



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

# **Evaluación del rol de las integrinas en el proceso de diferenciación cardíaca a partir de células madre pluripotentes humanas**

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

Gabriel Neiman

Director: Dr. Santiago G. Miriuka

Consejera de estudios: Dra. Elba Vazquez

Lugar de trabajo: Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de  
la Infancia (FLENI)

Buenos Aires, 2018



## **Evaluación del rol de las integrinas en la diferenciación cardíaca a partir de células madre pluripotentes humanas**

Las células madre pluripotentes (CMP) son una herramienta clave para lograr un mayor conocimiento tanto del desarrollo embrionario como para avances científicos en el campo de la medicina regenerativa. Actualmente son utilizadas en el modelado de enfermedades, ensayos farmacológicos y en un futuro, terapias de reemplazo celular. El desarrollo de este área de investigación es posible de llevar a cabo gracias a dos propiedades de las CMP: a) Su capacidad de autorenovación y b) de diferenciación hacia las 3 capas germinales del embrión en desarrollo. Las CMP se encuentran en constante interacción con proteínas presentes en la Matriz Extracelular (MEx) a través de las integrinas. Estas son una superfamilia de receptores de adhesión celular que reconocen principalmente ligandos de la MEx y de la superficie celular.

El objetivo de esta tesis consiste en evaluar la relevancia que poseen determinadas integrinas en los diferentes estadios celulares que surgen durante la diferenciación cardíaca a partir de una línea de células madre embrionaria humana (CMEh). Desarrollamos dos modelos de diferenciación cardíaca distintos con el objetivo de obtener, en cada uno de ellos, las múltiples poblaciones mesodérmicas que se originan durante la especificación (progenitor mesodérmico, progenitor cardíaco y cardiomiocitos inmaduro) y caracterizar su dinámica de aparición mediante la presencia de marcadores moleculares. En segundo lugar, analizamos el perfil de expresión de diferentes subunidades de integrinas en los estadios celulares antes mencionados. En este caso se observaron cambios en los niveles de expresión de las integrinas en las diferentes poblaciones celulares durante la diferenciación cardíaca. Por último, evaluamos el rol de la integrina  $\alpha 5$  mediante la manipulación de su expresión en la diferenciación cardíaca. Para esto, establecimos una línea de silenciamiento inducible en nuestra línea de CMEh mediante el uso de una variante del sistema CrispR-Cas9. El silenciamiento de la integrina  $\alpha 5$  en el estadio inicial de la diferenciación afectó la dinámica

de aparición del progenitor mesodérmico lo cual derivó en una menor eficiencia de obtención de células cardíacas.

Nuestros resultados sugieren que la presencia o ausencia de las distintas integrinas contribuye a la diferenciación específica, primero hacia linaje mesodérmico y finalmente a cardiomiocitos mediante la regulación diferencial de la expresión de las diferentes subunidades de integrinas.

Palabras Clave: Células madre embrionarias humanas, Diferenciación Cardíaca, Cardiomiocitos, Integrinas.

# **Evaluation of the role of integrins during cardiac differentiation from human pluripotent stem cells**

Pluripotent stem cells provide an invaluable tool for studying embryonic development and also, for regenerative medicine: disease modeling, drug screening, and prospectively, cell-replacement therapies. PSC are capable of unlimited undifferentiated proliferation in vitro and the ability to differentiate into the three embryonic germ layers. Stem cells and ECM have a close multifunctional relationship. The engagement of stem cells with their surrounding extracellular matrix (ECM) through integrins act as a crucial control mechanism of stem cell function. Integrins are a superfamily of adhesion molecules, are non-covalently-associated  $\alpha/\beta$  heterodimers that mediate cell–cell, cell–extracellular matrix interactions by binding to distinct ligands.

In this thesis, the main goal was to study how important are specific integrins in different multipotent mesoderm-committed populations during cardiac differentiation from human embryonic stem cells (hESC). First, we developed two different protocols of cardiac differentiation in order to identify different mesoderm populations through the presence of typical molecular markers of each stage (mesodermal progenitor, cardiac progenitor and cardiomyocytes). Then, we characterized in depth the levels of integrins expression in cell populations described before. We show a different regulation of integrins expression in mesoderm-committed populations, suggesting that are relevant to get an efficient cardiac specification.

Finally, we assessed the role of integrin  $\alpha 5$  by manipulating transcription in cardiac differentiation. We generated an inducible hESC line through a variant of crispr-cas9 system where we are able to repress the expression of this integrin subunit. Knockdown of integrin  $\alpha 5$  during first stage of mesoderm commitment altered the generation of the mesodermal progenitor and this led to a lower efficiency of cardiac differentiation protocol. Our results indicate that the presence or absence of specific

integrins contribute to specific differentiation, first to mesoderm commitment and then to cardiomyocytes through a differential regulation of integrin expression.

Keywords: Human embryonic stem cells, cardiac differentiation, cardiomyocytes, integrins.

## AGRADECIMIENTOS

Durante estos cinco años de doctorado me acompañaron y ayudaron muchas personas y a todas ellas quiero agradecerles.

A Santiago por las buenas ideas, aconsejarme a lo largo del doctorado y por dar la confianza y la libertad necesaria. A Ale, por la buena onda, siempre dispuesta a dar ideas y una mano en lo que que hiciera falta. A Gustavo, por el continuo apoyo del FLENI en el doctorado.

A todo el gran grupo divertido del labo, cada día mas grande: Agus, Alan, Anto, Ale, Celes, Cyn, Darío, Guada, Leo, Lu, Marie, Marce, Nati, Sofi, Oli, Olivier, Willy, Vero y los que siguieron llegando. En especial a Xime, amiga desde el día 0 de estos 5 años, siempre haciendo catarsis doctoral juntos. A Wais amigo desde siempre y del último año doc, por darme una mano con en el procesamiento de resultados. A Sole, siempre de buen humor y por las infinitas charlas en nuestro auto y a Charly, por la ayuda tan importante en el principio del doctorado.

A todo el grupo de Ale en Ciudad universitaria, por la buena onda siempre que necesitábamos ir a su labo.

A toda la gente que conocí en la Universidad y en Rio de Janeiro. En especial a Fer Mesquita, a Adriana Bastos de Carvalho y Antonio Campos de Carvalho por la oportunidad de trabajar en su grupo y ayudarme en todo lo que necesitaba.

A todos mis amigos de la facultad: Lau, Lele, Meli, LuMa, Pame, Anita, Angie, LuRo, Cin, Fer, Wais y Dani por los grandes momentos divertidos durante y después de la carrera.

A mis históricos amigos de la secundaria: Andre, Lu, Chris, Diego, Juan, Fran y mas.

A mi familia por estar siempre ahi y apoyarme en todo. A mis viejos Diana y Guille, a mi hermana Meli, a Sebas, al gran nuevo integrante Nahuelito y a toda la familia extendida, abuelos, tíos, primos.



# Índice general

Evaluación del rol de las integrinas en la diferenciación cardíaca a partir de células madre pluripotentes humanas . . . . .	I
Evaluation of the role of integrins during cardiac differentiation from human pluripotent stem cells . . . . .	III
Agradecimientos . . . . .	V
Abreviaturas . . . . .	XI
<b>1. Introducción . . . . .</b>	<b>1</b>
1.1. Células Madre Pluripotentes humanas (CMPH): Un avance fundamental para la Medicina Regenerativa . . . . .	1
1.1.1. Células Madre humanas: origen, diferencias y similitudes . . . . .	1
1.1.2. Diferentes sistemas de cultivo <i>in vitro</i> de las CMPH . . . . .	4
1.1.3. Diferenciación de las CMPH . . . . .	6
1.1.4. Diferenciación a células cardíacas: Recapitular lo ocurrido en el desarrollo embrionario . . . . .	9
1.2. Las integrinas y su interacción con la Matriz Extracelular . . . . .	13
1.2.1. La Matriz Extracelular y su función en las CMPH . . . . .	13
1.2.2. Que son las integrinas? . . . . .	15
1.2.3. Cambios conformacionales de las integrinas y vías de señalización . . . . .	19
1.2.4. El nicho de las CMPH y su relación con las integrinas . . . . .	22
1.3. Represión de la transcripción mediada por Cas9-KRAB en CMPH . . . . .	25
<b>2. Hipótesis y Objetivos . . . . .</b>	<b>29</b>

<b>3. Modelos de diferenciación cardíaca y sus diferentes estadios celulares de compromiso mesodérmico</b> . . . . .	31
3.1. CMEh HES3 y su estado pluripotente, paso inicial clave para la diferenciación cardíaca . . . . .	31
3.2. CMEh HES3 NKX2.5 <sup>eGFP/w</sup> : Herramienta clave para la selección de progenitores cardíacos y cardiomiocitos . . . . .	33
3.3. Modelo de diferenciación cardíaca a partir de la formación de cuerpos embrioides . . . . .	34
3.4. Modelo de diferenciación cardíaca a partir de la formación de una monocapa celular megaconfluente . . . . .	39
3.5. Cierre del capítulo . . . . .	44
<b>4. Caracterización de las integrinas y sus principales ligandos en la diferenciación cardíaca</b> . . . . .	46
4.1. Caracterización de subunidades $\alpha$ de integrinas y de sus ligandos a lo largo de la diferenciación cardíaca a partir de la formación de cuerpos embrioides . . . . .	47
4.1.1. Establecimiento del protocolo para el disgregado exitoso de cuerpos latidores . . . . .	47
4.1.2. Caracterización de subunidades de integrinas $\alpha 5$ , $\alpha 8$ y su ligando fibronectina durante la diferenciación cardíaca . . . . .	48
4.1.3. Caracterización de subunidades de integrinas $\alpha 3$ , $\alpha 6$ y los diferentes subtipos de laminina durante la diferenciación cardíaca . . . . .	51
4.2. Caracterización de las subunidades de integrinas y de sus ligandos a lo largo de la diferenciación cardíaca a partir de una monocapa celular megaconfluente . . . . .	57
4.2.1. Caracterización de las subunidades de integrinas $\alpha 4$ , $\alpha 5$ , $\alpha 8$ y su ligando fibronectina durante la diferenciación cardíaca . . . . .	58

4.2.2.	Caracterización de subunidades de integrinas $\alpha 3$ , $\alpha 6$ y las diferentes subunidades de laminina durante la diferenciación cardíaca . . . . .	62
4.2.3.	Caracterización de la subunidad de integrina $\beta 1$ durante la diferenciación cardíaca . . . . .	66
4.3.	Cuadro comparativo de la dinámica temporal de expresión de las subunidades de integrinas en ambos protocolos de diferenciación cardíaca	67
4.4.	Cierre del Capítulo . . . . .	69
<b>5.</b>	<b>Silenciamiento de la expresión de la integrina <math>\alpha 5</math> durante la TEM en la diferenciación cardíaca . . . . .</b>	<b>70</b>
5.1.	Generación de la línea de CMEh HES3 NKX2.5 <sup>eGFP/w</sup> KRAB <sup><math>\alpha 5</math></sup> . . . . .	70
5.1.1.	Obtención y verificación de los plásmidos TRE-dCas9/KRAB y U6-gRNA . . . . .	70
5.1.2.	Transducción de la línea HES3 NKX2.5 <sup>eGFP/w</sup> con ambos plásmidos lentivirales . . . . .	72
5.2.	Estudios funcionales en la línea HES3 NKX2.5 <sup>eGFP/w</sup> KRAB <sup><math>\alpha 5</math></sup> y en su diferenciación a cardiomiocitos . . . . .	78
5.2.1.	Evaluación de la tasa de proliferación y apoptosis en el estado indiferenciado. . . . .	78
5.2.2.	Evaluación de la diferenciación cardíaca a partir del silenciamiento de la integrina $\alpha 5$ durante la TEM . . . . .	81
5.3.	Cierre del Capítulo . . . . .	92
<b>6.</b>	<b>Discusión . . . . .</b>	<b>93</b>
6.1.	Cultivo de las CMEh y su diferenciación cardíaca . . . . .	94
6.2.	Caracterización de integrinas durante el proceso de diferenciación cardíaca. . . . .	96
6.3.	Silenciamiento de la integrina $\alpha 5$ durante la TEM en la diferenciación cardíaca. . . . .	99
6.4.	Próximos experimentos a desarrollar . . . . .	102

<b>7. Conclusiones</b>	104
7.1. Dinámica de expresión de las integrinas durante el proceso de diferenciación cardíaca	104
7.2. El silenciamiento de la integrina $\alpha 5$ durante la TEM altera la dinámica de aparición del progenitor mesodérmico y la obtención de cardiomiocitos inmaduros	105
<b>8.</b>	106
8.1. Cultivo celular de CMEh y su diferenciación cardíaca	106
8.2. Vectores utilizados y preparación de DNA plasmídico	110
8.3. Generación de líneas de CMEh modificadas genéticamente	112
8.4. Inmunofluorescencia y citometría de flujo	115
8.5. Estudio de la proliferación y la apoptosis	118
8.6. Extracción de RNA, RT y PCR	119
8.7. Análisis Estadísticos	121
8.8. <i>Primers</i> utilizados	122
<b>Bibliografía</b>	125

## ABREVIATURAS

- bFGF: *basic Fibroblast Growth Factor*
- BMP4: *Bone Marrow Factor 4*
- CME: Células Madre Embrionarias
- CMEh: Células Madre Embrionarias humanas
- CMP: Células Madre Pluripotentes
- CMPH: Células Madre Pluripotentes humanas
- CMPi: Células Madre Pluripotentes inducidas
- CRISPR: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
- cTnT: Cardio Troponina T
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico
- dNTPS: desoxi-ribonucleótidos-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- DOX: Doxiciiclina
- E-cad: E-cadherina
- eGFP: *enhanced Green Fluorescence Protein*
- gRNA: RNA guía
- GSK3: Glucógeno-Sintetasa Quinasa 3
- iMEF: Fibroblastos Murinos Embrionarios irradiados
- KRAB: *Krüppel associated box*
- LP: Línea Primitiva
- RNA: Ácido Ribonucleico
- mRNA: Ácido Ribonucleico mensajero
- MEx: Matriz Extracelular
- MHC- $\alpha$ :  *$\alpha$ -Myosin Heavy Chain*
- MFI: Mediana de la Intensidad de Fluorescencia

qPCR: Reacción en Cadena de la polimerasa Cuantitativa

RT-qPCR: *Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction*

ROCKi: Inhibidor de Rho Kinasa

SFB: Suero Fetal Bovino

TEM: Transición Epitelio-Mesenquimal

TRE: Elemento Respondedor a Tetraciclina

TSS: *Transcription Start Site*

# 1. INTRODUCCIÓN

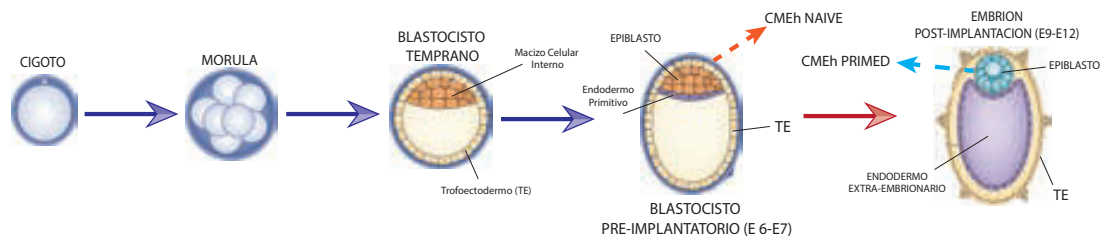
## 1.1. Células Madre Pluripotentes humanas (CMP<sub>h</sub>): Un avance fundamental para la Medicina Regenerativa

Las células madre pluripotentes (CMP) son en la actualidad una herramienta clave para lograr un mayor conocimiento tanto del desarrollo embrionario como para avances científicos en el campo de la medicina regenerativa. Actualmente son utilizadas en el modelado de enfermedades, ensayos farmacológicos y en un futuro, terapias de reemplazo celular. Incluso, recientemente, ha ganado importancia el desarrollo de organoides, pequeñas estructuras tridimensionales que buscan simular el desarrollo de los órganos [1].

El avance en estas novedosas áreas de investigación es posible de llevar a cabo gracias a dos importantes propiedades que poseen las CMP: a) Su capacidad de autorenovación y b) de diferenciación hacia las 3 capas germinales del embrión en desarrollo (ectodermo, mesodermo y endodermo). Para una mejor comprensión de las CMP, se describirá en la siguiente sección las distintas clases de células madre existentes, como se obtienen y cuales son sus similitudes y diferencias.

### 1.1.1. Células Madre humanas: origen, diferencias y similitudes

Las células madre, cuya principal característica es la auto-renovación y la diferenciación, pueden ser derivadas a partir de diferentes estadios del embrión en desarrollo (Figura 1.1). Una manera útil de clasificar a las células madre es a partir de su potencial de diferenciación. Diferentes ensayos que evalúan esta capacidad,

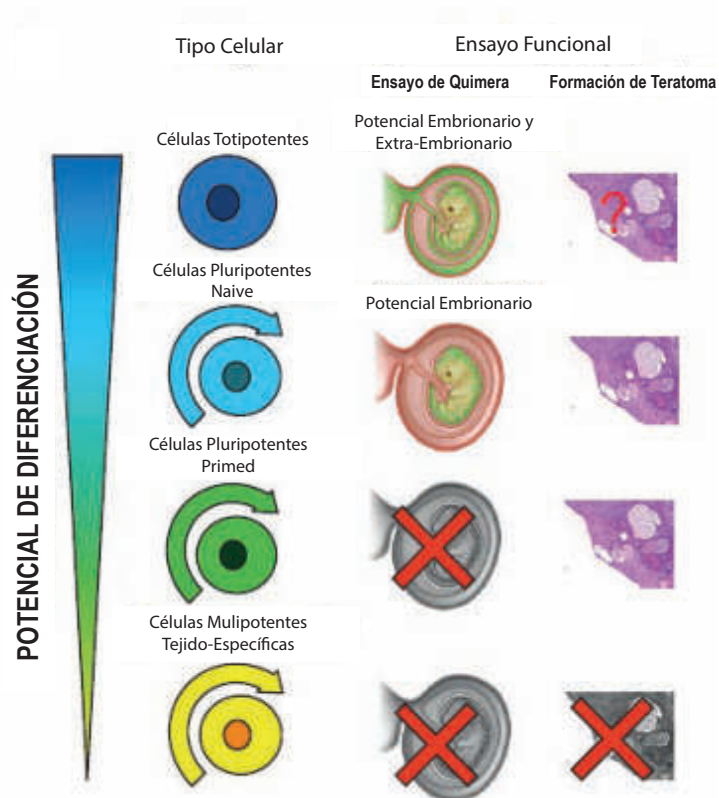


**Fig. 1.1:** Desarrollo del embrión desde la formación del cigoto hasta la aparición del embrión post-implantatorio. Las CMEh Naive son obtenidas del embrión pre-implantatorio y las CMEh Primed son derivadas a partir del epiblasto del embrión post-implantatorio. Adaptada de De los Angeles y Col. [2].

tales como la formación de teratomas y de quimeras en ratón son utilizados para determinar el potencial de diferenciación de las diferentes clases de células madre existentes [2] (Figura 1.2):

- Las Células Totipotentes, como el cigoto, tienen la capacidad de desarrollar tanto tejidos embrionarios como extra-embrionarios.
- Las Células Pluripotentes humanas *naive* poseen la capacidad de conversión a todos los tipos celulares de un individuo adulto y pertenecen a un estadio temprano del epiblasto embrionario pre-implantatorio.
- Las Células Pluripotentes humanas *primed* son aquellas que convencionalmente se las identifica como CMPH y pertenecen a un estadio más tardío. Se obtienen del epiblasto embrionario post-implantatorio.
- Las Células Multipotentes (como las células madre hematopoyéticas) tienen la capacidad de diferenciarse hacia tipos celulares diferentes pero relacionados con el tejido de origen.
- Las Células Unipotentes son aquellas que tienen la potencialidad para diferenciarse a un solo tipo celular.





**Fig. 1.2:** Esquema de los diferentes tipos de células madre existentes agrupadas acorde a su potencial de diferenciación. Dos tipos de ensayos fundamentales para su clasificación: ensayo de quimera y ensayo de formación de teratomas [2].

Las CMEh *primed* son aquellas que han ganado mayor protagonismo en la investigación científica debido a que fueron las primeras en ser cultivadas. En este tipo celular se encuentran ampliamente reportados los métodos de derivación y de cultivo *in vitro*. En los últimos años ha crecido el campo de investigación relacionado a las CMEh *naive*, sin embargo, aún se encuentra en investigación como obtener este tipo celular y el método para mantener este cultivo en un estado indiferenciado homogéneo. La ventaja de esta clase de CMEh consistiría en que es un estado aún más indiferenciado e hipometilado, por lo que la especificación hacia los distintos tipos celulares debería ser igual de eficiente, independientemente del embrión de donde

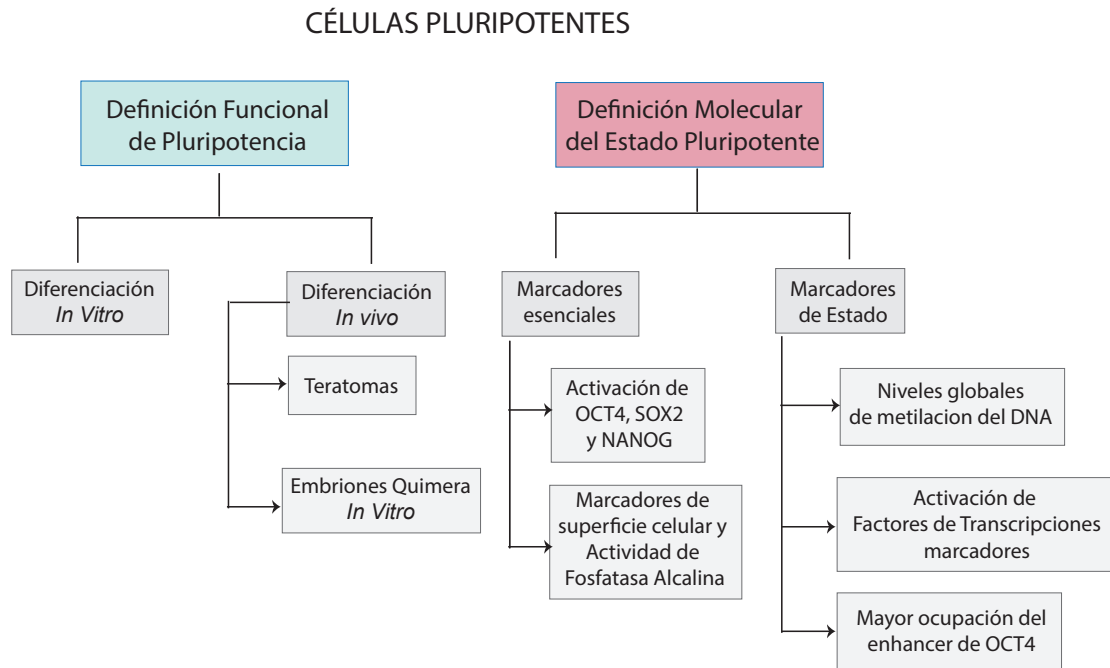
provenga el tipo celular en estudio.

Por otro lado, hace aproximadamente 12 años se describió la reprogramación de células somáticas adultas al estado pluripotente mediante la expresión ectópica de factores de transcripción maestros (Oct3/4, Sox2, cMYC y KLF4). A esta clase se la denominó células madre pluripotentes inducidas (CMPi), siendo uno de los avances más importantes en este campo dado que solucionó diferentes problemas que conlleva el uso de las CMEh. En primer lugar, la dificultad ética de trabajar con embriones humanos y además, evita el potencial rechazo del tejido celular luego del trasplante en pacientes [3]. Desde el punto de vista de su capacidad de diferenciación, poseen propiedades similares a las CMEh *primed*.

Entonces, actualmente existen dos tipos de CMPh: Las CMEh y las hCMPi. A continuación describiremos brevemente las principales características que las definen tanto a nivel molecular como funcional (Figura 1.3). A nivel molecular, las CMPh expresan una serie de factores de transcripción esenciales (entre ellos OCT4, SOX2 y NANOG) que estimulan la expresión de genes necesarios para mantener el estado indiferenciado e inhiben otros relacionados a la diferenciación. También expresan marcadores de superficie propios de este tipo celular, poseen actividad de fosfatasa alcalina, presentan una ocupación preferencial del enhancer de OCT4 e hipermetilación del DNA. Por último, las CMPh mantienen un cariotipo diploide estable y alta actividad de la enzima telomerasa por largo plazo durante su propagación *in vitro* [4]. A nivel funcional, como mencionamos anteriormente, deben tener la capacidad de generar los tres linajes embrionarios tanto *in vitro* como *in vivo*.

### **1.1.2. Diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de las CMPh**

Inicialmente las CMPh eran cultivadas en un medio que contenía 20 % de suero fetal bovino (SFB) y se utilizaba como sustrato una capa de fibroblastos murinos embrionarios irradiados (iMEF, del inglés *mouse embryonic fibroblasts*) [5]. Luego,



**Fig. 1.3:** Características fundamentales a nivel funcional y molecular que definen a las CMPH. Adaptada de De los Angeles y Col. [2]

a medida que se profundizaba el conocimiento acerca de las CMPH, se desarrolló un suplemento más definido que actuaba como reemplazo del SFB y permitía mantener las células en un estado indiferenciado más homogéneo. Además se comenzó a tratar los cultivos con diferentes factores adicionales como *Basis Fibroblast Growth Factor* (bFGF), el cual permitía mantener las células en estado indiferenciado por tiempos prolongados. A lo largo de los últimos años, mayoritariamente se ha migrado al uso de sustratos definidos libres de componentes derivados de animales. Estos se encuentran mayoritariamente conformados por proteínas estructurales de la matriz extracelular (MEx), como laminina [6]. Además, junto con estos sustratos, se utilizan medios comerciales que solo cuentan con los factores esenciales para el mantenimiento homogéneo de las CMPH. Esta combinación de medio y sustrato definido ha mejorado de manera importante el cultivo de las CMPH, aunque encarecido el costo.

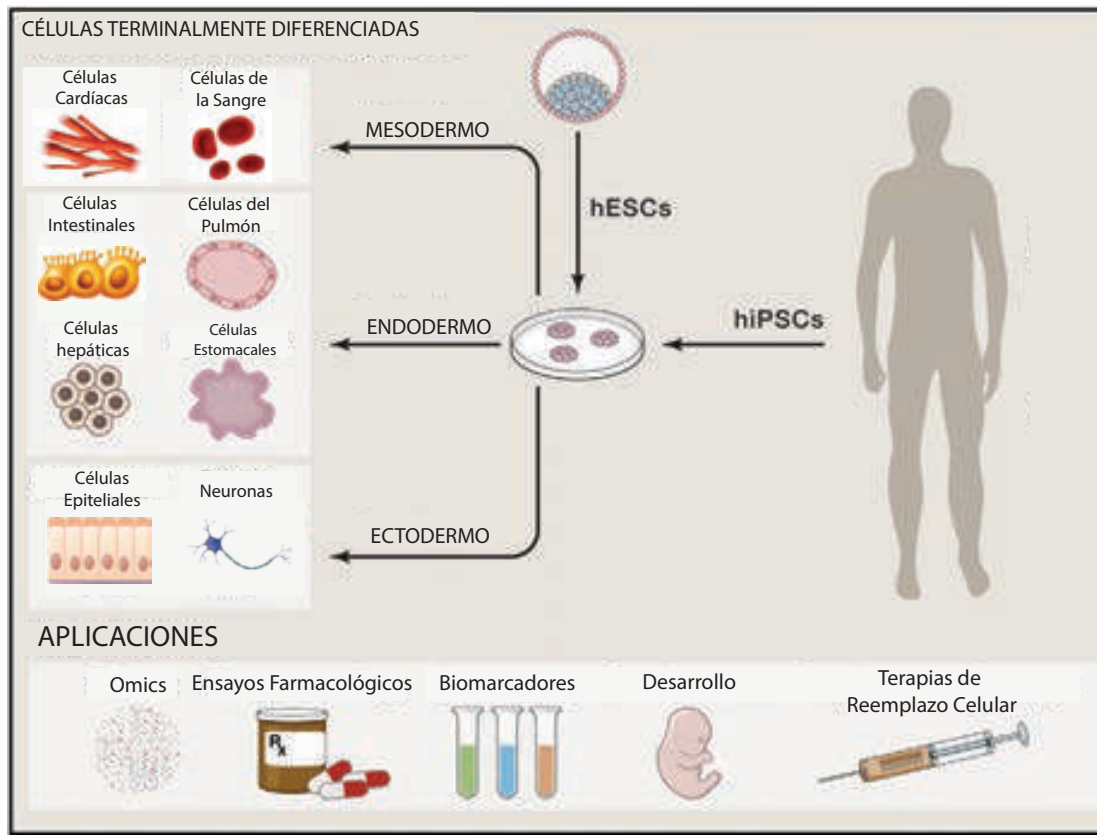
### 1.1.3. Diferenciación de las CMPh

La posibilidad de mantener las CMPh en un estado indiferenciado homogéneo por largo plazo permitió avanzar en el desarrollo de protocolos de diferenciación hacia cientos de tipos celulares distintos que se encuentran presentes en un individuo adulto.

En primer lugar, con esta nueva herramienta fue posible estudiar en profundidad la diferenciación desde la perspectiva de la biología del desarrollo al utilizar investigaciones ya realizadas en otros modelos animales. Debido a esto se buscó recapitular en un cultivo *in vitro* los eventos clave que regulan el compromiso hacia los diferentes linajes en el embrión [7]. Es importante resaltar, como mencionamos anteriormente, que este sistema experimental además es visto como una fuente ilimitada de células y tejidos para terapias de reemplazo celular y para el modelado de distintas enfermedades (Figura 1.4).

A medida que transcurrió el tiempo de investigación en este área de estudio, distintos tipos de métodos fueron generados para iniciar la diferenciación específica hacia distintos tipos celulares adultos a partir de CMPh. El primero consiste en la formación de agregados tridimensionales llamados cuerpos embrioides y el segundo parte de una monocapa celular sobre un sustrato definido. El primero tiene la ventaja de proveer una estructura tridimensional que favorece las interacciones entre células mientras que en el segundo método mencionado hay un menor efecto de las células vecinas y es técnicamente más sencillo [8].

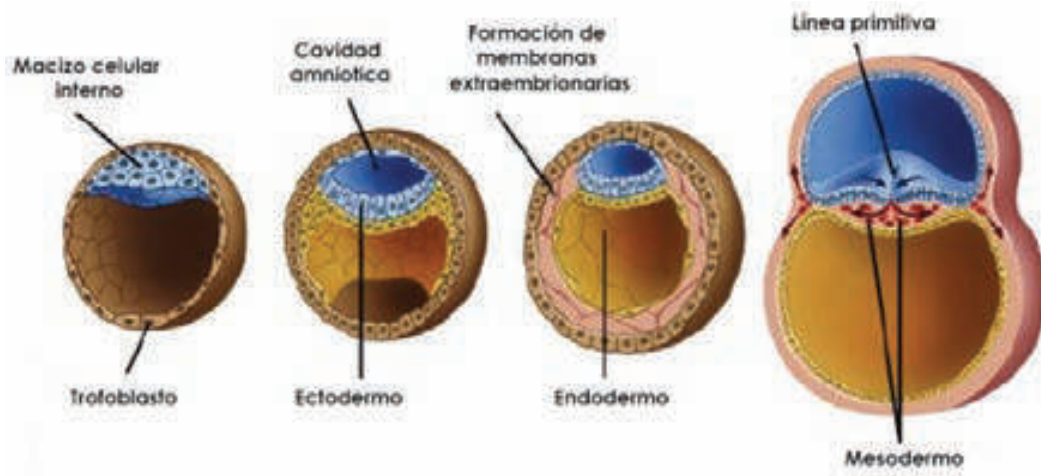
Como describimos anteriormente, la estrategia más exitosa para la diferenciación de CMPh consiste en recapitular lo que ocurre en el desarrollo embrionario. Cuando los factores que mantienen el cultivo en estado pluripotente son removidos, estas se diferencian y bajo condiciones apropiadas, generan derivados de las tres capas germinales: mesodermo, endodermo y ectodermo [8]. Durante el desarrollo embrionario, en el proceso de gastrulación emergen estos tres linajes que luego se reorganizarán



**Fig. 1.4:** Diferentes tipos celulares obtenidos a partir de CMPh y sus potenciales aplicaciones. Adaptada de Wu y col. [1]

dando lugar a todos los órganos del individuo (Figura 1.5). En mamíferos, el comienzo de la gastrulación está marcado por la formación de una estructura transitoria denominada línea primitiva en la región del epiblasto [9]. Análisis moleculares y estudios de mapeo de linaje han definido las regiones anterior, posterior y media de la línea primitiva. Estas regiones difieren tanto en los patrones de expresión génicos así como en su potencial de desarrollo.

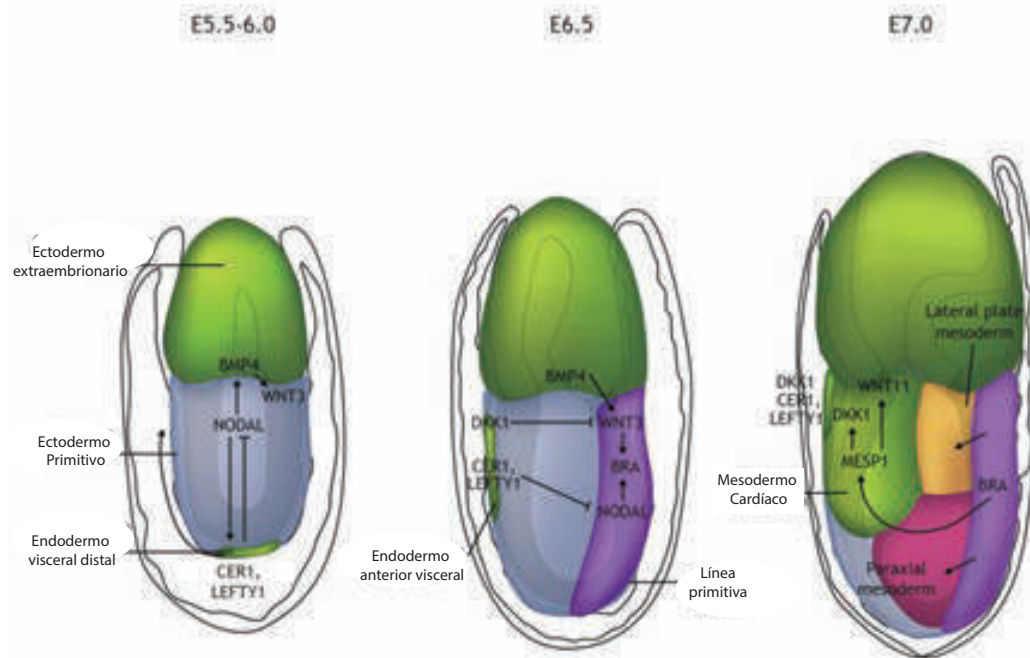
La especificación de las distintas subpoblaciones es controlada tanto espacialmente como temporalmente. Genes como *Brachyury* [11] son expresados a lo largo de toda la línea primitiva mientras que otros son solo preferencialmente expresados en la región posterior (como *HoxB1*) o en la región anterior (*Foxa2*) [12]. A medi-



**Fig. 1.5:** Esquema de la gastrulación en mamíferos. Establecimiento de las tres capas embrionarias luego de la gastrulación [10].

da que la gastrulación prosigue en el tiempo se da una mayor especificación de los linajes: en diferentes regiones a lo largo de la línea primitiva surge el mesodermo cardíaco y craneal y el endodermo definitivo mientras que el ectodermo deriva de una región del epiblasto que no ingresa en la línea primitiva [13]. Entonces, la segregación temporal y espacial observada durante la gastrulación sugiere que diferentes regiones de la línea primitiva o cercanas a esta, constituyen un ambiente de señalización que es responsable de la inducción de los distintos linajes. Diferentes estudios han demostrado que factores de crecimiento de la familia BMP [14] y Nodal [15] así como miembros de la familia de Wnt [16] son esenciales para el desarrollo.

A partir de estos conocimientos se buscó evaluar si las vías de señalización estudiadas podrían ser recapituladas en estos cultivos *in vitro* obteniendo células representativas de los diferentes tipos de linajes. Por ejemplo, algunos de los experimentos realizados demostraron que la señalización por Activina A conduce a una inducción eficiente del endodermo definitivo mientras que al inducir con BMP4, se promueve la aparición del linaje mesodérmico [13]. Todos estos avances han permitido generar



**Fig. 1.6:** El ratón, como un modelo de cardiogénesis humana. Adaptada de Burridge y Col. [17]

numerosos protocolos de diferenciación específicos con el fin de obtener diferentes tipos celulares adultos a partir de CMPh.

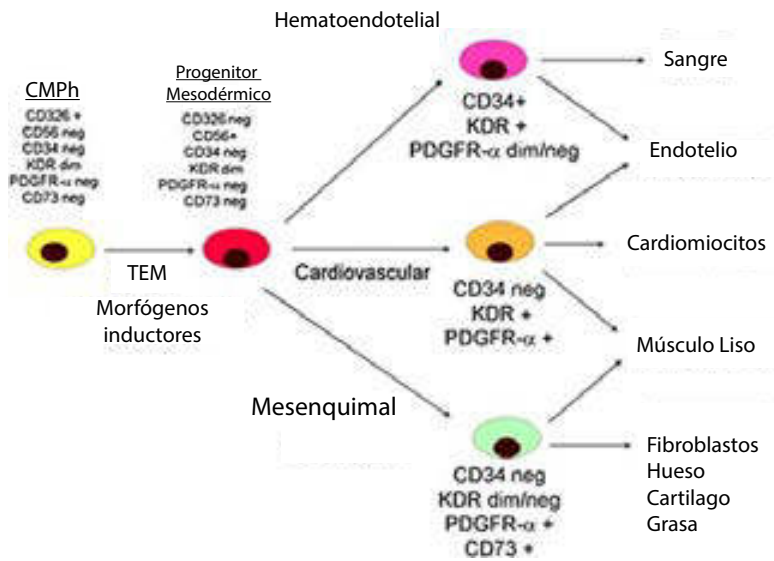
#### 1.1.4. Diferenciación a células cardíacas: Recapitular lo ocurrido en el desarrollo embrionario

Los linajes cardíacos, vascular, hematopoyético y de músculo esquelético derivan de subpoblaciones de mesodermo inducido en un patrón temporal definido. Como mencionamos anteriormente, entender los mecanismos que regulan la inducción mesodérmica es indispensable para lograr obtener cada uno de estos tipos celulares [13]. A pesar de que se ha avanzado mucho en el conocimiento del desarrollo embrionario por medio del uso de las CMPh, aún deben ser estudiados en mayor profundidad los eventos más tempranos de la especificación hacia los diferentes linajes.

A lo largo de los últimos años se ha logrado describir con mayor profundidad el modelo de cardiogénesis, el cual es altamente similar en humano y ratón (Figura 1.6). La cardiogénesis se inicia con la generación de mesodermo mediante el proceso de gastrulación descrito anteriormente. En el día 5 (E5.0) del embrión de ratón, la señalización de NODAL en el epiblasto proximal mantiene la expresión de BMP4 en el ectodermo extraembrionario (adyacente al epiblasto), el cual induce la expresión de WNT3 en el epiblasto proximal promoviendo la aparición de la línea primitiva. Aproximadamente en E5.5, aumenta la expresión de los antagonistas de WNT (DKK1) y NODAL (Lefty1 y Cer1) restringiendo la señalización de estas dos vías al epiblasto posterior [17]. En E5.75, WNT induce la expresión de marcadores mesoendodérmicos como Brachyury T y se inicia la transición epitelio-mesenquimal (TEM). Este proceso es muy importante durante el desarrollo debido a que ocurren grandes cambios transcripcionales que desencadenan la activación de vías de señalización diferentes que modifican la arquitectura de los tejidos, la morfología celular, la adhesión y la capacidad migratoria. El progenitor mesodérmico obtenido luego de la TEM pierde expresión de aquellas proteínas de membrana que generan la adhesión entre células y aumenta la presencia de todas aquellas relacionadas con un fenotipo migratorio. Este progenitor es capaz de diferenciarse a cualquier tipo celular mesodérmico y posee algunos marcadores moleculares característicos como KDR, PDFGR- $\alpha$  y CD56 (N-cam). Este último fue descrito en un trabajo más reciente [18] donde se lo menciona como un marcador que permite aislar realmente al progenitor mesodérmico ya que es esta subpoblación, la única capaz de diferenciarse a cualquier tipo celular de este linaje (Figura 1.7).

Finalmente, genes vinculados a la diferenciación mesodérmica y a la TEM como Fgf4 y Fgf8 son expresados e inducen un incremento en los niveles de MESP1, gen regulador maestro de la especificación a progenitor cardiaco [19] [20]. Este último conduce la diferenciación mediante el inicio de vías de señalización que promueven





**Fig. 1.7:** Diferentes tipos celulares adultos obtenidos a partir de la diferenciación del progenitor mesodérmico [18].

el silenciamiento de la vía canónica WNT/Beta-catenin, lo que resalta el carácter bifásico que posee esta vía en la diferenciación cardíaca [21]. Luego, río abajo de MESP1, la cardiomiogénesis continúa mediante la expresión de una compleja red de factores interactuantes como Nkx2-5, Mef2X, Gata4, entre otros [22]. A partir de este punto, la especificación continúa hasta el desarrollo final del corazón pero no es el objetivo de este trabajo ahondar en los estadios más tardíos.

### Diferenciación a células cardíacas a partir de CMPH: Diferentes modelos utilizados

Los conocimientos para diferenciar CMPH de manera dirigida han progresado considerablemente en los últimos 10 años. Uno de los primeros métodos de diferenciación específica utilizados involucraba el co-cultivo de CMPH con células del endodermo visceral de ratón, las cuales generaban las señales de diferenciación necesarias para la inducción mesodérmica. Este método era poco eficiente pero mostró generar

cardiomiocitos de tipo ventricular [23]. Además, proveyó de los primeros conceptos para la diferenciación, como por ejemplo, la remoción del SFB y su reemplazo por factores específicos para llevarla a cabo.

Actualmente, dos métodos básicos para la diferenciación cardíaca de CMPH son ampliamente utilizados: i) la formación de cuerpos embrioides y ii) el cultivo a partir de una monocapa megaconfluente. Las diferentes versiones de cada método se basan en una secuencia progresiva de ambientes inductores utilizando factores de crecimiento y/o pequeñas moléculas. El primer método que se realizó mediante la formación de cuerpos embrioides involucró el crecimiento de estos en un medio conteniendo 20 % SFB y a lo largo de la diferenciación se formaban los agregados esféricos. Esta técnica producía tipos celulares diferenciados de los tres linajes embrionarios, incluyendo cardiomiocitos en un porcentaje que iba desde el 5 % al 15 % [24]. Estos protocolos han sido mejorados mediante el agregado de factores definidos como aquellos reportados en el desarrollo embrionario o utilizando pequeñas moléculas que inhiben las vías de señalización [25]. Los modelos de diferenciación que parten de la formación de cuerpos embrioides son técnicamente complejos lo cual ha llevado al desarrollo de protocolos de diferenciación que se inician con una monocapa celular donde las CMPH son cultivadas en alta densidad [26]. Este último método pudo ser desarrollado eficientemente gracias a la aparición de medios definidos enriquecidos en los factores necesarios para mantener el estado indiferenciado de las CMPH, los cuales permiten lograr la megaconfluencia celular necesaria de la monocapa y así poder comenzar el protocolo de diferenciación cardíaca. A su vez, a partir del estudio de las distintas cascadas de señalización activadas por factores como BMP4 o Activina A durante el desarrollo embrionario, se comenzaron a utilizar pequeñas moléculas que actúan directamente sobre las vías de señalización, lo cual evita el uso de morfógenos para llevar a cabo la diferenciación cardíaca [27] [28].

A modo de conclusión general, estos estudios demuestran que la importancia de

---

la incubación de las CMPH con distintos factores de crecimiento a tiempo y concentraciones específicas son esenciales para la diferenciación dirigida a mesodermo temprano y luego hacia un destino cardíaco más específico [17].

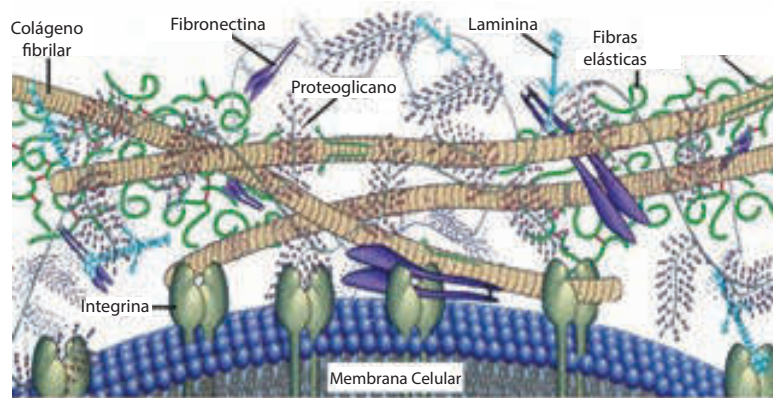
## **1.2. Las integrinas y su interacción con la Matriz Extracelular**

### **1.2.1. La Matriz Extracelular y su función en las CMPH**

Las células de tejidos y órganos específicos se encuentran embebidas en una estructura secretada por las mismas células, la matriz extracelular. Es una estructura tridimensional, compleja, compuesta por diferentes moléculas que pueden ser divididas en dos grandes grupos: i) proteínas estructurales y ii) proteoglicanos, que incluye los glicosaminoglicanos, responsables de señalización celular, principalmente en procesos regulatorios durante el desarrollo (Figura 1.8) [29].

La MEx no solo provee integridad estructural sino que también actúa como un sustrato para la migración, regula activamente la morfología celular, el desarrollo y la función metabólica [30]. A pesar de que la mayoría de las proteínas estructurales de la MEx se encuentran bien descritas y caracterizadas, la distribución espacio-temporal de estas en los diferentes tejidos continúa siendo investigada. Uno de los mayores desafíos en el campo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa consiste en estudiar exhaustivamente sus componentes con el objetivo de reemplazar tejidos y órganos dañados [31].

Las proteínas estructurales más importantes que la componen son colágenos, elastinas, lamininas y fibronectina. Una de sus principales funciones consiste en proveer una estructura fundamental dentro de la cual las células del tejido sean capaces de unirse o migrar pero también cumplen un rol determinante en la activación de vías de señalización relacionadas con la proliferación, diferenciación, entre otras fun-



**Fig. 1.8:** Esquema representativo de la composición de la MEx indicando la unión de esta a las células y sus principales componentes estructurales [32].

ciones. Estas proteínas estructurales se encuentran conectadas al citoesqueleto de las células por medio de las integrinas. Estas últimas cumplen un rol esencial en la función regulatoria de las células y serán descritas con mas detalle en la próxima sección [33].

La laminina es parte de la membrana basal y esta involucrada en la adhesión, la migración, el crecimiento y la diferenciación celular. Existen 11 genes distintos distribuidos en diferentes cromosomas que codifican para las 11 subunidades de laminina: 5 subunidades  $\alpha$ , 3 subunidades  $\beta$  y 3 subunidades  $\gamma$ . Solo 16 combinaciones de las 3 subunidades han sido sugeridas e incluso un número aún menor han podido ser purificadas [34] (Figura 1.9). Las lamininas muestran una distribución tejido específica con variación en su composición durante el desarrollo. Se ha demostrado que el heterotrímero de laminina 111 se encuentra mayormente expresado en el embrión, mientras que en el adulto se reduce a un pequeño subconjunto de membranas basales [35]. En contraste, la laminina 511 es prácticamente ubicua y la laminina 521 se encuentran mayormente presente en el organismo adulto [36].

Otra proteína estructural importante es la fibronectina, la cual existe en forma soluble e insoluble y se une a las integrinas así como también a otros componentes

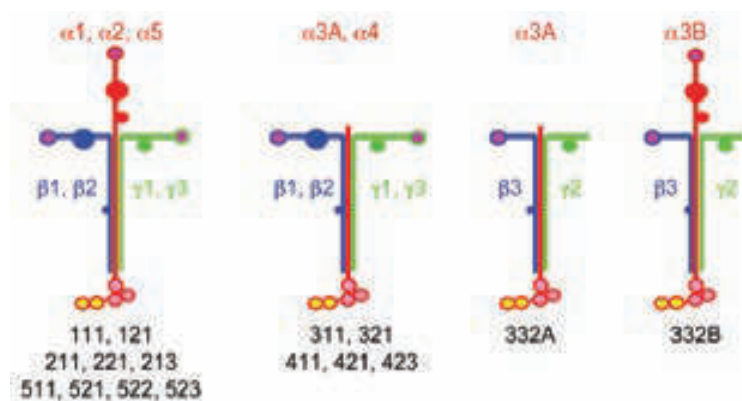
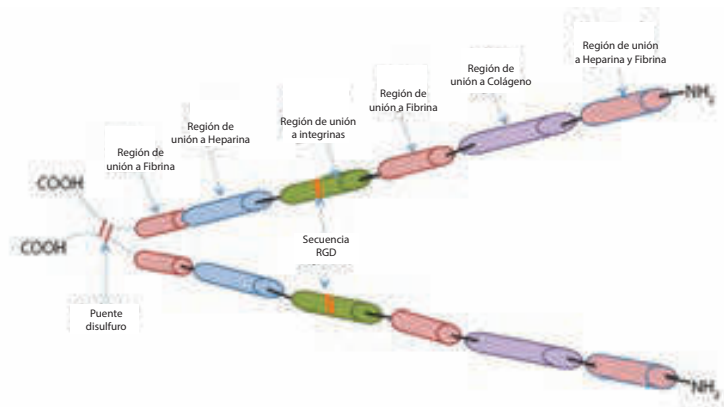


Fig. 1.9: Heterótrimeros de laminina descritos o predichos [34]

de la MEx. Su rol mas importante está relacionado con la adhesión y la migración celular [37]. Usualmente, la fibronectina es un dímero compuesto por dos subunidades iguales y existen múltiples variantes de esta proteína que se generan por *splicing* alternativo (Figura 1.10). Además, análisis exhaustivos han mostrado que la región involucrada en la adhesión celular esta compuesta por pequeñas secuencias reconocidas por las integrinas. Una de las mas conocidas es la secuencia tripeptídica RGD y su reconocimiento no solo depende de ella, sino también de su presentación tridimensional [38]. Por último, diversos trabajos mostraron que la fibronectina es particularmente importante durante el desarrollo embrionario dado que una mutación que inactivó la expresión funcional de este gen resultó ser letal en ratón. Se observó además que su expresión es particularmente crucial en el desarrollo embrionario normal de estructuras vasculares [39].

### 1.2.2. Que son las integrinas?

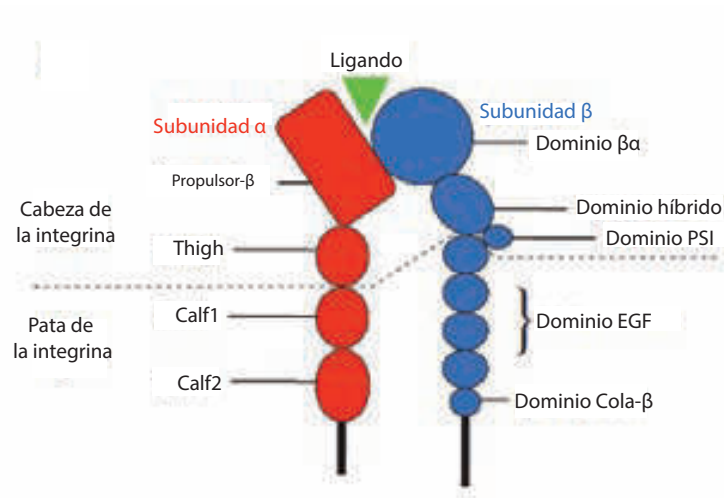
La complejidad y la diversidad estructural y funcional de las integrinas permite a esta familia de moléculas de adhesión tener un rol clave en una gran cantidad de contextos diferentes: inflamación, homeostasis, morfogénesis de tejidos, cicatrización



**Fig. 1.10:** La fibronectina es un dímero de glicoproteína formado por dos péptidos iguales unidos por un puente disulfuro [37].

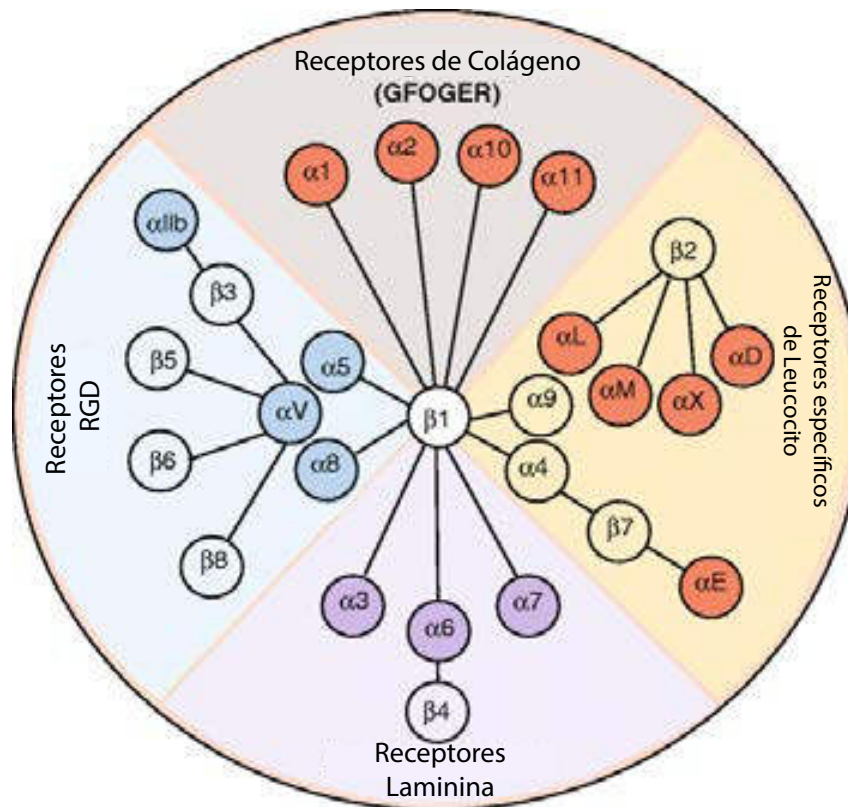
de heridas, en la regulación del crecimiento celular y la diferenciación [40].

Las integrinas son una superfamilia de receptores de adhesión celular que reconocen principalmente ligandos de la MEx y de la superficie celular. Ellas son heterodímeros transmembrana  $\alpha\beta$  que en humanos pueden formar 24 tipos de integrinas diferentes, las cuales surgen de una asociación no covalente entre una de las 18 subunidades  $\alpha$  y una de las 8 subunidades  $\beta$  existentes [41] (Figura 1.11). Estos dos tipos de subunidades son totalmente distintas, con homología no detectable entre ellas. La identidad de secuencia entre subunidades  $\alpha$  es de aproximadamente un 30 % mientras que entre las subunidades  $\beta$  es de un 45 %, lo cual indicaría que ambas familias de subunidades evolucionaron por duplicación génica [42]. A su vez, cada subunidad posee un gran dominio extracelular, una estructura de hélice que se despliega dentro de la membrana celular y una corta cola citoplasmática. El tamaño de las diferentes subunidades varía pero típicamente la subunidad  $\alpha$  posee alrededor de 1000 aminoácidos mientras que la subunidad  $\beta$  consta de 750 aminoácidos.



**Fig. 1.11:** Esquema del heterodímero de integrina [43].

La región extracelular de la subunidad  $\alpha$  está compuesta principalmente por un dominio denominado Propulsor  $\beta$ , el cual consiste de 8 láminas  $\beta$  dispuestas alrededor de un eje central y el sitio de interacción con el ligando se ubica a menudo en la hendidura formada en el centro del propulsor. Este se encuentra conectado a otros dominios llamados *Thigh*, *Calf1* y *Calf2*. Los primeros dos conforman la cabeza de la integrina y los dos últimos conforman la pata. Es de suma importancia destacar que esta subunidad es la que determina la especificidad por el ligando. Existen 9 clases de integrinas  $\alpha$  que contienen, además, un dominio I que posee la capacidad de interactuar con el ligando afín. Este se encuentra presente en el grupo de integrinas que interactúan con la subunidad  $\beta 2$ , en la subfamilia de integrinas que se une a colágeno ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 10$ , y  $\alpha 11$ ) y en la integrina  $\alpha E\beta 7$  (Figura 1.12). Por otro lado, también se encuentran los tipos de subunidad  $\alpha$  que no poseen el dominio I y reconocen el motivo RGD del ligando ( $\alpha V$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 8$  y  $\alpha IIb$ ). Finalmente, la tercera clase de subunidades está compuesta por aquellas que se unen a laminina



**Fig. 1.12:** Representación de la familia de integrinas. En vertebrados, esta familia se encuentra conformada por 24 heterodímeros. Las subunidades representadas en naranja poseen el dominio  $\alpha I$ , las celestes reconocen el dominio RGD del ligando y las violetas son aquellas que tienen su mayor afinidad por diferentes tipos de laminina [44].

( $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ , y  $\alpha 7$ ) [44]. A lo largo de este trabajo, haremos especial hincapié en aquellas subunidades de unión a fibronectina y laminina.

La subunidad  $\beta$  también consta de varios dominios diferentes y tiene una menor participación a la hora de determinar la afinidad por el sustrato. Su cola citoplásmica se encuentra altamente vinculada a proteínas citoesqueléticas por lo que esta subunidad tiene un rol importante en la activación de distintas cascadas de señalización. Por otro lado, contiene un dominio  $\beta 1$  que promueve la activación de la integrina [43].

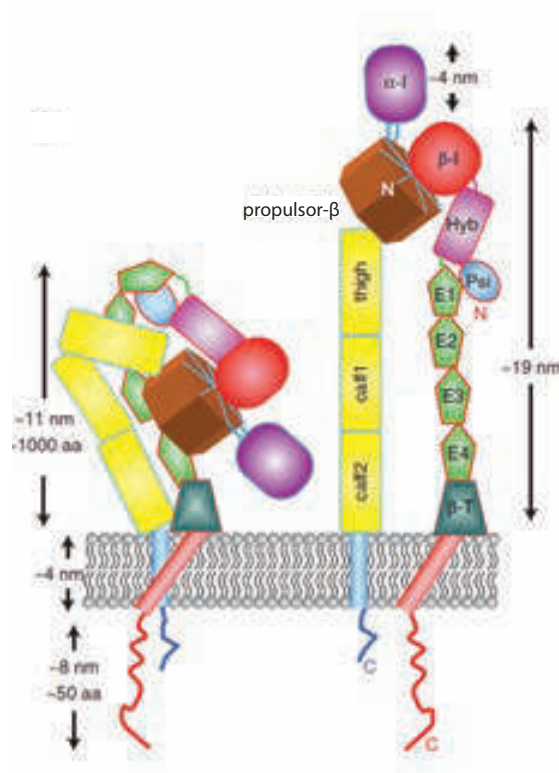


### 1.2.3. Cambios conformacionales de las integrinas y vías de señalización

#### Cambios en la conformación de las integrinas influyen sobre su nivel de activación

Los diferentes heterodímeros de integrinas adoptan diferentes conformaciones acorde a su afinidad por el ligando y a la señalización intracelular. Sin embargo, existe gran controversia acerca de la relación entre los diferentes grados de plegamiento y la afinidad por el ligando observada [45]. A partir de trabajos reportados, existe un consenso general en que los heterodímeros de integrinas adoptan múltiples conformaciones, las cuales son funcionalmente relevantes. El análisis estructural de los dominios extracelulares postula que al menos se observaron dos conformaciones distintas (Figura 1.13). La primera de ellas es la forma plegada donde la región de afinidad por el ligando se encuentra en dirección hacia la membrana celular, presumiblemente se trata de la forma inactiva de la integrina [46]. La segunda estructura sería una en que la integrina posee una mayor actividad y se encuentra totalmente desplegada, donde la región que interactúa con el ligando aparece expuesta [47]. Sin embargo, actualmente hay cierta discusión acerca de los cambios que se dan entre las dos estructuras. Es decir, si existen más conformaciones que estas dos y si cada una de ellas está relacionada con una diferente afinidad por el ligando y por ende, relacionadas a distintos niveles de activación [45].

Por otro lado, las causas por las que las integrinas cambian de conformación son diversas. En primer lugar, existe una señalización externa dada por la interacción con las proteínas y los factores presentes en la MEx que puede promover estos cambios en la estructura. Un trabajo reveló que la tensión mecánica generada por la MEx consolida un estado activo de la integrina en una conformación más abierta y con una mayor afinidad por el ligando [43]. Otro caso interesante es el de la integrina



**Fig. 1.13:** Esquema que muestra los dos tipos de conformaciones que pueden adoptar los heterodímeros de integrinas. A la izquierda se observa la conformación plegada y a la derecha la conformación abierta [45].

$\alpha 5 \beta 1$ , donde la tensión mecánica induce una mayor interacción con la fibronectina y esto lleva a un aumento de la fosforilación de la proteína FAK [48]. Es decir, los estímulos provenientes del exterior celular influyen sobre las vías de señalización que se activan. En segundo lugar la cola citoplasmática de las integrinas se encuentra altamente vinculada con proteínas que inician diferentes cascadas de señalización y también con aquellas que remodelan el citoesqueleto, por lo que cambios intracelulares también pueden repercutir en la conformación que adoptan las integrinas y en su afinidad con el ligando. La proteína Talin es clave para el cambio de conformación, dado que esta se une a la cola citoplasmática de la subunidad  $\beta$ , lo cual causa una relajación de la estructura inactiva y permite un desplegado incipiente de la región

que interactúa con el ligando, comenzando a modificar su nivel de actividad [49]. Por último, también se encuentra postulado, aunque con cierta discusión actual, que estos cambios en la señalización intracelular provocan una disposición diferente de la cola citoplásmica de la subunidad  $\beta$  alrededor de la cola de la subunidad  $\alpha$ , lo cual colabora en una activación de la integrina diferente [50].

A modo de resumen, luego de activadas, las integrinas sufren cambios conformaciones que involucran el desplegamiento del receptor. Sin embargo, la evidencia que comienza a surgir muestra que el grado de activación es dependiente del tipo de integrina y del ligando. Además, existirían conformaciones intermedias entre la plegada y la abierta que pueden ser funcionalmente relevantes. Cabe aclarar, que existe una gran diversidad de tipos de integrinas, las cuales poseen funciones muy distintas, por lo que lo explicado aquí son conceptos generales que aplican al comportamiento y la función de todas ellas.

### **Las integrinas y sus vías de señalización**

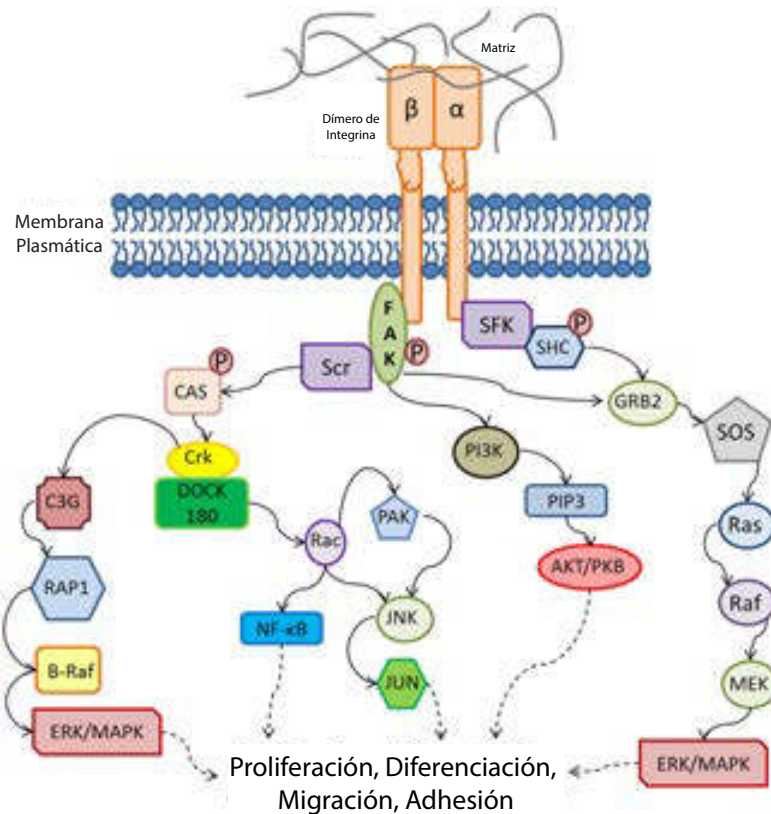
Como mencionamos anteriormente, las integrinas son aquellos receptores que reciben las señales de las proteínas estructurales de la MEx, debiendo traducir este mensaje hacia el interior de las células. Este proceso descansa en el nexo existente entre las integrinas y el citoesqueleto a través de su cola citoplásmica y permite la transmisión bidireccional de la información [51] [52]. Además del rol mecánico en el anclaje a la MEx, las integrinas transmiten señales químicas intracelulares, proveyendo información sobre su localización, el ambiente local, el estado adhesivo y sobre la matriz que la rodea. Estos mensajes determinan respuestas como la migración, la supervivencia y la diferenciación [53]. Este diálogo bidireccional requiere una dinámica temporal y espacial de ensamblaje y desensamblaje de complejos multiproteicos que se forman alrededor de las colas citoplásmicas de estos receptores. En diferentes trabajos se describió que existe una red de 156 componentes que forman el adheso-

ma de las integrinas [54]. En esta sección describiremos brevemente las principales proteínas señalizadoras que forman parte de este adhesoma (Figura 1.14).

En la región citoplasmática adyacente a la membrana celular se forman complejos focales pequeños, los cuales son estructuras multiproteicas que contienen a las integrinas y actúan como el puente de unión entre la actina intracelular y las proteínas estructurales de la MEx. Estas uniones focales aportan el espacio donde ocurre el reclutamiento citoplasmático de una red de proteínas que interactúan entre ellas [55]. Simultáneamente a la unión del ligando con la integrina, las proteínas *Talin* y *Kindlin* son reclutadas a la cola citoplasmática de la subunidad  $\beta$  [56]. A partir de la activación de las integrinas, estas tienden a agruparse y se generan múltiples conexiones proteicas con las fibras de actina a través de la proteína *Talin*, lo cual provee un punto de inicio para el ensamblaje del adhesoma. Una de las primeras proteínas de señalización reclutada es la Kinasa de Adhesión Focal (FAK) que se une a *Talin* y *Paxilin*. Esta kinasa es crucial dado que se encuentra involucrada en múltiples vías de señalización y actúa como un integrador de todas las señales, siendo entonces quien dispara la respuesta celular. Río abajo de la proteína FAK, son reclutadas otras proteínas como Src y PI3K y se producen sucesivas fosforilaciones que promueven el reclutamiento de otras proteínas de señalización conformando el adhesoma en su totalidad [57]. Por consiguiente, la activación del complejo FAK-Src induce cascadas de señalización que dan diferentes respuestas para la supervivencia, la diferenciación, la motilidad y la progresión del ciclo celular.

#### **1.2.4. El nicho de las CMPH y su relación con las integrinas**

A partir de lo detallado en las secciones anteriores, solo resta describir cuales son los principales avances que se encuentran reportados acerca de la importancia de las integrinas a la hora de mantener las CMPH en su característico estado indiferenciado o en estimular la diferenciación hacia algún linaje específico [58].



**Fig. 1.14:** Diagrama que ilustra las distintas vías de señalización que pueden encenderse luego de la activación de las integrinas por su ligando [55].

*In vivo*, las células madre adultas residen como células quiescentes en lugares específicos de muchos órganos, los cuales se definen como nichos. Estos les proveen un ambiente protegido y finamente controlado para el mantenimiento a largo plazo. *In vitro*, las CMP pueden crecer indefinidamente bajo condiciones controladas de cultivo y también forman su propio nicho conformado principalmente por MEx. Inicialmente, las CMP<sub>h</sub> eran cultivadas sobre iMEF y esta capa nutricia le aportaba los factores necesarios y la MEx inicial sobre la cual adherirse, crecer y secretar su propio nicho. En este sistema, múltiples tipos de integrinas se encuentran activadas dada la gran variedad de proteínas estructurales de MEx que se encuentran pre-

sentes [6]. Sin embargo, en los últimos años, diferentes grupos de investigación han desarrollado métodos para recrear un nicho artificial. A partir de esto fue posible cultivar directamente las CMPH sobre moléculas purificadas de la MEx tales como Vitronectina, Fibronectina o Laminina [59] [60]. Bajo estas condiciones de cultivo, las proteínas de la MEx activan un subconjunto de integrinas diferentes que estarán comprometidas en la función del mantenimiento del estado indiferenciado. De hecho, en diversos trabajos se ha reportado que CMPH cultivadas sobre Geltrex (enriquecido en laminina) se unen principalmente a través de la integrinas  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha 6\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  [61]. Por otro lado, si se las cultiva sobre Fibronectina, se activa el receptor  $\alpha 5\beta 1$  mientras que sobre vitronectina el nexo se da principalmente vía la integrina  $\alpha V\beta 5$  [62] [63]. Como último punto, es importante destacar que si las CMPH son cultivadas sobre gelatina o sin sustrato, las integrinas no se encuentran activas dado que no están presentes las proteínas estructurales con las que estas interactúan y el cultivo de CMPH se diferencia [58] [64]. Por consiguiente, el repertorio de integrinas expresadas por las CMPH sobre componentes específicos de la MEx ha mostrado ser restringido y dependiente del sustrato presente.

De mucha mayor complejidad y desconocimiento resulta el análisis del rol que tienen las integrinas en los diferentes procesos de diferenciación de las CMPH. Se encuentra reportado que la integrina  $\alpha 5\beta 1$  podría tener un rol importante en el progenitor mesodérmico. Publicaciones anteriores mostraron que la mutación de la integrina  $\alpha 5$  conduce a defectos mesodérmicos en la embriogénesis del ratón [65]. Mas tarde, otro grupo diseñó materiales sintéticos conteniendo ligandos insolubles para esta integrina. Si el ligando se encontraba presente ocurría la inducción mesodérmica mientras que si estaba ausente no sucedía este proceso de diferenciación [66]. Esto podría sugerir que la activación de esta integrina modula la expresión de BMP4, factor esencial para la inducción mesodérmica. A pesar de estos avances, los trabajos realizados en este área aún son escasos y requieren un mayor estudio para

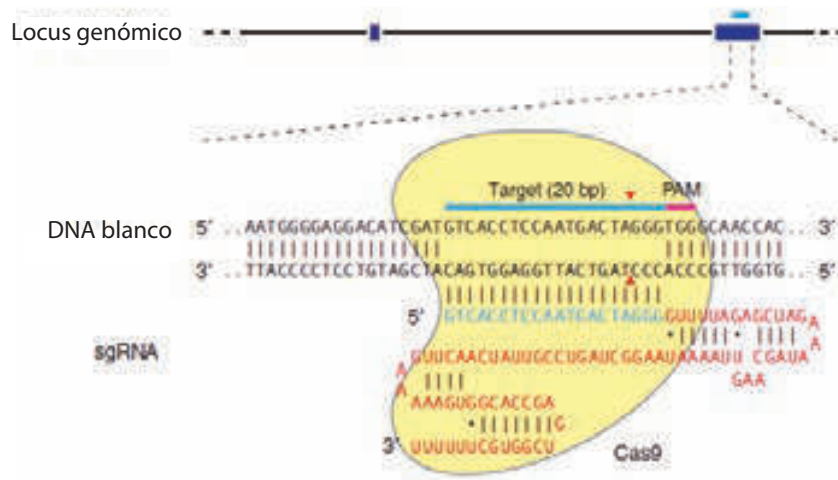
su elucidación [67]. Por último, otras publicaciones sugieren que tanto la subunidad  $\alpha 6A$  como las subunidades  $\beta 4$  y  $\beta 5$  ganan preponderancia en las células cardíacas [68].

### 1.3. Represión de la transcripción mediada por Cas9-KRAB en CMPh

Con el objetivo de entender el rol biológico de diversos genes en el desarrollo y en enfermedades, debemos decifrar la relación entre genotipo y fenotipo. Hasta hace pocos años, RNAi ha sido el método más comúnmente usado como herramienta para observar la pérdida de función en el estudio de la biología humana [69]. Sin embargo, este método posee algunas desventajas como el efecto de *off-targets* e incompleto silenciamiento del gen deseado. En 2012, surgió la tecnología de CRISPR como una nueva herramienta para la edición génica. El sistema CRISPR/Cas9 está conformado por dos componentes: un RNA guía (gRNA) que provee la especificidad al blanco y una proteína (Cas9) que actúa como una helicasa y una nucleasa para desplegar y cortar el DNA blanco. En este sistema, la única restricción es la secuencia motivo PAM ("NGG" en el caso de SpCas9), que debe situarse adyacente a nuestro gen blanco [70] (Figura 1.15).

Esta actividad nucleasa de CRISPR (CRISPRn) ha sido utilizada para ensayos de gran escala con el fin de identificar genes asociados con la viabilidad celular en CMP [72]. Sin embargo, CRISPRn no es el sistema más robusto para los estudios de pérdida de función debido a que es limitado por aquellas células dentro de una población que no producen un fenotipo *knock-out* [73]. Además, los fenotipos de pérdida o ganancia de función pueden ser parciales, lo cual dificulta la lectura del resultado final.

Más recientemente, se generó una versión desactivada de la nucleasa (dCas9) que

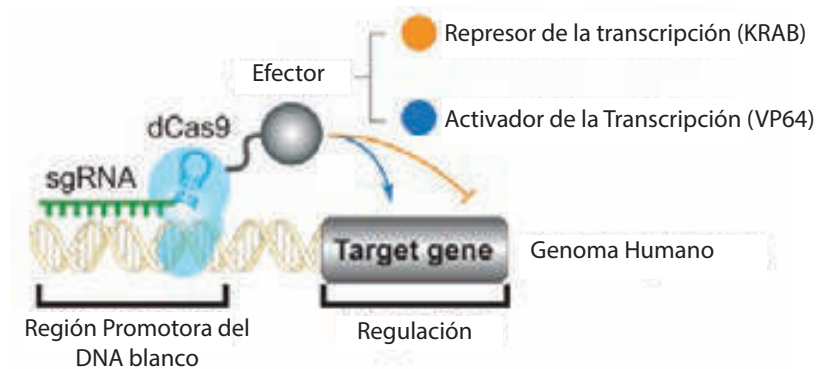


**Fig. 1.15:** Esquema de la nucleasa Cas9 conducida a un gen blanco por el gRNA de 20 pares de bases [71].

puede ser fusionada a distintos dominios efectores que le proveen una funcionalidad diferente a este sistema. En nuestro trabajo, la proteína dCas9 utilizada, se encuentra fusionada al dominio represor KRAB (del inglés, *Krüppel associated box*), el cual produce una interferencia transcripcional eficiente [74] [75]. Uno de los objetivos para los cuales se diseñó esta tecnología denominada CRISPRi (interferencia de CRISPR) reside en reprimir eficientemente la expresión de genes con el fin de estudiar la diferenciación temprana o modelar enfermedades en CMPH (Figura 1.16).

En este sistema, dCas9-KRAB fue localizado río abajo de un promotor inducible que responde al antibiótico procarionta Doxiclina (TRE, del inglés *tetracycline responsive element*). Entonces dCas9-KRAB se expresa cuando este antibiótico se encuentra presente mientras que el gRNA está regulado por un promotor constitutivo (Figura 1.17). Debido a que el desarrollo embrionario consiste de una serie de eventos secuenciales que se dan en puntos temporales precisos a partir de la re-

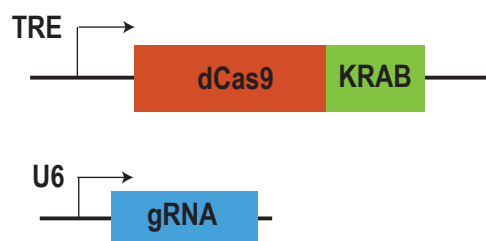




**Fig. 1.16:** Sistema donde dCas9 se encuentra fusionada a un dominio efector y es conducido al gen blanco por un gRNA. Este efector puede ser un represor (KRAB) o un activador (VP64) de la transcripción. Adaptada de Kearns y Col. [74]

presión o activación de genes específicos, este sistema sería especialmente útil para investigar la importancia de la expresión de distintos genes en momentos puntuales de la diferenciación.

En los diferentes trabajos donde se puso a punto este sistema experimental se tuvieron en cuenta algunos criterios con el fin de que el silenciamiento inducible sea exitoso. En primer lugar, el gRNA debe ser diseñado en las regiones cercanas al sitio de inicio de la transcripción (TSS, del inglés *transcription start site*), usualmente 150 pares de bases río arriba o abajo de este. A medida que el gRNA se aleja de este



**Fig. 1.17:** Construcciones utilizadas para generar la línea de CMPh estable dCas9-KRAB

sitio, la eficiencia del silenciamiento disminuye. Como último punto, la inducción del silenciamiento es reversible pero según se encuentra reportado, la recuperación de la expresión total de la proteína puede demorar aproximadamente 10 días [74] [76].

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A lo largo de la introducción destacamos la complejidad y la importancia que posee la arquitectura de la MEx. Las proteínas estructurales que la componen actúan como una fuente de señales que desencadenan cambios en la proliferación, diferenciación y la migración, entre otras funciones. Actualmente, uno de los objetivos importantes en el área de las células madre consiste en investigar la relación existente entre las CMPh y las proteínas de la MEx. Las principales preguntas que buscan ser respondidas se refieren a la manera en que se traducen las señales provenientes de la MEx dentro de las células, cómo las diferentes clases de integrinas presentes decodifican este mensaje y si los diferentes grados de contacto entre las proteínas de la MEx y las integrinas influyen en la diferenciación específica de las CMPh hacia distintos tipos celulares.

En función de estas preguntas desarrollamos nuestra hipótesis que buscará ser respondida a lo largo de este trabajo: Las diferentes clases de integrinas se unen a distintas proteínas estructurales de la MEx, lo cual resulta en uno de los factores determinantes para definir el mensaje que se traduce al interior de las células. Como consecuencia se generan cambios significativos en el programa transcripcional que afectará el destino celular al mantener las células en estado pluripotente o influir en la diferenciación hacia un tipo celular específico, en nuestro caso de interés, hacia células cardíacas.

A partir de la hipótesis planteada, nos propusimos trabajar en los siguientes objetivos:

1. Establecer un modelo de diferenciación cardíaca altamente eficiente y reproducible que nos permita estudiar el rol de las integrinas.

- Desarrollar un protocolo de diferenciación cardíaca que recapitule el desarrollo embrionario y así obtener las múltiples poblaciones mesodérmicas que se originan durante la diferenciación cardíaca.
  - Identificar los marcadores moleculares que permitan caracterizar temporalmente la aparición de las diferentes poblaciones mesodérmicas.
2. Caracterizar detalladamente la dinámica de expresión de las subunidades de integrinas en los diferentes estadios de la diferenciación cardíaca: indiferenciado, progenitor mesodérmico y cardiomiocito inmaduro.
3. Evaluar el rol de determinadas subunidades de integrinas mediante la manipulación de su expresión en la diferenciación cardíaca.
- Establecer una línea de CMPH modificada, mediante el uso de una variante del sistema de edición génica CRISPR-Cas9, que nos permita silenciar de manera inducible la expresión de un gen target.
  - Estudiar si la manipulación de la expresión de subunidades de integrina afecta la dinámica de aparición de las diferentes poblaciones mesodérmicas.
  - Evaluar si la eficiencia final de obtención de cardiomiocitos inmaduros se encuentra afectada.

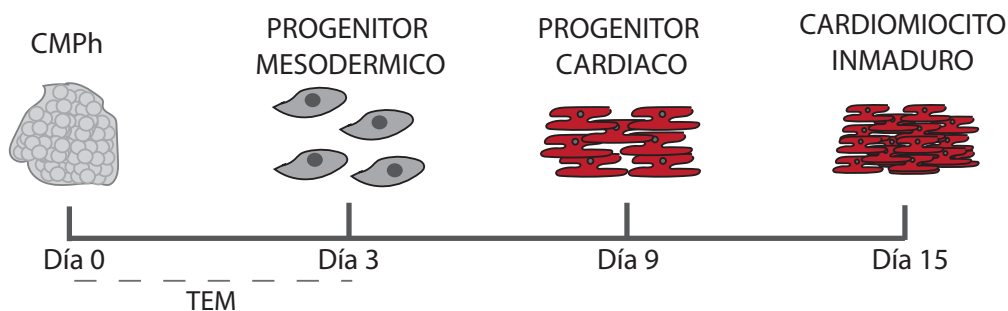
### **3. MODELOS DE DIFERENCIACIÓN CARDÍACA Y SUS DIFERENTES ESTADIOS CELULARES DE COMPROMISO MESODÉRMICO**

El objetivo general de este capítulo consiste en la puesta a punto del sistema experimental con el que trabajaremos a lo largo de esta tesis. En línea con las investigaciones llevadas a cabo en nuestro y en otros laboratorios, desarrollamos dos protocolos de diferenciación cardíaca distintos a partir de CMPh. El primer protocolo comienza con la generación de agregados celulares llamados cuerpos embrioides; el segundo tiene su punto inicial a partir de la formación de una monocapa celular megaconfluente. Las características de ambos protocolos y sus particularidades serán explicadas mas adelante.

Durante el proceso de diferenciación, las CMPh generan múltiples derivados mesodérmicos a partir del tratamiento con los diferentes morfógenos (Figura 3.1). Por esta razón, en este capítulo también buscaremos conocer la dinámica de aparición de estas poblaciones específicas a partir de la presencia/ausencia de determinados marcadores moleculares. Estos últimos serán utilizados durante todo el trabajo como una herramienta clave para la caracterización y evaluación de la eficiencia en nuestro sistema experimental.

#### **3.1. CMEh HES3 y su estado pluripotente, paso inicial clave para la diferenciación cardíaca**

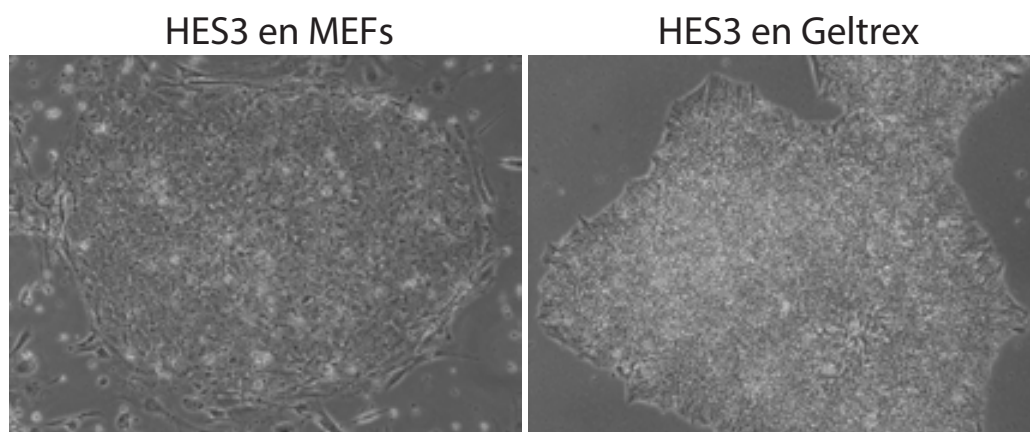
En este trabajo utilizamos una línea de CMEh denominada HES3. Esta fue inicialmente crecida y mantenida en una capa de iMEF que en conjunto con el uso de un



**Fig. 3.1:** Esquema de los diferentes tipos celulares de origen mesodérmico obtenidos a partir de la diferenciación cardíaca.

medio definido libre de suero y enriquecido en factores esenciales (como bFGF), les permite obtener todos los nutrientes necesarios para mantener su estado pluripotente característico. De todos modos, actualmente en el laboratorio, las CMPh son mayoritariamente crecidas en sustratos definidos y libres de células murinas. Uno de los principales sustratos utilizados se denomina Geltrex, el cual se encuentra compuesto por proteínas estructurales de la MEx, enriquecido especialmente en Laminina. Se utilizan además medios de cultivo definidos que se encuentran compuestos de factores esenciales con el fin de lograr mantenerlas en el estado indiferenciado óptimo (como los medios Medios E8 Flex y mTesR)(Figura 3.2).

El crecimiento de las CMPh en sustratos libre de iMEF y la utilización de medios definidos supone varias ventajas. En primer lugar, se evita trabajar en un co-cultivo de células de diferentes especies. En segundo lugar estas se mantienen en un estado indiferenciado más homogéneo dado que solo dependemos del sustrato definido y el medio comercial utilizado, lo cual nos permite descartar como un factor adicional de variabilidad el estado en el que se encuentran las iMEF. Por último, al crecerlas sobre Geltrex logramos una disminución en la heterogeneidad a la hora de analizar diferencias en la expresión génica, clave a lo largo del análisis de los resultados en esta tesis.



**Fig. 3.2:** Cultivo de las CMEh HES3 en los diferentes sustratos. Microfotografías de campo claro: A la izquierda colonia sobre iMEF y a la derecha en placas pre-tratadas con Geltrex. Aumento 10X.

### **3.2. CMEh HES3 NKX2.5<sup>eGFP/w</sup>: Herramienta clave para la selección de progenitores cardíacos y cardiomiocitos**

La línea HES3 utilizada en esta tesis fue previamente modificada en el laboratorio de Células Madre e Inmunología del Dr. Edouard G. Stanley en la Universidad Monash, Australia. La estrategia utilizada consistió en generar una recombinación homóloga en las células, de manera de insertar la secuencia de eGFP río abajo del promotor del gen NKX2.5, el cual comienza a expresarse cuando estas se diferencian a progenitores cardíacos y cardiomiocitos (Figura 3.3). Es importante recordar que el marcador molecular NKX2.5 es un factor de transcripción en el desarrollo cardíaco y aumenta fuertemente a lo largo de la diferenciación. Esta herramienta será particularmente útil a lo largo de este trabajo, dado que nos permitirá evaluar la eficiencia de la diferenciación de manera sencilla y rápida.



**Fig. 3.3:** Esquema de los alelos en línea HES3 modificada: wild-type y NKX2.5-eGFP

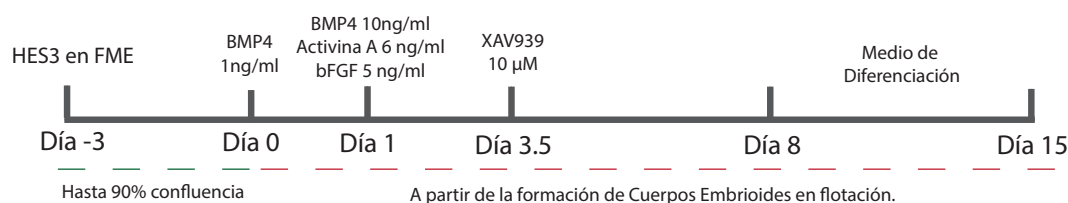
### 3.3. Modelo de diferenciación cardíaca a partir de la formación de cuerpos embrioides

Con el objetivo de trabajar con la línea celular HES3 NKX2.5<sup>eGFP/w</sup>, comenzamos una colaboración con el Laboratorio de Cardiología Celular y Molecular dirigido por el Dr. Antonio Campos de Carvalho en la Universidad Federativa de Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil. Parte de este trabajo fue realizado en una estancia corta doctoral en esta universidad, donde no solo aprendí el manejo de esta línea, sino que también adquirí los conocimientos necesarios para realizar un protocolo de diferenciación cardíaca a partir de la formación de cuerpos embrioides (Figura 3.4). Este fue desarrollado inicialmente en el laboratorio del Dr. Gordon Keller en el Centro para la Medicina Regenerativa McEwen, Canadá [77].

El primer paso consiste en el crecimiento de las CMEh HES3 sobre iMEF, debiendo esperar hasta que estas alcancen un 90 % de confluencia. Una vez logrado, las células son tratadas enzimáticamente y apenas pierden su adherencia a la placa, son resuspendidas en agitación por 24 horas en el medio y los factores indicados. Al concluir el primer día ya se encuentran formados los pequeños cuerpos embrioides.

El medio utilizado a lo largo de todo el protocolo es un medio definido de diferenciación al cual se le agregan diversos morfógenos (BMP4, Activina A, bFGF y el inhibidor de la vía Wnt/Beta-catenina, XAV939) que buscan recapitular las señales existentes en la diferenciación inicial a mesoendodermo, luego al progenitor mesodérmico, progenitor cardíaco y finalmente a cardiomiocito. Tanto los morfóge-



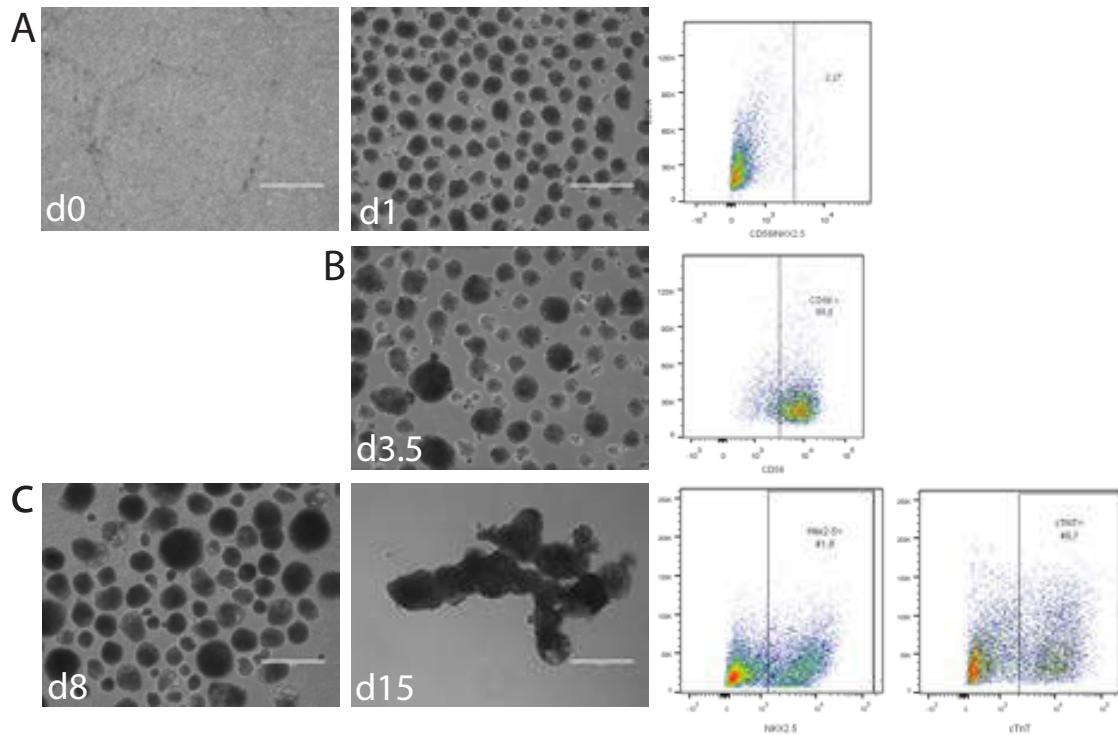


**Fig. 3.4:** Esquema del Protocolo de Diferenciación a partir de la generación de cuerpos embrioides.

nos, como su concentración van variando a lo largo de los 15 días de duración del protocolo hasta alcanzar el estadio de cardiomiocito inmaduro. A partir del día 9 aproximadamente, el progenitor cardíaco primero y luego el cardiomiocito inmaduro ganan actividad contráctil espontánea. Al persistir en forma de agregados celulares son entonces llamados cuerpos latidores.

Es de importancia mencionar que estos cultivos en diferenciación se mantienen siempre en flotación en placas de nula adherencia y bajo condición de hipoxia (5%  $CO_2$ , 5%  $O_2$ ) hasta el día 8 del protocolo, momento en el cual comienza a aparecer el progenitor cardíaco. El hecho de mantener el cultivo en un estado hipóxico se debe a que, bajo esta condición, en los primeros días aumenta la eficiencia de diferenciación hacia un linaje mesodérmico, lo cual es determinante para lograr obtener una mayor proporción de cardiomiocitos en el día 15.

Como se mencionó anteriormente, una de las etapas fundamentales que se debe dar en el desarrollo es la TEM. A las 24 horas de iniciado el proceso de diferenciación, el agregado de los morfógenos señalados a los cuerpos embrioides es fundamental y sucede entre los días 2 y 4, momento en que aparecen los progenitores mesodérmicos. Este es un punto de inflexión del protocolo donde se busca obtener al menos un 50% del marcador del progenitor mesodérmico CD56 positivo con el fin de, a día 15, obtener una alta proporción de cardiomiocitos inmaduros (Figura 3.5) (*Link Video S1 cuerpos latidores*).

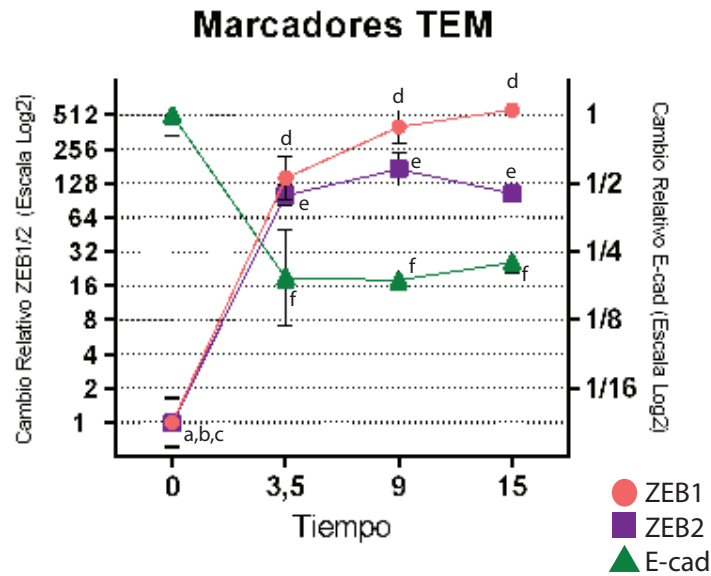


**Fig. 3.5:** Fotomicrografías de campo claro (Aumento 10X) y análisis por citometría de flujo de los marcadores moleculares presentes en los distintos estadios celulares durante el protocolo de diferenciación cardíaca a partir de la formación de cuerpos embrioides. (A) En el día 1 se observa la formación exitosa de los pequeños cuerpos embrioides y la esperada fluorescencia negativa del marcador característico del progenitor mesodérmico CD56 y del marcador cardíaco NKX2.5 (ambos fluorescen en el mismo canal). (B) En el día 3.5, momento en que debe aparecer el progenitor, se observa un crecimiento en el tamaño de los cuerpos embrioides en conjunto con la presencia de su marcador característico CD56 en un 80% de la población celular. (C) Tanto a día 8 como a día 15, aumenta el tamaño de los cuerpos latidores y se obtiene aproximadamente un 50% de células positivas para el marcador NKX2.5. Además, en un mismo porcentaje, se observa la presencia del marcador de cardiomiocito inmaduro Cardiotroponina T (cTnT).

Una vez logrado este objetivo, se debe inhibir la vía de señalización canónica de Wnt, la cual se mantiene activa hasta el día 3.5. Con el objetivo de lograr especificidad en la diferenciación cardíaca se utiliza el inhibidor XAV-939, para así favorecer la aparición del progenitor cardíaco a partir del día 8. En este punto temporal del protocolo comienza a aumentar la expresión del marcador NKX2.5 y por consiguiente, la fluorescencia emitida por eGFP. Este modelo suele tener al menos un 40 % de eficiencia evaluado a día 15, momento en que el cultivo se encuentra enriquecido en cardiomiocitos inmaduros en los cuerpos latidores (Figura 3.5).

Si bien éste protocolo suele ser exitoso, debemos destacar que es costoso, laborioso y variable, por lo que en diferentes experimentos esta eficiencia se encuentra en un rango comprendido entre 40 % y 80 %, dependiendo tanto de un estado indiferenciado óptimo de las células sobre las iMEF como del tamaño de los cuerpos embrioides formados. Esto último es realmente importante, dado a que en estos cuerpos tridimensionales en flotación se genera un gradiente de la concentración de los distintos morfógenos. Al variar el tamaño de los cuerpos, también varía la concentración del morfógeno que percibe cada célula comprendida en este agregado. Es importante mencionar que a medida que transcurren los días y, en particular, a partir del día 8 los cuerpos embrioides comienzan a unirse y compactarse, lo cual hace más dificultoso el disgregado celular con el fin de realizar posteriores análisis mediante citometría de flujo. Mas adelante explicaremos el mecanismo puesto a punto para poder lograr la unicelularidad deseada sin afectar los epítopes de membrana.

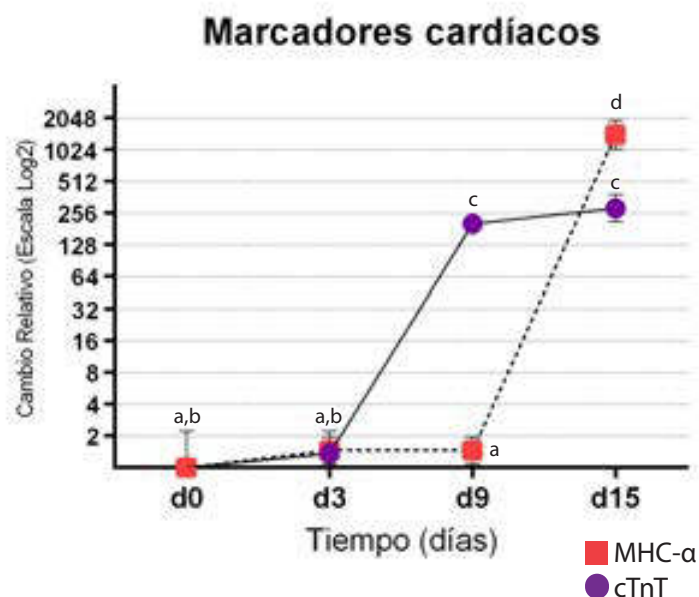
Adicionalmente, como la presencia de un marcador en si mismo indica parcialmente que estamos ante el tipo celular buscado, realizamos un análisis mas profundo de otros marcadores por RT-qPCR tanto en el progenitor mesodérmico, como en el progenitor cardíaco y en el cardiomiocito inmaduro. Durante la TEM, como explicamos anteriormente, disminuye fuertemente la expresión de todos los genes ligados a la adhesión entre células como E-cadherina (E-cad) o EpCam(CD326) y



**Fig. 3.6:** Expresión de marcadores moleculares ligados a la TEM por RT-qPCR durante la diferenciación cardíaca. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando los valores de RPL7 y luego relativizados al día 0 de la diferenciación (estado indiferenciado). Los datos son presentados como media  $\pm$  SEM y graficados en escala Log2. Letras diferentes en la misma curva indican diferencias significativas en los diferentes tiempos ( $p < 0.05$ ). N=4

contrariamente, aumentan todos aquellos que están ligados a un fenotipo migratorio como algunos factores de transcripción clave, entre ellos, ZEB1, ZEB2 y proteínas involucradas en la reorganización del citoesqueleto como Vimentina. En este caso evaluamos en los días 0, 3.5, 9 y 15 del protocolo de diferenciación, el nivel de expresión de algunos de los marcadores de la TEM (Figura 3.6). Se observa claramente cómo, de acuerdo a lo esperado, E-cad reduce significativamente su nivel de expresión a día 3.5 mientras que tanto ZEB1 como ZEB2 aumentan significativamente para luego mantenerse elevados en los siguientes días. Este resultado también nos indica que estamos ante el progenitor mesodérmico buscado.

Como último paso de la caracterización de este protocolo de diferenciación, medimos mediante RT-qPCR los niveles de cambio relativo de los marcadores cardíacos



**Fig. 3.7:** Expresión de marcadores moleculares cardíacos por RT-qPCR durante la diferenciación cardíaca. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando los valores de RPL7 y luego relativizados al día 0 de la diferenciación (estado indiferenciado). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM y graficados en escala Log2. Letras diferentes en la misma curva indican diferencias significativas en los diferentes tiempos ( $p < 0.05$ ). N=3

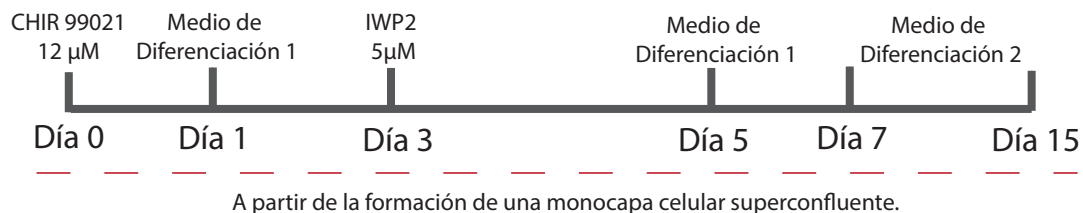
cTnT (tanto a nivel de mRNA como proteico) y de la Cadena Pesada de  $\alpha$ -Miosina (MHC- $\alpha$ , del inglés  *$\alpha$ -Myosin Heavy Chain*) (Figura 3.7). De manera paralela, estos cuerpos tridimensionales comienzan a ganar actividad contráctil y ambos marcadores comienzan a expresarse. Como se observa, estas proteínas se expresan a partir del día 9 de la diferenciación.

### 3.4. Modelo de diferenciación cardíaca a partir de la formación de una monocapa celular megaconfluente

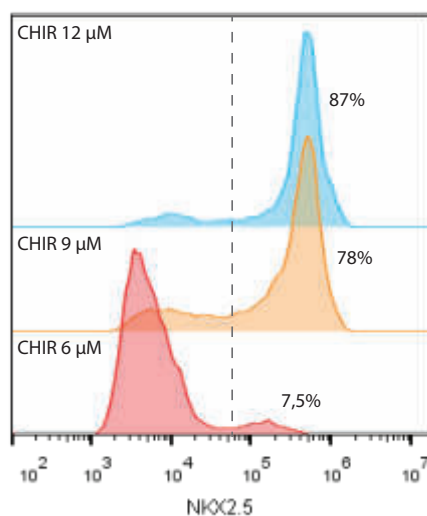
Luego de haber realizado una parte de los experimentos de la tesis con el protocolo explicado anteriormente, decidimos poner a punto este nuevo modelo de diferenciación que cuenta con varias ventajas comparativas:

- Mayor reproducibilidad dado que no depende de la formación de cuerpos embrioides.
- Se utilizan tan solo dos pequeñas moléculas que intervienen en vías de señalización: CHIR 99021 e IWP2.
- Mayor facilidad para disgregar la monocapa celular con el objetivo de analizar la expresión de marcadores de membrana por citometría de flujo.
- Mas económico dado que no precisa del uso de factores de transcripción como BMP4 o Activina A, más costosos que los inhibidores.

Este protocolo fue desarrollado por el Laboratorio del Dr. Sean Palecek en la Universidad de Wisconsin, Estados Unidos [26]. Si bien, como recientemente detallamos, es un sistema experimental mas fácilmente reproducible, se deben tener en cuenta ciertos pasos que es imprescindible realizarlos de manera correcta para lograr una alta eficiencia en la diferenciación. En primer lugar, existe cierta variabilidad línea-dependiente en el número de células con que se debe comenzar este protocolo. Nosotros determinamos que con nuestra línea de trabajo HES3 NKX2.5<sup>eGFP/w</sup> debemos comenzar con 450.000 células por pocillo de una placa de 24 pocillos y mantenerlas 48 horas en un medio definido enriquecido en factores de pluripotencia, para luego comenzar la diferenciación (Figura 3.8).



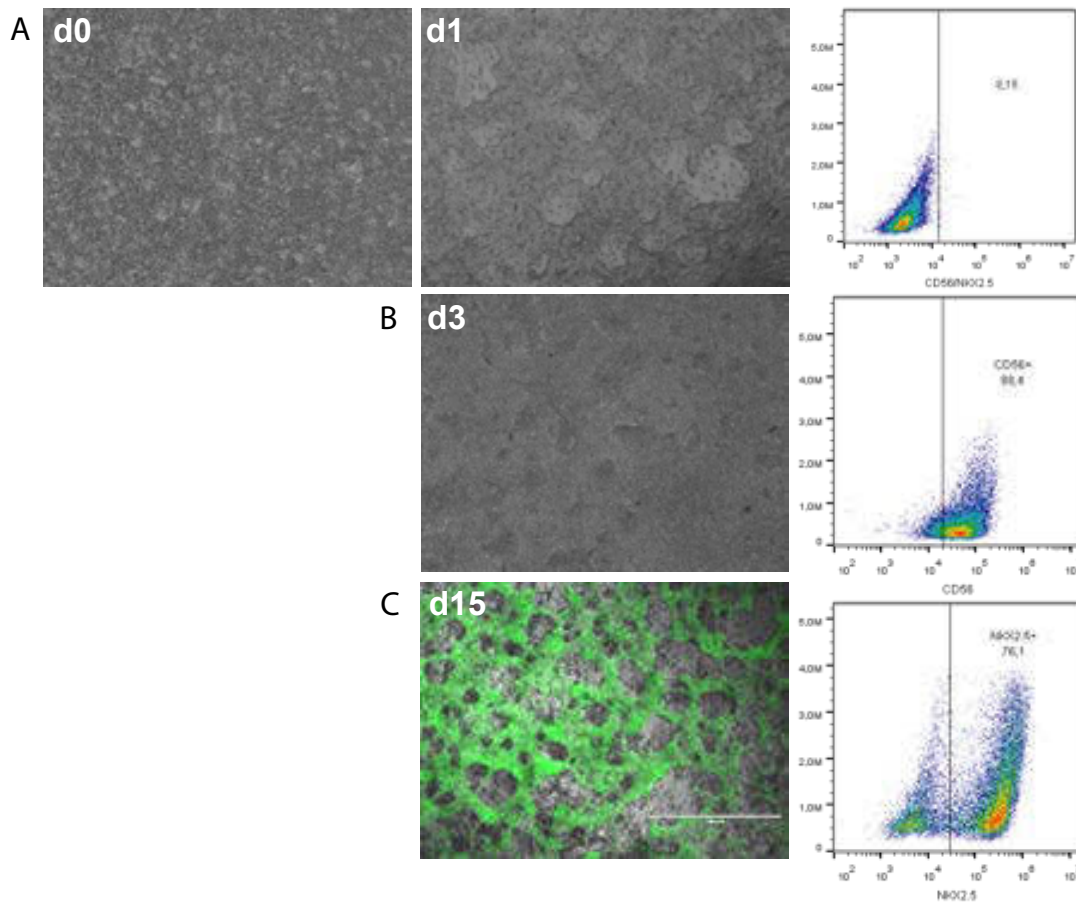
**Fig. 3.8:** Esquema del protocolo de diferenciación a partir de una monocapa celular megaconfluyente.



**Fig. 3.9:** Curva de concentración de CHIR 99021 en el protocolo de diferenciación cardíaca a partir una monocapa celular. Concentraciones probadas de CHIR 99021: 6  $\mu$ M, 9  $\mu$ M y 12  $\mu$ M. N=2

Adicionalmente, debimos poner a punto la concentración del inductor de la TEM CHIR 99021 utilizado en el día inicial del protocolo (Figura 3.9). Este es un inhibidor de la enzima 3-glucógeno sintetasa (GSK3), el cual promueve una activación de la vía canónica de Wnt. Debido a lo reportado en la literatura, decidimos probar tres concentraciones diferentes de CHIR 99021 y seleccionar la óptima en función del porcentaje del marcador reportero NKX2.5-eGFP obtenido. Finalmente, optamos por la concentración 12  $\mu$ M CHIR 99021 que es aquella que a día 15 nos permite obtener el porcentaje mas alto de fluorescencia, es decir, un mayor enriquecimiento en cardiomiocitos inmaduros. Cabe destacar que en otras líneas de células madre pluripotentes que manejamos en el laboratorio la concentración óptima es 9  $\mu$ M, lo que expresa la variabilidad entre las líneas celulares.

Como siguiente paso, realizamos un seguimiento de la morfología de la monocapa celular en los días clave de la diferenciación y mediante citometría evaluamos el nivel de expresión de los marcadores mencionados anteriormente (Figura 3.10). Por lo tanto, confirmamos la presencia del progenitor mesodérmico a día 3 (mediante la



**Fig. 3.10:** Fotomicrografías y análisis por citometría de marcadores moleculares en los distintos estadios celulares durante el protocolo de diferenciación cardíaca a partir de una monocapa celular megaconfluente. (A) Al día inicial y a las 24 horas (post-agregado de CHIR 99021) no hay marcación positiva ni para CD56 ni para NKX 2.5 (fluorescen en el mismo canal). Fotomicrografía: Aumento 10X (B) A día 3, positivización de la población CD56 en aproximadamente un 85 %. Fotomicrografía: Aumento 10X (C) A día 15, superposición de fotomicrografía de la imagen tomada en campo claro con aquella donde se observa la expresión del gen reportero NKX2.5-eGFP. Aumento 4X. Se observa casi un 80 % de células positivas para este marcador.

medición de la expresión de CD56) y en el día 15 a través de la fluorescencia emitida por eGFP que se encuentra río abajo del promotor del marcador cardíaco temprano NKX2.5 (*Link Video S2 campo claro/GFP monocapa latidora 4X*).

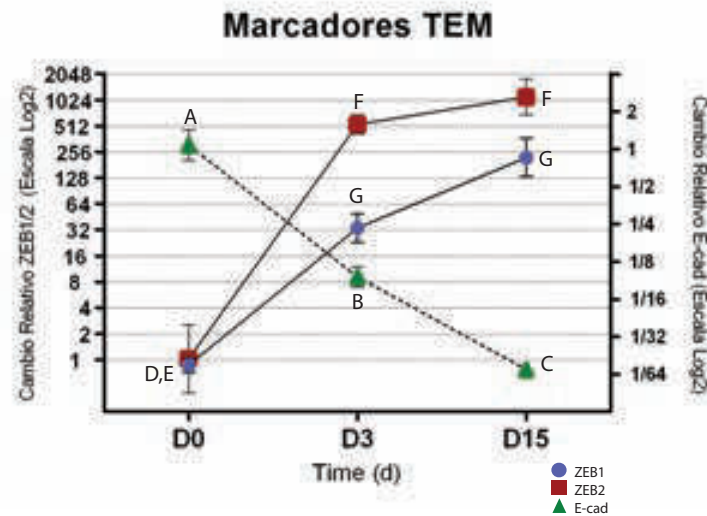
El hecho de trabajar con un protocolo que parte de una monocapa celular, nos permite observar con mucha mayor claridad al microscopio la morfología típica que



van tomando las células a lo largo del tratamiento con los diferentes factores agregados. A día uno, luego del tratamiento con CHIR 99021 12 $\mu$ M podemos ver un alto grado de muerte celular, espacios que se generan en la monocapa y sectores de esta que van tomando una incipiente arquitectura tridimensional. La muerte celular observada es esperable ya que los procesos de diferenciación involucran a la apoptosis como un camino para evitar eventos no deseados como la diferenciación hacia otros linajes. Hacia día 3, todos esos espacios se repueblan al multiplicarse las células conservando la tridimensionalidad observada al día 1, la cual con el correr de los días se va acentuando. Luego de los 7 días (una vez ya retirado el factor IWP2 5 $\mu$ M), comienzan a formarse estructuras en forma de red que, a día 10, dan lugar a las regiones con actividad contráctil espontánea que estarán finalmente conformadas por los cardiomiocitos inmaduros. Otra de las ventajas de este sistema experimental reside en que a día 15 podemos ver claramente la estructura en red de los cardiomiocitos gracias a la presencia del eGFP reportero que posee la línea celular utilizada en este trabajo.

Al igual que en la puesta a punto del protocolo anterior, evaluamos por RT-qPCR la dinámica de expresión de los marcadores moleculares de la TEM en los diferentes puntos temporales evaluados en este modelo de diferenciación cardíaca (Figura 3.11). Claramente, se observa una suba significativa de la expresión tanto de ZEB1 como de ZEB2 y un significativo descenso del mRNA del marcador de membrana E-cad. Por ende, el inhibidor CHIR 99021 es necesario y suficiente para la inducción de la TEM con la consiguiente aparición del progenitor mesodérmico a día 3.

Finalmente, con el fin de caracterizar con mayor detalle a las poblaciones celulares de nuestro interés, evaluamos la expresión de mRNA de los marcadores cardíacos cTnT y MHC- $\alpha$  (Figura 3.12). Tal cual lo esperado, sólo a día 15, momento en que la monocapa celular ya es contráctil se observa una suba muy significativa de ambos.

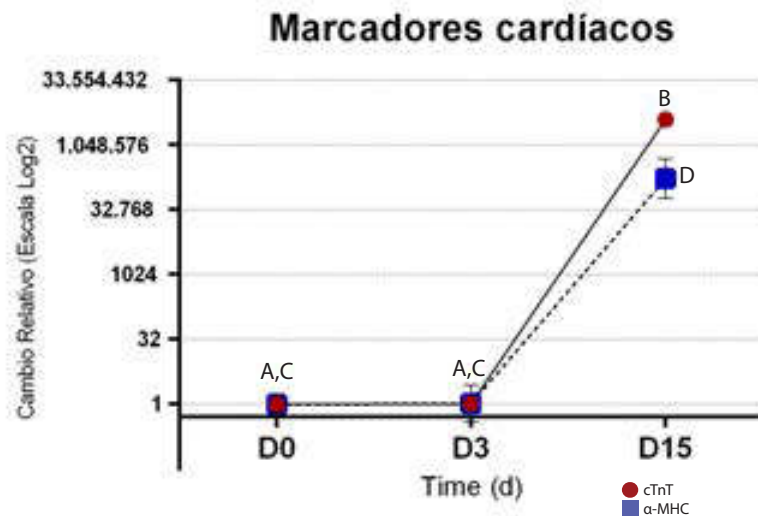


**Fig. 3.11:** Evaluación de la expresión de marcadores moleculares ligados a la TEM por RT-qPCR durante la diferenciación cardíaca a partir de una monocapa celular ultraconfluyente. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando los valores de RPL7 y luego relativizados al día 0 de la diferenciación (estado indiferenciado). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM y graficados en escala Log<sub>2</sub>. Letras diferentes en la misma curva indican diferencias significativas en los diferentes tiempos ( $p < 0.05$ ). N=3

### 3.5. Cierre del capítulo

En este capítulo describimos la puesta a punto de dos protocolos de diferenciación, los cuales serán utilizados a lo largo de los próximos objetivos de esta tesis. Además, con el fin de analizar los diferentes estadios de compromiso mesodérmico en el proceso de diferenciación caracterizamos la dinámica temporal de aparición de los marcadores moleculares en cada una de estas poblaciones. Esta caracterización nos servirá para darle un marco temporal a la descripción de los receptores de integrina.

Inicialmente, trabajamos con líneas celulares crecidas sobre una capa de iMEFs y a partir de esta, comenzaba el protocolo de diferenciación cardíaca donde su paso inicial consistía en la formación de cuerpos embrioides. Luego, la mayor reproducibilidad de los experimentos y el hecho de trabajar con una monocapa celular fueron



**Fig. 3.12:** Análisis de la expresión de marcadores moleculares cardíacos por RT-qPCR durante la diferenciación cardíaca a partir de una monocapa celular megaconfluente. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando los valores de RPL7 y luego relativizados al día 0 de la diferenciación (estado indiferenciado). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM y graficados en escala Log2. Letras diferentes en la misma curva indican diferencias significativas en los diferentes tiempos ( $p < 0.05$ ). N=3

la principal razón por la que decidimos migrar hacia el segundo protocolo. Para este último, utilizamos cultivos de CMEh sobre sustratos definidos y un modelo de diferenciación donde se utilizan tan solo dos pequeñas moléculas que intervienen en vías de señalización específicas (CHIR99021 e IWP2). Por último, es importante subrayar que el segundo objetivo de esta tesis fue llevado a cabo usando ambos protocolos, mientras que el tercero, fue completamente realizado en el segundo modelo descrito.

## 4. CARACTERIZACIÓN DE LAS INTEGRINAS Y SUS PRINCIPALES LIGANDOS EN LA DIFERENCIACIÓN CARDÍACA

El objetivo general en este capítulo consiste en conocer el perfil de expresión de determinadas subunidades de integrinas, tanto a nivel de mRNA como proteico, en el estado indiferenciado de la línea celular HES3 y también en las diferentes poblaciones obtenidas a lo largo del protocolo de diferenciación cardíaca: progenitor mesodérmico, progenitor cardíaco y cardiomiocito inmaduro. Esta caracterización fue realizada en ambos modelos de diferenciación cardíaca previamente explicados y será descrita en las dos próximas secciones de este capítulo. Es importante aclarar que, en primer lugar, el estudio de la dinámica de expresión de las integrinas fue desarrollado en el protocolo de diferenciación a partir de la formación de los cuerpos embrioides y luego fue mas profundamente estudiado en el protocolo que parte de una monocapa celular megaconfluyente.

Si bien fue detalladamente comentado en la introducción, a modo de breve repaso es útil recordar que las integrinas se encuentran compuestas por dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$ . Existen aproximadamente 15 subtipos de cadenas  $\alpha$ , siendo esta la que le confiere la afinidad a la integrina por un ligando en particular. En el caso de la subunidad  $\beta$ , en este trabajo, analizamos principalmente la expresión de la cadena  $\beta 1$  que es aquella que forma parte de la mayoría de los heterodímeros de integrinas. Es de destacar que el número de subtipos de integrinas es alto, y nos abocamos al estudio de las más conocidas y con roles ya definidos en otros contextos.

Por último, también hicimos un análisis general mediante RT-qPCR de los principales ligandos de las integrinas analizadas: fibronectina y laminina.

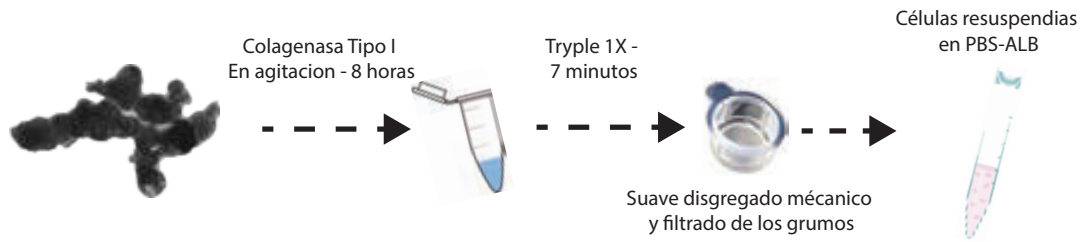
## **4.1. Caracterización de subunidades $\alpha$ de integrinas y de sus ligandos a lo largo de la diferenciación cardíaca a partir de la formación de cuerpos embrioides**

Con el fin de ordenar el análisis de la expresión de las diferentes subunidades de integrinas, las agrupamos acorde al ligando por el cual tienen su afinidad principal. Comenzaremos con el estudio de aquellas integrinas que tienen su mayor afinidad por la fibronectina, para luego analizar detalladamente aquellas que se unen como ligando principal a distintos subtipos de laminina.

### **4.1.1. Establecimiento del protocolo para el disgregado exitoso de cuerpos latidores**

Una vez lograda la identificación de los diferentes marcadores moleculares de las poblaciones mesodérmicas, procedimos a poner a punto el protocolo para poder analizar, mediante citometría de flujo, la presencia de las diferentes integrinas en la membrana de los cardiomiocitos inmaduros a día 15. En este estadio es particularmente difícil el disgregado de los cuerpos latidores ya que se encuentran en muchos casos, densamente unidos entre ellos y las células dentro de cada uno de los cuerpos se encuentran dispuestas de manera compacta, secretando una gran cantidad de proteínas de MEx.

Debido a esto, pusimos a punto un método de disgregado específico (Figura 4.1) donde a partir de la incubación con la enzima colagenasa se degrada parte de las fibras de la MEx y luego, mediante el uso de la enzima Tryple logramos parcialmente la unicelularidad deseada. Posteriormente del tratamiento con ambas enzimas aún permanecen presentes grumos enriquecidos en cardiomiocitos, por lo cual utilizamos un filtro celular y una pipeta de 1 mililitro con el fin de disgregarlos mecánicamente

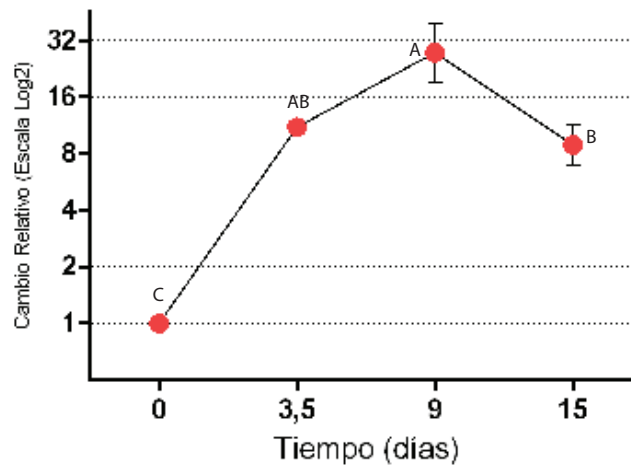


**Fig. 4.1:** Esquema que muestra el protocolo utilizado para el disgregado de los cuerpos latidores a día 15 manteniendo intactos los epítopes de membrana.

casi en su totalidad. Se encuentra reportado que, en comparación con la Tripsina, el tratamiento con la enzima Tryple protege en un mayor grado los epítopes de membrana [78]. Además, el disgregado mecánico debe ser limitado para así poder también conservar las integrinas y lograr llevar a cabo el análisis por citometría de flujo exitosamente. La puesta a punto de este protocolo de disgregado de los cuerpos latidores fue especialmente laborioso dado que existe un compromiso entre el éxito de obtener un gran porcentaje de células en su estado unicelular y mantener intacto el objetivo de nuestro análisis, las integrinas.

#### 4.1.2. Caracterización de subunidades de integrinas $\alpha 5$ , $\alpha 8$ y su ligando fibronectina durante la diferenciación cardíaca

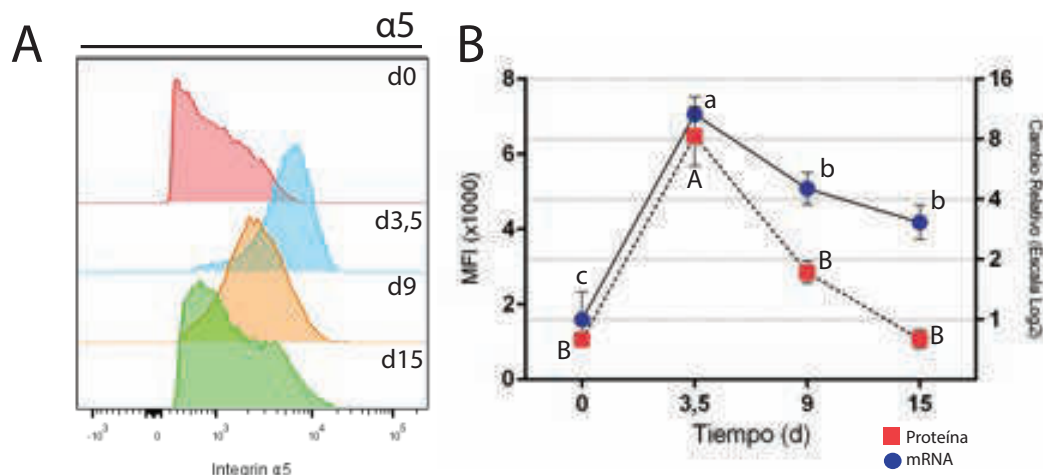
En esta sección comenzaremos a describir el perfil de expresión de aquellas subunidades  $\alpha$  de integrinas que poseen su mayor afinidad por la fibronectina. En primer lugar, analizamos por RT-qPCR el perfil de expresión de la fibronectina (Figura 4.2) con el fin de observar si existe una correlación entre su nivel de expresión y el de las integrinas que se unen a ella. Como se puede observar, hay un aumento significativo de la expresión hacia día 3.5 (momento en que se forma el progenitor



**Fig. 4.2:** Perfil de expresión de la fibronectina por RT-qPCR durante la diferenciación cardíaca a partir de la formación de cuerpos embrioides. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando los valores de RPL7 y luego relativizados al día 0 de la diferenciación (estado indiferenciado). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM y son graficados en escala Log2. Letras diferentes indican diferencias significativas en los diferentes tiempos ( $p < 0.05$ ) N=4

mesodérmico) para luego a día 9 (progenitor cardíaco) alcanzar su pico de expresión. Es interesante mencionar que en el día 15 se observa un descenso de los niveles del mRNA de fibronectina, indicando un posible cambio en la expresión. Los *primers* fueron diseñados con el fin de poder amplificar todas las isoformas existentes, de manera que el resultado obtenido se refiere a la expresión de mRNA de fibronectina total.

El siguiente paso consistió en evaluar el perfil de expresión tanto de mRNA como de la proteína de la integrina  $\alpha 5$  (Figura 4.3) y solo a nivel de mRNA de la integrina  $\alpha 8$  (Figura 4.4). Como fue explicado en la introducción, ambas integrinas poseen su sitio de unión al dominio RGD de la fibronectina. Tal como se observa, existe una alta relación en los niveles de expresión de mRNA y proteína de la integrina  $\alpha 5$  en los diferentes días de la diferenciación (Figura 4.3). Por otro lado, en el día 3,5, el aumento de la presencia del marcador molecular CD56, que indica la aparición

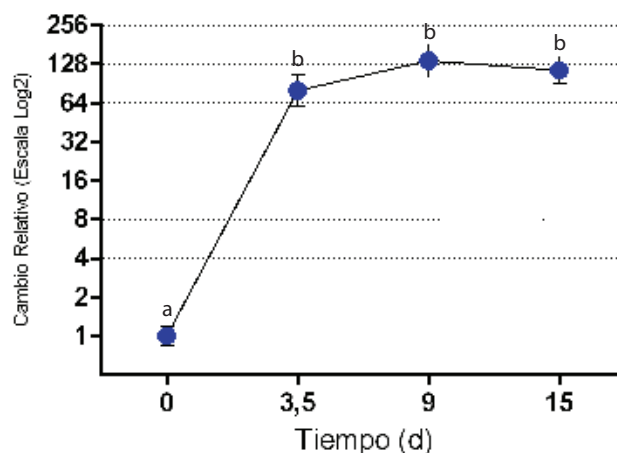


**Fig. 4.3:** Análisis de la expresión de mRNA (N=4) y proteína (N=3) de la integrina  $\alpha 5$  en los días 0, 3.5, 9 y 15 de la diferenciación cardíaca. (A) Evaluación por citometría de la intensidad de fluorescencia de la integrina  $\alpha 5$  en las poblaciones celulares a lo largo de la diferenciación. (B) Perfil de expresión de mRNA y a nivel proteico: La curva azul muestra el cambio de expresión de mRNA relativizado al día 0 (estado indiferenciado) y la curva roja muestra la Mediana de la Intensidad de Fluorescencia (MFI) en los días indicados de la diferenciación cardíaca. Letras diferentes en la misma curva indican diferencias significativas en los diferentes tiempos ( $p < 0.05$ ). Letras en minúscula refieren a mRNA y letras en mayúscula a la proteína.

del progenitor mesodérmico, es acompañado por un aumento de la expresión de la integrina  $\alpha 5$  en aproximadamente 8 veces para luego ir descendiendo gradualmente hasta llegar en el día 15 a niveles de expresión similares a los presentes en el estado indiferenciado de la línea celular HES3. La regulación positiva de esta subunidad hacia el día 3.5 podría estar indicando que esta posee un rol protagónico para el correcto desarrollo de la diferenciación cardíaca, específicamente en el transcurso de la TEM.

Como mencionamos anteriormente, también estudiamos la expresión de la integrina  $\alpha 8$ , de la cual prácticamente no se conocen antecedentes en la diferenciación cardíaca. El análisis de los niveles de expresión de mRNA demostró una regulación positiva marcada durante la diferenciación (Figura 4.4). La cadena  $\alpha 8$  ya a día 3.5





**Fig. 4.4:** Expresión de la Integrina  $\alpha 8$  por RT-qPCR durante la diferenciación cardíaca. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando los valores de RPL7 y luego relativizados al día 0 de la diferenciación (estado indiferenciado). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM y son graficados en escala Log2. N=4

aumenta fuertemente su expresión para mantenerse estable en ese nivel a lo largo de toda la diferenciación cardíaca. Al momento de realizar este experimento, aún no contábamos con el anticuerpo para evaluar la presencia de esta subunidad a nivel proteico, pero como se verá más adelante durante los análisis de la diferenciación cardíaca en monocapa pudimos realizarlo.

#### 4.1.3. Caracterización de subunidades de integrinas $\alpha 3$ , $\alpha 6$ y los diferentes subtipos de laminina durante la diferenciación cardíaca

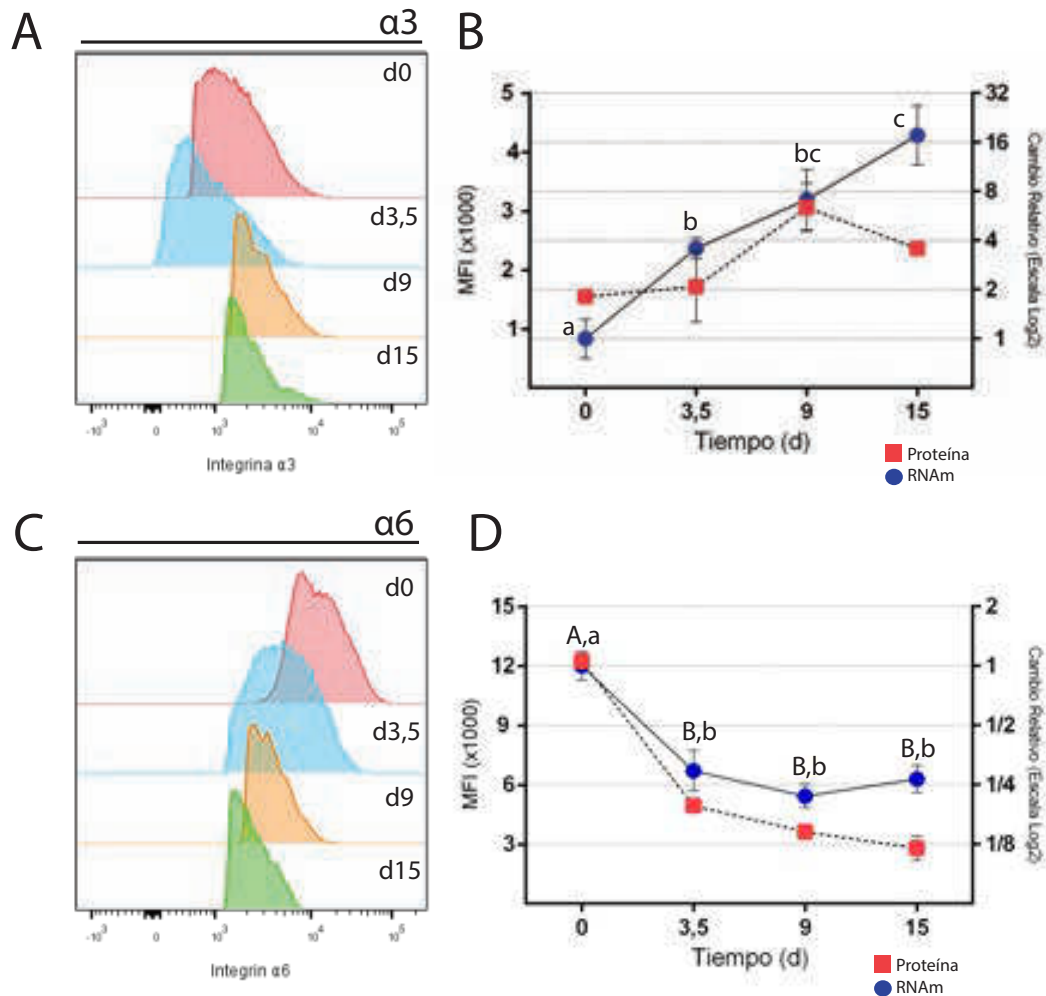
En esta sección se describe en profundidad la dinámica de expresión (mRNA y proteína) en los diferentes puntos de la diferenciación cardíaca de dos integrinas que tienen su mayor afinidad por la laminina:  $\alpha 3$  y  $\alpha 6$ . Como explicamos anteriormente, la laminina es un heterotrímero conformado por una subunidad  $\alpha$ , una subunidad  $\beta$  y una subunidad  $\gamma$ . Por lo que también, analizaremos detalladamente el perfil de

expresión de la totalidad de subunidades de laminina: 5 subunidades  $\alpha$ , 3 subunidades  $\beta$  y 3 subunidades  $\gamma$ . Es importante remarcar que, a diferencia de las integrinas, ninguno de los tres tipos de subunidades le confiere una afinidad especial a la laminina por una integrina en particular y tampoco es posible diseñar *primers* que engloben a todas las clases de laminina en su conjunto. Debido a esto, realizamos un análisis en profundidad del perfil de mRNA de cada una de las 11 subunidades.

Como primer paso, estudiamos la dinámica de expresión de la integrina  $\alpha 3$  en las diferentes poblaciones celulares obtenidas durante la diferenciación cardíaca (Figura 4.5). Tal como se observa, existe una relación estrecha en los niveles de expresión tanto del mRNA como de la proteína de la integrina  $\alpha 3$ , a excepción del día 15 donde se presenta cierta divergencia entre ambas curvas con una caída leve en la expresión a nivel proteico. Sin embargo, siempre se mantiene una expresión constante de esta proteína con una ligera tendencia a la suba mientras que el mRNA aumenta paulatinamente pero de manera significativa a lo largo de la diferenciación.

La segunda integrina de unión a laminina que analizamos en este modelo de diferenciación es la cadena  $\alpha 6$  (Figura 4.5). Como se muestra, esta integrina se encuentra altamente presente en el estado indiferenciado y a día 3.5 ya se observa una caída significativa de su expresión en aproximadamente 4 veces respecto a su nivel a día 0. Además, es interesante destacar que existe una relación paralela entre la expresión del RNAm y de la proteína a lo largo de toda la diferenciación.

Por último, con el objetivo de evaluar si existe una expresión diferencial de las diferentes subunidades de laminina a lo largo de la diferenciación, realizamos un análisis de la expresión de los 11 subtipos existentes. Comenzamos evaluando el perfil de las 5 subunidades  $\alpha$  (Figura 4.6). Como se observa, existe una regulación de la expresión muy distinta en cada una de las subunidades  $\alpha$  analizadas. La laminina  $\alpha 1$  muestra un continuo aumento de su nivel que llega a su pico de expresión en el progenitor cardíaco para luego descender a un nivel similar al presente en el estado



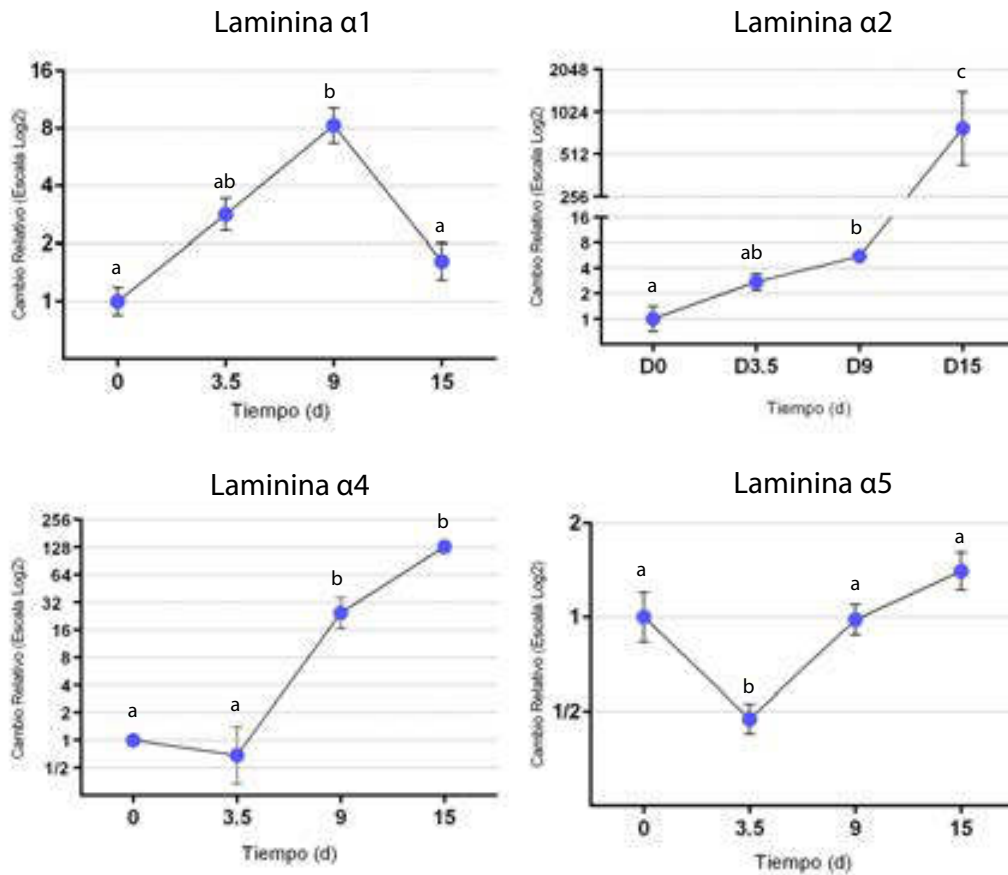
**Fig. 4.5:** Análisis de la expresión de RNAm (N=4) y proteína (N=3) de la integrina  $\alpha 3$  y  $\alpha 6$  en los días 0, 3.5, 9 y 15 de la diferenciación cardíaca. (A-C) Evaluación por citometría de la intensidad de fluorescencia de las subunidades de integrinas en las distintas poblaciones celulares a lo largo de la diferenciación. (B-D) Perfil de expresión de mRNA y a nivel proteico: la curva azul muestra el cambio de expresión de mRNA relativizado al día 0 (estado indiferenciado) y la curva roja muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) en los días indicados de la diferenciación cardíaca. Letras diferentes en la misma curva indican diferencias significativas en los diferentes tiempos ( $p < 0.05$ ). Letras en minúscula refieren a mRNA y letras en mayúscula a la proteína.

indiferenciado. En el caso de la laminina  $\alpha 5$ , es importante recordar, que se encuentra altamente expresada en las CMPh y prácticamente se mantiene constante a lo largo de todo el proceso de diferenciación. Es interesante resaltar que a día 3.5 se observa una caída significativa de su expresión a la mitad respecto al estado indiferenciado para luego volver a recuperar su nivel. Esta breve caída probablemente se deba a una regulación negativa dada en el transcurso de la TEM. Los casos más significativos son los de las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$  dado que se encuentran prácticamente ausentes en el día 0 y ambas muestran un ascenso significativo de su expresión entre los días 9 y 15. Recordemos que en este momento los cuerpos embrioides comienzan a ganar actividad contráctil y finalmente se diferencian a cardiomiocitos inmaduros. También analizamos el nivel de expresión de la laminina  $\alpha 3$  pero no encontramos presencia de esta en el estado indiferenciado y tampoco durante la diferenciación cardíaca.

Entonces, a modo de breve conclusión, cada una de estas integrinas ( $\alpha 3$  y  $\alpha 6$ ) posee un perfil de expresión diferente a pesar de unirse ambas al mismo ligando. Esto podría deberse a que cada una de estas subunidades se une a una clase de laminina distinta disparando cascadas de señalización diferentes, las cuales resultan en funciones dispares.

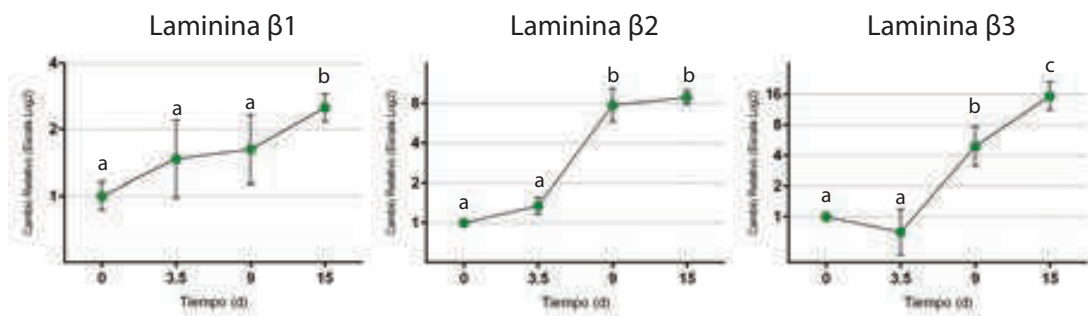
Finalmente, analizamos el perfil de expresión de mRNA de las 3 subunidades  $\beta$  (Figura 4.7) y las 3 subunidades  $\gamma$  (Figura 4.8). Al estudiar la subunidad  $\beta$  se observa un aumento significativo de las lamininas  $\beta 2$  y  $\beta 3$  de entre 8 y 16 veces en los días 9 y 15 del protocolo de diferenciación mientras que la cadena  $\beta 1$  eleva su expresión ligeramente pero de manera significativa hacia el día 15.

En el caso de las lamininas  $\gamma$ , los cambios relativos observados son menores. Sin embargo se evidencia un incremento significativo de la subunidad  $\gamma 3$  en el día 3.5 para luego descender a niveles similares a los encontrados en el estado indiferenciado. Además, a día 9 asciende la expresión en aproximadamente 3 veces de la subuni-

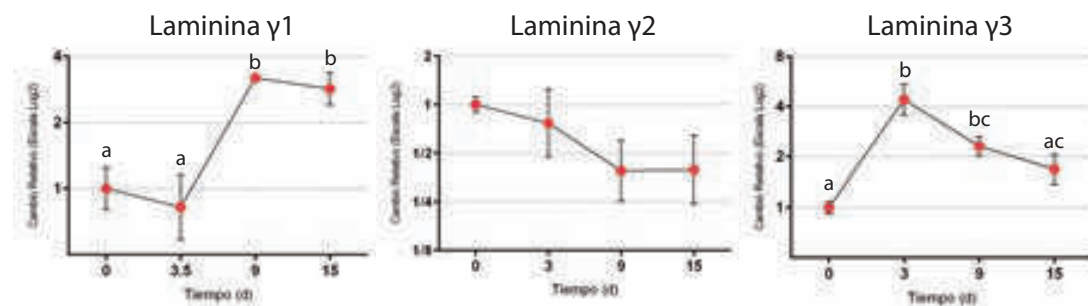


**Fig. 4.6:** Análisis de la expresión de las 5 subunidades  $\alpha$  de Lamininas por RT-qPCR durante la diferenciación cardíaca. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando los valores de RPL7 y luego relativizados al día 0 de la diferenciación (estado indiferenciado). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM y son graficados en escala Log2. N=3

dad  $\gamma 1$  y se mantiene estable. La subunidad  $\gamma 2$  se mantiene constante, sin cambios significativos.



**Fig. 4.7:** (A) Análisis de la expresión de las subunidades  $\beta$  de laminina por RT-qPCR durante la diferenciación cardíaca. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando los valores de RPL7 y luego relativizados al día 0 de la diferenciación (estado indiferenciado). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM y son graficados en escala Log2. N=3



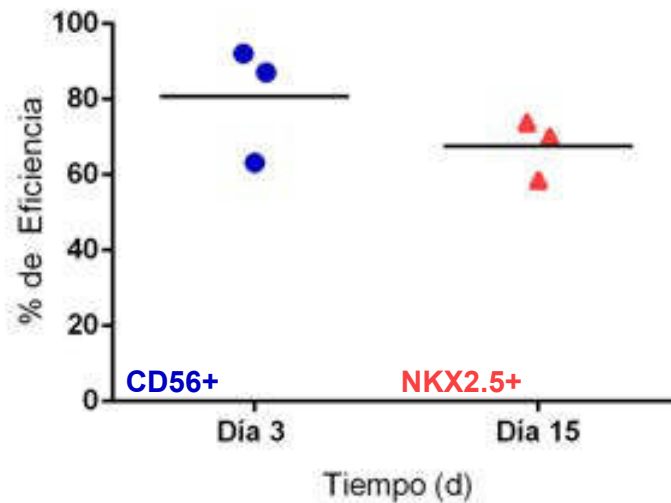
**Fig. 4.8:** (A) Análisis de la expresión de las 3 subunidades  $\gamma$  de laminina por RT-qPCR durante la diferenciación cardíaca. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando los valores de RPL7 y luego relativizados al día 0 de la diferenciación (estado indiferenciado). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM y son graficados en escala Log2. N=3

Como conclusión, se observa una regulación diferencial de la expresión de los diferentes subtipos a lo largo de la diferenciación. Por consiguiente, los heterotrímeros de laminina formados en cada estadio del modelo de diferenciación serán distintos y la afinidad por las diferentes integrinas será variable acorde al tipo de laminina con la cual interactúe.

## 4.2. Caracterización de las subunidades de integrinas y de sus ligandos a lo largo de la diferenciación cardíaca a partir de una monocapa celular megaconfluente

En esta nueva sección realizaremos una exhaustiva caracterización de subunidades de integrinas que se expresan durante la diferenciación cardíaca pero a partir del segundo protocolo descrito en el capítulo anterior, el cual comienza con la generación de una monocapa celular megaconfluente. Si bien los dos protocolos implican forzar la diferenciación a mesodermo y luego a cardiomiocitos, existe una diferencia no menor ajena a los linajes implicados: en el protocolo descrito previamente la diferenciación se realiza en tres dimensiones. En cambio, este modelo describe los cambios en una diferenciación en dos dimensiones. Hipotéticamente este cambio estructural *per se* podría implicar cambios mayores en la expresión de las proteínas de la MEx y sus receptores.

Como explicamos antes, una de las dificultades de este tipo de protocolos es la variabilidad que se obtiene en la eficiencia de diferenciación. Para el análisis de expresión de integrinas, utilizamos aquellos protocolos que se diferenciaron exitosamente, es decir, donde tanto a día 3 (Marcador CD56) como a día 15 (Marcador NKX2.5-eGFP) su eficiencia es mayor al 50 % (Figura 4.9). Esta definición de éxito es arbitraria, sin embargo acorde a nuestra experiencia y la literatura es un punto de corte alto que identifica una diferenciación cardíaca apropiada. Es importante destacar que en este modelo de diferenciación fue mas simple obtener los cardiomiocitos inmaduros en su estado unicelular sin alterar la presencia de los epítopes de membrana. Esta monocapa es menos compacta que los cuerpos latidores, por lo que solo mediante la incubación con la enzima Tryple el cultivo fue disgregado exitosamente.



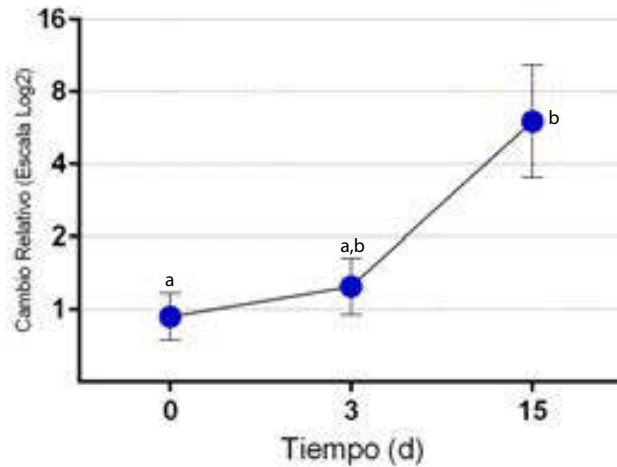
**Fig. 4.9:** Eficiencia del protocolo de diferenciación cardíaca a día 3 y a día 15. A día 3: población celular positiva para el marcador del progenitor mesodérmico CD56. A día 15: población celular positiva para el marcador de cardiomiocito inmaduro NKX2.5-eGFP (N=3)

#### 4.2.1. Caracterización de las subunidades de integrinas $\alpha 4$ , $\alpha 5$ , $\alpha 8$ y su ligando fibronectina durante la diferenciación cardíaca

En esta parte del trabajo describiremos, tal como lo hicimos con el modelo de diferenciación anterior, el perfil de expresión de las integrinas  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 8$  y su respectivo ligando, la fibronectina. Cabe destacar que en este capítulo analizaremos el perfil de integrinas con una mayor profundidad dado que vamos a estudiar las subunidades  $\alpha 4$  y  $\alpha 8$  tanto a nivel de mRNA como proteico.

Comenzaremos evaluando el perfil de expresión de la fibronectina a lo largo de la diferenciación cardíaca (Figura 4.10). Se observa una significativa tendencia de incremento de los niveles de mRNA de fibronectina a lo largo de la diferenciación cardíaca, aumentando a día 15 aproximadamente siete veces. Es importante mencionar que en este análisis no contamos con el punto temporal a día 9, donde en el



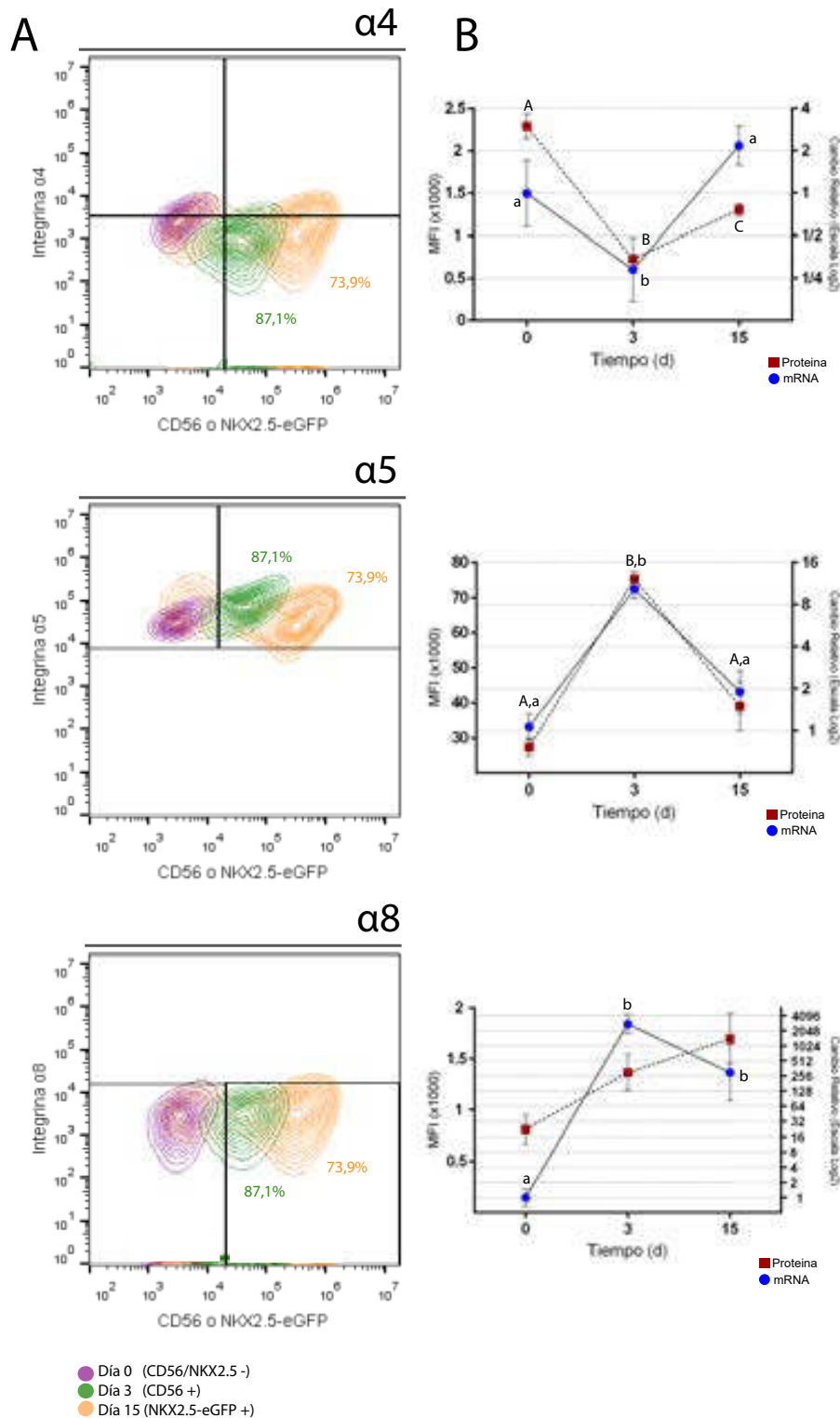


**Fig. 4.10:** Perfil de expresión de la fibronectina por RT-qPCR durante la diferenciación cardíaca a partir de una monocapa celular megaconfluente. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando los valores de RPL7 y luego relativizados al día 0 de la diferenciación (estado indiferenciado). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM y son graficados en escala Log2. N=3

modelo de diferenciación anterior se encuentra el pico de la expresión. Sin embargo, en el estadio de cardiomiocito inmaduro se observa un aumento de la expresión de fibronectina congruente al visto en el protocolo descrito anteriormente. Por esta razón, creemos que existe una tendencia de aumento de la expresión paralela en ambos modelos de diferenciación.

Como siguiente paso, evaluamos el perfil de expresión de las diferentes integrinas que tienen su mayor afinidad por esta proteína estructural de la MEx (Figura 4.11). En primer lugar se observa que a lo largo de la diferenciación cardíaca existe una dinámica distinta de la expresión de las subunidades de integrinas que tienen afinidad por el mismo ligando. La integrina  $\alpha 8$  se encuentra tanto a nivel de mRNA como proteico en un nivel de expresión casi nulo a día 0, pero en los diferentes días de la diferenciación, su mRNA se incrementa significativamente mientras que a nivel proteico su MFI aumenta un 50% a día 15, sin embargo debido a la variabilidad encontrada no resulta ser estadísticamente significativo. A diferencia de esta última,

la integrina  $\alpha 4$  se encuentra en un grado de expresión mayor a día 0 para luego a día 3, decaer tanto a nivel de mRNA como proteico. A día 15, con la aparición del cardiomiocito inmaduro, la expresión de esta integrina tiende a recuperarse. Su mRNA se incrementa significativamente recuperando los niveles observados a día 0 mientras que la MFI proteica aumenta de manera significativamente pero se mantiene en niveles inferiores a los presentes en el estado indiferenciado. La regulación de la expresión mas interesante se da en la cadena  $\alpha 5$ . Como se explicó en la introducción, esta subunidad es aquella con mayor afinidad por la fibronectina y se expresa en una gran variedad de tipos celulares diferentes. Tal como se observa, se encuentra presente en el estado indiferenciado en un nivel de expresión mas elevado que las anteriores dos subunidades de integrina estudiadas. A pesar de su alto nivel de expresión, a día 3, la aparición del marcador del progenitor mesodérmico CD56 es acompañada por un mayor nivel de intensidad de la integrina  $\alpha 5$ , aumentando 3 veces su MFI y mas de 8 veces su nivel de mRNA en comparación al estado indiferenciado. Luego a día 15, en el cardiomiocito inmaduro, su nivel de expresión desciende a niveles muy similares a los que se encontraban previamente en el día 0 (Figura 4.11). Es importante señalar, que como se muestra en el gráfico, existe un paralelismo en la dinámica de expresión del RNAm y de la proteína. Por último, es interesante recordar que este mismo perfil de expresión es congruente al que se observó en el modelo de diferenciación anterior, con lo cual es una regulación propia de la diferenciación cardíaca y no depende del tipo de protocolo realizado.

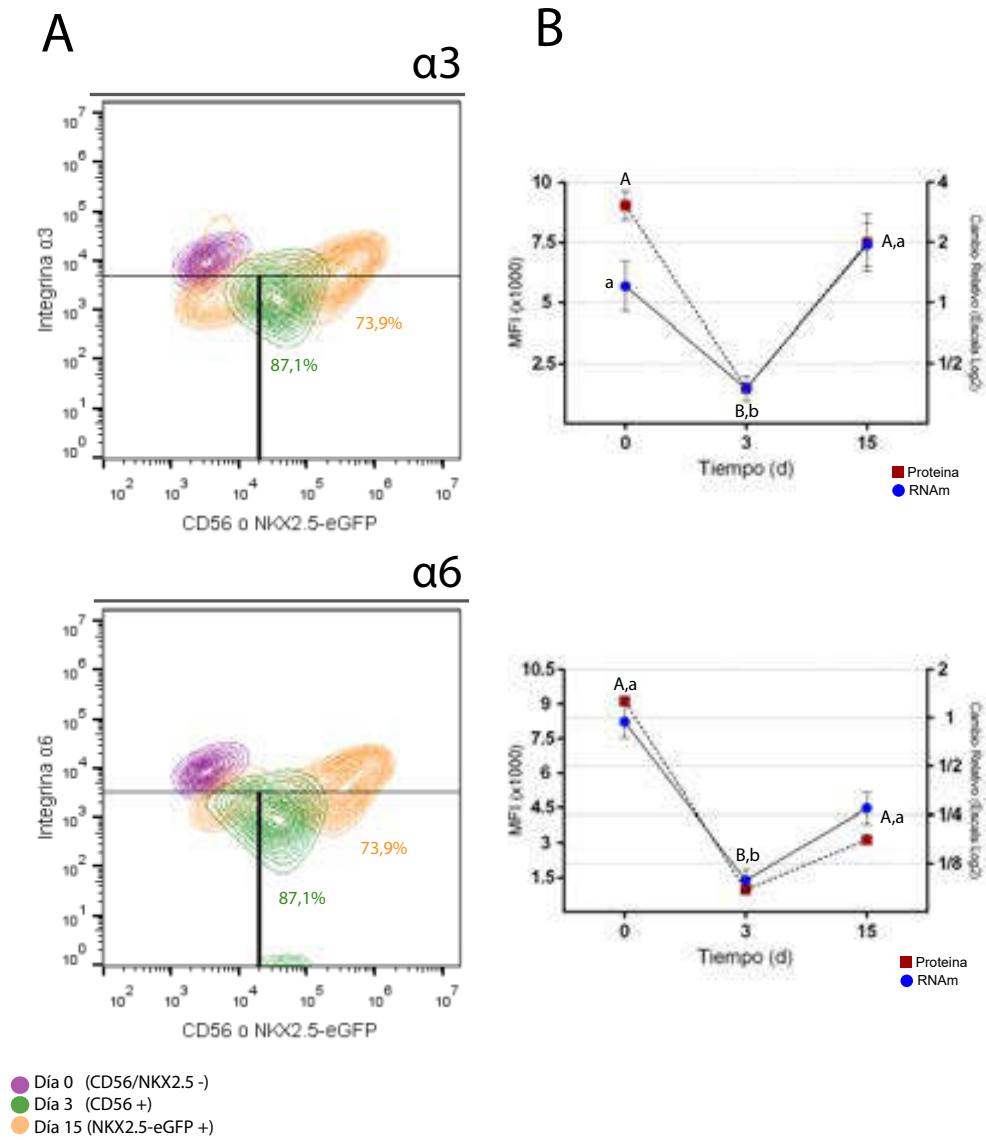


**Fig. 4.11:** Análisis de la expresión de mRNA (N=4) por RT-qPCR y proteína (N=3) de las integrinas  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 8$  en los días 0, 3 y 15 de la diferenciación cardíaca. (A) Evaluación por citometría de la intensidad de fluorescencia de las subunidades de integrina en las poblaciones celulares a lo largo de la diferenciación. (B) Perfil de expresión de mRNA y a nivel proteico: La curva azul muestra el cambio de expresión de mRNA relativizado al día 0 (estado indiferenciado) y la curva roja muestra la MFI en los días indicados de la diferenciación cardíaca.

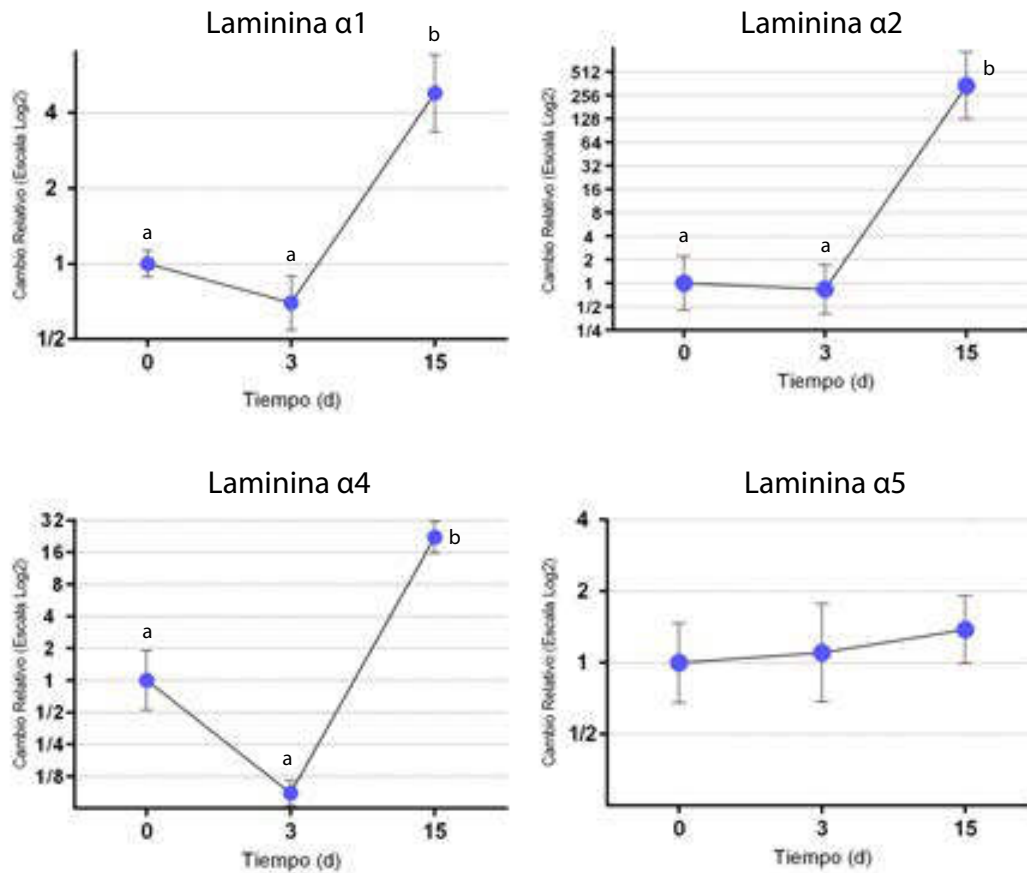
### 4.2.2. Caracterización de subunidades de integrinas $\alpha 3$ , $\alpha 6$ y las diferentes subunidades de laminina durante la diferenciación cardíaca

Adicionalmente, estudiamos la dinámica de expresión de aquellas integrinas que tienen mayor afinidad por los diferentes subtipos de laminina: las subunidades  $\alpha 3$  y  $\alpha 6$  (Figura 4.12). También, por último, realizamos un análisis de la expresión de mRNA de todas las subunidades de Laminina existentes. A diferencia de lo descrito en la sección anterior, en este caso, la dinámica de expresión de ambas subunidades es similar. Ambas se encuentran expresadas en el estadio indiferenciado y luego de la TEM, en el día 3, tanto su mRNA como la proteína caen fuertemente. En el caso de ambas integrinas, su intensidad de fluorescencia desciende aproximadamente 5 veces. Finalmente, a día 15, recuperan parcialmente su expresión aunque la subunidad  $\alpha 3$  lo hace con mayor intensidad. En el caso de esta última, existe una clara discrepancia en la dinámica de expresión cuando se comparan ambos modelos de diferenciación estudiados, mientras que la integrina  $\alpha 6$  mantiene una tendencia decreciente en ambos protocolos.

Si bien no encontramos una diferencia en su comportamiento que nos permita proponer que cada una de estas subunidades tiene afinidad por un subtipo de laminina diferente, evaluaremos como es el perfil de expresión del mRNA de los 11 subtipos de laminina en este modelo de diferenciación cardíaca. Comenzamos analizando el perfil de expresión de las distintas subunidades  $\alpha$  de laminina (Figura 4.13). Como se puede observar, existe una tendencia similar a la vista en el modelo de diferenciación anterior. La cadena  $\alpha 5$  de laminina mantiene su nivel constante a lo largo de toda la diferenciación mientras que tanto las subunidades  $\alpha 2$  como  $\alpha 4$  aumentan significativamente hacia día 15, momento en que el cultivo se encuentra en el estadio de cardiomiocito inmaduro. La mayor diferencia se da en la laminina



**Fig. 4.12:** Análisis de la expresión de mRNA (N=4) y proteína (N=3) de las integrinas  $\alpha 3$  y  $\alpha 6$  en los días 0, 3 y 15 de la diferenciación cardíaca. (A) Evaluación por citometría de la intensidad de fluorescencia de las subunidades de integrinas en las distintas poblaciones celulares a lo largo de la diferenciación. (B) Perfil de expresión de mRNA y a nivel proteico: la curva azul muestra el cambio de expresión de mRNA relativizado al día 0 (estado indiferenciado) y la curva roja muestra la MFI en los días indicados de la diferenciación cardíaca.

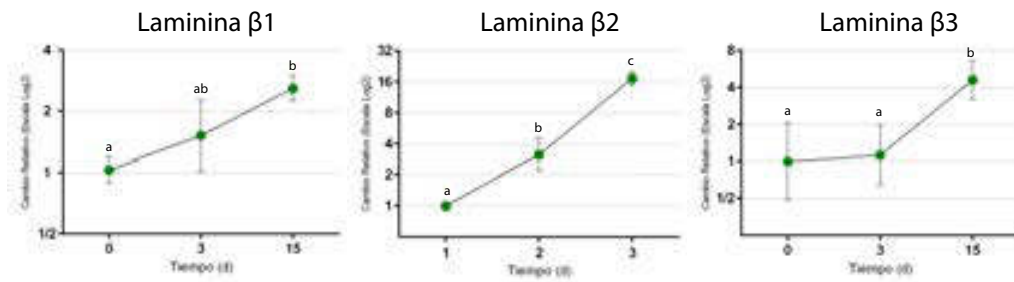


**Fig. 4.13:** Análisis de la expresión de las 5 subunidades  $\alpha$  de Lamininas por RT-qPCR durante la diferenciación cardíaca. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando los valores de RPL7 y luego relativizados al día 0 de la diferenciación (estado indiferenciado). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM y son graficados en escala Log2. N=3

$\alpha 1$  donde, en este modelo, se incrementa 4 veces a día 15. Sin embargo, en el modelo anterior su aumento significativo se da más tempranamente, en el estadio de progenitor cardíaco para luego descender a niveles similares a los encontrados en el estado indiferenciado.

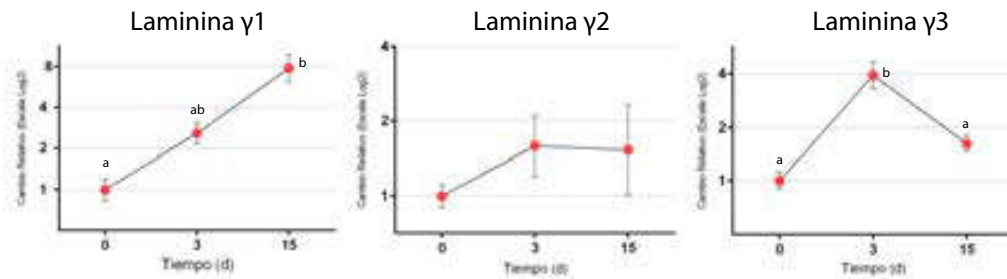
Como último paso, evaluamos la dinámica de expresión tanto de las 3 subunidades  $\beta$  (Figura 4.14) como de las 3 subunidades  $\gamma$  (Figura 4.15).

En este caso, también se observan cambios en las subunidades de laminina que



**Fig. 4.14:** (A) Análisis de la expresión de las subunidades  $\beta$  de Laminina por RT-qPCR durante la diferenciación cardíaca. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando los valores de RPL7 y luego relativizados al día 0 de la diferenciación (estado indiferenciado). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM y son graficados en escala Log2. N=3

se expresan a lo largo de la diferenciación. En el estadio de cardiomiocito inmaduro gana mucha relevancia la laminina  $\beta 2$ , la cual aumenta su nivel de expresión 16 veces respecto al estado indiferenciado, mientras que las otras dos subunidades  $\beta$  también tienden a aumentar pero en un menor grado. Finalmente, las subunidades  $\gamma$  sufren cambios menores pero igualmente significativos. La cadena  $\gamma 1$  aumenta paulatinamente a lo largo de los diferentes días hasta llegar a un máximo de 8 veces a día 15. Diferente comportamiento posee la Laminina  $\gamma 3$ , la cual tiene su pico de expresión en el estadio de progenitor mesodérmico (día 3), para luego descender a niveles similares a los encontrados en el estado indiferenciado. En ambos tipos de subunidades, la dinámica de expresión es muy similar a la observada en el modelo de diferenciación que parte de la formación de cuerpos embrioides.

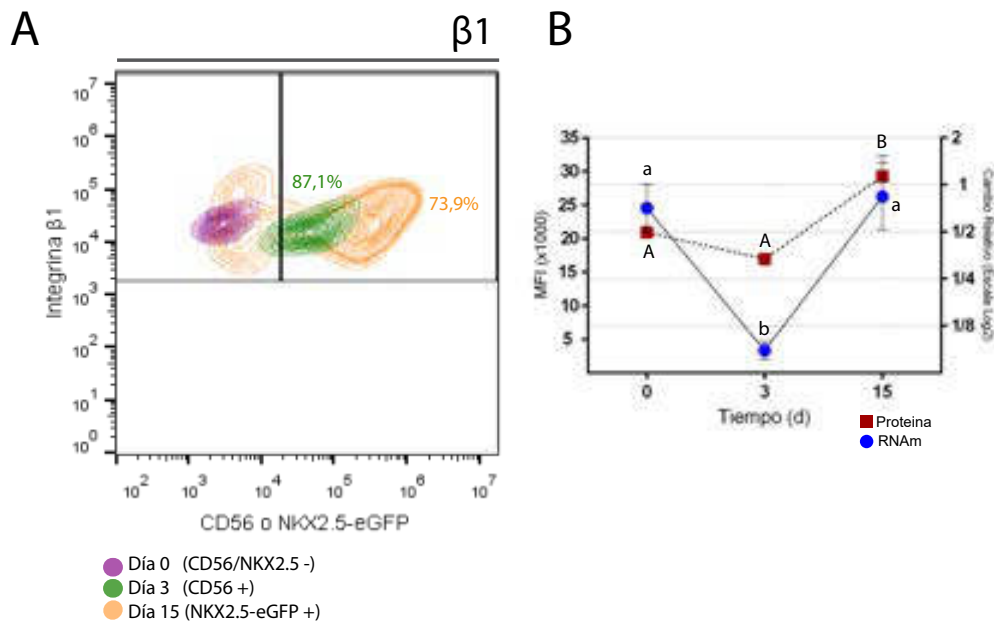


**Fig. 4.15:** (A) Análisis de la expresión de las subunidades  $\gamma$  de laminina por RT-qPCR durante la diferenciación cardíaca. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando los valores de RPL7 y luego relativizados al día 0 de la diferenciación (estado indiferenciado). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM y son graficados en escala Log2. N=3

### 4.2.3. Caracterización de la subunidad de integrina $\beta 1$ durante la diferenciación cardíaca

A diferencia de la caracterización descrita en el protocolo anterior, en este caso también estudiamos como es el perfil de expresión de la subunidad  $\beta 1$  en los diferentes puntos del modelo de diferenciación cardíaca (Figura 4.16). Recordemos que la cadena  $\beta 1$  es la principal subunidad que forma el heterodímero de integrina con la mayoría de las subunidades  $\alpha$  estudiadas en este trabajo (por ejemplo,  $\alpha 5\beta 1$  o  $\alpha 6\beta 1$ ). Los otros tipos de subunidades  $\beta$  que conforman las integrinas se encuentran en menor frecuencia y asociadas a tejidos específicos. En esta figura se observa claramente que a nivel proteico la integrina  $\beta 1$  parte inicialmente de un nivel de expresión alto, luego a día 3 se reduce su intensidad levemente y finalmente a día 15 aumenta su expresión a niveles superiores a los encontrados en el estado indiferenciado. Es interesante mencionar que a nivel de mRNA se observa una regulación de la expresión similar a la descrita a nivel proteico, pero con la diferencia que a día 3 se produce un significativo descenso de la expresión del mRNA, disminuyendo a 1/8 de la expresión inicial.





**Fig. 4.16:** Análisis de la expresión de mRNA (N=4) y proteína (N=3) de la integrina  $\beta 1$  en los días 0, 3 y 15 de la diferenciación cardíaca. (A) Evaluación por citometría de la intensidad de fluorescencia de la cadena  $\beta 1$  en las distintas poblaciones celulares a lo largo de la diferenciación. (B) Perfil de expresión de mRNA por RT-qPCR y a nivel proteico: La curva azul muestra el cambio de expresión de mRNA relativizado al día 0 (estado indiferenciado) y la curva roja muestra la MFI en los días indicados de la diferenciación cardíaca. Letras diferentes en la misma curva indican diferencias significativas en los diferentes tiempos ( $p < 0.05$ ). Letras en minúscula refieren a mRNA y letras en mayúscula a la proteína.

### 4.3. Cuadro comparativo de la dinámica temporal de expresión de las subunidades de integrinas en ambos protocolos de diferenciación cardíaca

A modo de resumen general del capítulo, el siguiente cuadro comparativo muestra el comportamiento de cada una de las subunidades de integrina en los diferentes estadios de ambos modelos de diferenciación (Figura 4.17).

<i>MONOCAPA</i> <i>CUERPOS</i>	Día 0	Día 3 (ó 3.5)	Día 15
$\alpha 3$	+ +++	++ +	+++ +++
$\alpha 6$	+++ +++	+ +	+ ++
$\alpha 5$	++ ++	+++ +++	++ ++
$\alpha 8$	+ +	+++ +++	+++ +++
$\alpha 4$	? ++	? +	? ++
$\beta 1$	? +++	? ++	? +++

**Fig. 4.17:** Cuadro comparativo del perfil de expresión de las subunidades de integrinas en los diferentes estadios de ambos modelos de diferenciación cardíaca.

#### **4.4. Cierre del Capítulo**

A lo largo de este capítulo estudiamos en detalle el perfil de expresión de diferentes subunidades de integrinas durante la diferenciación cardíaca a partir de CMEh. En primer lugar se puede concluir que esta dinámica de expresión, en su mayoría, fue similar en ambos modelos de diferenciación. Esto nos indica que el comportamiento de las integrinas estudiadas no se regula de manera diferente por la formación de cuerpos embrioides o al partir de una monocapa celular megaconfluyente, sino que es propio de la diferenciación a cardiomiocitos. Hay que destacar que nuestros análisis no discriminan el origen de la expresión del RNAm, ya que las muestras son tomadas a partir de la masa celular total, en la cual coexisten, por ejemplo, cardiomiocitos y otras células mesodérmicas diferenciadas. Pero, sin embargo, la citometría de flujo realizada sobre las integrinas si permite discriminar entre las células, ya que se realizó una comarcación para la expresión de CD56, presente en las células mesodérmicas en diferenciación, o de la expresión de eGFP bajo el promotor de NKx2.5, factor de transcripción cardíaco.

Por otro lado, observamos que existe una regulación diferente en la expresión de las integrinas tanto en el progenitor mesodérmico como en el cardiomiocito inmaduro. Por ejemplo, en el día 3, observamos un marcado aumento de la expresión de la integrina  $\alpha 5$  para luego, a día 15, descender significativamente. Finalmente, también estudiamos el perfil de expresión de sus respectivos ligandos evidenciando una regulación interesante a lo largo de este proceso. En primer lugar, la Fibronectina tiende a aumentar su nivel de expresión a lo largo de la diferenciación mientras que existen cambios en las clases de Lamininas que se expresan acorde al tipo de población celular presente. Estos resultados obtenidos serán útiles en el desarrollo del próximo capítulo dado que buscaremos estudiar si el hecho de manipular la expresión de una integrina, afecta significativamente la dinámica de la diferenciación.

## **5. SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE LA INTEGRINA $\alpha 5$ DURANTE LA TEM EN LA DIFERENCIACIÓN CARDÍACA**

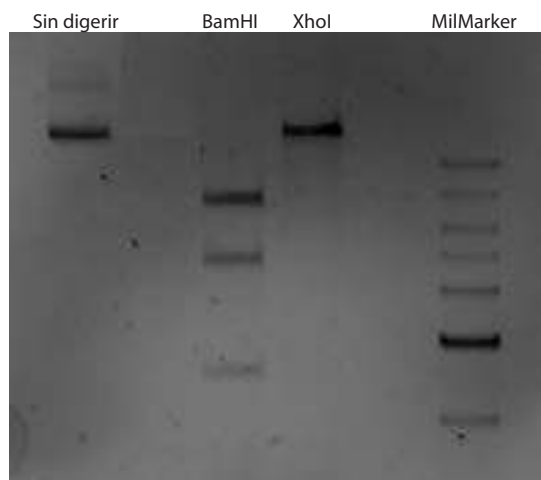
Una vez desarrollado el sistema experimental de silenciamiento inducible, evaluamos si existen cambios tanto funcionales como moleculares en las CMEh HES3 y durante el modelo de diferenciación cardíaca que parte de una monocapa celular megaconfluente al manipular la expresión de la integrina  $\alpha 5$ .

A lo largo de este capítulo mostraremos además la puesta a punto del sistema de silenciamiento inducible de genes blanco mediante una variante del sistema de edición génica CRISPR-Cas9, el cual fue descrito detalladamente en la introducción.

### **5.1. Generación de la línea de CMEh HES3 NKX2.5<sup>eGFP/w</sup> KRAB <sup>$\alpha 5$</sup>**

#### **5.1.1. Obtención y verificación de los plásmidos TRE-dCas9/KRAB y U6-gRNA**

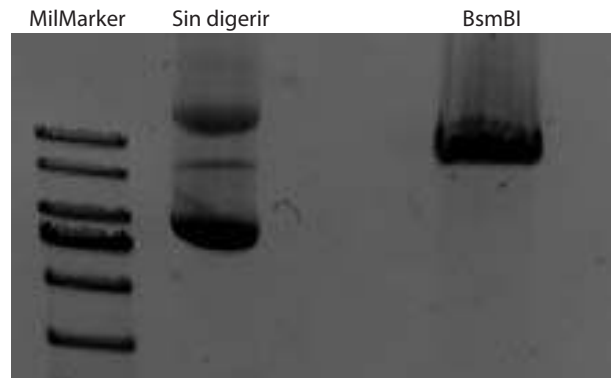
En primer lugar, adquirimos en Addgene los plásmidos lentivirales necesarios para la construcción de la línea celular modificada. El primero de ellos posee aproximadamente 14.000 pares de bases y la fusión dCas9/KRAB se ubica río abajo del promotor que responde a doxiciclina (TRE). En el comienzo de mi doctorado, esta variante del sistema CRISPR-Cas9 había sido publicada recientemente por lo que debimos realizar un chequeo exhaustivo mediante mapeo con enzimas de restricción para evaluar si eran los vectores correctos, dado que inicialmente fueron enviados



**Fig. 5.1:** Mapeo de restricción del plásmido TRE-dCAS9/KRAB. Se utilizaron dos enzimas de restricción diferentes para chequeo: BamHI y XhoI.

plásmidos similares pero con errores en la secuencia (Figura 5.1). En la primera calle se observa el plásmido intacto mostrando sus bandas características: las conformaciones de círculo abierto y la super-enrollada. En la segunda calle, observamos las bandas que resultan de la digestión con la enzima BamHI cuyos tamaños son 7418 pb, 4746 pb y 2485 pb. Finalmente, en la tercera se obtuvo la banda que surge producto del digerido con la enzima XhoI, la cual genera una sola banda líneal de 14586 pb.

El siguiente paso consistió en caracterizar mediante mapeo de restricción el plásmido que fue clonado con el gRNA de diferentes subunidades de integrina río abajo del promotor U6. En este caso, también es interesante destacar que con el primer plásmido lentiviral diseñado para este fin no fue posible generar partículas virales y tiempo después fue reemplazado por otros vectores diferentes. Debido a esto, también realizamos un chequeo exhaustivo de este (Figura 5.2). El plásmido portador U6-gRNA tiene un peso de 8475 pb que se observa tanto en la primera calle, donde obtuvimos las tres bandas características del plásmido intacto: círculo



**Fig. 5.2:** Mapeo de restricción del plásmido U6-gRNA. Se utilizó la enzima de restricción BsmBI para su chequeo.

abierto, una proporción pequeña de la banda líneal y super-enrollada. En la segunda calle se encuentra el producto digerido por la enzima BsmBI que genera una sola banda de 8450 pb que es coincidente con la banda líneal observada en el plásmido intacto.

Una vez que el tamaño de ambos vectores fue chequeado, el plásmido portador fue clonado con diferentes gRNA de genes blanco. En este trabajo, los genes blanco de interés son las subunidades de integrina  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha 8$  descritas en la caracterización del capítulo anterior (Figura 5.3).

### **5.1.2. Transducción de la línea HES3 NKX2.5<sup>eGFP/w</sup> con ambos plásmidos lentivirales**

#### **Transducción del vector TRE-dCas9/KRAB**

Luego de haber purificado y clonado los diferentes plásmidos mencionados anteriormente, iniciamos la etapa de la transducción viral en el cultivo celular. En primer lugar, se transdujo el plásmido TRE-dCas9/KRAB en nuestra línea de CMEh y 48 horas más tarde las colonias fueron seleccionadas mediante el tratamiento con

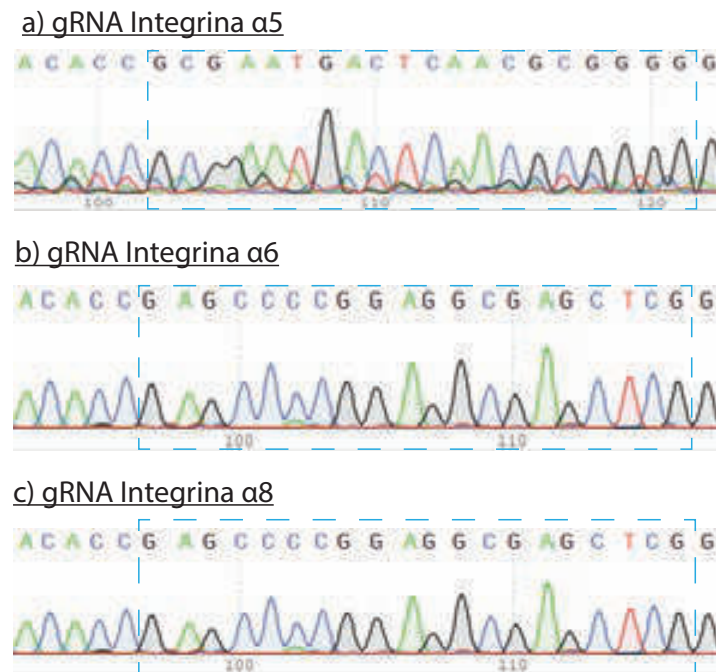
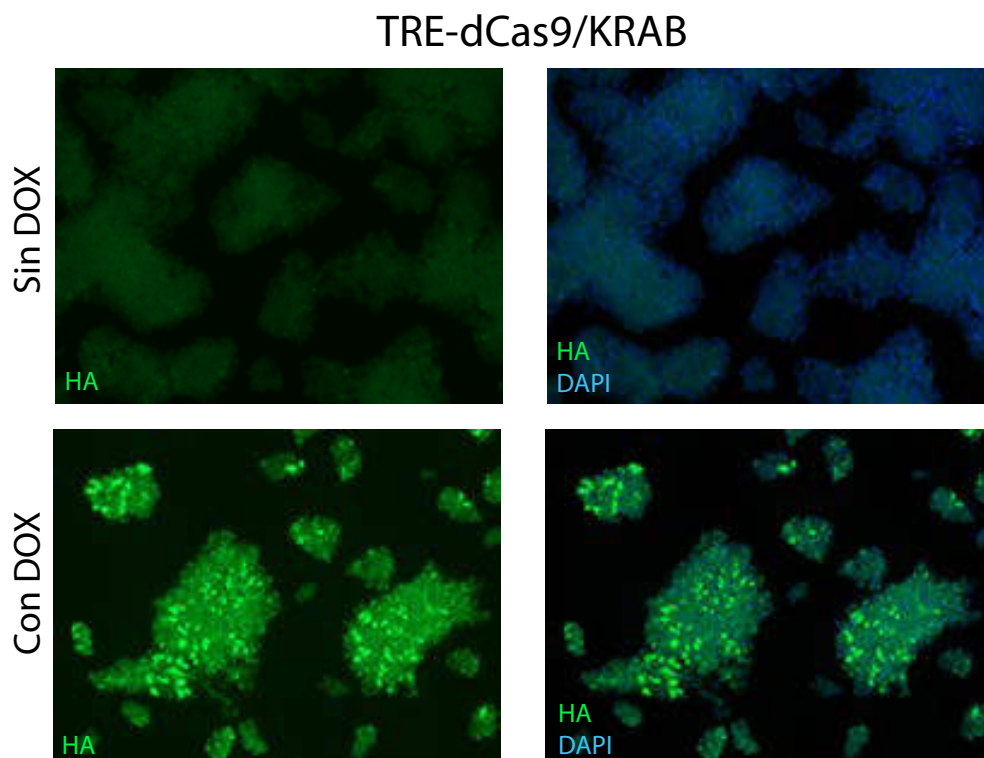


Fig. 5.3: Clonación del plásmido portador con los gRNA de las integrinas  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha 8$ .

el antibiótico G418 debido a que este vector posee resistencia al mismo. Una vez seleccionadas, comenzamos con el aislamiento clonal de manera de obtener líneas celulares modificadas que posean idéntico nivel de inducción de la proteína fusión dCas9/KRAB. Este paso fue puesto a punto por nuestro laboratorio dado que lograr líneas clonales es particularmente dificultoso en este sistema experimental ya que estas células al encontrarse unicelulares tienden a morir o diferenciarse. El cultivo seleccionado fue crecido de manera muy diluida para lograr tener a cada célula lo más alejada de sus vecinas. Además, fue clave en este punto mantener las células por 72 horas con el inhibidor de la Rho kinasa (ROCKi), el cual inhibe vías de señalización que disparan la apoptosis cuando las CMPH se encuentran en estado unicelular. Luego, se las dejó crecer en la misma placa aproximadamente 8 días y



**Fig. 5.4:** Microfotografía de inmunofluorescencia contra el tag HA fusionado a dCas9-KRAB en la línea de CMEh HES3. En el panel superior se muestra el cultivo celular sin tratamiento mientras que el inferior se trató con doxiciclina 250ng/ml por 72 hs.

se las picó individualmente. La eficiencia de obtención de clones es muy baja dado que existe una alta proporción de muerte por lo que se precisó partir de una gran cantidad de células aisladas iniciales. Finalmente, analizamos el nivel de expresión de 9 clones diferentes y seleccionamos aquel que tuviera el mayor nivel de expresión de dCas9-KRAB luego de tratarlos 72 horas con doxiciclina. Cabe destacar que esta proteína fusión se encuentra unida al tag HA por lo que evaluamos la expresión mediante inmunofluorescencia (Figura 5.4).

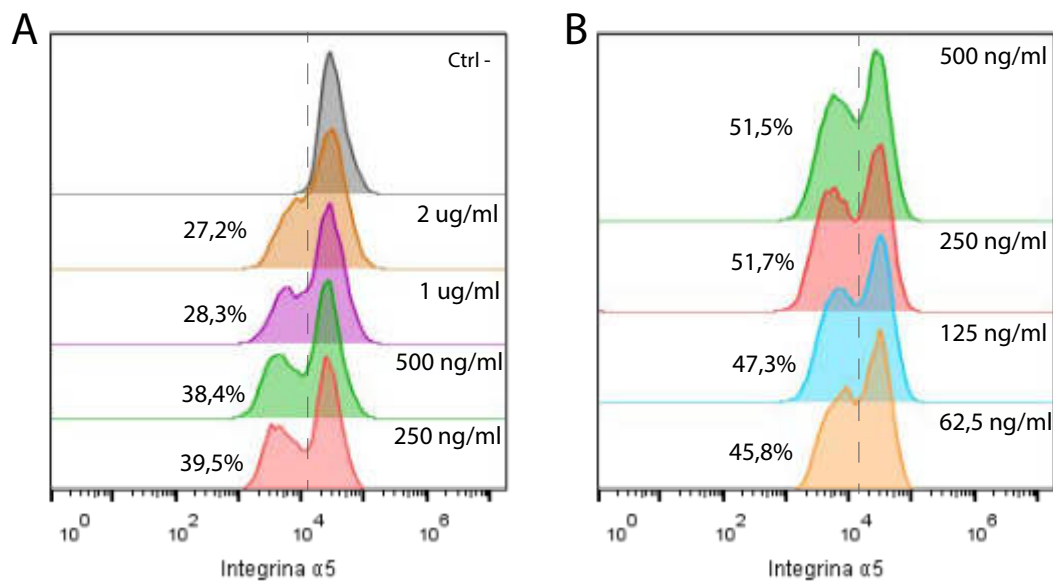
La inmunofluorescencia realizada contra el tag HA nos permite conocer en profundidad como es la dinámica de expresión del represor en los diferentes clones. En



primer lugar, en el clon mostrado (Figura 5.4) se observa que la activación de la transcripción de KRAB es doxiciclina dependiente y que existe una alta inducción del represor a las 72 horas. El hecho de que la transcripción de dCas9-KRAB no se active sin el agregado de doxiciclina (ausencia de *leaking*) es muy importante dado que en este tipo de sistemas es usual encontrar clones donde el represor se encuentra expresado en ausencia del inductor. Por último se observa que no todas las células dentro del mismo clon poseen la misma intensidad de fluorescencia por lo que se presenta un diferente nivel de expresión del represor KRAB entre células, lo que podría deberse a una respuesta heterogénea de las mismas o a la presencia de dos o más clones en un mismo cultivo. De todos modos, es importante resaltar que todas las células del cultivo resultaron activas, solo que algunas en un mayor nivel.

### **Transducción del plásmido portador U6-gRNA**

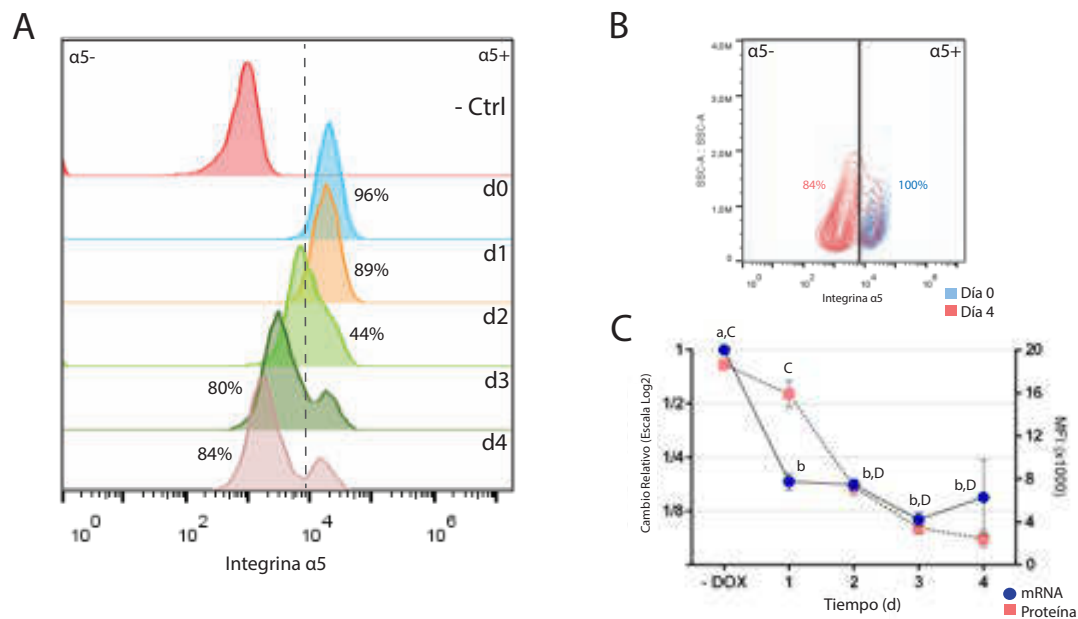
A partir de la generación de la línea de CMEh HES3/KRAB, realizamos la transducción del plásmido portador del gRNA de interés con el objetivo de que se integre al genoma y así tener una expresión constitutiva de este en el cultivo celular. Es importante recordar que sobre esta línea modificada realizamos 3 transducciones virales independientes con los gRNAs de los siguientes genes blanco: integrinas  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha 8$ . De todos modos a lo largo de esta sección haremos especial énfasis en los resultados obtenidos con el gRNA de la integrina  $\alpha 5$  dado que fue aquella donde pudimos desarrollar el silenciamiento inducible de manera exitosa. El plásmido transducido portador del gRNA posee una resistencia contra el antibiótico Puromicina, el cual fue utilizado para seleccionar aquellas colonias positivas. Luego comenzamos a trabajar con subclones de este cultivo de células con el objetivo de observar si existía un silenciamiento efectivo al tratarlas con doxiciclina. Se evaluó a las 72hs de incubación con doxiciclina mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo primario conjugado contra la integrina  $\alpha 5$ . La concentración reportada de uso de doxiciclina



**Fig. 5.5:** Curva de concentración de doxiciclina en el silenciamiento de la integrina  $\alpha 5$  a las 72 horas (N=2). A)Rango de concentraciones entre 2 ug/ml y 250 ng/ml B)Rango de concentraciones entre 500 ng/ml y 62,5 ng/ml

en CMPH es 2 ug/ml [79], sin embargo observamos que esta concentración afectaba la sobrevivencia de las células por lo que realizamos también una curva dosis-respuesta con el fin de evaluar cuanto se podía disminuir la concentración de doxiciclina sin afectar el silenciamiento (Figura 5.5).

En primer lugar, en este experimento, se observa que en ambos cultivos celulares existe una proporción importante de células que se silencia la integrina  $\alpha 5$  a las 72 horas. Es interesante como en la figura A, la separación de la población negativizada y su porcentaje aumenta a medida que disminuye la concentración de doxiciclina. Como en este experimento aún no se presentaba una dosis de la droga que perjudicase el silenciamiento, continuamos en otro ensayo disminuyendo la concentración de la doxiciclina hasta 62,5 ng/ml como se observa en la figura B (Figura 5.5). A partir de los resultados observados en este panel, decidimos que la concentración final debía ser 250 ng/ml dado que es aquella donde se mantiene el mayor porcentaje silenciado



**Fig. 5.6:** Dinámica temporal del silenciamiento de la integrina  $\alpha 5$ . A) Evaluación de la represión a nivel proteico de este receptor durante 4 días por citometría de flujo (N=3). B) Poblaciones celulares negativa y positiva para la integrina  $\alpha 5$  en los días 0 y 4 del silenciamiento. C) Perfil de expresión de mRNA (RT-qPCR) y a nivel proteico: La curva azul muestra el cambio de expresión de mRNA relativizado al mismo cultivo de CMEh HES3 pero sin tratar con doxiciclina (N=3). La curva roja muestra la MFI en los 4 días donde se silenció este receptor. Letras diferentes en la misma curva indican diferencias significativas en los diferentes tiempos ( $p < 0.05$ ). Letras en minúscula refieren a mRNA y letras en mayúscula a la proteína.

de la integrina  $\alpha 5$ . Por consiguiente, logramos disminuir 8 veces la concentración reportada de doxiciclina con el objetivo de que su presencia no afecte la supervivencia celular. Luego de observar que una proporción de la población celular reprimió la expresión de esta integrina en respuesta al agregado de doxiciclina, buscamos aislar clones donde el silenciamiento inducible sea total (Figura 5.6). El procedimiento de aislamiento clonal fue idéntico al descrito anteriormente.

Uno de los clones aislados mostró a día 4 un silenciamiento de aproximadamente el 85% a nivel proteico pero a día 2 ya se observó un descenso en su nivel de expresión (Figura 5.6). En el panel C se muestra el paralelismo entre la represión del nivel del mRNA y de la proteína, disminuyendo su expresión en conjunto. Por

otro lado, a las 24 horas se observó un fuerte descenso del mRNA pero aún no de la proteína, probablemente debido a que la vida media de este receptor a nivel proteico sea mas prolongada. Por último, debemos destacar que a día 4 se observa un remanente de la población positiva de aproximadamente un 15 %. Esto podría llegar a deberse a una respuesta heterogénea de las células a pesar de pertenecer al mismo clon o que la población sea biclonal debido a la dificultad técnica del aislamiento que se presenta en los cultivos de CMP. El resultado mostrado anteriormente de la inmunomarcación del *tag* HA avala la respuesta heterogénea observada. De todos modos, consideramos que el grado de silenciamiento es suficientemente elevado como para utilizar esta línea clonal.

## **5.2. Estudios funcionales en la línea HES3 NKX2.5<sup>eGFP/w</sup> KRAB<sup>α5</sup> y en su diferenciación a cardiomiocitos**

En esta sección evaluamos cuales son los cambios funcionales que se observan en esta línea celular al silenciar la integrina  $\alpha 5$  tanto en en su estado indiferenciado como en la fase de la TEM durante la diferenciación cardíaca.

### **5.2.1. Evaluación de la tasa de proliferación y apoptosis en el estado indiferenciado.**

Como mencionamos en la introducción, una de las principales propiedades que poseen las CMP en su estado indiferenciado es la autorenovación indefinida. Por consiguiente, cuando este tipo de líneas celulares sufre algún tipo de estrés, mayoritariamente tienden a enlentecer su tasa de proliferación o si se prolonga en el tiempo, desencadenan un proceso de apoptosis que las lleva a su muerte.

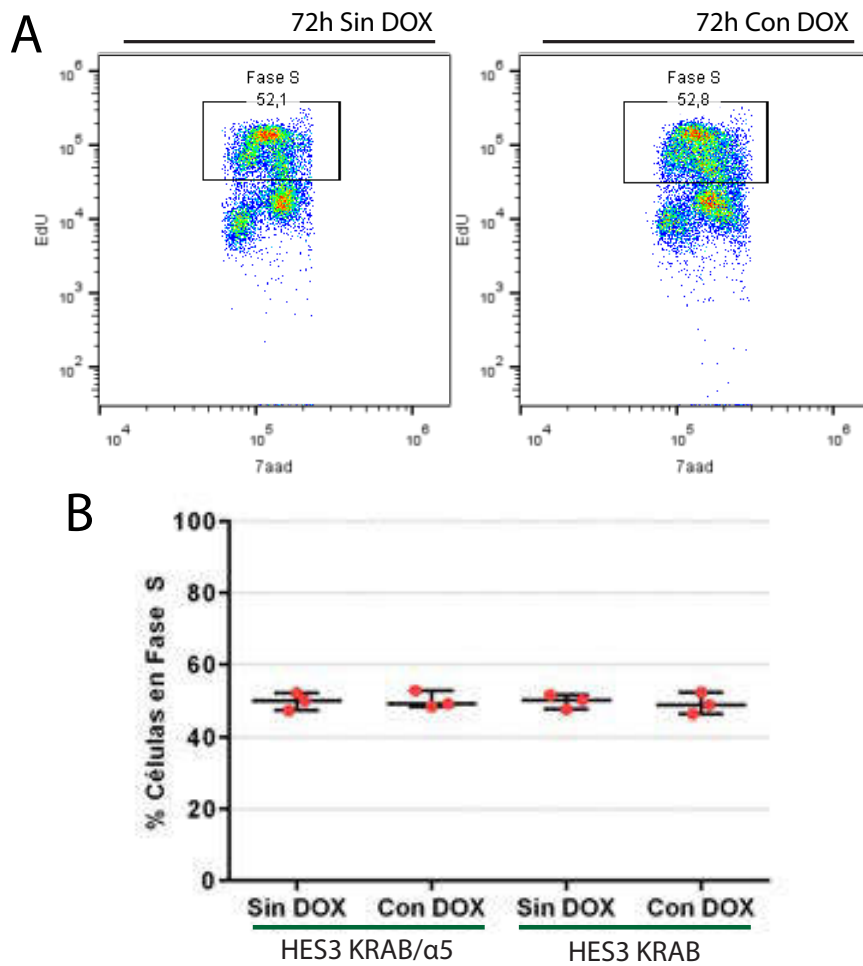
## **Estudio de la proliferación**

En primer lugar buscamos estudiar si la tasa de proliferación se encuentra afectada 72 horas luego del inicio del silenciamiento (Figura 5.7). Tal como vimos anteriormente, en este punto temporal ya se encuentra reprimida la expresión de este receptor en aproximadamente el 80 % de las células. Se utilizó el ensayo de proliferación EdU mediante citometría de flujo que nos permite saber el porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular. De todos modos, no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de células que se encuentran en la Fase S del ciclo celular bajo ambas condiciones. El porcentaje de células en la fase S suele ubicarse en un rango de 45 %-50 % dada la alta proliferación que poseen las CMPH. Esto indicaría que a las 72 horas de iniciado el silenciamiento, no existen cambios funcionales visibles en la tasa de proliferación celular. Es importante destacar que además realizamos los controles necesarios en la línea HES3 KRAB que no expresa el gRNA de la integrina para descartar efectos de la doxiciclina sobre esta línea.

## **Estudio de la apoptosis y muerte celular**

Luego de verificar que no existen cambios en la tasa de proliferación, buscamos evaluar si se presenta una mayor tasa de apoptosis al silenciar esta integrina por el mismo período de tiempo (Figura 5.8). En este caso, utilizamos el Kit de Anexina/IP para determinar la apoptosis y la muerte celular. Pueden aparecer dos clases de poblaciones positivas para estas marcaciones: i) Anexina Positiva: Población celular apoptótica. ii) Anexina-IP Positiva: Población celular necrótica. En nuestro experimento, evaluamos si se presentaban distintos niveles de estas dos poblaciones bajo ambas condiciones. Como en el ensayo de proliferación, no se encontraron cambios significativos por lo que concluimos que esta integrina tampoco está involucrada en la sobrevivencia de estas células, al menos en el corto plazo.

A modo de resumen, la viabilidad celular no se encuentra afectada por el silencia-



**Fig. 5.7:** Evaluación de la proliferación luego de 72 horas del inicio del silenciamiento con doxiciclina. A) Ensayo de proliferación de EdU por citometría de flujo en la línea HES3 KRAB/ $\alpha$ 5 en presencia/ausencia de esta integrina. B) Gráfico que muestra el porcentaje de células en Fase S en la línea celular HES3 KRAB/ $\alpha$ 5 y HES3 KRAB bajo los diferentes tratamientos (N=3). No se encuentran diferencias significativas.

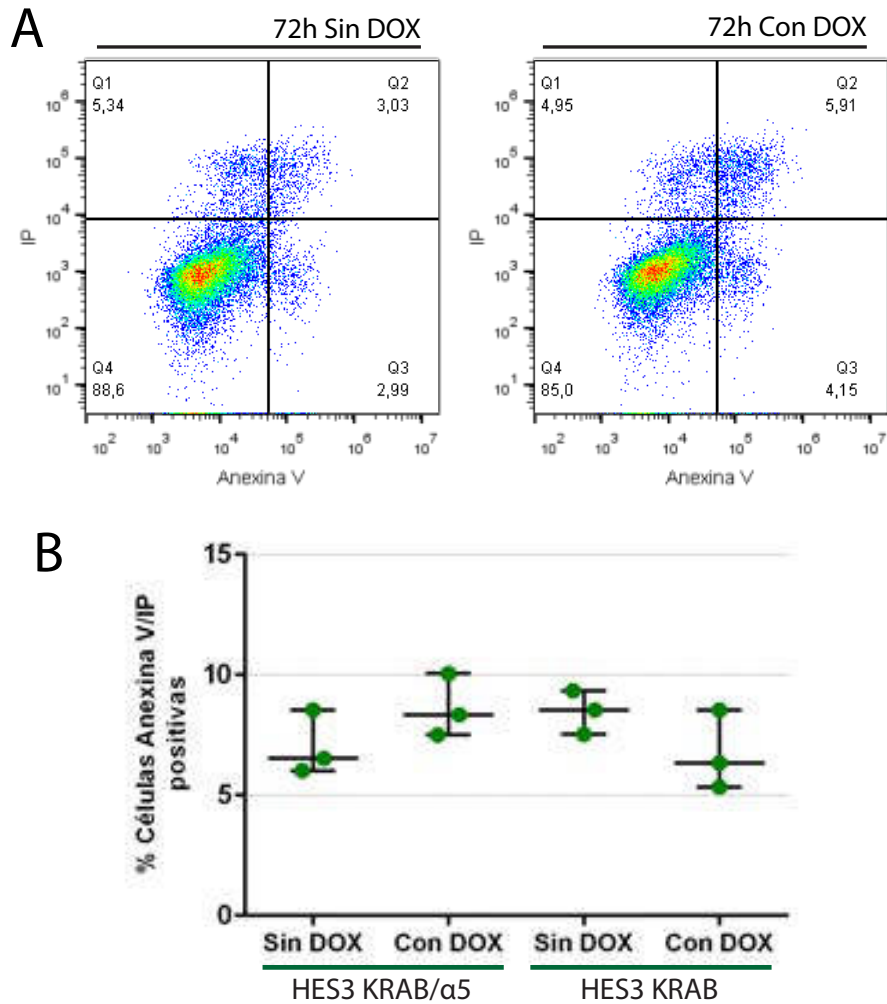
miento de la integrina  $\alpha 5$  por 72 horas, lo cual nos permitió evaluar los cambios que se producen, a partir del silenciamiento de esta integrina durante la diferenciación cardíaca.

### **5.2.2. Evaluación de la diferenciación cardíaca a partir del silenciamiento de la integrina $\alpha 5$ durante la TEM**

A lo largo de esta sección nuestro objetivo central consiste en estudiar si el silenciamiento de la integrina  $\alpha 5$  durante la TEM (Figura 5.9), fase inicial de la diferenciación cardíaca, modifica la dinámica de aparición de este progenitor y de los cardiomiocitos. Elegimos esta fase inicial para inhibir la expresión de  $\alpha 5$  ya que nuestros resultados previos demostraron que es durante la TEM en donde la integrina  $\alpha 5$  se muestra mas expresada (Figura 4.11).

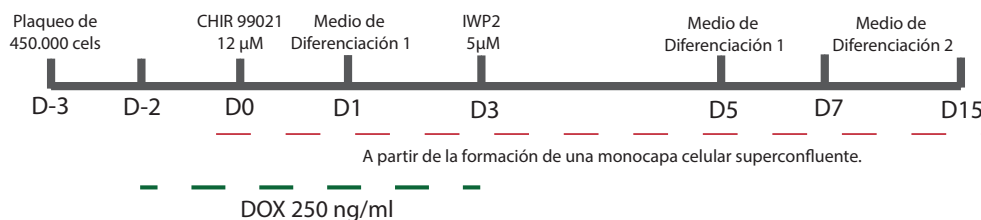
#### **Cambios en la dinámica de aparición del progenitor mesodérmico a partir del silenciamiento de la integrina $\alpha 5$ durante la diferenciación cardíaca**

Como primer paso, realizamos un estudio mas detallado de la dinámica temporal de aparición del marcador del progenitor mesodérmico CD56 y su relación con el aumento de la expresión de la integrina  $\alpha 5$ , descrito en el capítulo anterior. En este caso, observamos tanto a día 2 como a día 3 el comportamiento de estas dos proteínas por citometría de flujo (Figura 5.10). En este seguimiento temporal de ambas proteínas se puede observar que existe una relación clara donde en tan solo 24 horas se duplica el porcentaje de células doble positivas. En primer lugar, a día 2, ya emerge una población importante que posee una alta expresión del marcador CD56 y se correlaciona con una mayor intensidad de la integrina  $\alpha 5$ . Por otro lado, existe una importante subpoblación que es positiva para esta integrina pero aún no para CD56. A día 3, momento en que culmina la TEM, se puede observar como las



**Fig. 5.8:** Evaluación de la tasa de apoptosis luego de 72 horas de iniciado el silenciamiento con doxiciiclina. A) Ensayo de apoptosis con marcación de Anexina V/Ioduro de Propidio (IP) por citometría de flujo en la línea HES3 KRAB/ $\alpha 5$  en presencia/ausencia de esta integrina. B) Gráfico que muestra el porcentaje de células Anexina V positivas en la línea celular HES3 KRAB/ $\alpha 5$  y HES3 KRAB bajo los diferentes tratamientos (N=3). No se encuentran diferencias significativas.

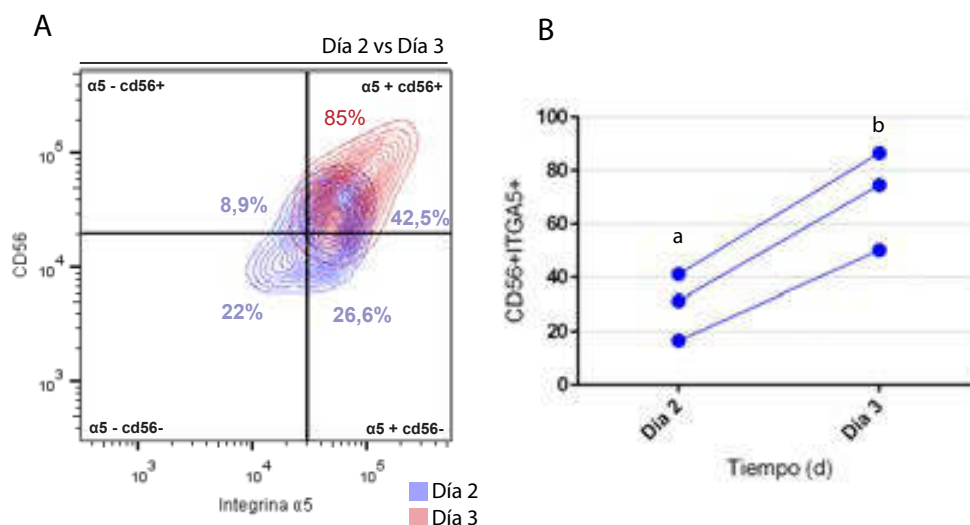




**Fig. 5.9:** Esquema del protocolo de diferenciación a partir de una monocapa celular megaconfluente donde se indica el momento en que se trató el cultivo celular con doxiciclina con el fin de silenciar la integrina  $\alpha 5$ .

células en una proporción casi total resultan ser CD56 e integrina  $\alpha 5$  positivas. Es importante recordar que a día 0, descrito en el capítulo anterior, la integrina  $\alpha 5$  se encuentra expresada pero en una intensidad menor que aquellas que transicionan hacia el progenitor mesodérmico mientras que CD56 no se encuentra expresado.

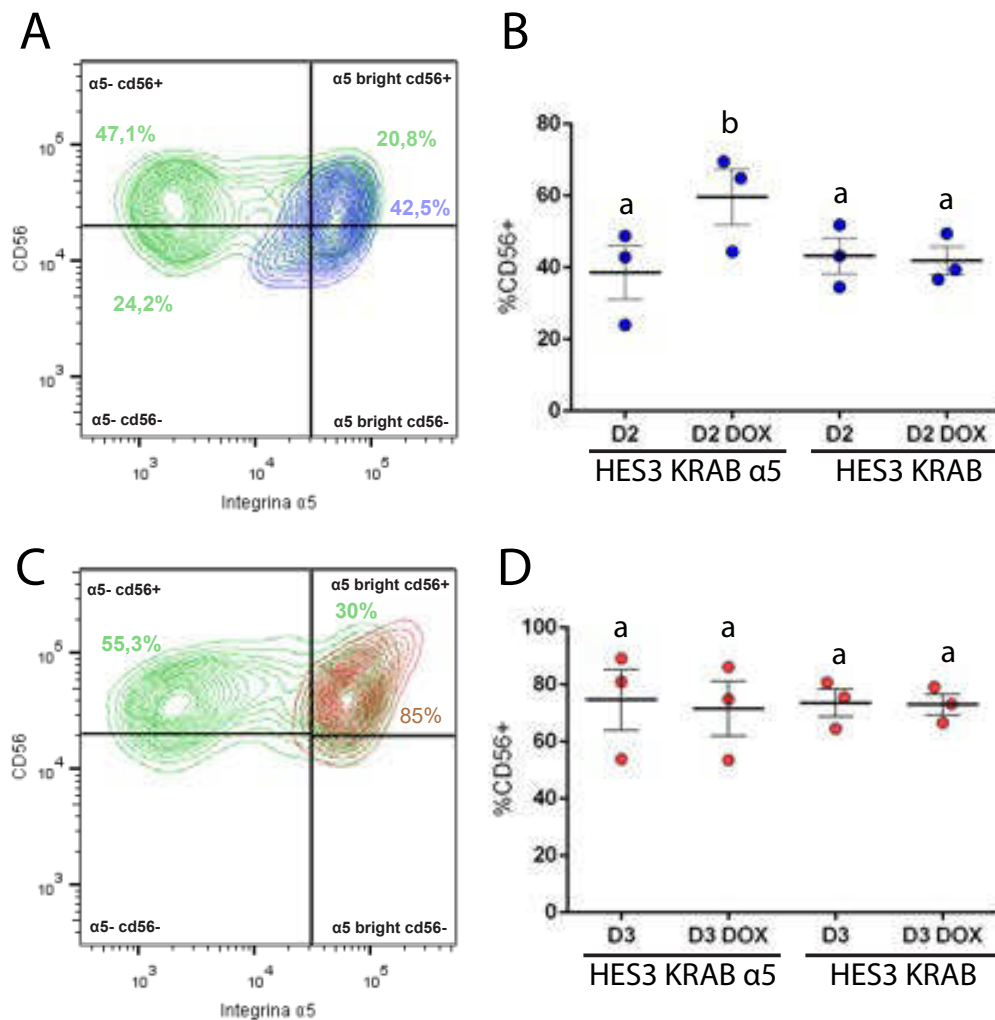
Una vez analizado el comportamiento de nuestros marcadores de interés en los días 2 y 3 de la TEM en la diferenciación cardíaca, buscamos estudiar que ocurre al tratar este cultivo en diferenciación con doxiciclina durante el período descrito en el esquema anteriormente mostrado, desde el día -2 hasta el día 3, momento en que aparece el progenitor mesodérmico. Por consiguiente, nuestro principal objetivo en esta etapa consiste en estudiar si el silenciamiento de la integrina  $\alpha 5$  durante la TEM modifica la dinámica de aparición del progenitor mesodérmico en los días 2 y 3 del protocolo de diferenciación (Figura 5.11). Como se puede observar en el día 2 de la diferenciación comparamos lo que ocurre en la población donde la integrina se encuentra silenciada y en aquella donde la diferenciación transcurre normalmente, sin intervención del sistema experimental. Claramente existe un cambio significativo en la expresión del marcador de la TEM CD56 ya que se genera artificialmente una



**Fig. 5.10:** Dinámica temporal de expresión del marcador CD56 y la integrina  $\alpha 5$  en los días 2 y 3 de la diferenciación cardíaca. A) Gráfico de densidad de puntos que muestra la dinámica temporal de la expresión de ambas proteínas. B) Gráfico que muestra el aumento significativo de la población celular doble positiva entre los días 2 y 3 de la diferenciación (N=3).

población negativa de la subunidad  $\alpha 5$  y como consecuencia se produce un aumento hasta alcanzar el  $59,63\% \pm 7,73\%$  de la población CD56+ en comparación con la línea donde no se silenció esta integrina en la que la población CD56+ da un valor de  $38,57\% \pm 7,48\%$ . Es importante destacar que esta población negativa para  $\alpha 5$  posee un nivel de expresión aún menor de esta subunidad que las células en su estado indiferenciado. A día 3 DOX se observa una población CD56+ del  $71,53\% \pm 9,59\%$  y se equipara el porcentaje con aquel observado en la línea en que no se reprimió la expresión de la integrina  $\alpha 5$  a día 3 ( $74,7\% \pm 10,68\%$  CD56+), tal como se observa en el panel D (Figura 5.11). Esto podría indicar que al silenciar la subunidad  $\alpha 5$ , se desregula el proceso de la TEM y la alta positividad de CD56 observada normalmente a día 3, se adelanta temporalmente al segundo día.

Adicionalmente, en los paneles B y D se puede observar que también realizamos el mismo tratamiento en la línea celular donde se expresa el represor KRAB pero



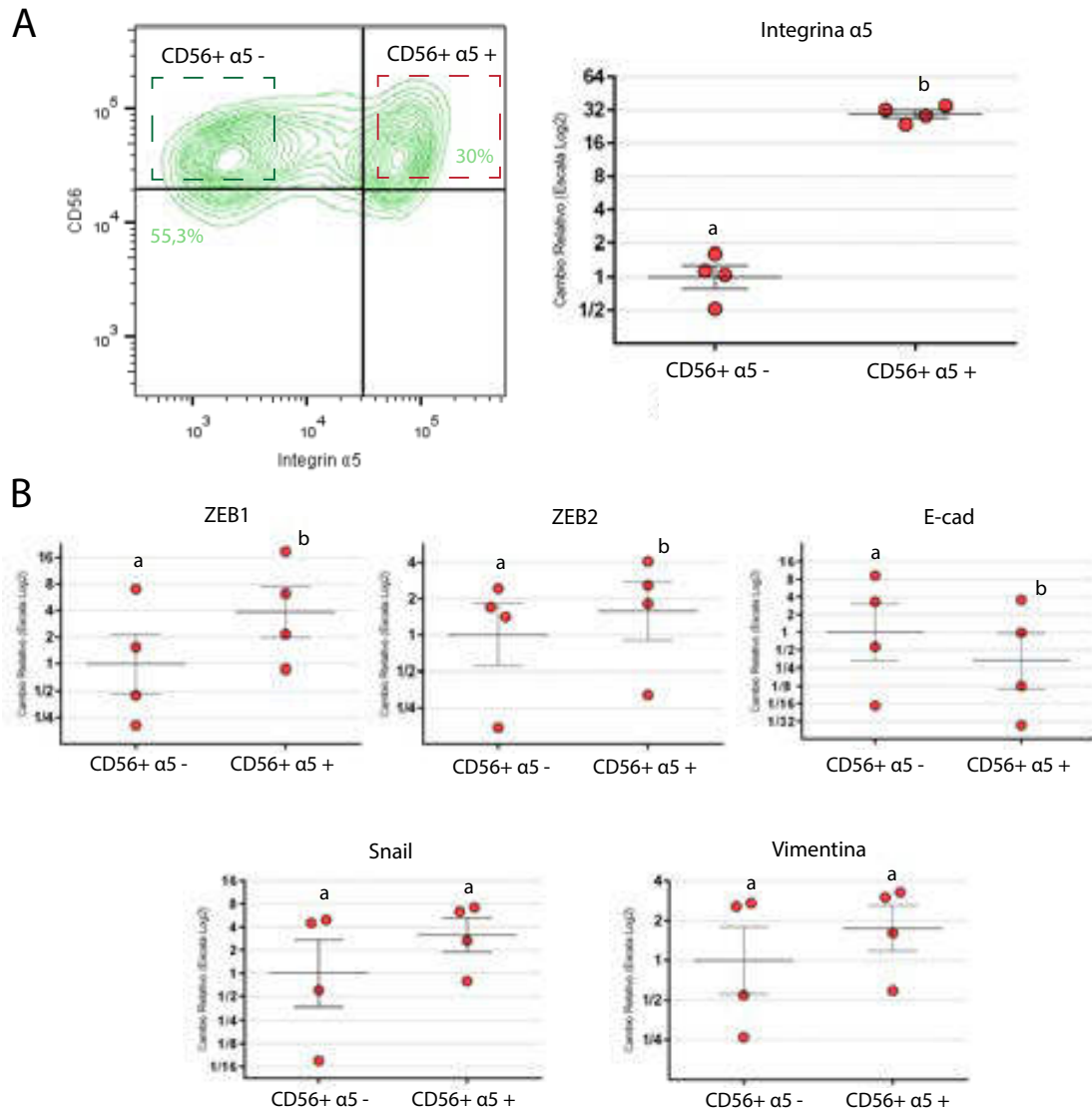
**Fig. 5.11:** Dinámica temporal de expresión del marcador CD56 y la integrina  $\alpha 5$  en los días 2 y 3 de la diferenciación cardíaca al tratar el cultivo con doxiciclina. A) Estudio de la expresión de ambas proteínas por citometría de flujo en el día 2 de la diferenciación cardíaca sin/con doxiciclina. B) Gráfico que muestra el porcentaje de células CD56 $^+$  en el día 2 sin/con doxiciclina. C) Estudio de la expresión de ambas proteínas por citometría de flujo en el día 3 de la diferenciación cardíaca sin/con doxiciclina. D) Gráfico que muestra el porcentaje de células CD56 $^+$  en el día 3 sin/con doxiciclina. (N=3). Los datos son presentados como media  $\pm$  SEM.

no el gRNA de la integrina  $\alpha 5$  y no se observa ningún efecto en la diferenciación generado por el solo agregado de la doxiciclina, lo que permite descartar un efecto no deseado de este antibiótico sobre nuestros cultivos celulares.

Como breve resumen, se observó un cambio en la dinámica temporal de aparición del marcador molecular CD56 en donde aumentó su porcentaje significativamente a día 2 en comparación a la misma línea donde no se intervino el sistema mientras que a día 3 los valores de CD56 se equiparan hasta llegar a un porcentaje prácticamente idéntico.

A partir de estos resultados, buscamos caracterizar en mayor profundidad ambas poblaciones obtenidas en el día 3 con expresión opuesta de la integrina  $\alpha 5$  pero positivas para CD56. Para lograrlo, por medio de la utilización de un *cell sorter*, separamos estas poblaciones celulares para luego analizarlas por RT-qPCR (Figura 5.12). Tal como se muestra, separamos las poblaciones celulares que se encuentran delimitadas por rectángulos en el gráfico de densidad de puntos del panel A y luego analizamos por RT-qPCR el nivel de expresión de la integrina  $\alpha 5$  con el fin de verificar que ambas poblaciones hayan sido correctamente separadas. Se observó un aumento de 30 veces en la expresión del mRNA en la población positiva para la integrina en comparación con aquella donde esta fue silenciada exitosamente. En el Panel B, se muestra que la población doble positiva tiene niveles significativamente mayores de los marcadores de la TEM ZEB1 y ZEB2 mientras que el marcador E-cad disminuye en mayor proporción en aquellas células positivas para la integrina. En el caso de los marcadores de la TEM Snail y Vimentina no encontramos diferencias significativas pero es altamente probable que, dada la variabilidad observada, el número de réplicas biológicas sea insuficiente. En este experimento fue particularmente útil analizar cada réplica biológica como un bloque experimental dado que la eficiencia de la inducción mesodérmica, a través del agregado del inhibidor CHIR 99021, es muy variable.

Como conclusión, luego de la TEM aparecen, a día 3, dos poblaciones de expresión contraria de la integrina  $\alpha 5$  pero igualmente positivas para CD56. Al analizar en mayor profundidad, observamos que aquella población donde la integrina se encuen-

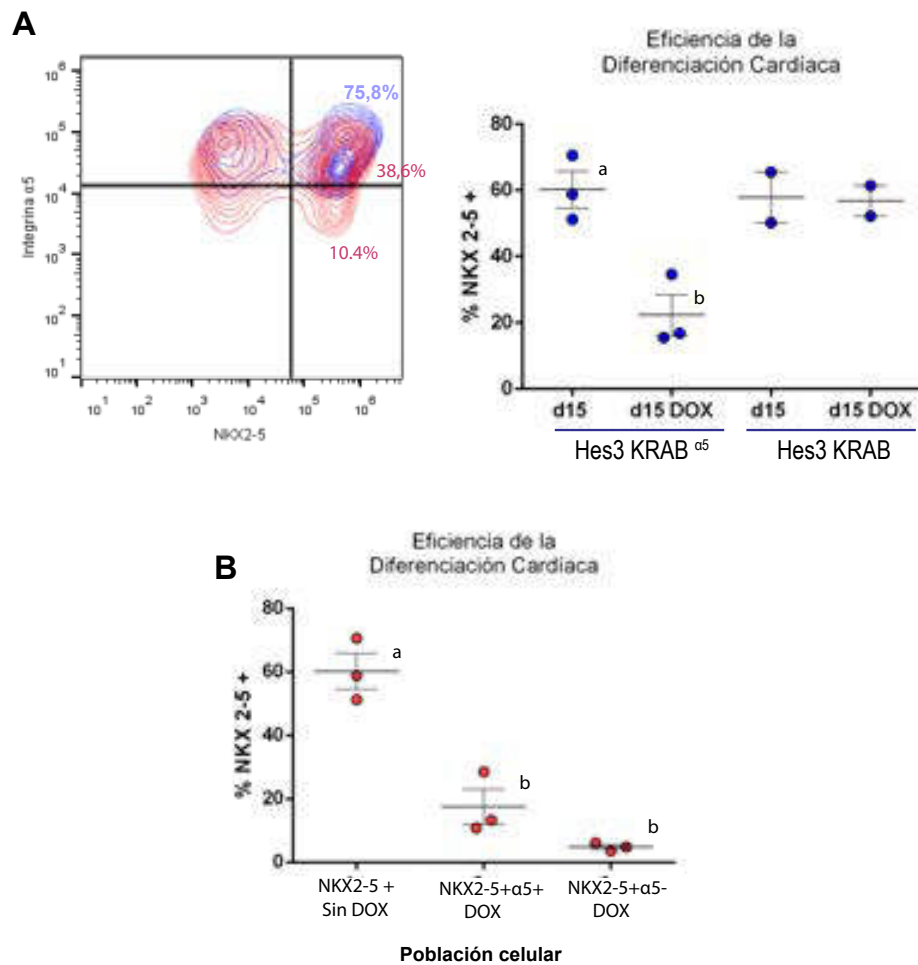


**Fig. 5.12:** Análisis de la expresión de distintos marcadores de la TEM por RT-qPCR en las poblaciones celulares CD56+ $\alpha 5$ - y CD56+ $\alpha 5$ +. A) Gráfico que muestra las poblaciones separadas mediante *cell sorter* y el análisis por RT-qPCR de la expresión del mRNA de la integrina  $\alpha 5$ . B) Análisis de la expresión por RT-qPCR de marcadores de la TEM en ambas poblaciones celulares. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM y son graficados en escala Log2. Letras diferentes indican diferencias significativas en las diferentes poblaciones ( $p < 0.05$ ) N=4

tra silenciada posee menores niveles de expresión de los marcadores característicos de la TEM con lo cual podría tener un potencial de especificación hacia cardiomiocitos reducido.

### **Evaluación de la eficiencia de diferenciación cardíaca luego del silenciamiento de la integrina $\alpha 5$ durante la TEM**

Luego de observar el cambio en la dinámica de aparición del progenitor mesodérmico en la diferenciación cardíaca, nuestra intención fue estudiar si el progenitor obtenido después del silenciamiento de la subunidad  $\alpha 5$  lograba también diferenciarse exitosamente a cardiomiocito inmaduro (día 15). Con este objetivo, luego del silenciamiento en los primeros tres días de la diferenciación, continuamos el protocolo hacia la especificación cardíaca pero sin el tratamiento con doxiciclina de manera que este progenitor mesodérmico en diferenciación tenga la capacidad de recuperar paulatinamente los niveles normales de la integrina  $\alpha 5$ . Por consiguiente, en el día 15 comparamos, mediante la expresión de nuestro reportero NKX2.5-eGFP, la eficiencia en aquel modelo de diferenciación donde se silenció la integrina  $\alpha 5$  y en aquel donde no se intervino el sistema (Figura 5.13). En el mismo experimento evaluamos si los cardiomiocitos inmaduros a día 15 recuperaron los niveles de expresión característicos de la integrina  $\alpha 5$ . Como se observa en el Panel A, el silenciamiento de la subunidad  $\alpha 5$  durante la TEM provocó una caída significativa en la eficiencia de obtención de cardiomiocitos inmaduros a día 15 desde un  $60,51\% \pm 5,64\%$  NKX2.5+ hasta un  $22,35\% \pm 6,14\%$  en el modelo donde se intervino el sistema mientras que el nivel de expresión de la integrina  $\alpha 5$  se recuperó pero no totalmente. Tal como se muestra en el Panel B, aproximadamente un  $10\%$  de los cardiomiocitos inmaduros totales obtenidos en el protocolo tratado con doxiciclina permanecen con un bajo nivel de expresión de esta integrina mientras que en aquella diferenciación donde no se silenció esta subunidad, no existe una población de



**Fig. 5.13:** Evaluación de la eficiencia de la diferenciación cardíaca por citometría de flujo. A) Descenso de un 40% de la población celular NKX2.5 positiva al silenciar la integrina  $\alpha 5$  durante la TEM de la diferenciación cardíaca. B) A día 15, en el protocolo tratado con doxiciclina se mantiene una población de cardiomiocitos inmaduros NKX2.5+ con menor expresión de la integrina  $\alpha 5$  (4,84%  $\pm$  0,75%) y otra población con mayor intensidad de esta subunidad (17,51%  $\pm$  5,54%). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM.

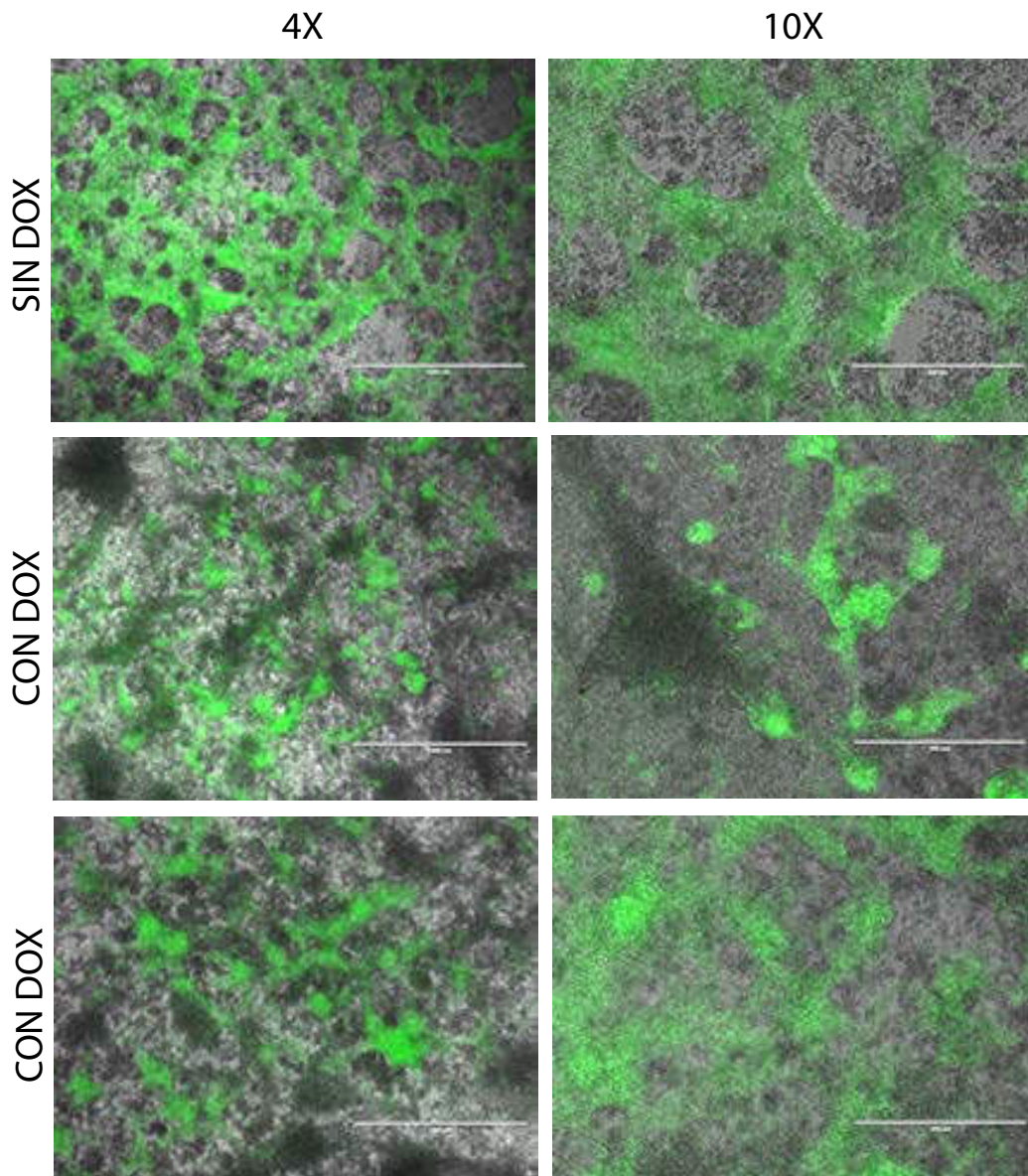
cardiomiocitos inmaduros negativos.

Tal como mencionamos anteriormente, a día 15 los cardiomiocitos inmaduros forman estructuras de red contráctiles características del modelo de diferenciación que parte de la monocapa celular. Sin embargo, en aquellos protocolos donde se

silenció la integrina  $\alpha 5$  durante la TEM se mantuvo la monocapa celular con un sobrecrecimiento de estructuras tridimensionales y los cardiomiocitos inmaduros se encontraban ubicados de manera azarosa en diferentes partes de este cultivo(Figura 5.14).

Por consiguiente, todos estos resultados sugieren que el silenciamiento de la integrina  $\alpha 5$  afecta negativamente la aparición y el potencial de diferenciación cardíaca del progenitor mesodérmico y como consecuencia de este proceso, pierden la capacidad de reorganización para la formación de la redes contráctiles y cae la eficiencia de obtención de cardiomiocitos inmaduros significativamente.





**Fig. 5.14:** Microfotografías de modelos de diferenciación cardíaca a día 15 sin/con doxiciclina durante la TEM en dos aumentos diferentes: 4X y 10X. Superposición de fotomicrografía de la imagen tomada en campo claro con aquella donde se observa la expresión del gen reportero NKX2.5-eGFP. Videos: i) **Link** Video S3 campo claro/GFP monocapa latidora 10X control sin DOX ii) **Link** Video S4 campo claro/GFP monocapa latidora 10X con DOX iii) **Link** Video S5 campo claro/GFP monocapa latidora 10X con DOX

### 5.3. Cierre del Capítulo

A lo largo de este último capítulo de resultados hemos logrado la puesta a punto de un valioso sistema experimental de silenciamiento inducible para evaluar el funcionamiento general de diferentes genes y además, conseguimos dilucidar que ocurre al manipular la expresión de la integrina  $\alpha 5$ , la cual posee una regulación interesante a lo largo de la diferenciación.

Esta línea generada es una herramienta potente que nos va a permitir evaluar en el futuro cercano, en nuestro laboratorio, que ocurre al silenciar una gran variedad de genes con funcionalidad diferente tanto en el estado indiferenciado como en la diferenciación cardíaca. Además fue clave encontrar la concentración de doxiciclina que no afecta al estado pluripotente característico de la línea de CMEh HES3.

Como segundo punto y mas importante, logramos avanzar en el conocimiento existente acerca de la integrina  $\alpha 5$  y su rol en la diferenciación cardíaca. Es importante recordar que esta integrina logra su pico de expresión en el progenitor mesodérmico en ambos protocolos de diferenciación y en este capítulo logramos demostrar que al silenciar esta subunidad durante la TEM se produce una desregulación de la diferenciación que resulta en cambios de la dinámica temporal de aparición del progenitor mesodérmico, para luego a día 15 afectar significativamente la obtención de cardiomiocitos inmaduros.

## 6. DISCUSIÓN

Las CMPH son en la actualidad una de las herramientas mas valiosas para la investigación en el área de la medicina regenerativa. Desde el inicio, cuando se derivaron las primeras líneas de CMEh hasta el día de hoy ha habido grandes avances tanto en el estudio del desarrollo embrionario como en la diferenciación hacia diferentes tipos celulares del individuo adulto. No solo se logró diferenciar CMEh sino que también ha ganado especial importancia el área de reprogramación de células somáticas adultas (hCMPi) para el estudio y modelado *in vitro* de enfermedades de pacientes. A pesar de estos avances, su uso en la clínica aún no se ha extendido, principalmente debido a que todavía no se conocen en profundidad muchos de los mecanismos que regulan el mantenimiento en estado pluripotente así como durante la diferenciación.

La relación existente entre las CMPH y su MEx continúa siendo uno de los temas de investigación en el área que mas avances requieren debido a lo poco que se conoce acerca de esta interacción. Un mayor conocimiento de la función que cumplen las proteínas estructurales de la MEx como de las integrinas ha ganado relevancia con el objetivo de aumentar la eficiencia de la diferenciación hacia distintos tipos celulares adultos y también para lograr que estas células en su conjunto conformen tejidos que puedan ser reinsertados en los órganos de manera exitosa[33][30]. En este trabajo nuestra finalidad consistió en desarrollar un sistema experimental que nos permita comenzar a estudiar la importancia de las integrinas en el proceso de diferenciación cardíaca e investigar si estas se encuentran involucradas en el mantenimiento de las células en estado pluripotente y durante su diferenciación específica.

## 6.1. Cultivo de las CMEh y su diferenciación cardíaca

La primera parte de este trabajo consistió en la puesta a punto de nuestro sistema experimental. Tal como describimos, en el inicio comenzamos cultivando las CMEh sobre iMEF dado que era el método de cultivo de uso extendido en los laboratorios. Sin embargo, en este tipo de sistemas se presenta una gran heterogeneidad en el estado de las CMPH dado que los medios que se utilizan no son totalmente definidos y por otro lado, existe una variabilidad acorde al lote de iMEF utilizado. Otro punto importante consiste en la necesidad de la separación física de ambos tipos celulares para poder estudiar con mayor facilidad que es lo que ocurre en las CMPH descartando cualquier interfencia vinculada al co-cultivo celular. Debido a esto, nuestro sistema experimental migró hacia sustratos libres de células animales y a medios totalmente definidos que nos permitieron tener una mayor homogeneidad en los cultivos y un mayor rendimiento celular.

En nuestro trabajo entonces logramos la puesta a punto de dos protocolos de diferenciación cardíaca distintos. El primero de ellos, como describimos anteriormente, tiene su inicio en CMPH cultivadas en iMEF mientras que el segundo comienza con las CMPH mantenidas en el sustrato definido Geltrex. Otra diferencia destacable entre ambos protocolos es que el primero comenzaba con la generación de los cuerpos embrioides tridimensionales mientras que el segundo protocolo partió de una monocapa celular megaconfluyente bidimensional. Dado que nuestro objetivo era investigar el rol de las proteínas estructurales de la MEx y las integrinas, existía la posibilidad de que haya una fuerte regulación de la expresión dependiendo de si las células se encontraban en agregados celulares tridimensionales o en una monocapa. De hecho, trabajos reportados muestran que existen diferencias entre ambos modelos siendo los cuerpos embrioides quienes favorecen una mayor interacción entre células [8]. Por esto, fue valioso para nuestro estudio poder evaluar paralelamente

lo que ocurría en ambos protocolos y entonces saber si había un efecto dependiente del protocolo utilizado o si la regulación de la expresión era solamente dependiente de la diferenciación a cardiomiocitos.

Otro aspecto interesante consistió en la utilización, en el segundo modelo de diferenciación, de pequeñas moléculas que actúan directamente sobre las vías de señalización y evitan la necesidad de utilizar factores de transcripción clave (como BMP4 y Activina A) que se encuentran involucrados en el desarrollo embrionario [21] [25]. Debido a esto, se pudo reducir la cantidad de factores necesarios, lo cual permitió incrementar la reproducibilidad y eficiencia de la diferenciación cardíaca. Tal como se observó a lo largo de este trabajo, el tipo de morfógeno, la concentración y la ventana temporal en la que se administra es esencial para lograr la especificación hacia un linaje en particular. La migración de un modelo de diferenciación a otro se dio como un proceso natural dada la mayor eficiencia y facilidad con que se desarrollaba el segundo de ellos.

Por último, fue imprescindible para nuestro trabajo identificar los diferentes estadios celulares que emergen durante la diferenciación cardíaca y que son congruentes a aquellos tipos celulares que aparecen durante el desarrollo embrionario. Si bien, a partir del tratamiento con los diferentes factores de transcripción, fue posible identificar temporalmente en que estadio celular de la diferenciación se encontraba el protocolo, fue necesario contar con marcadores moleculares adecuados para la identificación certera de ellos. Aún al día de hoy, se continúa estudiando cuales son aquellos marcadores mas adecuados y mas fácilmente identificables. En el caso del progenitor mesodérmico, nosotros utilizamos el marcador molecular de membrana CD56 como indicativo de aparición de esta población celular [18]. Si bien ya habían sido descriptos marcadores de esta población en otros trabajos, es de destacar que continuaba en discusión que esos marcadores no permitían aislar una población que verdaderamente se pudiera diferenciar a cualquier linaje mesodérmico. A partir del

trabajo de Evseenko y col. [18], identificamos el momento en que el marcador CD56 aparece en una proporción significativa de las células en nuestros dos modelos de diferenciación y luego fue corroborado mediante el análisis de marcadores moleculares intracelulares. En el caso del progenitor cardíaco y de los cardiomiocitos, en la actualidad no existen marcadores de membrana que nos permitan identificarlos fácilmente por lo que siempre lo realizamos mediante la caracterización de marcadores intracelulares tales como NKX2.5 o cTnT.

## **6.2. Caracterización de integrinas durante el proceso de diferenciación cardíaca.**

### **Caracterización de la fibronectina y aquellas subunidades de integrinas afines**

Una vez establecidos ambos protocolos de diferenciación y caracterizados los diferentes estadios de compromiso mesodérmico que emergen durante este proceso, logramos llevar a cabo el objetivo de describir la dinámica temporal de expresión de distintas subunidades de integrinas en las poblaciones celulares obtenidas.

En primer lugar, observamos en ambos protocolos de diferenciación una gran congruencia en el comportamiento de la expresión de la fibronectina a nivel de mRNA y también de las subunidades de integrina  $\alpha 5$  y  $\alpha 8$ , independientemente si se partía de una monocapa bidimensional o de cuerpos embrioides. Por otro lado, en ambos modelos se observó un aumento significativo del mRNA de fibronectina, luego de la TEM, en el progenitor mesodérmico. Este hecho se encuentra en línea con lo reportado en diferentes publicaciones donde describen que la presencia de fibronectina es fundamental en aquellas células que ganan un fenotipo migratorio tal como sucede en la TEM de distintas clases de células tumorales [80] [81]. En los estadios avanzados de la diferenciación, la fibronectina continúa presente y se cree

que cumple un papel tanto en el desarrollo vascular embrionario de ratón [39] como en una eficiente diferenciación a células cardíacas [68].

En el caso de las integrinas de unión a fibronectina, la integrina  $\alpha 5$  muestra un comportamiento interesante, donde gana mayor intensidad en el progenitor mesodérmico para luego descender a los niveles presentes en el estado indiferenciado. De hecho, en osteoblastos se vio que la activación de la integrina  $\alpha 5$  podría favorecer la expresión de BMP4 [82]. También se observó que la ausencia de esta integrina en el desarrollo embrionario de ratón causaba defectos en el desarrollo vascular [65]. El caso de la integrina  $\alpha 8$  es también destacable dado que en ambos protocolos se observa una regulación positiva significativa de la expresión de su mRNA pero si bien se registra un aumento, es mucho menor, en el caso de la proteína. Esta integrina se encuentra presente en células mesenquimales y muy relacionada con la génesis del riñon [83] [84]. En la Base de Datos Integrada de Expresión de Proteínas Humanas (HIPED) se encuentra reportado que por espectrometría de masas se verificó la presencia de la integrina  $\alpha 8$  en el corazón fetal por lo que se debería profundizar aún mas esta investigación para averiguar si efectivamente cumple un rol en la diferenciación cardíaca.

Por consiguiente, logramos describir en las diferentes poblaciones que derivan del proceso de diferenciación cardíaca como es el comportamiento de las principales integrinas de unión a fibronectina y en función de esto en conjunto con la información reportada, intentar dilucidar cuales podrían ser sus potenciales roles en nuestro sistema experimental.

### **Caracterización de la laminina y aquellas subunidades de integrina afines**

En este trabajo, además, tuvimos la intención de conocer como es la dinámica de expresión de todas las subunidades de laminina (5 subunidades  $\alpha$ , 3 subunidades  $\beta$  y 3 subunidades  $\gamma$ ) y de las integrinas que se unen a ellas.

Nuevamente el perfil de expresión de mRNA de las subunidades de Laminina fue altamente paralelo en las distintas poblaciones celulares de ambos modelos de diferenciación cardíaca. Como ya se encuentra reportado, la Laminina 511 es ubicua [85] y es una de las proteínas principales que sirven de soporte a las CMPH [86]. Tal como muestra nuestra caracterización, la laminina  $\alpha 5$  mantiene una expresión constante a lo largo de toda la diferenciación cardíaca en línea con los trabajos que demuestran que esta subunidad se encuentra ampliamente expresada en todos los tejidos, siendo la principal cadena de laminina [85]. Los casos mas interesantes son los de las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$ , donde su expresión de mRNA crece significativamente en el cardiomiocito inmaduro. Existen pocos trabajos que reporten la importancia de estas subunidades en el desarrollo cardíaco, sin embargo, hay algunos antecedentes que muestran que la delección de la laminina  $\alpha 4$  en ratón afecta el desarrollo vascular embrionario [87] mientras que un desbalance de la subunidad  $\alpha 2$  en rata y humanos puede promover la hipertrofia cardíaca [88]. Como describimos en esta tesis, las diferentes subunidades de laminina son fundamentales en el desarrollo embrionario y además, acorde al tipo celular analizado, varía la composición de las subunidades de laminina presentes. Esta etapa de nuestro trabajo es un puntapie inicial para evaluar el rol de determinadas lamininas en el desarrollo cardíaco y con especial interés, para el futuro cercano, investigar el rol de las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$  en los cardiomiocitos inmaduros.

La integrina  $\alpha 6$  muestra también un comportamiento similar en ambos protocolos de diferenciación y su negativización a lo largo de este proceso puede estar relacionado a que esta cumple un rol importante en la autoproliferación del estado indiferenciado [89] [90]. La única discrepancia que se observa entre ambos modelos de diferenciación es en el estadio de cardiomiocito inmaduro, donde en aquel modelo donde se parte de una monocapa celular, se observa una recuperación significativa del nivel de expresión de la integrina  $\alpha 6$ . Sin embargo, un trabajo reportado muestra



que existe una variante de splicing  $\alpha 6A$  que se encuentra positivamente regulada en la diferenciación cardíaca en ratón [91], por lo que restaría profundizar este estudio para evaluar si efectivamente en las CMEh ocurre algo similar. Por último, la integrina  $\alpha 3$  mostró una regulación dispar en ambos modelos de diferenciación. En el protocolo que comienza con la formación de cuerpos embrioides se observa un aumento significativo de esta subunidad mientras que en el protocolo que parte de la monocapa celular se observa una dinámica de expresión congruente a la de la integrina  $\alpha 6$ . De todos modos, en ninguno de los dos casos observamos que pudiera ser un marcador molecular del progenitor mesodérmico, luego de la TEM tal como se reportó en trabajos de progresión tumoral [92] [93].

### **6.3. Silenciamiento de la integrina $\alpha 5$ durante la TEM en la diferenciación cardíaca.**

La novedosa tecnología de CRISPR-Cas9 permitió facilitar enormemente la edición génica y por ende, el estudio de la función de determinados genes a nivel celular. Sin embargo, la mutación que genera esta tecnología es irreversible por lo que no es adecuado para el estudio de aquellos genes en los cuales su fenotipo *knock out* promueve la muerte inmediata del sistema. En nuestro caso, fue de mayor utilidad desarrollar un sistema inducible en el que pudiéramos regular la expresión de genes en una ventana temporal determinada, intentando imitar lo que ocurre en los diferentes modelos de diferenciación de CMPH. Debido a esto, nuestro objetivo consistió en la puesta a punto del sistema dCas9-KRAB donde el gRNA de un gen blanco de interés conduce al represor de la transcripción a la región promotora del respectivo gen promoviendo su silenciamiento reversible. En nuestro laboratorio también contamos con el vector dCas9-VP64 que permite sobre-expresar un gen de manera inducible y que en el futuro cercano será puesto a punto con el fin de estudiar las

función de distintos genes en la diferenciación.

Una vez desarrollado este sistema, logramos manipular la expresión del gen de la integrina  $\alpha 5$  de manera exitosa. Encontramos una concentración de doxiciclina adecuada (250 ng/ml) para evitar afectar negativamente al sistema y a las 72 horas la expresión proteica de esta integrina se encontraba reprimida en el 80% de las células. Luego, buscamos estudiar si se afectaba la proliferación y la supervivencia a las 72 horas de silenciada la subunidad  $\alpha 5$  pero no encontramos diferencias significativas. Es importante destacar que estas células fueron cultivadas sobre el sustrato Geltrex, el cual está compuesto principalmente por diferentes subtipos de lamininas. Trabajos anteriores muestran que al cultivar las células sobre este sustrato, las integrinas que se activan y señalizan son aquellas que tienen su mayor afinidad por esta proteína de MEx [64] [58] por lo que intentamos utilizar fibronectina como sustrato, dado que señala principalmente a través de la integrina  $\alpha 5$ . Sin embargo, a las 24 horas de crecidas sobre fibronectina, el cultivo celular perdía total adherencia y nos imposibilitó evaluar su comportamiento. Por último, resta evaluar que ocurre con la tasa de proliferación y apoptosis al mantener el silenciamiento de la integrina  $\alpha 5$  en las CMEh por largo término.

Luego comenzamos a analizar que ocurría si silenciábamos esta integrina durante la TEM, momento en que gana su mayor nivel de expresión acorde a lo visto en nuestra caracterización en ambos protocolos de diferenciación. Como primer paso, observamos que entre los días 2 y 3, la proporción de células positivas para CD56 e integrina  $\alpha 5$  aumentó al doble en aquella población donde no se intervino el sistema. Sin embargo, al silenciar la integrina  $\alpha 5$  se observó una desregulación general de la TEM donde a día 2 se observó un aumento del 20% de la población CD56 positiva mientras que, a día 3, esta misma población era porcentualmente similar a aquella donde no se silenció la integrina. Trabajos anteriores mostraron que la mutación de esta integrina conducía a defectos mesodérmicos en la embriogénesis

del ratón por lo que esta podría estar señalizando para colaborar en la inducción mesodérmica [65]. Además, estudios *in vitro* mostraron que la activación de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  en la diferenciación a osteoblastos moduló positivamente la expresión de BMP4, factor esencial para la inducción mesodérmica [82]. Luego, analizamos mas profundamente que diferencias existian en el progenitor mesodérmico (día 3) entre ambas poblaciones positivas para CD56 pero de expresión opuesta de la integrina  $\alpha 5$  y logramos demostrar que los marcadores de la TEM como ZEB1 y ZEB2 disminuyeron significativamente su expresión en aquella población negativa para la integrina, en comparación a la población que se mantuvo positiva. Es decir, a nivel molecular, existen diferencias en el grado de especificación del progenitor mesodérmico cuando se silencia la integrina. Además, es importante destacar, que es posible que en el contexto de nuestros experimentos de inhibición de la integrina  $\alpha 5$ , la expresión del marcador CD56 no sea confiable para determinar por si solo la presencia del progenitor mesodérmico. A partir de todos estos resultados, buscamos investigar si se encontraba afectada la especificación cardíaca luego de la obtención de este progenitor mesodérmico tratado con doxiciclina. A día 15, en los cardiomiocitos inmaduros, el factor de transcripción cardíaco NKX2.5 se encontró disminuido en aproximadamente un 60% e importantes cambios morfológicos se observaron en los cultivos donde se realizó la diferenciación. Por consiguiente, la integrina  $\alpha 5$  posee un rol fundamental en el desarrollo adecuado de la TEM y su silenciamiento no solo trae aparejado cambios en la TEM sino que genera consecuencias irreversibles para la obtención de cardiomiocitos inmaduros. En el futuro cercano, realizaremos otros experimentos para verificar nuestra hipótesis, los cuales serán descritos en la siguiente sección.

## 6.4. Próximos experimentos a desarrollar

Todos los resultados descritos a lo largo de este trabajo son un puntapié inicial para la profundización de la investigación acerca de la importancia de las integrinas y sus ligandos en la diferenciación cardíaca. Haremos especial énfasis en los experimentos que sería importante realizar con el fin de completar el conocimiento acerca del rol de la integrina  $\alpha 5$  en la diferenciación cardíaca.

Como primer paso, sería muy interesante poder encontrar otros marcadores de membrana del progenitor mesodérmico que nos permitan conocer con mayor profundidad cuales son los cambios que están ocurriendo en la dinámica de aparición del progenitor mesodérmico. En nuestro laboratorio también se trabaja con células de tipo mesenquimal por lo que también intentaremos evaluar la expresión de los marcadores típicos que se encuentran presentes en ellas.

Por otro lado, buscaremos analizar si en el progenitor mesodérmico donde se silenció esta integrina también desciende la expresión de genes involucrados en el compromiso mesodérmico y el progenitor cardíaco como *Brachyury* y *Mesp1*, los cuales se expresan mas tempranamente que *NKX2.5*.

Adicionalmente debemos evaluar si se encuentra afectada la eficiencia de obtención de cardiomiocitos inmaduros al silenciar luego de la TEM o si la presencia de la integrina  $\alpha 5$  solo es totalmente necesaria en esta fase inicial de la diferenciación. También es de interés estudiar mas profundamente, tanto a nivel molecular como electrofisiológico, las características de aquellos cardiomiocitos inmaduros que se diferenciaron exitosamente y poseen una expresión negativa de la integrina  $\alpha 5$ , dado que esta clase de población celular no existe naturalmente. Además, como mencionamos en la introducción, las integrinas son redundantes por lo que también es posible que exista un *cross-talk* parcial entre las diferentes integrinas que responden a la unión a fibronectina y de esta manera reemplacen al menos en parte a la función

que cumple la integrina  $\alpha 5$ .

Por último, investigar la activación/inactivación de las vías de señalización descritas en la introducción es vital para intentar comprender el mecanismo bajo el cual suceden todos los cambios descritos a lo largo de este trabajo.

## 7. CONCLUSIONES

### 7.1. Dinámica de expresión de las integrinas durante el proceso de diferenciación cardíaca

- Encontramos una estrecha relación en la dinámica de expresión de las integrinas y sus respectivos ligandos al comparar ambos modelos de diferenciación cardíaca.
  
- En relación a las integrinas de unión a Fibronectina:
  - La integrina  $\alpha 5$  tiene su pico de expresión a nivel de mRNA y proteico en el progenitor mesodérmico (día 3) para luego descender a los niveles presentes en el estado indiferenciado.
  - La integrina  $\alpha 8$  se encuentra prácticamente ausente en el estado indiferenciado y la expresión de su mRNA se incrementa significativamente durante la diferenciación. Restan hacer mas estudios para saber que ocurre a nivel proteico.
  
- Con respecto a las integrinas de unión a Laminina:
  - La integrina  $\alpha 6$  se encuentra altamente expresada en el estado indiferenciado y decrece significativamente a lo largo de la diferenciación.
  - La integrina  $\alpha 3$  es aquella que muestra disparidad entre ambos modelos pero en el protocolo de diferenciación que parte de una monocapa celular posee un comportamiento congruente a la integrina  $\alpha 6$ .

## 7.2. El silenciamiento de la integrina $\alpha 5$ durante la TEM altera la dinámica de aparición del progenitor mesodérmico y la obtención de cardiomiocitos inmaduros

- Generamos la línea de silenciamiento inducible CMEh HES3 NKX2.5<sup>eGFP/w</sup> KRAB <sup>$\alpha 5$</sup>  que es capaz de reprimir la expresión de la integrina  $\alpha 5$  mediante el agregado de doxiciclina. Al tercer día, en el 85 % de la población celular se encontraba silenciada.
- A las 72 horas, el silenciamiento de esta integrina no produjo cambios significativos en la tasa de proliferación ni en la tasa de apoptosis en las CMPh HES3.
- La dinámica de aparición del progenitor mesodérmico fue afectada al silenciar esta integrina. A día 2 un porcentaje mayor de la población celular es CD56 positivo mientras que a día 3 se equiparaba con la población control.
- La eficiencia del protocolo de diferenciación decreció significativamente al reprimir la expresión de esta integrina durante la TEM. Se obtuvo un 60 % menos de cardiomiocitos inmaduros y no se formó la red contráctil típica observada en este tipo de cultivos.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Cultivo celular de CMEh y su diferenciación cardíaca

Trabajamos con la línea de CMEh HES3 NKX2.5<sup>eGFP/w</sup> que fue cedida por el Dr. Edouard Stanley (Monash University, Australia). Utilizamos dos sistemas de cultivo diferentes para el crecimiento de estas células en estado indiferenciado: en placas sobre iMEF y en el sustrato Geltrex, libre de derivados animales.

#### Cultivo celular sobre iMEF

Los iMEF se utilizan como capa nutricia 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. 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).

Las CMEh fueron mantenidas en estado indiferenciado cultivándolas sobre una capa de iMEF, 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,  $\beta$ -Mercaptoetanol 55mM (Gibco) y 4ng/ml bFGF (Thermo Fisher Scientific). 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.

### **Cultivo celular sobre sustratos libres de derivados animales**

El segundo sistema de cultivo utilizado fue aquel en el que las CMEh fueron mantenidas sobre Geltrex (Gibco) con medio E8 Flex(Gibco), usualmente en placas de 6 pocillos (Corning). Los pasajes de las CMEh se realizaron cuando estas se encontraban dispuestas de manera muy compacta dentro de las colonias y en su totalidad alcanzaban un 70 % de confluencia. Además, en este sustrato eran capaz de mantenerse en estado óptimo indiferenciado un máximo de 4 días, momento en el cual era necesario realizar un nuevo pasaje independientemente de su confluencia. Con el objetivo de levantar las células de la placa, el cultivo se trataba con 500µl de Tryple Select 1X (Gibco) y se las incubaba 5 minutos a 37 grados. Una vez que se observaba su separación de la placa, se diluyó la enzima con 2 ml de PBS. 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 y se agregó medio E8 Flex suplementado con Rocki 10µM durante las primeras 24 horas (Cayman Chemicals).

### **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: Medio E8 Flex suplementado con 20 % v/v SFB y 10 % v/v DMSO. Para descongelarlas se procedió a resuspender el pellet final en medio E8 Flex y se transfirió las células a una placa con la capa nutricia de iMEF o sobre el sustrato Geltrex, según el experimento.

## Detección de contaminación con *Mycoplasma*

Controlamos periódicamente los cultivos de células para la detección de contaminación con bacterias del género *Mycoplasma* y, de ser positiva, proceder a descartarlos. Para ello, extrajimos DNA genómico de las distintas líneas celulares a analizar y realizamos reacciones de PCR con *primers* que amplifican una secuencia de DNA de 500 pb conservada en este género de bacterias. Dado que ante la ausencia de contaminación no se obtiene producto de amplificación, utilizamos como control positivo muestras de ADN genómico conteniendo *Mycoplasma*.

<b>Mycoplasma</b>	<b>Secuencia del <i>primer</i> (5'3')</b>
Sentido	ACACCATGGGAGYTGGTAAT
Anti-Sentido	CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT

## Diferenciación a células cardíacas a partir de la formación de cuerpos embrioides

Este protocolo de diferenciación se inicia mediante el crecimiento de las células HES3 NKX2.5<sup>eGFP/w</sup> sobre iMEF, donde se las mantiene hasta lograr un 90 % de confluencia. En ese momento se adiciona 1,5mL de Tripsina (Gibco) y son incubadas a 37°C por 5 minutos. Luego, se diluyen en 2 mL de Stop Medium (DMEM (Gibco), 50 % de SFB (Gibco), 1 % de PenStrep (Gibco) y 1 µL/mL de DNase I (Gibco)) y son colectadas en un tubo de fondo redondo en el cual son centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. Luego son resuspendidas en medio basal (STEMPRO34 (Gibco), 1 % de L-glutamina (Gibco), 150 µg/mL de transferrina (Roche), 50 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma), 0,45 pM de monotioglicerol (Sigma)), se adiciona BMP4 (Tocris) con una concentración final de 1 ng/mL y son distribuídas en placas de baja adherencia (Corning). Se incuban en suave agitación por 24 horas a 37°C en estufa

de 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> para la formación de los cuerpos embrioides. Para la inducción del mesodermo, a día 1, los cuerpos embrioides son colectados en un tubo de fondo redondo y mantenidos por 20-30 minutos en estufa de 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> a 37°C. Una vez que estos decantan, el sobrenadante conteniendo las células no agregadas es removido y los cuerpos embrioides son resuspendidos en el medio de inducción 1 (medio basal con 10 ng/mL de BMP4, 6 ng/mL de Activina A (Tocris) y 5 ng/mL de bFGF (Thermo Fisher Scientific)) y colocados en placas de 6 pocillos no adherentes (Corning) e incubados en estufa 5 % O<sub>2</sub>. Para la inducción a mesodermo cardíaco (día 3,5), los cuerpos embrioides son cultivados en medio de inducción 2 (medio basal junto con 10  $\mu$ M de XAV939 (Tocris)) y mantenidos en estufa 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> a 37°C por 4 días. Después de este período, las células son mantenidas en medio basal hasta la realización de los experimentos.

### **Diferenciación a células cardíacas a partir de la formación de una monocapa celular megaconfluente**

Este segundo modelo de diferenciación se inicia con el crecimiento de 450.000 células HES3 en placas de 24 pocillos (Corning) tratados con Geltrex y mantenidos diariamente con 1 ml de medio mTeSR (StemCell Technologies) por pocillo. Luego se crece este cultivo por 48 horas, momento en el cual adquiere la megaconfluencia deseada y comienza el protocolo de diferenciación (día 0). En este punto el medio es cambiado por 1 ml de RPMI 1640 (Gibco), 20  $\mu$ l de Suplemento B27 sin Insulina (Gibco) y 12  $\mu$ M CHIR99021 (Tocris), inhibidor de GSK3. A las 24 horas, este medio inductor es retirado y se las mantiene por 48 horas con RPMI 1640 y el suplemento B27 sin Insulina. En el día 3 de la diferenciación, el medio es reemplazado por RPMI 1640, el Suplemento B27 sin Insulina y una concentración final 5  $\mu$ M de IWP2 (Sigma), inhibidor de la vía de Wnt. Este es mantenido en cultivo por 48 horas para luego, a día 5, ser cambiado por RPMI 1640 junto con el suplemento B27

sin insulina. A partir del día 7, el medio es cambiado cada 48 horas por Medio RPMI 1640 + suplemento B27 con Insulina (Gibco). En el día 9 la monocapa comienza a ganar actividad contractil y son mantenidos en este medio hasta la realización de los experimentos.

## 8.2. Vectores utilizados y preparación de DNA plasmídico

### Vectores utilizados

A lo largo de este trabajo utilizamos los siguientes plásmidos:

Plásmidos Variante de Crispr/Cas9	
Nombre	Detalle
pHAGE TRE dCas9-KRAB (Addgene.org: N°50917)	Expresión de dCas9-KRAB regulable por Tet. Resistencia a G418.
pLenti SpBsmBI sgRNA Puro (Addgene.org: N°62207)	Vector de expresión vacío para gRNA. Resistencia a Puromicina.

Plásmidos helpers lentivirales	
Nombre	Detalle
pMD2.G (Addgene.org: N°12259)	Proteína de envoltura lentiviral VSV-G.
psPAX2 (Addgene.org: N°12260)	Plásmido de empaquetamiento lentiviral de segunda generación.

### Transformación de bacterias competentes

Generamos bacterias competentes de la cepa Stbl3 de Escherichia coli mediante la utilización del protocolo de Inoue [94], a partir del cual se obtienen eficiencias de transformación de entre 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> UFC/ $\mu$ g de DNA. La transformación fue realizada utilizando el método de golpe de calor y las bacterias fueron sembradas en placas con LB-ágar conteniendo ampicilina.

## **Purificación de DNA genómico**

Para extraer DNA genómico de cultivos celulares eucariotas con el fin de realizar análisis por PCR, se partió de 200.000 células disociadas, se realizó un lavado con PBS y se las resuspendió en 100 µl buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001 % gelatina, 0.5 % NP-40, 0.5 % Tween-20) suplementado con 10 µg/ml de proteinasa K (Fermentas). Luego de incubar las muestras durante 1 h a 65°C se precipitó el DNA con 600 µl de isopropanol. Se centrifugaron las muestras a 12.000 g durante 15 minutos a TA, se lavó el pellet de DNA con etanol 70 % y se lo resuspendió en 30 µl de agua milliQ (H<sub>2</sub>O<sub>mq</sub>) Se favoreció la solubilización del DNA genómico mediante la incubación de las muestras a 65°C durante 1 h. Conservamos las muestras de DNA genómico a -20°C.

## **Preparación de DNA plasmídico**

Realizamos el protocolo de Miniprep con el objetivo de obtener pequeñas cantidades de DNA plasmídico para el análisis por mapeo de restricción y para la verificación de la presencia de insertos clonados por PCR. El método utilizado es el de Birnboim y Doly, el cual consiste en una lisis alcalina de bacterias utilizando NaOH y el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS).

Para la transfección de células en cultivo, preparamos DNA plasmídico a una escala mayor mediante el kit Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System (Promega). El DNA plasmídico resultante fue cuantificado en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 y su integridad fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %.

### **8.3. Generación de líneas de CMEh modificadas genéticamente**

En este trabajo generamos distintas líneas celulares modificadas genéticamente a partir de la transducción lentiviral de los plásmidos descritos anteriormente a través de una variante de la tecnología CRISPR/Cas9.

#### **Clonación del plásmido portador del sgRNA de interés**

Con el objetivo de lograr el silenciamiento de determinados genes de interés debimos clonar en el vector pLenti SpBsmBI sgRNA Puro las diferentes secuencias diseñadas de los sgRNAs de las integrinas antes mencionadas. Para la digestión del vector utilizamos la enzima de restricción BsmBI (Promega) y se realizó una incubación a 37°C *overnight*. Luego, el fragmento digerido fue corrido en un gel 1% agarosa y purificado mediante el uso del kit PureLin Quick Gel Extraction Kit (Thermo-Fisher Scientific). Una vez aislado el producto digerido, se procedió a ligarlo con los gRNAs de interés mediante la incubación con la enzima T4 ligasa (Promega) por 2 horas a temperatura ambiente para luego transformar este producto ligado en bacterias competentes.

En este trabajo diseñamos dos secuencias diferentes de sgRNA por cada gen, dirigidas 200 pares de bases río arriba o abajo del sitio de inicio de la transcripción. Para el diseño de los sgRNA utilizamos la herramienta bioinformática CRISPR Design Tool Ran et al., 2013. Las mismas se encuentran listadas a continuación:

Secuencias sgRNA	
Nombre	Secuencia (5'-3')
sgRNA1- $\alpha$ 5 <i>Forward</i>	GCGAATGACTCAACGCGGGG
sgRNA1- $\alpha$ 5 <i>Reverse</i>	CCCCGCGTTGAGTCATTCGC
sgRNA2- $\alpha$ 5 <i>Forward</i>	GAGGTTTAGGAAGCGGCTCC
sgRNA2- $\alpha$ 5 <i>Reverse</i>	GGAGCCGCTTCCTAAACCTC
sgRNA1- $\alpha$ 6 <i>Forward</i>	GAGCCCCGGAGGCGAGCTCG
sgRNA1- $\alpha$ 6 <i>Reverse</i>	CGAGCTCGCCTCCGGGGCTC
sgRNA2- $\alpha$ 6 <i>Forward</i>	GCTCCCACGTCGTGGCTTCC
sgRNA2- $\alpha$ 6 <i>Reverse</i>	GGAAGCCACGACGTGGGAGC
sgRNA1- $\alpha$ 8 <i>Forward</i>	GTGCGCCGAGCGCACCGACC
sgRNA1- $\alpha$ 8 <i>Reverse</i>	GGTCGGTGCGCTCGGCGCAC
sgRNA2- $\alpha$ 8 <i>Forward</i>	GCCAGCCCCCGAGCCGGCT
sgRNA2- $\alpha$ 8 <i>Reverse</i>	AGCCGGCTCGGGGGGCTGGC

Los oligonucleótidos *Forward* y *Reverse* fueron hibridizados in vitro y clonados en el plásmido antes mencionado a través de un ensayo de digestión y ligación secuencial con la enzima de restricción BsmBI(NEB) y la enzima ligasa T4(Promega), respectivamente[95]. La purificación del plásmido digerido en el gel fue realizada utilizando el kit PureLink Quick Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de la transformación de bacterias competentes y selección con ampicilina, tomamos colonias transformantes y las validamos por PCR con primers específicos y luego por secuenciación.

### Línea de CMEh HES3 NKX2.5<sup>eGFP/w</sup> KRAB<sup>A5</sup> por transducción lentiviral

En primer lugar generamos la línea estable HES3 NKX2.5<sup>eGFP/w</sup> KRAB a partir de la transducción de la línea parental y en base a esta realizamos finalmente la

línea modificada HES3 NKX2.5<sup>eGFP/w</sup> KRAB<sup>α5</sup> con partículas lentivirales. Para ello utilizamos los plásmidos pHAGE TRE dCas9-KRAB (50917) y pLenti SpBsmBI sgRNA Puro (62207), comprados en ADDGENE. Las partículas lentivirales son obtenidas por co-transfección independiente de las células empaquetadoras HEK-293FT (Thermo Fisher Scientific) con los respectivos vectores dCas9-KRAB o el portador del gRNA junto con los vectores gag/pol y VSV-G. Estos dos últimos aportan la maquinaria necesaria para la replicación del genoma viral, así como para la síntesis de las proteínas estructurales virales y las glicoproteínas que le confieren el tropismo, en este caso, de amplio rango y adecuado para la transducción de las CMEh. La transfección se realizó mediante el agente X-Treme 9 (ROCHE).

Las partículas lentivirales son liberadas al medio de cultivo de las células empaquetadoras. Utilizamos el medio condicionado con partículas lentivirales producido luego de 48h post-transfección, el cual es colectado, filtrado y ultra-centrifugado a 25,000 rpm en un rotor SW-41Ti por 90 minutos a 4° para finalmente resuspender el pellet viral en 200µl de PBS. Agregamos 5µl de virus a la línea HES3 NKX2.5<sup>eGFP/w</sup> y se incubó a lo largo de toda una noche en la estufa a 37°C. Con el objetivo de incrementar la eficiencia de transducción agregamos polibreno (5-10 µg/ml).

Al día siguiente, cambiamos el medio de cultivo por medio fresco y esperamos 48 horas hasta seleccionar aquellas células exitosamente transducidas con el antibiótico correspondiente. La concentración y la duración del pulso es dependiente del tipo de antibiótico. En el caso del tratamiento con G418(Sigma) fue necesario aplicar dos pulsos de 48 horas con una concentración final de 150µg/ml mientras que en el caso del antibiótico Puromicina solo fue necesario realizar un pulso de 48 horas con una concentración final de 0,5 µg/ml. La eficiencia de la transducción fue estimada teniendo en cuenta el porcentaje de sobrevivencia en el cultivo luego de la selección con el antibiótico, la cual se encontraba cercana al 15-20 %.



## **La Doxiciclina como inductor de la expresión de dCas9-KRAB**

La doxiciclina es un antibiótico bacteriano del grupo de las tetraciclinas con efecto inocuo sobre células eucariotas. Este antibiótico procariota se une al promotor que responde a Tetraciclina y en este caso promueve la activación de la transcripción. La doxiciclina (Sigma) fue reconstituida en agua autoclavada, luego fue filtrada y mantenida a largo plazo a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La concentración final de uso en el cultivo fue de 250 ng/ml.

## **8.4. Inmunofluorescencia y citometría de flujo**

### **Inmunofluorescencia**

Para realizar tinciones de inmunofluorescencia indirecta, se cultivaron las células sobre vidrios cubreobjetos o en placas de cultivo. En todos los casos, las superficies fueron previamente recubiertas con Geltrex. Las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos a TA, permeabilizadas con 0,1% PBSTriton X-100 (PBST) y bloqueadas con 3% suero normal de burro en PBST. Los anticuerpos primarios fueron incubados en solución de bloqueo a  $4^{\circ}\text{C}$  ON y luego se realizaron 3 lavados de 30 minutos con PBST. Los anticuerpos secundarios fueron incubados junto con DAPI en solución de bloqueo por 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron luego lavadas como se describió previamente, y fotografiadas en microscopios invertidos de fluorescencia Olympus IX71. Las imágenes fueron procesadas utilizando los softwares ImageJ y Adobe Photoshop CS6.

### **Citometría de Flujo**

Las cuerpos embrioides fueron disgregados a lo largo de todo una noche con colagenasa tipo IV 1mg/ml, centrifugados a  $300 \times g$  durante 5 minutos y luego incubados por 10 minutos con la enzima Tryple 1x. Posteriormente las células fueron

resuspendidas en PBS suplementado con 1% de suero fetal bovino y los grumos restantes fueron disgregados mecánicamente mediante la utilización de un filtro de 100nm.

En el caso de la monocapa celular, el tratamiento con la enzima Tryple 1X por 5 minutos fue suficiente para lograr un disgregado celular exitoso.

Para la detección de las proteínas cardíacas, las células fueron fijadas en 300 ul de PFA 4% e incubadas durante 20 minutos. Luego de 2 lavados con PBS se permeabilizaron utilizando la solución PermBufferIII (Becton Dickinson). La Inmuno-marcaación fue realizada agregando los anticuerpos correspondientes según el caso: anticardiotroponina T (Abcam). Este último fue utilizado 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 300 x g, aspirando completamente el sobrenadante y resuspendiendo las células en 500ul de PBS.

Para la detección del progenitor mesodérmico temprano y de las diferentes integrinas de membrana estudiadas, las células fueron disociadas con la enzima Tryple y se utilizaron sin ser fijadas. Se incubaron las muestras durante 20 minutos en hielo y en oscuridad con el anticuerpo primario conjugado con un fluoróforo para citometría de flujo. Finalmente las muestras se lavaron tres veces con una solución de PBS suplementado con 1% de suero fetal bovino. Las mediciones se realizaron en el citómetro FACS Aria II (Becton Dickinson) o BD Accuri c6 y los resultados fueron analizados con el software FlowJo X o Bdaccuri software.

## Anticuerpos utilizados

Anticuerpos Primarios Conjugados		
Nombre	Empresa	Catálogo
Integrina $\alpha$ 3 (CD49c)	Becton Dickinson	556025
Integrina $\alpha$ 4 (CD49d)	Becton Dickinson	560972
Integrina $\alpha$ 5 (CD49e)	Becton Dickinson	555617
Integrina $\alpha$ 6 (CD49f)	Becton Dickinson	561894
Integrina $\alpha$ 8	Thermo Fisher Scientific	MA5-23593
Integrina $\beta$ 1 (CD29)	Becton Dickinson	561795
NCAM (CD56)	Becton Dickinson	564488

Anticuerpos Primarios		
Nombre	Empresa	Catálogo
Cardiotroponina T ( $\alpha$ -cTnT)	Abcam	ab8295
Tag HA	Lab. Dr Martín Monte	

Anticuerpos Secundarios		
Nombre	Empresa	Catálogo
$\alpha$ -IgG de ratón Alexa Fluor 568	Thermo Fisher Scientific	A-11031
$\alpha$ -IgG de ratón Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	A-21200

## 8.5. Estudio de la proliferación y la apoptosis

### Ciclo celular y proliferación

El análisis del estado replicativo fue realizado mediante citometría de flujo utilizando el sistema Click-iT® EdU Flow Cytometry Kit (Thermo Fisher Scientific). Para ello, se realizaron pulsos con el análogo de nucleótido 5-Etínil-2'- deoxiuridina (EdU) a una concentración de 10  $\mu$ M durante 20 minutos en estufa, se disociaron las células a suspensiones unicelulares y luego se las fijó con para-formaldehído durante 20 minutos a TA. Para revelar la incorporación de EdU se siguieron las indicaciones del fabricante, que incluyen la tinción con 7-Aminoactinomicina D (7-AAD). Los umbrales EdU+ y EdU fueron determinados a partir de las células control, las cuales no fueron tratadas con doxiciclina.

### Apoptosis

El análisis de la apoptosis y muerte celular fue realizada mediante la utilización del sistema FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (Becton Dickinson). Este consiste en la marcación de las células con Anexina V y 7-AAD. La Anexina V se encuentra conjugada al fluoróforo FITC y posee una alta afinidad por la Fosfatidilserina, la cual se encuentra expuesta hacia afuera en la membrana en células apoptóticas tempranas y más avanzadas. La utilización en conjunto con 7-AAD permite diferenciar el estadio temprano de la apoptosis y el estado necrótico de las células, una vez que estas son positivas para ambos marcadores.

El protocolo consiste en resuspender las células en una concentración de 1.000.000 cels/ml y realizar una marcación secuencial, en primer lugar incubando con Anexina V por 15 minutos y luego con 7-AAD para finalmente analizarlo por citometría de flujo.

## 8.6. Extracción de RNA, RT y PCR

### Extracción de RNA total

Para obtener RNA total de células en cultivo utilizamos el reactivo Trizol (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al momento de la extracción, se descartaron los medios de cultivo, se realizó un lavado con PBS 1x y se agregó entre 200-500  $\mu$ l de Trizol por cada well. Las muestras fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta proseguir con el protocolo de extracción y, luego del mismo, se resuspendió el RNA en H<sub>2</sub>Omq libre de RNAsas. Durante el paso intermedio de precipitación con Isopropanol, utilizamos GlycoBlue(Thermo Fisher Scientific) para maximizar la eficiencia de precipitación del ARN.

Luego, estas muestras fueron cuantificadas utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 y también se verificó que la relación OD260/OD280 fuese de entre 1,7 y 2 para asegurar una elevada pureza del ARN total obtenido. Finalmente el RNA total extraído fue conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Retro-Transcripción(RT)

Para efectuar la transcripción reversa se utilizaron 500ng de ARN total, 10 ng/ml de oligonucleótidos al azar (random primers) (Thermo Fisher Scientific), dNTPs 1mM (Thermo Fisher Scientific) y 200U de la enzima MMLV (Promega). Se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, la preparación (sin la enzima) fue llevada a  $65^{\circ}\text{C}$  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  $\mu$ 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  $37^{\circ}\text{C}$  para que ocurra la retrotranscripción y 15 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$  con el

fin de inactivar a la enzima. Finalmente, almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Luego de terminar la reacción se diluyeron las muestras 1/5 en  $\text{H}_2\text{O}$  libre de RNAsas y se las conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **PCR a punto final**

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ . Se colocaron los siguientes componentes por tubo de PCR: 2,5  $\mu\text{l}$  de Buffer de PCR (Tris-HCl 200mM[pH 8.4], KCl 500mM), 1  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  50mM, 0,5  $\mu\text{l}$  de una mezcla de los 4 deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Thermo Fisher Scientific), 2,5  $\mu\text{l}$  de oligonucleótido sentido (primer forward) 5 $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{l}$  de oligonucleótido antisentido (primer reverse) 5 $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{l}$  de la ADN polimerasa PlatinumTaq DNA Polimerasa 5U/ $\mu\text{l}$  (Thermo Fisher Scientific) y 2  $\mu\text{l}$  de ADN copia, y completando el volumen a 25  $\mu\text{l}$  con agua libre de DNAsas.

### **PCR en tiempo real**

Para evaluar los niveles de expresión de RNA mensajero (mRNA) en las distintas condiciones experimentales, se realizaron reacciones de PCR en tiempo real a partir de cDNA (RT-qPCR), utilizando el kit SYBR Green Master Mix (Roche) y la termocicladora StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Por cada muestra se realizaron dos réplicas técnicas y en cada corrida se analizó un control negativo (blanco) para cada set de *primers* utilizados.

Los datos fueron analizados con el software LinReg[96], a partir del cual se obtuvieron las eficiencias de la reacción de PCR para cada par de *primers* y, con esta información, se calcularon los niveles teóricos iniciales de cDNA ( $N_0$ ) para cada condición. Se evaluó el gen normalizador (*housekeeping*) RPL7, utilizado de rutina en CMP humanas. Todos los experimentos fueron realizados con al menos tres réplicas biológicas.

Para cada uno de los cDNA analizados se realizaron curvas de temperatura de apareamiento con el fin de 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.

## **8.7. Análisis Estadísticos**

Los resultados experimentales son presentados como media +/- error estándar de la media (SEM) para al menos tres réplicas biológicas. Según el diseño experimental, la significancia estadística entre grupos fue analizada mediante ANOVA en bloques aleatorizados. Para ambos casos, se analizó la normalidad en las distribuciones de las variables mediante el test de Shapiro Wilks modificado. Se analizó además la homocedasticidad a través de la prueba de Levene y se realizaron comparaciones entre los grupos utilizando el test de Tukey. Consideramos las diferencias entre grupos como estadísticamente significativos cuando el P valor fue  $<$  a 0,05. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Infostat.

## 8.8. *Primers* utilizados

Integrinas		Secuencia
Integrina $\alpha 3$	<i>Forward</i>	CTTGCAGATGCGGGCAGCCT
	<i>Reverse</i>	CACCACCAGGGTGAGCAGCG
Integrina $\alpha 4$	<i>Forward</i>	TATGTTATGTGGAAGGCTGGC
	<i>Reverse</i>	TCATTGCTGAGATTTTCCCCTT
Integrina $\alpha 5$	<i>Forward</i>	GGGTACGGCGGGCACTGTTC
	<i>Reverse</i>	TCCACTGGGGCTTGGGGGTC
Integrina $\alpha 6$	<i>Forward</i>	CCATGCACGCGGATCGAG
	<i>Reverse</i>	TTGCCCCCTGGACCTTGG
Integrina $\alpha 8$	<i>Forward</i>	AACTTGCCAGGTTCCAGACTC
	<i>Reverse</i>	GCCATCAAGACTATTGTGTTTGC
Integrina $\beta 1$	<i>Forward</i>	CGGGGCATCTGCGAGTGTGG
	<i>Reverse</i>	AGGTTGGACCGGCTGGGGTA



<b>Dif. Cardíaca</b>		<b>Secuencia</b>
ZEB1	<i>Forward</i>	TTACACCTTTGCATACAGAACCC
	<i>Reverse</i>	TTTACGATTACACCCAGACTGC
ZEB2	<i>Forward</i>	GGAGACGAGTCCAGCTAGTGT
	<i>Reverse</i>	CCACTCCACCCTCCCTTATTTC
E-cadherina	<i>Forward</i>	AAAGGCCCATTTCTAAAAACCT
	<i>Reverse</i>	TGCGTTCTCTATCCAGAGGCT
Vimentina	<i>Forward</i>	TGCCGTTGAAGCTGCTAACTA
	<i>Reverse</i>	CCAGAGGGAGTGAATCCAGATTA
SNAI1/SNAIL	<i>Forward</i>	ATGCACATCCGAAGCCACA
	<i>Reverse</i>	GAGGGTCAGCGGGGACATC
$\alpha$ -cTnT	<i>Forward</i>	ATGATGCATTTTGGGGGTTA
	<i>Reverse</i>	CAGCACCTTCCTCCTCTCAG
a-MHC	<i>Forward</i>	CAACAATCCCTACGACTAC
	<i>Reverse</i>	TCTCCTCTGAAGTGAAGC

<b>MEx</b>		<b>Secuencia</b>
Fibronectina	<i>Forward</i>	CGGGGCATCTGCGAGTGTGG
	<i>Reverse</i>	GAGCGTGGGGTGCCAGTG
Laminina $\alpha$ 1	<i>Forward</i>	CGGGCTTTTCCAGAACAGTG
	<i>Reverse</i>	AGTAAATCAGGCCGCTGGAG
Laminina $\alpha$ 2	<i>Forward</i>	TGAGTATGAAAGCAAGGCCAGA
	<i>Reverse</i>	TCAATTGGCACAGGGGAGAG
Laminina $\alpha$ 3	<i>Forward</i>	CTGGGCTACAGTTCACAGCA
	<i>Reverse</i>	CAGGGCTACAACCCTGGC
Laminina $\alpha$ 4	<i>Forward</i>	CCTTTTGATGCCGTACTCTGC
	<i>Reverse</i>	CGCTGACATCCAGTAGTGCT
Laminina $\alpha$ 5	<i>Forward</i>	AGCGGCTGAACACGACAGG
	<i>Reverse</i>	AGTGAGCGGTGCCACGTTC
Laminina $\beta$ 1	<i>Forward</i>	GGGGTCGTGTCAGCCTTG
	<i>Reverse</i>	AGTGCTCTTGCACGGTGCC
Laminina $\beta$ 2	<i>Forward</i>	GAACCCCAAAGCAAGGAGGA
	<i>Reverse</i>	GCCAGCACGCTTAGCAGTAG
Laminina $\beta$ 3	<i>Forward</i>	CAGAGGAGCTGTTTGGGGAG
	<i>Reverse</i>	CCCATTGATGTGGTCACGGA
Laminina $\gamma$ 1	<i>Forward</i>	GGCCCAGGATGTCAAAGATG
	<i>Reverse</i>	TGTTCTCTACATGGGCACG
Laminina $\gamma$ 2	<i>Forward</i>	TGATACCAGAGCCAAGAACGC
	<i>Reverse</i>	CCAGCCCCTCTTCATCTACA
Laminina $\gamma$ 3	<i>Forward</i>	TACGGCAAACAGAACCCCTC
	<i>Reverse</i>	GATCAGCCAGCAGAGTCCTG

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Jun Wu y Juan Carlos Izpisua Belmonte. “Stem Cells: A Renaissance in Human Biology Research”. En: *Cell* 165.7 (2016), págs. 1572-1585. ISSN: 10974172.
- [2] Alejandro De Los Angeles y col. “Hallmarks of pluripotency”. En: *Nature* 525.7570 (2015), págs. 469-478. ISSN: 14764687.
- [3] Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors”. En: 2 (2006), págs. 663-676.
- [4] Lior Gepstein. “Derivation and potential applications of human embryonic stem cells”. En: *Circulation Research* 91.10 (2002), págs. 866-876. ISSN: 00097330.
- [5] Michal Amit y col. “Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture”. En: *Developmental Biology* 227.2 (2000), págs. 271-278. ISSN: 00121606.
- [6] Chunhui Xu y col. “Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells”. En: *Nature* ... 19.October (2001), págs. 971-974.
- [7] Gordon Keller. “New Insights into Early Human Development : Lessons for Stem Cell Derivation and Differentiation”. En: *Genes & development* 19 (2005), págs. 1129-1155. ISSN: 00928674.
- [8] Gordon M. Keller. “In vitro differentiation of embryonic stem cells”. En: *Current Opinion in Cell Biology* 7.6 (1995), págs. 862-869. ISSN: 09550674.
- [9] Patrick P.L. Tam y Richard R. Behringer. “Mouse gastrulation: The formation of a mammalian body plan”. En: *Mechanisms of Development* 68.1-2 (1997), págs. 3-25. ISSN: 09254773.

- [10] Scott F. Gilbert. “Developmental Biology”. En: *Developmental Biology* (2013).
- [11] A Kispert y B G Herrmann. *Immunohistochemical analysis of the Brachyury protein in wild-type and mutant mouse embryos*. 1994.
- [12] S J Kinder y col. “The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm.” En: *Development (Cambridge, England)* 128 (2001), págs. 3623-3634. ISSN: 0950-1991.
- [13] Charles E. Murry y Gordon Keller. “Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development”. En: *Cell* 132.4 (2008), págs. 661-680. ISSN: 00928674.
- [14] B L Hogan. “Bone morphogenetic proteins in development.” En: *Current opinion in genetics & development* 6.4 (1996), págs. 432-438. ISSN: 0959-437X.
- [15] Kristin Chadwick y col. “Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells”. En: 102.3 (2003), págs. 906-915.
- [16] Terry P. Yamaguchi. “Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning”. En: *Current Biology* 11.17 (2001), págs. 713-724. ISSN: 09609822.
- [17] Paul W. Burridge y col. “Production of de novo cardiomyocytes: Human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming”. En: *Cell Stem Cell* 10.1 (2012), págs. 16-28. ISSN: 19345909.
- [18] Denis Evseenko y col. “Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells”. En: ()).
- [19] Ita Costello y col. “The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of *Mesp1* to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation”. En: *Nature Cell Biology* 13.9 (2011), págs. 1084-1092. ISSN: 14657392.

- 
- [20] Antoine Bondué y col. “Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification”. En: *Cell Stem Cell* 3.1 (2008), págs. 69-84. ISSN: 18759777.
- [21] A. T. Naito y col. “Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis”. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.52 (2006), págs. 19812-19817. ISSN: 0027-8424.
- [22] Antoine Bondué y Cédric Blanpain. “Mesp1: A key regulator of cardiovascular lineage commitment”. En: *Circulation Research* 107.12 (2010), págs. 1414-1427. ISSN: 00097330.
- [23] C. Mummery. “Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes: Role of Coculture With Visceral Endoderm-Like Cells”. En: *Circulation* 107.>21 (2003), págs. 2733-2740. ISSN: 0009-7322.
- [24] Limor Zwi y col. “Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells”. En: *Circulation* 120.15 (2009), págs. 1513-1523. ISSN: 00097322.
- [25] Steven J. Kattman y col. “Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines”. En: *Cell Stem Cell* 8.2 (2011), págs. 228-240. ISSN: 19345909.
- [26] Xiaojun Lian y col. “Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling”. En: ().
- [27] Sharon L. Paige y col. “Endogenous wnt/ $\beta$ -Catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells”. En: *PLoS ONE* 5.6 (2010). ISSN: 19326203.

- [28] X. Lian y col. “Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling”. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2012). ISSN: 0027-8424.
- [29] T. C. Flanagan y col. “Reference models for mitral valve tissue engineering based on valve cell phenotype and extracellular matrix analysis”. En: *Cells Tissues Organs* 183.1 (2006), págs. 12-23. ISSN: 14226405.
- [30] Stephen Badylak y col. “The extracellular matrix as a biologic scaffold for tissue engineering”. En: *Tissue Engineering* (2008), págs. 121-143. ISSN: 0302766X.
- [31] Raheem Peerani y Peter Zandstra. “Review series Enabling stem cell therapies through synthetic stem cell – niche engineering”. En: *Strategies* 120.1 (2010), págs. 60-70. ISSN: 15588238.
- [32] Joseph M. Aamodt y David W. Grainger. “Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response”. En: *Biomaterials* 86 (2016), págs. 68-82. ISSN: 18785905.
- [33] Miriam Votteler y col. *Stem Cell Microenvironments - Unveiling the Secret of How Stem Cell Fate is Defined*. 2010.
- [34] Monique Aumailley. “The laminin family”. En: () .
- [35] M Falk y col. “Restricted distribution of laminin alpha1 chain in normal adult mouse tissues.” En: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 18.6 (1999), págs. 557-68. ISSN: 0945-053X.
- [36] J H Miner y col. “The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform.” En: *The Journal of cell biology* 137.3 (1997), págs. 685-701. ISSN: 0021-9525.

- 
- [37] Roumen Pankov y Kenneth M Yamada. “Fibronectin at a glance”. En: *Journal of Cell Science* 115 (), págs. 3861-3863.
- [38] Edward F. Plow y col. “Ligand binding to integrins”. En: *Journal of Biological Chemistry* 275.29 (2000), págs. 21785-21788. ISSN: 00219258.
- [39] E L George y col. “Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin.” En: *Development (Cambridge, England)* 119.4 (1993), págs. 1079-1091. ISSN: 0950-1991.
- [40] Richard O. Hynes. “Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines”. En: *Cell* 110.6 (2002), págs. 673-687. ISSN: 00928674.
- [41] Motomu Shimaoka y Timothy A. Springer. “Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function”. En: *Nature Reviews Drug Discovery* 2.9 (2003), págs. 703-716. ISSN: 1474-1776.
- [42] Yoshikazu Takada, Xiaojing Ye y Scott Simon. “The integrins”. En: *Genome Biology* 8 (2007).
- [43] J. A. Askari y col. “Linking integrin conformation to function”. En: *Journal of Cell Science* 122.2 (2009), págs. 165-170. ISSN: 0021-9533.
- [44] Malgorzata Barczyk, Sergio Carracedo y Donald Gullberg. “Integrins”. En: *Cell and Tissue Research* 339.1 (2010), págs. 269-280. ISSN: 0302766X.
- [45] Iain D Campbell y Martin J Humphries. “Integrin Structure , Activation , and Interactions”. En: (2017), págs. 1-15.
- [46] Noritaka Nishida y col. “Activation of Leukocyte  $\beta 2$  Integrins by Conversion from Bent to Extended Conformations”. En: *Immunity* 25.4 (2006), págs. 583-594. ISSN: 10747613.
- [47] Jieqing Zhu y col. “NIH Public Access”. En: 34.2 (2009), págs. 234-249.

- [48] Junichi Takagi y col. "Structure of integrin  $\alpha 5 \beta 1$  in complex with  $\text{R}$  bro-nectin". En: 22.18 (2003), págs. 4607-4615.
- [49] Shigenori Honda y col. "Integrin-linked kinase associated with integrin acti-vation". En: *Blood* 113.21 (2009), págs. 5304-5313. ISSN: 00064971.
- [50] Kenji Iwasaki y col. "Electron tomography reveals diverse conformations of integrin  $\alpha 1 \beta 3$  in the active state". En: *Journal of Structural Biology* 150.3 (2005), págs. 259-267. ISSN: 10478477.
- [51] Evan A. Evans y David A. Calderwood. "Forces and bond dynamics in cell adhesion". En: *Science* 316.5828 (2007), págs. 1148-1153. ISSN: 00368075.
- [52] David A. Calderwood, Sanford J. Shattil y Mark H. Ginsberg. "Integrins and actin filaments: Reciprocal regulation of cell adhesion and signaling". En: *Jour-nal of Biological Chemistry* 275.30 (2000), págs. 22607-22610. ISSN: 00219258.
- [53] Cindy K. Miranti y Joan S. Brugge. "Sensing the environment: A histori-cal perspective on integrin signal transduction". En: *Nature Cell Biology* 4.4 (2002). ISSN: 14657392.
- [54] Benjamin Geiger. "NIH Public Access". En: 9.8 (2009), págs. 858-867.
- [55] Edward R. Horton y col. "The integrin adhesome network at a glance". En: *Journal of Cell Science* 129.22 (2016), págs. 4159-4163. ISSN: 0021-9533.
- [56] M Moser y col. "The tail of integrins, talins, and kindlins." En: *Science* 324.May (2009), págs. 895-899.
- [57] D. S. Harburger y D. A. Calderwood. "Integrin signalling at a glance". En: *Journal of Cell Science* 122.9 (2009), págs. 1472-1472. ISSN: 0021-9533.
- [58] Lorian Vitillo y Susan J. Kimber. "Integrin and FAK Regulation of Human Pluripotent Stem Cells". En: *Current Stem Cell Reports* (2017), págs. 358-365. ISSN: 2198-7866.



- 
- [59] Stefan R Braam y col. “Recombinant Vitronectin Is a Functionally Defined Substrate That Supports Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal via  $\alpha$ 5 Integrin”. En: ().
- [60] Sergey Rodin y col. “Clonal culturing of human embryonic stem cells on laminin-521/E-cadherin matrix in defined and xeno-free environment”. En: *Nature Communications* 5 (2014), págs. 1-13. ISSN: 20411723.
- [61] Sergey Rodin y col. “Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511”. En: *Nature Biotechnology* 28.6 (2010), págs. 611-615. ISSN: 10870156.
- [62] Despina Soteriou y col. “Comparative proteomic analysis of supportive and unsupportive extracellular matrix substrates for human embryonic stem cell maintenance”. En: *Journal of Biological Chemistry* 288.26 (2013), págs. 18716-18731. ISSN: 00219258.
- [63] Y. Meng y col. “Characterization of integrin engagement during defined human embryonic stem cell culture”. En: *The FASEB Journal* 24.4 (2010), págs. 1056-1065. ISSN: 0892-6638.
- [64] Lorian Vitillo y col. “Integrin-Associated Focal Adhesion Kinase Protects Human Embryonic Stem Cells from Apoptosis, Detachment, and Differentiation”. En: *Stem Cell Reports* 7.2 (2016), págs. 167-176. ISSN: 22136711.
- [65] J T Yang, H Rayburn y R O Hynes. “Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice.” En: *Development (Cambridge, England)* 119.4 (1993), págs. 1093-1105. ISSN: 0950-1991.
- [66] Bo Liu, Andrew K. Lewis y Wei Shen. “Physical hydrogels photo-cross-linked from self-assembled macromers for potential use in tissue engineering”. En: *Biomacromolecules* 10.12 (2009), págs. 3182-3187. ISSN: 15257797.

- [67] Han Wang, Xie Luo y Jake Leighton. “Extracellular Matrix and Integrins in Embryonic Stem Cell Differentiation Supplementary Issue: Biochemistry of the Individual Living Cell”. En: *Biochemistry insights* 8.s2 (2015).
- [68] Silin Sa, Lian Wong y Kara E. McCloskey. “Combinatorial Fibronectin and Laminin Signaling Promote Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Embryonic Stem Cells”. En: *BioResearch Open Access* 3.4 (2014), págs. 150-161. ISSN: 2164-7860.
- [69] Vincent Castranova y col. “HHS Public Access”. En: 58.4 (2016), págs. 1922-2013.
- [70] Jennifer A. Doudna y Emmanuelle Charpentier. “The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9”. En: *Science* 346.6213 (2014). ISSN: 10959203.
- [71] F Ann Ran y Patrick D Hsu. “30 Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system”. En: *Nature Protocols* 8.11 (2013), págs. 2281-2308.
- [72] Ophir Shalem y col. “Genome - scale CRISPR - Cas9 knockout screening in human cells”. En: *Science* 343.6166 (2014), págs. 84-87. ISSN: 1095-9203.
- [73] Author Manuscript y Separate Magnitude. “NIH Public Access”. En: 31.9 (2013), págs. 1713-1723. ISSN: 08966273.
- [74] N. A. Kearns y col. “Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells”. En: *Development* 141.1 (2014), págs. 219-223. ISSN: 0950-1991.
- [75] Mohammad A. Mandegar y col. “CRISPR Interference Efficiently Induces Specific and Reversible Gene Silencing in Human iPSCs”. En: *Cell Stem Cell* 18.4 (2016), págs. 541-553. ISSN: 18759777.
- [76] Ryan M Genga, Nicola A Kearns y René Maehr. “Controlling transcription in human pluripotent stem cells using CRISPR-effectors”. En: *METHODS* (2015).

- 
- [77] Lei Yang y col. "Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+embryonic-stem-cell-derived population". En: *Nature* 453.7194 (2008), págs. 524-528. ISSN: 14764687.
- [78] Trypsin Replacement Enzymes. "TrypLE™ Select and TrypLE™ Express". En: *Media* ().
- [79] United Kingdom y col. "HHS Public Access". En: 21.2 (2017), págs. 129-139.
- [80] Cheng-Lin Li y col. "Fibronectin induces epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer MCF-7 cells via activation of calpain". En: *Oncology Letters* (2017), págs. 3889-3895. ISSN: 1792-1074.
- [81] Grasieli De Oliveira Ramos y col. "Fibronectin modulates cell adhesion and signaling to promote single cell migration of highly invasive oral squamous cell carcinoma". En: *PLoS ONE* 11.3 (2016), págs. 1-18. ISSN: 19326203.
- [82] Tzu Wei Tan y col. "CCN3 increases BMP-4 expression and bone mineralization in osteoblasts". En: *Journal of Cellular Physiology* 227.6 (2012), págs. 2531-2541. ISSN: 00219541.
- [83] Gudrun Volkert y col. "Contribution of the  $\alpha 8$  Integrin Chain to the Expression of Extracellular Matrix Components". En: *Cell Communication & Adhesion* 21.2 (2014), págs. 89-98. ISSN: 1541-9061.
- [84] Camille Humbert y col. "Integrin alpha 8 recessive mutations are responsible for bilateral renal agenesis in humans". En: *American Journal of Human Genetics* 94.2 (2014), págs. 288-294. ISSN: 00029297.
- [85] J H Miner, R M Lewis y J R Sanes. "Molecular cloning of a novel laminin chain, alpha 5, and widespread expression in adult mouse tissues." En: *The Journal of biological chemistry* 270.48 (1995), págs. 28523-28526.

- [86] Heidi Hongisto y col. "Laminin-511 expression is associated with the functionality of feeder cells in human embryonic stem cell culture". En: *Stem Cell Research* (2012). ISSN: 18735061.
- [87] Jill Thyboll y col. "Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation." En: *Molecular and cellular biology* 22.4 (2002), págs. 1194-202. ISSN: 0270-7306.
- [88] Patricia Oliviero y col. "Expression of laminin  $\alpha$ 2 chain during normal and pathological growth of myocardium in rat and human". En: *Cardiovascular Research* 46.2 (2000), págs. 346-355. ISSN: 00086363.
- [89] Paul H. Krebsbach y Luis G. Villa-Diaz. "The Role of Integrin  $\alpha$ 6 (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker". En: *Stem Cells and Development* 26.15 (2017), págs. 1090-1099. ISSN: 1547-3287.
- [90] Luis G Villa-Diaz. "P LURIPOTENT S TEM C ELLS Putative Immunogenicity Expression Profiling Using Human Pluripotent Stem Cells and Derivatives". En: 12 (2015), págs. 1-10.
- [91] S. Thorsteinsdottir y col. "Expression of the  $\alpha$ 6A integrin splice variant in developing mouse embryonic stem cell aggregates and correlation with cardiac muscle differentiation". En: *Differentiation* 64.3 (1999), págs. 173-184. ISSN: 03014681.
- [92] Takuya Shirakihara y col. "Identification of integrin  $\alpha$ 3 as a molecular marker of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes". En: *Cancer Science* 104.9 (2013), págs. 1189-1197. ISSN: 13479032.
- [93] Monica Morini y col. "The  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity". En: *International Journal of Cancer* 87.3 (2000), págs. 336-342. ISSN: 00207136.

- [94] Its Vectors, Pulsed-field Agarose y Gene Identification. "Molecular Cloning".  
En: *The Journal of infectious diseases* 208.2 (2001), NP. ISSN: 1537-6613.
- [95] John M Walker. *Post- Transcriptional Gene Regulation IN Series Editor*. ISBN:  
9781493930661.
- [96] J. M. Ruijter y col. "Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the  
analysis of quantitative PCR data". En: *Nucleic Acids Research* 37.6 (2009).  
ISSN: 03051048.