatectomía parcial. A diferencia de lo que ocurre en otros organismos, la mayoría de los eventos de reparación tisular en mamíferos son independientes de los efectos de desdiferenciación y, por el contrario, resultan de la activación de células madre o progenitoras pre existentes.

Las células madre embrionarias (CME) se definen por su capacidad de replicación, su clonalidad y su potencialidad (capacidad para diferenciarse). Asimismo, funcionalmente se definen como células que tienen la capacidad de auto-renovarse y de generar células diferenciadas. Estas células existen por un período finito de tiempo y no perduran a lo largo de la vida del organismo. Estas características de las CME son mantenidas gracias a la acción orquestada de complejos remodeladores de la cromatina, factores de transcripción y vías de señalización que integran las señales necesarias para mantener la estructura de su cromatina, prevenir su diferenciación y promover su auto-renovación.

Por su parte, las células madre adultas presentan una capacidad más reducida de auto-renovación y su potencialidad está altamente restringida ⁽³⁷⁾. La diferencia en potencialidad de ambos tipos celulares está relacionada con su origen. Las células madre embrionarias se originan en el macizo celular interno previo a la determinación de las tres capas germinales (Figura 1), mientras que el

origen de las células madre adultas no es tan claro pero se cree que, durante la determinación del linaje específico de cada tejido en el desarrollo embrionario, un subgrupo celular logra escapar dicha determinación y coloniza un nicho específico que no sólo le permite mantener su potencialidad, sino también restringirla ⁽³⁸⁾.

Se pueden definir cuatro tipos de células madre en base a su potencialidad. (Figura 7)

-Célula madre totipotente: aquella célula capaz de crecer y formar un organismo completo, en el que se incluyen los componentes embrionarios, como son las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo), el linaje germinal, los tejidos que darán el saco vitelino y los componentes extraembrionarios, como la placenta. Muchos autores consideran que la única célula totipotente es el cigoto ⁽³⁹⁾.

-Célula madre pluripotente: este tipo de célula no puede formar un organismo completo, pero puede dar origen a células de las tres capas embrionarias ⁽³⁹⁾.

-Célula madre multipotente: es aquella célula que en principio sólo puede originar tipos celulares de su propia capa o linaje embrionario de origen, por ejemplo, una célula madre sanguínea será capaz de originar de manera exclusiva diferentes tipos celulares maduros y funcionales hematopoyéticos ⁽³⁹⁾.

-Célula madre unipotente: célula capaz de dar lugar únicamente a un tipo de célula particular ⁽³⁹⁾.

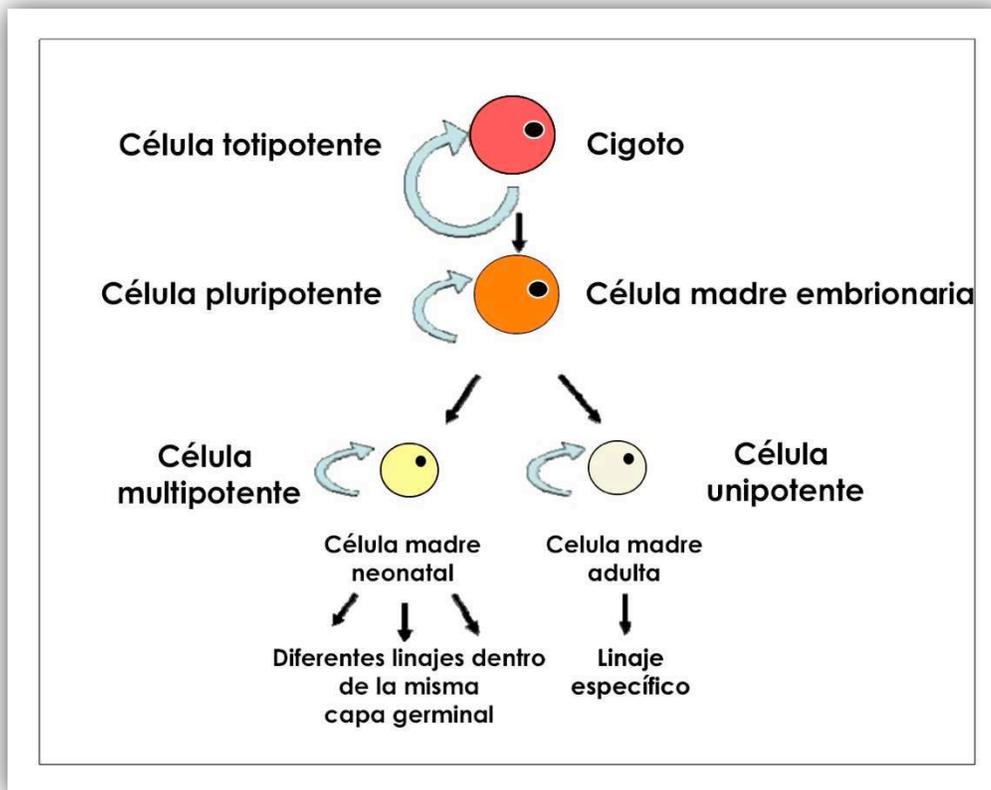


Figura 7. Esquema jerárquico de potencialidad.

Desde un punto de vista ontogénico, las células madre se pueden clasificar como:

-Célula madre embrionaria: la CME por excelencia es el cigoto, formado por la fecundación del óvulo por un espermatozoide. Como mencionamos previamente, el cigoto es totipotente. Conforme se va desarrollando el embrión, sus células van perdiendo esta propiedad de forma progresiva, llegando a la fase de blastocisto que contiene células pluripotentes en el macizo celular interno del cual se derivan las líneas celulares de CME utilizadas en investigación

-Célula madre neonatal: son las células madre procedentes del cordón umbilical y/o placenta. Muchos estudios han evidenciado la existencia de distintos tipos de células madre en el cordón umbilical, lo que lo convirtió en una de las fuentes más aceptadas para la obtención de células con capacidad regenerativa de múltiples tejidos.

-Célula madre adulta: en un individuo adulto se conocen decenas de distintos tipos de células madre adultas (CMA) y progenitoras, que son las encargadas de regenerar tejidos en continuo desgaste, como la piel, sangre, hígado, tejido nervioso, intestino, etc. Su capacidad para generar células especializadas suele estar limitada a unos pocos linajes .

Gracias a su habilidad para generar todos los tipos celulares presentes en un organismo adulto, las CME se postulan como una herramienta de enorme valor para la investigación básica. El uso potencial más importante de las CMEh es su aplicación en terapias regenerativas. En teoría las CMEh pueden diferenciarse a numerosos tipos celulares y estos derivados podrían ser usados en terapias de reemplazo para tratar un gran número de enfermedades, en las que las células nativas no funcionan correctamente o son destruidas. Sin embargo, aún falta superar numerosos inconvenientes, como la obtención en suficiente cantidad y pureza de células requeridas y aspectos relacionados con la bioseguridad, ya que las CMEh presentan capacidad teratogénica.

Las CMEh han demostrado constituir un gran modelo *in vitro* que logra recapitular de manera fiel los eventos que ocurren durante la embriogénesis, transformándolas en una herramienta única para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que definen la especificación tisular durante el desarrollo embrionario humano y representan un modelo único para estudiar la etiología de las enfermedades que tienen su origen durante la etapa prenatal. Numerosos aspectos de la embriogénesis pueden estudiarse mediante el modelo que comprende la formación, a partir de colonias de CME, de agregados celulares tridimensionales denominados cuerpos embrioides (CEs). Los CEs se diferencian a las tres capas germinales a través de un conjunto secuencial de eventos que imitan parcialmente la gastrulación del embrión.

Por último otra de las aplicaciones de gran interés comercial incluye el uso de las CMEh como herramienta de testeo en el desarrollo de nuevas drogas.

Los estudios sobre CMEs constituyen hoy en día uno de los temas de mayor interés en el campo de las ciencias biomédicas, logrando motivar a la comunidad

científica, trascendiendo al ámbito social, convirtiéndose en un objeto de atención generalizada.

Nicho cardiogénico.

El término nicho de células madre, fue originalmente propuesto por Schofield ⁽⁴⁰⁾, y se refiere al microambiente en el cual residen las células madre o progenitores. Estos micro-ambientes están conformados por diferentes tipos celulares, moléculas de matriz extracelular y factores solubles capaces de regular la actividad de las células madre, jugando un importante rol en el balance auto-renovación/diferenciación y el mantenimiento de la homeostasis celular. *In vivo*, las células madre residen normalmente en nichos con una arquitectura tisular definida. La organización de las células madre y células de soporte en estos nichos define la distribución y el nivel de las señales que las células madre reciben, determinando por lo tanto su destino celular. Los nichos están definidos por la producción localizada de señales y la localización espacial de las células capaces de recibir dichas señales.

Durante mucho tiempo, se ha pensado que en el corazón adulto no existía un nicho cardiogénico, ya que las lesiones en el miocardio inevitablemente dejan cicatrices en el tejido ^(1, 41). Sin embargo, hoy en día se sabe que en el corazón adulto existe un recambio de cardiomiocitos a lo largo de la vida adulta ^(42, 43). Desafortunadamente la tasa de recambio es muy baja resultando insuficiente para reparar la función contráctil luego del daño. Por el contrario, algunas especies de peces ⁽⁴⁴⁾ y anfibios ^(45, 46), al igual que el corazón embrionario y neonatal en mamíferos ^(47, 48), presentan una gran capacidad regenerativa que se logra principalmente por la proliferación de cardiomiocitos pre-existentes. Actualmente se cree que en el corazón adulto existen nichos en los cuales residen progenitores cardíacos que tienen la capacidad de diferenciarse a CM *in vitro* y serían los responsables del recambio celular durante la vida adulta ^(49, 50). Estos nichos resultan una fuente atractiva de células para ser utilizadas en terapias de reparación cardíaca y por lo tanto en los últimos diez años han sido motivo de numerosas investigaciones ⁽⁴¹⁾. Tanto en ratones como en humanos se han

identificado poblaciones celulares que expresan el receptor del factor de crecimiento de células madre (c-Kit), el antígeno de células madre (Sca-1) y el factor de transcripción Islet-1 ⁽⁵¹⁻⁵³⁾. Si bien estas poblaciones comparten características en cuanto a su potencial para diferenciarse *in vitro* a los distintos tipos celulares presentes en el corazón, aun existen discrepancias en cuanto a su ubicación en el corazón y a los marcadores que expresan ⁽⁵⁴⁾. Por lo tanto resulta crítico determinar cual de todas las poblaciones descritas contribuye normalmente al mantenimiento de la homeostasis cardíaca. Estudios de mapeo genético de destino celular ayudarán en el futuro a determinar cuál de estas poblaciones de células son los verdaderos progenitores cardíacos.

Células madre pluripotentes inducidas.

A pesar del enorme potencial que ofrecen las CMEh en cuanto a su implementación en terapias regenerativas, las reservas éticas asociadas con el uso de embriones y la posible reacción inmunológica del individuo receptor, han estimulado la búsqueda de fuentes alternativas de células pluripotentes. En el año 2006 el grupo del Dr. Shinya Yamanaka identificó genes capaces de "reprogramar" una célula somática para dar origen a una célula pluripotente. La introducción de un gran número de genes candidatos en fibroblastos de ratón, reveló que un conjunto de sólo cuatro de éstos, era suficiente para reprogramar fibroblastos epidérmicos a un tipo celular que se asemeja al de las CME. Estas células modificadas, llamadas células madre pluripotentes inducidas (CMPIs), luego de la reprogramación recuperan la capacidad para auto-renovarse y la pluripotencia, pudiendo así dar lugar a todos los tipos celulares del organismo adulto ⁽⁵⁵⁾

Las CMPI humanas se originaron por primera vez en el año 2007 ^(56, 57). En estos trabajos se partió de fibroblastos epidérmicos que fueron transducidos con partículas virales portando genes que codifican factores de transcripción característicos de células madre (Oct-4, Sox2, Lin28 y Nanog ⁽⁵⁷⁾ u Oct-4, Sox2, Klf4 y c-Myc⁽⁵⁶⁾). Estas células reprogramadas son similares en múltiples aspectos a las CMEh, incluyendo la morfología, la tasa de proliferación, la expresión de antígenos de superficie, el estado epigenético y la actividad de la enzima telomerasa.

Además, las CMPIs pueden diferenciarse a cada uno de los tipos celulares que conforman las tres capas germinales ⁽⁵⁶⁾. Sin embargo, existe cierta evidencia que sugiere que las CMPIs y las CMEh no son idénticas ^(56, 58, 59). De hecho, han sido reportadas diferencias en la expresión génica entre líneas de CMPIs⁽⁶⁰⁾, las cuales podrían deberse a los distintos orígenes de la población celular de partida, a la metodología empleada para la reprogramación y/o al grado de reprogramación alcanzada ⁽⁶¹⁾.

Inicialmente se consideraba indispensable el uso de partículas virales ^(55, 57) para la reprogramación celular, lo que convertía a las CMPIs en células no seguras para ser usadas en aplicaciones clínicas ya que los cambios no controlados en el genoma que produce la integración de los plásmidos, podían convertirlas en células potencialmente tumorigénicas. Desde el 2008 a la fecha se han desarrollado diversos mecanismos de reprogramación mediante los cuales es posible reprogramar las células sin la necesidad de recurrir a partículas virales u otros mecanismos que involucren incorporación de ADN foráneo. Por ejemplo se ha demostrado que la reprogramación es posible si las células somáticas son transfectadas directamente con las proteínas (no ADN o RNA) , sin embargo esta técnica resultó ser menos eficiente (0,006% versus 1% que se obtiene al usar sistemas virales) ⁽⁶²⁾. Otro método descrito es la transfección transiente de plásmidos episomales. Si bien esta técnica presenta la ventaja de evitar la integración al genoma, la misma demostró ser menos eficiente debido a una expresión disminuida de los factores reprogramadores además de presentar una cinética lenta de reprogramación. Otros métodos de reprogramación incluyen el uso de microARN (miARN)^(63, 64). Los miARN son una parte integral de la red génica y son capaces de controlar los genes involucrados en la especificación y el mantenimiento de la pluripotencia sin alterar la integridad del genoma.

Con el fin de aumentar la eficiencia de reprogramación actualmente se incluye en los protocolos de reprogramación el uso de pequeñas moléculas sintéticas o compuestos químicos que son capaces de modular el estado epigenético de las células a reprogramar o en algunos casos reemplazar a los genes reprogramadores ^(65, 66). A pesar de que el uso de modificadores de la cromatina se ha establecido rápidamente debido a su practicidad, en general

suelen tener un efecto global en la desregulación del genoma lo que puede devenir en problemas en las CMPIs generadas (Figura 8).

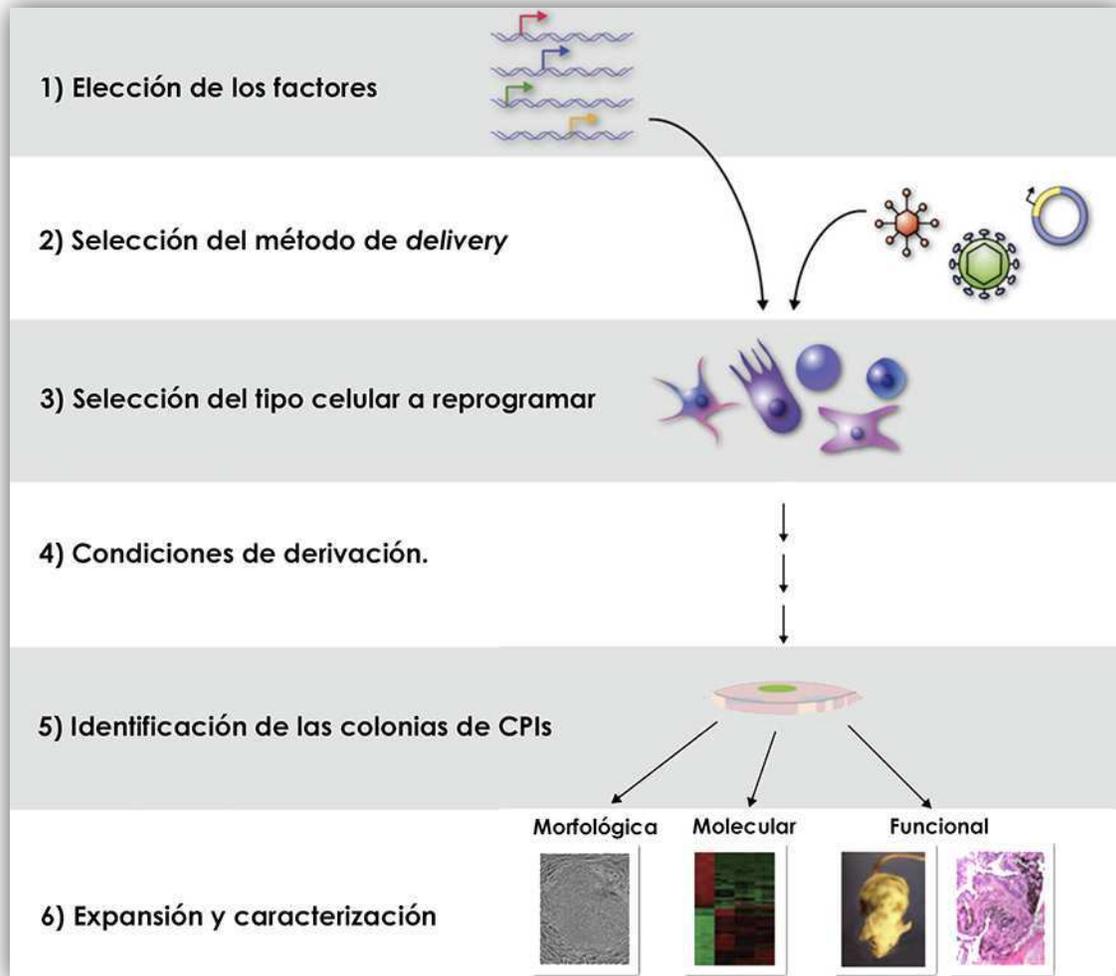


Figura 8. Resumen de la técnica de reprogramación celular. La generación de CMPIs puede dividirse en seis etapas: **1.** La elección de los factores reprogramadores. **2.** La selección del método de *delivery*. **3.** La selección del tipo celular a reprogramar. **4.** La elección de las condiciones de derivación. **5.** La identificación de las colonias reprogramadas. **6.** La expansión y caracterización molecular, morfológica y funcional de las células obtenidas. Figura adaptada de ⁽⁶⁷⁾

Aplicaciones de las CMPIs

Como se mencionó previamente las CMPIs presentan un enorme potencial para ser aplicadas dentro del campo de la medicina regenerativa como fuente de células que permita sustituir el tejido dañado o enfermo ⁽⁶⁸⁾. Un desafío clave en la traducción de esta promesa a la realidad es lograr aumentar la eficiencia de obtención y diferenciación de estas células, además de lograr maneras más eficientes de suministrarlas a los tejidos blanco sin perder la funcionalidad y viabilidad. Actualmente los métodos más empleados incluyen la inyección intravenosa de las células o la administración local en el sitio a tratar lo que generalmente mediante el uso de biomateriales como estructuras de andamiaje.

Otra aplicación de las CMPIs es el uso de las mismas para generar células derivadas de pacientes que presentan enfermedades genéticas. Estas CMPIs pueden diferenciarse al tejido de interés brindando una herramienta única para el estudio de dichas enfermedades. Esta herramienta puede ser utilizada para estudiar la iniciación y progresión de distintos desórdenes, así como también evaluar distintas intervenciones terapéuticas (por ejemplo el testeo y selección de nuevas drogas)(Figura 9).

Este potencial de las células CMPIs ha abierto un aspecto completamente nuevo de la investigación en la que el modelado y la evaluación *in vitro* de modelos de enfermedades complejas se están convirtiendo en una realidad. Recientemente, las CMPIs se han aplicado ampliamente para el estudio de enfermedades cardíacas (como el síndrome de QT largo) y enfermedades neurodegenerativas (como la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Alzheimer ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾).

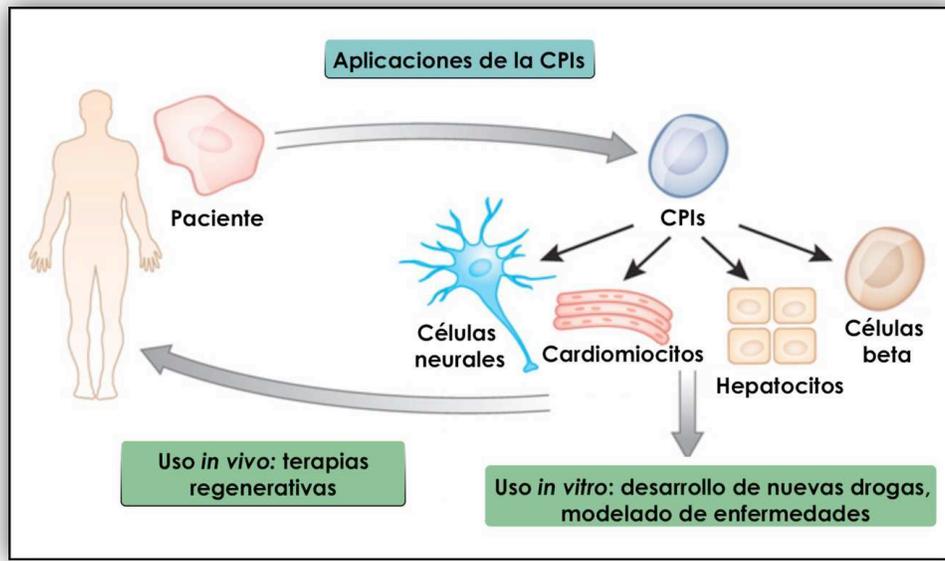


Figura 9. Esquema representativo de las aplicaciones de las CMPIs.

Diferenciación *in vitro* de CMEh a CM.

El aislamiento de las CMEh y la más reciente generación de CMPIs, marcó el comienzo de una nueva era de oportunidades para la investigación y las terapias cardiovasculares. La disponibilidad de un número ilimitado de células cardíacas humanas para investigación y aplicaciones terapéuticas es una de las promesas más alentadoras que ofrecen actualmente los estudios con células pluripotentes. Numerosos estudios realizados para dilucidar los mecanismos que conllevan la diferenciación de CMEh a CM *in vitro*, han recapitulado muchos de los procesos que ocurren *in vivo* durante el desarrollo cardíaco temprano; lo que permitió contar por primera vez con un modelo de estudio *in vitro* del desarrollo cardíaco humano. Los CM derivados a partir de CMEh constituyen un modelo que permite abarcar el estudio de diversos fenómenos celulares desde la electrofisiología hasta la bioquímica de proteínas. Por otra parte, contar con la capacidad de generar CMPIs a partir de células de pacientes con enfermedades cardiovasculares hereditarias brinda una oportunidad sin precedentes para el estudio de enfermedades cardiovasculares humanas ⁽⁷¹⁻⁷³⁾. Poder disponer de cantidades considerables de células cardíacas también resulta de gran interés para la

industria farmacéutica ya que permite su utilización, como herramienta novedosa, para el desarrollo de nuevas drogas y el testeo de compuestos cardiotóxicos ^(74, 75).

Desde ya la aplicación mas ambiciosa detrás del uso de estas células es su aplicación en terapias de reemplazo celular en corazones dañados, sin embargo aun quedan muchos desafíos por superar antes de lograr considerarlas para tal fin. Para que estas nuevas herramientas puedan ser aprovechadas, es esencial el desarrollo de protocolos de diferenciación eficientes y reproducibles que permitan generar los tipos celulares deseados en suficiente cantidad y pureza. Con el fin de desarrollar poblaciones de CM lo suficientemente homogéneas para su uso terapéutico, numerosos grupos han desarrollado, con diverso éxito, protocolos que permiten identificar y aislar progenitores cardíacos ⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾.

La activación secuencial de los factores de transcripción que llevan a la formación del mesodermo pre-cardíaco y finalmente a la determinación del tejido cardíaco se ha logrado recrear *in vitro* a partir de células pluripotentes de una manera muy similar a la que ocurre en el embrión.

Es por esto que la mayoría de los protocolos desarrollados hasta la actualidad se basan en la activación o inhibición de efectores de las vías de señalización mas relevantes en la embriogénesis. La misma secuencia de expresión génica que se observa *in vivo* es lograda en la diferenciación *in vitro* a partir de células pluripotentes (Figura 10).

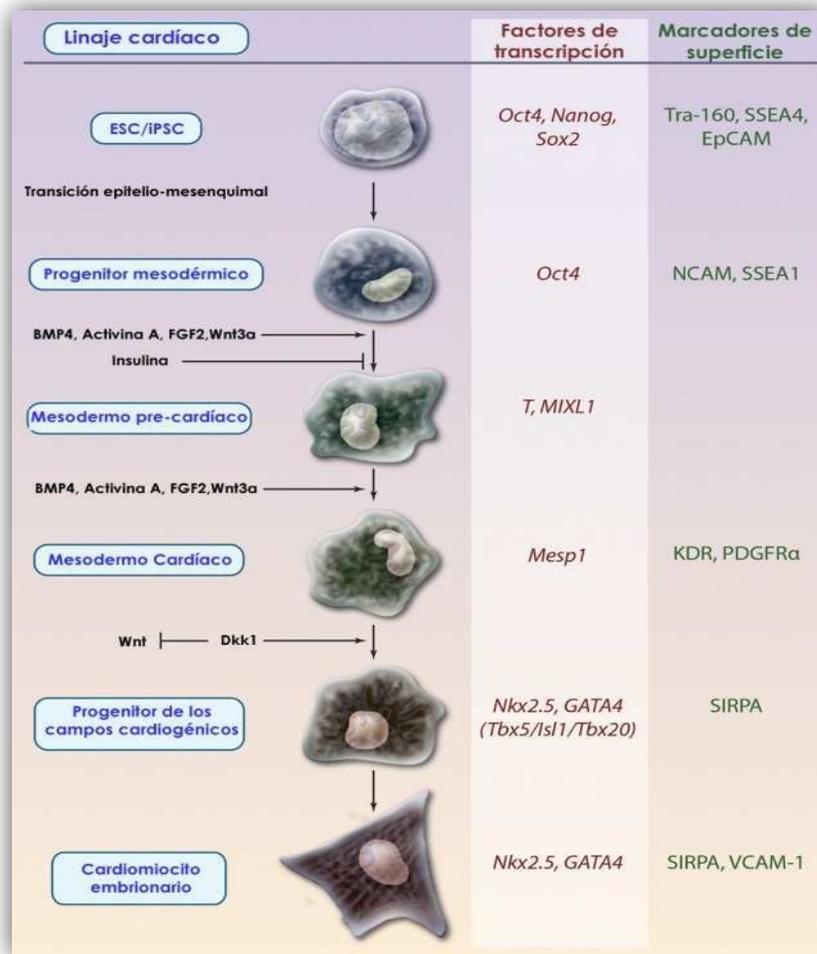


Figura 10. Modelo de diferenciación secuencial a CM a partir de células pluripotentes humanas. Este modelo simplificado representa la jerarquía del linaje cardíaco a través de los distintos progenitores identificados mediante la expresión de factores de transcripción y marcadores de superficie. Figura adaptada de ⁽⁷⁹⁾.

La metodología más usada para obtener CM a partir de CMEh, comprende la formación de CE (agregados celulares tridimensionales denominados cuerpos embrioides), a partir de colonias de CMEh. Este tipo de cultivo se originó a partir de la disociación y reagregado de células murinas embrionarias en cultivos en gota colgante, lo que daba como resultado esferas, con una capa interna de células tipo ectodermales y una capa externa de células endodermales, de aspecto similar a los embriones de post-implantación y por eso se los llamo CE ⁽⁸⁰⁾. Los CE logran diferenciarse a las 3 capas germinales ⁽⁸¹⁾ y , a diferencia de lo que ocurre en el desarrollo *in vivo*, los CE suelen ser muy variables en su estructura y composición; y un porcentaje de los mismos presenta, de forma espontánea,

estructuras contráctiles al ser diferenciados *in vitro*. Muchos aspectos de la cardiogénesis pueden estudiarse empleando el modelo de CEs. A pesar de que existen discrepancias en cuanto al momento de la segregación de los progenitores de los distintos linajes, una vez que se inicia el programa molecular de diferenciación cardíaca, los progenitores cardíacos derivados de CMEs se involucran en la recapitulación de todos los fenotipos de células cardíacas aunque sin respetar ninguna organización espacial en particular. ⁽⁸²⁾

Existen algunos parámetros críticos que determinan el éxito de la diferenciación cardíaca *in vitro* como por ejemplo el número inicial de células utilizado para formar los CEs, la composición del medio de cultivo, la línea celular que se emplea y el momento de la diferenciación en que los CEs pasan a ser cultivados en adhesión. A diferencia de las células murinas, las células pluripotentes humanas son más reticentes a ser disociadas en suspensiones unicelulares y re-agregadas, por lo que en los primeros protocolos de diferenciación cardíaca los CEs se formaban utilizando colagenasa tipo IV sobre las colonias de CMEh, y permitiendo que las mismas se disocien en fracciones irregulares dando origen a CEs de diverso tamaño, los cuales eran cultivados en suspensión en placas de petri no adherentes en un medio conteniendo suero fetal bovino (SFB). Los CEs eran luego transferidos a placas pre-tratadas con gelatina, facilitando de esta forma su adhesión y posterior crecimiento. Normalmente, entre los 4 y 8 días post-adhesión se observaban áreas contráctiles

Estos primeros estudios permitieron demostrar que las células que conforman las áreas contráctiles mencionadas, exhiben propiedades estructurales, funcionales y moleculares similares a las que presentan los CM embrionarios ⁽⁸³⁻⁸⁵⁾. La reproducibilidad de estos primeros protocolos resultó ser una de las principales limitaciones. Esto se debió en parte al uso de SFB en el medio, cuya composición no es definida y presenta gran variabilidad entre lotes y proveedores, a la variabilidad fenotípica existente entre las diferentes líneas de CMEh empleadas y al tamaño irregular de partida de los CEs. Además, en estas condiciones se obtienen derivados de las tres capas germinales, por lo que resulta muy complejo identificar, aislar y cuantificar el número de CM obtenido (cuyo porcentaje suele ser minoritario). Dada la heterogeneidad de las poblaciones celulares que

conforman los CE, la obtención de poblaciones homogéneas de células cardíacas en última instancia, depende de los protocolos y de la especificidad del proceso de selección de células. La disección mecánica de las zonas contráctiles ⁽⁸⁶⁾ y la purificación por centrifugación en gradiente de Percoll ⁽⁸⁷⁾ han sido las técnicas más utilizadas para optimizar la selección de CM, sin embargo el grado de pureza que se consigue resulta insuficiente para fines clínicos o de investigación ⁽⁸⁸⁾.

Con el fin de optimizar la diferenciación cardíaca *in vitro*, numerosos investigadores han diseñado nuevos protocolos basados en la generación de CE de tamaño uniforme cultivados en medios completamente definidos. En cuanto a la composición del medio de cultivo se han desarrollado una variedad de medios específicos para lograr una diferenciación cardíaca eficiente. Para inducir la cardiomiogénesis (en ausencia de SFB), los distintos medios basales, son suplementados mediante el agregado de factores de crecimiento involucrados en el desarrollo cardíaco *in vivo* tales como BMP4, activina A, FGF2, agonistas y antagonistas de la vía de señalización de Wnt y Insulina y VEGF. La concentración de cada uno de estos factores debe ser optimizada para cada línea de CMEh empleada ya que la variabilidad en el requerimiento de los mismos se debe, en parte, a la señalización endógena mediada por estos factores que presentan las células ^(89, 90). Mas recientemente, debido al gran costo, su rápida degradación y la variación entre lotes de la bioactividad de los mismos, los factores de crecimiento han comenzado a ser reemplazados por pequeñas moléculas sintéticas que emulan los mismos efectos con mayor reproducibilidad y eficacia.

La heterogeneidad de los CE formados en los primeros protocolos representó una gran limitación para obtener reproducibilidad y sincronidad en la diferenciación cardíaca. Con el fin de mejorar la fiabilidad y solidez de los protocolos de diferenciación, se ha desarrollado una técnica en donde las CMEh son disgregadas enzimáticamente hasta obtener una suspensión unicelular, se plaquean en un número controlado en placas no adherentes de 96 pocillos y luego se facilita su agregación mediante centrifugación ⁽⁹¹⁾. De esta manera se logró obtener gran cantidad de CE de tamaño uniforme. A partir de este desarrollo, han aparecido diferentes variantes comerciales y caseras para lograr

formar CEs de tamaño uniforme. Además del uso de placas de múltiples pocillos, también se ha implementado la utilización de micropocillos (de diversos biomateriales) de tamaño definido pre-tratados con distintas proteínas de matriz extracelular y la microimpresión de patrones, que se usan para sembrar las CMEh y generar colonias de tamaño controlado que darán origen a CEs de tamaño uniforme ⁽⁹²⁻⁹⁶⁾.

En los últimos años se han desarrollado también protocolos que no se basan en la formación de CEs sino que parten de cultivos de CMEh en monocapa. Esta alternativa resulta particularmente atractiva para ser empleada en aquellas líneas celulares que no pueden disgregarse fácilmente con enzimas, además de ser menos trabajosa. Sin embargo la eficiencia de estos protocolos en monocapa ha sido probada solo en unas pocas líneas celulares.

Actualmente, el cultivo de CEs con concentraciones optimizadas de factores de crecimiento en el medio, es el método de diferenciación mas usado para lograr CM con una alta eficiencia.

En cuanto a las técnicas para aislar CM de una población mixta de células diferenciadas se han desarrollado métodos físicos y métodos de selección genética y no genética. Como mencionamos previamente la disección manual de las áreas contráctiles de los CEs y el uso de un gradiente de Percoll se encuentran entre la primeras técnicas empleadas pero ambas resultan muy laboriosas, su eficiencia es muy variable (se han reportado eficiencias entre un 2% y un 70%)^(84, 97) y dependen de la formación de grandes áreas contráctiles. Otro método de selección consiste en utilizar líneas celulares que han sido modificadas de manera tal que adquieran resistencia a un determinado antibiótico o expresen alguna proteína reportera bajo el control de un promotor cardíaco específico ^(98, 99). De esta manera se han desarrollado numerosas líneas de CMEh que una vez diferenciadas permiten aislar las células cardíacas por el agregado de antibióticos al medio de cultivo o por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por su nombre en inglés) o ambas ^(99, 100). La elección de la técnica mas conveniente depende de la aplicación para la cual se necesiten las células. Si se busca enriquecer un cultivo en CM, probablemente se utilizará la selección

mediada por antibiótico. Ésta es más conveniente ya que no requiere aislar y separar las células por citometría de flujo, y permite obtener cultivos muy puros. El momento a lo largo de la diferenciación en el que se agrega el antibiótico es crucial y debe ser determinado de manera tal que no afecte la viabilidad ni la maduración de los CM en cultivo ⁽¹⁰¹⁾. Mientras que si lo que se desea es tener un seguimiento de la diferenciación cardíaca a lo largo del tiempo, será mas conveniente utilizar una línea reportera fluorescente (ej: proteína verde fluorescente) o luminiscente (ej: luciferasa). Estas líneas también permiten el seguimiento *in vivo* en modelos animales post trasplante celular ⁽¹⁰²⁾.

A diferencia de lo que ocurre en otros linajes como el hematopoyético, donde los marcadores de superficie característicos de cada población están bien definidos, los marcadores para el linaje cardíaco recién se están empezando a establecer. Al momento se utiliza la combinación de dos o tres proteínas dentro de las cuales se encuentran la molécula de adhesión vascular 1, (VCAM1 por su sigla en inglés⁽¹⁰³⁾), la proteína reguladora de señal alfa (SIRPA por su sigla en inglés ⁽¹⁰⁴⁾) y el receptor de VEGF2, KDR ⁽¹⁰⁵⁾. Sin embargo, no existe aun un consenso claro sobre la identidad inmunofenotípica que presentan los CM en sus diferentes estados de diferenciación y madurez. Otro método no genético se basa en discriminar a los CM por la elevada densidad mitocondrial ⁽¹⁰⁶⁾. Utilizando el colorante vital Tetrametilrodamina metil éster (TMRM) que tiñe selectivamente las mitocondrias, es posible purificar CM derivados de CMEh con un 99% de pureza. La limitante que presenta esta técnica es que solo puede ser empleada en CM maduros de más de 8 semanas en cultivo siendo ineficaz para progenitores o estadios más tempranos.

Las técnicas para aislar y purificar CM de cultivos de poblaciones mixtas aun están siendo refinadas y puestas a punto. La eficiencia relativa y las limitaciones prácticas que presentan las técnicas conocidas hasta el momento derivaran en mejoras futuras que permitirán no solo discriminar los CM de otros tipos celulares sino también obtener CM de distinto tipo y grado de madurez.

Si bien los protocolos de diferenciación cardíaca han mejorado ampliamente a lo largo de la última década, aun presentan limitaciones significativas con respecto a la variabilidad en la cantidad y pureza de los CM

obtenidos dependiendo de las líneas celulares utilizadas, la reproducibilidad, complejidad y el costo de los protocolos

Caracterización de los CM derivados de CMEh.

Para determinar la efectividad de la derivación de CM a partir de CMEh, es necesario caracterizar los CM obtenidos. La primer señal que indica que el protocolo ha sido exitoso es claramente la aparición de áreas contráctiles. Si bien los primeros trabajos publicados, reportaban el porcentaje de CEs contráctiles como una medida de la diferenciación cardíaca actualmente la proporción de CM obtenidos se estima mediante inmunotinciones intra-citoplasmáticas de proteínas cardíacas evaluadas mediante citometría de flujo. Esta técnica permite evaluar de manera más eficaz el/los protocolo/s empleado/s. Además, existen numerosos ensayos complementarios que pueden ser considerados al momento de caracterizar los CM dependiendo de la rigurosidad requerida (ej: análisis por RT-PCR en tiempo real para evaluar la expresión de genes cardíacos, inmunotinciones que permiten detectar la expresión de proteínas cardíacas, microscopía electrónica para determinar la ultraestructura celular y la densidad mitocondrial) ^(107, 108). Ensayos de mayor rigor involucran la evaluación de la integridad funcional de los CM. Una de las principales características de los CM es la capacidad de generar potenciales de acción (PAs) ⁽¹⁰⁹⁾, los cuales son necesarios para la propagación de la señal eléctrica en el miocardio y para generar la liberación intracelular de calcio permitiendo la contracción muscular. Mediante la evaluación de la capacidad de generar PAs y sus características (como amplitud, duración, frecuencia, etc) se puede no solo dar certeza de la presencia de CM sino también distinguir que tipo de CM se obtuvo.

Citoquinas.

Las citoquinas comprenden un amplio grupo de proteínas o glicoproteínas que poseen la capacidad de modular la actividad de células individuales y de tejidos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Éstas, son moléculas de bajo peso molecular, de aproximadamente 15-30 KDa, constituidas por 120-180 aminoácidos. Originalmente, el término interleuquina (IL) se aplicó a moléculas reguladoras de la comunicación entre distintos tipos de leucocitos, numerándose correlativamente a medida que se las descubría (IL-1, IL-2, etc). No obstante, algunas de ellas se detectaron inicialmente en ensayos funcionales *in vitro* y aún conservan su denominación original de acuerdo a la función biológica que permitió su identificación, como es el caso del factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor transformador del crecimiento (TGF).

Familia de citoquinas tipo interleuquina 6.

La familia de citoquinas tipo interleuquina-6 (IL-6) está compuesta por una docena de miembros, entre los cuales podemos mencionar a la IL-6, la interleuquina-11 (IL-11), el factor inhibitorio de leucemias (LIF), la oncostatina-M (OSM), y la cardiotrofina-1 (CT1). La estructura de estas citoquinas se caracteriza por poseer cuatro alfa hélices ordenadas formando una topología ascendente-ascendente-descendente-descendente ⁽¹¹⁰⁾. La unión entre las alfa hélices es posible gracias a un cordón de 25 aminoácidos que une las hélices A y B, un cordón corto que une las hélices B y C y finalmente un segundo cordón largo que une las hélices C y D. Fuera del haz que contiene estas cuatro hélices principales hay una pequeña hélice adicional, la hélice E (Figura 11) ⁽¹¹¹⁾.



Figura 11. Representación de la estructura de IL-6. Las cuatro hélices principales están señaladas como A, B, C y D. La hélice adicional al final del cordón largo se muestra como E. Figura adaptada ⁽¹¹¹⁾.

Generalmente, estas proteínas solubles de bajo peso molecular, causan efectos pleiotrópicos regulando un amplio rango de actividades biológicas que incluyen entre otras el crecimiento, la proliferación celular y la diferenciación celular, la regulación del metabolismo energético, la modulación de la inflamación, la hematopoyesis, la embriogénesis, la regeneración hepática y neuronal y la regulación de la fisiología cardiovascular ^(112, 113). A través de la activación de genes blanco, involucrados en el crecimiento, la diferenciación, la supervivencia, la apoptosis y la proliferación, las citoquinas tipo IL-6 juegan un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular y tisular ⁽¹¹⁴⁾.

Factor inhibitorio de Leucemias.

LIF recibe su nombre gracias a la habilidad de esta citoquina de inhibir la diferenciación de células M1 de leucemia mieloide a macrófagos, sin embargo, dada la naturaleza pleiotrópica de esta citoquina este nombre resulta desafortunado. LIF es una glicoproteína de 180 aminoácidos y en humanos, presenta un peso molecular de entre 37 a 62 kDa dependiendo del grado de glicosilación ^(115, 116). LIF existe en al menos tres isoformas: una forma soluble denominada LIF-D, una forma intracelular ubicada en el núcleo denominada LIF-i; y una tercer forma asociada a la matriz extracelular, denominada LIF-M. LIF-D y LIF-M son traducidas a partir de transcritos alternativos que difieren en el primer exón

el cual codifica para distintos péptidos señal, los que le dan a la proteína madura una localización subcelular diferencial. LIF-i es una isoforma truncada de la proteína debido a la ausencia de un codón ATG en el primer exón (por lo que su traducción comienza en el primer codón ATG del segundo exón). La expresión de estas tres isoformas esta regulada de manera independiente durante la embriogénesis y la vida adulta ^(117, 118).

LIF es secretada por diversos tipo celulares incluyendo fibroblastos, macrófagos, condrocitos, células mesenquimales, células estromales de médula ósea, células endoteliales, astrocitos y células tumorales ^(119, 120). LIF es considerada una citoquina pleiotrópica ya que puede actuar de manera pro- o anti diferenciación y pro- o anti supervivencia dependiendo del tipo celular y la ventana temporal en la que actúe ^(121, 122). *In vivo*, la producción de LIF esta asociada a procesos inflamatorios y enfermedades autoinmunes. Además, LIF se encuentra presente en la decidua uterina previo a la implantación del embrión, y sería una de las proteínas responsables en proveer un ambiente inmunotolerante para el feto durante la gestación ⁽¹²³⁾.

Las CME murinas, a diferencia de las CME humanas, dependen de la presencia de LIF para el mantenimiento de su estado pluripotente. Si bien, al principio esta dependencia diferencial resultaba desconcertante, con el tiempo numerosos estudios a nivel transcripcional han demostrado las similitudes y diferencias entre los dos tipos celulares; llegando a la conclusión de que probablemente la mayor diferencia se deba a que el momento en el desarrollo en el cual se derivan unas y otras líneas no es temporalmente equivalente ^(124, 125). Las CMEh son derivadas a partir del epiblasto tardío mientras que las CME murinas corresponderían a un estadio mas inmaduro. Estos resultados estarían indicando que existe una ventana temporal acotada en la que existe una dependencia de LIF para el mantenimiento de la pluripotencia en los embriones que varía en las diferentes especies ^(126, 127).

Mecanismo de acción: receptores y transducción de señales.

Las citoquinas de la familia tipo IL-6 actúan mediante el ensamblaje de complejos multiméricos de receptores que incluyen los receptores específicos para cada citoquina (sub-unidad β) y un receptor común a todas, conocido como glicoproteína-130 (gp130, sub-unidad α) ^(128, 129). Esta glicoproteína es el principal transductor de las señales mediadas por los miembros de la familia de citoquinas del tipo IL-6 y, se encuentra ampliamente distribuida en diversos tejidos humanos incluyendo el riñón, el pulmón, la placenta, el cerebro y el corazón embrionario y adulto (figura 12) ⁽¹³⁰⁾.

La unión de las citoquinas al complejo multimérico es capaz de inducir la activación de tres vías de señalización: la vía JAK/STAT (quinasa Janus/transductor de señal y activador de la transcripción); Ras/ERK (quinasa regulada por señales extracelulares), y PI3K/PKB (fosfatidilinositol-3-quinasa/ proteína quinasa B) ⁽¹³¹⁾. En particular se ha sugerido que la vía gp130/JAK/STAT jugaría un importante rol en el desarrollo cardíaco temprano ^(132, 133).

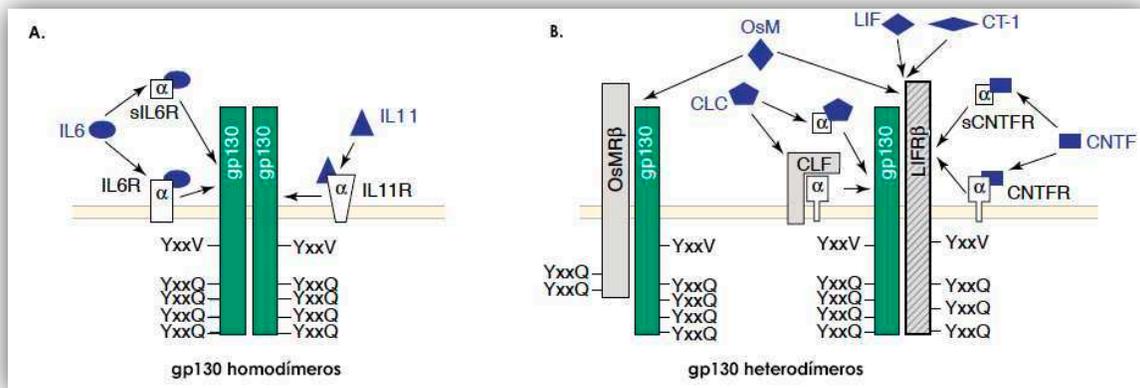


Figura 12. Regulación de las vías de señalización dependientes de gp130 luego de la unión de la activación por unión del ligando. La unión del ligando produce la formación de complejos de receptor activados. **A.** La unión de IL-6 o IL-11 sus receptores específicos (sub-unidad α) produce la homodimerización de gp130. **B.** La presencia de subunidades α solubles permite la señalización en trans en células que solo expresan la sub-unidad β . La unión de OSM, LIF y CT-1 produce la heterodimerización de los complejos receptores. Figura adaptada de ⁽¹²⁹⁾.

El primer evento en la señalización es la interacción de la citoquina con el complejo receptor. Inmediatamente luego de la dimerización del complejo receptor se produce la activación catalítica de las tirosinas de JAK, presentes en

las regiones proximales al dominio intracitoplasmático, las cuales son responsables de la fosforilación del mismo. La fosforilación de una única tirosina proximal a la membrana (Y757 en ratón y Y759 en humano) en el dominio citoplasmático del receptor gp130 es necesaria y suficiente para lograr reclutar a la fosfatasa intracitoplasmática SHP2 al dominio SH2 ((del inglés *Src Homology 2*) presente en el receptor. La subsecuente fosforilación y activación de dicho dominio conlleva la activación mediante fosforilación de la cascada de transducción de señales Ras/ERK1/2 (figura 13) ⁽¹³⁴⁾.

En este sentido, la fosforilación de SHP2 provee de elementos de anclaje a la proteína Grb2 (del inglés *Growth factor receptor binding protein-2*). Ésta es una proteína citosólica de 25 kDa, que presenta un dominio SH2 y dos dominios SH3 (del inglés *Src Homology 3*). A través del dominio SH3 se asocia a Sos (del inglés *Son of sevenless*), un intercambiador de nucleótidos de guanina que interviene en la activación de la proteína Ras .

La fosforilación de SHP2, le permite formar complejos con las proteínas de andamiaje Gab1/2 (del inglés *Growth factor receptor binding protein2-associated binding protein 1/2*) y la subunidad regulatoria p85 de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), lo que lleva a la activación de la vía de señalización mediada por PKB/Akt (aunque también puede contribuir a la vía de Ras/ERK1/2)(figura 13)⁽¹³⁵⁾.

Por el contrario, si los residuos fosforilados son los presentes en el dominio C-terminal del complejo receptor se produce el anclaje y activación de proteínas STAT (principalmente STAT1 y 3). Una vez fosforiladas (por acción de la quinasa JAK), las proteínas STAT se disocian del receptor y se homo- o heterodimerizan mediante interacciones recíprocas a través del dominio SH2 de un monómero y la tirosina fosforilada del otro. Las proteínas STAT dimerizadas, translocan al núcleo y se unen a elementos específicos en el ADN, que se hallan presentes en las regiones promotoras de genes, activando así su transcripción ⁽¹³⁶⁾ (Figura 13). La activación de los STATs por estímulos de ligandos es un proceso transiente que puede durar desde unos pocos minutos a horas hasta que eventualmente las proteínas STAT en el núcleo sean desfosforiladas y retornen al citoplasma ⁽¹³⁷⁾ .

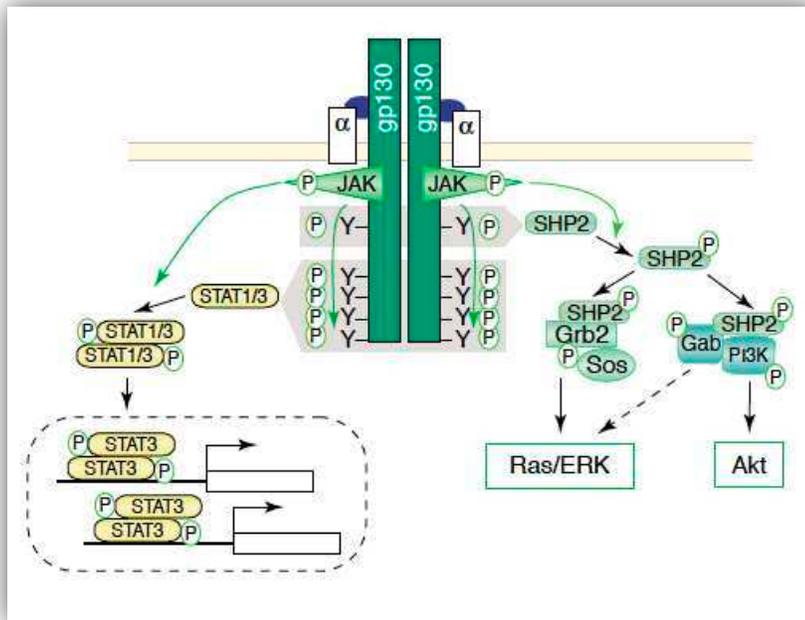


Figura 13. Esquema representativo de la activación intracelular de las vías de señalización. Por simplicidad, solo se muestra la activación a partir de la formación de homodímeros de gp130, pero lo mismo ocurre luego de la heterodimerización. La fosforilación de las tirosinas (Y) en el dominio intracitoplasmático por medio de las JAK asociadas constitutivamente es un requerimiento fundamental para la activación de la señalización. La proteína SHP2 es fosforilada por las JAK, asociadas al dominio intracitoplasmático del receptor, y se une a Grb2 (que a su vez esta asociada constitutivamente a Sos) activando la vía Ras/ERK. Por otro lado SHP2 activado puede formar un complejo terciario con Gab1/2 y la subunidad p85 de la PI3K activando la vía de Akt. STAT1/3 se une a los motivos YXXQ fosforilados y en consecuencia es activado, forma homo o heterodímeros y transloca a núcleo donde se unirá a elementos respondedores en el ADN activando la transcripción de genes blanco. Figura adaptada de ⁽¹²⁹⁾.

La vía de señalización JAK/STAT puede ser regulada negativamente a distintos niveles mediante diversos mecanismos. La familia de proteínas supresoras de citoquinas (SOCS por su nombre en inglés) es uno de los principales mecanismos que regulan la señalización mediada por citoquinas. La retroalimentación negativa mediada por SOCS controla la duración e intensidad de la señalización vía JAK/STAT inducida por las citoquinas de la familia de IL-6. ^(138, 139). Dentro de las proteínas de la familia SOCS, SOCS1 y SOCS3 son estructuralmente similares y ambas tienen la capacidad de inhibir fuertemente la actividad quinasa de las proteínas JAK, sin embargo sus patrones de expresión son diferentes. SOCS3 es inducido por varias de las citoquinas de la familia incluyendo IL-6, CT-1 y LIF (figura 14) ⁽¹⁴⁰⁾.

Otras proteínas involucradas en la regulación de la señalización mediada por STAT son las proteínas inhibidoras de STAT activada (PIAS, por su nombre en

inglés). Existen diversos mecanismos descritos mediante los cuales estas proteínas son capaces de regular la actividad transcripcional de las STATs como por ejemplo mediante el bloqueo de los sitios de unión al ADN presente en las STATs, el reclutamiento de deacetilasas de histonas o la sumoilación y secuestro de factores de transcripción ⁽¹⁴¹⁾. Numerosos estudios han demostrado que las proteínas PIAS tienen un rol fundamental en regular las STATs ⁽¹⁴²⁾. PIAS interactúa con los dímeros de STATs (no con los monómeros), lo que explicaría que la interacción PIAS-STAT requiere de la estimulación mediada por citoquinas (figura 14) ⁽¹⁴³⁾.

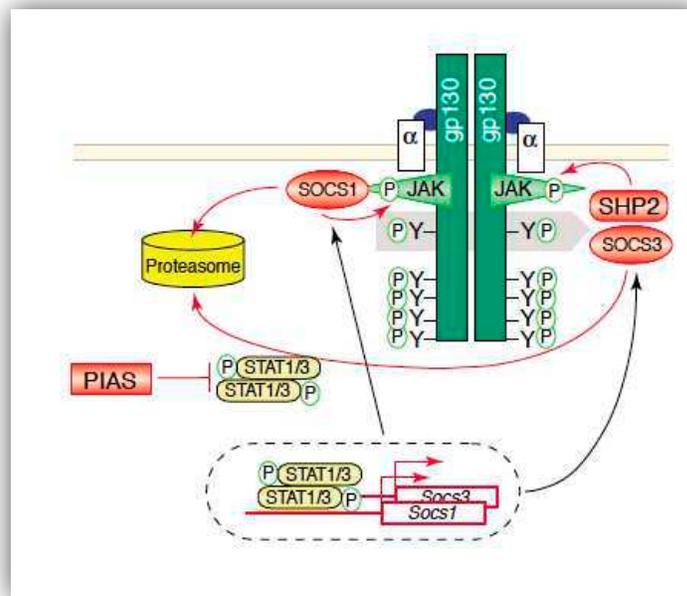


Figura 14. Esquema representativo de la regulación negativa de la vía JAK/STAT. STATs en el núcleo activan la transcripción de SOCS1/3 lo que lleva a la degradación proteosómica de componentes de la vía de señalización. Otro mecanismo consiste en el secuestro de STATs activados por medio de la proteína PIAS, lo que evita la dimerización de los STATs y su consecuente translocación a núcleo. Figura adaptada de ⁽¹²⁹⁾.

Vía de señalización LIF/gp130 en el corazón.

Las funciones cardíacas son moduladas por diversos factores autócrinos y parácrinos, incluidos factores neurohormonales, factores de crecimiento y citoquinas. El progreso en la biología molecular cardiovascular ha llevado al ahora ampliamente aceptado concepto de que el corazón no es simplemente un aparato contráctil, sino un órgano secretor productor de un gran número de

factores autócrinos / parácrinos y, al mismo tiempo, que el miocardio es el blanco de estos factores.

Diversos trabajos han demostrado que el sistema del receptor gp130 desempeñaría un importante papel cardioprotector en respuesta al estrés fisiológico (edad avanzada, preñez) y patofisiológico (isquemia, aumento de presión, presencia de agentes cardiotóxicos e inflamación), promoviendo la supervivencia de los CM, mediante la inducción de mecanismos adaptativos, permitiendo preservar la funcionalidad cardíaca en el corazón adulto. La hipertrofia cardíaca constituye una de las principales formas de respuesta de los CM a estímulos de estrés y permite a la célula cardíaca generar mayor trabajo provocando un aumento de la función de la bomba cardíaca.

Las características fenotípicas que exhiben ratones deficientes en gp130, permiten asignarle un papel crítico al receptor en el desarrollo cardíaco ^(136, 144-147). Ratones gp130 ^{-/-} mueren entre 12.5 días post coito y el término; y presentan anomalías a nivel cardíaco y hematopoyético. Al analizar el corazón de estos ratones se encontró que poseen un desarrollo hipoplásico del miocardio ventricular sin presentar defectos de tabicación. El grosor de la pared compacta del ventrículo es un 20% menor que los ratones *wild type*, lo que indicaría que gp130 tiene un rol en el crecimiento y mantenimiento de los CM pero no es su diferenciación ya que los mismos presentan una estructura celular normal y expresan todos los marcadores específicos ⁽¹⁴⁶⁾. Con el fin de evitar la muerte embrionaria, se han desarrollado modelos de ratones KO condicionales, en donde la delección de gp130 se activa en el corazón luego del nacimiento. Estos animales presentaron alteraciones morfológicas de los CM ventriculares, indicativo de que citoquinas que señalizan vía gp130 tendrían un importante rol en el mantenimiento de éstas células luego del desarrollo embrionario ⁽¹⁴⁵⁾. Además si bien estos animales, no presentaron problemas cardíacos durante los primeros 6 meses de vida, luego desarrollaron problemas cardíacos característicos de la vejez a una temprana edad asociado con una elevada mortalidad. En el corazón la activación de gp130 ocurre, en respuesta a inflamaciones, a sobrecargas de presión, a lesiones isquémicas y durante la embriogénesis. Múltiples reguladores de la vía JAK/STAT, incluyendo LIF, IL-6, CT-1 y SOCS3, se expresan en niveles elevados

en el corazón luego de un infarto, demostrando la existencia de un microambiente rico en citoquinas en el miocardio ⁽¹⁴⁸⁾.

Durante el desarrollo embrionario se ha reportado que LIF y CT-1 están presentes en el tubo cardíaco. Ambas citoquinas tienen la capacidad de inducir el crecimiento de los CM y promover su supervivencia, lo que sería indicador de que el sistema mediado por gp130 tendría un rol fundamental durante el desarrollo cardíaco embrionario. El receptor de LIF y su ligando también se expresan abundantemente en el corazón neonatal murino ^(149, 150) y ensayos *in vitro* han demostrado que LIF tiene un efecto hipertrófico en CM adultos en cultivo, predominantemente mediante el aumento en el largo de los CM por adición de unidades sarcoméricas ⁽¹⁵¹⁾. Si bien inicialmente se creía que la vía de señalización mediada por STAT3 era la única responsable de dicho efecto, ahora se sabe que la cascada de señalización mediada por MEK/ERK sin duda tiene clara predominancia en comparación con JAK / STAT y las vías de PI3-K en la hipertrofia cardíaca mediada por LIF/gp130 ⁽¹⁵²⁾.

La vía de señalización mediada por JAK/STAT sería la principal responsable del efecto citoprotector de LIF en los CM. Por ejemplo, se ha demostrado que LIF reduce el daño y la apoptosis en CM luego de un evento isquémico en una manera STAT3 dependiente ⁽¹⁵³⁾. Ensayos *in vivo* han demostrado que la sobreexpresión de LIF durante un infarto de miocardio agudo (inducido experimentalmente) provoca hipertrofia compensatoria de los CM y disminución de los niveles de apoptosis preservando la función ventricular ⁽¹⁵⁴⁾.

Además, LIF estimula el crecimiento y la proliferación de los fibroblastos cardíacos participando en la remodelación tisular luego de una lesión isquémica ^(155, 156). Se cree que la expresión de LIF estaría involucrada en la regulación del depósito de proteínas de matriz extracelular, y en la regulación de numerosos compuestos involucrados en la formación de cicatrices. De hecho, se ha demostrado que la sobreexpresión de LIF *in vivo*, es capaz de reducir el tamaño del infarto, promover la neo-vascularización y reducir la fibrosis. También se ha sugerido que LIF sería la responsable de reducir la reacción inflamatoria luego de un evento isquémico ^(157, 158).

LIF también se encuentra en el corazón humano adulto en situaciones fisiológicas normales y es expresada por distintos tipos celulares presentes en el miocardio como células endoteliales y fibroblastos. LIF dentro del miocardio podría proporcionar un importante mecanismo autócrino/parácrino, responsable de integrar las respuestas ante situaciones de estrés en el corazón ⁽¹⁵⁹⁾.

Toda esta evidencia sugiere que LIF tiene una importante participación en la señalización autócrina/parácrina en el miocardio, actuando como mediador en respuestas (a corto y largo plazo) frente a injurias, previniendo la muerte celular y estimulando el crecimiento y la supervivencia del los CM.

Hipótesis y Objetivos

El **objetivo general** de esta Tesis de Doctorado ha sido aportar nuevos conocimientos sobre la relevancia biológica de la citoquina LIF a lo largo del proceso de diferenciación de células madre embrionarias humanas a cardiomiocitos.

Objetivo 1: Optimización de la diferenciación cardíaca a partir de CMEh.

Como se mencionara previamente numerosos grupos han desarrollado, con diverso éxito, protocolos que permiten identificar y aislar progenitores cardíacos ⁽⁷⁶⁾ ^(77, 78). Actualmente existe una gran variabilidad en cuanto al rendimiento y eficiencia de los distintos protocolos que se utilizan para la diferenciación cardíaca a partir de CMEh. Esto se debe principalmente a las líneas celulares empleadas y la composición del medio diferenciante que puede ser totalmente indefinida (por ejemplo al usar SFB) o definida (mediante el uso de distintos morfógenos).

Teniendo en cuenta estas observaciones el primer objetivo de esta Tesis ha sido desarrollar un protocolo de diferenciación cardíaca a partir de CMEh utilizando un medio de composición definida.

Objetivo 2: Estudio del efecto de LIF durante la generación de CM a partir de CMEh.

Como se mencionara en la introducción, está establecido que LIF tiene la capacidad de promover la supervivencia de CM cultivados *in vitro* y que dicha citoquina se encuentra presente en corazones adultos luego de eventos de estrés, previniendo el daño del tejido cardíaco frente a ambientes patológicos. La información proveniente de los modelos de ratones KO para gp130 permiten asignarle a las vías de señalización medidas por dicho receptor, un rol fundamental en el desarrollo cardíaco. Sin embargo hasta la actualidad no se ha reportado la presencia de LIF y/o función de las vías de señalización activadas por la citoquina, durante el desarrollo cardíaco humano.

En base a lo aquí expuesto el segundo objetivo de esta Tesis consistió en evaluar el rol de LIF durante la diferenciación cardíaca de células madre pluripotentes.

Objetivo 3: Generación de células madre pluripotentes inducidas.

La aparición de las CMPIs en el 2006 significó un cambio de paradigma estableciendo que células terminalmente diferenciadas podían ser reprogramadas hasta su estado indiferenciado recuperando así su capacidad pluripotente. Este nuevo modelo representa una herramienta sin precedentes para el modelado de enfermedades genéticas, testeo de drogas y como fuente de células para el tratamiento de enfermedades degenerativas.

Teniendo en cuenta lo aquí expuesto el tercer objetivo de esta Tesis consistió en la obtención, caracterización y diferenciación a cardiomiocitos de CMPIs generadas a partir de fibroblastos humanos.

El corazón humano esta formado por diversos tipos celulares dentro de los cuales se encuentran los CM, las células endoteliales y las células de soporte (tipo mesenquimales). Se cree que éstas ultimas están involucradas en el mantenimiento de la homeostasis celular de los CM ⁽¹⁶⁰⁾. Existe evidencia que mecanismos parácrinos mediados por las células de soporte son las responsables de promover la supervivencia de los CM en el corazón adulto ⁽¹⁶¹⁾. Estas células son conocidas por secretar un amplio rango de citoquinas y factores de crecimiento que pueden inhibir la fibrosis y la apoptosis, disminuir la remodelación ventricular, favorecer la angiogénesis y contribuir a la cardiomiogénesis ^(160, 162, 163). Sin embargo se desconoce si factores liberados por las mismas tiene algún rol durante el desarrollo cardíaco en la embriogénesis.

Considerando lo aquí expuesto nuestra **hipótesis de trabajo** es que las células presentes en el tejido cardíaco en desarrollo secretan la citoquina LIF, la cual es uno de los factores responsable de prevenir la muerte celular por apoptosis en cardiomiocitos mediante la activación de la vía JAK/STAT3 durante el desarrollo embrionario.

Resultados

Capítulo I.

Validación del estado indiferenciado la línea de CMEh,WA09.

En nuestro laboratorio contamos con varias líneas de CMEh, entre ellas las líneas HUES-5, WA-09 (o H9), WA-01 y HUES-16. En trabajos previos determinamos que las líneas HUES-5 (Universidad de Harvard) y WA-09 (WiCell Institute) son las más adecuadas para trabajar en diferenciación cardíaca dado que al someterlas al protocolo de diferenciación con SFB fueron las que dieron origen a un mayor porcentaje de CEs que presentaban áreas contráctiles ⁽¹⁶⁴⁾. Estas líneas de CMEh fueron propagadas sobre una capa nutricia de fibroblastos murinos embrionarios mitóticamente inactivados (iMEF) por radiación gamma , en medio de cultivo para células madre (hES, por su nombre en ingles : human Embryonic Stem) suplementado con 4 ng/ml de bFGF.

Debido a la elevada tendencia que presentan las CMEh a diferenciarse espontáneamente en cultivo fue necesario confirmar el mantenimiento de su estado indiferenciado antes de exponerlas a los protocolos de diferenciación. Para ello, analizamos la morfología de las colonias, medimos la actividad de la fosfatasa alcalina y determinamos la expresión de ciertos marcadores de estado embrionario.

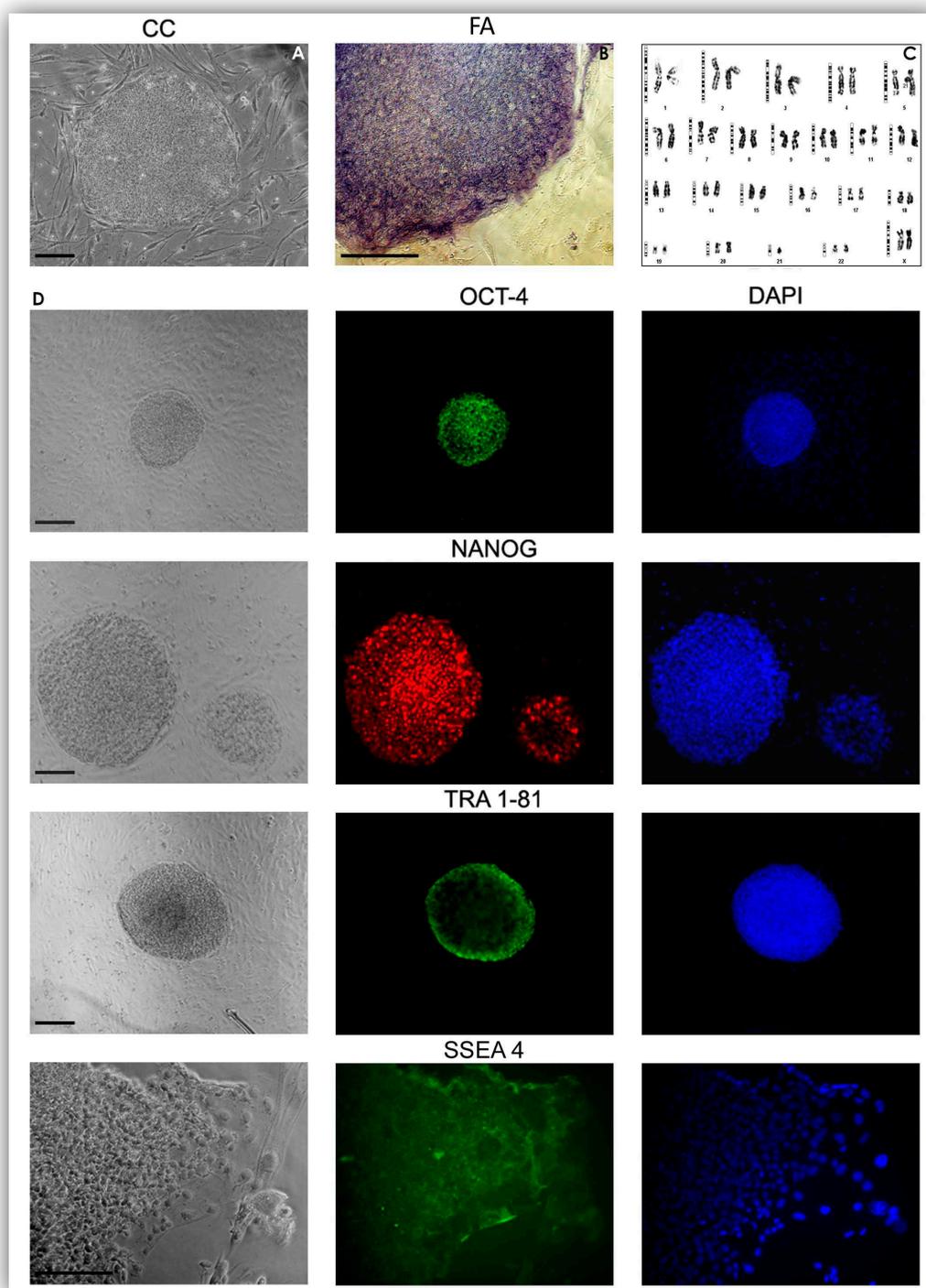


Figura 1. Validación del fenotipo indiferenciado de la línea de CMEh, H9. Fotomicrografías representativas de: **A.** colonia de CMEh crecida sobre una capa nutricia de iMEF. **B.** tinción de la actividad de fosfatasa alcalina (FA). **C.** Análisis del cariotipo mediante bandeado G de la línea de CMEh, H9. **D.** Inmunomarcaciones realizadas empleando anticuerpos primarios específicos contra los marcadores de estado embrionario: Oct-4, Nanog, TRA1-81 y SSEA-4. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La barra representa 100 μ m. CC: Campo claro.

Como puede observarse en la Figura 1, bajo las condiciones experimentales llevadas a cabo en el laboratorio, las colonias de la línea celular H9 de CMEh muestran un fenotipo indiferenciado, presentando una morfología compacta con bordes bien definidos y una relación núcleo/citoplasma elevada. También, exhiben una alta actividad de fosfatasa alcalina, presentan un cariotipo normal característico de las células humanas y expresan los marcadores de estado embrionario: antígeno de rechazo de tumor 1-81 (TRA1-81), antígeno específico de estado embrionario 4 (SSEA-4) y los factores de transcripción: Octámero-4 (Oct-4) y Nanog.

Validación de la capacidad pluripotente.

Además, de la auto-renovación, la pluripotencia es otra de las propiedades más características de las CMEh. La pluripotencia es la capacidad que presentan estas células para diferenciarse y dar origen a derivados celulares de las tres capas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo. De manera similar a lo que ocurre *in vivo*, el protocolo de diferenciación *in vitro* comprende la formación de CEs (agregados celulares tridimensionales) que permite recapitular, en parte, la compleja estructura multicelular que se genera durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. En la Figura 2A se muestra un esquema del protocolo de diferenciación *in vitro* basado en la formación de CEs mediante el uso de enzimas y cultivados en placas no adherentes (cultivo en suspensión) en presencia de SFB y ausencia de bFGF durante 7 días, y su posterior adhesión al sustrato (gelatina) durante al menos 7 días más.

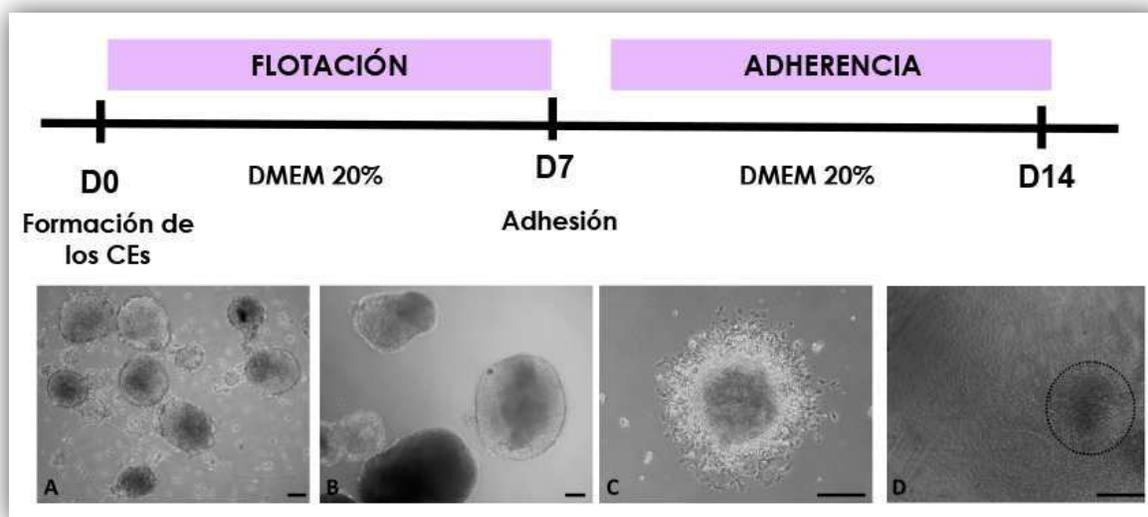


Figura 2. (Panel superior) Esquema del protocolo de diferenciación de CMEh que comprende la formación de CE's en presencia de SFB. (Panel inferior) Fotomicrografías representativas de CE's expuestos al protocolo de diferenciación *in vitro* en presencia de SFB. **A.** CE's en flotación en día 1. **B.** CE's en flotación en día 4. **C.** CE's adheridos en día 5. **D.** CE's en día 14. El área marcada indica una zona contráctil. La barra representa 100 μ m.

El proceso de diferenciación de las CMEh fue evaluado a distintos tiempos (días) determinando los niveles de los transcritos de marcadores de estado embrionario y de linaje, por análisis de RT-PCR en tiempo real. Como se puede observar en la Figura 3, los niveles de expresión de los ARNm correspondientes a los factores de transcripción Oct-4 y Nanog, genes maestros implicados en el mantenimiento del estado embrionario, disminuyeron marcadamente conforme avanzó la diferenciación. Se determinó la presencia de derivados endodérmicos cuantificando los niveles de expresión de los ARNm correspondientes a alfa feto proteína (AFP) y al factor de transcripción endodermal Sox17 (por su nombre en inglés : sex determining region Y-box 17, Figura 4). En particular AFP presentó un marcado aumento en sus niveles de expresión hacia el final del proceso de diferenciación (1000 veces mayor que en el control). Por último, medimos la abundancia del ARNm de Pax-6 (por su nombre en inglés : Paired box protein-6) como marcador de derivados ectodérmicos. Pax-6 es un marcador temprano de diferenciación ectodérmica, particularmente involucrado en el desarrollo del ojo. Los niveles del ARNm de Pax-6 presentaron un pico de expresión al día 7 de la diferenciación (Figura 4). Esta oleada de expresión temporal se ha observado *in*

vivo y se la ha asociado con el rol que este factor de transcripción desempeña en la especificación de linaje (ojo).

Se evaluaron además los niveles de expresión de los transcritos del marcador de mesodermo temprano: T/brachyury y de los marcadores de mesodermo cardíaco: *Mesp1* (por su nombre en inglés : mesoderm posterior 1) e *Islet 1* (por su nombre en inglés : Insulin gene enhancer protein ISL-1). Los niveles del ARNm de T/Brachyury y de *Mesp-1*, presentaron un pico máximo en el día 4 de la diferenciación (30 veces superior respecto al control en ambos casos) y disminuyeron conforme avanzó la diferenciación (Figura 5). Los niveles de expresión del ARNm de *Islet-1* fueron detectables a partir del día 4 del proceso de diferenciación y aumentaron progresivamente hasta alcanzar en el día 14 un nivel de expresión aproximadamente 20 veces superior al exhibido en células indiferenciadas. La presencia de marcadores de linaje cardíaco se evaluó analizando la expresión de los mRNA de la isoforma alfa de la cadena pesada de la miosina (α -MHC), de la proteína de la caja homeótica 2.5 (*Nkx 2.5*) y de la troponina T cardíaca (*cTnT*). La expresión de los 3 mensajeros fue máxima al día 14 de la diferenciación (Figura 5).

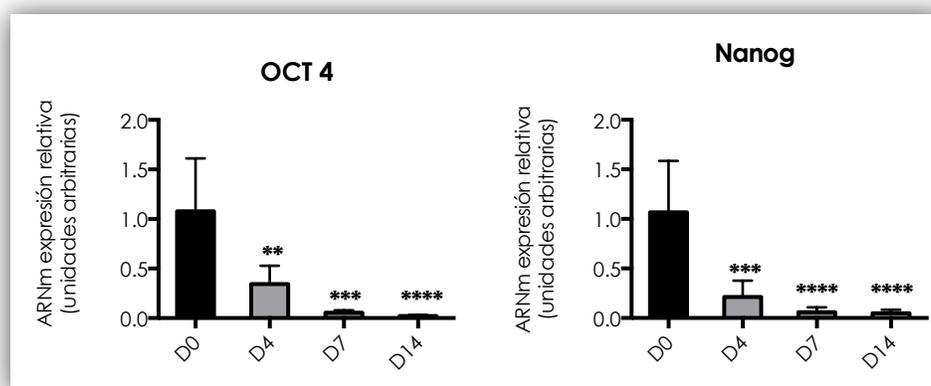


Figura 3. Validación de la diferenciación de CMEh inducida por la presencia de SFB en el medio de cultivo concomitantemente con la remoción de bFGF mediante análisis de RT-PCR en tiempo real de los marcadores Oct-4, Nanog. Los gráficos muestran los niveles de ARNm relativos al día 0 (D0) establecido arbitrariamente como 1. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (** $p < 0,01$ vs D0; *** $p < 0,001$ vs D0; **** $p < 0,0001$ vs D0).

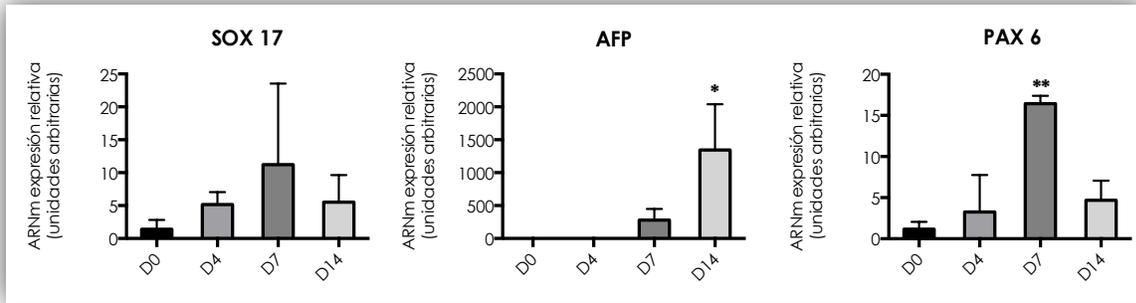


Figura 4. Validación de la diferenciación de CMEh inducida por la presencia de SFB en el medio de cultivo concomitantemente con la remoción de bFGF mediante análisis de RT-PCR en tiempo real de los marcadores de endodermo Sox17 y AFP; y el marcador de neuroectodermo PAX6. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0,05$ vs D0, ** $p < 0,01$ vs D0).

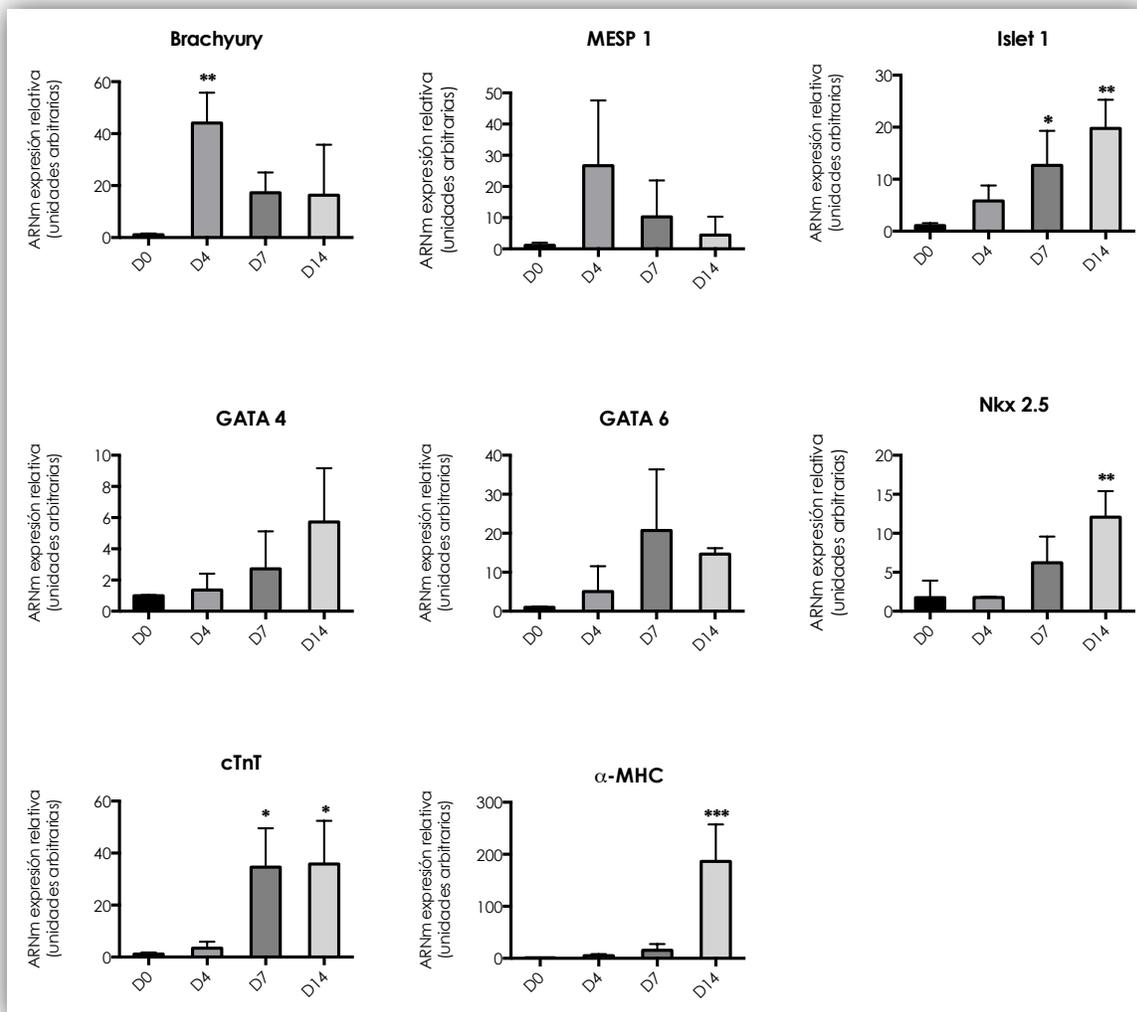


Figura 5. Validación de la diferenciación de CMEh inducida por la presencia de SFB en el medio de cultivo concomitantemente con la remoción de bFGF mediante análisis de RT-PCR en tiempo real de los marcadores Brachyury, Mesp-1, Islet-1, GATA4, GATA6, α -MHC, Nkx2.5, cTnI. Los gráficos muestran los niveles de ARNm relativos al día 0 (D0) establecido arbitrariamente como 1. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0,05$ vs D0; ** $p < 0,01$ vs D0; *** $p < 0,001$ vs D0).

A partir del día 8 del proceso de diferenciación fue posible distinguir estructuras características de las tres capas embrionarias. Mediante ensayos de inmunofluorescencia observamos la presencia de células positivas para el marcador de progenitores neurales tempranos Nestina (indicativo de la presencia de derivados ectodérmicos. Figura 6, panel inferior derecho). Los CEs que presentaban áreas con actividad contráctil, característica de células cardíacas, resultaron inmunorreactivos para cTnT y el factor natriurético auricular ⁽¹⁶⁵⁾ ⁽¹⁶⁵⁾ (Figura 6, panel superior). Por último, también se observaron zonas con un crecimiento epitelial compacto e inmunorreactivas para la AFP característica del tejido endodérmico (Figura 6, panel inferior izquierdo).

En este tipo de cultivos predomina la aparición de derivados ectodérmicos debido a que ante la ausencia de señales específicas la especificación de linaje por *default* en las CMEh (al igual que en el embrión) es el ectodermo.

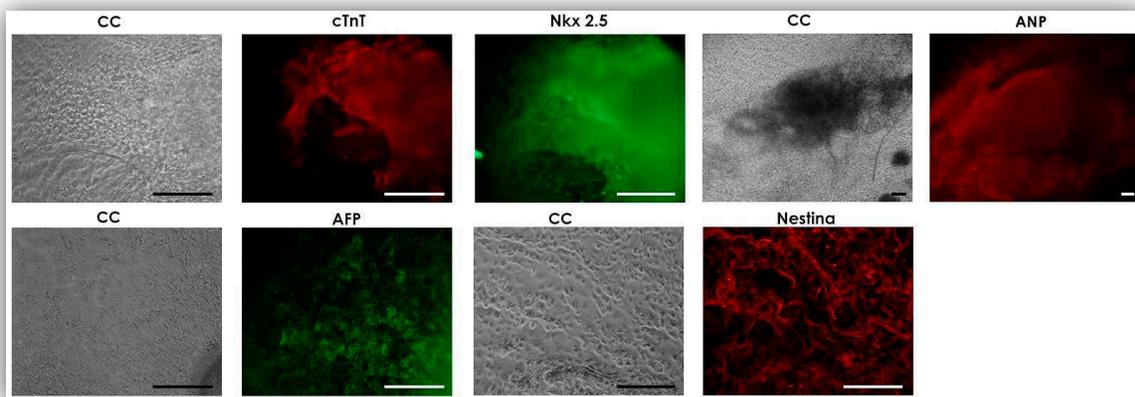


Figura 6. Validación de la capacidad pluripotente de las CMEh en presencia de suero fetal bovino. **A.** Inmunomarcaciones del marcador de linaje mesodérmico : cTnT, Nkx 2.5 y ANP; ectodérmico: nestina y endodérmico: AFP en la línea de CMEh, H9; al día 14 del proceso de diferenciación en presencia de SFB. La barra representa 100 μ m.(cc) campo claro.

Generación de líneas celulares reporteras de la activación de la expresión del factor de transcripción T/Brachyury y de la proteína α -MHC.

Con el fin de contar con herramientas experimentales que nos faciliten el estudio de la diferenciación cardíaca decidimos generar líneas estables que expresen genes reporteros río abajo de regiones promotoras de genes mesodérmicos y cardíacos. Para ello, adquirimos los vectores diseñados en el

laboratorio del Dr. Mercola ⁽⁹⁹⁾ y generamos dos líneas estables utilizando las células HUES-5 (H5). La primera línea fue obtenida empleando un vector lentiviral (Plásmido #21222, Addgene, Figura 7A) donde la expresión de la proteína fluorescente verde (eGFP) se halla dirigida por un fragmento de la zona regulatoria del promotor del gen T/Brachyury el cual se expresa específicamente en el mesodermo.

Rex-1 es un factor de transcripción que se expresa en CMEh en estado indiferenciado. El vector empleado presenta además un fragmento de la región promotora de Rex-1 dirigiendo la expresión del gen que confiere resistencia al antibiótico Blastidina. Por lo tanto, las células resistentes serán aquellas donde, por un lado se mantiene el estado indiferenciado debido a la activación del promotor endógeno de Rex-1 y por el otro se expresa la resistencia al antibiótico gracias a la integración del plásmido y la activación del promotor heterólogo. De este modo, se logra disminuir considerablemente la presencia de células diferenciadas espontáneamente y obtener un cultivo homogéneo de CMEh.

La segunda línea estable se generó utilizando un plásmido lentiviral que presenta un fragmento del promotor de α -MHC regulando la expresión de mCherry (proteína fluorescente roja), además del sistema Rex-1/Blasticidina descrito previamente (Plásmido #21228, Addgene. Figura 7B). Esta línea permite identificar aquellas células que se han diferenciado a cardiomiocitos.

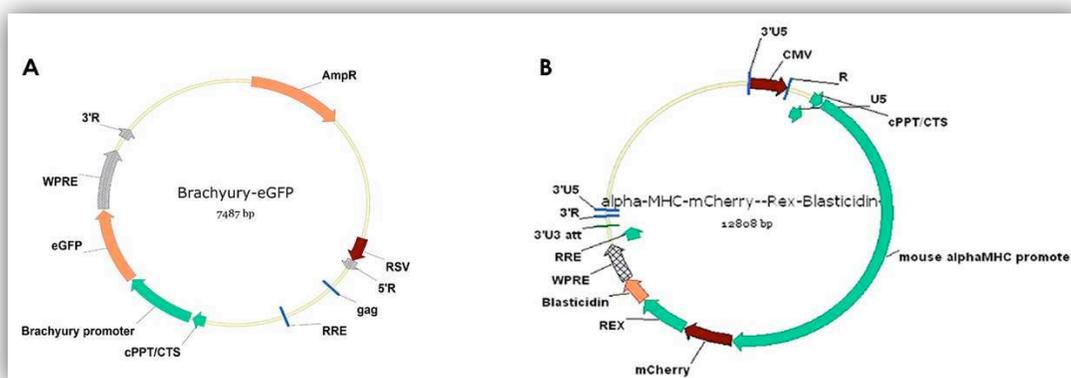


Figura 7. Mapa de los vectores lentivirales generados en el laboratorio del Dr. Mark Mercola.

Mediante ensayos de RT PCR a punto final, logramos determinar que el plásmido Brachyury-GFP se integró correctamente, que es capaz de expresar el mensajero de eGFP (Figura 8 C) y que su inserción no provocó alteraciones cromosómicas ya que la las células presentaron un cariotipo normal (Figura 8 B). Al evaluar la dinámica de la expresión de T/Brachyury, se puede observar que eGFP comienza a expresarse al día 2 y exhibe un máximo de expresión al día 4 (Figura 8 A) para luego reprimirse hasta el final de la diferenciación.

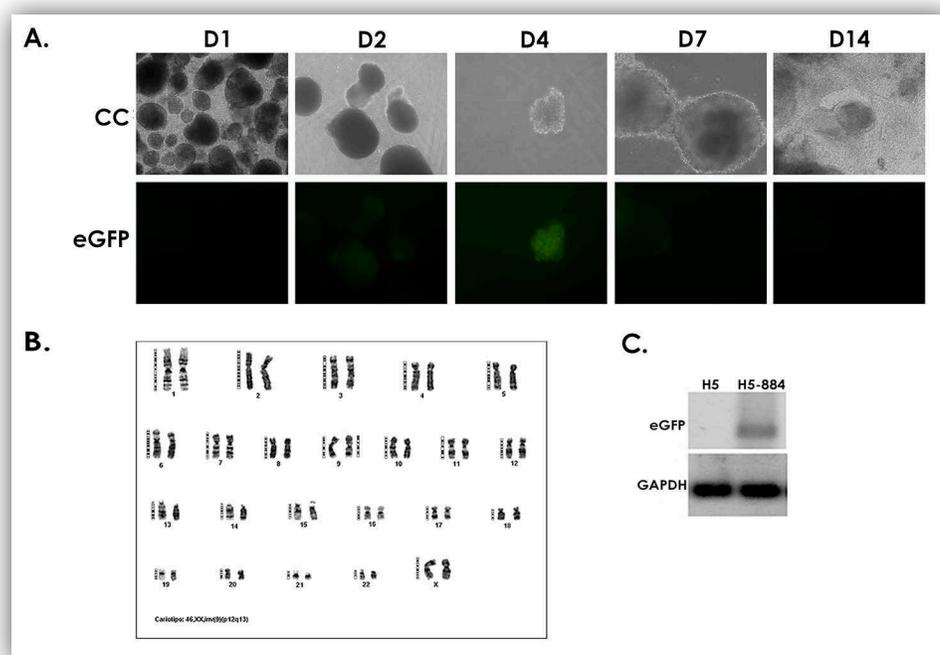


Figura 8. A. Expresión de eGFP reflejando la activación de T/Brachyury a lo largo de la diferenciación cardíaca. B. Análisis del cariotipo mediante bandeo G de la línea estable H5-884. C. Análisis de la expresión del mRNA de eGFP mediante PCR a punto final de la línea HUES-5 y la línea estable HUES-5 modificada.

Para la segunda línea estable observamos que la proteína mCherry (debido a la activación del promotor de α -MHC), puede detectarse en los CE contráctiles a partir del día 7, aumentando sus niveles hasta el día 14 (Figura 9). Los patrones temporales de expresión de eGFP y mCherry se correlacionan con las variaciones de los niveles endógenos de los ARNm de T/Brachyury y α -MHC observados (Figura 5).

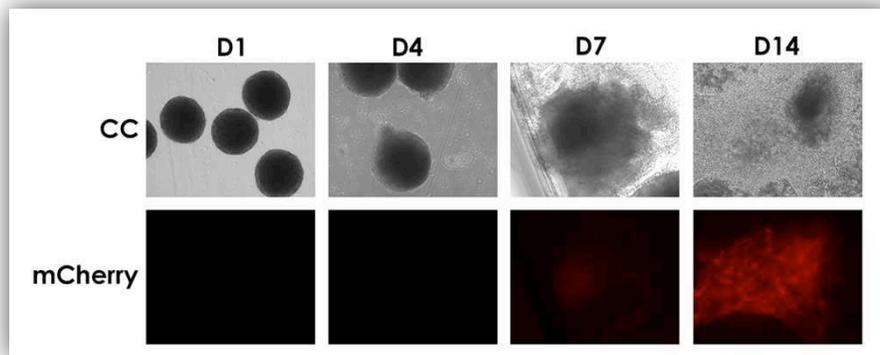


Figura 9. Expresión de mCherry reflejando la activación de la zona reguladora de α -MHC a lo largo del proceso de diferenciación cardíaca.

Diferenciación cardíaca dirigida.

El protocolo de diferenciación previamente descrito incluye el agregado de SFB al medio de cultivo. El SFB es de composición compleja e indefinida, la cual varía entre lote y lote, contiene diversos factores que promueven la diferenciación celular a las tres capas embrionarias, ectodermo, mesodermo y endodermo. Por lo tanto la población celular obtenida al finalizar el protocolo es muy heterogénea y varía entre experimentos

La generación de un determinado tipo celular a partir de CMEh requiere entonces la disponibilidad de un protocolo eficiente y reproducible que permita obtener poblaciones celulares homogéneas.

La generación de CM a partir de CMEh puede lograrse a partir de la diferenciación espontánea en presencia de SFB o mediante abordajes experimentales que incluyen el uso de factores de crecimiento y/o morfógenos que normalmente participan en el desarrollo del corazón embrionario *in vivo* tales como BMP-4, bFGF, Insulina, Activina A, VEGF y el péptido inhibidor de Wnt, DKK1 (*dickkopf homolog*).

BMP-4, es uno de los miembros de las proteínas morfogénicas del hueso que a su vez forman parte de la súper familia de los factores de crecimiento transformantes beta ($TGF\beta$). En el desarrollo embrionario humano, la señalización mediada por BMP4 es crucial en la determinación del eje dorso ventral y la

especificación del mesodermo. Particularmente, la especificación del mesodermo cardíaco es inducida por las vías de señalización de las BMPs y de los FGF provenientes del endodermo adyacente. Las células cardíacas se especifican en regiones del embrión en donde existe expresión de BMP-4 (mesodermo lateral y endodermo), de FGF y de antagonistas de la vía de Wnt como Dkkopf, Crescent o Cerberus (endodermo anterior). En los últimos años se han desarrollado pequeñas moléculas que homologan la función de diversos factores de crecimiento. Tal es el caso de los compuestos IWR1 e IWR2 (del inglés Inhibitor Wnt response 1 y 2) los cuales actúan inhibiendo la vía de Wnt y son comúnmente usados en los protocolos de diferenciación cardíaca ya que suelen ser menos costosos y en general mas potentes que los factores recombinantes ⁽⁹⁰⁾. La activina A es otro miembro de la superfamilia TGF β también esta involucrada en la especificación del tejido mesodérmico. Por último, numerosos protocolos incluyen el agregado de VEGF, una proteína de señalización involucrada, junto con bFGF, en la formación *de novo* del sistema circulatorio embrionario. No obstante, es muy importante remarcar que estos abordajes varían en su eficiencia y frecuentemente son dependientes de cada línea celular.

Con el fin de enriquecer el fenotipo celular en derivados cardíacos, desarrollamos un protocolo que incluye el uso del medio comercial StemPro34 (un medio de composición definida) y el agregado, en ventanas temporales acotadas, de factores específicos: BMP-4 (10 ng/ml), Activina A (3 ng/ml), bFGF(10 ng/ml), y VEGF (5 ng/ml), que dirigen la diferenciación de las CMEh hacia el linaje mesodérmico en primera instancia, y a mesodermo cardíaco en un segundo paso (de aquí en mas referido como protocolo dirigido, Figura 10).

La vía canónica de señalización de Wnt/ β -catenina tiene un papel bifásico en la cardiogénesis humana. Esta vía debe estar activa en las primeras fases de la diferenciación cardíaca e inhibida en las fases tardías ⁽¹⁶⁶⁾. La inhibición de la señalización endógena de Wnt mediada por inhibidores extracelulares tales como DKK1 y Crescent es un requisito para promover la cardiogénesis ^(19, 167). Por esto, el protocolo empleado en este estudio contempla el uso de una pequeña molécula, el inhibidor de Wnt IWR1 (5 μ M) el día 4 de iniciada la diferenciación. Este inhibidor ejerce su efecto mediante su interacción con el complejo

APC/Axin2/GSK3 β . Esta interacción estabiliza el complejo y conlleva una disminución de los niveles citoplasmáticos de β -catenina inhibiendo de esta forma la señalización a través de la vía de Wnt ^(168, 169).

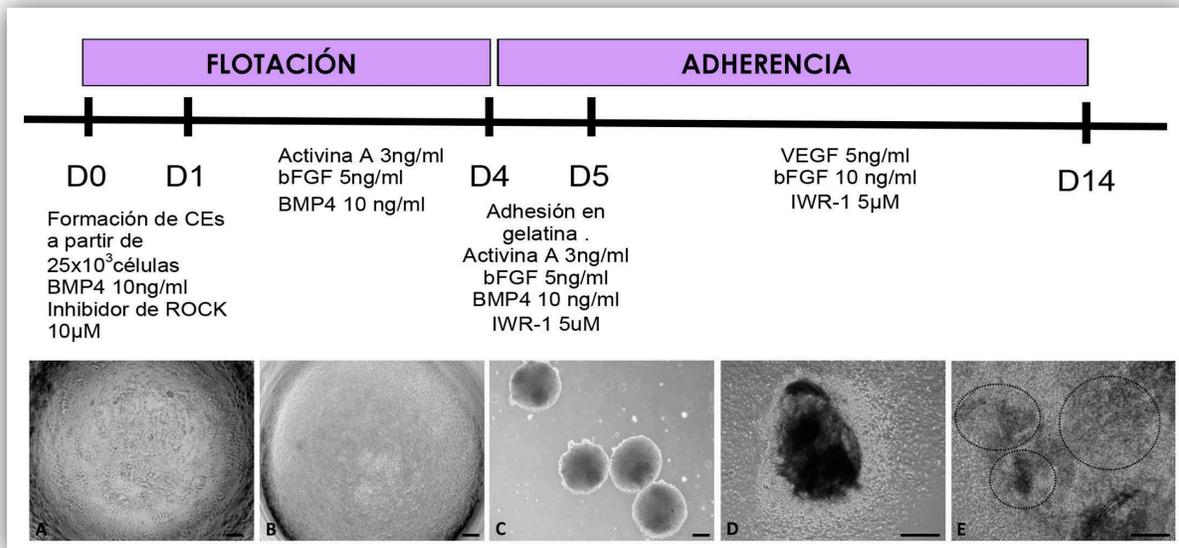


Figura 10. Esquema del protocolo de diferenciación dirigida *in vitro* en presencia de morfógenos promotores de la diferenciación cardíaca (panel superior). Fotomicrografías representativas de CEs a lo largo del protocolo de diferenciación dirigida. (panel inferior). **A.** Células sembradas en el pocillo previo a ser centrifugadas y **B.** post centrifugación. **C.** CEs en flotación luego de 3 días de iniciado el protocolo. **D.** CE adherido el día 6 de la diferenciación. **E.** CEs luego de 14 días iniciado el protocolo. Los círculos indican áreas contráctiles. La barra representa 100 μ m.

Evaluación de la eficiencia del protocolo de diferenciación dirigida.

Para evaluar la eficiencia del protocolo dirigido se determinaron en primer lugar las variaciones en los niveles de expresión de los ARNm de Oct-4 y Nanog (marcadores de estado embrionario). Como se puede observar en la Figura 11, la expresión de los factores de transcripción Oct-4 y Nanog disminuyó marcadamente conforme avanzó la diferenciación.

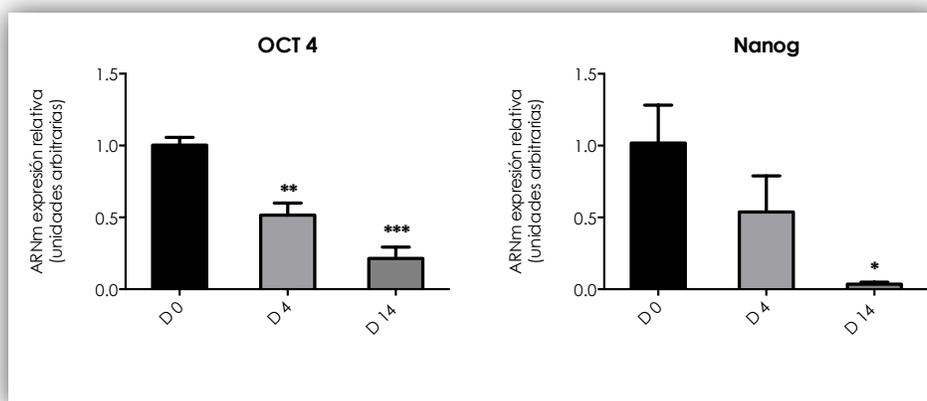


Figura 11. Validación de la diferenciación dirigida de CMEh en medio enriquecido en factores cardiogénicos mediante análisis de RT-PCR en tiempo real de los marcadores Oct-4 y Nanog. Los gráficos muestran los niveles de ARNm relativos al día 0 (D0) establecido arbitrariamente como 1. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0,05$ vs D0; ** $p < 0,01$ vs D0; *** $p < 0,001$ vs D0).

Al evaluar marcadores de ectodermo neural, no se detectaron aumentos en los niveles de los transcritos de genes Nestina y Pax 6 (Figura 12). Por el contrario, se observó una inducción de los marcadores de endodermo Sox17 y AFP (Figura 12). Esto podría deberse, al menos en parte, a que en el modelo de diferenciación basado en la formación de CE (el cual recapitula muchos de los procesos biológicos que experimenta el blastocito) se genera una capa de endodermo primitivo que rodea por fuera al CE (170, 171).

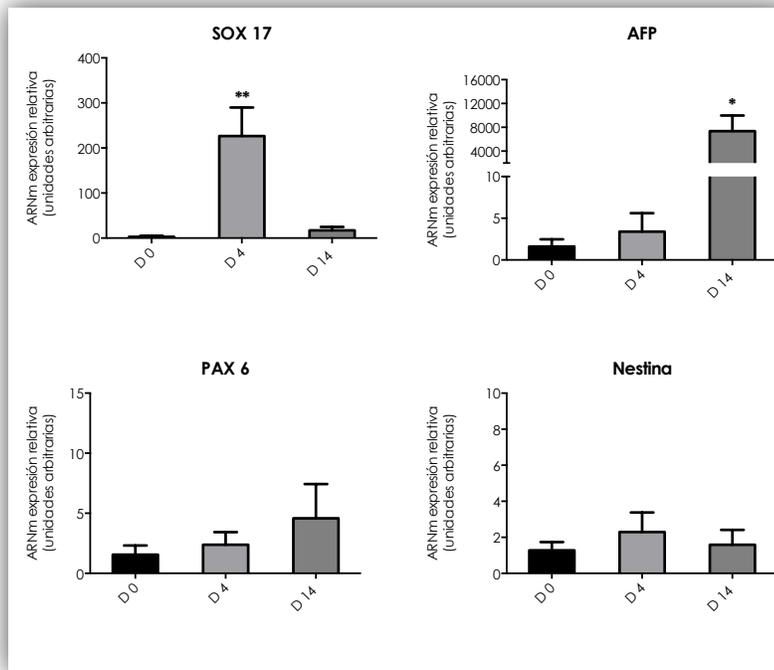


Figura 12. Validación de la diferenciación dirigida de CMEh en medio enriquecido en factores cardiogénicos mediante análisis de RT-PCR en tiempo real de los marcadores de endodermo Sox 17 y AFP ; y los marcadores ectodérmicos PAX 6 y Nestina. Los gráficos muestran los niveles de ARNm relativos al día 0 (D0) establecido arbitrariamente como 1. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs D0).

Posteriormente, se determinó el perfil de expresión génica de marcadores de linaje cardíaco mediante análisis de RT-PCR en tiempo real. Los niveles del transcrito de T/Brachyury presentaron un pico máximo de expresión a los 4 días (100 veces)(Figura 13).

El factor de transcripción Mesp-1 actúa como un regulador maestro residiendo en lo más alto dentro de la jerarquía del programa transcripcional cardíaco, promoviendo la rápida expresión de factores de transcripción críticos para la adquisición del linaje cardíaco (ej: GATA-4, Nkx2.5, Mef2C, Hand2) ⁽¹⁶⁵⁾. *In vivo* este factor además es requerido para la migración de los de los precursores cardíacos derivados del mesodermo hacia la futura región cardíaca durante el desarrollo embrionario ⁽¹⁷²⁾. Como se observa en la Figura 13 los niveles del ARNm de Mesp-1 exhibieron un máximo de expresión al día 4 de la diferenciación (100 veces mayor que la determinada al día 0), disminuyendo luego su expresión al

final del protocolo (día 14). Seguidamente se observó la expresión de GATA 4 que fúe máxima a día 14.

En concordancia con lo expuesto anteriormente, luego del pico de inducción de Mesp-1, se observó una marcada y sostenida inducción en los niveles de los transcritos de los factores de transcripción Islet-1 (100 veces respecto a las células indiferenciadas) y Nkx2.5 (150 veces respecto a las células indiferenciadas). Islet-1 es un marcador de progenitores cardíacos multipotentes tempranos y junto con Nkx 2.5 regulan la activación de la red transcripcional cardiogénica. Esta inducción precedió a la expresión de los genes estructurales cardíacos α -MHC y cTnT (Figura 13).

La α -MHC es una de las principales proteínas presentes en el corazón y es la responsable de la transducción de la energía y del desarrollo de la fuerza, además de proveer integridad estructural al tejido ^(173, 174). La cTnT es una de las proteínas que conforman el complejo de la troponina (junto con la troponina C y la I) que se unen a la tropomiosina en las fibras musculares del corazón manteniéndola unida a la actina y a la miosina. Las regulaciones de calcio mediadas por troponina gobiernan la función del motor de actina-miosina que impulsa la contracción muscular ⁽¹⁷⁵⁾.

Estos cambios en el perfil de expresión de genes cardíacos fueron acompañados por la aparición de áreas contráctiles, las que fueron evidentes a partir del día 9 y durante el resto de la diferenciación (Figura 10).

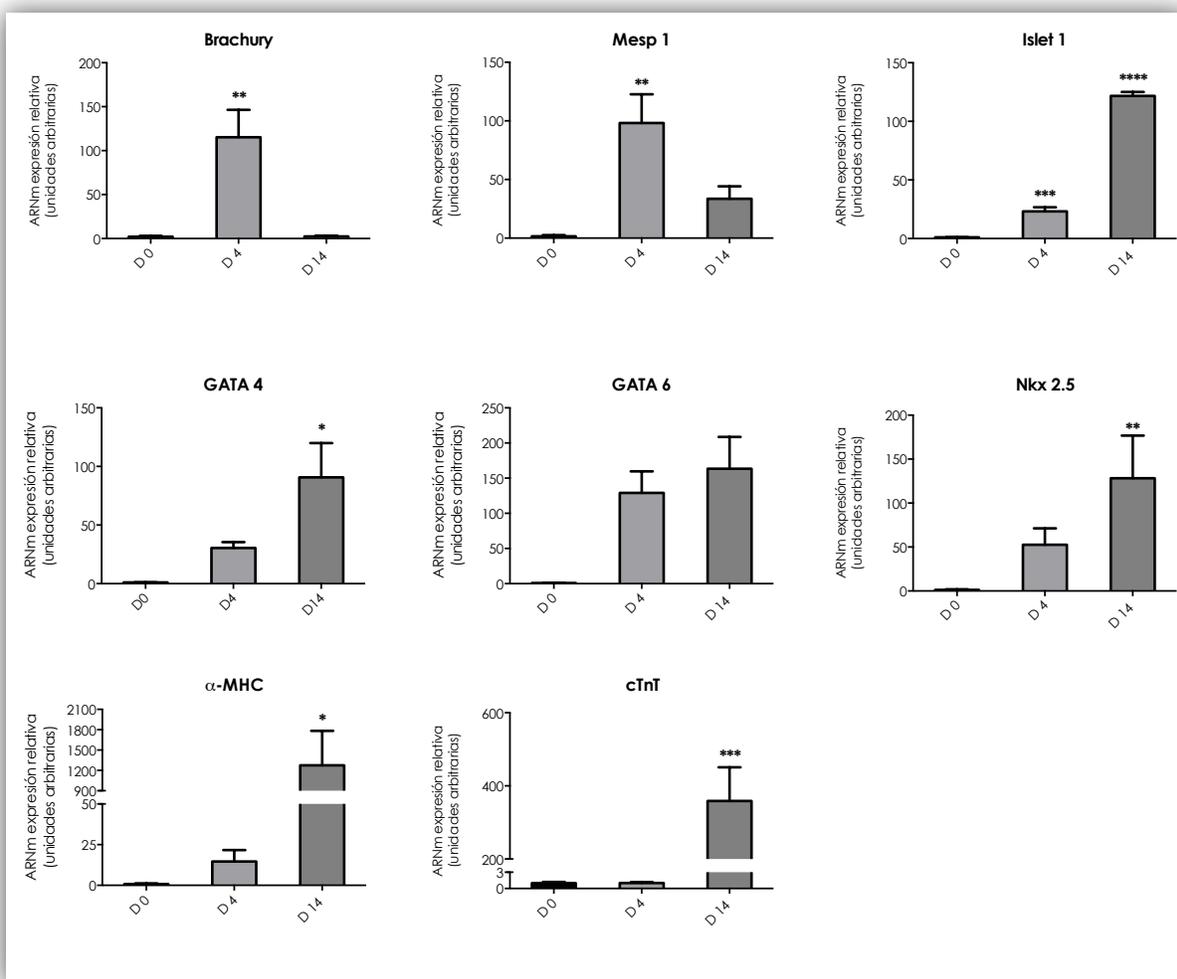


Figura 13. Validación de la diferenciación dirigida de CMEh en medio enriquecido en factores cardiogénicos mediante análisis de RT-PCR en tiempo real de los marcadores de mesodermo T/Brachyury, Mesp-1; y de mesodermo cardíaco Islet-1, GATA 4, GATA 6, α-MHC, Nkx2.5, cTnT. Los gráficos muestran los niveles de ARNm relativos al día 0 (D0) establecido arbitrariamente como 1. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (* p <0,05 vs D0; ** p <0,01 vs D0; *** p <0,001 vs D0; **** p <0,0001 vs D0).

A continuación evaluamos mediante inmunomarcaciones la expresión de algunos marcadores cardíacos en CE's contráctiles. Como se observa en la Figura 14 tanto la expresión de cTnT como la de Nkx 2.5 fue específica del área contráctil.

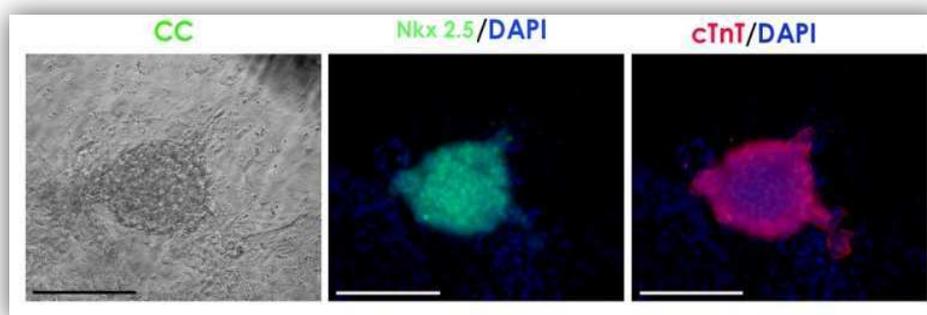


Figura 14. Inmunomarcaciones de CE's exhibiendo áreas contráctiles utilizando anticuerpos específicos anti-Nkx2.5 y anti-cTnT. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las barras representan 100 μ m. CC: campo claro.

Finalmente, mediante citometría de flujo determinamos la eficiencia del nuevo protocolo de diferenciación. Se obtuvo un porcentaje de células cTnT positivas del $18,4 \% \pm 2,7$ y $25,8 \% \pm 2,4$ de células α -MHC positivas. El porcentaje de células α MHC positivas en la diferenciación en presencia de SFB no suele superar el 3% ⁽⁸³⁾.

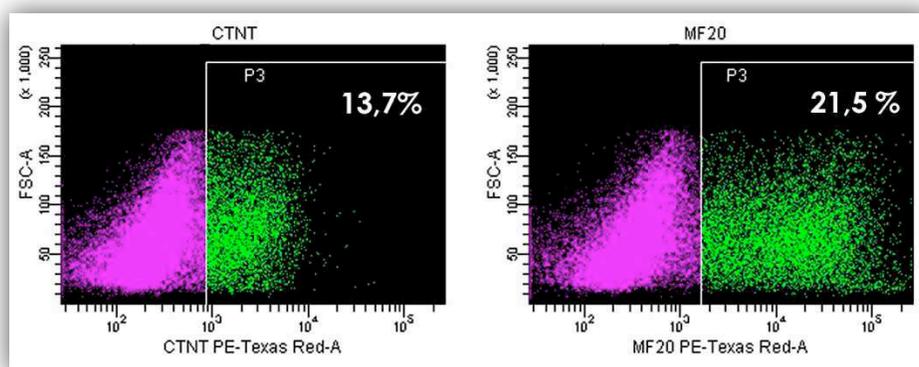


Figura 15. Ploteo de puntos (dot plots) representativos del análisis de la eficiencia del protocolo de diferenciación cardíaca mediante citometría de flujo. Las células fueron marcadas con un anticuerpo anti-cTnT o anti- α MHC (MF20) como anticuerpo primario y en ambos casos se utilizó un anticuerpo anti-ratón conjugado con PE.

Estos resultados indican que este nuevo protocolo de diferenciación es más eficiente en la obtención de CM a partir de CMEh. No solo logramos aumentar el porcentaje de derivados cardíacos obtenidos sino que también logramos disminuir la cantidad de derivados de otros linajes ya que debido a la composición del medio empleado no se generaron estructuras de derivados ectodérmicos y los derivados endodérmicos, aunque presentes, también se vieron disminuidos.

El pulso o ritmo cardíaco puede ser modulado por la acción de diversos neurotransmisores. Entre ellos podemos mencionar a la norepinefrina, la cual es sintetizada y almacenada en la médula adrenal y en los nervios simpáticos periféricos. Este neurotransmisor incrementa la frecuencia del ritmo cardíaco mediante la activación de los receptores adrenérgicos tipo β_1 presentes en el corazón.

Con la finalidad de estudiar si los CM generados respondían a este neurotransmisor medimos la frecuencia de contractibilidad en presencia o ausencia del mismo. El agregado de norepinefrina 10 nM resultó en un incremento de 2 veces del promedio de contracciones por minuto, evidenciando que los cardiomiocitos generados mediante este protocolo son capaces de responder a la norepinefrina (tabla 1).

PROMEDIO DE CONTRACCIONES POR MINUTO	
- NOREPINEFRINA	+ NOREPINEFRINA
23,5 \pm 2,88	50,8 \pm 3,77

Tabla 1. Evaluación del efecto del agregado de norepinefrina a CEs contráctiles. El resultado es el promedio de las contracciones por minuto registradas en 20 CEs.

Interleuquinas de la familia tipo IL-6 y sus receptores: Perfil de expresión en células indiferenciadas y a lo largo de la diferenciación cardíaca.

Con el fin de caracterizar en CMEh el perfil de expresión de ciertos receptores de citoquinas pertenecientes a la familia de la interleuquina 6 (IL-6), realizamos ensayos de inmunofluorescencia en colonias de células indiferenciadas. Como se puede observar en la Figura 16, las células de la línea H9 expresan los receptores de LIF, IL-6, IL-11 y gp130, sub-unidad transductora común para todas las citoquinas de la familia de IL-6.

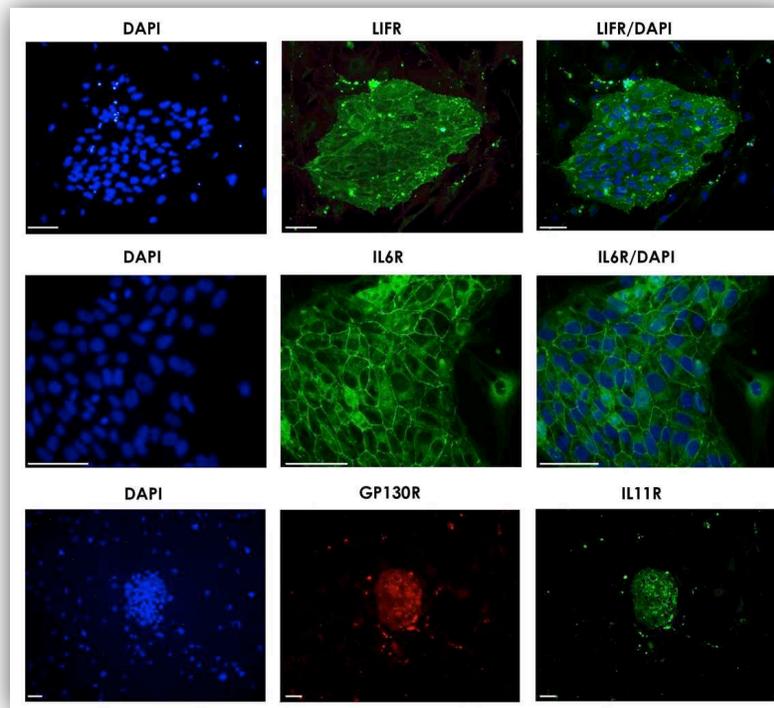


Figura 16. Inmunomarcaciones de los receptores de LIF, IL11, IL6 y el receptor gp130 en colonias indiferenciadas de la línea de CMEh, H9. La barra representa 100 μ m.

A continuación determinamos los niveles de expresión de los ARNm del receptor gp130, de sus co-receptores y de las citoquinas de la familia de la IL-6 en CMEh indiferenciadas y a lo largo de la diferenciación cardíaca mediante un análisis de RT-PCR en tiempo real, tanto en el protocolo de diferenciación con SFB como en el protocolo dirigido.

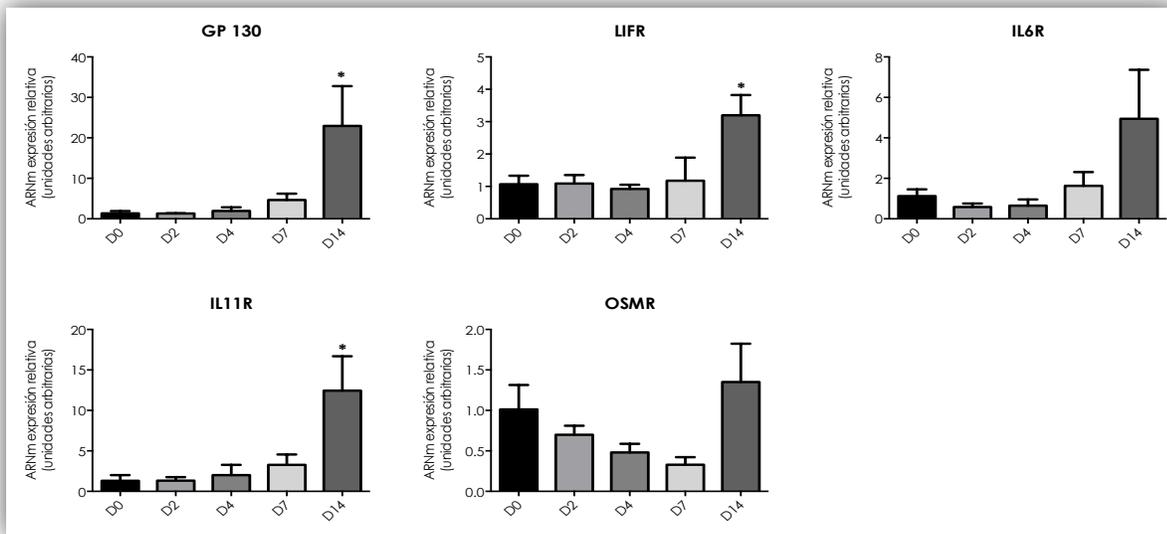


Figura 17. Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de la expresión de ARNm de gp130, de los co-receptores, LIFR, IL-6R, IL-11R, OSMR a lo largo de la diferenciación en presencia de SFB. Los gráficos muestran los niveles de ARNm relativos al día 0 (D0) establecido arbitrariamente como 1. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0,05$ vs D0).

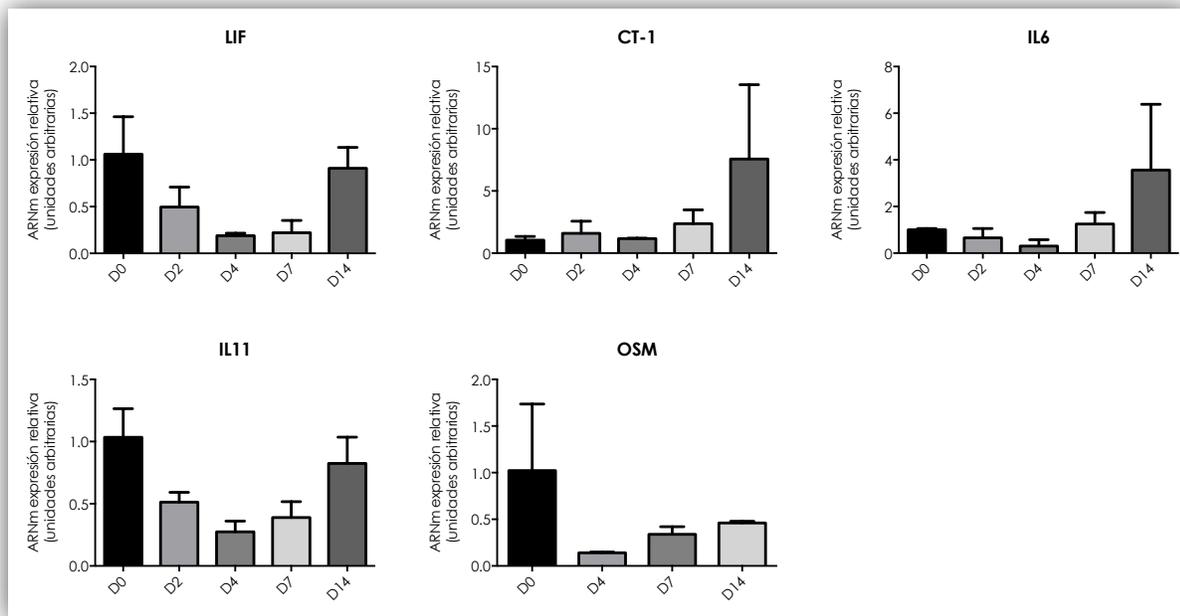


Figura 18. Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de la expresión de ARNm de las citoquinas LIF, IL-6, CT-1, IL-11 y OSM a lo largo de la diferenciación en presencia de SFB. Los gráficos muestran los niveles de ARNm relativos al día 0 (D0) establecido arbitrariamente como 1. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes.

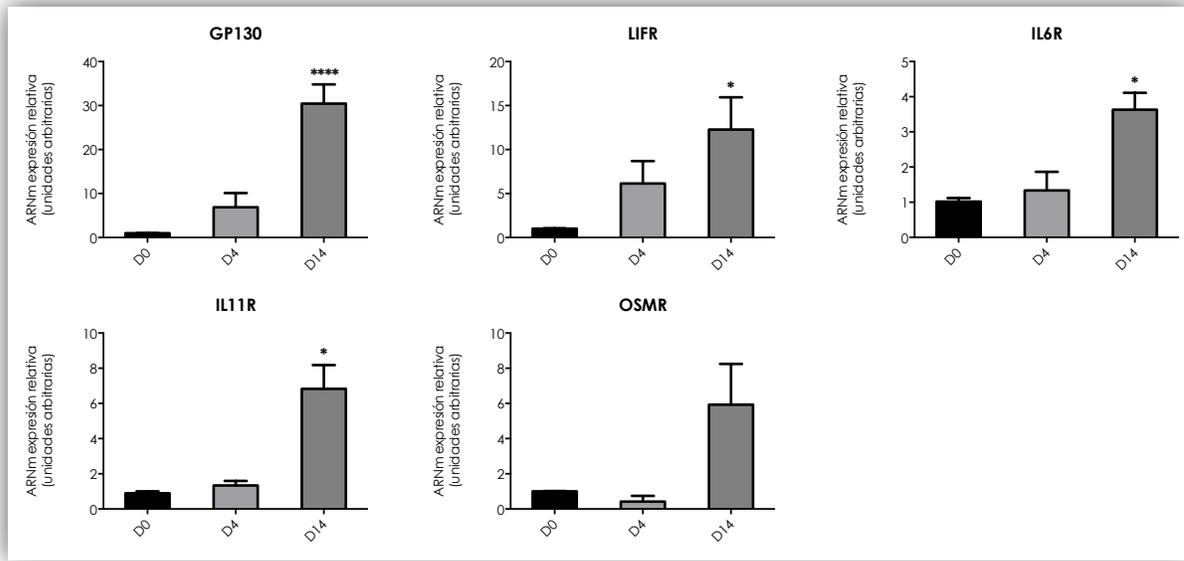


Figura 19. Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de la expresión de ARNm de gp130, de los co-receptores, LIFR, IL-6R, IL-11R, OSMR a lo largo de la diferenciación dirigida. Los gráficos muestran los niveles de ARNm relativos al día 0 (D0) establecido arbitrariamente como 1. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0,05$ vs D0 **** $p < 0,0001$ vs D0).

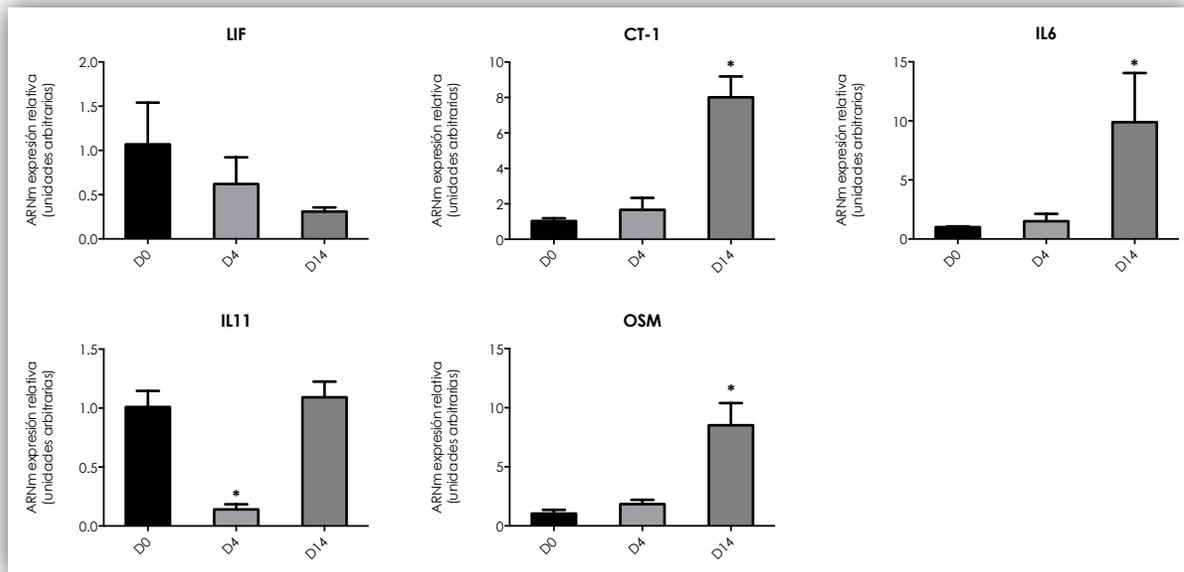


Figura 20. Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de la expresión de ARNm las citoquinas LIF, IL-6, CT-1, IL-11 y OSM a lo largo de la diferenciación en el protocolo dirigido. Los gráficos muestran los niveles de ARNm relativos al día 0 (D0) establecido arbitrariamente como 1. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0,05$ vs D0).

Como podemos observar en la Figura 17 los niveles de los ARNm de la mayoría de los receptores analizados aumentaron conforme avanzó la diferenciación en presencia de SFB. Por el contrario los niveles de los transcritos de las citoquinas presentaron un perfil de expresión mas variado aunque no exhibieron cambios significativos a lo largo de 14 días de iniciada la diferenciación (Figura 18).

Los perfiles de expresión de los transcritos de citoquinas de la familia de IL-6 y receptores medidos en CMEh expuestas al protocolo dirigido (Figura 19 y 20) resultaron similares a los determinados en el protocolo de diferenciación en presencia de SFB (salvo para OSM y su receptor). Notablemente, los niveles del ARNm de gp130 y LIFR fueron los que experimentaron la mayor inducción (aproximadamente 20-30 veces) en ambas condiciones experimentales.

Evaluación de la funcionalidad de las vías de señalización río abajo de gp130 en CMEh.

Luego de analizar los niveles de expresión de los ARNm de gp130, de sus co-receptores y de las citoquinas de la familia de la IL-6, decidimos evaluar la funcionalidad de las vías de señalización que se activan río abajo del complejo LIF/gp130/LIFR en CMEh indiferenciadas. Para ello, realizamos ensayos de western blot para determinar los niveles de STAT3, ERK y AKT fosforiladas en CMEh cultivadas tanto en presencia como en ausencia de LIF .

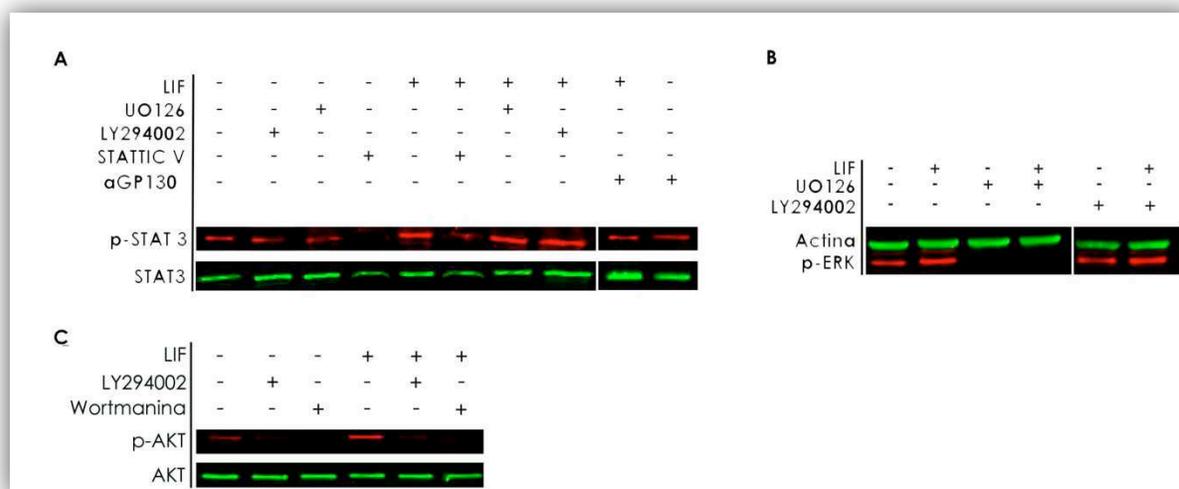


Figura 21. Evaluación de la funcionalidad de las vías de señalización activadas por LIF. Western blot de CMEh indiferenciadas estimuladas con LIF en presencia o ausencia de Inhibidores de cada una de las vías. Se utilizaron anticuerpos específicos contra STAT3 total, STAT3 fosforilada (p-STAT3) (TYR705), ERK fosforilada (p-ERK) (Thr202/Tyr204), actina (control de carga), AKT y AKT fosforilada (p-AKT)(Ser 473).

Como se puede observar en la Figura 21, luego de estimular las CMEh con LIF (20ng/ml) durante 20 minutos, fue posible detectar un aumento en los niveles del factor STAT3, de la proteína ERK (por su nombre en inglés: Extracellular signal Regulated Kinase) y de la proteína quinasa B/Akt fosforiladas.

Con el fin de identificar los efectores de las vías de transducción de señales responsables de mediar los eventos de fosforilación inducidos por LIF, empleamos inhibidores específicos, los cuales fueron agregados 90 minutos antes de la estimulación con LIF. Para inhibir la fosforilación de STAT3, utilizamos el compuesto STAT3IC V (2 μ M, Calbiochem) el cual es permeable a la membrana celular y se une directamente al dominio SH2 de STAT3, previniendo de esta forma su fosforilación. Con el fin de contrarrestar la acción de LIF empleamos el anticuerpo anti-gp130 (α -gp130; 0,5 μ g/ml, R&D) que se une al receptor bloqueando los sitios de interacción con la citoquina. Mediante ensayos de Western blot empleando un anticuerpo específico (anti-fosfoSTAT3^{Tyr705}) pudimos observar que la presencia de STAT3IC V logró disminuir marcadamente la fosforilación de STAT3 en el residuo tirosina 705 y que el anticuerpo α -gp130 bloqueó la estimulación mediada por LIF (comparar calle +LIF con calle +LIF+ α -gp130 en la figura 21, panel A).

Como se observa en la Figura 21B el tratamiento con LIF produjo un aumento en los niveles de ERK fosforilada, los que fueron detectados mediante el uso de un anticuerpo específico (anti-fosfo-Erk1/2^{Thr202/Tyr204}). Con la finalidad de dilucidar si este aumento en la abundancia de fosfo-ERK en presencia de LIF era una consecuencia de la activación de la quinasa MEK (por su nombre en inglés: MAPK/ERK Kinase), pre-incubamos a las células con U0126, un inhibidor específico de la misma. MEK es una quinasa dual (fosforila residuos serina/treonina y tirosina) que actúa río arriba de ERK en la cascada de señalización. El tratamiento con este inhibidor (20 μ M) redujo significativamente la presencia de la proteína ERK fosforilada en los residuos treonina 202 y tirosina 204 tanto en presencia como en ausencia de LIF (niveles basales) (Figura 21B). Frecuentemente la transducción de señales no es lineal y por el contrario los estímulos se transmiten a través de interacciones entre diferentes vías (*crosstalk*).

Para dilucidar si el efecto de LIF sobre ERK estaba modulado por estímulos adicionales provenientes de otras vías de señalización, pre-tratamos a las CMEh con LY294002 (20 μ M), un inhibidor farmacológico de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K). Pudimos determinar que la presencia de este fármaco no tuvo efecto alguno sobre la abundancia de ERK fosforilada en los residuos treonina 202 y tirosina 204 en células estimuladas con LIF indicando que al menos las señales inducidas por LIF y propagadas a través de la cascada de PI3K no modulan la fosforilación de ERK en los residuos aminoacídicos mencionados.

LY294002 y wortmanina son moléculas estructuralmente no relacionadas que inhiben a la subunidad regulatoria p85 de la PI3K, impidiendo de esta forma la activación de efectores que yacen río abajo en la cascada tales como la proteína quinasa B/Akt. Como se puede observar en la Figura 21C, la presencia de LY294002 (20 μ M) o de wortmanina (100 nM) conllevó una marcada disminución de los niveles de Akt fosforilada en el residuo serina 473.

Localización subcelular de STAT3

Entre los numerosos eventos de señalización que ocurren río abajo de la activación del receptor de LIF, las fosforilaciones, dimerización, translocación al

núcleo y unión a elementos respondedores presentes en el ADN de STAT3 ocupan un rol central. Como puede observarse en la Figura 22, la adición de LIF causó la relocalización subcelular de STAT3 hacia el núcleo (A) y un aumento en la abundancia de STAT3 fosforilado en tirosina 705 (B).

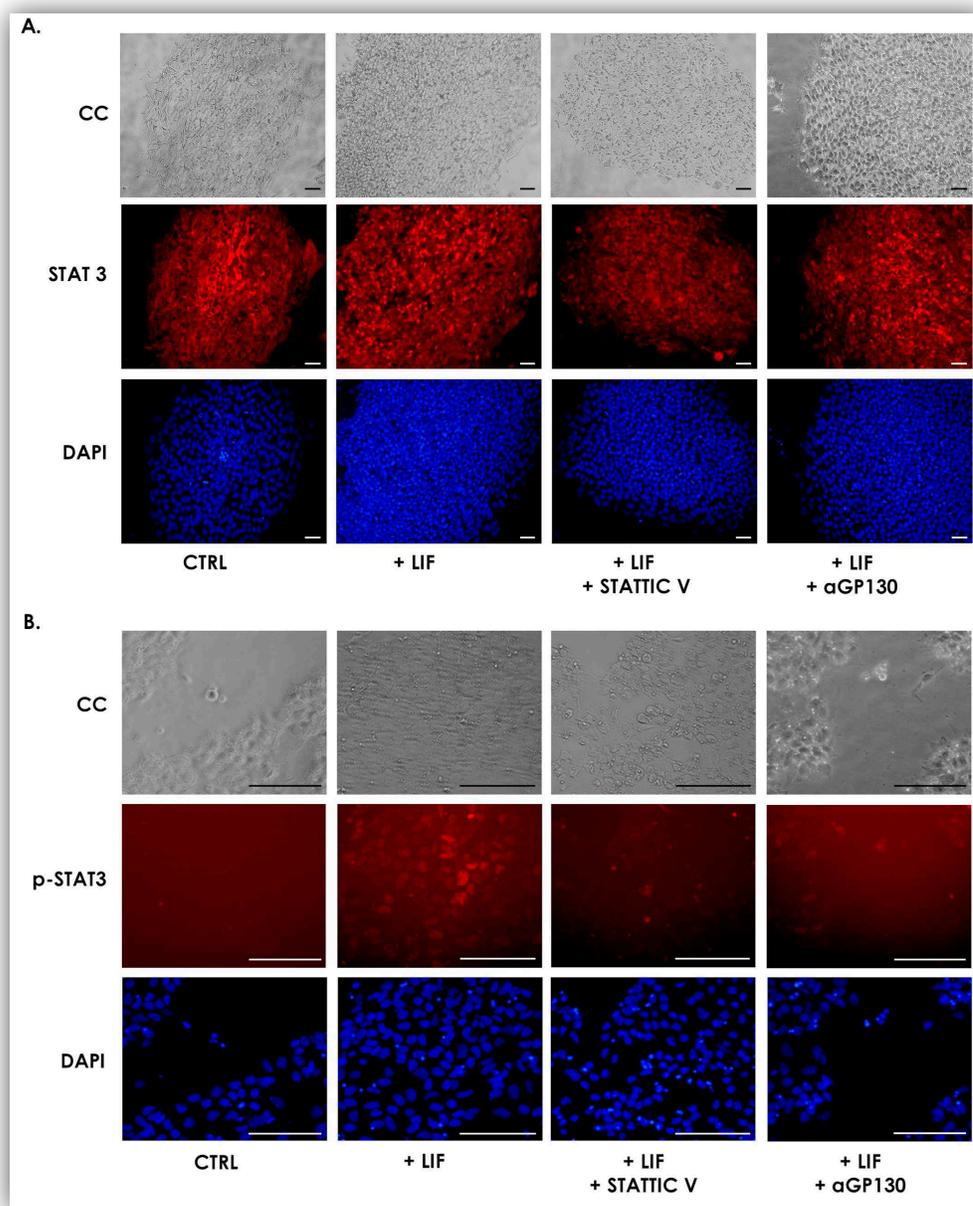


Figura 22. A. Inmunomarcaciones con el anticuerpo primario específico anti-STAT3 de colonias H9 crecidas sobre Matrigel no estimuladas (CTRL), estimuladas con LIF (20 ng/ml)(+LIF), tratadas con el inhibidor STAT3IC V 20 μ M y LIF 20 ng/ml (+LIF+STAT3ICV) y con anti-GP130 0,5 μ g/ml y LIF 20 ng/ml (+LIF+αGP130). **B.** Inmunomarcaciones con el anticuerpo anti-fosfo-STAT3 de colonias H9 crecidas sobre Matrigel no estimuladas (CTRL), estimuladas con 20 ng/ml de LIF (+LIF), tratadas con el inhibidor STAT3IC V 20 μ M y LIF 20 ng/ml (+LIF+STAT3ICV) y con anti-GP130 0,5 μ g/ml y LIF 20 ng/ml (+LIF+αGP130). La barra representa 100 μ m.

La translocación al núcleo de STAT3 en respuesta al tratamiento con LIF fue marcadamente inhibida tanto por la presencia de STATIC V al igual que cuando los receptores de gp130 fueron bloqueados por el agregado del anticuerpo específico α -gp130.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que en las CMEh, LIF propaga señales a través de las vías de MEK/ERK, PI3K/Akt y gp130/STAT3.

Perfil de expresión del factor inhibidor de leucemia (LIF) a lo largo del desarrollo cardíaco humano.

Las características fenotípicas de los ratones deficientes en gp130 en el tejido cardíaco (modelo de *knock out* condicional), demuestran un rol crítico del receptor en la transición entre la hipertrofia compensatoria y la falla cardíaca, demostrando que ligandos que actúan vía gp130 serían importantes en procesos adaptativos en el corazón en respuesta al estrés ⁽¹⁴⁵⁾. De todas las citoquinas que señalizan a través de este receptor se ha demostrado que sólo CT-1 y LIF son capaces de promover el crecimiento y mantenimiento de cardiomiocitos ventriculares (de rata y ratón) *in vitro* ⁽¹⁷⁶⁾.

Se ha demostrado que las tres vías de señalización activadas por gp130 juegan un rol importante en la fisiología cardíaca y que la vía de señalización de gp130/STAT3 se encuentra alterada en corazones que presentan fallas cardíacas.

Durante los últimos 50 años, múltiples estudios han demostrado que LIF tiene la capacidad de estimular la proliferación o inducir la diferenciación dependiendo del tipo celular y la etapa del desarrollo en la que actúe. La importancia de LIF se extiende desde el desarrollo embrionario temprano, donde es relevante para la implantación del blastocisto y para el mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación de las células madre, hasta la vida adulta de los organismos donde tiene influencia en células musculares, vasos, hueso, neuronas, células cardíacas y del sistema endócrino, reproductivo e inmune ^(177, 178). LIF es un modulador crítico de la reparación tisular, inflamación e influencia tanto el estado fisiológico como el patológico de numerosos procesos. Si bien existe gran cantidad de bibliografía acerca del rol de LIF en células cardíacas, la mayoría de los trabajos evalúan su rol

en cultivo de explantos cardíacos *in vitro* (179, 180), en cultivo de células madre murinas (181) o en modelos de injuria y reperfusión en corazones adultos (151, 182) en distintos modelos animales.

Con la finalidad de determinar el perfil de expresión de LIF durante las primeras etapas de la cardiogénesis humana realizamos ensayos de inmunohistoquímica en cortes histológicos de corazones fetales. Estas inmunotinciones fueron realizadas durante mi estadía en el laboratorio del Dr. Evseenko (Laboratorio de Regeneración de Tejido Conectivo (LCTR), UCLA; Los Ángeles, USA) sobre muestras adquiridas por la Universidad de California en Los Ángeles.

Evaluamos la expresión de LIF en cortes histológicos de corazones de 8, 11, 15 y 17 semanas de gestación. También, determinamos la expresión de la cadena pesada de la miosina como marcador de tejido cardíaco.

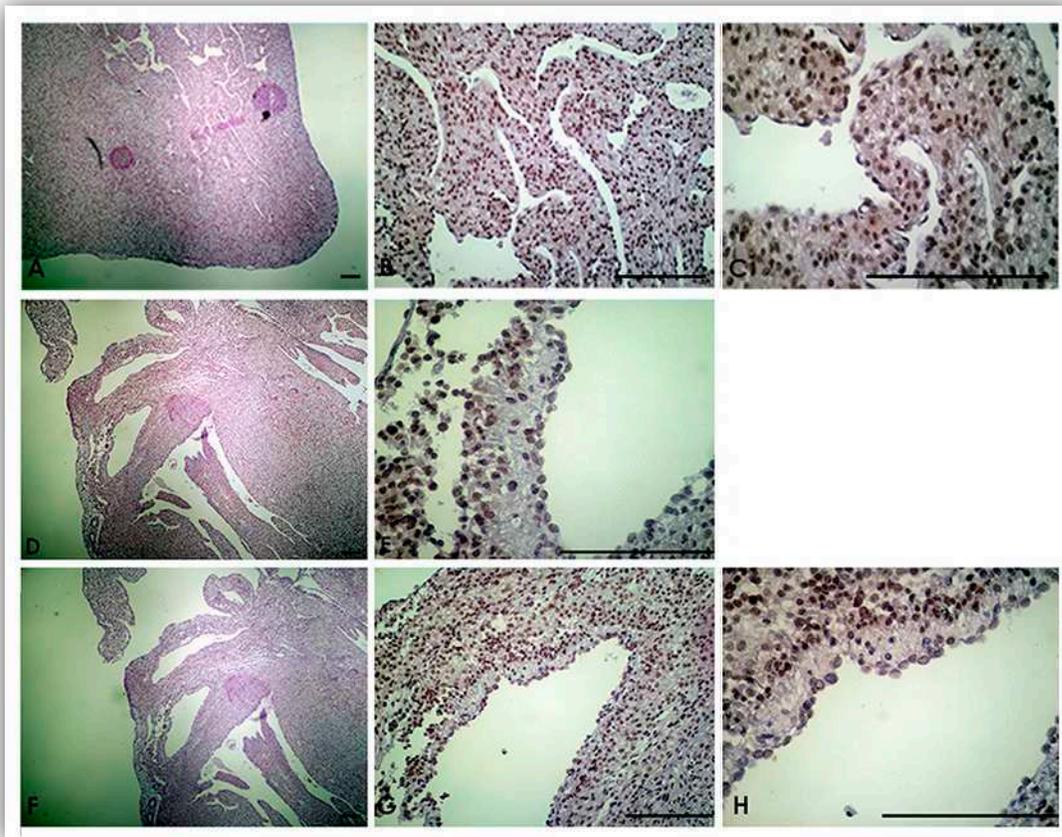


Figura 23. Corazón humano en la semana 8 del desarrollo embrionario. Expresión de LIF en el área ventricular (**A.** 40x, **B.** 200x, **C.** 400x). Expresión de LIF en la cavidad auricular (**D.** 40x, **E.** 400x). Se observó que el endocardio es negativo para la expresión de LIF (**F.** 40x, **G.** 200x, **H.** 400x). La barra representa 100 μ m.

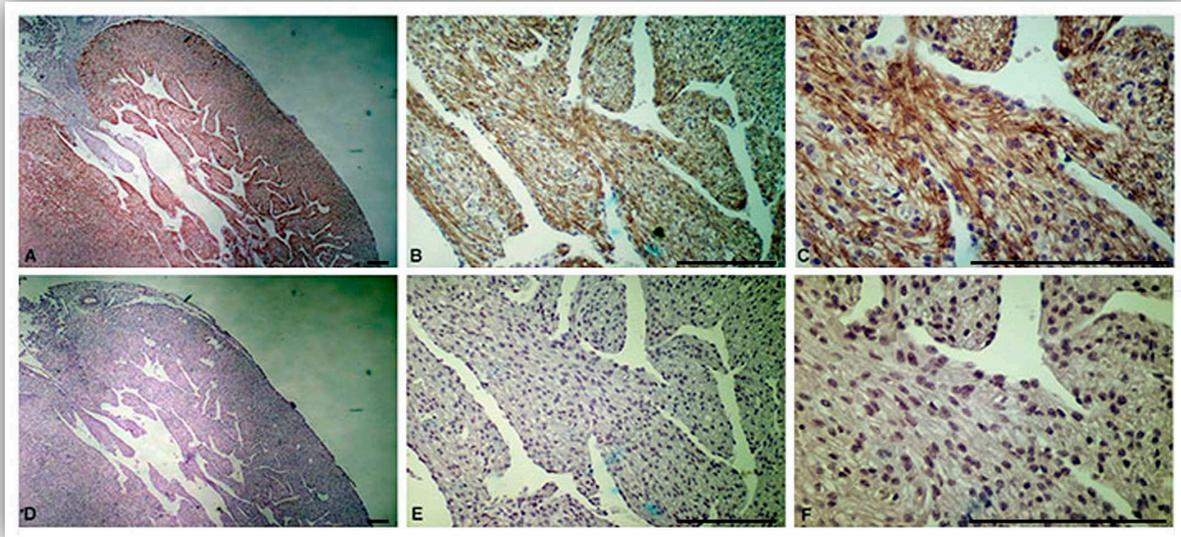


Figura 24. Corazón humano en la semana 8 del desarrollo embrionario. Expresión de la cadena pesada de la miosina sarcomérica (α -MHC) (A. 40x, B. 200x, C. 400x). D-F. control de isotipo (IgG murina. D. 40x, E. 200x, F. 400x). La barra representa 100 μ m.

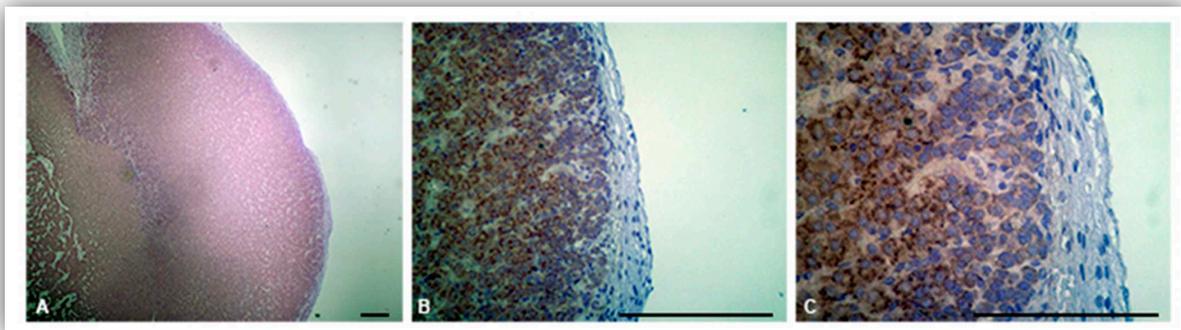


Figura 25. Corazón humano en la semana 11 del desarrollo embrionario. Se puede observar la expresión de LIF en el miocardio mientras que el epicardio no es inmunoreactivo. (A: 40x, B:200x, C: 400x). La barra representa 100 μ m.

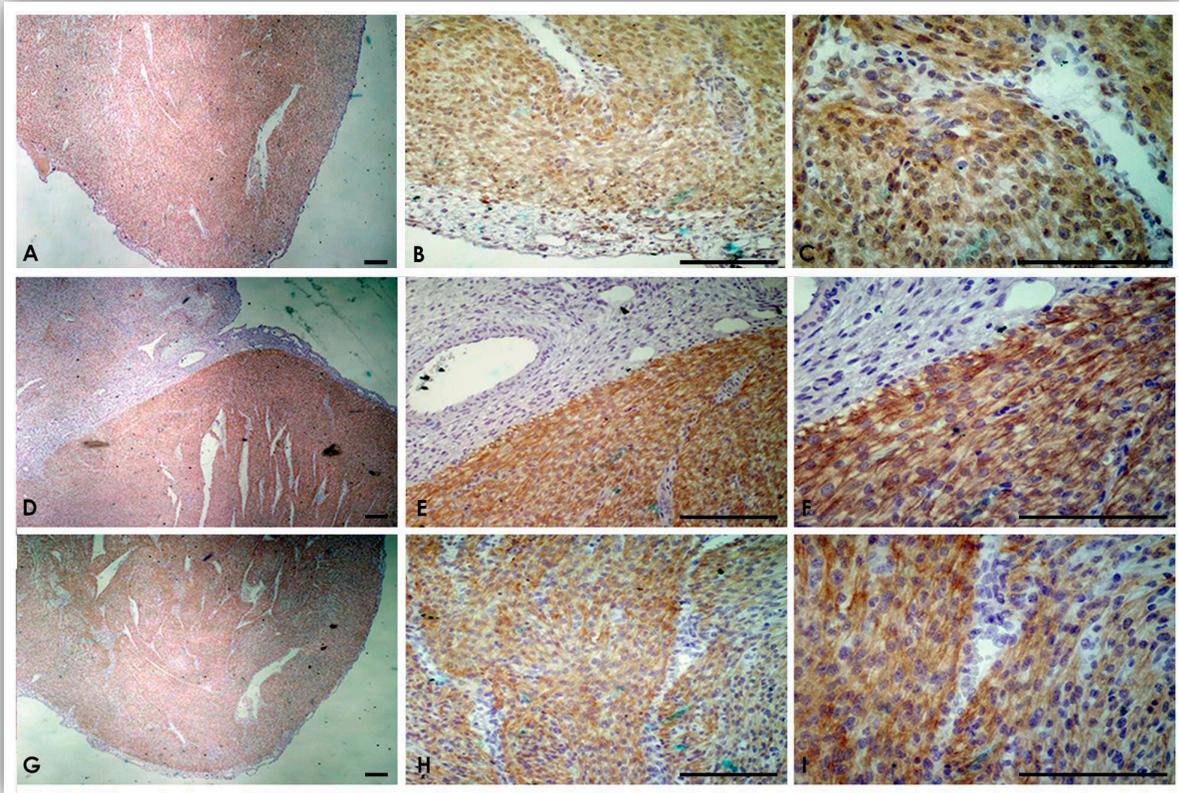


Figura 26. Corazón en la semana 15 del desarrollo embrionario. Se puede observar la expresión de LIF en el miocardio mientras que el epicardio y endocardio no presentan inmunoreactividad. (**A.** 40x, **B.** 200x , **C.** 400x). Se puede observar la expresión de aMHC en el miocardio tanto en la región auricular. (**D.** 40x, **E.** 200x , **F.** 400x), como en la ventricular (**G.** 40x, **H.** 200x , **I.** 400x). La barra representa 100 μ m.

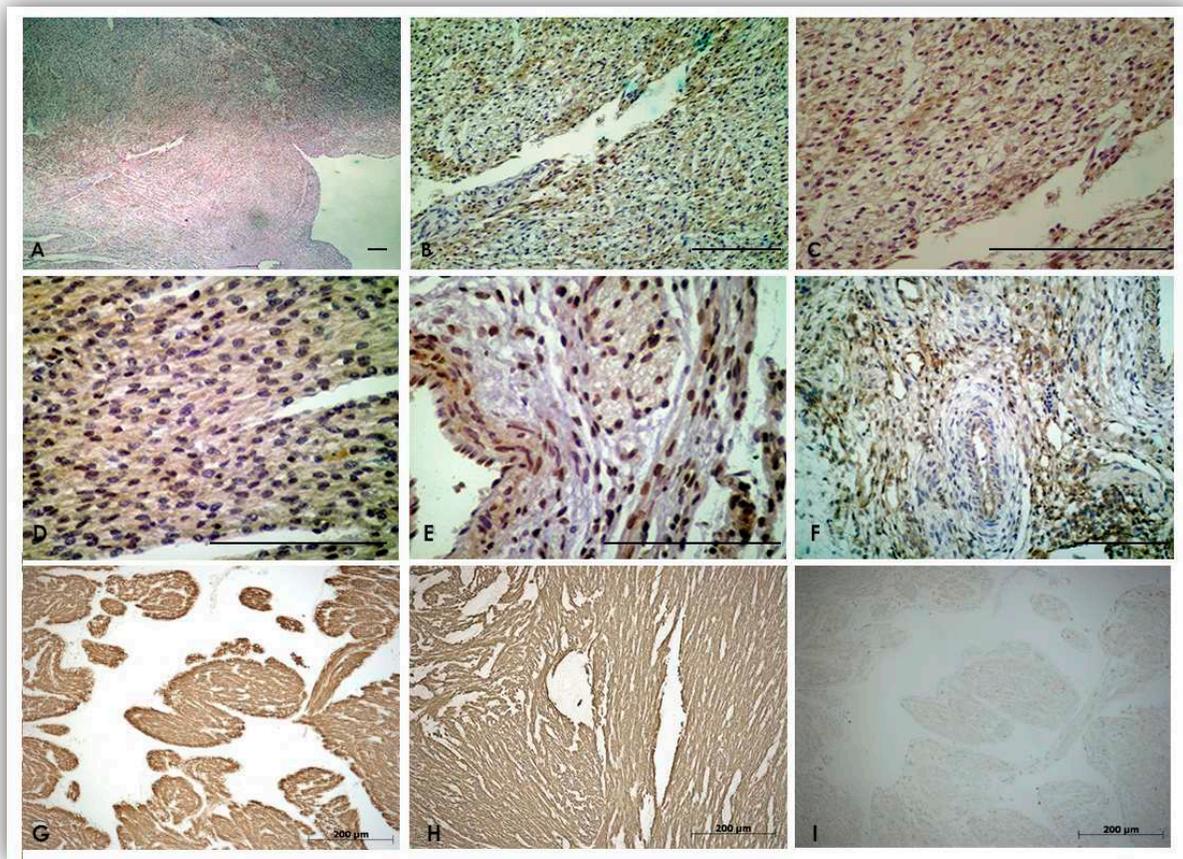


Figura 27. Corazón humano en la semana 17 del desarrollo embrionario. Expresión de LIF en la región auricular (**A.** 40x, **B.** 200x, **C.** 400x). La expresión de gp130 se observó en el miocardio auricular (**D.** 400x) y en la región de los grandes vasos (**E.** 200x), mientras que la región ventricular la expresión estaba disminuida. **F.** expresión de STAT3 en la región de grandes vasos (200x). La barra representa 100 μ m. Expresión de MF20 en miocardio auricular y ventricular (**G.** 40x y **H.** 200x). **I.** control de isotipo (40x). La barra representa 200 μ m.

En las Figuras 23 a 27 podemos observar que LIF se expresa ubicuamente en las distintas regiones del corazón en los estadios más tempranos del desarrollo (semanas 8 a 15) y posteriormente (semana 17) exhibe una expresión más restringida a la zona auricular, cercana a la ubicación del nodo sinusal. Observamos que gp130 (en la semana 17 del desarrollo) se expresa ampliamente en el corazón tanto en el miocardio como en las células endoteliales asociadas a los vasos sanguíneos al igual que STAT3.

A partir de las inmunotinciones en los cortes histológicos pudimos determinar que LIF se expresa en el corazón embrionario humano (al menos en los estadios evaluados). Debido a la falta de información acerca del rol de LIF en el desarrollo cardíaco humano y ya que el uso de CMEh permite contar con un modelo

humano de cardiogénesis, nos resultó de gran interés estudiar la relevancia biológica de LIF durante la diferenciación cardíaca en el modelo de diferenciación *in vitro* a partir de CMEh.

Perfil de expresión de gp130 ,LIF y STAT3 en CEs contráctiles.

Como primer paso, decidimos realizar inmunotinciones en CEs contráctiles producto de la diferenciación *in vitro*.

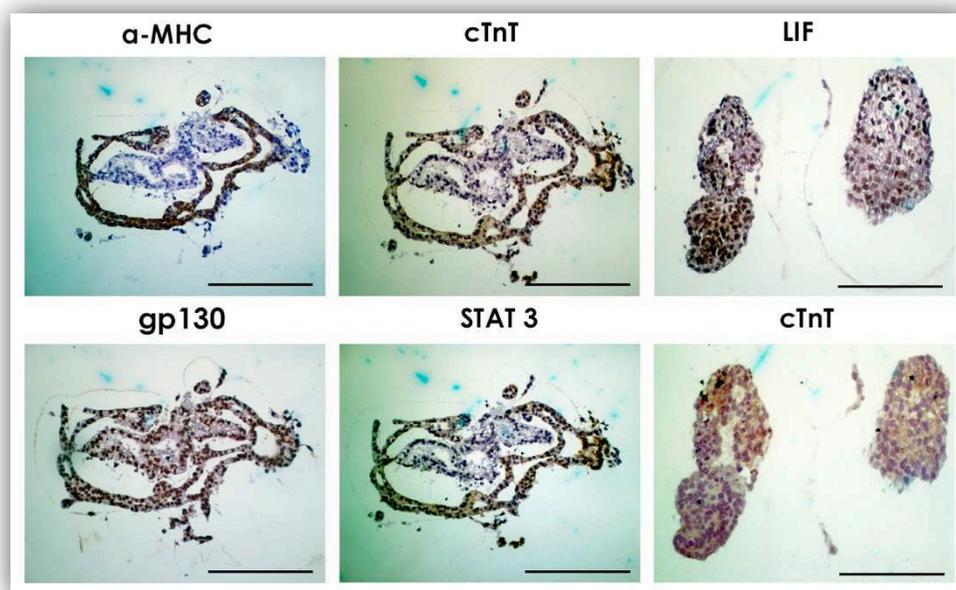


Figura 28. Inmunohistoquímica de CEs que exhibían áreas contráctiles luego de 14 días en cultivo. Se puede observar la expresión de αMHC, cTnT ,gp130, STAT3 y LIF. La barra representa 100 μ m.

Como podemos observar en la Figura 28 los Ces, luego de 14 días de diferenciación *in vitro*, expresan gp130, LIF y STAT 3 al igual que lo observado para el tejido cardíaco evaluado previamente. Este resultado nos permite reafirmar nuestro modelo *in vitro* para el estudio de la diferenciación cardíaca.

LIF es producido y secretado durante la diferenciación cardíaca de CMEh *in vitro*.

A continuación decidimos evaluar la expresión de LIF en las células generadas al aplicar el protocolo de diferenciación dirigida *in vitro* de CMEh a CM. Para ello, expusimos a las células al protocolo de diferenciación durante 18 días, y

mediante un ensayo de ELISA (LIF ELISA kit, KAC1351, Invitrogen.) cuantificamos la presencia de LIF en el sobrenadante. Este ensayo se basa en un sistema oligoclonal en el cual se usan varios anticuerpos monoclonales contra distintos epitopes de LIF. La detección se realiza mediante anticuerpos acoplados a peroxidasa que permiten evidenciar la presencia de LIF mediante un ensayo colorimétrico.

Debido a que bajo el protocolo de diferenciación cardíaca empleado en este estudio se generan varios tipos celulares dentro de los cuales los cardiomiocitos son una población minoritaria, decidimos separar manualmente las áreas contráctiles (enriquecidas en CM) de las no contráctiles (células de soporte) con el fin de identificar la población celular que estaría expresando y secretando LIF al medio.

Como se puede observar en la Figura 29 en el sobrenadante de las células presentes en las áreas no contráctiles determinamos una mayor concentración del LIF que en las áreas contráctiles (aproximadamente 3 veces).

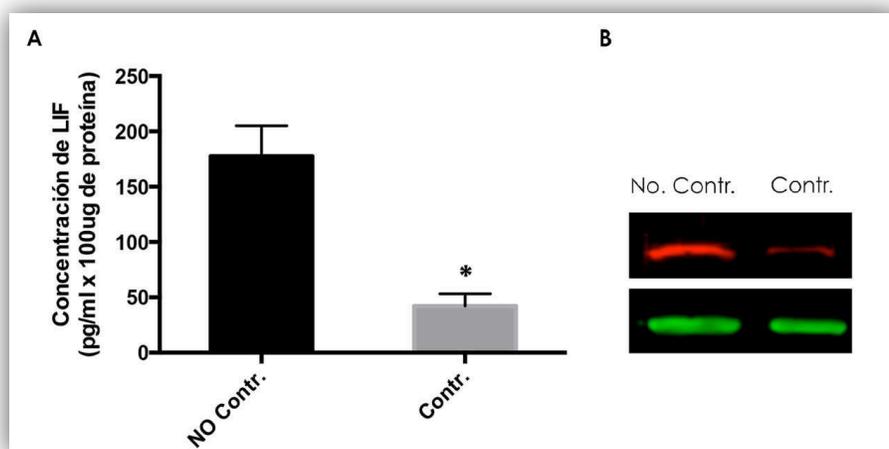


Figura 29. A. Determinación de la presencia de LIF en el sobrenadante de un cultivo de CMEh luego de 20 días de iniciado el proceso de diferenciación cardíaca: solo del área contráctil (contr) o solo del área no contráctil (no contr). La concentración de LIF se expresa como pg/ml cada 100 ug de proteína total. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$). **B.** Western blot de las células evaluadas en el ensayo de EALISA. Se empleó un anticuerpo anti-LIF (rojo) y se utilizó actina como control de carga (verde).

Luego evaluamos los niveles del ARNm de gp130, LIF y α -MHC a lo largo de la diferenciación pero en esta oportunidad separando mecánicamente las áreas contráctiles de las no contráctiles. La pureza de cada población fue evaluada mediante el análisis de la expresión del ARNm de α -MHC.

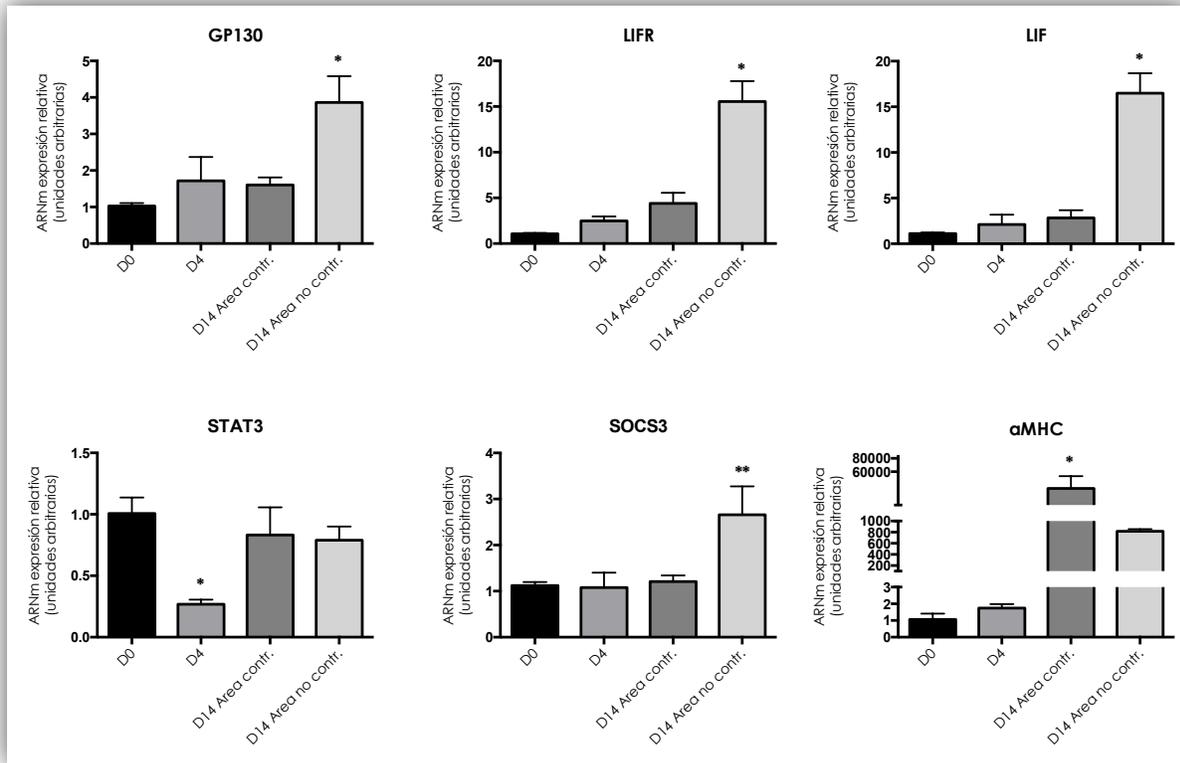


Figura 30. Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de la expresión de ARNm de gp130, LIFR, STAT3, SOCS3, LIF y αMHC a lo largo de la diferenciación. Al día 14 de la diferenciación se separaron manualmente las áreas contráctiles de las no contráctiles y se analizaron por separado. Los gráficos muestran los niveles de ARNm relativos al día 0 (D0) establecido arbitrariamente como 1. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0,05$ vs D0, ** $P < 0,01$ VS D0).

Como se puede observar en la Figura 30, tanto la expresión de la citoquina LIF como la de los receptores LIFR y gp130 fue mayor en las áreas no contráctiles. Además, en estas muestras medimos los niveles de expresión del transcrito de STAT3 y del supresor de la señalización de citoquina, SOCS3. No se determinaron diferencias significativas entre los niveles del ARNm de STAT3 presentes en las muestras provenientes de áreas contráctiles y no contráctiles aisladas el día 14 del proceso de diferenciación. Sin embargo, se observó un marcado descenso de la expresión de STAT3 luego de 4 días de iniciado el proceso de diferenciación, coincidente con la especificación del mesodermo.

Por otra parte observamos que las células de las áreas no contráctiles expresan mayores niveles de SOCS3 que las áreas contráctiles, sugiriendo que la vía JAK/STAT estaría regulada diferencialmente en estas áreas. Es importante

destacar que la técnica de selección manual de las áreas contráctiles, si bien sirve para enriquecer en una población cardíaca, no resulta del todo efectiva en obtener poblaciones puras a juzgar por los niveles del ARNm correspondiente a-MHC determinados (Figura 30, panel inferior derecho).

A continuación nos pareció importante caracterizar fenotípicamente las células que rodean a los CEs contráctiles. En la Figura 31A podemos observar que estas células presentan una forma ahusada característica de las células tipo mesenquimal y además aproximadamente el 18% presenta un perfil de expresión CD34/CD73⁺ (evaluada por citometría de flujo), el cual también es característico de este tipo celular. Por último, corroboramos que estas células expresan LIF a juzgar por la inmunoreactividad detectada mediante microscopía de fluorescencia en las células co-generadas con los CEs contráctiles (Fig. 31B).

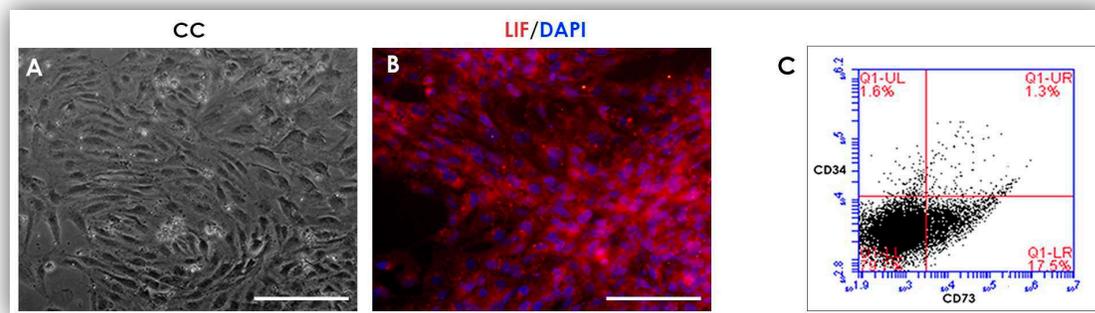


Figura 31. **A.** Fotomicrografías de campo claro de las células que se co-generan con los CEs bajo el protocolo de diferenciación cardíaca dirigido. **B.** Inmunomarcación evidenciando la expresión de LIF. La barra representa 100 μ m. **C.** Ploteo de puntos (dot plots) representativos obtenidos por citometría de flujo de las células que rodean a los CEs contráctiles. Se utilizaron los anticuerpos anti CD73-APC y CD34-FITC.

Efecto de LIF en la diferenciación cardíaca *in vitro*.

Se ha demostrado que LIF está presente en los distintos tipos celulares que conforman el tejido cardíaco (células endoteliales, fibroblastos y CM) ^(159, 183) y que tiene un efecto hipertrófico y citoprotector sobre los miocitos cardíacos adultos ⁽¹⁵¹⁾. Tanto la vía de MAPK/ERK_{1/2} y la de PI3K/Akt son activadas por la citoquina LIF y han sido asociadas con la protección a corto plazo de los miocitos cardíacos en lesiones de injuria y reperfusión sin la necesidad de transcripción génica ⁽¹⁸⁴⁾. STAT1 y STAT3 (formando homo- o heterodímeros) dominan la señalización de LIF en el corazón. Existe evidencia que asocia a STAT3 (a veces activado por LIF) a la protección de los cardiomiocitos mediada por la activación de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-X_L), antioxidantes (MnSOD) y pro-angiogénicas (VEGF y VE cadherina). Además ha surgido evidencia que STAT3 y AKT pueden activarse recíprocamente en los cardiomiocitos ⁽¹⁸⁵⁾.

Teniendo en cuenta lo aquí expuesto en conjunto con los resultados del ensayo de ELISA, nos pareció relevante estudiar el efecto de LIF durante la diferenciación cardíaca de CMEh expuestas al protocolo cardiogénico.

Para ello, LIF (10 o 100 ng/ml) fue agregado luego de 4 días (una vez que el mesoderma se ha establecido), 8 días (concordante con la aparición de los progenitores cardíacos), o 10 días (cuando ya se aprecian áreas contráctiles) de iniciado el proceso de diferenciación. Luego de 14 días de diferenciación, determinamos el porcentaje de CEs contráctiles y la abundancia de la proteína α -MHC mediante ensayos de citometría de flujo (Figura 32 A y B).

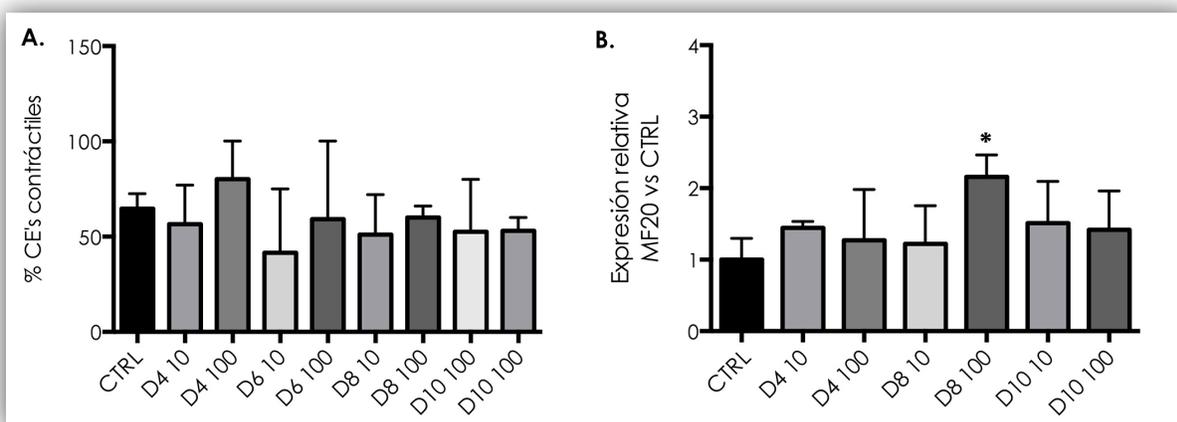


Figura 32. A. Porcentaje de CEs contráctiles evaluados al día 14 de la diferenciación **B.** Expresión relativa de la proteína α MHC (MF20) con respecto al nivel del control (sin LIF, al día14) determinada mediante citometría de flujo empleando un anticuerpo primario específico y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0,05$ vs CTRL). D4, D8 y D10 (día en el que fue agregado LIF);10(10 ng/ml) y 100 (100ng/ml) de LIF.

Al evaluar el porcentaje de CEs contráctiles, no se encuentran diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales (Figura 32 A). Sin embargo, como se mencionó previamente en la introducción, el porcentaje de áreas contráctiles no suele ser un buen parámetro para estimar la eficiencia de diferenciación de un determinado protocolo. Es por ello que decidimos evaluar la expresión de la proteína α -MHC mediante citometría de flujo. A partir de este ensayo podemos concluir que el agregado de LIF (100 ng/ml) a partir del día 8 y hasta el fin del proceso de diferenciación causó un aumento significativo en el número de células que expresan α -MHC (células cardíacas).

Con el fin de estudiar si los CM cultivados con LIF respondían de manera diferencial a la estimulación de los receptores adrenérgicos tipo β 1, medimos la frecuencia de contractibilidad en presencia o ausencia de norepinefrina. El agregado de norepinefrina 10 nM resultó en un incremento de 2 veces del promedio de contracciones por minuto, tanto en condición control (sin tratar) como con la adición de LIF. Este resultado evidencia que los cardiomiocitos cultivados con LIF responden a la norepinefrina de la misma manera que los CM control (tabla 2).

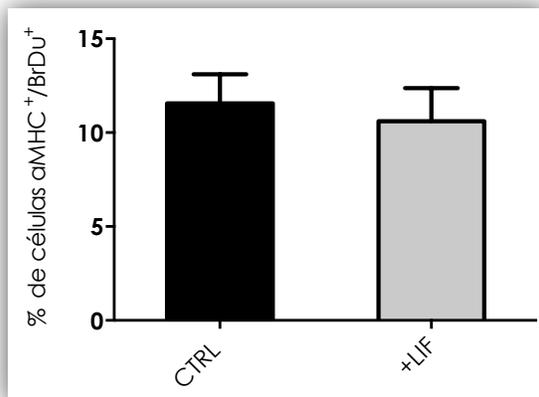
Figura 33. Ensayo de incorporación de BrdU (APC BrDu-flow kit; BD). El gráfico muestra el porcentaje de células cardíacas que incorporaron BrDu. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes.

Promedio de contracciones por minuto			
	- Norepinefrina	+ Norepinefrina	Promedio del Incremento
CTRL	21,5 \pm 1,88	49,8 \pm 2,27	1,8 \pm 0,2
LIF	19,14 \pm 1,14	37,4 \pm 3,59	1,93 \pm 0,08

Tabla 2. Evaluación del efecto del agregado de norepinefrina (10nM) a CEs contráctiles generados en presencia o ausencia de LIF (100ng/ml a partir del día 8 de la diferenciación) El resultado es el promedio de contracciones por minuto registradas en 9 CEs.

LIF no altera la tasa de proliferación celular de las células cardíacas.

El aumento en el número de células cardíacas puede deberse en principio a dos fenómenos diferentes. Podría ser el resultado de un cambio en la tasa de proliferación y o podría deberse a una disminución en la tasa de muerte de las células tratadas con LIF. Para dilucidar la causa del aumento observado, realizamos un ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina, que se incorpora al ADN durante su replicación, permitiendo así detectar las células presentes en la fase S del ciclo celular (indicativas del grado de proliferación). Luego de un pulso de 10 μ M BrDu de 1 hora evaluamos por citometría de flujo el porcentaje de células BrdU⁺/ α MHC⁺ presentes en ambas condiciones experimentales (ausencia o presencia de LIF 100 ng/ml a partir del día 8).



Como se observa en la Figura 33 el número de células atravesando la fase S del ciclo celular no varía significativamente en presencia o ausencia de LIF. Este resultado nos permite proponer que LIF no estaría ejerciendo un efecto sobre la tasa de proliferación de las células cardíacas obtenidas a partir de CMEh bajo el protocolo cardiogénico.

LIF ejerce un efecto citoprotector sobre las células cardíacas mediante la disminución de los niveles de apoptosis.

A continuación decidimos evaluar los niveles de muerte celular desplegados por las células cardíacas en presencia o ausencia de LIF. Una de las características de la muerte celular por apoptosis es la fragmentación del ADN. Para determinar la presencia de fragmentos de ADN, realizamos ensayos de TUNEL (del inglés *T*erminal deoxynucleotidyl transferase *d*UTP *n*ick *e*nd *l*abeling) el cual mide la fragmentación del ADN mediante la incorporación catalítica de deoxiuridinas trifosfato (dUTP's) marcados con fluoresceína (FITC) en el extremo 3'-OH de los fragmentos de ADN. El ADN así marcado puede ser cuantificado por citometría de flujo. Como nuestro propósito era evaluar solamente las células cardíacas, incorporamos al ensayo la marcación con un anticuerpo anti- α MHC y de este modo seleccionamos para nuestro análisis solo la población de interés.

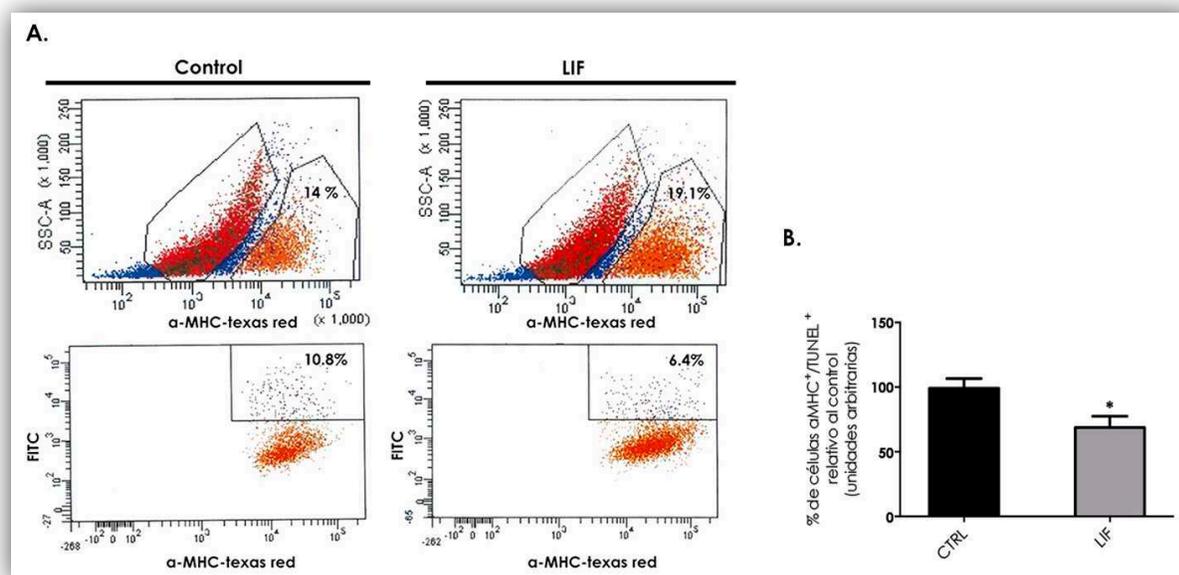


Figura 34. A. Ploteo de puntos (dot plots) representativos del ensayo de TUNEL analizado mediante citometría de flujo. **B.** Cuantificación del ensayo de TUNEL. El porcentaje de las células tratadas se relativizó al valor control (no tratadas) el cual se fijó arbitrariamente como 100. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0,05$).

Mediante el ensayo de TUNEL (Figura 34) observamos que el tratamiento de las células con LIF disminuye los niveles de muerte celular en aproximadamente un 30%. Si bien aquí se analizan solo las células que expresan α -MHC, no podemos ignorar el hecho de que, a pesar de haber optimizado el protocolo de diferenciación cardíaca el cual nos permitió obtener un mayor porcentaje de derivados mesodérmicos en general y cardíacos en particular, con el modelo experimental empleado en este estudio se generan varios tipos celulares dentro de los cuales los cardiomiocitos son una población minoritaria. Por lo tanto esta disminución en la tasa de apoptosis de las células cardíacas podría deberse a un efecto directo de LIF sobre las mismas o a un efecto indirecto donde LIF estuviera actuando sobre las células que se co-generan con los CM y éstas a su vez ejercieran algún efecto sobre los CM.

Con el fin de evaluar los efectos de la citoquina particularmente en los CM, decidimos emplear la línea celular, H9-hTnnTZ-pGZ-D2 (H9-cTnT, *WiCell*), que dadas sus características nos permite obtener una población celular más homogénea. Esta línea celular fue establecida a partir de la línea H9, la cual fue modificada genéticamente de manera que la expresión de la proteína verde fluorescente

(GFP) y la del gen *Sh ble* (resistencia al antibiótico Zeocina) se encuentren reguladas por una región del promotor de la cTnT. De esta manera es posible seleccionar, mediante el uso de zeocina o por citometría de flujo (por detección de la fluorescencia) la población de interés. En la Figura 35 A se puede observar que luego de la selección con el antibiótico solo sobreviven aquellas células que expresan GFP y tienen activado el promotor de cTnT.

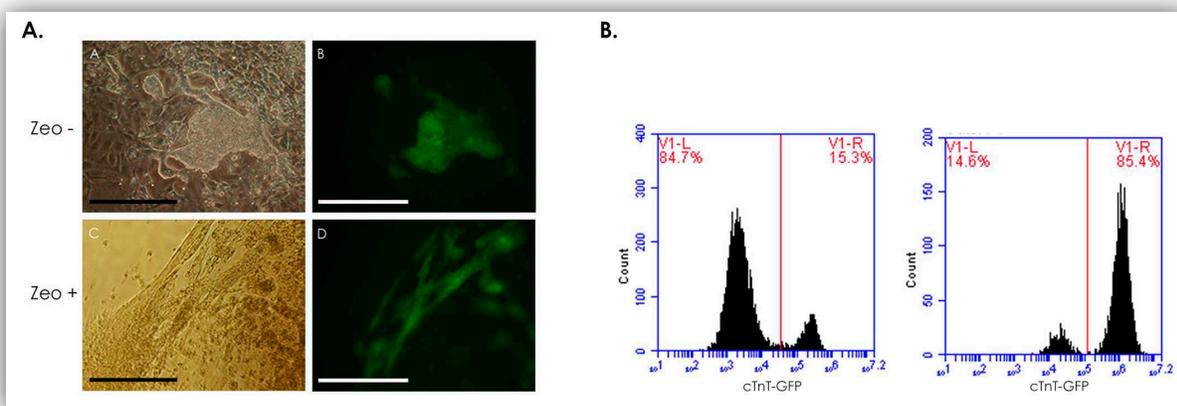
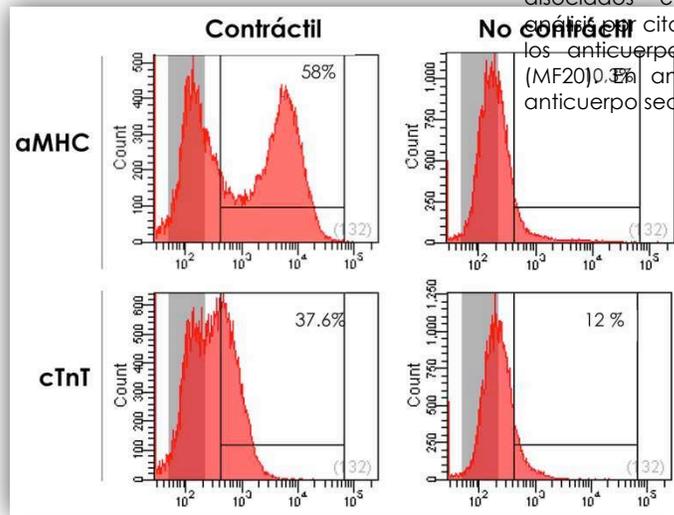


Figura 35. A. Expresión de cTnT y GFP luego de 10 días de inducir la diferenciación. Se pueden observar diferentes tipos celulares que rodean al CE contráctil A: campo claro. B: Expresión de GFP en el área contráctil. C y D: 48hs post selección con zeocina solo sobreviven aquellas células donde se activó el promotor de cTnT (GFP+). **B.** Análisis, mediante citometría, de flujo del enriquecimiento en células cardíacas mediante la selección con Zeocina. Panel izquierdo: CEs sin tratar. Panel derecho: CEs tratados con Zeocina (100 ug/ml durante 72 hs). Se muestran dos histogramas representativos.

Esta línea estable nos permite de una manera muy eficiente obtener una población altamente enriquecida en células cardíacas mediante el uso de la Zeocina (100ug/ml). Como se puede observar en la Figura 33 B, luego de tres días de selección con antibiótico logramos obtener entre un 75 y 90 % de células positivas para cTnT. Si comparamos con los valores que se obtiene mediante el enriquecimiento mecánico (Figura 36), podemos observar que éste último método no solo resulta menos eficiente (37,6% cTnT⁺ y 58% α -MHC⁺) sino que además es mucho más laborioso, consume mayor tiempo, es dependiente del operador y en caso de querer continuar cultivando las áreas seleccionadas, éstas deben ser pasadas de placa aumentando el riesgo de contaminaciones.

Figura 36. Expresión de aMHC y cTnT. Selección mecánica de las áreas contráctiles luego de 10 días de diferenciación. Se realizó una disección de CE's utilizando una aguja, y luego disociados enzimáticamente para su análisis en citometría de flujo. Se utilizaron los anticuerpos anti-cTnT y anti aMHC (MF20). En ambos casos se empleó un anticuerpo secundario Alexa-488.



Para los subsiguientes experimentos, se empleó el protocolo previamente descrito, donde se incluyó a partir del día 10 el tratamiento con Zeocina (100 ug/ml) durante 72 horas. Este procedimiento nos permitió obtener un cultivo enriquecido en la población de interés y por lo tanto poder evaluar el efecto de LIF sobre la misma.

A continuación, evaluamos la viabilidad de las células H9-cTnT seleccionadas tratadas o no con LIF (a partir del día 8) luego de 14 días de diferenciación, mediante un ensayo colorimétrico utilizando sal de tetrazolio -(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida; XTT). Este ensayo se basa en la capacidad que poseen las células metabólicamente activas para reducir la sal de tetrazolio (XTT) de color amarillo a una tinción de formazán de color naranja, la cual es detectada utilizando un espectrofotómetro de microplaca a una longitud de onda de 450nm.

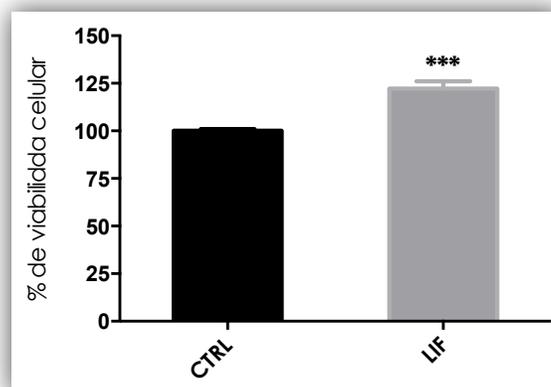


Figura 37. La viabilidad celular se midió mediante un ensayo colorimétrico utilizando de colorante vital XTT / PMS sobre células Zeocina resistentes control o tratadas con LIF 100ng/ml a partir del día 8 de diferenciación. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular, calculado a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra tratada y la absorbancia del control x 100. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. (***) $P < 0.001$.

Como se puede observar en la Figura 37, aquellas células Zeocina resistentes tratadas con LIF, presentaron un incremento aproximado del 25% en la viabilidad celular.

Teniendo en cuenta que el ensayo de XTT solamente refleja la funcionalidad de la actividad mitocondrial, quisimos confirmar si este resultado era la consecuencia de una disminución en el grado de muerte celular.

Como mencionamos previamente, la degradación del ADN en oligómeros de tamaño uniforme (180-200 pares de bases aproximadamente) es característica de los cortes inter-nucleosomales que sufre el ADN durante procesos apoptóticos. Teniendo esto en consideración decidimos evaluar los niveles de apoptosis mediante ensayos de ELISA (del inglés, Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Este abordaje experimental permitió detectar de manera cuantitativa mono y oligonucleosomas citoplasmáticos.

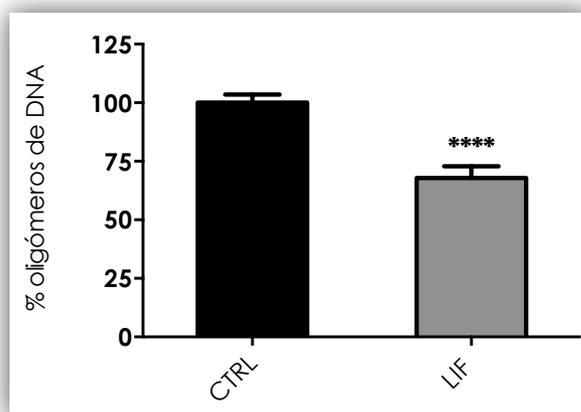


Figura 38. Porcentaje de oligómeros de ADN cuantificado mediante ELISA . Los resultados están representados como el porcentaje de oligómeros de ADN de los CE's tratados con LIF respecto de los presentes en CE's sin tratar que fueron fijados arbitrariamente en 100. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. (**** $P < 0.0001$).

En la Figura 38 se observa que en los extractos citoplasmáticos de los CE's zeocina resistentes tratados con LIF se detectó un menor porcentaje de oligómeros de ADN ($\approx 25\%$), indicativos de un menor grado de fragmentación del ADN, y en consecuencia de un menor grado de apoptosis.

La familia de proteínas de Célula B del Linfoma 2 (Bcl-2 por su nombre en inglés) se encuentra conformada por alrededor de 25 miembros que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca del proceso de apoptosis celular. La proteína de la célula B del linfoma extra grande (Bcl-xL por su nombre en inglés) es una molécula transmembrana presente en la mitocondria y actúa como una proteína pro-supervivencia mediante la prevención de la liberación de factores mitocondriales (tales como el citocromo c) lo que conduciría a la activación de la vía de las caspasas y derivando en la muerte celular. Es un concepto bien establecido en el campo de la apoptosis que las cantidades relativas de proteínas pro- y anti-supervivencia de la familia Bcl-2 son las que definen si la célula terminará o no en un proceso apoptótico. A mayor cantidad de Bcl-xL los poros mitocondriales no serán permeables y por lo tanto la célula sobrevivirá. Sin embargo, si se activan proteínas pro- apoptóticas como BAX (y Bcl-xL es secuestrada), se formarán poros en la

membrana mitocondrial, el citocromo c se liberará conllevando la iniciación de la cascada de caspasas que conduce a eventos apoptóticos.

Es por ello que decidimos evaluar mediante ensayos RT-PCR en tiempo real y de western blot los niveles de algunos de los ARNm y proteínas involucrados en la regulación de procesos apoptóticos

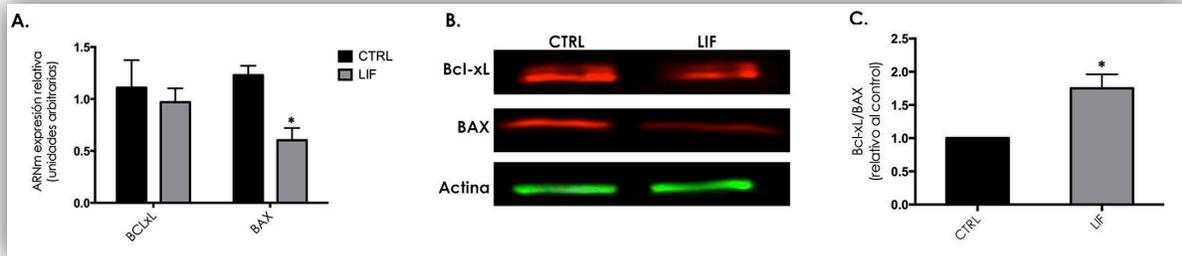


Figura. 39. **A.** Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de la expresión de ARNm de Bcl-xL y BAX en células contráctiles Zeocina resistentes. **B.** Western blot de células contráctiles seleccionadas control vs tratadas con LIF reveladas con anti-Bcl-xL y anti-BAX. En ambos casos se utilizó actina como control de carga. **C.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia utilizando el sistema LICOR. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (* $P < 0.05$).

En la Figura 39 A se muestran los niveles de expresión de los ARNm de Bcl-xL y BAX en células contráctiles seleccionadas con Zeocina y tratadas o no con LIF. Como se puede observar la presencia de LIF regula negativamente los niveles del transcritto de BAX sin afectar los niveles del ARNm de Bcl-xL. Los niveles proteicos de Bcl-xL, BAX y actina (esta última como control de carga) fueron determinados mediante ensayos de western blot (Figura 39 B). Los niveles de expresión de BAX disminuyen marcadamente en presencia de la citoquina. Al evaluar la relación Bcl-xL /BAX (Figura 39 C) observamos que la misma resultó ser casi el doble en células tratadas con respecto a células sin tratar.

En conjunto estos resultados muestran la preponderancia de Bcl-xL sobre BAX, lo que sería indicativo de que LIF estaría promoviendo la supervivencia celular, en concordancia con los resultados obtenidos previamente (Figura 37 y 38).

LIF ejerce su efecto citoprotector mediante la activación de STAT3.

Con el fin de dilucidar si el efecto citoprotector de LIF estaba mediado por la activación de STAT3 empleamos el inhibidor STAT3, el cual fue agregado al medio de cultivo 90 minutos previos a la incorporación de LIF el día 8 de la diferenciación y hasta el día 14 de la diferenciación. En una primera instancia quisimos evaluar si ante la presencia de STAT3 se bloqueaba el efecto de LIF.

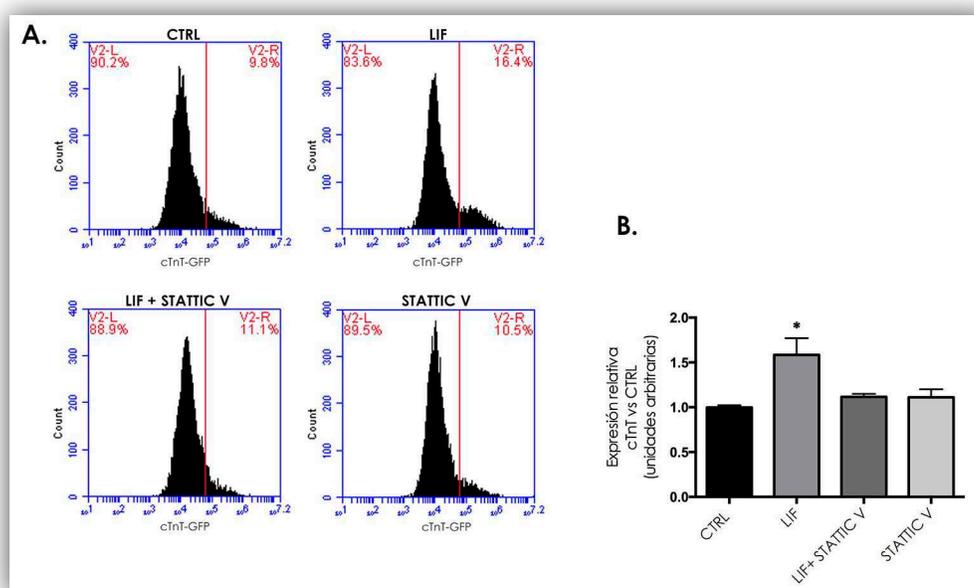


Figura 40. A. Histogramas representativos de la cuantificación de células positivas para cTnI evaluada mediante citometría de flujo de CE en condiciones CTRL: células sin tratamiento; LIF: células tratadas con LIF 100ng/ml; LIF + STAT3 V: células tratadas con STAT3 V 2μM y LIF 100ng/ml; STAT3 V: células tratadas con STAT3 V 2 μM tratados a partir el día 8 de la diferenciación hasta el día 14. **B.** Cuantificación de la expresión relativa de la proteína cTnI con respecto al nivel del control (sin LIF, al día 14) determinada mediante citometría de flujo. Las barras representan el promedio ± SEM de tres experimentos independientes. (*p<0,05 vs CTRL).

Como podemos observar en la Figura 40, en presencia del inhibidor de STAT3 se obtiene la misma cantidad de células cardíacas que en las condiciones control (sin LIF). Por lo tanto la presencia de STAT3 V en el medio de cultivo conlleva la supresión del efecto de LIF sobre las células contráctiles.

A continuación analizamos los niveles de apoptosis cuantificando el porcentaje de oligómeros de ADN citoplasmáticos en los CM cultivados en

presencia del inhibidor STTTIC V o del anticuerpo específico contra gp130 tanto en presencia como en ausencia de LIF.

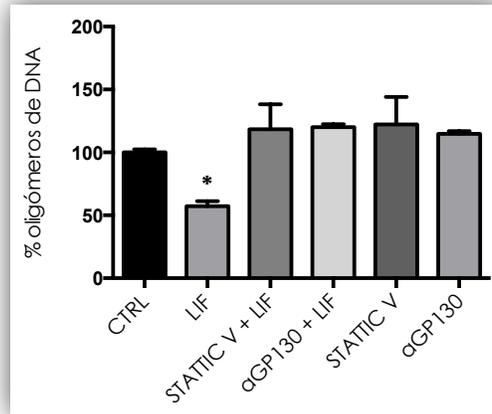


Figura 41. Porcentaje de oligómeros de ADN cuantificado mediante ELISA . Los resultados están representados como el porcentaje de oligómeros de ADN de los CEs tratados con LIF, LIF + STATTC V, LIF + αGP130, STATTC V y αGP130 respecto de los presentes en CEs sin tratar (CTRL) que fueron fijados arbitrariamente en 100. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. (* $p < 0.05$ vs CTRL).

Pudimos observar (Figura 41) que tanto la presencia del inhibidor STATTC V como la del anticuerpo bloqueante α -gp130 fue capaz de revertir el efecto citoprotector observado en presencia de LIF. En ambas condiciones experimentales (STATTC V o α -GP130) el porcentaje de oligómeros de ADN fue similar a los valores determinados en CM cultivados en condiciones control .

En conjunto estos resultados nos permiten concluir que LIF estaría ejerciendo un efecto citoprotector sobre las células contráctiles independientemente de la presencia de las células que se co-generan con los CM. El mayor número de células cardíacas generadas en presencia de LIF se debería a una disminución en los niveles de apoptosis. Este efecto estaría mediado, al menos en parte, por la vía de señalización mediada por gp130/STAT3.

Efecto de LIF en la especificación del mesodermo.

La transición epitelio mesenquimal (TEM) es un proceso complejo que ocurre durante la gastrulación e involucra cambios en la arquitectura tisular, la morfología, la adhesión y la capacidad migratoria de las células que conforman la mórula ⁽¹⁸⁶⁾. Durante la embriogénesis temprana la TEM juega un rol central en la determinación del mesodermo.

Los ensayos realizados previamente consideran la adición de LIF una vez que el mesodermo ha sido establecido (a partir del día 8 de la diferenciación). Observamos que cuando los CEs son cultivados en presencia de LIF desde el día 1 de la diferenciación (es decir previo al establecimiento del mesodermo) obtenemos una menor cantidad de células que expresan el marcador cardíaco α -MHC ($24,67\% \pm 5,2\%$ en el control versus $18\% \pm 3,2\%$ en las tratadas con LIF) (Figura 42).

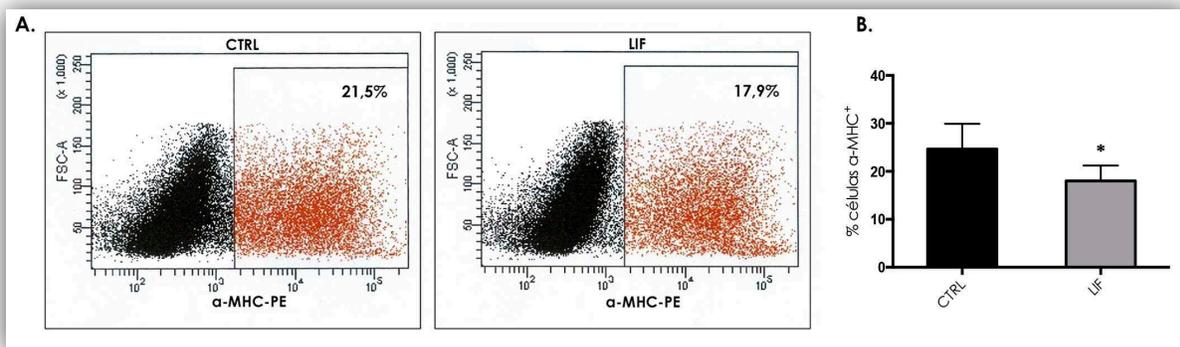


Figura 42. Expresión de la proteína α MHC en células control o tratadas con LIF desde el día 1 de la diferenciación determinada mediante citometría de flujo empleando un anticuerpo primario específico y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. **A.** Ploteo de puntos (dot plots) representativos. **B.** Cuantificación de los ensayos de citometría de flujo. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$).

Durante el año 2010, el grupo de la Dra. Gay Crooks, describió un progenitor mesodérmico temprano que surge de la TEM al cual lo denominó hEMP (por su nombre en inglés: human early mesodermal progenitor). Dicho progenitor es EpCAM/CD326 negativo y se caracteriza por perder la adhesión epitelial característica de la CMEh y adquirir expresión de NCAM/CD56 durante la TEM ⁽¹⁸⁷⁾. EpCAM (por su nombre en inglés: epithelial cell adhesion molecule) es una glicoproteína transmembrana involucrada en la adhesión célula-célula. De la

misma manera que ocurre en otras estructuras epiteliales, las CMEh usualmente establecen una polaridad apical-basal en relación a la capa nutricia sobre las que son cultivadas, y se asocian unas a otras mediante moléculas de adhesión como E-caderina y EpCAM ⁽¹⁸⁸⁾. Durante la TEM la pérdida de E-cadherina esta asociada con la expresión de NCAM (del ingles: neural cell adhesión molecule) y se ha reportado que sin la expresión de NCAM la TEM no ocurre ⁽¹⁸⁹⁻¹⁹¹⁾.

Este progenitor mesodérmico se obtiene a partir del cultivo de CMEh plaqueadas sobre Matrigel en presencia de BMP-4, Activina A, bFGF y VEGF (Figura 43) y representa un potente progenitor capaz de generar todos los derivados mesodérmicos: cardiovasculares, hematoendoteliales y mesenquimales (hueso, cartílago, grasa y fibroblastos).

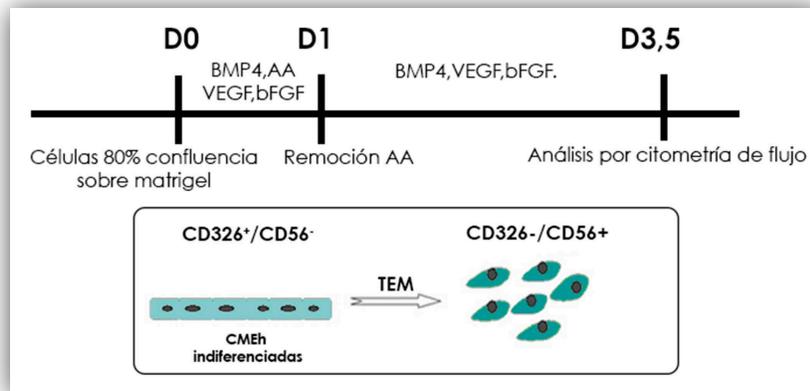


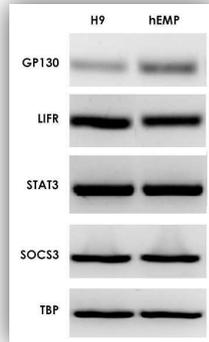
Figura 43 Esquema representativo de la inducción del progenitor temprano de mesodermo (hEMP). Las células son inducidas por 3,5 días y luego su fenotipo evaluado por citometría de flujo.

En el año 2011 establecimos una colaboración con el laboratorio dirigido por el Dra. Crooks donde pude capacitarme para generar, identificar y purificar dicho progenitor mesodérmico. Estos progenitores representan una herramienta experimental muy valiosa para evaluar el efecto de la citoquina LIF durante la determinación de mesodermo temprano.

Para llevar a cabo esta evaluación, primero analizamos mediante RT-PCR la expresión de los ARNm de algunos de los componentes de la vía de señalización mediada por LIF en hEMP. Como puede observarse en la Figura 44, en los hEMP tanto LIFR como STAT3 y SOCS3 se expresan en niveles comparables a los

Figura 44. Expresión de los ARNm de gp130, LIFR, STAT3 y SOCS3 y TBP (control de carga). Analizado mediante un ensayo de RT-PCR a punto final.

determinados en CMEh (H9). Por el contrario los hEMPs exhiben mayores niveles del transcripto correspondiente a gp130 que sus contrapartes indiferenciadas.



A continuación, realizamos ensayos de diferenciación *in vitro* de CMEh a hEMP en presencia o ausencia de LIF (10ng/ml) desde el día 0 y hasta el día 3,5 y evaluamos el porcentaje de células CD326-/CD56⁺ por citometría de flujo.

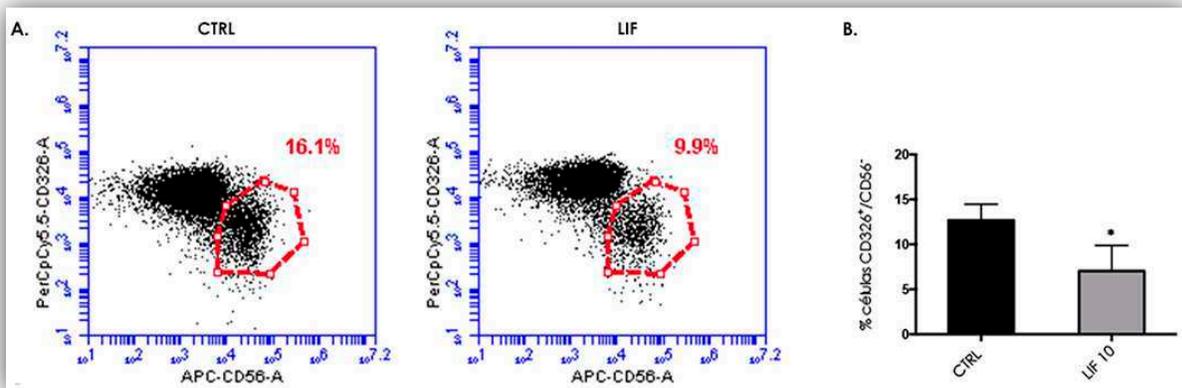


Figura 45. Porcentaje de hEMP obtenidos luego de 3,5 días de diferenciación en condiciones control (sin tratar) o tratados con LIF 10 ng/ml. Se utilizaron los anticuerpos específicos anti-CD326 conjugado con PerCP Cy 5.5 y el anticuerpo específico anti-CD56 conjugado con APC. **A.** Ploteo de puntos (Dot plots) representativos de la diferenciación a hEMP en presencia o ausencia de LIF. **B.** Cuantificación de los ensayos de citometría de flujo. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$).

Como podemos observar en la Figura 45 la presencia de LIF durante la diferenciación de hEMP redujo la aparición de células CD326-/CD56⁺.

Estos resultados nos permiten proponer que la presencia de LIF estaría alterando el proceso de diferenciación hacia linaje mesodérmico a juzgar por el menor número de hEMP obtenidos.

Capítulo II.

Células pluripotentes inducidas : reprogramación y caracterización.

Considerando el campo de la terapia regenerativa, resulta difícil pensar en la aplicación a gran escala de CMEh. Su obtención es muy dificultosa, limitando por lo tanto su disponibilidad. La utilización de estas células en terapias regenerativas se ve limitada debido a problemas de histocompatibilidad como sucede hoy en día con los trasplantes de órganos; sin mencionar los problemas éticos que representa la obtención de estas células en numerosos países en el mundo. Es así como en los últimos años el campo de las células madre pluripotentes se vio revolucionado por una nueva forma de obtención de células muy similares a las embrionarias, las células madre pluripotentes inducidas (CMPIs) (67, 192, 193). Estas células se obtienen a partir de células somáticas adultas como fibroblastos, queratinocitos o células epiteliales y son reprogramadas frecuentemente por medio de la transducción *in vitro* de partículas virales que portan secuencias codificantes para factores de transcripción cruciales para el mantenimiento de la pluripotencia. Las CMPIs así generadas presentan expresión génica, proteica y modificaciones epigenéticas muy similares a las CME; se diferencian a las tres capas germinales y poseen la capacidad de generar teratomas *in vivo*. Estas características las equiparan a las CMEs, y por ende son vistas como substitutos accesibles. Esta nueva herramienta resulta particularmente atractiva en el campo de las enfermedades cardiovasculares ya que no solo es un gran modelo humanizado *in vitro* para el testeado de drogas sino que también permitiría el tratamiento de pacientes cardíacos mediante el reemplazo del tejido enfermo por células del propio paciente sin tener que depender de la espera de un órgano compatible.

En base a lo aquí expuesto, nos resulto interesante obtener nuestra propia línea de CMPIs y evaluarla dentro del protocolo de diferenciación cardíaca dirigido.

Para la reprogramación celular empleamos fibroblastos humanos derivados de prepucio. En la Figura 46 A podemos observar que estas células presentan una morfología ahusada característica y crecen formando una monocapa compacta (I). Los fibroblastos fueron infectados con partículas lentivirales conteniendo el plásmido STEMCCA (ver Materiales y Métodos). Luego de 7 a 14 días de realizada la infección se observó la aparición de pequeñas colonias compactas con bordes definidos formadas por unas pocas células cuya morfología es redondeada y exhiben una relación núcleo citoplasma elevada (Figura 46A.II). Luego de aproximadamente 40 días durante los cuales las células fueron re-picadas varias veces, se obtienen grandes colonias muy similares a las de CMEh (Figura 46.III, comparar con Figura 1).

Como primer paso para caracterizar las colonias obtenidas realizamos un ensayo para detectar la actividad de fosfatasa alcalina, la cual resultó positiva (15). A continuación, analizamos mediante RT-PCR a punto final la expresión de los genes Oct-4 y Nanog. Como se puede observar en la Figura 46 C, ambos clones analizados (C1 y C2) expresan los ARNm correspondientes a los genes maestros de pluripotencia con niveles de expresión similares a los detectados en la línea de CMEh, H9. Por el contrario, los fibroblastos humanos que dieron origen a las CMPIs no expresan dichos transcritos.

Debido a que las células reprogramadas se originaron a partir de la inserción de un plásmido lentiviral y que éstas exhiben un perfil de expresión génica muy diferente a la célula de origen consideramos relevante analizar el cariotipo celular para evaluar la posible aparición de rearrreglos cromosómicos.

Como se puede observar en la Figura 46 B, las CMPIs presentaron un cariotipo normal de células humanas, en este caso, masculinas (46,XY).

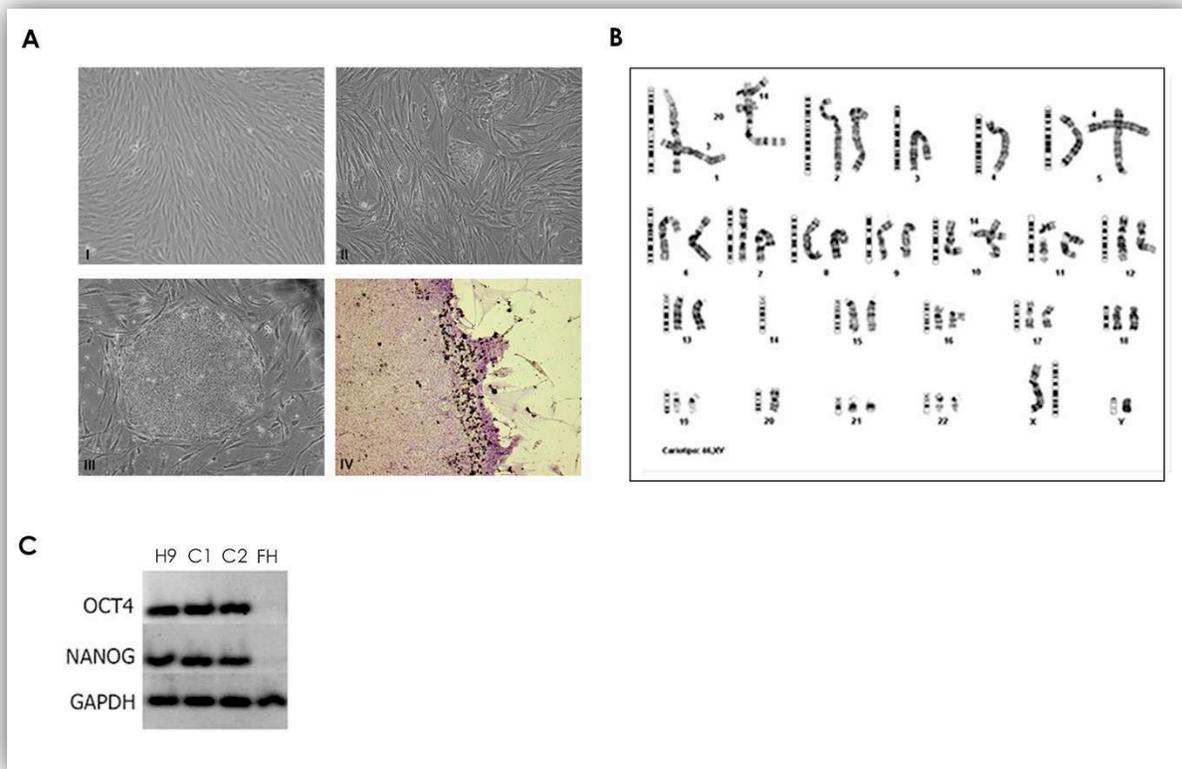


Figura 46. Caracterización de las células reprogramadas. **A.** fotomicrografías representativas de: (I) fibroblastos humanos derivados de prepucio. (II) colonias reprogramadas sobre MEFi 10 días post-infección. (III) colonia de células reprogramadas sobre MEFi luego de 5 pasajes. ⁽¹⁵¹⁾ (IV) Tinción de la actividad de fosfatasa alcalina. **B.** Cariotipo (bandeo G) de las células reprogramadas. **C.** Análisis mediante RT-PCR a punto final de la expresión de ARNm de OCT-4 y Nanog en dos clones de células reprogramadas, la línea de CMEh H9 y fibroblastos humanos (FH).

Posteriormente evaluamos la expresión de proteínas características del estado indiferenciado mediante ensayos de inmunofluorescencia.

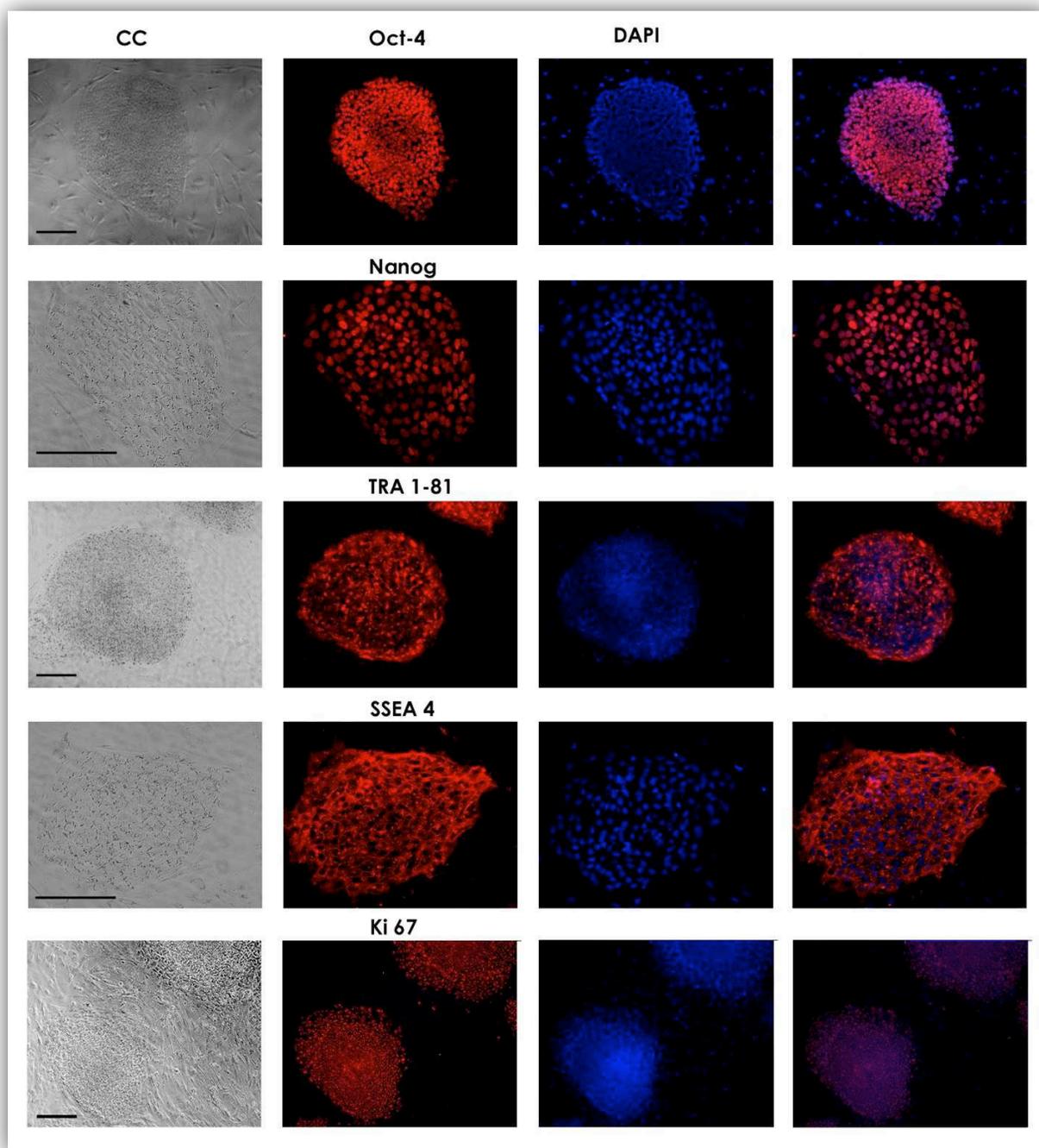


Figura 47. Validación del fenotipo indiferenciado de las células reprogramadas. Fotomicrografías representativas de inmunomarcaciones realizadas empleando anticuerpos primarios específicos contra los marcadores de estado indiferenciado : Oct-4, Nanog, TRA1-81 SSEA-4 y Ki 67. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La barra representa 100 μ m. CC: Campo claro.

Como podemos observar en la Figura 47, las colonias de CMPIs expresan los factores de transcripción característicos del estado indiferenciado OCT-4 y Nanog, así como también las proteínas de superficie TRA1-81 y SSEA 4. Por último observamos que estas células son altamente proliferativas a juzgar por la inmunoreactividad del marcador de proliferación celular Ki67.

En conjunto estos resultados muestran que bajo las condiciones experimentales llevadas a cabo en el laboratorio, las colonias de CMPIs generadas muestran un fenotipo muy similar a las CMEh indiferenciadas, presentando una morfología compacta con bordes bien definidos y una relación núcleo/citoplasma elevada. También, exhiben una alta actividad de fosfatasa alcalina y expresan los marcadores de estado embrionario: TRA1-81, SSEA-4, los factores de transcripción: Oct-4 y Nanog

Validación de la capacidad pluripotente y teratogénica de las CMPIs.

Para validar la capacidad pluripotente de las CMPIs las expusimos al protocolo de diferenciación en presencia de SFB. Al igual que lo observado para las CMEh, a partir del día 8 de la diferenciación fue posible distinguir estructuras características de las tres capas embrionarias. Mediante ensayos de inmunofluorescencia observamos la presencia de células positivas para el marcador de progenitores neurales tempranos, Nestina. Los CE que presentaban áreas con actividad contráctil, característica de células cardíacas, resultaron inmunorreactivos para la α -MHC y la cTnT. Por último, también se observaron zonas con un crecimiento epitelial compacto e inmunorreactivas para la AFP característica del tejido endodérmico (Figura 48).

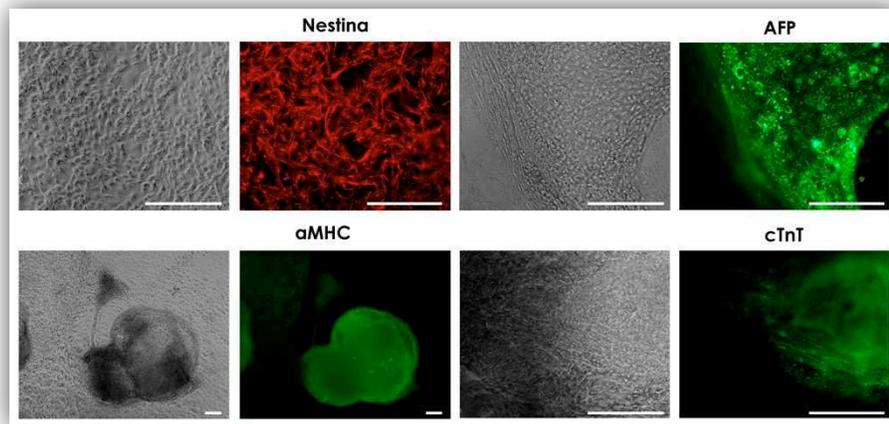


Figura 48. Inmunomarcaciones del marcador de linaje mesodérmico : cTnT,y αMHC; ectodérmico: nestina y endodérmico: AFP en CMPIs; al día 14 del proceso de diferenciación en presencia de SFB. La barra representa 100 μ m.

Por último, comprobamos la capacidad teratogénica de las CMPIs. Para ello ratones inmunosuprimidos fueron inyectados con una suspensión unicelular de CMPIs en Matrigel suplementado con inhibidor de ROCK. Como se puede observa en la figura 49, las CMPIs fueron capaces de generar teratomas *in vivo* los cuales presentaron estructuras características de las tres capas embrionarias.

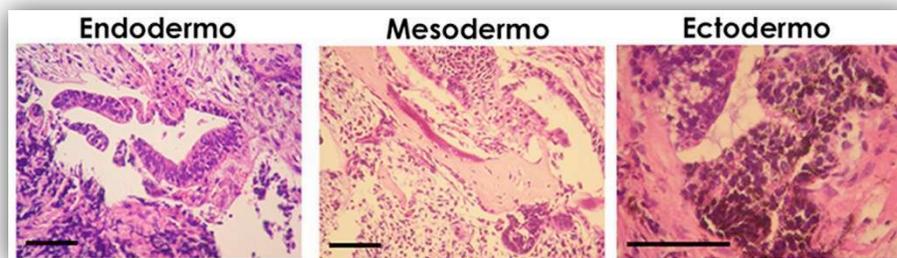


Figura 49. Las CMPIs fueron capaces de generar teratomas en ratones inmunosuprimidos. Al analizar los cortes histológicos de los mismo hallamos estructuras características de las tres capas embrionarias. Endodermo: epitelio columnar pseudoestratificado tipo intestinal. Mesodermo: trabécula ósea rodeada de osteoblastos. Ectodermo: Neuroepitelio melanocítico pigmentado. La barra representa 100 μ M.

Diferenciación cardíaca dirigida de CMPIs.

A continuación decidimos exponer a las células reprogramadas al protocolo dirigido de diferenciación cardíaca. Como podemos observar en la Figura 50, las CMPIs soportaron el método de agregación forzada (A) y se diferenciaron generando áreas contráctiles (B). A continuación, evaluamos mediante ensayos de citometría de flujo el porcentaje de células cardíacas obtenidas luego de 14 días de iniciado el proceso diferenciación.

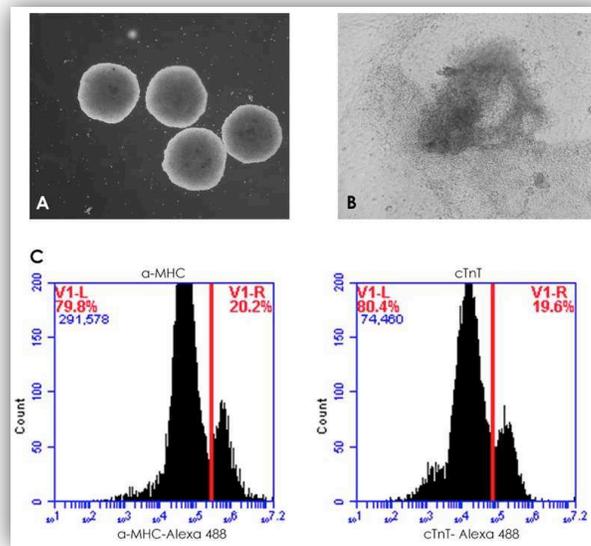


Figura 50. Diferenciación cardíaca dirigida de CMPIs. **A.** Ces a día 1 de la diferenciación. **B.** CE contráctil luego de 14 días de diferenciación. **C.** Histogramas representativos de CEs analizados por citometría de flujo luego de 14 días de diferenciación.

Como se puede observar en la Figura 50 C, se obtuvo aproximadamente un 20% de células que expresan cTnI y α-MHC. Los valores obtenidos fueron similares a los obtenidos con las CMEh.

Luego evaluamos las variaciones en los niveles de expresión de los ARNm característicos del estado indiferenciado y de las tres capas embrionarias mediante RT-PCR en tiempo real. Como se puede observar en la Figura 51, la expresión de los factores de transcripción Oct-4 y Nanog disminuyó

marcadamente conforme avanzó la diferenciación al igual que lo observado para la línea H9 de CMEh.

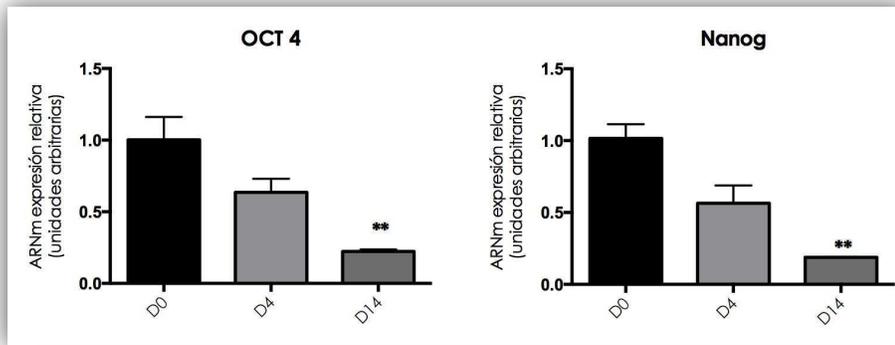


Figura 51. Validación de la diferenciación dirigida de CMEh en medio enriquecido en factores cardiogénicos mediante análisis de RT-PCR en tiempo real de los marcadores Oct-4, Nanog. Los gráficos muestran los niveles de ARNm relativos al día 0 (D0) establecido arbitrariamente como 1. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (** $p < 0,01$ vs D0).

Posteriormente, se determinó el perfil de expresión génica de marcadores mesodérmicos y de linaje cardíaco.

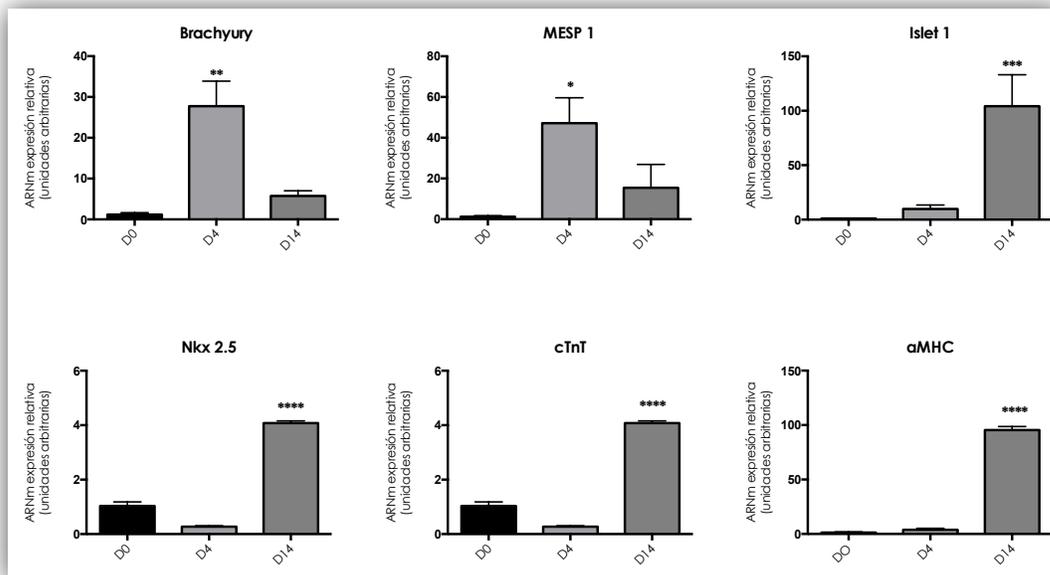


Figura. 52. Validación de la diferenciación dirigida de CMPIs en medio enriquecido en factores cardiogénicos mediante análisis de RT-PCR en tiempo real de los marcadores de mesodermo Brachyury, Mesp-1; y de mesodermo cardíaco Islet-1, α -MHC, Nkx2.5, cTnT. Los gráficos muestran los niveles de ARNm relativos al día 0 (D0) establecido arbitrariamente como 1. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (* $p < 0,05$ vs D0; ** $p < 0,01$ vs D0, *** $p < 0,001$ vs D0; **** $p < 0,0001$ vs D0).

Como se puede observar en la figura 52, los niveles del transcrito de T/Brachyury presentaron el pico de inducción característico al día 4 de la diferenciación. Las células expresaron el marcador Mesp-1 (el cual se indujo aproximadamente 60 veces respecto de los valores detectados para el día 0) cuya expresión ocurrió abajo de T/Brachyury.

En concordancia con lo expuesto anteriormente, luego del pico de inducción de Mesp-1, se observó una marcada y sostenida inducción en los niveles de los transcritos de Islet-1 (100 veces respecto a las células indiferenciadas) y Nkx2.5 (4 veces respecto a las células indiferenciadas.), ambos reguladores de la activación de la red transcripcional cardiogénica. Esta inducción precedió a la expresión de los genes estructurales cardíacos α -MHC (100 veces) y cTnT (4 veces) (Figura 52). Notamos una diferencia respecto a lo observado para las CMEh, ya que si bien la expresión de las proteínas estructurales y factores de transcripción cardíacos fue mayor al día 14, los niveles de inducción resultaron menores que los observado para CMEh

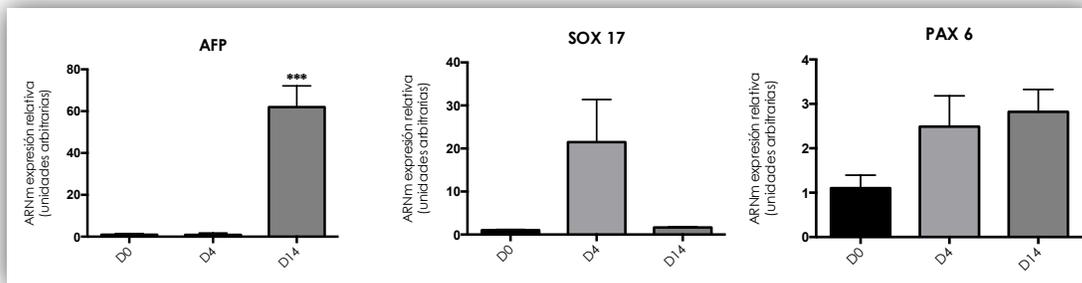


Figura. 53. Validación de la diferenciación dirigida de CMPIs en medio enriquecido en factores cardiogénicos mediante análisis de RT-PCR en tiempo real de los marcadores de endodermo AFP y Sox 17; y de ectodermo PAX6. Los gráficos muestran los niveles de ARNm relativos al día 0 (D0) establecido arbitrariamente como 1. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (***) $p < 0,001$ vs D0).

De manera similar a lo observado en las CMEh, se observó una marcada inducción de AFP, mientras que Sox 17 y el marcador de ectodermo no mostraron cambios significativos (Figura 53).

En conjunto estos resultados indican que las células reprogramadas se diferenciaron exitosamente al linaje cardíaco luego de ser expuestas al protocolo

desarrollado en el laboratorio y por lo tanto constituyen un modelo adecuado para el estudio de la cardiomiogénesis humana *in vitro*.

Caracterización de los componentes de la familia de Interleuquinas tipo IL-6 en CMPIs.

Al igual que lo evaluado para las CMEh, caracterizamos en las CMPIs el perfil de expresión del receptor gp130, de sus co-receptores y de algunas de las citoquinas de la familia de la IL-6 a lo largo de la diferenciación cardíaca dirigida mediante un análisis de RT-PCR en tiempo real (Figura 54)

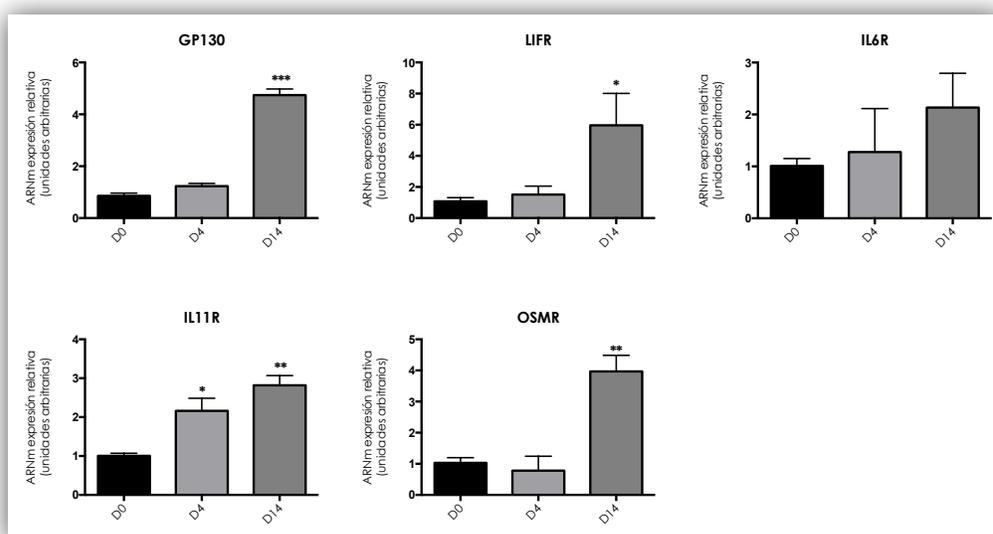


Figura 54. Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de la expresión de ARNm de gp130, de los co-receptores, LIFR, IL-6R, IL-11R, y OSMR.. Las barras representan el promedio ± SEM de tres experimentos independientes (*p<0,05 vs D0; **P<0,01 vs D0; ***P<0,005 vs D0).

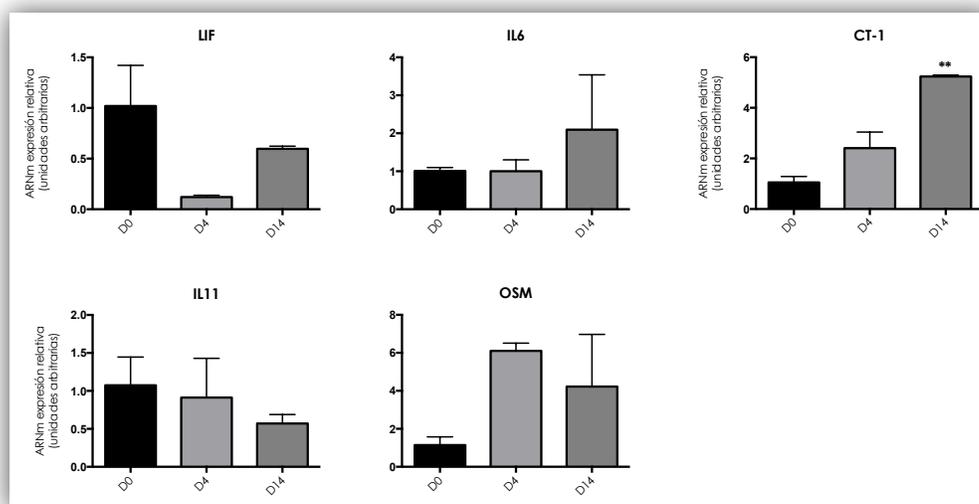


Figura 55. Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de la expresión de ARNm de gp130, de los co-receptores, LIF, IL-6, CT-1, IL-11 y OSMR. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (** $p < 0,01$ vs D0).

Como podemos observar en la Figura 54 los niveles de los ARNm de la mayoría de los receptores analizados aumentaron conforme avanzó la diferenciación. Por el contrario, los niveles de los transcritos de las citoquinas presentaron un perfil de expresión más variado aunque no exhibieron cambios significativos a lo largo de 14 días de iniciada la diferenciación, a excepción de CT-1 (aumentó 5 veces respecto al control). (Figura 55).

Interleuquinas de la familia tipo IL-6 y sus receptores: Perfil de expresión en CMPIs indiferenciadas .

Realizamos ensayos de inmunofluorescencia en colonias de CMPIs indiferenciadas. Como se puede observar en la Figura 56, las células reprogramadas expresan los receptores de LIF, IL-6 y gp130 y la citoquina LIF.

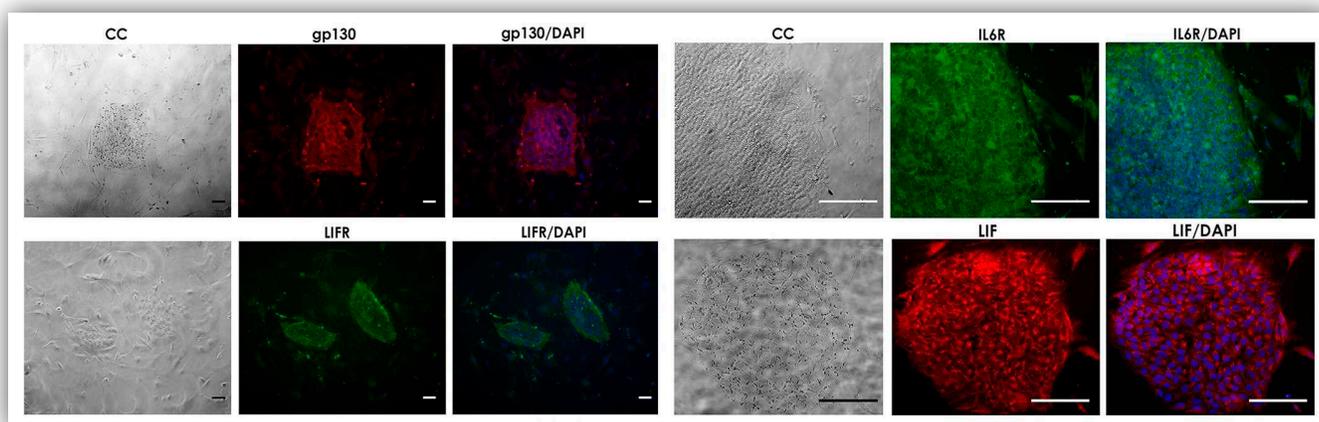


Figura 56. A. Inmunomarcaciones de LIF y de los receptores LIFR, IL6R y gp130 en colonias indiferenciadas de CMPs. La barra representa 100 μ m.

Localización subcelular de STAT3

Por último, evaluamos la funcionalidad de la vía JAK/STAT3, inducida por LIF mediante ensayos de inmunofluorescencia en CMPs indiferenciadas estimuladas con LIF en presencia o ausencia del inhibidor STAT3IC V o del anticuerpo anti-gp130 (Figura 57).

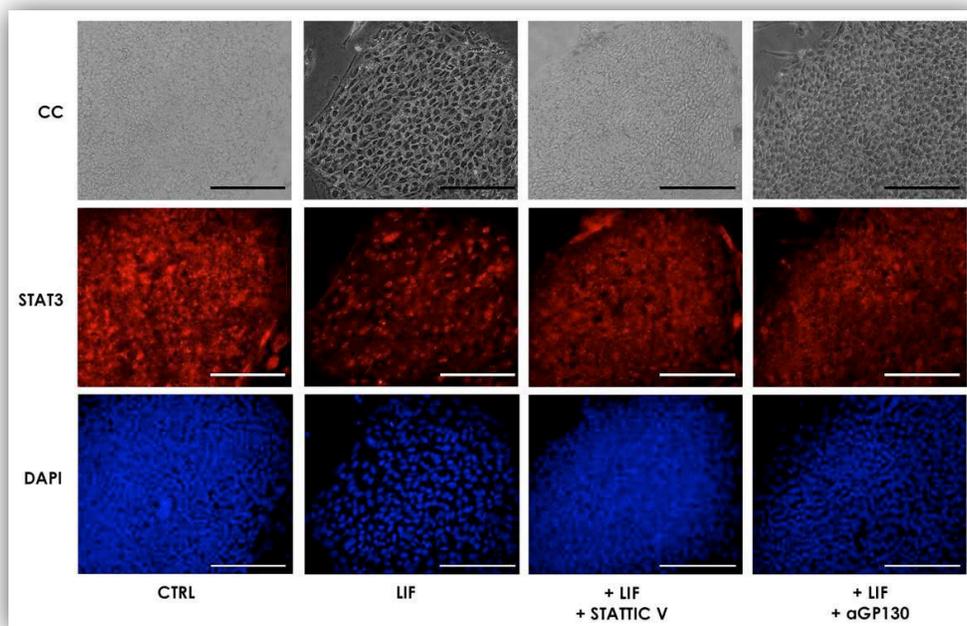


Figura 57. Inmunomarcaciones con el anticuerpo primario específico anti-STAT3 de colonias CMPs crecidas sobre Matrigel no estimuladas (CTRL), estimuladas con LIF (20 ng/ml) (+ LIF), tratadas con el inhibidor STAT3IC V 20 μ M y LIF 20 ng/ml (+STAT3IC V + LIF) y con anti-GP130 0,5 μ g/ml y LIF 20 ng/ml (+aGP130 + LIF). La barra representa 100 μ m

De manera similar a lo observado en CMEh, respondieron a la adición de LIF a juzgar por la relocalización de STAT3 hacia el núcleo (Figura 40, LIF). Esta translocación fue marcadamente inhibida tanto por la presencia de STATIC V como cuando los receptores de gp130 fueron bloqueados por el agregado de anticuerpos α -gp130.

Discusión

Capítulo I : CMEh una promisorio herramienta para la medicina regenerativa.

Las distintas líneas de CMEh presentan una morfología similar, expresan marcadores característicos del estado embrionario (ej: Oct-4, NANOG y SSEA-4) y pueden dar origen a derivados de las tres capas embrionarias *in vitro*, pero el potencial de desarrollo a un linaje específico puede variar entre líneas individuales. La diferenciación hacia un linaje específico puede estar favorecida o restringida por propiedades inherentes de las distintas líneas o inducidas por las condiciones de cultivo ⁽¹⁹⁴⁾. De hecho, las condiciones de cultivo pueden tener un profundo impacto en el perfil molecular que exhiben las CMEh. Se ha reportado que cambios en la composición del medio de cultivo puede modificar la expresión de miles de genes ⁽¹⁹⁵⁾, lo que indica la importancia de mantener las condiciones de cultivo lo mas estable posibles. Si bien a las líneas con las que contamos en el laboratorio se les controla el cariotipo de manera regular (Figura 1) y siempre han presentado un bandeo G normal, existe cuantiosa evidencia que sugiere que el cultivo extendido de las CMEh puede producir cambios mas sutiles en las células como amplificación génica, y metilaciones diferenciales ⁽¹⁹⁶⁾. Considerando lo aquí expuesto en primer lugar adoptamos como rutina en nuestro laboratorio la validación del estado indiferenciado de la línea WA09 (Figura 1).

Desde la derivación de las CMEh en 1998, numerosos grupos han desarrollado protocolos para lograr diferenciar CMEh a CM ^(99, 104, 197-202). Si bien los distintos métodos descritos son efectivos, su eficiencia suele ser variable (generalmente baja) y dependiente del la línea de CMEh utilizada (incluso varía según los subclones utilizados).

En este trabajo hemos logrado optimizar un protocolo de diferenciación cardíaca que nos permitió aumentar significativamente la eficiencia de diferenciación respecto a los valores que obteníamos al utilizar SFB. En relación con lo mencionado previamente, es importante destacar que si bien el protocolo dirigido resultó mas eficiente en la generación de cardiomiocitos, su reproducibilidad estuvo sujeta principalmente a la calidad de los cultivo de CMEh que se utilizaban como material de partida. Generalmente hemos obtenido

mejores resultados cuando se utilizaban CMEh de pasajes bajos (menores a 40) lo que coincide con publicaciones previas ⁽¹⁹⁶⁾ .

La mayoría de los protocolos de diferenciación, incluyen la formación de CEs en suspensión a partir de la disociación mecánica o enzimática de las colonias de CMEh . Esta estrategia resulta en la formación de CEs de tamaño heterogéneo disminuyendo la reproducibilidad y eficiencia de los protocolos ya que se conoce que el tamaño de los CEs influencia la eficiencia de diferenciación cardíaca ^{(91, 195, 203) (204)} . En el protocolo desarrollado en el presente trabajo, utilizar placas de 96 pocillos en forma de V para la formación de los CEs (en vez de formarlos a partir de cultivos en suspensión como el protocolo en SFB) nos permitió controlar el número de células que conformaría cada CE y generar así CEs de tamaño homogéneo. Esto facilita la manipulación de los mismos y permite controlar el número de CE empleado para cada tratamiento. En concordancia con lo reportado por Burridge *et al* ⁽⁹¹⁾ , comprobamos que el número óptimo de células para formar un CE es de 25.000, lo que genera CEs de un tamaño que oscila entre 200 y 300 μ m luego de 3 días en cultivo (Figura 10).

El protocolo dirigido esta basado en el uso de un medio de composición definida y en el agregado secuencial de morfógenos en ventanas temporales acotadas. Esto permite un mayor control del proceso de diferenciación cardíaca, pudiendo delimitar los eventos necesarios para la especificación del tejido cardíaco. Además, al usar este medio logramos no sólo aumentar la cantidad de células cardíacas generadas sino también disminuir la cantidad de tipos celulares que se co-generan durante la diferenciación, restringiéndolos mayoritariamente al linaje mesodérmico. Como se puede observar por el análisis en RT PCR en tiempo real (Figura 13), todos los marcadores de linaje mesodérmico y cardíaco evaluados aumentaron marcadamente y en la mayoría de los casos casi en un orden de magnitud respecto a la diferenciación con SFB. Cabe destacar que bajo este protocolo también se observó una robusta inducción de la expresión de marcadores endodérmicos (Figura 12). Como se menciona previamente en el modelo de diferenciación basado en la formación de CEs se genera una capa de endodermo primitivo que rodea por fuera al CE ^(170, 171) . Existe numerosa evidencia que indica la existencia de una interacción obligatoria entre el endodermo y el

mesodermo durante la especificación y diferenciación terminal de los CM. Es por esto, que si bien el protocolo aquí empleado enriquece la proporción de derivados cardíacos, resulta muy difícil promover la diferenciación a mesodermo sin la presencia de células endodermales ⁽²⁰⁵⁾.

Los CM obtenidos mediante este protocolo presentan propiedades estructurales y funcionales de cardiomiocitos en etapas tempranas del desarrollo. Los mismos se caracterizan por la expresión de los factores de transcripción Nkx 2.5, GATA 4 y GATA6 (Figura 13) así como también la de las proteínas estructurales α -MHC y cTnT (Figura 13, 14 y 15); y responden a la estimulación mediada por norepinefrina indicando que presentan receptores adrenérgicos tipo β 1 funcionales (tabla 1).

LIF en células madre embrionarias.

Una de las principales diferencias que presentan las CMEh con respecto a las CME murinas es la dependencia de estas últimas de la presencia de LIF en el medio de cultivo para el mantenimiento del estado indiferenciado. En las CME murinas la señalización mediada por STAT3 inducida por LIF es la responsable del mantenimiento del estado indiferenciado ^(206, 207). Durante algunos años se creyó que las CMEh no eran capaces de responder al tratamiento con LIF, lo cual resultó ser un concepto erróneo ya que LIFR y gp130 se expresan en las CMEh indiferenciadas (Figura 16) ^(208, 209). En el presente trabajo demostramos no solo la expresión de dichas proteínas sino también la funcionalidad de las vías de señalización JAK/STAT, MAPK/PI3K y MEK/ERK que actúan río abajo de la activación mediada por LIF (Figura 21). A diferencia de lo reportado por Humphrey *et al* y Dahéron *et al*, nosotros si observamos fosforilación de STAT3 en la tirosina 705 en condiciones basales (medio condicionado suplementado con bFGF). Además, observamos que las CMEh cultivadas en medio hES suplementado con bFGF presentan la proteína ERK fosforilada en los residuos treonina 202 y tirosina 204 y la proteína AKT fosforilada en la serina 47. Tanto en los trabajos publicados como en el presente trabajo, la estimulación con LIF fue capaz de aumentar la cantidad de

ERK, AKT y STAT3 fosforiladas. Particularmente, también comprobamos que luego del tratamiento con LIF, STAT3 transloca al núcleo donde ejerce su función transcripcional ⁽²¹⁰⁾ (Figura 22).

LIF y cardiomiogénesis.

Dado que nuestro interés en la señalización mediada por LIF está centrado en la diferenciación cardíaca, evaluamos el perfil de expresión del ARNm de la citoquinas de la familia tipo IL6 y sus receptores a lo largo de la diferenciación (Figura 17 a 20). En concordancia con lo descrito previamente para otras líneas de CMEh, comprobamos que la expresión de los receptores LIFR y gp130 aumenta conforme avanza la diferenciación ^(144, 195) tanto espontánea como dirigida. Sin embargo, la expresión de la citoquina LIF no experimentó diferencias significativas a lo largo de la diferenciación tanto en presencia de suero como en el protocolo dirigido. Este resultado difiere de lo reportado en el trabajo de Aghajanova *et al*, donde demuestran que la expresión de LIF aumenta con la diferenciación en presencia de SFB. Estas discrepancias podrían deberse principalmente a la línea celular utilizada (WA09 en nuestro caso y HS237 en el de ellos) y al tipo de SFB empleado para las diferenciaciones ya que la diferente composición del suero y la variabilidad entre lotes probablemente altere los perfiles de expresión de las células en cultivo.

Las citoquinas de la familia de la IL-6 exhiben un amplio rango de funciones biológicas sobre los CM. Se sabe que frente a estímulos de estrés los CM presentes en el corazón son capaces de producir LIF, CT-1 e IL-6 ⁽²¹¹⁻²¹³⁾. Durante la última década ha surgido evidencia del rol beneficioso de LIF, previniendo el daño cardíaco y facilitando la reparación del miocardio, en el modelo de isquemia/reperfusión. LIF mediante efectos autócrinos/parácrinos mediaría las respuestas a corto y largo plazo, previniendo la muerte de los CM por apoptosis y estimulando el crecimiento hipertrófico.

De las citoquinas tipo IL-6 que señalizan a través de gp130, solamente CT-1 y LIF han presentado la capacidad de promover el crecimiento y la supervivencia

de los CM neonatales ventriculares murinos *in vitro* ⁽¹⁷⁶⁾. Existen trabajos que demuestran que en el corazón embrionario murino, justo previo al cese de las divisiones mitóticas de los cardiomiocitos, LIF se expresa en niveles muy elevados en miocardio neonatal y en cultivos primarios de CM neonatales murinos ⁽²¹⁴⁾. En un modelo de diferenciación *in vitro* de CME murinas a CM el agregado de LIF ha demostrado tener un rol beneficioso en la supervivencia y proliferación una vez adquirido el compromiso cardíaco ⁽²¹⁴⁾.

En el presente trabajo reportamos por primera vez que LIF se expresa durante el desarrollo cardíaco humano. Como se puede observar mediante tinción de los cortes histológicos con anticuerpos específicos (Figura 23 a 27), LIF se expresa en el miocardio tanto en la región auricular como ventricular en las semanas 8 a 15. Si bien existen reportes que demuestran la expresión de LIF en células endoteliales en otros tejidos ^(215, 216), en las muestras aquí analizadas tanto el epicardio como el endocardio resultaron negativos para la expresión de LIF en las semanas analizadas. Durante la semana 17 del desarrollo, observamos que la expresión de LIF se reduce solo a la región auricular cercana a la zona de los grandes vasos. En esta semana el desarrollo gp130 presenta una amplia expresión en todo el tejido incluyendo las células endoteliales. En el sistema de diferenciación *in vitro* basado en la formación de CEs, también observamos por tinción de cortes histológicos la expresión de la citoquina LIF como de gp130, STAT3 y las proteínas cardíacas cTnT y α MHC (Figura 28). Estas tinciones de algún modo nos permitieron validar nuestro modelo y corroborar que logramos recapitular fielmente, en parte, lo eventos que ocurren durante la cardiomiogénesis humana.

Se conoce que la expresión de LIF en el miocardio del corazón adulto provee un mecanismo autócrino/parácrino de señalización que sería el responsable de integrar las respuestas a estímulos de estrés en el corazón. Sin embargo, aun no está claro si LIF (o alguna otra citoquina de la familia) posee una participación relevante en la diferenciación, crecimiento y supervivencia de los miocitos cardíacos durante el desarrollo embrionario.

En el modelo de diferenciación *in vitro* aquí presentado, observamos que LIF es producido y liberado al medio tanto por los CM como por las células que se co-generan con ellos (Figura 31). Células con un perfil tipo mesenquimal/fibroblasto

que se ubican rodeando las áreas contráctiles serían las responsables de liberar mayoritariamente LIF al medio de cultivo. De manera coincidente con este resultado, está reportado que LIF se expresa en varios de los tipos celulares que residen en el tejido cardíaco como CM y fibroblastos ^(151, 217). Creemos que LIF liberado al medio por estas células, estaría actuando de manera parácrina sobre las áreas contráctiles.

Durante el desarrollo del corazón embrionario, las distintas poblaciones celulares se encuentran muy próximas unas a otras, creando un microambiente donde las células interactúan y reciben distintos estímulos. En el modelo de diferenciación *in vitro*, estos microambientes están recreados parcialmente por la formación de CEs. Sin embargo el método de cultivo utilizado involucra el uso de grandes volúmenes de medio de cultivo comparado con los volúmenes fisiológicos y es posible que esta característica afecte negativamente la señalización e interacción de las células entre sí y con su entorno. Es por esto que, a pesar de haber demostrado que LIF es producido durante la diferenciación dirigida, decidimos evaluar su participación en el proceso de diferenciación cardíaca mediante el agregado exógeno de LIF. En el presente trabajo, comprobamos que el agregado de LIF a partir el día 8 de la diferenciación cardíaca, ejerce un efecto citoprotector sobre los CM (Figura 32), mediante la disminución de los niveles de apoptosis (Figura 34 y 38) y el aumento de la viabilidad celular (Figura 37) sin alterar la tasa de proliferación celular (Figura 33). Por medio de ensayos de PCR en tiempo real y western blot establecimos que la presencia de LIF en el medio de cultivo, reduce los niveles del transcritto y de la proteína pro-apoptótica BAX sin alterar los niveles del transcritto del factor anti-apoptótico Bcl-xL (Figura 39). Este resultado llamó nuestra atención ya que está reportado que Bcl-xL es uno de los blancos más importantes de las proteínas STATs para ejercer su efecto citoprotector en cardiomiocitos neonatales murinos ⁽²¹⁸⁾. Estas diferencias podrían deberse al menos en parte, a que las células analizadas corresponden a células murinas atravesando distintos estadios del desarrollo que los analizados en este trabajo. Finalmente, observamos que el efecto mediado por LIF es revertido mediante el uso de inhibidores específicos de la vía de señalización

LIF/gp130/STAT3. Mediante el uso del inhibidor específico STATTIC V, logramos determinar que la señalización mediada por STAT3 participaría en la regulación de la apoptosis (figura 40 y 41).

Estos resultados coinciden con reportes previos donde se demostró que mecanismos moleculares río abajo de la señalización mediada por gp130, principalmente la vía JAK/STAT, ejercen un efecto citoprotector en células cardíacas ^(182, 218). Estudios realizados en ratones deficientes en STAT3 en los cardiomiocitos demuestran que esta proteína provee protección en respuesta a injurias, participando de la preservación de la función ventricular, la densidad capilar, reduciendo los niveles de apoptosis y limitando el tamaño de la zona infartada en modelos de pre-condicionamiento isquémico ⁽¹³⁶⁾. Ratones deficientes en STAT3 en el tejido cardíaco presentan mayor grado de apoptosis de los CM, resultando en una mayor zona infartada y en consecuencia una función cardíaca disminuida ⁽¹⁸²⁾.

Mediante lo aquí expuesto nosotros postulamos que LIF durante la formación del corazón estaría previniendo la muerte celular por apoptosis, asegurando de esta manera la correcta formación del tejido cardíaco. Acorde con estos resultados, Bader y sus colaboradores ⁽²¹⁴⁾, propusieron que LIF contribuye, junto con numerosos factores, a la correcta formación y mantenimiento del corazón murino; y que la presencia de LIF en el miocardio durante el desarrollo modularía la cardiomiogénesis controlando el mantenimiento del estado diferenciado de los CM .

Teniendo en cuenta la restricción de su expresión a la zona auricular una vez formado el corazón (cerca de la desembocadura de los grandes vasos), es concebible pensar que LIF podría ejercer un rol en la protección de las células madre cardíacas que anidan en regiones cercanas al nodo sinusal situado en la zona postero-lateral superior de la aurícula derecha ⁽²¹⁹⁾.

Especificación del mesodermo y LIF.

Se ha demostrado que durante la gastrulación de embriones murinos la expresión de LIF es prácticamente nula y que la sobreexpresión de LIF durante esta etapa, inhibe la especificación del mesodermo *in vivo* ⁽²²⁰⁾. En concordancia con estos resultados, en el presente trabajo hemos demostrado que la presencia de LIF en etapas tempranas de la diferenciación cardíaca, disminuye la cantidad de progenitores mesodérmicos tempranos generados y en consecuencia afecta negativamente la diferenciación cardíaca (Figura 42). La presencia de LIF en el medio de cultivo redujo la formación de progenitores mesodérmicos tempranos en casi un 50% (Figura 45). Basándonos en estos resultados, creemos que LIF estaría inhibiendo la TEM necesaria para la generación del mesodermo.

Conclusión

En conjunto todos estos resultados indican que durante la cardiomiogénesis LIF ejercería efectos opuestos dependiendo de la ventana temporal en la que actúe. Por un lado, la presencia de LIF en etapas tempranas de la diferenciación inhibiría la especificación a mesodermo, obstaculizando la adquisición del fenotipo cardíaco. Por el otro, si LIF está presente una vez que el fenotipo cardíaco ya ha sido adquirido, la misma promovería la supervivencia de los CM.

Capítulo II: Células Madre Pluripotentes Inducidas.

Durante los últimos 15 años el interés en la medicina regenerativa a crecido enormemente. Numerosas estrategias se han empleado con el fin de encontrar o generar el tipo celular mas adecuado para ser usado en aplicaciones clínicas dentro de las cuales se incluyen la identificación y diferenciación de progenitores embrionarios y adultos o la diferenciación específica a distintos tipos celulares a partir de CMEh. La aparición de las CMPIs , abrió la posibilidad al desarrollo de células paciente-específicas marcando un nuevo punto de inflexión en el campo

de las terapias regenerativas, haciendo que el tratamiento de enfermedades degenerativas, mediante terapias de reemplazo celular, dejen de ser una utopía y comiencen a ser pensadas como una posibilidad concreta. Vale aclarar que el campo de la medicina cardiovascular aun se encuentra lejos de aplicar este tipo de tecnología clínicamente.

La generación de CMPIs a partir de pacientes con enfermedades cardíacas hereditarias, ha proporcionando un modelo sin precedentes para el estudio de dichas enfermedades (72, 73). La generación de este tipo de células resulta particularmente interesante para la industria farmacéutica ya que permitiría el desarrollo de nuevas drogas cardioprotectoras y la evaluación de la posible cardiotoxicidad de las mismas. En ese aspecto, uno de los trabajos mas resonantes de los últimos años fue el presentado por Moretti *et al* (71), en el cual lograron generar cardiomiocitos a partir de la reprogramación de fibroblastos provenientes de pacientes con el síndrome de QT largo. Las células cardíacas generadas de esta forma lograron recapitular las propiedades electrofisiológicas de dicho desorden que se caracteriza entre otras cosas, por presentar potenciales de acción de mayor duración.

En el presente trabajo de Tesis hemos generado CMPIs en nuestro laboratorio a partir de fibroblastos dérmicos humanos (Figura 46). Las CMPIs obtenidas expresan marcadores embrionarios, tienen la capacidad de dar origen a derivados de las tres capas germinales y presentan capacidad teratogénica (Figura 47, 48 y 49). Al ser sometidas al protocolo de diferenciación dirigida, las CMPIs adquirieron un fenotipo cardíaco a juzgar por la aparición de áreas contráctiles y expresión de marcadores característicos de este linaje (Figura 50 a 53).

Un aspecto interesante a discutir respecto a las CMPIs es su equivalencia con las CME. Estudios pioneros en el área describieron la existencia de una amplia similitud entre ambos tipos celulares; sin embargo, a partir del año 2009 comenzaron a reportarse ciertas diferencias entre CMPIs y CMEh. A partir del análisis de datos provenientes de ensayos de microarreglos realizados comparando líneas de CME y CMPIs, se determinó la presencia de una expresión

diferencial de cientos de genes ⁽²²¹⁾; concluyendo que cada línea de CMPIs debería ser considerada como un subtipo único de células pluripotentes.

Posteriormente, otros estudios compararon la expresión génica global entre las CMEh y las CMPIs e identificaron en éstas últimas una expresión génica y patrón de metilación altamente relacionada con la de las células que le dieron origen ^(222, 223). Estudios recientes reportaron la conservación de la “memoria epigenética” de las células de origen en las CMPIs derivadas ^(224, 225). Contrariamente, otros trabajos han concluido que es difícil distinguir las CMPIs de las CME en base a su expresión génica o a sus patrones de metilación del ADN ^(226, 227). De hecho, estos autores encontraron que algunos clones de CMPIs resultan indistinguibles de las CME. Unas de las posibles causas de estas controversias pueden ser atribuidas entre otras, a los métodos de transferencia génica, el tipo celular reprogramado, a las combinación de factores de transcripción empleada en la reprogramación, su de expresión y la estequiometría de los mismos y por último a las condiciones de cultivo empleadas durante la derivación ⁽⁶¹⁾.

Es por esto que debemos ser cautos en los resultados obtenidos a partir de CMPIs ya que lo concluido para una línea en particular no necesariamente es valido para otras. Esto resulta de suma importancia a la hora de considerar su aplicación en terapias regenerativas.

Conclusión.

En el presente trabajo de Tesis hemos logrado reprogramar exitosamente fibroblastos dérmicos a CMPIs y diferenciarlas a CM. Las células así generadas resultaron muy similares a las CMEh al menos en sus perfiles de expresión génica y en su respuesta a morfógenos cardiogénicos

Materiales y Métodos

Células utilizadas

Para la realización del presente trabajo se utilizaron líneas de fibroblastos humanos derivados de prepucio (FH), fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, del inglés, murine embryonic fibroblast), la línea de CMEh, WA09 (H9) adquirida del Instituto WiCell de la Universidad de Wisconsin y la línea HUES-5 adquirida en la universidad de Harvard.

Derivación de MEF

Ratones hembras en día 12 o 13 de preñez de la cepa CF1 fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Con el objetivo de obtener los embriones de ratón, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical. En cabina de flujo vertical se procedió a limpiar el abdomen con etanol 70 % v/v, se abrió la cavidad peritoneal y se removieron los cuernos uterinos que contienen a los embriones. Los cuernos uterinos fueron colocados en una placa de Petri y lavados 3 veces con PBS (del inglés phosphate buffered saline) (NaCl 8 mg, KCl 200 mg, KH₂PO₄ 200 mg y Na₂HPO₄ 1,14 mg, por litro de solución, pH 7,4) con el objetivo de remover la sangre. Posteriormente, se separaron los embriones de las placentas y de sus membranas fetales y una vez libres de deciduas se colocaron en otra placa de Petri, lavando nuevamente 3 veces con PBS. Bajo lupa estereoscópica los embriones fueron decapitados y eviscerados. El remanente se colocó en una nueva placa de Petri y se lavó 2 veces con PBS. Los cuerpos de los embriones fueron homogeneizados mecánicamente utilizando hojas de bisturí; luego se agregó Tripsina/EDTA (0,25% v/v Tripsina 0,5mg/ml (Invitrogen) en PBS + 0,53 mM EDTA) y se continuó el tratamiento mecánico de los mismos hasta disgregar completamente el tejido. Se agregaron 5 ml de Tripsina/EDTA a la placa y se incubaron los preparados durante 30 minutos a 37° C. Luego se colocaron los embriones procesados en un tubo cónico de 50 ml y se agregaron aproximadamente 30 ml de medio DMEM (del inglés, Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco) suplementado con aminoácidos no esenciales (2mM

concentración final) (Gibco), 50 U/ml Penicilina/Estreptomicina (P/E) (Gibco) y 200 μ M L-Glutamina (Gibco). A este medio se le agregó además 10% v/v SFB (Gibco). Se dejó decantar la preparación recuperando luego el sobrenadante, el cual contiene los MEF. El volumen obtenido de sobrenadante se dividió en X botellas de cultivo T75 ($X = \text{Número de Embriones Obtenidos}/3$), completando el volumen de las mismas a 20 ml con DMEM 10% SFB. Esta siembra de células fue considerada pasaje cero. Se mantuvieron las botellas T75 durante 2 ó 3 días en incubadora a 37° C y atmósfera al 5% CO₂. Luego de que los fibroblastos alcanzaron un 100% de confluencia se procedió a su amplificación o a su criopreservación.

Cultivo y criopreservación de MEF

Los MEF se cultivaron en medio DMEM con suplementos y con 10% v/v SFB. Para una botella de cultivo T75: se aspiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con 5 ml PBS. Se agregó 1 ml de Tripsina/EDTA, y luego de que las células fueron desprendidas completamente de la superficie, se agregaron 4 ml de medio DMEM con 10% v/v SFB para inactivar la acción enzimática de la tripsina. Luego se transfirió la suspensión celular a un tubo cónico de 50 ml. Se repitió este paso, lavando las paredes de la botella con 5 ml adicionales. Se centrifugó durante 5 minutos a 200 x g. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 6 ml de medio. Se transfirieron 2 ml de la suspensión de MEF a cada una de las 3 botellas T75 y se llevó a un volumen final de 10 ml con medio. Se mantuvieron los cultivos celulares 2 ó 3 días en incubadora a 37° C y atmósfera al 5% CO₂. Las células fueron pasadas al alcanzar el 100% de confluencia. Para evitar los procesos biológicos asociados a la senescencia replicativa las células no fueron amplificadas por más de 3 pasajes.

Para la criopreservación de los MEF, la suspensión celular obtenida luego de desprender a las células con Tripsina/EDTA, fue transferida a un tubo cónico con 9 ml de DMEM. Luego se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 1ml de DMEM suplementado con 20% v/v SFB y 10% v/v dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich). El medio de

criopreservación fue agregado a las células de forma lenta y mezclando suavemente. La suspensión celular fue fraccionada a razón de 1ml por criotubo (Corning). Éstos fueron guardados rápidamente en un contenedor para congelamiento con isopropanol por 24 horas a -80°C , lo que permite un descenso controlado de la temperatura a razón de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Finalmente se los almacenó en un tanque de nitrógeno líquido. Para descongelar las células, los viales fueron removidos del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente calentados a 37°C en un baño térmico hasta observarse líquido dentro del tubo. Inmediatamente se transfirió el contenido de cada criotubo a un a un tubo cónico con 10 ml de DMEM con suplementos y con 20% v/v SFB. Se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a $200 \times g$, se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml de DMEM con suplementos y con 20% v/v SFB, y se sembró la células en una botella correspondiente.

Irradiación de MEF

Los MEF irradiados (MEFi) se utilizan como capa nutricia (o feeder layer por su denominación en inglés) capaz de mantener a las CMEh en estado indiferenciado. La irradiación de estas células permite inactivarlas mitóticamente sin afectar su viabilidad. Esto es importante para el manejo de los co-cultivos con las CMEh.

Para una botella T75: Se aspiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se agregó 1 ml de Tripsina/EDTA. Las células disociadas fueron transferidas a un tubo cónico con 9 ml de medio DMEM 10% v/v SFB. La suspensión celular se homogeneizó con pipeta para evitar la presencia de agregados celulares. Posteriormente las células fueron irradiadas con 40-80 Gy por el servicio ofrecido por la empresa CEBIRSA S.A. (Centro de Irradiación, Fitz Roy 2455, Ciudad de Buenos Aires, Argentina). La suspensión con MEFi se centrifugó a $200 \times g$ durante 5 minutos y el pellet celular se resuspendió en DMEM con suplementos y con 10% v/v SFB en un volumen final tal que permita transferir $1,0 \times 10^6$ células/placa de cultivo adherente de 100 mm de diámetro (Corning), previamente tratadas durante al menos 1 hora con una solución estéril de gelatina bovina (0,1% v/v en PBS)

(Sigma). Las placas sembradas fueron colocadas sobre un agitador mecánico durante 5 minutos para lograr una distribución uniforme de las células y luego se colocaron en incubadora a 37° C y 5% CO₂.

Co-Cultivo de CMEh sobre MEFi

Las CMEh fueron mantenidas en estado indiferenciado cultivándolas sobre una capa nutricia de MEFi, en medio hES. (DMEM/F12 (Gibco) suplementado con 20% Knock Out Serum Replacement (KSR) (Gibco) aminoácidos no esenciales (2mM concentración final), L-glutamina (2mM concentración final), 50 U/ml P/E, β - Mercaptoetanol 55mM (Gibco) y 4ng/ml bFGF (Invitrogen). El medio de cultivo fue renovado cada 24hs.

Los pasajes de las CMEh se realizaron cuando las colonias, observadas al microscopio con un aumento de 100X, alcanzaban aproximadamente el tamaño de un campo. Para ello, las células se lavaron con PBS y luego se incubaron durante 20 minutos con 1ml de una solución 1 mg/ml de Colagenasa Tipo IV (Gibco); al confirmar bajo el microscopio la separación parcial de las colonias de la capa nutricia se diluyó la enzima agregando 5 ml de medio hES. Para desprender completamente las colonias se utilizó una espátula plástica estéril. Luego se transfirió la suspensión celular a un tubo cónico de 15 ml y se lo centrifugó durante 5 minutos a 200 x g, se eliminó el sobrenadante, se agregó medio HES y se resuspendió suavemente de manera que las colonias se fragmentaran.

Criopreservación de CMEh

Luego de desprender las colonias de CMEh como se describió en el inciso anterior, las células fueron resuspendidas en medio de criopreservación: hES suplementado con 20% v/v SFB y 10% v/v DMSO. Para descongelarlas se procedió como en el caso de MEF, se resuspendió el pellet final en medio hES y se transfirió las colonias a una placa de cultivo de 100 mm de diámetro, previamente tratada con gelatina bovina y sembrada con la capa nutricia de MEFi.

Ensayo de actividad de Fosfatasa Alcalina

Para corroborar el estado indiferenciado de las CMEh se realizaron ensayos de actividad de la fosfatasa alcalina (FA), la cual disminuye conforme las CMEh se diferencian.

Se utilizó el kit de actividad de la FA (Sigma). En primera instancia se realizó una solución conteniendo Fast Red Violet, Naftol y H₂O, en proporción 2:1:1, que vira a un color rojo violáceo en presencia de FA activa. Se dejó incubar la solución sobre una placa conteniendo CMEh durante 15 minutos y al cabo de este tiempo se lavó tres veces con PBS y se procedió a fotografiar los resultados utilizando un microscopio invertido con una cámara digital asociada (Nikon eclipse TE 2000-S) .

Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se extrajo de las células utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Las células a controlar fueron cosechadas removiendo el medio de cultivo, agregando 500ul de PBS y levantándolas de la placa con una espátula plástica. Las muestras fueron transferidas luego a un tubo de 1,5 ml. Se centrifugó a 14000 x g durante 10 segundos y se realizó un lavado con PBS. Finalmente las células fueron resuspendidas en 600 µl de Solución de Lisis Nuclear, mezclando con pipeta automática. Luego se agregaron 3 µl de Solución ARNasa al lisado y se mezcló nuevamente con pipeta automática. Se incubó a 37°C durante 30 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 200 µl de Solución de Precipitación de Proteínas, mezclando en vórtex. Se dejó enfriar en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 14000 x g durante 4 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo conteniendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló suavemente por inversión, se centrifugó a 14000 x g durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante, agregando luego 600 µl de etanol 70% v/v a temperatura ambiente. Se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 14000 x g durante 1 minuto. Se removió

el sobrenadante y se dejó secar el pellet al aire a temperatura ambiente por 30 minutos. Al cabo de este tiempo se rehidrató el ADN en 100 µl de Solución de Rehidratación de ADN, incubando 1 hora a 65°C.

DetECCIÓN DE MICOPLASMA

Semanalmente se controló que todas las líneas celulares y cultivos primarios utilizados se encuentren libres de *Mycoplasma* sp. Para ello se realizó la extracción del ADN genómico de las células a analizar, seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando oligonucleótidos específicos (*primers*) que hibridan con secuencias presentes en el genoma de distintas especies del género *Mycoplasma* (*Mycoplasma hominis*; *Mycoplasma orale*; *Mycoplasma salivarium* y *Mycoplasma pneumoniae*).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl. Se colocaron los siguientes componentes por tubo de PCR: 2,5 µl de Buffer de PCR (Tris-HCl 200mM [pH 8.4], KCl 500mM), 1 µl de MgCl₂ 50mM, 0,5 µl de una mezcla de los 4 deoxi-nucleótidos trifosfato (dNTPs) 10mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Invitrogen), 2,5 µl de oligonucleótido sentido (*primer forward*) 20µM, 2.5 µl de oligonucleótido anti-sentido (*primer reverse*) 20µM, 0,2 µl de la ADN polimerasa PlatinumTaq DNA Polimerasa 5U/µl (Invitrogen) y 2 µl de ADN genómico, y completando el volumen a 25 µl con agua libre de DNAsas. Las secuencia de los *primers* degenerados para la detección de *Mycoplasma* se detallan a continuación:

Sentido : 5'-ACACCATGGGAGYTGGTAAT-3'

Anti-sentido :5'- CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT-3'

El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 5 minutos a 94°C.
2. Desnaturalización del ADN molde: 30 segundos a 94 °C
3. Apareamiento: 30 segundos a 55 °C
4. Extensión: 40 segundos a 72 °C
5. Extensión Final: 5 minutos a 72 °C

6. Los pasos 2 a 4 se realizaron 35 ciclos

Al finalizar las reacciones de PCR, los productos de la amplificación fueron sometido a una corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% m/v en buffer TAE 1X (Tris-acético 0,04 M, EDTA 1mM) a 100V por 35 minutos. Cada muestra contenía 25 μ l del producto de la reacción de PCR y 5 μ l de buffer de carga 10X Orange G (para 50 ml: 30% v/v glicerol, 100 μ M EDTA, 10% v/v SDS y 2mg/ml Orange G). En el gel se sembraron además los productos de amplificación de las muestras de ADN correspondiente a las distintas especies de *Mycoplasma*, provistas por el Kit (controles positivos). Finalmente, el gel fue teñido en una solución 0,5 μ g/ml de Bromuro de Etidio durante 30 minutos en oscuridad, visualizado y fotografiado en un transiluminador con luz UV Fotodyne Modelo 602107CE acoplado a una PC, controlado por el software Foto/Analyst PC Image v5.00. Se observó la presencia o ausencia de bandas correspondientes a genes de *Mycoplasma* sp en las muestras analizadas.

Preparación de ARN total

Para preparar ARN total se partió de células crecidas hasta confluencia, a excepción de los fibroblastos humanos derivados de prepucio, los cuales fueron cultivadas siempre sub-confluentes. La extracción del ARN se llevó a cabo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, las células fueron colectadas en Trizol, y luego de extraer con cloroformo (Merck), se precipitó el ARN con isopropanol (Merck), se lavó con etanol 75% y se resuspendió en agua deionizada libre de ribonucleasas. La concentración del ARN aislado (ng de ARN/ μ l de solución) se determinó utilizando un espectrofotómetro automático NanoDrop 1000 controlado por el software ND-1000. Se verificó también que la relación OD₂₆₀/OD₂₈₀ fuese de entre 1,7 y 2 para asegurar una elevada pureza del ARN total obtenido.

Retrotranscripción

Para efectuar la transcripción reversa se utilizaron 500ng de ARN total, 10 ng/ml de oligonucleótidos al azar (*random primers*) (Invitrogen), dNTPs 1mM y 200U de la enzima MMLV (Promega). Se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, la preparación (sin la enzima) fue llevada a 65°C durante 5 minutos en la termocicladora para lograr la desnaturalización del ARN. Luego, para evitar la renaturalización, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo durante al menos un minuto. Finalmente, en cada tubo se agregaron 5 μ l de la mezcla conteniendo la enzima MMLV en su buffer correspondiente y se colocó nuevamente en la termocicladora bajo el siguiente programa: 60 minutos a 37°C para que ocurra la retrotranscripción y 15 minutos a 70 °C con el fin de inactivar a la enzima. Finalmente, almacenadas a -20°C hasta su utilización.

PCR

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l. Se colocaron los siguientes componentes por tubo de PCR: 2,5 μ l de Buffer de PCR (Tris-HCl 200mM [pH 8.4], KCl 500mM), 1 μ l de MgCl₂ 50mM, 0,5 μ l de una mezcla de los 4 deoxi-nucleótidos trifosfato (dNTPs) 10mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Invitrogen), 2,5 μ l de oligonucleótido sentido (primer forward) 20 μ M, 2.5 μ l de oligonucleótido anti-sentido (primer reverse) 20 μ M, 0,2 μ l de la ADN polimerasa PlatinumTaq DNA Polimerasa 5U/ μ l (Invitrogen) y 2 μ l de ADN copia, y completando el volumen a 25 μ l con agua libre de DNAsas.

El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 5 minutos a 94°C.
2. Desnaturalización del ADN molde: 30 segundos a 94 °C
3. Apareamiento: 30 segundos a 55 °C
4. Extensión: 40 segundos a 72 °C
5. Extensión Final: 5 minutos a 72 °C

6. Los pasos 2 a 4 se realizaron 35 ciclos

RT-PCR en tiempo real

Los pares de oligonucleótidos específicos utilizados en este trabajo fueron diseñados con el programa Beacon Designer (Premier Biosoft internacional), definiendo como T_m para los mismos una temperatura de 60° C. Para evitar la amplificación espuria de posible ADN geonómico contaminante en las muestras, los *primers* fueron diseñados de manera tal que cada miembro del par sentido y anti-sentido hibridara en un exón diferente del gen blanco. En los casos en los que esto no fue posible, luego de la extracción de ARN se incluyó un paso de digestión de ADN, incubando las muestras con ADNasa 1 durante 30 minutos a 37°C. Los *primers* fueron sintetizados por el servicio de la empresa Invitrogen. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se indican en la tabla 1.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20µl. Se colocaron los siguientes reactivos por tubo de PCR: 10µl de SYBR-Green master mix (Invitrogen); 0,4µl de ROX (Invitrogen); 3,6µl de primer sentido (5µM); 3,6µl de primer anti-sentido (5µM); 0,4µl de H₂O y 2µl de ADNc. Se utilizó el termociclador Step One Plus (Applied Biosystems). Cada muestra a analizar fue determinada por triplicado. En todos los casos el programa utilizado fue el siguiente:

Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa:

1. 10 minutos a 94°C.
2. Apareamiento y extensión: 30 segundos a 60 °C
3. Desnaturalización: 40 segundos a 94 °C.
4. 40 segundos a 58 °C
5. 40 segundos a 72 °C

Los pasos 2 a 5 se repitieron por 40 ciclos. La lectura de la fluorescencia fue realizada al finalizar el paso 5 de cada ciclo.

Para cada uno de los ADNc analizados se realizaron curvas de temperatura de apareamiento para verificar la presencia de un único producto de amplificación. Esto fue confirmado al sembrar los productos de la reacción en geles de agarosa

(2%) teñidos con bromuro de etidio, evidenciando una única banda.

Para el análisis de los datos se utilizó el método del $\Delta\Delta Ct$.

Preparación de plásmidos – Transformación de bacterias competentes

Con 100 ng de cada plásmido a amplificar, se transformaron bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5 α mediante shock térmico a 42°C durante 90 segundos. A continuación se incubó en medio LB líquido (10g/L de Peptona de Caseína, 5g/L de extracto de Levadura, 10 g/L de cloruro de Sodio), sin antibiótico, a 37°C durante 30 minutos en agitación permanente. Las bacterias se plaquearon en placas de Petri, conteniendo agar-LB (LB + 15 g/L de agar) con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$, y se dejaron en estufa a 37°C durante 16 horas. Posteriormente se picaron algunas colonias y se realizaron mini cultivos en LB-Ampicilina a 37°C durante 16 horas, en agitación permanente.

Maxi-Preparación de plásmidos

Los mini cultivos obtenidos fueron crecidos durante 24 horas en 400 ml de medio TB (5,33 g de Peptona; 10,7 g de extracto de lavadura; 0,4% Glicerol; 1,03 g KH₂PO₄; 5,57 g K₂HPO₄) con 100 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina (Bagó). Se centrifugaron las bacterias 15 minutos a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las bacterias fueron resuspendidas en 10 ml de Solución I (25 mM Tris-HCl pH = 8; 10 mM EDTA pH = 8), se agitó la suspensión con un vortex durante 5 minutos y se agregaron 20 ml de Solución II (0,2 N NaOH; 1% SDS). Se mezcló por inversión y se dejó a 0°C por 20 minutos. Posteriormente se colocaron 15 ml de solución III (3 M Acetato de potasio; 11,5 % Acético glacial), se mezcló por inversión por 5 minutos a 0°C, y se centrifugó por 30 minutos a 10000 rpm a 4°C. Al sobrenadante se le agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol, se mezcló, y dejó 20 min a -20°C. Se centrifugó 1 hora a 5000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 3 ml de TE, se agregó igual volumen de LiCl 5 M (frío), se mezcló y centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos en frío. Se colectó el sobrenadante, se le agregó igual volumen de

isopropanol, se mezcló y centrifugó 5 min. A 10000 rpm a 4°C. El sobrenadante se descartó, el pellet fue resuspendido en 0,5 ml de TE y se agregaron 20 mg/ml de ARNasa A durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó igual volumen de 13% polietilenglicol ⁽²²⁸⁾ en 1,6 M NaCl, se mezcló y se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en 400 µl de TE. Se realizaron extracciones con 1 volumen de fenol saturado en TE (una vez), 1 volumen fenol (saturado en TE): cloroformo (1:1) (2 veces), y 1 volumen cloroformo (una vez). Se agregó 0,1 volumen de Acetato de sodio 3 M pH = 5,2 y 2,5 volúmenes de ETOH 100 %. Se dejó 20 min a -20°C. Por último, se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm, se lavó con 70 % ETOH y se resuspendió el pellet en 250 µl de TE. La concentración de ADN obtenida se calculó como ($\mu\text{g de ADN}/\mu\text{l de solución}$) = $\text{OD}_{260} \times 50 \times F_{\text{dil}}/1000$.

Generación de líneas estables

La generación de líneas estables se realizó utilizando las líneas de CMEh HUES-5 y WA09, transducidos con partículas virales. Para tal fin se emplearon los vectores lentivirales Brachyury-eGFP-Rex-Blasticidina- (#21222, Addgene) y α -MHC-Cherry-Rex-Blasticidina (#21228, Addgene). Ambos plásmidos presentan un fragmento de la región promotora de Rex-1 dirigiendo la expresión del gen que confiere resistencia al antibiótico Blasticidina y difieren en la expresión del gen reportero. En el plásmido Brachyury-eGFP, la proteína fluorescente verde se halla dirigida por un fragmento de la zona regulatoria del promotor del gen T/Brachyury, mientras que en el otro plásmido la expresión de la proteína mCherry se encuentra dirigida por un fragmento de la zona regulatoria del promotor de α MHC. Las partículas lentivirales se generaron mediante la co-transfección de cada vector con los vectores empaquetadores pRSV-Rev (Addgene Plasmido # 12253), pMDLg/pRRE (Addgene #12251) y el vector ENV (Addgene#12259) en células de riñón humano genéticamente modificadas (HEK293T, ATCC, CRL-11268) utilizando FUGENE (Roche). 48 hs post transfección, el sobrenadante viral fue colectado, filtrado, y concentrado por centrifugación (40 minutos a 700g) utilizando las columnas Amicon Ultra-15 (Millipore). El concentrado viral obtenido fue utilizado fresco para

la infección de CMEh previamente plaqueados sobre Matrigel en placas de 6 pocillos. Se realizaron dos infecciones consecutivas por pocillo y 4 días después de la última infección, se realizó el tratamiento con blasticidina (400ug/ml) durante 48 horas, para seleccionar aquellas células que incorporaron el plásmido establemente. Se lavo el antibiótico y se dejó recuperar el cultivo por 72 hs y luego se realizó una segunda selección durante 7 días. Las células resistentes fueron luego cultivadas sobre una capa nutricia de MEFi en medio HES para su expansión. Una vez establecidas las líneas, fueron amplificadas, congeladas y mantenidas como de igual modo que las CMEh.

Inmunomarcaciones y microscopía de fluorescencia

Para las inmunomarcaciones, las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos (Corning). Luego de la remoción del medio de cultivo y de un lavado con PBS, las células fueron fijadas con una solución 4% m/v de paraformaldehido (PFA) (Sigma) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. A posteriori, se realizaron 3 lavados durante 5 minutos cada uno, con albúmina sérica bovina (ASB) 0,1% v/v (Gibco) en PBS. La permeabilización y el bloqueo se realizó con una solución compuesta por 0,1% v/v Triton X-100 (Sigma); 0,1% v/v ASB; 10% v/v Suero de Cabra Normal (SCN) (Gibco) en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de remover la solución de permeabilización y bloqueo se realizaron 3 lavados durante 5 minutos cada uno, con 0,1% v/v ASB en PBS. Las inmunomarcaciones se realizaron incubando las células con el o los anticuerpos primarios específicos en una solución de dilución de anticuerpos compuesta por: 0,1% v/v ASB, 10% v/v SCN en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente en agitador mecánico o durante una noche a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS, 0,1% v/v ASB. Posteriormente, se realizó una incubación de 2 horas en agitación de las células con el o los anticuerpos secundarios conjugados a los fluoróforos, en una dilución 1:400 (en la misma solución de dilución empleada para los anticuerpos primarios). Para la tinción de los núcleos se utilizó el 4-6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) (Sigma) en una concentración final de 200ng/ml, el cual fue agregado simultáneamente con los

anticuerpos secundarios. Se realizaron nuevamente 3 lavados durante 5 minutos cada uno, con 0,1% v/v ASB en PBS y finalmente se agregó un volumen apropiado de PBS. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo se detallan en las tablas 2 y 3 respectivamente.

El análisis de las imágenes se realizó fotografiando las células con una cámara digital Nikon DXN1200F acoplada al microscopio invertido de fluorescencia con lámpara de mercurio (Nikon Eclipse TE2000-S) y controlada por el software EclipseNet versión 1.20.0 Build 61.

Ensayo de fragmentación del ADN.

Se utilizó el kit de detección de muerte celular Cell Death Detection ELISA^{Plus} (Roche Mannheim, Alemania). Este ensayo colorimétrico de ELISA (del inglés, Enzyme-linked Immunosorbent Assay) permite detectar de manera cuantitativa los mono u oligonucleosomas (fragmentos de ADN-histonas) liberados al citoplasma durante el proceso apoptótico. El ensayo utiliza dos anticuerpos monoclonales dirigidos: uno contra el ADN (conjugado con peroxidasa) y otro contra las histonas (conjugado con biotina). El anticuerpo anti-histona-biotina se une a las histonas de los nucleosomas y captura simultáneamente el inmunocomplejo al pocillo de la microplaca que está revestido de estreptavidina, la cual es reconocida por la biotina. Adicionalmente, el anticuerpo anti-ADN-peroxidasa reacciona con el ADN de los nucleosomas. Por último, la reacción es revelada usando ácido benzotiazolidina (ABTS) como sustrato de la peroxidasa.

Los CEs fueron cultivados en placas de 24 pocillos y tratados según se indica en la sección de Resultados. Una vez finalizados los tratamientos, éstos fueron sometidos a una lisis suave que mantiene la integridad de los núcleos. Luego los lisados fueron transferidos a tubos eppendorf y centrifugados (200 x g, 5 min). El sobrenadante, conteniendo la fracción citoplasmática, fue transferido a los pocillos tratados con estreptavidina y en éstos se realizó la incubación con los anticuerpos correspondientes. Para el revelado se lavó el exceso de anticuerpos y en cada pocillo se agregaron 100 µl de la solución de ABTS. Luego se realizó una incubación en agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Inmediatamente en cada pocillo se agregaron 100 μ l de una solución que detiene la reacción. Finalmente, el producto coloreado obtenido fue cuantificado en un lector de microplacas (BioRad-Benchmark) a una longitud de onda de 405 nm. Los resultados se expresan como porcentajes de oligómeros de ADN, calculados a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra y la absorbancia del control correspondiente multiplicado por 100. Los experimentos fueron realizados 3 veces por triplicado.

Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular fue estimada midiendo los cambios colorimétricos en el ensayo de 2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) (XTT). Este ensayo se basa en la actividad mitocondrial que exhiben las células viables mediante la cual se produce la reducción de la sal de tetrazolio XTT de color amarillo, a una tinción de formazán, de color naranja. Los CEs fueron cultivados en placas de 24 pocillos (se mantuvo constante el número de CEs por tratamiento) y tratados según se indica en la sección de Resultados. Transcurridos los tratamientos, se procedió a la determinación de la viabilidad. Para ello, en condiciones de esterilidad, se reemplazó el medio de cultivo por 50 μ g/pocillo de XTT (Sigma) disuelto en PBS conteniendo 0,3 μ g/pocillo del catalizador N-metildibenzopirazina metil-sulfato (PMS) en un volumen final de 200 μ l, e incubando los CEs durante 2-4 horas a 37°C y atmósfera al 5% de CO₂. La actividad metabólica fue determinada midiendo la absorbancia de las muestras con un lector de microplacas BioRad-Benchmark a una longitud de onda de 450nm y substrayendo la absorbancia a 650nm. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular, calculado a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra y la absorbancia del control correspondiente multiplicado por 100. Los experimentos fueron realizados 3 veces por quintuplicado.

Diferenciación de CMEh en presencia de SFB.

Para inducir la diferenciación, las colonias de CMEh fueron dispersadas utilizando una solución 1mg/ml de colagenasa tipo IV (Invitrogen, CA, USA) durante 1 hora. Las células fueron diluidas en PBS y colectadas en un tubo Falcon y se las dejó decantar. Por último las células fueron resuspendidas en medio DMEM suplementado con 20% suero fetal bovino (Gibco, CA, USA), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 50 µg/ml streptomycin; y transferidas a una placa de petri no adherente. Las células fueron incubadas en suspensión a 37°C y 5% CO₂ durante 7 días durante los cuales ocurrió la formación de los CE. El medio de diferenciación fue reemplazado cada 24-72 hs por medio fresco. El día 7 de la diferenciación, los CE fueron adheridos en placas de 24 pocillos pre-tratadas con gelatina 0,1% y cultivados por 7 días más. Frecuentemente, entre 2 y 4 días post adhesión se observan estructuras características de la diferenciación como neuro-rosetas, proyecciones neurales y áreas contráctiles.

Diferenciación cardíaca dirigida a partir de CMEh

Para inducir la diferenciación las colonias de CMEh fueron dispersadas utilizando la enzima TrypLE™ Select (Invitrogen) hasta lograr una suspensión unicelular. Las células fueron luego diluidas en PBS y en un tubo Falcon y se las centrifugo por 5 minutos a 1000 rpm. Luego se las resuspendió en medio mTser (StemCell Technologies) suplementado con inhibidor de Rock 10 µ M (Cayman Chemicals) y BMP-4 10ng/ml (Invitrogen). Se contó el número de células utilizando una cámara de Neubauer y se las llevó a volumen de manera de lograr una suspensión de 500.000 células /ml. Por último, se sembraron las células en placas no adherentes de 96 pocillos con fondo en V (25.000 células/well, 50ul), se centrifugaron por 7 minutos a 1300 rpm y se incubaron durante una noche a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂. Al otro día se retiraron manualmente los CE formados y se cultivaron en suspensión por 4 días en placas de Petri no adherentes en medio StemPro34 suplementado con 10ng/ml BMP4, 5ng/ml bFGF (Invitrogen) y

3ng/ml Activina A (Invitrogen). El día 4 de la diferenciación, los CEs fueron adheridos en placas de 12, 24 o 6 pocillos (dependiendo del experimento) pre-tratadas con gelatina 0,1% bovina (0,1% v/v en PBS) (Sigma) en medio StemPro34 suplementado con 10 ng/ml BMP4, 5ng/ml bFGF , 3ng/ml Activina A y 5uM IWR-1 (SIGMA). A partir del día 5 y hasta el día 14 los CEs fueron mantenidos en medio StemPro34 suplementado con 5ng/ml VEGF (R&D), 10ng/ml bFGF y 5uM IWR-1.

Inducción de progenitores mesodérmicos tempranos.

Las colonias de CMEh fueron pasadas manualmente de MEF a pocillos pre-tratados con Matrigel y cultivadas en medio mTeSR hasta adquirir una confluencia del 70-90% (2 a 4 días) y se les cambio el medio por mTeSR suplementado con Activina A (10 ng/ml), bFGF (10ng/ml), VEGF (10ng/ml) y BMP4 (10ng/ml). Las células fueron cultivadas en este medio por 24 hs (día 1), luego el medio fue cambiado a mTeSR suplementado con bFGF (10ng/ml), VEGF (10ng/ml) y BMP4 (10ng/ml) y se las cultivo en este medio hasta el fin del protocolo . Para las células tratadas LIF, se adicionó 10 ng/ml de LIF desde el día 1 del protocolo y hasta el fin del protocolo.

Estimulación con Norepinefrina.

CEs cultivados durante 14 días fueron estimulados mediante el agregado de norepinefrina (Sigma) 10nM de durante 10 minutos. La cantidad de contracciones por minuto fue contabilizada antes y después de la adición de la droga.

DetECCIÓN DE LIF EN EL SOBRENADANTE.

Para la determinación de LIF en el medio de cultivo se utilizó el kit *LIF Human ELISA* (Invitrogen, KAC1351). Este ensayo se realiza en una placa de 96 pocillos y está basado en un sistema oligoclonal en el que se utiliza una mezcla de anticuerpos monoclonales que detectan distintos epítopes de la citoquina LIF. La detección de la citoquina se realiza mediante la interacción con los anticuerpos monoclonales adsorbidos en la base de cada pocillo y el uso de un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, por su nombre en inglés), lo que permite evidenciar la presencia de la citoquina mediante una reacción cromogénica.

Las áreas contráctiles de CEs cultivados durante 14 días fueron separadas manualmente bajo microscopio de las áreas no contráctiles y colocadas en una placa de 12 pocillos no adherente en medio STEMPRO 34 + bFGF (10 ng/ml). Las regiones no contráctiles remanentes también se les cambió el medio de cultivo por STEMPRO34 + bFGF y ambas placas fueron cultivadas por 4 días sin cambio de medio. Luego se tomó el sobrenadante de cada cultivo y se lo utilizó para la determinación de la presencia de LIF mediante el ensayo de ELISA.

En cada pocillo de la placa se colocaron 100 μ l de la curva estándar (soluciones de plasma humano de concentración conocida) y 100 μ l de la muestra a evaluar. La curva estándar se armó pipeteando 100 μ l de cada solución estándar con 100 μ l de buffer. A continuación se agregó 50 μ l del anticuerpo anti-LIF conjugado por pocillo y se incubó la placa durante 4 horas a temperatura ambiente. Los pocillos fueron luego lavados 3 veces con una solución de lavado y se les agregó 200 μ l de solución cromogénica de tetrametilbenzidina. La placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación y la reacción fue terminada por el agregado de 50 μ l de una solución de ácido oxotetrasulfúrico. Por último, el producto coloreado obtenido fue cuantificado en un lector de microplacas (BioRad-Benchmark) a una longitud de onda de 450 nm.

Los resultados se expresan como picogramos de LIF por mililitro cada 100 μ g de proteína total. Los experimentos fueron realizados 3 veces por triplicado.

Estimulación con LIF durante la diferenciación cardíaca

La estimulación con el factor inhibitorio de leucemias, LIF, realizó mediante el agregado exógeno de la citoquina recombinante humana (Millipore, LIF1010). Se realizó una curva de dosis y tiempo donde a CEs diferenciados con el protocolo de diferenciación dirigida se les agregó LIF en concentraciones de 10 o 100 ng/ml en los días 4, 8 o 10 de la diferenciación. LIF fue adicionado con cada cambio de medio.

Ensayo de TUNEL

Para la determinación y cuantificación de células apoptóticas se realizó un ensayo de TUNEL utilizando el kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega), mediante el cual se evaluó la fragmentación del ADN nuclear. Para ello, las células fueron disgregadas utilizando una solución de tripsina-EDTA 0,25% v/v / colagenasa tipo IV 1mg/ml (Invitrogen) hasta lograr una suspensión unicelular. Las enzimas fueron inactivadas con medio DMEM 10% suero fetal bovino y colectadas utilizando una pipeta de 10 ml en un tubo Falcon, centrifugadas a 1000 rpm durante 5min. Se lavaron dos veces las células con PBS frío, y se fijaron utilizando PFA 4% e incubaron en hielo por 20 minutos. Luego se permeabilizaron con Etanol 70% (Anebra) frío O.N. Luego de dos lavados, el pellet fue resuspendido e incubado durante 60 min a 37°C en un buffer equilibrante (cacodilato de potasio 200mM, Tris-HCl 25mM, ditiotreitól 0,2 mM, BSA 0,25mg/ml, 2,5mM cloruro de cobalto) complementado con una mezcla de nucleótidos (50 µM fluoresceína 12-dUTP, 100µM dATP, 10mM Tris-HCL, 1mM EDTA) y la enzima recombinante Desoxinucleotidil transferasa terminal (rTdT por sus siglas en inglés). La reacción fue terminada mediante el agregado de EDTA 20mM. Finalmente, las células fueron lavadas con una solución 0,1% de Tritón x100 (Sigma) en PBS conteniendo 5mg/ml de ASB. Las células fueron analizadas por citometría de flujo.

Citometría de flujo

Las células fueron disgregadas utilizando una solución de tripsina-EDTA 0,25% v/v /colagenasa tipo IV 1mg/ml , transferidas a tubos de hemólisis y centrifugadas a 300 x g durante 5 minutos. Para la detección de las proteínas cardíacas, las células fueron fijadas en 300 ul de PFA 4% e incubadas durante 15 a 20 minutos. Luego de 2 lavados con PBS se permeabilizaron utilizando la solución PermBufferIII (BD). La Inmunomarcación fue realizada agregando los anticuerpos correspondientes según el caso: anti-miosina sarcomérica (MF-20, DSHB), anti-cardiotroponina T (Abcam). Ambos anticuerpos fueron utilizados en una dilución 1/400. Para el control de isotipo se utilizó IgG normal de ratón como anticuerpo primario. Las células luego fueron lavadas e incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios : Alexa fluor 488 anti-ratón IgG (H+L) o APC anti-ratón IgG (H+L) (Life Technologies). Todas las muestras fueron incubadas a 4° C durante 20 minutos en oscuridad. Luego se realizaron dos lavados agregando 1ml de PBS en cada tubo, centrifugando a 200 x g, aspirando completamente el sobrenadante y resuspendiendo las células en 500ul de PBS.

Para la detección de hEMP, en el día 3,5 de la diferenciación las células fueron disociadas con la enzima Tryple y se utilizaron sin ser fijadas. Para la detección de las proteínas de membrana se utilizaron los anticuerpos : anti-CD326 conjugado con PerCP Cy5.5 (Biolegend) y anti-CD56 conjugado con APC (Biolegend). Se incubaron las muestras durante 20 minutos en hielo y en oscuridad. Finalmente las muestras se lavaron tres veces con una solución de PBS suplementado con 1% de suero fetal bovino y filtraron a través de un filtro de 45 µm previo a ser analizadas.

Las mediciones se realizaron en el citómetro FACS Aria II (Becton Dickinson) o BD Accuri c6 y los resultados fueron analizados con el software BDFACSDiva o Bdaccuri software.

Inmunohistoquímica.

Las muestras de corazón humano fueron gentilmente cedidas por los laboratorios del Dr. Evseenko y el Dr. Nsair de la Universidad de California en Los Angeles, UCLA por su sigla en ingles). La generación de los tacos de parafina, corte y montado se realizó en el en el laboratorio de Patología trasnacional (UCLA) o en el laboratorio de Neuropatología (FLENI).

Para las inmunomarcaciones los portaobjetos conteniendo los distintos cortes fueron procesados de la siguiente manera:

Se calentaron a 60^o C en un horno por dos horas y luego se comenzó con el proceso de rehidratación:

- 10 minutos en 147xylene I
- 10 minutos en 147xylene II
- 3 minutos en etanol 100%
- 3 minutos en etanol 96%
- 3 minutos en etanol 80%
- 3 minutos en etanol 70%
- 3 minutos en agua.

A continuación se realizó la recuperación de los antígenos colocando los cortes histológicos en una solución de desenmascaramiento (pH=6) y dentro de una vaporera por 45 minutos y se las dejó enfriar en hielo por 15 minutos. A continuación se los incubo con una solución de peróxido de hidrogeno por 15 minutos y se las lavó con TBS. El bloqueo se realizó utilizando una solución al 2% de suero normal de caballo. La incubación con los correspondientes anticuerpos (Tabla 2) se realizó en PBS-Albumina 1% a 4^oC, O.N. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos poli-clonales asociados a peroxidasa (Tabla 3). Se reveló la reacción cromogénica utilizando una solución de 3,3'aminobenzidina (DAB) hasta la aparición de color y se frenó la

reacción colocando los cortes histológicos en agua destilada. Como contra tinción se utilizó una solución de hematoxilina (SIGMA).

Finalmente se realizó la rehidratación y montaje de los cortes :

- Enjuague en dióxido de amonio
- 3 minutos en etanol 70%
- 3 minutos en etanol 96%
- 3 minutos en etanol 96%
- 3 minutos en etanol 100%
- 3 minutos en 148xylene I
- 3 minutos en 148xylene II
- Enjuague con xylene fresco.
- Se dejó evaporar el xylene y se agregaron 1 a 2 gotas de solución de montaje (Cytoseal60, Thermo Scientific™) , se los cubrió con un cubreobjetos y se los dejó secar.

Ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina.

Para este ensayo se utilizó el kit APC BrDu flow Kit (BD Pharmigen). CEs cultivados durante 14 días en presencia o ausencia de LIF recibieron un pulso de 10 μ M de bromodeoxiuridina (BrDu) durante una hora. Luego de la incubación, los CEs fueron disociados enzimáticamente para lograr una suspensión unicelular. Cada muestra fue pasada a un tubo de hemólisis, centrifugada (por 5 minutos a 1000 rpm) y resuspendidas en 100 μ l de BD Cytotfix/Cytoperm Buffer. Se incubaron las muestras en hielo durante 20 minutos y se lavaron con 1 ml de 1X BD Perm/Wash Buffer mediante centrifugación. A continuación se resuspendieron las células en 100 μ l de BD Cytoperm Permeabilization Buffer y se las incubó nuevamente en hielo por 10 minutos, se las lavó y re-fijo en buffer de fijación. Luego de un nuevo lavado, se trató las células con la enzima DNAasa (300ug/ml) para exponer la BrDu incorporada en el DNA y se las incubó durante 1 hora a 37 °C. Por último las células fueron lavadas por centrifugación e incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios específicos anti-BrDu conjugado con el fluorocromo alofococianina (APC, por su nombre en inglés)

y anti- α -MHC (AB-2147781, DSHB). Una vez finalizada la tinción con los anticuerpos primarios se realizaron dos lavados por centrifugación utilizando el buffer 1X BD Perm/Wash y se realizó la tinción con el anticuerpo secundario contra ratón conjugado con FITC, con el fin de detectar el anticuerpo anti- α -MHC. Por último las células fueron lavadas una vez más y analizadas mediante citometría de flujo. Las mediciones se realizaron en el citómetro FACS Aria II (Becton Dickinson) y los resultados fueron analizados con el software BD FACSDiva.

Aislamiento de fibroblastos de prepucio humano.

Los fibroblastos dérmicos de prepucio (FH) fueron derivados a partir de tejido sano de un paciente sometido a un procedimiento quirúrgico, bajo el consentimiento informado del donante y aprobación del comité de ética institucional. La muestra fue procesada inmediatamente después de obtenida. Luego de remover cuidadosamente el tejido adiposo y la fascia, la muestra de piel fue cortada en trozos de aproximadamente 2mm y colocada en una placa de cultivo de 100mm de diámetro, la cual fue pre-tratada durante una hora a temperatura ambiente con una solución estéril de gelatina bovina 0,1% v/v en PBS. Los explantos fueron cultivados con medio de cultivo DMEM alta glucosa, suplementado con 20% SFB, aminoácidos no esenciales (2mM concentración final), 50 U/ml P/E y L-Glutamina (2mM concentración final). Éstos se mantuvieron a 37°C con una atmósfera al 5% CO₂ hasta que los fibroblastos provenientes de la dermis alcanzaron un crecimiento exponencial y cubrieron en un 80% la superficie de la placa. Luego, dichos explantos fueron removidos y se procedió a la amplificación y/o criopreservación de los fibroblastos.

Generación de CMPIs a partir de fibroblastos humanos de prepucio

La reprogramación se realizó a partir de FH transducidos con partículas virales. Para tal fin se empleó un vector lentiviral (pHAGE-STEMCCA, desarrollado por el laboratorio del Dr. Gustavo Mostoslavsky ⁽²²⁹⁾) que porta la secuencia de los

genes Oct4, Sox2, Klf4, y c-Myc que codifican para factores de transcripción cruciales para la determinación y mantenimiento del estado embrionario. Las partículas lentivirales se generaron mediante la co-transfección de dicho vector con los vectores empaquetadores pRSV-Rev (Addgene Plasmido # 12253), pMDLg/pRRE (Addgene #12251) y el vector ENV (Addgene#12259) utilizando FUGENE (Roche) en células HEK293T (ATTC, CRL-11268). 48 hs post transfección, el sobrenadante viral fue colectado, filtrado, y concentrado por centrifugación (40 minutos a 700g) utilizando las columnas Amicon Ultra-15 (Millipore). El concentrado viral obtenido fue utilizado fresco para la infección de FH previamente plaqueados en una densidad de $1,3 \times 10^5$ células por pocillo de una placa de 6 pocillos. Se realizaron dos infecciones consecutivas por pocillo y 3 días después de la última infección, las células fueron pasadas y cultivadas sobre una capa nutricia de MEFi en medio DMEM 10% SFB y 24 hs después se les cambió el medio de cultivo a medio de células pluripotentes hES. La aparición de colonias putativas de CMPIs se observaron entre los días 7 y 20 post transducción. Posteriormente, se realizó una amplificación clonogénica y cada clon fue caracterizado mediante ensayo de fosfatasa alcalina (FA), el perfil de expresión génica de marcadores de pluripotencia (Oct-4 y NANOG por RT-PCR), el inmunofenotipo mediante la evaluación de la expresión de las proteínas Oct-4, NANOG, SSEA-3/4 y TRA 1-81 por medio de ensayos de inmunofluorescencia, evaluación de la capacidad multipotente mediante ensayos de diferenciación in vitro, y por último se evaluó el cariotipo (Genetista Susana Acevedo). La evaluación de capacidad teratogénica fue realizado por la Licenciada María Questa-Ortiz mediante la inyección subcutánea de 1×10^6 CMPIs en una suspensión de Matrigel (1/20) suplementado con 10uM de inhibidor de Rock en ratones inmunosuprimidos. El análisis histológico fue llevado a cabo por el laboratorio de Neuropatología del hospital FLENI.

Preparación de extractos proteicos y Western Blot

Los extractos de proteínas totales fueron obtenidos mediante el tratamiento de las células con RIPA buffer (20 mM Tris Hcl pH=7,4, 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, 10% glicerol, 0,1% dodecilsulfato sódico (SDS), 0,5% deoxicolato de sodio y 1 %

tritón X100) suplementado con inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail set I, Calbiochem, San Diego, CA, USA) y de fosfatasa (1mM NaF, 1 mM Na₂VO₄). Las muestras se incubaron 10 minutos en hielo y luego se centrifugaron 5 minutos a 4°C a 10000 x g. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método del ácido bicinonínico (BCA) (Pierce) . Brevemente, se prepara una curva estandar de albumina de suero bovina con 5 concentraciones (2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 ug/ul) y una solución 50:1 de Reactivo A : Reactivo B (A: solución de carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bisinoninico y retrato de sodio en 0,1 M de solución 151 de sodio; B: 151 solución de sulfato cúprico al 4%). Se pipetea 10 µl de cada punto de la curva por duplicado en pocillos de una placa de 96 pocillos y 10 µl de la proteína a cuantificar (o su correspondiente dilución). Luego se agregan 200 µl de la solución A:B y se lo incubaba a 37°C en oscuridad por 30 minutos. Los valores de absorbancia se registran mediante un lector de microplacas BioRad-Benchmark a una longitud de onda de 595nm.

Para los ensayos de western blot, se utilizaron entre 15 y 30 µg de proteínas total por calle. A cada muestra se les agregó solución de siembra (100ul/ml glicerol, 100mg/ml SDS 10%, 650ul/ml Tris HCl 0.5M pH 6.8, 250ul/ml β-mercaptoethanol, 100ul/ml Bromophenol 0.5%) y se las calentó 5 minutos a 100 °C para completar el proceso de desnaturalización. Posteriormente las proteínas se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE en un gel de 12% o 15% durante 3 horas a 100 Volts. Luego, las muestras se electrotransfirieron a una membrana de PVDF de baja fluorescencia (Milipore) durante 45 min a 10 mA. Finalizada la transferencia se bloqueó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en buffer comercial LICOR. La membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos (Tabla 2), preparados en Buffer LICOR-Tween 0,1%. Luego se realizaron 2 lavados de 5 minutos y 1 lavado de 20 minutos en PBS-Tween 0,1%. Seguidamente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario LICOR (Tabla 4), preparado en Buffer LICOR con 0,1% de SDS, durante 1 hora. Finalmente se realizaron 2 lavados de 5 minutos y 1 lavado de 20 minutos con PBS-Tween 0,1%. Por último el Western blot se reveló empleando un detector de luz infraroja LICOR-Odyssey.

Las soluciones utilizadas en la electroforesis fueron:

Solución de siembra: Tris 40 mM pH = 6,8, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,006%, SDS 1% y β -Mercaptoetanol 0,1%;

Solución de Corrida: Tris 25 mM pH = 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%; Solución de Transferencia: Tris 25 mM pH = 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%, Metanol 20%, PBS-Tween: Tween20 (SIGMA-Aldrich) 0,1% V/V en PBS y Buffer LICOR-Tween: Tween20 0,1% V/V en buffer comercial LICOR.

Los geles utilizados fueron de poliacrilamida al 12% o 15% (gel de resolución):

-Para gel 12%: 4 ml de acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8% (BIO-RAD), 2,5 ml de Tris-Cl 1,5 M pH = 8,8, 200 μ l SDS 10%; 200 μ l de persulfato de amonio 10%, 3,35ml de H₂O destilada y 10 μ l de tetrametiletilendiamina (TEMED) (SIGMA-Aldrich).

Para gel 15%: 5 ml de acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8%, 2,5 ml de Tris-Cl 1,5 M pH = 8,8, 200 μ l SDS 10%; 200 μ l de persulfato de amonio 10%, 2,3 ml de H₂O destilada y 10 μ l de TEMED.

-Gel de poliacrilamida concentrador: 0,4 ml de acrilamida 30%-bisacrilamida, 0,8%, 0,375 ml de Tris-Cl 1 M pH = 6,8, 30 μ l SDS 10%, 30 μ l APS 10%, 2,16 ml de H₂O destilada y 4 μ l de TEMED.

Inhibidores empleados

El inhibidor de STAT3, STATIC V (Millipore); el inhibidor de PI3K, Ly294002 (SIGMA) y el inhibidor de MEK, UO126 (SIGMA), fueron diluidos en DMSO y conservados a -20°C. El anticuerpo neutralizante α -gp130 (R&D) fue diluido en PBS y almacenado a -20°C.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar. En el análisis para determinar diferencias estadísticas significativas de las PCR en tiempo real, ensayo de dosis de LIF, citometría de flujo en presencia de inhibidores y análisis del porcentaje de oligomeros en presencia de inhibidores, se hicieron estudios de ANOVA seguidas

de pruebas de comparación múltiples de Dunnet. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si se cumplía que $p < 0,05$.

En el caso de los ensayos de western blot, viabilidad celular, incorporación de BrDu, TUNEL, PCR en tiempo real de las proteínas apoptóticas, y análisis del porcentaje de oligómeros y la determinación del porcentaje de hEMP; las diferencias significativas entre los tratamientos se detectaron usando una prueba *t* de Student. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si se cumplía que $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se hicieron con el software GraphPad Prism 6 (2013).

Primers utilizados.

BLANCO	SENTIDO (5' → 3')	ANTI-SENTIDO (5' → 3')
GAPDH	ACAGCCTCAAGATCATCAG	GAGTCCTTCCACGATACC
RPL7	AATGGCGAGGATGGCAAG	TGACGAAGGCGAAGAAGC
Oct4	CTGGGTTGATCCTCGGACCT	CACAGAACTCATACGGCGGG
Nanog	AAAGAATCTTCACCTATGCC	GAAGGAAGAGGAGAGACAGT
Brachury	TCCCAGGTGGCTTACAGATGA	GGTGTGCCAAAGTTGCCAAT
Islet -1	CACAAGCGTCTCGGGATTGTGTT	AGTGGCAAGTCTTCCGACAA
α-MHC	CAACAATCCCTACGACTAC	TCTCCTCTGAAGTGAAGC
NKX 2.5	CCCACGCCCTTCTCAGTCAA	GTAGGCCTCTGGCTTGAAGG
cTnT	ATGATGCATTTTGGGGGTA	CAGCACCTTCCTCCTCTCAG
PAX6	CAGGTGTCCAACGGATGTG	GTCGCTACTCTCGGTTACTAC
AFP	TGCTGGATTGTCTGCAGGATG	ACGTTCCAGCGTGGTCAGTTT
LIF	GCCCTCTTATTCTCTATTAC	CAAGGTACACGACTATGC
GP130	ACATTCGGACAGCTTGAACAGA	TTCCCCTGGTTCACAATGC
LIFR	CCTTTTGCTATCGGAAACGAGAA	AGCACTGCTTCCCTCACAGACA
SOCS3	TCACCCACAGCAAGTTCCC	CACTGAGCAGCAGGTTCCGC
STAT3	CAGCAGCTTGACACACGGTA	AAACACCAAAGTGGCATGTGA

Tabla 1. Primers utilizados en los ensayos de PCR a punto final y en tiempo real.

Anticuerpo primario	Especie-Tipo	Marca	N°Catálogo
α -Nanog	Conejo-Monoclonal	Cell Signaling	4903
α -Nestina	Conejo- Policlonal	Chemicon	AB5922

α -Oct4	Raton-Monoclonal	Santa Cruz	SC-5279
α -SSEA-4	Raton-Monoclonal	Santa Cruz	SC-21704
α -TRA-1-60	Raton-Monoclonal	Santa Cruz	SC-21705
α -TRA-1-81 (80)	Raton-Monoclonal	Santa Cruz	SC-21706
α -Bcl-2	Conejo-Policlonal	Santa Cruz	SC-492
α -Actina	Cabra-Policlonal	Santa Cruz	SC-1616
α -Bcl-XL	Conejo-Policlonal	Santa Cruz	SC-634
α -Bax	Conejo-Policlonal	Santa Cruz	SC-493
α -gp130	Ratón- monoclonal	Santa Cruz	sc-9994
α -gp130	Cabra-Policlonal	Santa Cruz	# sc-32093
α -IL11R α (K-20)	Cabra-Policlonal	Santa Cruz	sc-1947
α -IL6R α (C-20)	Conejo-Policlonal	Santa Cruz	sc-661
α -Islet 1	Cabra- Policlonal	Santa Cruz	sc-23590
α -Nkx-2.5	Conejo- Policlonal	Santa Cruz	sc-14033
α - α MHC (MF20)	Ratón- monoclonal	DSHB	AB_2147781
α -cTnT	Ratón-monoclonal	Abcam	ab8295
α -anti-Ki67	Ratón- monoclonal	Dako	N1633
α -CD326	Ratón- monoclonal	Biologend	324214
α -CD56	Ratón-monoclonal	Biologend	341025

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados en las inmunomarcaciones, Western blot y/o citometría de flujo

Anticuerpo	Especie	Fluoróforo	Marca	N°Catálogo
α -IgG de ratón	Cabra-Policlonal	Alexa Fluor 568	Invitrogen	A-11031
α -IgG de conejo	Cabra-Policlonal	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11008
α -IgG de ratón	Pollo-Policlonal	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-21200
α -IgG de conejo	Cabra-Policlonal	Alexa Fluor 555	Invitrogen	A-21429

Tabla 3: Anticuerpos secundarios utilizados en las inmunomarcaciones + citometría de flujo.

Anticuerpo secundario	Especie-Tipo	Marca	N°Catálogo
α -IgG de cabra IRDye® 800CW	Burro-Policlonal	LICOR	926-32214
α -IgG de cabra IRDye® 680CW	Burro-Policlonal	LICOR	926-32224
α -IgG de ratón IRDye® 800 CW	Burro-Policlonal	LICOR	926-32212

α -IgG de ratón IRDye® 680 CW	Burro-Policlona	LICOR	926-68072
α -IgG de conejo IRDye® 800 CW	Burro-Policlona	LICOR	926-32213
α -IgG de conejo IRDye® 680CW	Burro-Policlona	LICOR	926-68073

Tabla 4: Anticuerpos secundarios utilizados en western blot.

Bibliografía

1. Murry, C. E., Reinecke, H., and Pabon, L. M. 2006. Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair, *Journal of the American College of Cardiology* 47, 1777-1785.
2. Whelan, R. S., Kaplinskiy, V., and Kitsis, R. N. 2010. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance, *Annual review of physiology* 72, 19-44.
3. Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J. M., and Anversa, P. 1991. Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy, *Circulation research* 68, 1560-1568.
4. Lopez, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M., Jamison, D. T., and Murray, C. J. 2006. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data, *Lancet* 367, 1747-1757.
5. Xin, M., Olson, E. N., and Bassel-Duby, R. 2013. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair, *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 529-541.
6. Segers, V. F., and Lee, R. T. 2008. Stem-cell therapy for cardiac disease, *Nature* 451, 937-942.
7. Miquerol, L., and Kelly, R. G. 2013. Organogenesis of the vertebrate heart, *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2, 17-29.
8. Passier, R., Denning, C., and Mummery, C. 2006. Cardiomyocytes from human embryonic stem cells, *Handb Exp Pharmacol*, 101-122.
9. Tam, P. P., Parameswaran, M., Kinder, S. J., and Weinberger, R. P. 1997. The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation, *Development* 124, 1631-1642.
10. Olson, E. N., and Schneider, M. D. 2003. Sizing up the heart: development redux in disease, *Genes Dev* 17, 1937-1956.
11. Abu-Issa, R., and Kirby, M. L. 2007. Heart field: from mesoderm to heart tube, *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 45-68.
12. Viragh, S., Szabo, E., and Challice, C. E. 1989. Formation of the primitive myo- and endocardial tubes in the chicken embryo, *J Mol Cell Cardiol* 21, 123-137.
13. Gilbert, S. F. 2003. *Biología del Desarrollo*, editorial panamericana.
14. Linask, K. K. 1992. N-cadherin localization in early heart development and polar expression of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase, and integrin during pericardial coelom formation and epithelialization of the differentiating myocardium, *Dev Biol* 151, 213-224.
15. Milgrom-Hoffman, M., Harrelson, Z., Ferrara, N., Zelzer, E., Evans, S. M., and Tzahor, E. 2011. The heart endocardium is derived from vascular endothelial progenitors, *Development* 138, 4777-4787.
16. Harris, I. S., and Black, B. L. 2010. Development of the endocardium, *Pediatr Cardiol* 31, 391-399.
17. Gilbert, S. F. 2000. *Developmental biology*, 6th ed., Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
18. Bruneau, B. G. 2002. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis, *Circ Res* 90, 509-519.
19. Marvin, M. J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S. M., and Lassar, A. B. 2001. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm, *Genes Dev* 15, 316-327.
20. Showell, C., Binder, O., and Conlon, F. L. 2004. T-box genes in early embryogenesis, *Dev Dyn* 229, 201-218.
21. Komuro, I., and Izumo, S. 1993. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8145-8149.

22. Takeuchi, J. K., and Bruneau, B. G. 2009. Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors, *Nature* 459, 708-711.
23. Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., and Srivastava, D. 2010. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors, *Cell* 142, 375-386.
24. Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H., and Hamada, H. 1998. lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal, *Cell* 94, 287-297.
25. Srivastava, D., Cserjesi, P., and Olson, E. N. 1995. A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis, *Science* 270, 1995-1999.
26. Linask, K. K., Yu, X., Chen, Y., and Han, M. D. 2002. Directionality of heart looping: effects of Pitx2c misexpression on flectin asymmetry and midline structures, *Dev Biol* 246, 407-417.
27. Lints, T. J., Parsons, L. M., Hartley, L., Lyons, I., and Harvey, R. P. 1993. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants, *Development* 119, 969.
28. Kuo, C. T., Morrisey, E. E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M. M., Parmacek, M. S., Soudais, C., and Leiden, J. M. 1997. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation, *Genes Dev* 11, 1048-1060.
29. Pu, W. T., Ishiwata, T., Juraszek, A. L., Ma, Q., and Izumo, S. 2004. GATA4 is a dosage-sensitive regulator of cardiac morphogenesis, *Dev Biol* 275, 235-244.
30. Zeisberg, E. M., Ma, Q., Juraszek, A. L., Moses, K., Schwartz, R. J., Izumo, S., and Pu, W. T. 2005. Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4, *J Clin Invest* 115, 1522-1531.
31. Zhao, R., Watt, A. J., Battle, M. A., Li, J., Bondow, B. J., and Duncan, S. A. 2008. Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice, *Dev Biol* 317, 614-619.
32. Brade, T., Pane, L. S., Moretti, A., Chien, K. R., and Laugwitz, K. L. 2013. Embryonic heart progenitors and cardiogenesis, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3, a013847.
33. Bao, Z. Z., Bruneau, B. G., Seidman, J. G., Seidman, C. E., and Cepko, C. L. 1999. Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by Irx4, *Science* 283, 1161-1164.
34. Potts, J. D., Dagle, J. M., Walder, J. A., Weeks, D. L., and Runyan, R. B. 1991. Epithelial-mesenchymal transformation of embryonic cardiac endothelial cells is inhibited by a modified antisense oligodeoxynucleotide to transforming growth factor beta 3, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1516-1520.
35. Brockes, J. P. 1997. Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure, *Science* 276, 81-87.
36. Wolpert, L., Hicklin, J., and Hornbruch, A. 1971. Positional information and pattern regulation in regeneration of hydra, *Symp Soc Exp Biol* 25, 391-415.
37. van der Kooy, D., and Weiss, S. 2000. Why stem cells?, *Science* 287, 1439-1441.
38. Condic, M. L. 2014. Totipotency: what it is and what it is not, *Stem Cells Dev* 23, 796-812.
39. Sell, S. 2004. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy, *Critical reviews in oncology/hematology* 51, 1-28.
40. Schofield, R. 1983. The stem cell system, *Biomedicine & pharmacotherapy* = *Biomedecine & pharmacotherapie* 37, 375-380.
41. Laflamme, M. A., and Murry, C. E. 2005. Regenerating the heart, *Nature biotechnology* 23, 845-856.

42. Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., Jovinge, S., and Frisen, J. 2009. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans, *Science* 324, 98-102.
43. Kajstura, J., Urbanek, K., Perl, S., Hosoda, T., Zheng, H., Ogorek, B., Ferreira-Martins, J., Goichberg, P., Rondon-Clavo, C., Sanada, F., D'Amario, D., Rota, M., Del Monte, F., Orlic, D., Tisdale, J., Leri, A., and Anversa, P. 2010. Cardiomyogenesis in the adult human heart, *Circulation research* 107, 305-315.
44. Poss, K. D., Wilson, L. G., and Keating, M. T. 2002. Heart regeneration in zebrafish, *Science* 298, 2188-2190.
45. Romyantsev, P. P. 1973. Post-injury DNA synthesis, mitosis and ultrastructural reorganization of adult frog cardiac myocytes. An electron microscopic- autoradiographic study, *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 139, 431-450.
46. Flink, I. L. 2002. Cell cycle reentry of ventricular and atrial cardiomyocytes and cells within the epicardium following amputation of the ventricular apex in the axolotl, *Amblystoma mexicanum*: confocal microscopic immunofluorescent image analysis of bromodeoxyuridine-labeled nuclei, *Anatomy and embryology* 205, 235-244.
47. Porrello, E. R., Mahmoud, A. I., Simpson, E., Hill, J. A., Richardson, J. A., Olson, E. N., and Sadek, H. A. 2011. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart, *Science* 331, 1078-1080.
48. Drenckhahn, J. D., Schwarz, Q. P., Gray, S., Laskowski, A., Kiriazis, H., Ming, Z., Harvey, R. P., Du, X. J., Thorburn, D. R., and Cox, T. C. 2008. Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development, *Developmental cell* 15, 521-533.
49. Hsieh, P. C., Segers, V. F., Davis, M. E., MacGillivray, C., Gannon, J., Molkenstin, J. D., Robbins, J., and Lee, R. T. 2007. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury, *Nature medicine* 13, 970-974.
50. Martin-Puig, S., Wang, Z., and Chien, K. R. 2008. Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors, *Cell stem cell* 2, 320-331.
51. Urbanek, K., Torella, D., Sheikh, F., De Angelis, A., Nurzynska, D., Silvestri, F., Beltrami, C. A., Bussani, R., Beltrami, A. P., Quaini, F., Bolli, R., Leri, A., Kajstura, J., and Anversa, P. 2005. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8692-8697.
52. van Vliet, P., Rocco, M., Smits, A. M., van Oorschoot, A. A., Metz, C. H., van Veen, T. A., Sluijter, J. P., Doevendans, P. A., and Goumans, M. J. 2008. Progenitor cells isolated from the human heart: a potential cell source for regenerative therapy, *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation* 16, 163-169.
53. Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., Latronico, M. V., Coletta, M., Vivarelli, E., Frati, L., Cossu, G., and Giacomello, A. 2004. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart, *Circulation research* 95, 911-921.
54. Guan, K., and Hasenfuss, G. 2013. Cardiac resident progenitor cells: evidence and functional significance, *European heart journal* 34, 2784-2787.
55. Takahashi, K., and Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* 126, 663-676.
56. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell* 131, 861-872.

57. Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I., and Thomson, J. A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science* 318, 1917-1920.
58. Chin, M. H., Pellegrini, M., Plath, K., and Lowry, W. E. 2010. Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells, *Cell stem cell* 7, 263-269.
59. Bilic, J., and Izpisua Belmonte, J. C. 2012. Concise review: Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: close enough or yet too far apart?, *Stem cells* 30, 33-41.
60. Narsinh, K. H., Plews, J., and Wu, J. C. 2011. Comparison of human induced pluripotent and embryonic stem cells: fraternal or identical twins?, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19, 635-638.
61. Yamanaka, S. 2012. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future, *Cell stem cell* 10, 678-684.
62. Bosnali, M., and Edenhofer, F. 2008. Generation of transducible versions of transcription factors Oct4 and Sox2, *Biological chemistry* 389, 851-861.
63. Judson, R. L., Babiarz, J. E., Venere, M., and Blueloch, R. 2009. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency, *Nature biotechnology* 27, 459-461.
64. Melton, C., Judson, R. L., and Blueloch, R. 2010. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells, *Nature* 463, 621-626.
65. Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A. E., and Melton, D. A. 2008. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds, *Nature biotechnology* 26, 795-797.
66. Li, Y., Zhang, Q., Yin, X., Yang, W., Du, Y., Hou, P., Ge, J., Liu, C., Zhang, W., Zhang, X., Wu, Y., Li, H., Liu, K., Wu, C., Song, Z., Zhao, Y., Shi, Y., and Deng, H. 2011. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules, *Cell research* 21, 196-204.
67. Maherali, N., and Hochedlinger, K. 2008. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells, *Cell stem cell* 3, 595-605.
68. Bellin, M., Marchetto, M. C., Gage, F. H., and Mummery, C. L. 2012. Induced pluripotent stem cells: the new patient?, *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 713-726.
69. Yahata, N., Asai, M., Kitaoka, S., Takahashi, K., Asaka, I., Hioki, H., Kaneko, T., Maruyama, K., Saito, T. C., Nishikata, T., Asada, T., Yamanaka, S., Iwata, N., and Inoue, H. 2011. Anti-Abeta drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease, *PloS one* 6, e25788.
70. Song, B., Sun, G., Herszfeld, D., Sylvain, A., Campanale, N. V., Hirst, C. E., Caine, S., Parkinson, H. C., Tonta, M. A., Coleman, H. A., Short, M., Ricardo, S. D., Reubinoff, B., and Bernard, C. C. 2012. Neural differentiation of patient specific iPS cells as a novel approach to study the pathophysiology of multiple sclerosis, *Stem cell research* 8, 259-273.
71. Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C. B., Lam, J. T., Bott-Flugel, L., Dorn, T., Goedel, A., Hohnke, C., Hofmann, F., Seyfarth, M., Sinnecker, D., Schomig, A., and Laugwitz, K. L. 2010. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome, *The New England journal of medicine* 363, 1397-1409.
72. Carvajal-Vergara, X., Sevilla, A., D'Souza, S. L., Ang, Y. S., Schaniel, C., Lee, D. F., Yang, L., Kaplan, A. D., Adler, E. D., Rozov, R., Ge, Y., Cohen, N., Edelmann, L. J., Chang, B., Waghray, A., Su, J., Pardo, S., Lichtenbelt, K. D., Tartaglia, M., Gelb, B. D., and Lemischka, I. R. 2010. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome, *Nature* 465, 808-812.

73. Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., Feldman, O., Gepstein, A., Arbel, G., Hammerman, H., Boulos, M., and Gepstein, L. 2011. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells, *Nature* 471, 225-229.
74. Braam, S. R., Tertoolen, L., van de Stolpe, A., Meyer, T., Passier, R., and Mummery, C. L. 2010. Prediction of drug-induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, *Stem Cell Res* 4, 107-116.
75. Anson, B. D., Kolaja, K. L., and Kamp, T. J. 2011. Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology, *Clin Pharmacol Ther* 89, 754-758.
76. Leschik, J., Stefanovic, S., Brinon, B., and Puceat, M. 2008. Cardiac commitment of primate embryonic stem cells, *Nat Protoc* 3, 1381-1387.
77. Laflamme, M. A., Chen, K. Y., Naumova, A. V., Muskheli, V., Fugate, J. A., Dupras, S. K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., O'Sullivan, C., Collins, L., Chen, Y., Minami, E., Gill, E. A., Ueno, S., Yuan, C., Gold, J., and Murry, C. E. 2007. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts, *Nat Biotechnol* 25, 1015-1024.
78. Takei, S., Ichikawa, H., Johkura, K., Mogi, A., No, H., Yoshie, S., Tomotsune, D., and Sasaki, K. 2009. Bone morphogenetic protein-4 promotes induction of cardiomyocytes from human embryonic stem cells in serum-based embryoid body development, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H1793-1803.
79. Mummery, C. L., Zhang, J., Ng, E. S., Elliott, D. A., Elefanty, A. G., and Kamp, T. J. 2012. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview, *Circulation research* 111, 344-358.
80. Stevens, L. C. 1960. Embryonic potency of embryoid bodies derived from a transplantable testicular teratoma of the mouse, *Dev Biol* 2, 285-297.
81. Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium, *J Embryol Exp Morphol* 87, 27-45.
82. Hescheler, J., Fleischmann, B. K., Lentini, S., Maltsev, V. A., Rohwedel, J., Wobus, A. M., and Addicks, K. 1997. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis, *Cardiovasc Res* 36, 149-162.
83. Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. 2001. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes, *The Journal of clinical investigation* 108, 407-414.
84. He, J. Q., Ma, Y., Lee, Y., Thomson, J. A., and Kamp, T. J. 2003. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization, *Circulation research* 93, 32-39.
85. Xu, C., Police, S., Rao, N., and Carpenter, M. K. 2002. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells, *Circ Res* 91, 501-508.
86. Snir, M., Kehat, I., Gepstein, A., Coleman, R., Itskovitz-Eldor, J., Livne, E., and Gepstein, L. 2003. Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H2355-2363.
87. Singh, A. M., and Terada, N. 2007. Bypassing heterogeneity: the road to embryonic stem cell-derived cardiomyocyte specification, *Trends Cardiovasc Med* 17, 96-101.
88. Huber, I., Itzhaki, I., Caspi, O., Arbel, G., Tzukerman, M., Gepstein, A., Habib, M., Yankelson, L., Kehat, I., and Gepstein, L. 2007. Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation, *FASEB J* 21, 2551-2563.

89. Kattman, S. J., Witty, A. D., Gagliardi, M., Dubois, N. C., Niapour, M., Hotta, A., Ellis, J., and Keller, G. 2011. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines, *Cell Stem Cell* 8, 228-240.
90. Willems, E., Spiering, S., Davidovics, H., Lanier, M., Xia, Z., Dawson, M., Cashman, J., and Mercola, M. 2011. Small-molecule inhibitors of the Wnt pathway potently promote cardiomyocytes from human embryonic stem cell-derived mesoderm, *Circ Res* 109, 360-364.
91. Burridge, P. W., Anderson, D., Priddle, H., Barbadillo Munoz, M. D., Chamberlain, S., Allegrucci, C., Young, L. E., and Denning, C. 2007. Improved human embryonic stem cell embryoid body homogeneity and cardiomyocyte differentiation from a novel V-96 plate aggregation system highlights interline variability, *Stem cells* 25, 929-938.
92. Khademhosseini, A., Ferreira, L., Blumling, J., 3rd, Yeh, J., Karp, J. M., Fukuda, J., and Langer, R. 2006. Co-culture of human embryonic stem cells with murine embryonic fibroblasts on microwell-patterned substrates, *Biomaterials* 27, 5968-5977.
93. Mohr, J. C., de Pablo, J. J., and Palecek, S. P. 2006. 3-D microwell culture of human embryonic stem cells, *Biomaterials* 27, 6032-6042.
94. Mohr, J. C., Zhang, J., Azarin, S. M., Soerens, A. G., de Pablo, J. J., Thomson, J. A., Lyons, G. E., Palecek, S. P., and Kamp, T. J. 2010. The microwell control of embryoid body size in order to regulate cardiac differentiation of human embryonic stem cells, *Biomaterials* 31, 1885-1893.
95. Bauwens, C. L., Peerani, R., Niebruegge, S., Woodhouse, K. A., Kumacheva, E., Husain, M., and Zandstra, P. W. 2008. Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories, *Stem Cells* 26, 2300-2310.
96. Peerani, R., Rao, B. M., Bauwens, C., Yin, T., Wood, G. A., Nagy, A., Kumacheva, E., and Zandstra, P. W. 2007. Niche-mediated control of human embryonic stem cell self-renewal and differentiation, *EMBO J* 26, 4744-4755.
97. Mummery, C., Ward-van Oostwaard, D., Doevendans, P., Spijker, R., van den Brink, S., Hassink, R., van der Heyden, M., Ophthof, T., Pera, M., de la Riviere, A. B., Passier, R., and Tertoolen, L. 2003. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells, *Circulation* 107, 2733-2740.
98. Klug, M. G., Soonpaa, M. H., Koh, G. Y., and Field, L. J. 1996. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts, *The Journal of clinical investigation* 98, 216-224.
99. Kita-Matsuo, H., Barcova, M., Prigozhina, N., Salomonis, N., Wei, K., Jacot, J. G., Nelson, B., Spiering, S., Haverslag, R., Kim, C., Talantova, M., Bajpai, R., Calzolari, D., Terskikh, A., McCulloch, A. D., Price, J. H., Conklin, B. R., Chen, H. S., and Mercola, M. 2009. Lentiviral vectors and protocols for creation of stable hESC lines for fluorescent tracking and drug resistance selection of cardiomyocytes, *PLoS One* 4, e5046.
100. Anderson, D., Self, T., Mellor, I. R., Goh, G., Hill, S. J., and Denning, C. 2007. Transgenic enrichment of cardiomyocytes from human embryonic stem cells, *Mol Ther* 15, 2027-2036.
101. Kim, C., Majdi, M., Xia, P., Wei, K. A., Talantova, M., Spiering, S., Nelson, B., Mercola, M., and Chen, H. S. 2010. Non-cardiomyocytes influence the electrophysiological maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes during differentiation, *Stem Cells Dev* 19, 783-795.
102. Cao, F., Lin, S., Xie, X., Ray, P., Patel, M., Zhang, X., Drukker, M., Dylla, S. J., Connolly, A. J., Chen, X., Weissman, I. L., Gambhir, S. S., and Wu, J. C. 2006. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery, *Circulation* 113, 1005-1014.

103. Elliott, D. A., Braam, S. R., Koutsis, K., Ng, E. S., Jenny, R., Lagerqvist, E. L., Biben, C., Hatzistavrou, T., Hirst, C. E., Yu, Q. C., Skelton, R. J., Ward-van Oostwaard, D., Lim, S. M., Khammy, O., Li, X., Hawes, S. M., Davis, R. P., Goulburn, A. L., Passier, R., Prall, O. W., Haynes, J. M., Pouton, C. W., Kaye, D. M., Mummery, C. L., Elefanty, A. G., and Stanley, E. G. 2011. NKX2-5(eGFP/w) hESCs for isolation of human cardiac progenitors and cardiomyocytes, *Nature methods* 8, 1037-1040.
104. Dubois, N. C., Craff, A. M., Sharma, P., Elliott, D. A., Stanley, E. G., Elefanty, A. G., Gramolini, A., and Keller, G. 2011. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells, *Nature biotechnology* 29, 1011-1018.
105. Skelton, R. J., Costa, M., Anderson, D. J., Bruveris, F., Finnin, B. W., Koutsis, K., Arasaratnam, D., White, A. J., Rafii, A., Ng, E. S., Elefanty, A. G., Stanley, E. G., Pouton, C. W., Haynes, J. M., Ardehali, R., Davis, R. P., Mummery, C. L., and Elliott, D. A. 2014. SIRPA, VCAM1 and CD34 identify discrete lineages during early human cardiovascular development, *Stem Cell Res* 13, 172-179.
106. Hattori, F., Chen, H., Yamashita, H., Tohyama, S., Satoh, Y. S., Yuasa, S., Li, W., Yamakawa, H., Tanaka, T., Onitsuka, T., Shimoji, K., Ohno, Y., Egashira, T., Kaneda, R., Murata, M., Hidaka, K., Morisaki, T., Sasaki, E., Suzuki, T., Sano, M., Makino, S., Oikawa, S., and Fukuda, K. 2010. Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes, *Nat Methods* 7, 61-66.
107. Xu, X. Q., Soo, S. Y., Sun, W., and Zweigerdt, R. 2009. Global expression profile of highly enriched cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells, *Stem cells* 27, 2163-2174.
108. Sartiani, L., Bettioli, E., Stillitano, F., Mugelli, A., Cerbai, E., and Jaconi, M. E. 2007. Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach, *Stem cells* 25, 1136-1144.
109. Ma, J., Guo, L., Fiene, S. J., Anson, B. D., Thomson, J. A., Kamp, T. J., Kolaja, K. L., Swanson, B. J., and January, C. T. 2011. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301, H2006-2017.
110. Garbers, C., Hermanns, H. M., Schaper, F., Muller-Newen, G., Grotzinger, J., Rose-John, S., and Scheller, J. 2012. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines, *Cytokine & growth factor reviews* 23, 85-97.
111. Somers, W., Stahl, M., and Sehra, J. S. 1997. 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling, *The EMBO journal* 16, 989-997.
112. Hilfiker-Kleiner, D., Kaminski, K., Podewski, E., Bonda, T., Schaefer, A., Sliwa, K., Forster, O., Quint, A., Landmesser, U., Doerries, C., Luchtefeld, M., Poli, V., Schneider, M. D., Balligand, J. L., Desjardins, F., Ansari, A., Struman, I., Nguyen, N. Q., Zschemisch, N. H., Klein, G., Heusch, G., Schulz, R., Hilfiker, A., and Drexler, H. 2007. A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy, *Cell* 128, 589-600.
113. Hilfiker-Kleiner, D., Limbourg, A., and Drexler, H. 2005. STAT3-mediated activation of myocardial capillary growth, *Trends Cardiovasc Med* 15, 152-157.
114. Kunisada, K., Negoro, S., Tone, E., Funamoto, M., Osugi, T., Yamada, S., Okabe, M., Kishimoto, T., and Yamauchi-Takahara, K. 2000. Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 315-319.
115. Simpson, R. J., Hilton, D. J., Nice, E. C., Rubira, M. R., Metcalf, D., Gearing, D. P., Gough, N. M., and Nicola, N. A. 1988. Structural characterization of a murine

- myeloid leukaemia inhibitory factor, *European journal of biochemistry / FEBS* 175, 541-547.
116. Gascan, H., Godard, A., Ferez, C., Naulet, J., Praloran, V., Peyrat, M. A., Hewick, R., Jacques, Y., Moreau, J. F., and Souillou, J. P. 1989. Characterization and NH₂-terminal amino acid sequence of natural human interleukin for DA cells: leukemia inhibitory factor. Differentiation inhibitory activity secreted by a T lymphoma cell line, *The Journal of biological chemistry* 264, 21509-21515.
 117. Rathjen, P. D., Toth, S., Willis, A., Heath, J. K., and Smith, A. G. 1990. Differentiation inhibiting activity is produced in matrix-associated and diffusible forms that are generated by alternate promoter usage, *Cell* 62, 1105-1114.
 118. Haines, B. P., Voyle, R. B., and Rathjen, P. D. 2000. Intracellular and extracellular leukemia inhibitory factor proteins have different cellular activities that are mediated by distinct protein motifs, *Molecular biology of the cell* 11, 1369-1383.
 119. Nasef, A., Mazurier, C., Bouchet, S., Francois, S., Chapel, A., Thierry, D., Gorin, N. C., and Fouillard, L. 2008. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression, *Cellular immunology* 253, 16-22.
 120. Heymann, D., and Rousselle, A. V. 2000. gp130 Cytokine family and bone cells, *Cytokine* 12, 1455-1468.
 121. Shellard, J., Perreau, J., and Brulet, P. 1996. Role of leukemia inhibitory factor during mammalian development, *European cytokine network* 7, 699-712.
 122. Trouillas, M., Saucourt, C., Guillotin, B., Gauthereau, X., Taupin, J. L., Moreau, J. F., and Boeuf, H. 2009. The LIF cytokine: towards adulthood, *European cytokine network* 20, 51-62.
 123. Bamberger, A. M., Jenatschke, S., Schulte, H. M., Loning, T., and Bamberger, M. C. 2000. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates the human HLA-G promoter in JEG3 choriocarcinoma cells, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85, 3932-3936.
 124. Richards, M., Tan, S. P., Tan, J. H., Chan, W. K., and Bongso, A. 2004. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE, *Stem cells* 22, 51-64.
 125. Ginis, I., Luo, Y., Miura, T., Thies, S., Brandenberger, R., Gerecht-Nir, S., Amit, M., Hoke, A., Carpenter, M. K., Itskovitz-Eldor, J., and Rao, M. S. 2004. Differences between human and mouse embryonic stem cells, *Developmental biology* 269, 360-380.
 126. Brons, I. G., Smithers, L. E., Trotter, M. W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Howlett, S. K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. A., and Vallier, L. 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos, *Nature* 448, 191-195.
 127. Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., Gardner, R. L., and McKay, R. D. 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells, *Nature* 448, 196-199.
 128. Hirano, T., Nakajima, K., and Hibi, M. 1997. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system, *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 241-252.
 129. Ernst, M., and Jenkins, B. J. 2004. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130, *Trends in genetics : TIG* 20, 23-32.
 130. Kishimoto, T., Hibi, M., Murakami, M., Narazaki, M., Saito, M., and Taga, T. 1992. The molecular biology of interleukin 6 and its receptor, *Ciba Foundation symposium* 167, 5-16; discussion 16-23.
 131. Fischer, P., and Hilfiker-Kleiner, D. 2008. Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects, *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1, S414-427.
 132. Yamauchi-Takahara, K., and Kishimoto, T. 2000. A novel role for STAT3 in cardiac remodeling, *Trends Cardiovasc Med* 10, 298-303.

133. Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Drexler, H., Heusch, G., and Schulz, R. 2008. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure, *Pharmacol Ther* 120, 172-185.
134. Kodama, H., Fukuda, K., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Kato, T., Makino, S., Manabe, T., Murata, M., and Ogawa, S. 2000. Significance of ERK cascade compared with JAK/STAT and PI3-K pathway in gp130-mediated cardiac hypertrophy, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 279, H1635-1644.
135. Li, Y. J., Cui, W., Tian, Z. J., Hao, Y. M., Du, J., Liu, F., Zhang, H., Zu, X. G., Liu, S. Y., Xie, R. Q., Yang, X. H., Wu, Y. Z., Chen, L., and An, W. 2004. Crosstalk between ERK1/2 and STAT3 in the modulation of cardiomyocyte hypertrophy induced by cardiotrophin-1, *Chinese medical journal* 117, 1135-1142.
136. Fischer, P., and Hilfiker-Kleiner, D. 2007. Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT3 axis, *Basic research in cardiology* 102, 279-297.
137. Negoro, S., Kunisada, K., Fujio, Y., Funamoto, M., Darville, M. I., Eizirik, D. L., Osugi, T., Izumi, M., Oshima, Y., Nakaoka, Y., Hirota, H., Kishimoto, T., and Yamauchi-Takahara, K. 2001. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase, *Circulation* 104, 979-981.
138. Fujimoto, M., and Naka, T. 2003. Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules, *Trends in immunology* 24, 659-666.
139. Yasukawa, H., Sasaki, A., and Yoshimura, A. 2000. Negative regulation of cytokine signaling pathways, *Annual review of immunology* 18, 143-164.
140. Marine, J. C., McKay, C., Wang, D., Topham, D. J., Parganas, E., Nakajima, H., Pendeville, H., Yasukawa, H., Sasaki, A., Yoshimura, A., and Ihle, J. N. 1999. SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis, *Cell* 98, 617-627.
141. Shuai, K. 2006. Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins, *Cell research* 16, 196-202.
142. Liu, B., Gross, M., ten Hoeve, J., and Shuai, K. 2001. A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3203-3207.
143. Liao, J., Fu, Y., and Shuai, K. 2000. Distinct roles of the NH₂- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5267-5272.
144. Aghajanova, L., Skottman, H., Stromberg, A. M., Inzunza, J., Lahesmaa, R., and Hovatta, O. 2006. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptors is increased during differentiation of human embryonic stem cells, *Fertility and sterility* 86, 1193-1209.
145. Betz, U. A., Bloch, W., van den Broek, M., Yoshida, K., Taga, T., Kishimoto, T., Addicks, K., Rajewsky, K., and Muller, W. 1998. Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects, *The Journal of experimental medicine* 188, 1955-1965.
146. Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., Hirabayashi, T., Yoneda, Y., Tanaka, K., Wang, W. Z., Mori, C., Shioita, K., Yoshida, N., and Kishimoto, T. 1996. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 407-411.
147. Bourillot, P. Y., Aksoy, I., Schreiber, V., Wianny, F., Schulz, H., Hummel, O., Hubner, N., and Savatier, P. 2009. Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of

- mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog, *Stem Cells* 27, 1760-1771.
148. Oba, T., Yasukawa, H., Hoshijima, M., Sasaki, K., Futamata, N., Fukui, D., Mawatari, K., Nagata, T., Kyogoku, S., Ohshima, H., Minami, T., Nakamura, K., Kang, D., Yajima, T., Knowlton, K. U., and Imaizumi, T. 2012. Cardiac-specific deletion of SOCS-3 prevents development of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction, *Journal of the American College of Cardiology* 59, 838-852.
 149. Aoyama, T., Takimoto, Y., Pennica, D., Inoue, R., Shinoda, E., Hattori, R., Yui, Y., and Sasayama, S. 2000. Augmented expression of cardiotrophin-1 and its receptor component, gp130, in both left and right ventricles after myocardial infarction in the rat, *Journal of molecular and cellular cardiology* 32, 1821-1830.
 150. Latchman, D. S. 2000. Cardiotrophin-1: a novel cytokine and its effects in the heart and other tissues, *Pharmacology & therapeutics* 85, 29-37.
 151. Wang, F., Seta, Y., Baumgarten, G., Engel, D. J., Sivasubramanian, N., and Mann, D. L. 2001. Functional significance of hemodynamic overload-induced expression of leukemia-inhibitory factor in the adult mammalian heart, *Circulation* 103, 1296-1302.
 152. Matsui, H., Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., and Yamauchi-Takahara, K. 1996. Leukemia inhibitory factor induces a hypertrophic response mediated by gp130 in murine cardiac myocytes, *Research communications in molecular pathology and pharmacology* 93, 149-162.
 153. Haspel, R. L., and Darnell, J. E., Jr. 1999. A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 10188-10193.
 154. Birks, E. J., Latif, N., Owen, V., Bowles, C., Felkin, L. E., Mullen, A. J., Khaghani, A., Barton, P. J., Polak, J. M., Pepper, J. R., Banner, N. R., and Yacoub, M. H. 2001. Quantitative myocardial cytokine expression and activation of the apoptotic pathway in patients who require left ventricular assist devices, *Circulation* 104, 1233-240.
 155. Funamoto, M., Fujio, Y., Kunisada, K., Negoro, S., Tone, E., Osugi, T., Hirota, H., Izumi, M., Yoshizaki, K., Walsh, K., Kishimoto, T., and Yamauchi-Takahara, K. 2000. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes, *The Journal of biological chemistry* 275, 10561-10566.
 156. Yamauchi-Takahara, K., and Kishimoto, T. 2000. Cytokines and their receptors in cardiovascular diseases--role of gp130 signalling pathway in cardiac myocyte growth and maintenance, *International journal of experimental pathology* 81, 1-16.
 157. Trial, J., Rossen, R. D., Rubio, J., and Knowlton, A. A. 2004. Inflammation and ischemia: macrophages activated by fibronectin fragments enhance the survival of injured cardiac myocytes, *Experimental biology and medicine* 229, 538-545.
 158. Freed, D. H., Cunningham, R. H., Dangerfield, A. L., Sutton, J. S., and Dixon, I. M. 2005. Emerging evidence for the role of cardiotrophin-1 in cardiac repair in the infarcted heart, *Cardiovascular research* 65, 782-792.
 159. Cullinan, E. B., Abbondanzo, S. J., Anderson, P. S., Pollard, J. W., Lessey, B. A., and Stewart, C. L. 1996. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3115-3120.
 160. Ohnishi, S., Sumiyoshi, H., Kitamura, S., and Nagaya, N. 2007. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions, *FEBS letters* 581, 3961-3966.
 161. Noiseux, N., Gneocchi, M., Lopez-Illasaca, M., Zhang, L., Solomon, S. D., Deb, A., Dzau, V. J., and Pratt, R. E. 2006. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically

- repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14, 840-850.
162. Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S., and Epstein, S. E. 2004. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms, *Circulation research* 94, 678-685.
 163. Uemura, R., Xu, M., Ahmad, N., and Ashraf, M. 2006. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling, *Circulation research* 98, 1414-1421.
 164. Scassa, M. E., Jaquenod de Giusti, C., Questa, M., Pretre, G., Richardson, G. A., Blughermann, C., Romorini, L., Ferrer, M. F., Sevlever, G. E., Miriuka, S. G., and Gomez, R. M. 2011. Human embryonic stem cells and derived contractile embryoid bodies are susceptible to Coxsakievirus B infection and respond to interferon beta treatment, *Stem cell research* 6, 13-22.
 165. Bondue, A., and Blanpain, C. 2010. Mesp1: a key regulator of cardiovascular lineage commitment, *Circulation research* 107, 1414-1427.
 166. Naito, A. T., Shiojima, I., Akazawa, H., Hidaka, K., Morisaki, T., Kikuchi, A., and Komuro, I. 2006. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19812-19817.
 167. Schneider, V. A., and Mercola, M. 2001. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*, *Genes Dev* 15, 304-315.
 168. Hudson, J., Titmarsh, D., Hidalgo, A., Wolvetang, E., and Cooper-White, J. 2012. Primitive cardiac cells from human embryonic stem cells, *Stem cells and development* 21, 1513-1523.
 169. Lu, J., Ma, Z., Hsieh, J. C., Fan, C. W., Chen, B., Longgood, J. C., Williams, N. S., Amatruda, J. F., Lum, L., and Chen, C. 2009. Structure-activity relationship studies of small-molecule inhibitors of Wnt response, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19, 3825-3827.
 170. Jacobson, A. G., and Sater, A. K. 1988. Features of embryonic induction, *Development* 104, 341-359.
 171. Lough, J., and Sugi, Y. 2000. Endoderm and heart development, *Dev Dyn* 217, 327-342.
 172. Klaus, A., Saga, Y., Taketo, M. M., Tzahor, E., and Birchmeier, W. 2007. Distinct roles of Wnt/beta-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 18531-18536.
 173. Morkin, E. 2000. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression, *Microsc Res Tech* 50, 522-531.
 174. Edwards, J. G. 2008. Cardiac MHC gene expression: more complexity and a step forward, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H14-15.
 175. Wei, B., and Jin, J. P. 2011. Troponin T isoforms and posttranscriptional modifications: Evolution, regulation and function, *Arch Biochem Biophys* 505, 144-154.
 176. Sheng, Z., Pennica, D., Wood, W. I., and Chien, K. R. 1996. Cardiotrophin-1 displays early expression in the murine heart tube and promotes cardiac myocyte survival, *Development* 122, 419-428.
 177. Mathieu, M. E., Saucourt, C., Mournetas, V., Gauthereau, X., Theze, N., Praloran, V., Thiebaud, P., and Boeuf, H. 2012. LIF-dependent signaling: new pieces in the Lego, *Stem cell reviews* 8, 1-15.
 178. Metcalfe, S. M. 2011. LIF in the regulation of T-cell fate and as a potential therapeutic, *Genes and immunity* 12, 157-168.

179. Miyamoto, S., Murphy, A. N., and Brown, J. H. 2008. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II, *Cell death and differentiation* 15, 521-529.
180. Negoro, S., Oh, H., Tone, E., Kunisada, K., Fujio, Y., Walsh, K., Kishimoto, T., and Yamauchi-Takahara, K. 2001. Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction, *Circulation* 103, 555-561.
181. Rajasingh, J., Bord, E., Hamada, H., Lambers, E., Qin, G., Losordo, D. W., and Kishore, R. 2007. STAT3-dependent mouse embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes: analysis of molecular signaling and therapeutic efficacy of cardiomyocyte precommitted mES transplantation in a mouse model of myocardial infarction, *Circ Res* 101, 910-918.
182. Hirota, H., Chen, J., Betz, U. A., Rajewsky, K., Gu, Y., Ross, J., Jr., Muller, W., and Chien, K. R. 1999. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress, *Cell* 97, 189-198.
183. Wang, F., Trial, J., Diwan, A., Gao, F., Birdsall, H., Entman, M., Hornsby, P., Sivasubramaniam, N., and Mann, D. 2002. Regulation of cardiac fibroblast cellular function by leukemia inhibitory factor, *Journal of molecular and cellular cardiology* 34, 1309-1316.
184. Yang, X., Cohen, M. V., and Downey, J. M. 2010. Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning, *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 24, 225-234.
185. Zgheib, C., Zouein, F. A., Kurdi, M., and Booz, G. W. 2012. Differential STAT3 signaling in the heart: Impact of concurrent signals and oxidative stress, *Jak-Stat* 1, 101-110.
186. Hay, E. D. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation, *Acta anatomica* 154, 8-20.
187. Evseenko, D., Zhu, Y., Schenke-Layland, K., Kuo, J., Latour, B., Ge, S., Scholes, J., Dravid, G., Li, X., MacLellan, W. R., and Crooks, G. M. 2010. Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 13742-13747.
188. Krtolica, A., Genbacev, O., Escobedo, C., Zdravkovic, T., Nordstrom, A., Vabuena, D., Nath, A., Simon, C., Mostov, K., and Fisher, S. J. 2007. Disruption of apical-basal polarity of human embryonic stem cells enhances hematoendothelial differentiation, *Stem cells* 25, 2215-2223.
189. Lehembre, F., Yilmaz, M., Wicki, A., Schomber, T., Strittmatter, K., Ziegler, D., Kren, A., Went, P., Derksen, P. W., Berns, A., Jonkers, J., and Christofori, G. 2008. NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin, *The EMBO journal* 27, 2603-2615.
190. Ullmann, U., Gilles, C., De Rycke, M., Van de Velde, H., Sermon, K., and Liebaers, I. 2008. GSK-3-specific inhibitor-supplemented hESC medium prevents the epithelial-mesenchymal transition process and the up-regulation of matrix metalloproteinases in hESCs cultured in feeder-free conditions, *Molecular human reproduction* 14, 169-179.
191. Ng, V. Y., Ang, S. N., Chan, J. X., and Choo, A. B. 2010. Characterization of epithelial cell adhesion molecule as a surface marker on undifferentiated human embryonic stem cells, *Stem cells* 28, 29-35.
192. Zhou, Q., and Melton, D. A. 2008. Extreme makeover: converting one cell into another, *Cell stem cell* 3, 382-388.
193. Rao, M., and Gottesfeld, J. M. 2014. Introduction to thematic minireview series: Development of human therapeutics based on induced pluripotent stem cell (iPSC) technology, *The Journal of biological chemistry* 289, 4553-4554.

194. Allegrucci, C., and Young, L. E. 2007. Differences between human embryonic stem cell lines, *Human reproduction update* 13, 103-120.
195. Skottman, H., Stromberg, A. M., Matilainen, E., Inzunza, J., Hovatta, O., and Lahesmaa, R. 2006. Unique gene expression signature by human embryonic stem cells cultured under serum-free conditions correlates with their enhanced and prolonged growth in an undifferentiated stage, *Stem cells* 24, 151-167.
196. Maitra, A., Arking, D. E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassaei, K., Sui, G., Cutler, D. J., Liu, Y., Brimble, S. N., Noaksson, K., Hyllner, J., Schulz, T. C., Zeng, X., Freed, W. J., Crook, J., Abraham, S., Colman, A., Sartipy, P., Matsui, S., Carpenter, M., Gazdar, A. F., Rao, M., and Chakravarti, A. 2005. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells, *Nature genetics* 37, 1099-1103.
197. Wei, H., Tan, G., Manasi, Qiu, S., Kong, G., Yong, P., Koh, C., Ooi, T. H., Lim, S. Y., Wong, P., Gan, S. U., and Shim, W. 2012. One-step derivation of cardiomyocytes and mesenchymal stem cells from human pluripotent stem cells, *Stem cell research* 9, 87-100.
198. Xu, C., Police, S., Hassanipour, M., Li, Y., Chen, Y., Priest, C., O'Sullivan, C., Laflamme, M. A., Zhu, W. Z., Van Biber, B., Hegerova, L., Yang, J., Delavan-Boorsma, K., Davies, A., Lebkowski, J., and Gold, J. D. 2011. Efficient generation and cryopreservation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells, *Regenerative medicine* 6, 53-66.
199. Mignone, J. L., Kreuziger, K. L., Paige, S. L., and Murry, C. E. 2010. Cardiogenesis from human embryonic stem cells, *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 74, 2517-2526.
200. Lundy, S. D., Gantz, J. A., Pagan, C. M., Filice, D., and Laflamme, M. A. 2014. Pluripotent stem cell derived cardiomyocytes for cardiac repair, *Current treatment options in cardiovascular medicine* 16, 319.
201. Chong, J. J., and Murry, C. E. 2014. Cardiac regeneration using pluripotent stem cells--progression to large animal models, *Stem cell research* 13, 654-665.
202. Kouskoff, V., Lacaud, G., Schwantz, S., Fehling, H. J., and Keller, G. 2005. Sequential development of hematopoietic and cardiac mesoderm during embryonic stem cell differentiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13170-13175.
203. Ng, E. S., Davis, R. P., Azzola, L., Stanley, E. G., and Elefanty, A. G. 2005. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation, *Blood* 106, 1601-1603.
204. Yoon, B. S., Yoo, S. J., Lee, J. E., You, S., Lee, H. T., and Yoon, H. S. 2006. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment, *Differentiation; research in biological diversity* 74, 149-159.
205. Bader, A., Gruss, A., Hollrigl, A., Al-Dubai, H., Capetanaki, Y., and Weitzer, G. 2001. Paracrine promotion of cardiomyogenesis in embryoid bodies by LIF modulated endoderm, *Differentiation* 68, 31-43.
206. Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Gough, N. M. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells, *Nature* 336, 684-687.
207. Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides, *Nature* 336, 688-690.

208. Humphrey, R. K., Beattie, G. M., Lopez, A. D., Bucay, N., King, C. C., Firpo, M. T., Rose-John, S., and Hayek, A. 2004. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent, *Stem cells* 22, 522-530.
209. Daheron, L., Opitz, S. L., Zaehres, H., Lensch, M. W., Andrews, P. W., Itskovitz-Eldor, J., and Daley, G. Q. 2004. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells, *Stem cells* 22, 770-778.
210. Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J. E., Jr. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6, *Science* 264, 95-98.
211. Pan, J., Fukuda, K., Saito, M., Matsuzaki, J., Kodama, H., Sano, M., Takahashi, T., Kato, T., and Ogawa, S. 1999. Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes, *Circulation research* 84, 1127-1136.
212. Hishinuma, S., Funamoto, M., Fujio, Y., Kunisada, K., and Yamauchi-Takahara, K. 1999. Hypoxic stress induces cardiotrophin-1 expression in cardiac myocytes, *Biochemical and biophysical research communications* 264, 436-440.
213. Funamoto, M., Hishinuma, S., Fujio, Y., Matsuda, Y., Kunisada, K., Oh, H., Negoro, S., Tone, E., Kishimoto, T., and Yamauchi-Takahara, K. 2000. Isolation and characterization of the murine cardiotrophin-1 gene: expression and norepinephrine-induced transcriptional activation, *Journal of molecular and cellular cardiology* 32, 1275-1284.
214. Bader, A., Al-Dubai, H., and Weitzer, G. 2000. Leukemia inhibitory factor modulates cardiogenesis in embryoid bodies in opposite fashions, *Circulation research* 86, 787-794.
215. Liu, X., Tseng, S. C., Zhang, M. C., Chen, S. Y., Tighe, S., Lu, W. J., and Zhu, Y. T. 2015. LIF-JAK1-STAT3 Signaling Delays Contact Inhibition of Human Corneal Endothelial Cells, *Cell cycle*, 0.
216. Grosset, C., Jazwiec, B., Taupin, J. L., Liu, H., Richard, S., Mahon, F. X., Reiffers, J., Moreau, J. F., and Ripoche, J. 1995. In vitro biosynthesis of leukemia inhibitory factor/human interleukin for DA cells by human endothelial cells: differential regulation by interleukin-1 alpha and glucocorticoids, *Blood* 86, 3763-3770.
217. Ancey, C., Corbi, P., Froger, J., Delwail, A., Wijdenes, J., Gascan, H., Potreau, D., and Lecron, J. C. 2002. Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture, *Cytokine* 18, 199-205.
218. Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., Yamauchi-Takahara, K., and Kishimoto, T. 1997. Signals through gp130 upregulate bcl-x gene expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes, *The Journal of clinical investigation* 99, 2898-2905.
219. Hosoda, T. 2012. C-kit-positive cardiac stem cells and myocardial regeneration, *American journal of cardiovascular disease* 2, 58-67.
220. Conquet, F., Peyrieras, N., Tiret, L., and Brulet, P. 1992. Inhibited gastrulation in mouse embryos overexpressing the leukemia inhibitory factor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 8195-8199.
221. Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., Khvorostov, I., Ott, V., Grunstein, M., Lavon, N., Benvenisty, N., Croce, C. M., Clark, A. T., Baxter, T., Pyle, A. D., Teitell, M. A., Pelegrini, M., Plath, K., and Lowry, W. E. 2009. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures, *Cell stem cell* 5, 111-123.
222. Ghosh, Z., Wilson, K. D., Wu, Y., Hu, S., Quertermous, T., and Wu, J. C. 2010. Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells, *PLoS one* 5, e8975.
223. Marchetto, M. C., Yeo, G. W., Kainohana, O., Marsala, M., Gage, F. H., and Muotri, A. R. 2009. Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells, *PLoS one* 4, e7076.

224. Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, H., Loh, Y. H., Aryee, M. J., Lensch, M. W., Li, H., Collins, J. J., Feinberg, A. P., and Daley, G. Q. 2011. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells, *Nature biotechnology* 29, 1117-1119.
225. Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y. S., Hawkins, R. D., Nery, J. R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., Downes, M., Yu, R., Stewart, R., Ren, B., Thomson, J. A., Evans, R. M., and Ecker, J. R. 2011. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells, *Nature* 471, 68-73.
226. Newman, A. M., and Cooper, J. B. 2010. Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells, *Cell stem cell* 7, 258-262.
227. Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z. D., Ziller, M., Croft, G. F., Amoroso, M. W., Oakley, D. H., Gnirke, A., Eggan, K., and Meissner, A. 2011. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines, *Cell* 144, 439-452.
228. S, Y. A., Nao, E. E., Ndiaye, M., Taddio, J. M., Pegbessou, E. P., and Ndiaye, C. 2010. Lipoma of the soft palate: A rare anatomoclinical entity, *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases* 127, 151-152.
229. Sommer, C. A., Stadtfeld, M., Murphy, G. J., Hochedlinger, K., Kotton, D. N., and Mostoslavsky, G. 2009. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette, *Stem cells* 27, 543-549.