



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y
DE LA SALUD

ENTIDAD ACADÉMICA: INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHÁVEZ

**AUMENTO DE LA EFICIENCIA DE DIFERENCIACIÓN CARDÍACA A PARTIR DE
CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE TEJIDO ADIPOSO**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS

PRESENTA:

BLANCA REBECA IBARRA IBARRA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHÁVEZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. FELIPE ALONSO MASSÓ ROJAS
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHÁVEZ

DR. YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA
INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA, CONDE DE VALENCIANA

DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Abril, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Resumen	1
1. Marco teórico	2
1.1 Introducción	2
1.2 Células Troncales	2
1.3 Células troncales mesenquimales	5
1.4 Diferenciación de las células troncales hacia cardiomiocito	7
1.5 Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC)	8
1.6 Diferenciación de las ASC hacia cardiomiocito	9
1.7 Estudios pre-clínicos y clínicos con células troncales	12
2. Planteamiento del problema	13
3. Pregunta de investigación	15
4. Justificación	15
5. Objetivos	16
6. Hipótesis	16
7. Material y Métodos	17
7.1 Diseño del estudio	17
7.2 Extracción de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC)	17
7.3 Mantenimiento de las ASC	18
7.4 Citometría de Flujo	18
7.5 Inmunofluorescencia	19
7.6 Experimentos de la diferenciación hacia cardiomiocito a partir de las ASC	20
7.7 Construcción de plásmidos y generación de adenovirus recombinantes A20	20
7.8 Extracción de cardiomiocitos neonatales	21
7.9 Análisis estadístico	22
8. Resultados	22
8.1 Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC)	22
8.2 Experimentos de diferenciación cardíaca de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC).	27
8.2.1 Diferenciación cardíaca con moléculas pequeñas: Cardiogenol C	28
8.2.2 Diferenciación cardíaca con factores de crecimiento, interleucinas y adenovirus recombinantes: AdA20 + BMP-4 + VEGF + IL-6 + IGF-1 + HGF	30
8.2.3 Diferenciación cardíaca con cocultivos de cardiomiocitos: Cocultivo indirecto	32
8.2.4 Diferenciación cardíaca con factores de crecimiento, interleucinas y medios semisólidos a base de metilcelulosa: BMP-4 + VEGF + Methocult™ M3134 + IL-6	34
8.2.5 Diferenciación cardíaca con factores de crecimiento y un medio semisólido a base de metilcelulosa con interleucinas: BMP-4 + VEGF + Methocult™ M3435	37
9. Discusión	38
9.1 Nuevas hipótesis y perspectivas	41
10. Conclusiones	42
Agradecimientos	42
Abreviaturas	43
Bibliografía	44
Anexo 1. Artículo publicado derivado de la tesis: <i>Improved Efficiency of Cardiomyocytes-like Cells Differentiation from Rat Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells with a Directed Differentiation Protocol</i>, Stem Cell International, 2019.	48
Anexo 2. Resultados complementarios	64

Resumen

Introducción. Las células troncales son un recurso con gran potencial para la Medicina. La terapia celular es un recurso para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, sin embargo, se ha observado variabilidad en la respuesta entre los pacientes. Una solución a dicha variabilidad es la generación de cardiomiocitos *in vitro*. Existen varios estudios sobre la diferenciación cardíaca de las células troncales derivadas de tejido adiposo (ASC), no obstante, la eficiencia de diferenciación hacia cardiomiocitos a partir de estas células es variable.

Objetivo. Aumentar la eficiencia podría ayudar a mejorar la generación de cardiomiocitos *in vitro*.

Material y Métodos. Extracción de ASC de rata Wistar. Caracterización por citometría de flujo (CF) e inmunofluorescencia (IF) de cultivos de ASC indiferenciadas. Diferenciación *in vitro* hacia cardiomiocito a partir de las ASC. La eficiencia de diferenciación cardíaca se cuantificó por medio de citometría de flujo (CF) con el marcador cardíaco Troponina T (cTnT) y se evaluó la expresión de marcadores de diferenciación cardíaca por inmunofluorescencia (IF). Se realizaron 3 réplicas biológicas.

Resultados. Las ASC indiferenciadas fueron caracterizadas por CF CD90+, CD29+, CD44+, RT1A+, CD73+, CD45-, CD34-, CD31-. Se realizaron diferentes experimentos de diferenciación hacia cardiomiocito a partir de las ASC. Los experimentos de diferenciación mostraron una eficiencia de diferenciación a células similares a cardiomiocito hasta de 44 % en aquellos donde se utilizó una combinación de factores de crecimiento aunado a un medio semisólido a base de metilcelulosa con interleucinas cardiogénicas, donde se demostró la presencia de marcadores cardíacos tempranos y tardíos.

Conclusiones. A diferencia de otros protocolos, en donde se había observado una eficiencia baja y variable, el uso de factores críticos de la cardiomiogénesis, aunado a un medio semisólido comercial a base de metilcelulosa con citocinas como IL-3 e IL6, parece favorecer y hacer más eficiente la diferenciación cardíaca a partir de las ASC para la generación de cardiomiocitos *in vitro*.

1. Marco teórico

1.1 Introducción

La medicina regenerativa en los últimos años ha revolucionado el tratamiento de diversas enfermedades, como las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y crónico-degenerativas, en las que se ha evidenciado tanto el beneficio como la seguridad del uso de la terapia celular. Ante la necesidad de encontrar un tratamiento eficaz para las enfermedades cardiovasculares, el estudio de las células troncales se ha convertido en los últimos años en un recurso con gran potencial para la Medicina. Actualmente, los tratamientos son generalmente paliativos en el caso de una enfermedad terminal como la falla cardíaca. En estos casos, la medicina regenerativa ha demostrado ser una alternativa eficaz para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares [1–3].

La generación de cardiomiocitos *in vitro* es una estrategia para mejorar la respuesta a la terapia celular. Empero, aún existen limitaciones en el área clínica que resolver para poder dar un tratamiento a base de células troncales. Recientemente, la generación de cardiomiocitos inmaduros *in vitro* a partir de las células troncales pluripotenciales inducidas ha mostrado tener una buena eficiencia de diferenciación [4–6], no obstante, no se ha podido trasladar su uso a la práctica clínica por su potencial tumorigénico. Una alternativa para la generación de cardiomiocitos *in vitro* es el uso de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo porque son de fácil acceso, bajo índice tumorigénico y bajo costo, sin embargo, se debe aumentar la eficiencia de diferenciación a cardiomiocito a partir de estas células con el fin de poder trasladarlas en un futuro al área clínica o para su uso en otras aplicaciones como estudios de farmacología *in vitro* o modelos de enfermedad genética.

1.2 Células troncales

Las células troncales (SC) se definen como células indiferenciadas con capacidad de diferenciación y auto-renovación [7] (**Figura 1**). Una de las características más importantes y que hace atractivo el uso de éstas para la regeneración celular es la capacidad de diferenciación a distintas estirpes celulares [7]. La capacidad de

diferenciación se denomina plasticidad, lo cual define a las células como totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales [7,8].

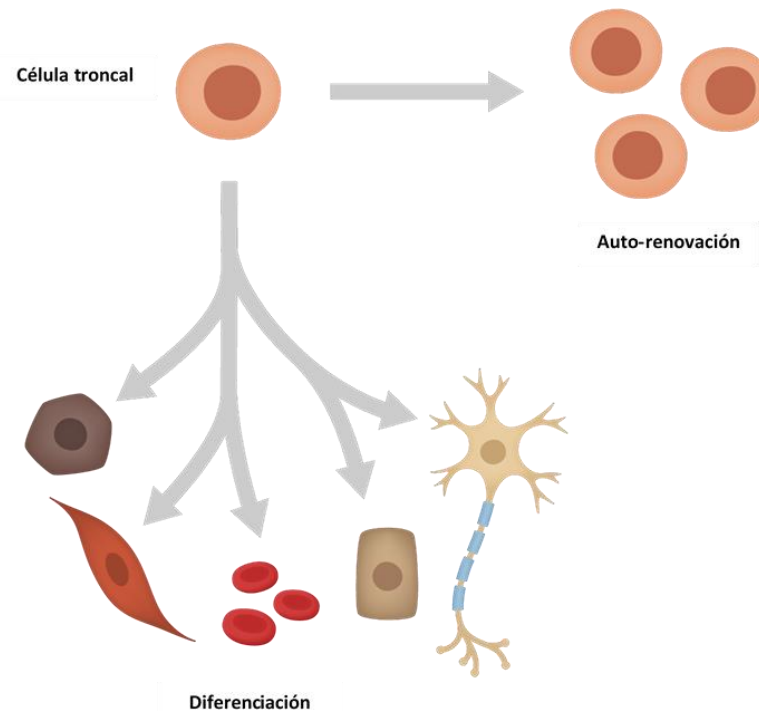


Figura 1. Representación gráfica de las características de las células troncales: auto-renovación y diferenciación. *Imagen modificada: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-a-stem-cell>, Wellcome Genome Campus*

A grandes rasgos podemos clasificar las SC en células troncales embrionarias (ESC) y células troncales del adulto (**Figura 2**). Las ESC provienen de dos etapas del desarrollo embrionario. En el preblastocisto, se encuentran las ESC totipotenciales que darán origen tanto a las células embrionarias de las tres capas germinales como las extra-embrionarias. En el blastocisto, las células comienzan a presentar un grado mayor de diferenciación y son denominadas ESC pluripotenciales. Estas serán las que darán origen a las células del ectodermo, mesodermo y endodermo (**Figura 2**) [8]. Las ESC

expresan genes críticos para el mantenimiento de la pluripotencia: *Oct-4*, *Nanog* y *Sox-2* [9]. Sin embargo, su uso en la terapia celular es controvertido porque provienen de embriones y han mostrado tener un alto nivel tumorigénico con la formación de teratomas [10,11]. Por esta razón, se ha determinado que su uso en humanos por el momento no es factible.

Dentro de las células troncales del adulto, se encuentran las células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC), las células troncales mesenquimales (MSC) y las células troncales específicas de órganos y tejidos (**Figura 2**). Las iPSC fueron descritas en el 2006, estas son células somáticas, como fibroblastos o células de sangre periférica positivas para el marcador CD34, reprogramadas mediante la sobreexpresión de genes que contribuyen al mantenimiento de la pluripotencia (*Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*) [12]. Al ser reprogramadas, dichas células adquieren características similares a las ESC. No obstante, el uso del oncogen *c-Myc* en la reprogramación hace factible la generación de teratomas, por lo que también se ha visto limitado su uso en humanos. Algunos estudios han logrado la reprogramación sin la necesidad de utilizar *c-Myc*, pero aún faltan estudios para comprobar la seguridad de estas células [13].

Las MSC se encuentran en nichos específicos dentro de cada órgano y tejido adulto. En su mayoría, se han denominado como células multipotenciales por presentar una diferenciación restringida a una capa germinal [8]; sin embargo, se ha observado que algunas MSC expresan genes que codifican factores críticos del mantenimiento de la pluripotencia como *Oct3/4* y *Sox2*, por lo que se les puede denominar como células pluripotenciales [14].

Las células troncales específicas de órganos y tejidos, en comparación con las MSC, tienen aún más limitada su potencialidad, diferenciándose específicamente a células de un órgano o tejido [7]. Tanto las MSC y las células troncales específicas de órganos y tejidos, se encuentran entre 0.0001 % al 5 % del total de células de un tejido

u órgano y permanecen en ellos en un estado quiescente por muchos años hasta que son activadas por enfermedades o daño tisular [14–16].

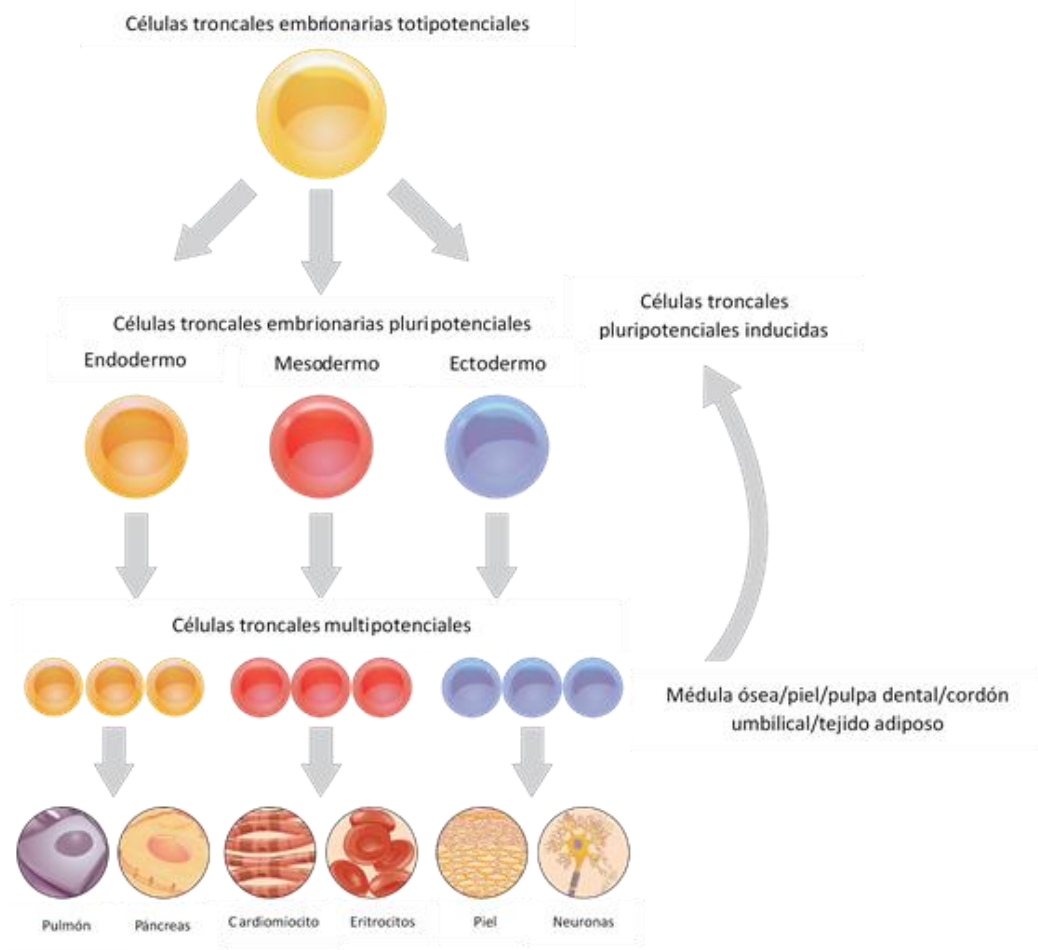


Figura 2. Diagrama de los tipos de células troncales según su potencialidad. *Imagen modificada:* <http://www.cell-transfection.com/home-2/stable-cell-lines/stem-cells/>.

1.3 Células troncales mesenquimales

Las MSC fueron descritas por primera vez en los estudios realizados por Friedenstein y colaboradores en los años 50, en los que lograron identificar dos tipos de SC en la médula ósea: las células troncales hematopoyéticas y las células troncales de médula ósea estromales. Estas últimas fueron nombradas así por la aparición de unidades formadoras de colonias similares a fibroblastos CFU-Fs [17]. Posteriormente, demostraron que dichas células eran capaces de generar células de hueso [18], cartílago

[19], grasa y tejido conectivo fibroso [20,21]. En 1991, Caplan denomina a estas células como células troncales mesenquimales (MSC) [19]. Hasta el momento se han identificado células MSC en diversos tejidos como en grasa [22], sangre de cordón umbilical, líquido amniótico [23], pulpa dentaria [24], tendones [25], vellosidades coriónicas [26], membrana sinovial [27] y músculo esquelético [28], entre otros.

Las MSC, en condiciones *in vitro*, tienen características multipotenciales o pluripotenciales y, por lo menos, deben diferenciarse a osteocitos, condrocitos y adipocitos [29]. Dentro de las MSC existen varios tipos de SC dependiendo del nicho en el que se encuentren. Fenotípicamente, expresan una serie de marcadores de superficie no específicos pero característicos, los cuales permiten diferenciar este tipo celular de otros tipos celulares por medio de la citometría de flujo. Estos marcadores pueden variar entre las diversas especies de mamíferos. Estos expresan en su mayoría: CD90+, CD73+, CD29+, CD44+, CD106+, CD105+, CD166+ y CD71+. No expresan marcadores de superficie hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 o CD11 y tampoco expresan moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 o CD40 o moléculas de adhesión como CD31, CD18 o CD56 [30].

El fenotipo inmunológico de las MSC es MHC I positivo, MHC II, CD40, CD80 y CD86 negativos [31]. Aún faltan estudios *in vivo* para determinar la capacidad inmunogénica e inmunomoduladora de las MSC. Por dicha razón, estas células han sido trasplantadas de forma autóloga para evitar el rechazo inmunológico.

Varios estudios han descrito el uso de las MSC en diversas patologías como la osteoartritis [32], en la lesión de la médula espinal [33], diabetes mellitus, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, osteoporosis, enfermedades autoinmunes y cardiovasculares [34]. En relación a las enfermedades cardiovasculares, en los últimos años se han descrito aplicaciones innovadoras como el trasplante de SC, la regeneración cardíaca, la prueba de nuevos fármacos, las pruebas de toxicidad de fármacos *in vitro*, así como su uso en modelos de enfermedades genéticas como el Síndrome de QT-largo, cardiomiopatía hipertrófica, entre otras [3,35–38].

1.4 Diferenciación de las células troncales hacia cardiomiocito

Existen diversos protocolos de diferenciación a cardiomiocito *in vitro*, como el empleo de factores tróficos que inducen el desarrollo cardíaco como BMP-4, FGF-2, IGF-1, HGF-1, entre otros [39–43]. La activina A también ha sido utilizada en la diferenciación de las iPSC. Esta proteína forma parte de la superfamilia del TGF- β y está implicada en los procesos de diferenciación hacia cardiomiocitos [1,39]. La aplicación de las moléculas antes citadas es tiempo dependiente, semejante al desarrollo embrionario cardíaco.

Algunos investigadores han utilizado la sobreexpresión o inhibición de genes para la diferenciación cardíaca. También se ha utilizado medios de cultivo especializados comerciales [44,45]. Recientemente, se reportó que el uso de moléculas pequeñas para la diferenciación cardíaca, por ejemplo: los antagonistas de la vía de Wnt / β -catenina como IWP-2 y 4, los inhibidores de la vía de Wnt por medio de la inhibición de GSK-3 β como la aminopirimidina CHIR99021 [39,46] y los activadores de la vía de Wnt, la diaminopirimidina (conocida como Cardiogenol C) que induce la cardiomiogénesis en ESC de ratón [47–49].

Varios reportes han descrito la inducción a la diferenciación a cardiomiocito con 5-azacitidina [50], un análogo de la citidina que juega un papel en la inhibición de la metilación del DNA; no obstante, no se ha logrado replicar los resultados obtenidos en diferentes estudios [51,52]. Los cocultivos con cardiomiocitos también han mostrado inducir la diferenciación a cardiomiocito [52,53].

Los protocolos hasta el momento han mostrado una diferenciación variable y en algunos casos menor al 1% para el caso de las ASC, sin embargo, para otras SC como las iPSC sí se ha observado una eficiencia de diferenciación mayor al 80 % [5].

Recientemente, se publicó una investigación sobre la diferenciación de fibroblastos humanos a cardiomiocitos que, por medio de un coctel de 9 compuestos,

buscó la reprogramación y diferenciación a cardiomiocitos. Entre los compuestos utilizados en la diferenciación hacia cardiomiocito, se utilizaron CHIR99021, BMP-4, Activina A y VEGF; con los cuales se obtuvo hasta un 97 % de células con contracción espontánea, fenotipo de células ventriculares y atriales [6]. Estos compuestos actúan sobre la β -catenina y Smad1 (efectores de la señalización procardiogénica de Wnt y BMP) para modificar promotores y *enhancers* de genes clave del desarrollo cardíaco [6]. En los protocolos donde se ha obtenido una eficiencia terminal de diferenciación mayor al 80% han utilizado diversas técnicas de purificación o enriquecimiento de las células diferenciadas a células similares a cardiomiocito.

1.5 Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC)

El tejido adiposo proviene del mesodermo y se desarrolla tanto prenatal como postnatalmente. Las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC) provienen de la fracción del estroma vascular (SVF) que se obtiene por lipoaspirado o por extracción directa del tejido adiposo. Estas células son aisladas del tejido adiposo mediante el uso de enzimas como la colagenasa [54–56]. El inmunofenotipo de las ASC es muy similar al de las MSC, sin embargo, pueden existir algunas variaciones dependiendo de la subpoblación que se esté estudiando como el marcador de superficie CD146 [57,58].

La razón por la cual el tejido adiposo posee SC se desconoce. Algunos autores han propuesto que esta subpoblación de células son en realidad células perivasculares o pericitos que residen en el tejido adiposo provenientes del endotelio vascular o que son células mesenquimales que viajan por el torrente sanguíneo y se alojan en el tejido graso [59]. Estas células representan una fuente de SC accesible con potencial para la medicina regenerativa y con un bajo índice tumorigénico (telomerasa y actividad de la aldehído deshidrogenasa estables además de no evidenciarse mutaciones en el gen *TP53* en cultivos celulares) [60]. Asimismo, han demostrado tener una plasticidad sobresaliente, diferenciándose a osteocitos, condrocitos, adipocitos, células endoteliales,

células similares a neuronas, células similares a cardiomiocitos, células similares a hepatocitos, entre otras [61].

1.6 Diferenciación de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo hacia cardiomiocito

En estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha observado que las ASC tienen la capacidad de diferenciarse hacia un linaje cardiogénico [44,45,50]. Los estudios han identificado la presencia de algunos marcadores de diferenciación cardíaca a nivel de genes y a nivel de proteínas como *Gata-4*, *Nkx2.5*, *Anp*, así como en proteínas cardíacas como β -MHC, α -MHC, troponina T (TnT), troponina I (TnI), troponina C y SerCa2, entre otras [44,45,50]. También se han observado contracciones espontáneas, lo cual ha sido corroborado por estudios electrofisiológicos. Los cambios morfológicos observados en algunos de estos protocolos de inducción a la cardiomiogénesis son compatibles con los observados en los cardiomiocitos, estructuras miotubulares, alineamiento con comunicación intercelular, presencia de discos Z y estructuras similares a sarcómeros [44,45,50,52,62–66]. Sólo un estudio ha evaluado la funcionalidad de las células similares a cardiomiocito derivadas de las ASC por medio de la respuesta farmacológica con diferentes β -agonistas, β -bloqueadores y acetilcolina [45]. Algunos estudios han observado pocos o ningún cambio en la inducción a la diferenciación a cardiomiocitos a partir de las ASC [51,67]. Incluso un estudio ha reportado la diferenciación espontánea a células similares cardíacas en 1.62 % y contracciones espontáneas con gradiente Ca^{2+} en 0.47 % [68]. Se resumen las condiciones de cultivo utilizadas, la especie de procedencia de las ASC y los resultados obtenidos de cada uno de los estudios (**Tabla 1**).

Hasta el momento existen varios protocolos para la inducción de las ASC hacia cardiomiocitos *in vitro*, sin embargo, la respuesta ha sido variable entre 0.02 % al 50 % (**Tabla 1**). Aquellos protocolos con un porcentaje mayor de diferenciación utilizan diversas técnicas de purificación celular como aislar clonas que presentan contracciones espontáneas.

Algunos estudios sólo toman en cuenta un marcador de diferenciación observado sólo por una técnica como RT-PCR, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o citometría de flujo para determinar la diferenciación a cardiomiocito. Otros miden varios marcadores con diferentes técnicas, observan cambios morfológicos compatibles con la diferenciación cardíaca e incluso observan contracciones espontáneas, pero en algunos estudios las condiciones de experimentación no han mostrado reproducibilidad en otros laboratorios. Hasta ahora, no existe un consenso del mejor protocolo de inducción a cardiomiocito a partir de las ASC (**Tabla 1**).

Tabla 1. Resumen de los diferentes protocolos de inducción a cardiomiocito de las células troncales derivadas de tejido adiposo (ASC).

Espece de procedencia de las ASC	Protocolo de inducción a la diferenciación a cardiomiocito	Resultados	Referencia
Conejos	5-Azacitidina 1,3,6 y 9 $\mu\text{mol/L}$ 12,24,48 y 72 horas de incubación + medio RPMI	[9 $\mu\text{mol/L}$] en 24 horas de incubación: Transformación del fenotipo en 20-30 % a cardiomiocito. Morfología: células binucleadas, agregados celulares y células redondas, contracción espontánea. Inmunotinción positiva para MHC, α -actina y TnI. No dediferenciación a los 2 meses.	[50]
Ratones C57B1/6N	Medio semisólido Methocult™ GF M3534	Morfología: células redondas y células tubulares. Células con estructuras similares a miotubos. Células contráctiles a los 11- 14 días (0.02-0.07 %). qRT-PCR: Expresión positiva de <i>Gata-4</i> , <i>Nkx2.5</i> , <i>Mlc-2v</i> , <i>Mlc-2a</i> , <i>Anp</i> , <i>Mef2C</i> , β - <i>Mhc</i> , <i>conexinas</i> . Microscopia electrónica: Miofilamentos, discos Z, estriación y sarcomeras organizadas. Potencial de acción similar a contracción atrial y ventricular. Respuesta farmacológica positiva a β -agonistas, β -bloqueadores y acetilcolina-agonistas.	[45]
Humano	Cocultivo con cardiomiocitos de rata + ASC marcadas con SLO (Texas Red)	Morfología: células multinucleadas 33 ± 7.4 Inmunofluorescencia: células estriadas, 81 % células positivas para α -actina, 20-25 % TnI, 11% desmina, 38 % conexina-43 y 5% contracción espontánea.	[62]
Humano	Placas con fibronectina y laminina y/o 5-azacitidina	Morfología: Células redondas y elongadas. RT-PCR: expresión positiva de <i>MLC-2α</i> (5-aza 1er semana). Expresión positiva <i>SERCA2α</i> (5-aza+laminina 1er semana). Inmunohistoquímica: Aumento de desmina, MLC-2 α , α -actina y troponina en cultivos con lamina y 5-aza+ laminina a las 3 y 5 semanas.	[65]
Ratón C57B1/6N	Methocult™ GF M3534 y medio BHK21	Morfología: células redondas, ramificadas y tubulares. Aislaron clones con contracción espontánea en medio BHK21	[44]

		<p>Citometría de flujo: 50% TnT sólo si son aisladas. (Protocolo con 3 pasos). Selección bajo microscopio invertido.</p> <p>Inmunofluorescencia: Células positivas para β-MHC, MLC-2v, α-MHC, TnT, α-actina y Titina.</p> <p>RT-PCR: Expresión positiva de <i>Mlc-2v</i>.</p>	
Rata Sprague-Dawley	TGF- β 1 [10ngml ⁻¹] durante 2 semanas	<p>Citometría de flujo: 16.78% \pm4.37 células positivas para MHC.</p> <p>Inmunofluorescencia: Pocas células positivas con MHC y α-Actina sarcomérica.</p>	[63]
Humano	<p>Comparación de 5 métodos:</p> <p>5-azacitidina [10μmol/L]</p> <p>MCM: DMEM Ig+ insulina+ transferrina+selenito de sodio+BSA+ac.</p> <p>Linoleico+ascorbato+dexametasona (3 semanas)</p> <p>Tricostatina A (TSA) [100ng/mL] durante 24 horas</p> <p>Cocultivo con cardiomiocitos indirecto (inserto poro 3.0 μm)</p> <p>Cocultivo directo con cardiomiocitos de rata (ASC marcadas con CM-Dil (Texas Red) 1:5 /1:10)</p>	<p>5-azacitidina no mostró cambios significativos.</p> <p>MCM: Coexpresión de Nkx2.5 y α-actina sarcomérica (27.2 % vs Control).</p> <p>TSA: RT-PCR 11 veces más expresado α-actina, también aumento de MHC, TNI y conexina 43, no contracción.</p> <p>Cocultivo indirecto: no diferenciación.</p> <p>Cocultivo directo: Coexpresión de Gata-4, Nkx2.5, α-actina, TnI y MHC. Contracción espontánea y gradiente de Ca²⁺.</p>	[52]
Humano	<p>Forbol acetato de miristato (PMA) [10nM] durante 24 horas</p> <p>Transfección de PKCδ</p>	<p>PMA: RT-PCR Expresión de <i>Mef2c</i>, <i>Gata-4</i> y β<i>Mhc</i>.</p> <p>Transfección de PKCδ: RT-PCR Expresión aumentada de <i>Gata-4</i>, <i>Mef2c</i>, <i>actina cardíaca</i>, <i>Troponina</i>, β<i>Mhc</i> y <i>conexina 43</i>.</p>	[66]
Ratón C57BL/6N	<p>DMEM con 20% Suero Neonatal Bovino (NBS)</p> <p><i>AdNkx2.5</i> y/o <i>Ad-α-actina</i> (adenovirus recombinante)</p>	<p>Diferenciación espontánea en 1.62% de las ASC con DMEM+20% NBS, células positivas en inmunofluorescencia para α-actina, MF20, cox45, CMHC, TNI, Nkx2.5. Contracción espontánea. 0.49% con gradiente Ca²⁺.</p> <p><i>AdNkx2.5</i> y/o <i>Ad-α-actina</i>: Aumenta el número de células diferenciadas a células similares a cardíacas.</p>	[68]
Rata Lewis	<p>Medio DMEM+ 5-azacitidina [5μM]</p> <p>Methocult™ GF M3534</p> <p>Methocult™ GF M3534 + 5-azacitidina [5μM]</p>	<p>No cambios morfológicos observados en cultivos con Methocult. 20% células grandes y 30% mortalidad celular cultivos 5-azacitidina.</p> <p>Inmunofluorescencia: Células positivas para conexina 43 y α-actina sarcomérica.</p>	[67]
Humano	Medio DMEM-F12 + 5-azacitidina [10 μ M] +bFGF	<p>No inducción cardiogénica.</p> <p>RT-PCR: Disminución de la expresión de <i>Mlc2v</i>, <i>Mlc2a</i>, <i>Nkx2.5</i>, β<i>Mhc</i>, <i>αMhc</i>, <i>Anp</i>, <i>Cox43</i>, <i>Troponina C</i>, <i>TnI</i> y <i>Mef2c</i>.</p>	[51]
Ratón C57Bl/6N	<p>ISX1 [20μM] por 4 días (molécula pequeña que activa el promotor del gen <i>Nkx2.5</i>) + Cocultivos con cardiomiocitos neonatos de rata Sprague-Dawley</p>	<p>ISX1 aumento la expresión de <i>Nkx2.5</i> 6 veces más respecto al control.</p> <p>Cocultivo +ISX1 Aumento la expresión de genes de diferenciación cardíaca tempranos y tardíos. <i>ANP</i> 9 veces más, <i>BNP</i> 3 veces más y <i>Troponina C</i> 15 veces más (RT-PCR).</p> <p>ISX-1 remodela la cromatina acetilando H3 y H4 del promotor del gen <i>Nkx2.5</i>.</p>	[64]

1.7 Estudios pre-clínicos y clínicos con células troncales

En estudios preclínicos (modelos *in vivo*), se ha mostrado la seguridad y beneficio del uso de las ASC indiferenciadas en modelos de infarto agudo de miocardio (IAM) y cardiopatía isquémica, en los cuales la constante ha sido que existe un incremento de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) y una disminución en el área de infarto, también se ha reportado un incremento de la neovascularización post-trasplante celular [69,70]. Algunos estudios han inducido previamente a la diferenciación de las ASC (*priming*) para aumentar el beneficio en los modelos de IAM en animales [44,69,70].

Evidencia adicional en modelos animales con IAM y cardiopatía isquémica han demostrado la seguridad, factibilidad y eficacia del uso de las SC. Un metaanálisis examinó 52 estudios pre-clínicos en modelos animales como perros, ovejas y cerdos tratados con diversos tipos SC como ESC, MSC, BM-MSC, ASC, HSC, CSC y células progenitoras endoteliales para investigar el efecto de la terapia celular en la enfermedad isquémica cardíaca. Los resultados mostraron que la terapia celular mejoró la FEVI un 7.5 % (6.2-8.9 %, IC95 %; $p < 0.001$) debido a un decremento significativo del volumen sistólico final. No hubo un incremento en la mortalidad después del tratamiento en el tipo de célula y en el tipo de infarto. El análisis de sensibilidad sugirió que, en el trasplante de las MSC, el infarto de la arteria descendente anterior, el modelo de oclusión crónica, un mayor número de células ($\geq 10^7$) y la inyección de células al menos una semana después del infarto tienen un efecto benéfico en la FEVI. No hubo diferencias entre el modelo animal y la vía de administración de las células [71].

En estudios clínicos, el trasplante de SC no cardíacas como progenitores de músculo esquelético y MSC de médula ósea ha resultado en un mejoramiento leve de la FEVI, pero se ha observado la inducción de arritmias [72]. Otros estudios han observado que existe un efecto sinérgico o paracrino que permite la angiogénesis o neovascularización [73,74]. Recientemente, *The Cochrane Collaboration* realizó un metaanálisis en el que se revisaron 33 ensayos clínicos controlados con un total de 1,765

participantes. El tratamiento con SC no mostró cambios estadísticamente significativos en la mortalidad (RR 0.70, IC 95 % 0.40 - 1.21) o en la morbilidad; sin embargo, los ensayos clínicos tenían un alto grado de heterogeneidad. En el seguimiento a corto plazo, la terapia con SC mejoró la FEVI significativamente (WMD 2.87, IC 95 % 2.00 - 3.73). La mejora en la FEVI se mantuvo en el seguimiento a largo plazo de 12 a 61 meses (WMD 3.75, IC 95% 2.57 - 4.93). También se observó que reduce los volúmenes finales sistólico y diastólico izquierdos y disminuye significativamente el tamaño del infarto a largo plazo. En estudios con resonancia magnética y angiografía ventricular izquierda, se encontró una correlación con el número de células infundidas y el efecto de la FEVI [2,75].

2. Planteamiento del problema

El corazón adulto tiene la capacidad de regenerarse de forma limitada, en este sentido, esta regeneración es insuficiente para compensar la muerte celular y el daño ocasionados por las enfermedades cardiovasculares [76]. Las enfermedades cardiovasculares tienen un alto impacto en la sobrevivencia de los pacientes, existiendo tratamientos sintomáticos, pero no curativos. Se han realizado diversos estudios con el fin de encontrar mejores tratamientos o curas para estas enfermedades, pero, hasta el momento, no se ha logrado encontrar ninguno que sea lo suficientemente eficaz y seguro.

El uso de las células troncales (SC) ha demostrado ser una alternativa que puede llegar a ser eficaz y segura para el tratamiento del infarto agudo de miocardio (IAM) [2]. Se ha observado tanto en modelos animales como en estudios clínicos que el trasplante de SC en IAM mejora la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) y disminuye el área de cicatriz ocasionada por el IAM. No obstante, se observan diferencias en las respuestas postrasplante celular de los pacientes, por ello se deben buscar nuevos abordajes para disminuir la variabilidad en la respuesta.

El objetivo principal de la terapia celular en la Cardiología es la regeneración y revascularización del miocardio para reestablecer la contractilidad sincrónica y conductividad bioeléctrica con miras a mejorar la función cardíaca sin generar efectos adversos en los pacientes. Para llegar a este objetivo, se han establecido diferentes abordajes para mejorar la respuesta a la terapia celular como la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos existentes, la conversión directa de los fibroblastos cardíacos en cardiomiocitos, la activación endógena de las células progenitoras cardíacas y la generación de cardiomiocitos derivados de SC *in vitro* para su posterior uso en la terapia celular.

La generación *in vitro* de cardiomiocitos se puede realizar con diversos tipos de SC del adulto como las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC), células troncales cardíacas (CSC) y células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC). El éxito de la generación *in vitro* de cardiomiocitos se mide por la eficiencia terminal de diferenciación, sin embargo, esta depende de las características de cada tipo de SC. Algunos estudios recientes han obtenido una eficiencia terminal de diferenciación a cardiomiocito inmaduro o a células similares a cardiomiocitos fetales hasta en un 97 % [6,77,78], no obstante, estos estudios utilizan iPSC, que tiene un alto índice tumorigénico [10,11], por lo que no se han realizado estudios clínicos hasta el momento.

Una propuesta es la generación de cardiomiocitos *in vitro* a partir de las ASC. Las ASC son una fuente de células troncales presente en los organismos adultos de fácil acceso [79]. La ventaja de las ASC en comparación a las iPSC es que el riesgo de generación de tumores a partir de ellas es mínimo (menor índice tumorigénico) [60], además de haber demostrado que su uso es seguro y eficaz en estudios clínicos, pero la eficiencia terminal de diferenciación a cardiomiocito generalmente es limitada y variable dependiendo del protocolo de inducción a la diferenciación cardíaca. Por esta razón, es importante identificar que método de diferenciación puede aumentar la eficiencia de diferenciación a cardiomiocito a partir de las ASC, lo cual nos permitiría obtener una cantidad suficiente de cardiomiocitos

para trasplante celular o para otras aplicaciones como los modelos de enfermedades genéticas en futuro.

3. Pregunta de investigación

¿Cuál es el mejor método de diferenciación para aumentar la eficiencia de diferenciación a cardiomiocito a partir de las ASC?

4. Justificación

Las SC son una fuente de células renovables que tienen la capacidad de diferenciación a diferentes estirpes celulares. La terapia celular se ha convertido en un recurso para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, donde se ha demostrado que el uso de las SC en los pacientes es seguro y eficaz, sin embargo, aún existen algunas limitaciones por resolver en el área clínica.

Para poder resolver estas limitaciones se tiene que regresar a la investigación básica. Existen diversas estrategias que pueden ayudar: una de ellas es la generación *in vitro* de cardiomiocitos. La generación *in vitro* de cardiomiocitos tiene como ventaja controlar el número o el subtipo de cardiomiocitos que en un momento dado se quisiera trasplantar.

Las ASC son una alternativa para la generación de cardiomiocitos *in vitro* ya que tienen como ventaja, su accesibilidad y su bajo índice tumorigénico en comparación a las ESC e iPSC. No obstante, la proliferación de las ASC diferenciadas a cardiomiocito es limitada y en muchos casos no se ha cuantificado la eficiencia de diferenciación con método cuantitativo que permita su comparación con otros métodos.

A fin de resolver dicha problemática, el presente estudio inducirá la diferenciación cardíaca de las ASC por medio de diversos métodos como factores de crecimiento, medios semisólidos, moléculas pequeñas o cocultivos con cardiomiocitos para obtener una alta eficiencia de diferenciación hacia cardiomiocito a partir de las ASC. La eficiencia de diferenciación a cardiomiocito será evaluada por medio del porcentaje de células

positivas para un marcador de diferenciación cardíaca tardío (Troponina T, TnT) con un método cuantitativo (citometría de flujo).

En un futuro, el conocimiento obtenido a partir del presente estudio podría ayudar a optimizar la eficacia terapéutica disminuyendo la variabilidad de respuesta a la terapia celular en estudios clínicos por medio de la generación de cardiomiocitos *in vitro* a partir de las ASC. Incluso, los cardiomiocitos generados a partir de estas células pueden ser utilizados en las diversas aplicaciones de las SC como estudios farmacológicos *in vitro* o modelos de enfermedad genética.

5. Objetivos

5.1 Objetivo principal

Aumentar la eficiencia terminal de diferenciación hacia cardiomiocito a partir de las ASC.

5.2 Objetivos específicos

1. Extraer y caracterizar por medio de citometría de flujo las ASC.
2. Inducir la diferenciación a cardiomiocito de las ASC empleando medios condicionados con factores de crecimiento específicos (BMP-4, VEGF, bFGF, NRG-1, HGF y/o IGF-1), adenovirus recombinantes que inhiben expresión del gen *A20*, medios semisólidos y/o cocultivos con cardiomiocitos.
3. Evaluar la eficiencia de diferenciación a cardiomiocito a partir de las ASC por medio de una herramienta cuantitativa (citometría de flujo).

6. Hipótesis

La combinación de protocolos de diferenciación cardíaca utilizado en las iPSC y protocolos de diferenciación cardíaca en las ASC (factores de crecimiento específicos del desarrollo cardíaco, cocultivos, moléculas pequeñas, entre otros) que semejen la cardiomiogénesis aumentará la eficiencia de diferenciación a cardiomiocito a partir de las ASC.

7. Material y Métodos

7.1 Diseño del estudio

El presente consiste en un estudio de medicina traslacional fase 0 (Investigación básica). El diseño del estudio es experimental en el que se consideraron 3 réplicas biológicas para el experimento de diferenciación cardíaca óptimo.

7.2 Extracción de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC)

Se utilizaron ratas macho o hembra de la cepa Wistar de 250 a 300 g de peso. Mantenido en bioterio en jaulas con libre acceso al agua y alimento, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas en estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para cuidado de animales de experimentación.

Se realizó eutanasia de la rata mediante CO₂. Se rasuraron las patas traseras, abdomen y región lumbar. En condiciones de asepsia y con material estéril, se realizó una incisión en la piel abdominal y se procedió a disecar el tejido adiposo subdérmico. El tejido adiposo extraído se colocó en un tubo de 50 mL con 30 mL de PBS 1x estéril (NaCl, 8g/L; KCl, 0.2g/L; Na₂HPO₄, 1.09g/L; KH₂PO₄, 0.26 g/L, pH 7.2) con una mezcla antibióticos y antimicótico al 3x (100 U/mL penicilina, 100 µg/ml estreptomina y anfotericina B).

En una campana de flujo laminar vertical, en condiciones estériles, se colocó el tejido adiposo extraído en una caja Petri con una cantidad mínima de PBS 1x + antibiótico-antimicótico al 1% (penicilina, estreptomina y anfotericina B, antibiótico-antimicótico, Gibco™) y se disgregó por medio de tijeras y bisturí hasta obtener una mezcla homogénea. Se colocó el tejido adiposo disgregado y homogeneizado en un tubo de plástico de 50 mL, a este se le agregó 10-15 mL de colagenasa tipo II al 0.1 % (Sigma) en medio DMEM (Gibco™) y se incubó con agitación constante a 37°C durante 45 a 60 minutos. Se agregó un volumen igual al material digerido de medio completo (DMEM bajo en glucosa + 10% SFB + antibiótico-antimicótico al 1%) para inactivar la digestión

de la colagenasa. Se filtró el material digerido con tela de chifón estéril en un frasco Erlenmeyer de 100 mL, el filtrado se cambió a un tubo de 50 mL y se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 10 mL de DMEM completo, se centrifugó a 2100 rpm por 6 min, se descartó el sobrenadante y se agregó 10 mL de buffer de lisis de amoníaco-cloruro-potasio (ACK) resuspendiendo el botón por pipeteo, se dejó reposar durante 5 a 10 min a temperatura ambiente para lisar los glóbulos rojos de la fracción estromal vascular (SVF). Para inactivar la reacción de lisis, se agregó 10 mL de DMEM completo y se centrifugó a 2,500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 10 mL de DMEM completo, se centrifugó a 2100 rpm por 6 min, se descartó el sobrenadante, repitiendo este último paso dos veces. Se resuspendió el botón con 10 mL de DMEM completo y la solución se pasó por un filtro de 100 μ m sobre un colador de acero inoxidable estéril a un tubo cónico nuevo de 50 mL. Se sembraron las ASC con DMEM completo en 8-10 cajas p100 y se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 37°C con 5 % CO₂.

7.3 Mantenimiento de los cultivos de las ASC

La proliferación de los cultivos se evaluó diario para observar el desarrollo de colonias visibles y descartar la presencia de microorganismos patógenos. Las colonias fueron visibles a partir de las 24 horas posterior a su extracción y siembra. La población las ASC en los cultivos celulares se evaluaron por su adherencia, morfología espiculada y su expansión a través de los pases. Se realizaron subcultivos cada vez que los cultivos presentaron una confluencia del 70 % al 80 %. La viabilidad celular de las ASC se midió con azul de tripano con un hemocitometro (cámara de Neubauer) o por citometría de flujo con ioduro de propidio.

7.4 Citometría de flujo

Se recolectaron las células de las cajas de cultivo empleando tripsina (1x) y se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min. El botón celular fue lavado con 1 mL de PBS al 0.8 % de albúmina bovina (BSA) y 0.02 % de azida de sodio. Se fijaron las células con

paraformaldehído al 4 % durante 10-15 minutos. Para los marcadores intracelulares, se permeabilizaron las células con Tritón X-100 al 0.1 % o saponina al 0.1 %; para marcadores intranucleares, se permeabilizaron las células con solución de Tritón X-100 al 0.5 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células con 1 mL de PBS mezclado con 0.8 % de albúmina sérica bovina (BSA) y 0.02 % de azida de sodio, se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 minutos. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 30-45 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos que se utilizaron para la caracterización de las ASC indiferenciadas fueron los siguientes: CD90, CD29, CD44, RT1A, CD73, CD106, CD105, CD45, CD34 y CD31. También se evaluaron otros marcadores de superficie relacionados con la diferenciación a cardiomiocito como CD106 (VCAM), Conexina-43 y SIRP α . Los marcadores de diferenciación cardíaca que se evaluaron tanto en las ASC indiferenciadas como en el seguimiento de los experimentos fueron los siguientes: Gata-4, Nkx2.5 , TnT, Cadena pesada de miosina (Myh) y el receptor sarcoplásmico de calcio (SerCa2). Como anticuerpos secundarios, se utilizaron anticuerpos acoplados a fluoróforos como isotiocinato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), Alexa488 o Alexa647 por 30-45 min a temperatura ambiente.

7.5 Inmunofluorescencia

Los cultivos de ASC indiferenciadas y los cultivos de los diferentes experimentos realizados para la diferenciación cardíaca se lavaron 3 veces con PBS 1X a 4°C, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron nuevamente los cultivos con PBS1X se permeabilizaron las células con solución de Tritón X-100 al 0.5 % durante 10 minutos; se lavaron nuevamente 3 veces con PBS 1X a 4°C. Se incubó con solución bloqueadora (Biocare Medical, Background Sniper) o con BSA 3 % por 10 minutos y se lavó 3 veces con PBS 1X a 4°C. Los anticuerpos primarios (CD90, Gata-4, Nkx2.5 , TnT, MyH, SerCa2, CD106, Conexina-43 y SIRP α) se incubaron durante 45- 60 minutos a temperatura ambiente (1:100-1:200). Las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X a 4°C y se incubaron los anticuerpos secundarios (1:200-1:300) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se agregó medio de montaje con DAPI (Santa Cruz ChemCruz™ Ultracruz™ Mounting Medium). Se obtuvieron las imágenes por medio de un microscopio confocal (Zeiss, LSM700).

7.6 Experimentos de diferenciación hacia cardiomiocito a partir de las ASC

Para la generación de cardiomiocitos *in vitro* a partir de las ASC, se probaron diferentes condiciones de cultivo para determinar cuáles de estas eran las óptimas.

Los experimentos de diferenciación cardíaca *in vitro* de las ASC de rata se realizaron basados en protocolos previamente reportados a los que se les hicieron modificaciones pertinentes o se combinaron. La descripción detallada de cada uno de los experimentos se realizó en la sección de resultados del presente documento. A grandes rasgos, se mencionan a continuación las condiciones de diferenciación de los cultivos de ASC utilizados:

1. Molécula pequeña (Cardiogenol-C) a diferentes concentraciones [47–49].
2. Medios condicionados con factores de crecimiento como FGF-2, HGF, IGF-1 y VEGF, BMP-4, y/o interleucinas como IL-6 que favorecen la diferenciación a cardiomiocito [39,40,80].
3. Transducción de un gen que inhiben la vía clásica de NF- κ B (A20) con adenovirus recombinantes aunado a factores de crecimiento (BMP-4, VEGF, IGF-1 y/o HGF) o interleucina 6 (IL-6) [81–83].
4. Cocultivos indirectos o directos con cardiomiocitos neonatales [52,62].
5. Medio semisólidos comerciales como Methocult™ M3134 y M3534 que contienen interleucinas como IL-6, IL-3, Stem Cell Factor, estos se combinaron con algunos factores de crecimiento antes mencionados [44,45,67].

De cada experimento se determinó el estado de diferenciación cardíaca por medio de marcadores de diferenciación cardíaca como Gata-4, Nkx2.5, TnT, Myh y/o SerCa2, por medio de citometría de flujo y/o inmunofluorescencia con microscopia confocal (protocolos previamente mencionados).

7.7 Construcción de plásmidos y generación de adenovirus recombinante A20

El adenovirus recombinante que sobreexpresa el gen A20 que se utilizó para inhibir la vía clásica de NF- κ B fue sintetizado siguiendo los siguientes pasos [81,84]: 1)

Subclonación y selección del gen *A20* para transferirlo al vector pshuttle, 2) linealización y transformación por recombinación homóloga para introducir el gen *A20* en la estructura del adenovirus ($\Delta E1$), 4) linealización de la estructura pAdEasy + *A20*, 5) Transfección de células HEK 293 con el adenovirus pAdEasy + *A20* para amplificación y posterior purificación. En experimentos preliminares, se demostró que una MOI (Multiplicity of Infection) de 100 es suficiente para lograr modificar los patrones de expresión y ver resultados [81,84].

Se realizaron cultivos de ASC por triplicado para poder realizar conteo celular y valorar la viabilidad a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la transducción con adenovirus recombinantes que contenían el gen *A20*. El conteo celular y la viabilidad se realizaron en una cámara de Neubauer empleando azul de tripano. Se observó la morfología celular de ambos cultivos con tinción de hematoxilina y eosina a las 72 horas post-transducción para observar cambios morfológicos relacionados al adenovirus recombinante.

La construcción y los experimentos relacionados con el uso de DNA recombinante fueron realizados siguiendo las guías internacionales de investigación para moléculas de DNA recombinante.

7.8 Extracción de cardiomiocitos neonatales

La extracción de cardiomiocitos neonatales se realizó con algunas modificaciones en el protocolo de Ehler y colaboradores [85]. Consistió en la extracción de corazones de ratas neonatas Wistar (1-5 días) por medio de decapitación de las ratas. Los corazones fueron cortados en pequeños fragmentos para su subsecuente digestión enzimática con tripsina al 0.1 % con agitación constante, cada 15 min se descartó el sobrenadante, a los 45 min se recuperó el sobrenadante hasta la disgregación total del tejido cardíaco. Se agregó medio HAM F10 con 10 % SFB para inactivar la digestión de la tripsina. Se centrifugó a 1,200 rpm por 5 minutos y se sembró en una botella T75. Se incubó a 37°C con CO₂ al 5 % durante una hora. Se recolectó el sobrenadante de la T75, se centrifugó a 1,200 rpm por 5 minutos y se sembró en una placa nueva.

7.9 Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como la media \pm desviación estándar de la media. Se utilizó una prueba t de Student o prueba de U de Mann-Whitney para comparar dos grupos. Las diferencias se considerarán como significativas con un $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Extracción y caracterización de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC).

Las ASC se aislaron del tejido adiposo subcutáneo mediante disgregación manual y digestión enzimática por medio de colagenasa. Las células obtenidas se sembraron en cajas de cultivo para su proliferación y mantenimiento. Los cultivos se vigilaron diariamente y se cambió el medio cada 2-3 días. Cuando los cultivos se encontraban al 70-80 % de confluencia, se utilizó tripsina para separar la células de la caja de cultivo y resembrarlas en placas nuevas (pases). Durante su proliferación se observó la morfología típica de las ASC, donde se observaron células alargadas similares a los fibroblastos (**Figura 3**).

Para confirmar que las ASC mantienen sus características fenotípicas después de su crecimiento en cultivo, se evaluaron y caracterizaron las ASC indiferenciadas por medio de citometría de flujo (FACScalibur Becton Dickinson). Se observó que las ASC extraídas por el método antes mencionado fueron positivas para los marcadores de superficie característicos de dichas células. El inmunofenotipo de las ASC se realizó con marcadores de superficie previamente establecidos para la caracterización. Se observó que las células ASC en el estado indiferenciado son positivas para CD90, CD29, CD44, RT1A, CD73, CD106 (VCAM) y son negativas para CD45, CD34 y CD31 (**Figura 4**).

También se valoró el porcentaje de células positivas para marcadores de diferenciación cardíaca en las ASC indiferenciadas, las células mostraron ser negativas para los marcadores de diferenciación cardíaca Gata-4, Nkx2.5, TnT, Tnl,

Myh y para el receptor sarcoplásmico de calcio SerCa2 (**Figura 5A**). Las células se marcaron con inmunofluorescencia observadas mediante microscopio confocal (Zeiss LSM700), tanto para marcadores de superficie como CD90, marcador característico de las células troncales. En las ASC, no se observaron células positivas para marcadores de cardiomiocitos como Nkx2.5, Myh y SerCa2 (**Figura 5B**).

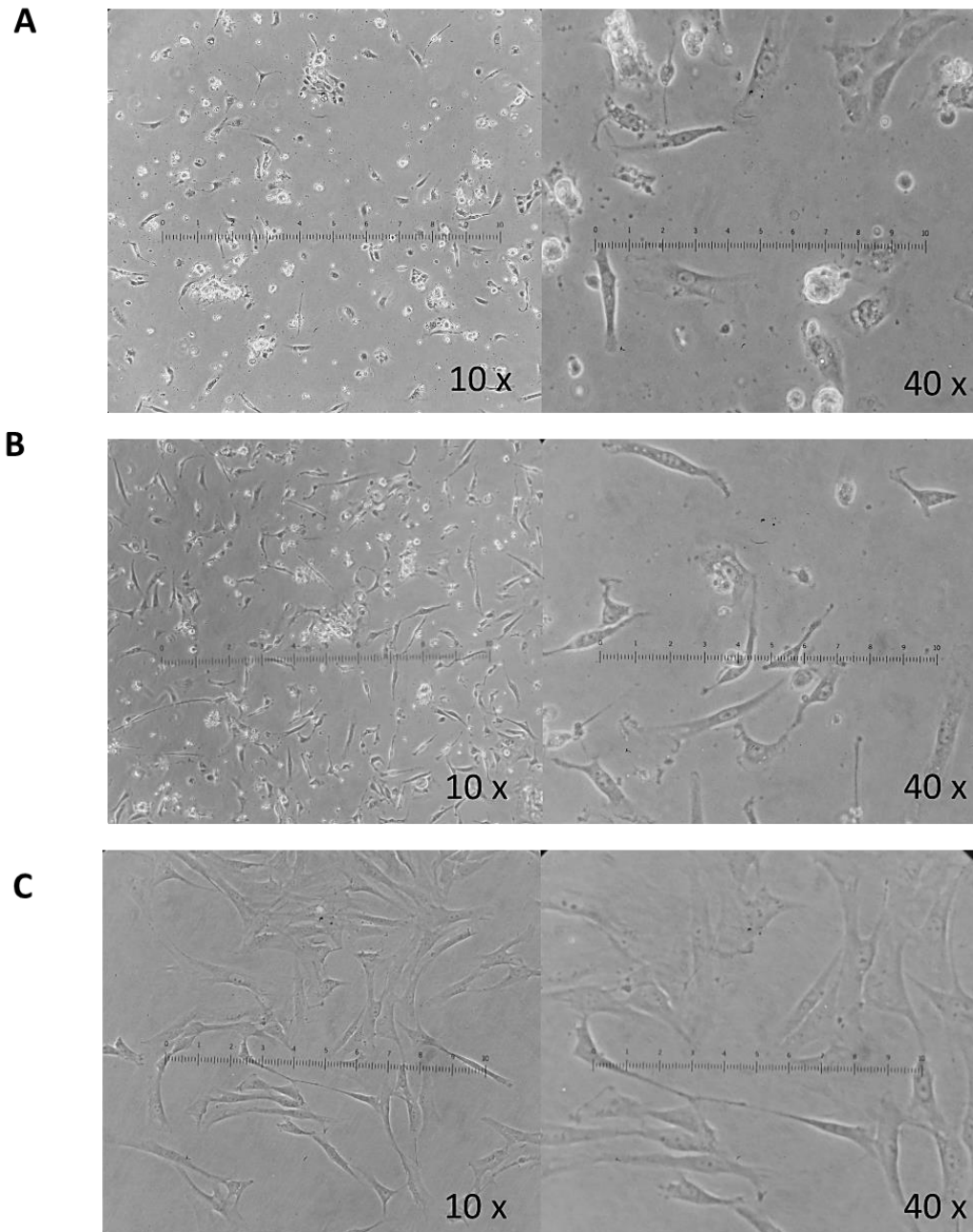


Figura 3. Micrografía de células troncales derivadas de tejido adiposo subcutáneo de rata (ASC) a las A) 24 horas, B) 48 horas y C) 5 días post-extracción, donde se observa células con morfología similar a fibroblasto.

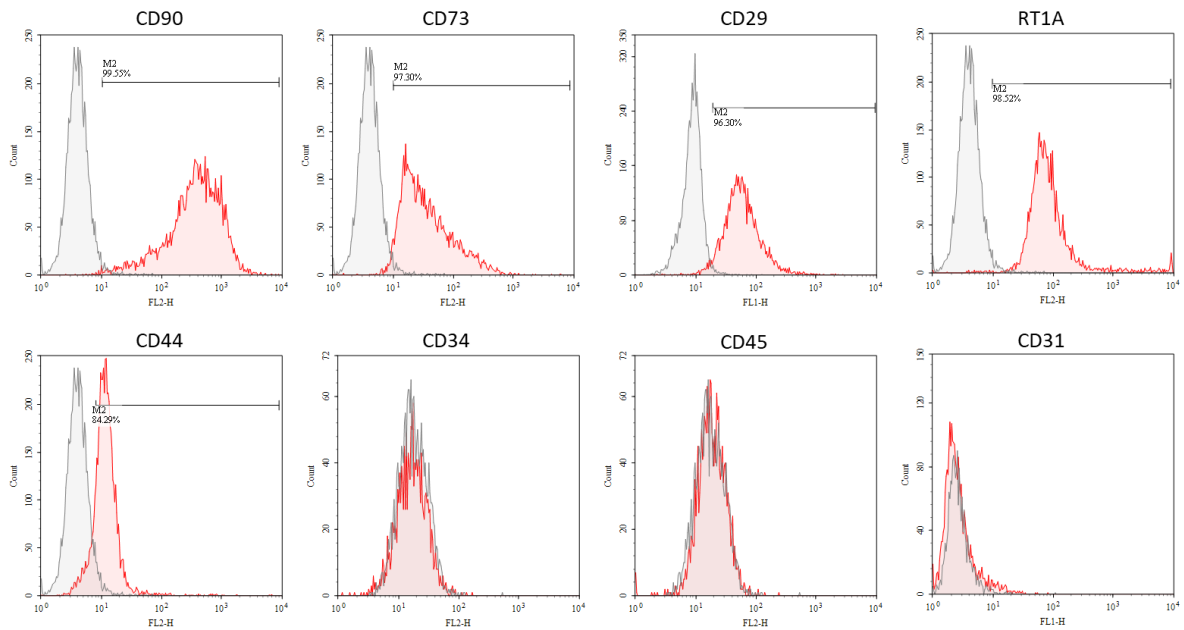
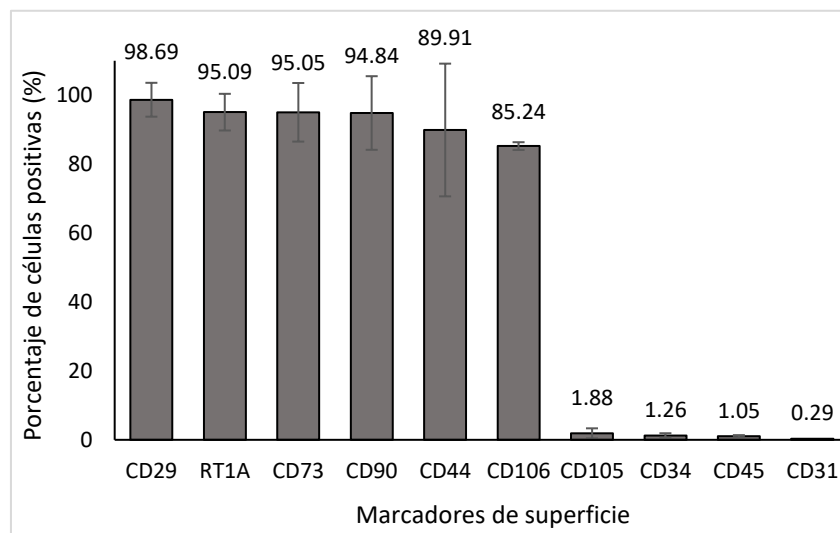
A**B**

Figura 4. A) Histogramas de citometría de flujo marcadores de superficie (CD90+, CD73+, CD29+, RT1A+, CD44+, CD34-, CD45- y CD31-) en color rojo e isotipo control en color gris. **B)** Gráficas del porcentaje de células positivas por citometría de flujo para los marcadores de superficie para la caracterización de las ASC indiferenciadas.

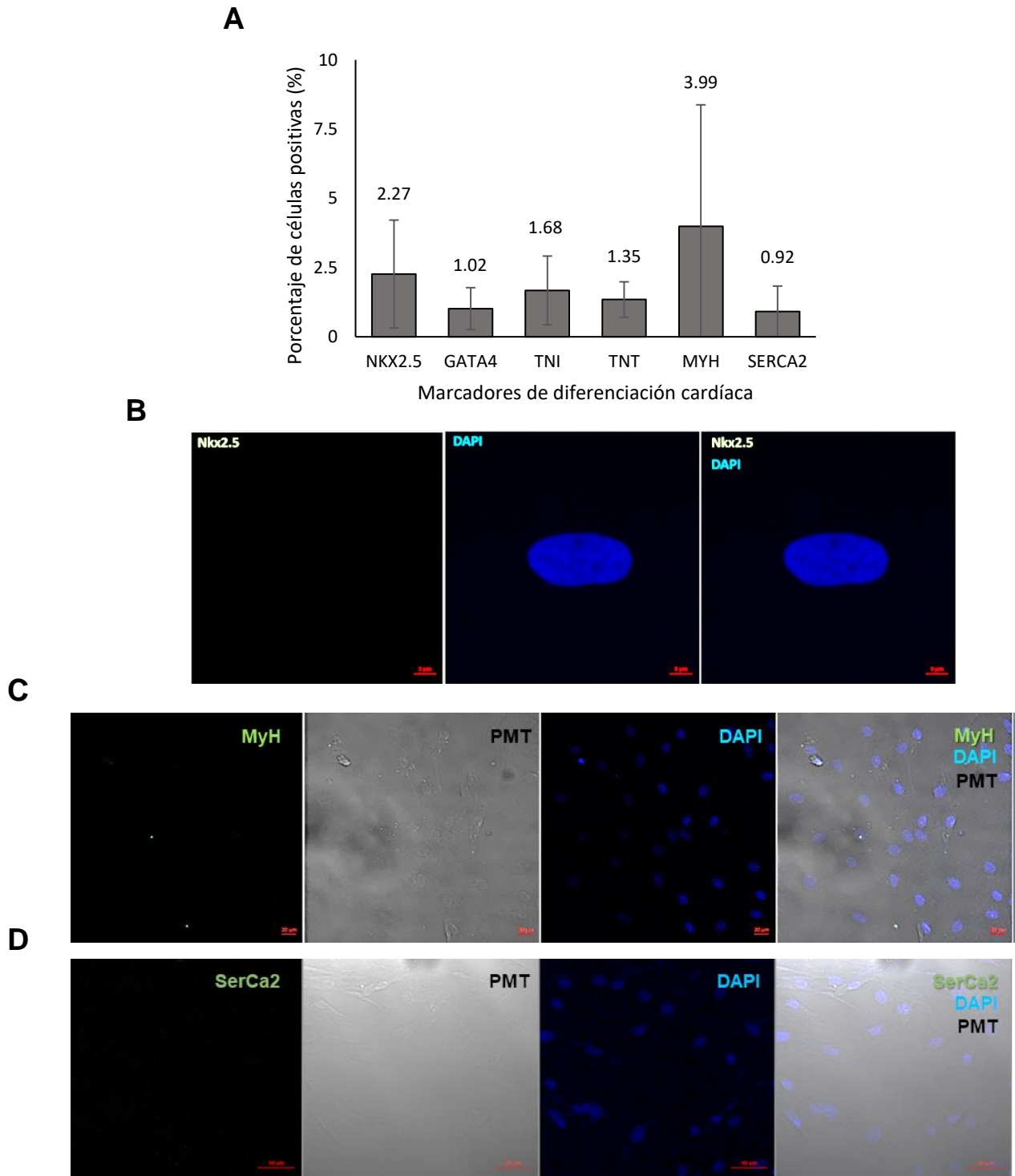


Figura 5. A) Gráficas del porcentaje de células positivas por citometría de flujo para los marcadores de diferenciación cardíaca Gata-4, Nkx2.5, Tnl, TnT, Myh y SerCa2. **B, C, D)** Micrografía de ASC indiferenciadas, obtenida con microscopio confocal de la para el marcador de diferenciación cardíaca temprana Nkx2.5 (**B**) y los marcadores tardíos Myh (**C**) y SerCa2 (**D**).

8.2 Experimentos de diferenciación cardíaca de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC).

Para aumentar la eficiencia terminal de diferenciación hacia cardiomiocito a partir de las ASC, se realizaron una serie de experimentos de inducción a la diferenciación hacia cardiomiocito, en los cuales, se probaron diferentes condiciones de cultivos como factores de crecimiento específicos del desarrollo cardíaco, interleucinas, adenovirus recombinantes, moléculas pequeñas, medios semisólidos comerciales y cocultivos con cardiomiocitos neonatales.

En total, se realizaron 10 protocolos de inducción a la diferenciación a cardiomiocito con diferentes condiciones de cultivo en las células ASC (Anexo, Tabla1). La eficiencia de diferenciación a cardiomiocito de cada protocolo de diferenciación (experimento) fue evaluada por medio de citometría de flujo para poder cuantificar el porcentaje de células positivas para troponina T (TnT) (marcador de diferenciación cardíaca tardío). También, se evaluó la morfología celular en los cultivos durante el experimento para valorar cambios compatibles con un cardiomiocito.

Los experimentos realizados mostraron resultados variables en la eficiencia de diferenciación a cardiomiocito a partir de las ASC. En la **tabla 2**, se muestran la eficiencia de diferenciación obtenida en diferentes protocolos realizados. Los experimentos que mostraron una mayor cantidad de células positivas para TnT, cambios morfológicos y presencia de proteínas cardíacas (marcadores de diferenciación cardíaca como Gata-4, TnT y Myh) fueron los experimentos en los que se incluyeron factores como BMP-4, VEGF, IL-6, IL-3 y medios semisólidos (Methocult™) (Anexo 1) (Ibarra-Ibarra, BR, Stem cell International, 2019). Los experimentos con moléculas pequeñas, adenovirus recombinantes/factores de crecimiento/IL6, así como los experimentos con cocultivos indirectos de cardiomiocitos neonatales, mostraron aumento de algunos marcadores cardíacos, pero no se observaron cambios morfológicos compatibles con un cardiomiocito tan evidentes como en los observados con los medios semisólidos (células binucleadas, elongadas, patrón de alineamiento y formación de estructuras similares a rosetas) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos de los experimentos de diferenciación cardíaca.

	Condiciones del cultivo	Días	Eficiencia de diferenciación a cardiomiocito (% Troponina T)	Observaciones
Molécula pequeña	Cardiogenol C	15	5.2 %	No se observaron cambios significativos
Adenovirus recombinantes + Factores de crecimiento + IL6	AdA20 BMP4+VEGF+IL6+ IGF1+HGF	14	10.3 %	Células rectangulares binucleadas/alineamiento celular
Cocultivo con cardiomiocitos	Cocultivo indirecto	14	16.7 %	Células alargadas/patrón de alineamiento IF (7d): Nkx2.5-/MyH-/TnT-
Medio semisólido a base de metilcelulosa + Factores de crecimiento e Interleucinas	M3134 BMP4+VEGF+IL6	14	18.3 %	Células rectangulares a partir del día 5.
	M3534 (IL3, IL6 y SCF) BMP4+VEGF	15	44 %	Morfología compatible con cardiomiocito. IP (21d): Gata4+/TnT+/MyH+/SerCa2+ [86]

8.2.1 Diferenciación cardíaca con moléculas pequeñas: Cardiogenol C

La diferenciación a cardiomiocito se indujo por medio de una molécula pequeña denominada cardiogenol C (Cdg-C). El Cdg-C es una diaminopirimidina que induce la cardiomiogénesis en las ESC y en células progenitoras del bulbo piloso (CD34+K15+), aumentando principalmente los niveles de expresión de Gata-4, Mef2, Nkx2.5 y la cadena pesada de miosina (MHC)[47–49]. El Cdg-C actúa a nivel de la vía de Wnt/ β -catenina funcionando como un activador, disminuyendo los niveles de Kremen-1 y Dkk-1, ambos inhibidores de la vía de Wnt/ β -catenina [47–49]. Se probaron 3 concentraciones de Cdg-C previamente reportadas en la literatura [1 μ M], [5 μ M] y [10 μ M] [47–49] (**Anexo 2, Figura 1A**).

El porcentaje de células positivas para 4 marcadores de diferenciación cardíaca (Gata-4, TnT, Myh y SerCa2) se analizó por medio de citometría de flujo. Los porcentajes fueron muy similares entre las 3 concentraciones. La mejor

condición fue la de 5 μ M obteniendo Gata- 4 (2.25 %), TnT (5.22 %), Myh (7.44 %) y SerCa2 (4.2 %) (**Anexo 2, Figura 1B**).

En las tres concentraciones evaluadas, no se observaron cambios morfológicos significativos (**Figura 6**).

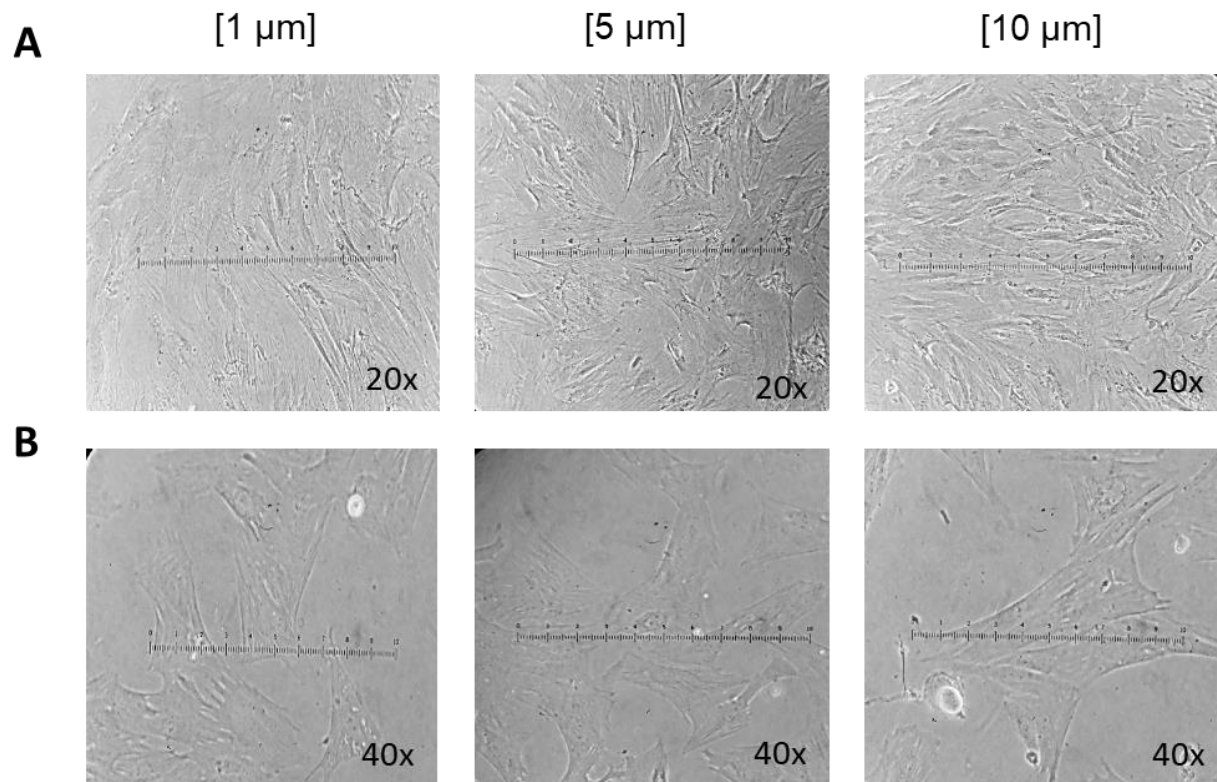


Figura 6. Micrografía de ASC inducidas a la diferenciación cardíaca con Cardiogenol C con diferentes concentraciones en los días 10 (**A**) y 15 (**B**).

8.2.2 Diferenciación cardíaca con factores de crecimiento, interleucinas y adenovirus recombinantes: AdA20 + BMP-4 + VEGF + IL-6 + IGF-1 + HGF

En un estudio previo [81], observamos que la inhibición de la vía clásica de NF- κ B por medio de un adenovirus recombinante que contenía el gen *A20* (*Ad-A20*) que codifica para la deubiquitinasa *A20* [87], parecía inducir la diferenciación de las ASC aunado a los factores de crecimiento como BMP-4 [10ng/mL]+ FGF-2 [81].

A diferencia del experimento en el estudio previo, en este experimento se utilizó una concentración mayor de BMP-4 [30 ng/mL], además de estimular las ASC con el factor de crecimiento VEGF en lugar de estimular con FGF-2. También se adicionó una interleucina (IL-6) con potencial cardiogénico ya que, según un estudio previo, dicha interleucina aumenta los niveles de Gata-4, Nkx2.5, TnT y conexina 43 por medio de la modulación de las vías de señalización como PI3K/Akt/PTEN/PKC ζ [75].

Para dicho experimento se consideraron varias combinaciones de factores de crecimiento (BMP-4, VEGF, IGF-1 y/o HGF), IL-6 y *Ad-A20*, como se muestra en en el **Anexo 2, Figura 2A**. Se observó la expresión de Nkx2.5 entre 13.65 – 34.44 %, obteniendo el valor más alto de Nkx2.5 en los cultivos con (*Ad-A20* + BMP-4 + VEGF + IGF-1 + HGF + IL-6). Gata-4 también mostró valores entre 9.71 – 12.99 %, siendo el porcentaje más alto para la condición (*Ad-A20* + BMP-4 + VEGF + IL-6). El porcentaje de células positivas para TnT fue menor al 10 % en las diferentes condiciones de cultivo, el mayor porcentaje se observó en el cultivo estimulado con *Ad-A20* + BMP-4 + VEGF + IL-6 (**Anexo2, Figura 2B**). A los 21 días, los porcentajes de células positivas para los marcadores de diferenciación cardíaca analizados disminuyeron en todas las condiciones, siendo los valores de Gata-4, Nkx2.5 y TnT para la condición con *Ad-A20* + BMP-4 + VEGF + IL-6 de 2.28 %, 6.03 % y 2.91 %, respectivamente (**Anexo 2, Figura 2C**). Las células mostraron cambios evidentes a los 21 días en comparación con el control. Se observaron células binucleadas con un patrón de alineamiento de células de forma tubular y con núcleo central similares a cardiomiocitos en las siguientes condiciones: BMP-4 + VEGF + IL-6 y *Ad-A20* + BMP-4 + VEGF + IGF-1 + HGF + IL-6 (**Figura 7**).

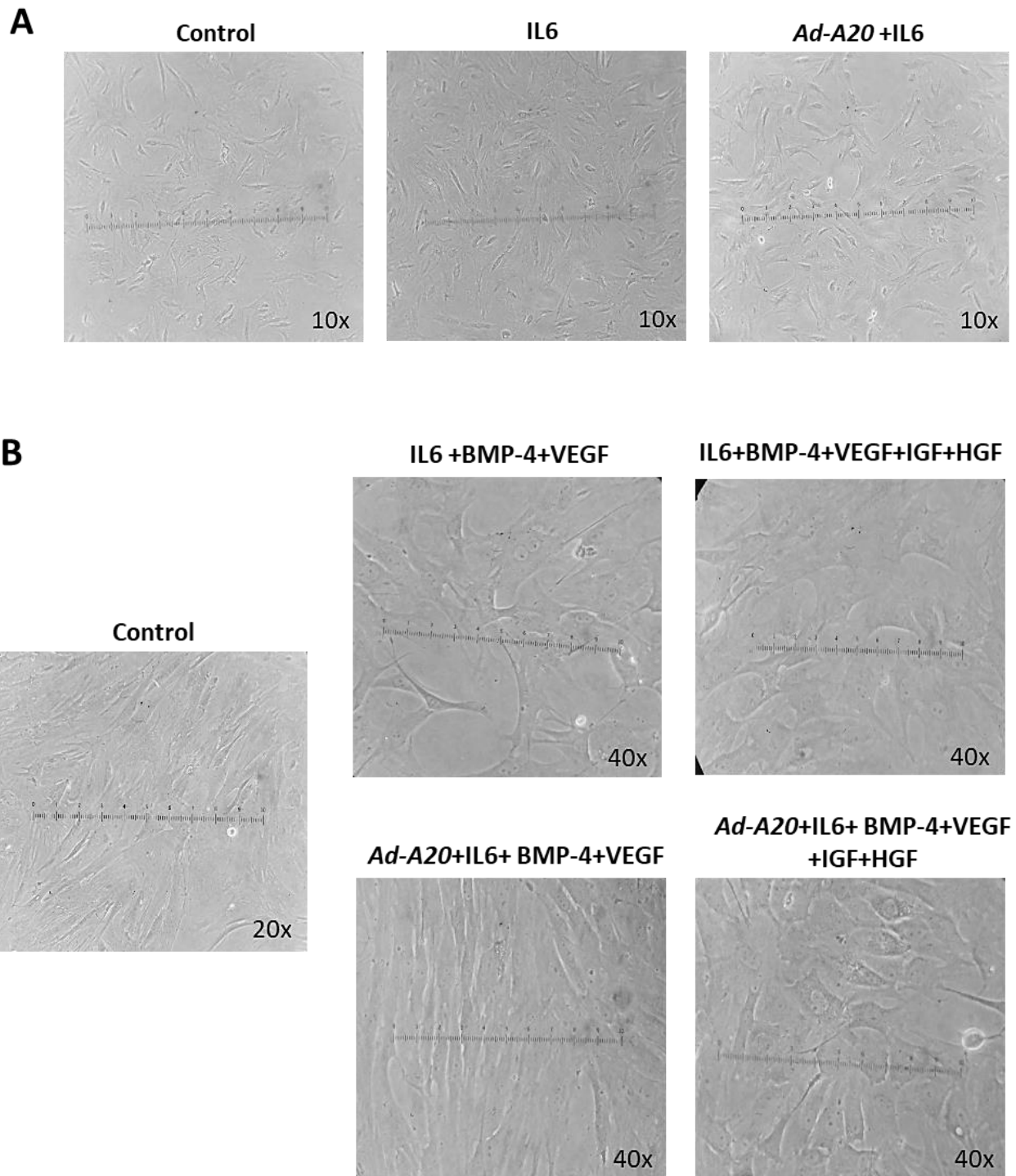


Figura 7. Micrografía de los cultivos de ASC inducidas a la diferenciación cardíaca con al día 1 (**A**) condición control, IL-6 y Ad-A20 + IL-6, y cultivos al día 21 de las diferentes condiciones (**B**).

8.2.3 Diferenciación cardíaca con cocultivos de cardiomiocitos: Cocultivo indirecto

Se valoró el uso de cocultivos de cardiomiocitos neonatales y ASC. Previamente, se ha reportado el uso de cocultivo indirectos para inducir la diferenciación a cardiomiocito [52]. Se extrajeron los cardiomiocitos de ratas neonatas de 1 a 5 días de nacidas por medio de tripsina (**Anexo 2, Figura 3**). En los cultivos de cardiomiocitos neonatales, se observaron células alargadas, “*apantalonadas*” o en forma de “Y”, con estructuras miofilamentosas, células binucleadas, fusión celular y células esféricas refringentes.

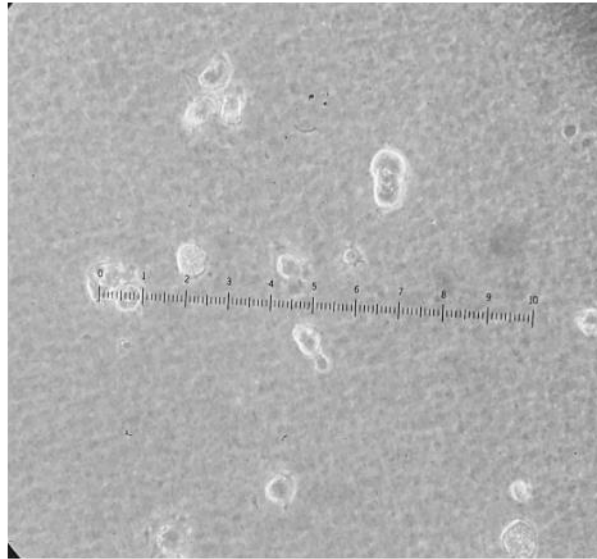
A las 24 horas de su extracción, se observó contracción de los cardiomiocitos neonatales de rata. Se demostró por inmunofluorescencia que los cardiomiocitos neonatales presentaban marcadores de diferenciación cardíaca como Gata-4, Nkx2.5, Myh y TnT. Los cardiomiocitos neonatales fueron sembrados en insertos de plástico con una membrana con un poro de 0.4 μm (Inserto Millicell® CM Millipore o Inserto PET Millipore 24 well Millicell® Hanging Cell Culture Insert) para crear un cocultivo indirecto, el cual no permite el paso de los cardiomiocitos hacia el cultivo de ASC, esto con el fin de obtener sustancias o moléculas secretadas por los cardiomiocitos que ayuden a la diferenciación (**Anexo 2, Figura 3**).

Los cardiomiocitos neonatales dentro del inserto formaron esferas de cúmulos de células. Las ASC en cocultivo, a partir del día 5-7, mostraron un patrón de alineamiento y células alargadas, no se observaron contracciones espontáneas (**Figura 8**). Al día 7, no se observaron marcadores cardíacos como Gata-4, Nkx2.5 y TnT por inmunofluorescencia (**Anexo 2, Figura 3C**).

Al día 14, se analizó el porcentaje de células positivas para los marcadores Gata-4 (5.85 %), Nkx2.5 (24.64 %), TnT (16.67 %) y Myh (9.18 %) para el cocultivo (**Anexo 2, Figura 3D**). El porcentaje obtenido mostró una alta eficiencia de diferenciación a

células similares a cardiomiocito, sin embargo, trasladar el uso de cocultivos al área clínica sería imposible por requerir la extracción de cardiomiocitos.

A



B

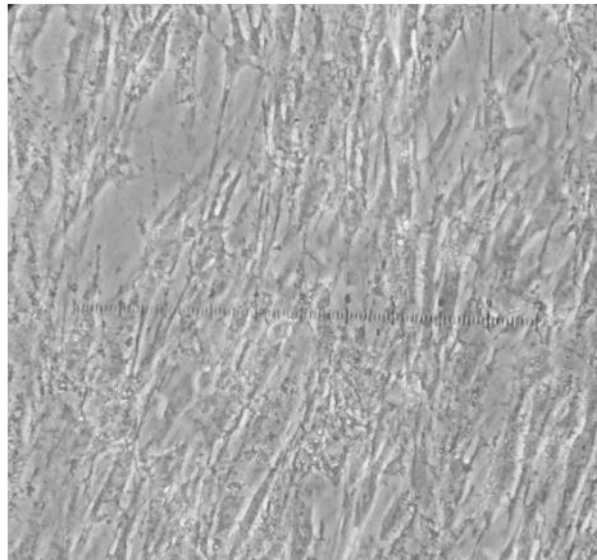


Figura 8. Micrografía de cardiomiocitos en un inserto en el día 8 (**A**) y ASC inducidas a la diferenciación cardíaca por medio de cocultivo indirecto con cardiomiocitos (**B**).

8.2.4 Diferenciación cardíaca con factores de crecimiento, interleucinas y medios semisólidos a base de metilcelulosa: BMP-4 + VEGF + Methocult™ M3134 + IL-6

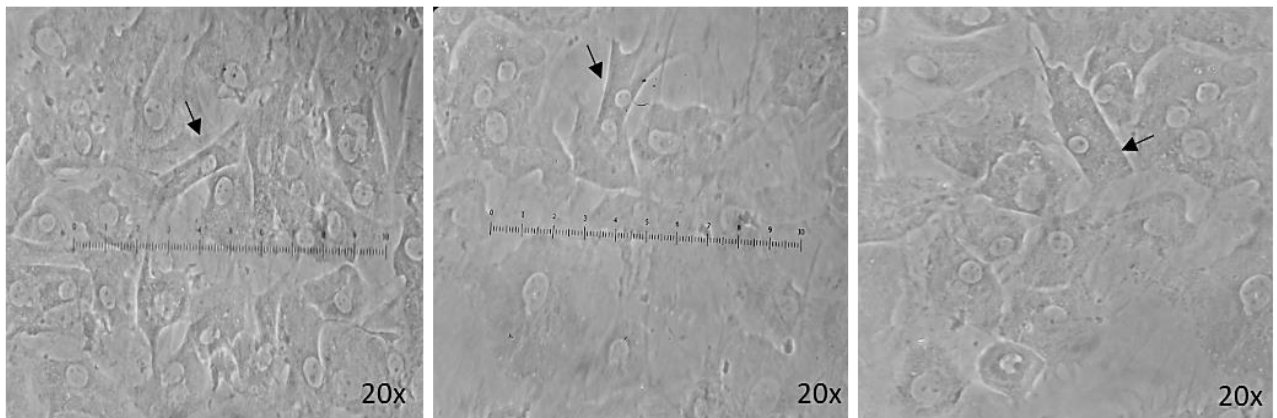
En el experimento # 9, se probaron 4 condiciones de cultivo para la diferenciación a cardiomiocito y se utilizó un medio semisólido comercial Methocult™ M3134 (STEMCELLS™ Technologies) (**Anexo 2, Figura 4A**). El Methocult™ M3134 contiene IMDM y metilcelulosa al 1 %, no contiene otros factores o interleucinas, razón por la que se agregó IL-6.

Las células se analizaron por citometría de flujo a los días 30 y 45 del experimento, un marcador de diferenciación temprana (Nkx2.5) y un marcador de diferenciación tardía (Myh) (**Anexo 2, Figura 4B**). A los 30 días, se observaron porcentajes de células positivas para Nkx2.5 entre 13.2 % y 24.25 %, para la cadena pesada de miosina (Myh), se observaron valores entre 10.55 % y 22.73 %, obteniendo el valor más alto en ambos marcadores las ASC inducidas con M3134 + BMP-4 + VEGF + IL-6 (**Anexo 2, Figura 4B**). A los 45 días, se observó una disminución del porcentaje de células positivas para Nkx2.5 y Myh, sin embargo, los valores más altos continuaron siendo aquellas ASC inducidas con M3134 + BMP-4 + VEGF + IL-6 con 8.8 % de Nkx2.5 y 16.7 % para Myh.

Las células mostraron cambios evidentes en la morfología celular a partir del día 10. A los 35 días se observaron células con estructuras similares a miofilamentos, células binucleadas, células con formas rectangulares “*apantalonadas*” similares a cardiomiocitos, a pesar de dichas características no se observaron contracciones espontáneas (**Figura 8**).

A los 40 días, se demostró por inmunofluorescencia la presencia de células positivas para Nkx2.5 y Myh en la condición M3134 + BMP-4 + VEGF+ IL-6 (**Figura 9**).

A



B

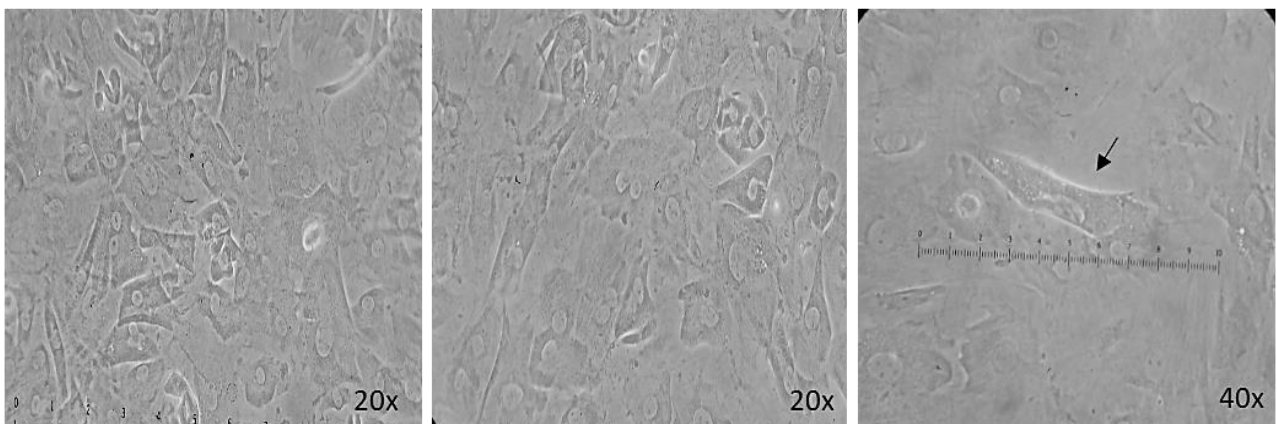
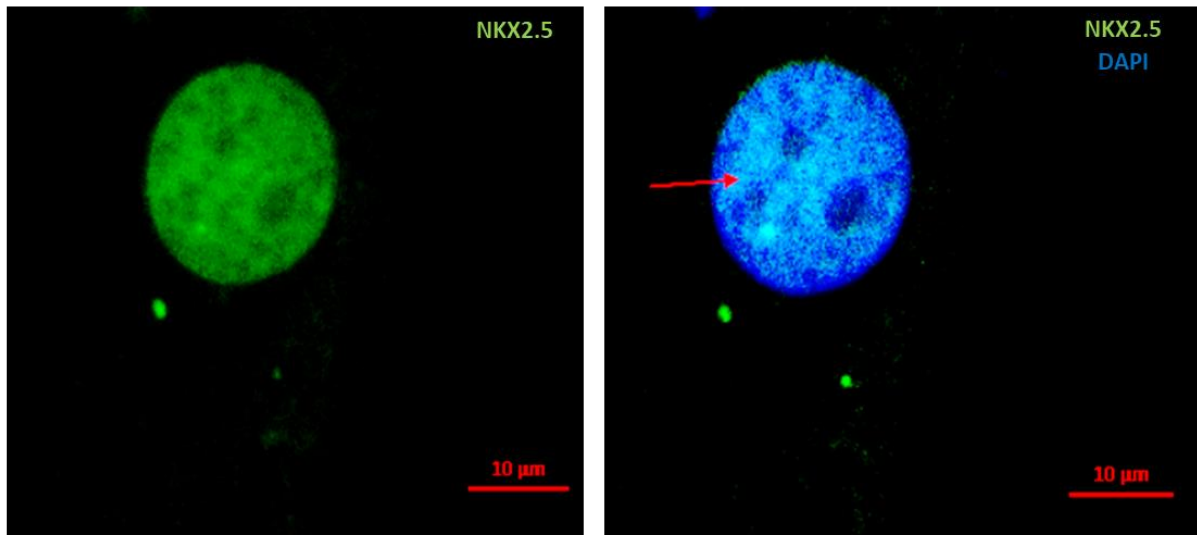


Figura 8. Micrografía de ASC inducidas a la diferenciación al día 35 de las diferentes condiciones de cultivo (M3134 +IL-6 +BMP-4 **(A)** y M3134 +IL-6 +BMP-4 + VEGF **(B)**) donde se observan células rectangulares “apantalonadas” y células binucleadas con morfología similar a cardiomiocito.

A



B

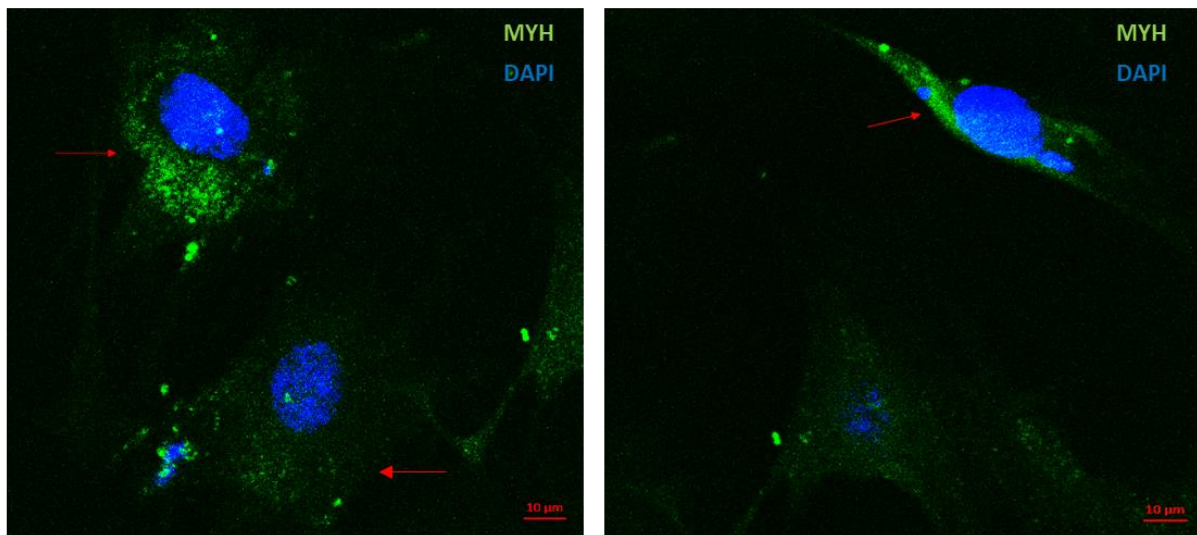


Figura 9. Micrografía de ASC inducidas a la diferenciación cardíaca con M3134 +IL-6 +BMP-4 + VEGF al día 40 para el marcador de diferenciación cardíaca temprano Nkx2.5 y el marcador de diferenciación cardíaca tardío Myh. Se observan células positivas tanto para Nkx2.5 (**A**) como para Myh (**B**). Micrografía obtenida con microscopio confocal, escala 10 µm.

8.2.5 Diferenciación cardíaca con factores de crecimiento y un medio semisólido a base de metilcelulosa con interleucinas: BMP-4 + VEGF + Methocult™ M3435

El uso de factores de crecimiento que inducen la cardiomiogénesis (BMP-4 y VEGF) aunado al uso de medios semisólidos basados en metilcelulosa (Methocult M3534) que contienen interleucinas (IL-3 e IL-6) con potencial cardiogénico mostró una buena eficiencia de diferenciación hacia células similares a cardiomiocito. Los resultados referentes a la dicha diferenciación se muestran en el anexo 1 (Artículo publicado en la revista Stem Cell International [86]).

A grandes rasgos se observó un aumento de la eficiencia de diferenciación a células similares a cardiomiocito de 39-44% a los 15 días en 3 réplicas biológicas y presencia de marcadores de diferenciación cardíaca como Gata-4, TnT, MyH y SerCa2 a los 21 días [86]. También se buscaron posibles marcadores de superficie que permitieran la separación de las células similares a cardiomiocito derivadas de las ASC del resto de células sin marcadores cardíacos. Se buscaron posibles marcadores de superficie previamente reportados en los cardiomiocitos derivados de iPSCs y ESCs como SIRP- α y CD106 (VCAM-1), sin embargo, estos marcadores no pueden ser utilizados para la purificación de las células similares a cardiomiocito derivadas de las ASC, ya que los marcadores de superficie (SIRP- α y CD106 (VCAM-1)) se encuentran presentes en el estado indiferenciado de las ASC [86].

9. Discusión de los avances obtenidos

Las SC son una fuente de células renovables que pueden dar lugar a diversos tipos celulares, lo cual hace atractivo su uso para la regeneración de tejidos. El presente protocolo tuvo como objetivo principal aumentar la eficiencia de diferenciación a cardiomiocito de las ASC ante la heterogeneidad de los resultados obtenidos en los diferentes protocolos de diferenciación previamente descritos en la literatura. Para determinar cuál es el método de diferenciación a cardiomiocito a partir de las ASC con mayor eficiencia, se probaron diferentes experimentos de diferenciación que incluían el uso de moléculas pequeñas, factores de crecimiento, adenovirus recombinantes, cocultivos con cardiomiocitos, medios semisólidos comerciales, interleucinas o la combinación de estos.

En el presente estudio, observamos que el uso de medios semisólidos comerciales como Methocult™ M3134 suplementado con IL-6 y Methocult™ M3534 (que contiene interleucinas (IL-3 e IL-6) cardiogénicas) en combinación con factores de crecimiento críticos de la cardiomiogénesis (BMP-4 y VEGF) presentaban cambios evidentes en la morfología celular, observando células de formas rectangulares o tubulares, células redondas, núcleos centrales, patrón de alineamiento celular, células con estructuras similares a miofilamentos y células binucleadas, similares a la morfología de un cardiomiocito. Ambos protocolos mostraron una alta eficiencia de diferenciación a células similares a cardiomiocito, no obstante, la eficiencia de diferenciación fue mayor en los cultivos con Methocult™ M3534 en combinación con factores de crecimiento críticos de la cardiomiogénesis (BMP-4 y VEGF) hasta un 44% de células positivas para TnT (marcador de diferenciación cardíaca tardío) en el día 14 y la presencia de marcadores de diferenciación cardíaca como Gata-4, TnT, Myh y SerCa2 al día 21.

Previamente, se había descrito el uso del Methocult™ M3534 y el M3134 (suplementado principalmente IL-6 y IL-3) en la diferenciación a células similares a cardiomiocitos a partir de las ASC [44,45,67]. Los resultados obtenidos en los

estudios anteriores fueron controversiales, ya que en el estudio de Carvalho y colaboradores no se encontraron cambios en la morfología tan evidentes como los observados en los otros dos estudios previos [44,45]. A diferencia de los protocolos de diferenciación con medios semisólidos complementados con interleucinas, el presente estudio utilizó la combinación de estos medios semisólidos que contienen IL-3 e IL-6 aunado a dos factores de crecimiento (BMP-4 y VEGF) críticos para la cardiomiogénesis, aumentando el número de células positivas para TnT hasta en un 44% sin la necesidad de separar clonas como el caso del estudio de Leobon y colaboradores [44]. A diferencia de los estudios previos, no se observaron contracciones espontáneas que nos permitiera hacer un análisis funcional.

La cardiogénesis es un proceso sumamente complejo que depende de la interacción de varias vías de señalización que, a su vez, dependen de la expresión de genes en tiempo y espacio siendo un proceso altamente regulado. Por esta razón, es de suma importancia considerar la combinación de factores de crecimiento y moléculas pequeñas que promuevan genes relacionados con la cardiomiogénesis. El factor de crecimiento BMP-4 utilizado en el protocolo de diferenciación con mayor eficiencia es una proteína de la superfamilia del factor de crecimiento de transformación β (TGF- β) que tiene un papel fundamental en el desarrollo embrionario cardíaco, promoviendo la especificación del primer campo de desarrollo cardíaco, comprometiendo a las células a un mesodermo cardíaco [4,40]. El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) también utilizado en el protocolo de diferenciación con mayor eficiencia, es un factor de crecimiento que, aunque juega una papel importante en la angiogénesis, ha sido utilizado en la diferenciación cardíaca activando AKT [39]. Cabe mencionar que ambos factores de crecimiento se utilizaron en las concentraciones utilizadas previamente descritas para la diferenciación de las iPSC a cardiomiocitos [39], por lo que tanto las iPSC como las ASC requieren de los mismos estímulos para su diferenciación a cardiomiocito.

En este trabajo buscamos aumentar aún más la eficiencia de diferenciación, aislando la población de células que presentaban características similares a cardiomiocito y células cTnT positivas con marcadores de superficie que

previamente se habían propuesto para purificar los cardiomiocitos derivados de las iPSC [46,78], como VCAM-1 y SIRP α [46,88]. Determinamos por citometría de flujo dichos marcadores en las células indiferenciadas donde se mostró que las ASC presentan células positivas en más de 80 % con VCAM-1 y SIRP α , lo que dificultaría su aislamiento.

Por otro lado, observamos que el uso de una sola molécula pequeña en este caso Cardiogenol C no aumenta la eficiencia de diferenciación en más de 6%. Este resultado es concordante con estudios previos realizados con una sola molécula pequeña como la 5-azacitidina, donde no se ha evidenciado diferenciación [51]. Sin embargo, por el mecanismo de acción del Cardiogenol C, se podría utilizar en combinación con otros factores críticos como coadyuvante o inductor de la diferenciación en los primeros 2 días, como se ha visto en protocolos de diferenciación de iPSC [89].

A pesar de observar un porcentaje aceptable de células positivas para TnT y otros marcadores cardíacos en los cultivos con adenovirus recombinantes y cocultivos, el uso de los cocultivos para la generación de cardiomiocitos es limitado porque el proceso requiere de cardiomiocitos y no permitiría la escalabilidad para su uso en terapia celular en un futuro. Además, la combinación de adenovirus recombinantes con factores de crecimiento no mantiene el estado diferenciado posterior al día 14.

A diferencia de otros protocolos de diferenciación cardíaca en las ASC, el uso de factores de crecimiento críticos de la cardiomiogénesis aunado a un medio semisólido que contiene interleucinas cardiogénicas parece favorecer y hacer más eficiente la diferenciación a células similares a cardiomiocito a partir de las ASC. Considerar el uso de protocolos similares a los utilizados en la diferenciación cardíaca de las iPSC puede ser de utilidad para diferenciar otras SC como las ASC. La eficiencia de diferenciación y la presencia de marcadores observada nos habla de que las ASC pueden diferenciarse a células similares a cardiomiocito inmaduro,

sin embargo, falta que complete su maduración, probablemente esta pueda ser completada *in vivo*.

9.1 Nuevas hipótesis y perspectivas

Para poder trasladar el conocimiento generado en este estudio al área clínica, es necesario realizar estudios en las células humanas. En caso de que los resultados sean similares, es necesario identificar marcadores de superficie que permitan purificar o aislar aquellas células con características similares a cardiomiocito a partir de las ASC. Esto nos permitiría realizar estudios en modelos animales con IAM o insuficiencia cardíaca para evaluar si es posible alcanzar la maduración de dichas células *in vivo*. Además, nos permitiría evaluar su efectividad y seguridad en estas patologías. Si estos resultados son favorables, se podría iniciar su traslado a la fase clínica (T1: Medicina traslacional). Por otro lado, purificar estas células diferenciadas nos permitiría estudiar su transcriptoma para poder compararlo con cardiomiocitos o cardiomiocitos derivados de iPSC, además de determinar qué vías de señalización y/o procesos biológicos están implicados en el proceso de diferenciación a partir de las ASC.

Otra opción para la obtención de una población mucho más pura de células similares a cardiomiocito es aislar desde un inicio una clona que forma parte de las ASC. Esta clona fue recientemente descrita y se ha demostrado que dichas células poseen propiedades pluripotenciales a las cuales se les denominó células MUSE. Las células MUSE, por sus siglas en inglés **M**UIti-lineage differentiating **S**tress **E**nduring cells, son células pluripotenciales que expresan genes del mantenimiento de la pluripotencia como Sox2, Nanog, Oct-3/4, que pueden dar origen a las tres capas germinales, que tienen una baja tumorigenicidad por una actividad disminuida de la telomerasa y que su purificación se puede realizar por medio de *cell sorting* por citometría de flujo o MACS con el marcador SSEA-3 o por medio de estrés severo con incubación con colagenasa en un ambiente frío (4°C) e hipóxico durante 16 horas [90–92]. Una vez aisladas las células MUSE, por sus características pluripotenciales, podrían tener mayor eficiencia terminal de

diferenciación a cardiomiocito con protocolos previamente utilizados en las iPSC, ya que su comportamiento es similar a las iPSC sin ser tumorigénicas.

10. Conclusiones

Las ASC tienen la capacidad de diferenciación a células similares a cardiomiocito. Ante la complejidad de la cardiomiogénesis, el uso de una molécula pequeña o un solo factor de crecimiento no es suficiente para poder diferenciar las ASC. La combinación de factores de crecimiento críticos de cardiogénesis aunado a un medio semisólido que contiene interleucinas con potencial cardiogénico es una opción viable para la generación de cardiomiocitos *in vitro*.

Agradecimientos

CONACyT beca número: 408083

Abreviaturas

Ad-A20	Adenovirus recombinante A20
ACK	amoníaco-cloruro-potasio
Anp	Péptido natriurético atrial
ASC	Células troncales derivadas de tejido adiposo
BM-MSC	Células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea
BMP-4	Proteína morfogénica de hueso 4
Cdg-C	Cardiogenol C
CFU-Fs	Unidades formadoras de colonias de fibroblastos
CO₂	Dióxido de carbono
CSC	Células troncales cardíacas
DMEM	Medio Eagle modificado de Dubelcco
DMSO	Dimetilsulfoxido
ESC	Células troncales embrionarias
FEVI	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
GOI	Gen de Interés
GSK-3β	Cinasa 3 beta de la glucógeno sintasa
HSC	Células troncales hematopoyéticas
IAM	Infarto agudo de miocardio
iPSC	Células troncales pluripotenciales inducidas
Mef2c	Factor potenciador de miocito 2c
MHC	Complejo de Histocompatibilidad
Mlc-2a	Cadena ligera de miosina 2 ^a
Mlc-2v	Cadena ligera de miosina 2v
mRNA	RNA mensajero
MSC	Células troncales mesenquimales
Myh	Cadena pesada de miosina
NGS	Secuenciación de próxima generación
Nkx2.5	NK2-homeobox 5
NRG-1	Neuroregulina 1
NSC	Células troncales neurales
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio del Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Transcriptasa reversa- Reacción en cadena de la polimerasa
SC	Células troncales
SerCa2	ATPasa Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico

SFB	Suero Fetal Bovino
SVF	Fracción del estroma vascular
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
WMD	Diferencia de medias ponderadas
α-Mhc	Cadena pesada de miosina alfa
β-Mhc	Cadena pesada de miosina beta

Bibliografía

- 1 Laflamme M a, Chen KY, Naumova A V, *et al.* Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007;**25**:1015–24. doi:10.1038/nbt1327
- 2 Dm C, Sa F, Sj B, *et al.* Stem cell treatment for acute myocardial infarction (Review). 2012.
- 3 Bernal A, Gálvez BG. The potential of stem cells in the treatment of cardiovascular diseases. *Stem Cell Rev Reports* 2013;**9**:814–32. doi:10.1007/s12015-013-9461-4
- 4 Bhattacharya S, Burridge PW, Kropp EM, *et al.* High efficiency differentiation of human pluripotent stem cells to cardiomyocytes and characterization by flow cytometry. *J Vis Exp* 2014;:52010. doi:10.3791/52010
- 5 Batalov I, Feinberg AW. Differentiation of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells using monolayer culture. *Biomark Insights* 2015;**10**:71–6. doi:10.4137/BMI.S20050
- 6 Cao N, Huang Y, Zheng J, *et al.* Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science* 2016;**1502**:aaf1502. doi:10.1126/science.aaf1502
- 7 Mummery CL (Christine L. *Stem cells : scientific facts and fiction.* Elsevier/Academic Press 2011.
- 8 Robert JS. Model systems in stem cell biology. *Bioessays* 2004;**26**:1005–12. doi:10.1002/bies.20100
- 9 Thomson M, Liu SJ, Zou L-N, *et al.* Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* 2011;**145**:875–89. doi:10.1016/j.cell.2011.05.017
- 10 Zhang G, Shang B, Yang P, *et al.* Induced pluripotent stem cell consensus genes: implication for the risk of tumorigenesis and cancers in induced pluripotent stem cell therapy. *Stem Cells Dev* 2012;**21**:955–64. doi:10.1089/scd.2011.0649
- 11 Zhang Y, Wang D, Chen M, *et al.* Intramyocardial transplantation of undifferentiated rat induced pluripotent stem cells causes tumorigenesis in the heart. *PLoS One* 2011;**6**:e19012. doi:10.1371/journal.pone.0019012
- 12 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;**126**:663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- 13 Fang I-M, Yang C-H, Chiou S-H, *et al.* Induced pluripotent stem cells without c-Myc ameliorate retinal oxidative damage via paracrine effects and reduced oxidative stress in rats. *J Ocul Pharmacol Ther* 2014;**30**:757–70. doi:10.1089/jop.2014.0020
- 14 Kronenberg H. Adult mesenchymal stem cells. *StemBook* 2009;:1–12. doi:10.3824/stembook.1.38.1
- 15 Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. 2003;**5**. doi:10.1186/ar614
- 16 Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 2007;**9**:204. doi:10.1186/ar2116
- 17 Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. *Cell Prolif* 1970;**3**:393–403. doi:10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x
- 18 Luria EA, Owen ME, Friedenstein AJ, *et al.* Bone formation in organ cultures of bone marrow. *Cell Tissue Res* 1987;**248**. doi:10.1007/BF00218212
- 19 Caplan Al. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;**9**:641–50. doi:10.1002/jor.1100090504
- 20 Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov U V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Prolif* 1987;**20**:263–72. doi:10.1111/j.1365-2184.1987.tb01309.x
- 21 Pittenger MF, Mackay a M, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;**284**:143–7.
- 22 Sulser T, Eberli D. Adipose-Derived Stem Cells (ASCs). 2010.
- 23 Tsai M-S, Lee J-L, Chang Y-J, *et al.* Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004;**19**:1450–6.

- doi:10.1093/humrep/deh279
- 24 Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003;**18**:696–704. doi:10.1359/jbmr.2003.18.4.696
- 25 Bi Y, Ehrlichou D, Kilts TM, *et al.* Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med* 2007;**13**:1219–27. doi:10.1038/nm1630
- 26 Igura K, Zhang X, Takahashi K, *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 2004;**6**:543–53.
- 27 De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001;**44**:1928–42. doi:10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P
- 28 Crisan M, Deasy B, Gavina M, *et al.* Purification and long-term culture of multipotent progenitor cells affiliated with the walls of human blood vessels: myoendothelial cells and pericytes. *Methods Cell Biol* 2008;**86**:295–309. doi:10.1016/S0091-679X(08)00013-7
- 29 Xu W. Tissue induction, the relationship between biomaterial's microenvironment and mesenchymal stem cell differentiation. *J Biomed Sci Eng* 2013;**06**:85–91. doi:10.4236/jbise.2013.61011
- 30 Chamberlain G, Fox J, Ashton B, *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;**25**:2739–49. doi:10.1634/stemcells.2007-0197
- 31 Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 2004;**32**:414–25. doi:10.1016/j.exphem.2004.02.004
- 32 Gupta PK, Das AK, Chullikana A, *et al.* Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther* 2012;**3**:25. doi:10.1186/srct116
- 33 Donnelly EM, Lamanna J, Boulis NM. Stem cell therapy for the spinal cord. *Stem Cell Res Ther* 2012;**3**:24. doi:10.1186/srct115
- 34 Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004;**95**:9–20. doi:10.1161/01.RES.0000135902.99383.6f
- 35 Choudry FA, Mathur A. Research focus Stem cell therapy in cardiology. 2011;**6**:17–23.
- 36 Wu J, Li J, Zhang N, *et al.* Stem cell-based therapies in ischemic heart diseases: a focus on aspects of microcirculation and inflammation. *Basic Res Cardiol* 2011;**106**:317–24. doi:10.1007/s00395-011-0168-x
- 37 Rogers TB, Pati S, Gaa S, *et al.* Mesenchymal stem cells stimulate protective genetic reprogramming of injured cardiac ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**50**:346–56. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.09.001
- 38 Kaushal S, Jacobs JP, Gossett JG, *et al.* Innovation in basic science: stem cells and their role in the treatment of paediatric cardiac failure--opportunities and challenges. *Cardiol Young* 2009;**19 Suppl 2**:74–84. doi:10.1017/S104795110999165X
- 39 Burridge PW, Keller G, Gold JD, *et al.* Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell* 2012;**10**:16–28. doi:10.1016/j.stem.2011.12.013
- 40 Tirosh-Finkel L, Zeisel A, Brodt-Ivshitz M, *et al.* BMP-mediated inhibition of FGF signaling promotes cardiomyocyte differentiation of anterior heart field progenitors. *Development* 2010;**137**:2989–3000. doi:10.1242/dev.051649
- 41 Ying QL, Nichols J, Chambers I, *et al.* BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 2003;**115**:281–92.
- 42 Cohen ED, Wang Z, Lepore JJ, *et al.* Wnt / β -catenin signaling promotes expansion of Isl-1 – positive cardiac progenitor cells through regulation of FGF signaling. 2007;**117**:2005–7. doi:10.1172/JCI31731.1794
- 43 Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, *et al.* Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;**26 Suppl 1**:188–202. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06549.x
- 44 Léobon B, Roncalli J, Joffre C, *et al.* Adipose-derived cardiomyogenic cells: in vitro expansion and functional improvement in a mouse model of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2009;**83**:757–67. doi:10.1093/cvr/cvp167
- 45 Planat-Bénard V, Menard C, André M, *et al.* Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 2004;**94**:223–9. doi:10.1161/01.RES.0000109792.43271.47
- 46 Lian X, Hsiao C, Wilson G, *et al.* Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci* 2012;**109**:E1848–57. doi:10.1073/pnas.1200250109
- 47 Yau WW, Tang M-K, Chen E, *et al.* Cardiogenol C can induce Mouse Hair Bulge Progenitor Cells to Transdifferentiate into Cardiomyocyte-like Cells. *Proteome Sci* 2011;**9**:3. doi:10.1186/1477-5956-9-3
- 48 Mike AK, Koenig X, Koley M, *et al.* Small Molecule Cardiogenol C Upregulates Cardiac Markers and Induces Cardiac Functional Properties in Lineage-Committed Progenitor Cells. *Cell Physiol Biochem*

- 2014;**33**:205–21. doi:10.1159/000356663
- 49 Wu X, Ding S, Ding Q, *et al.* Small Molecules that Induce Cardiomyogenesis in Embryonic Stem Cells. *J Am Chem Soc* 2004;**126**:1590–1. doi:10.1021/ja038950i
- 50 Rangappa S, Fen C, Lee EH, *et al.* Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg* 2003;**75**:775–9.
- 51 Kamarul W, Wan Z, Makpol S, *et al.* 5-Azacytidine Is Insufficient For Cardiogenesis In Human Adipose-Derived Stem Cells. *J Negat Results Biomed* 2012;**11**:3. doi:10.1186/1477-5751-11-3
- 52 Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, *et al.* Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med* 2010;**14**:878–89. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01009.x
- 53 Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, *et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;**103**:697–705. doi:10.1172/JCI5298
- 54 Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003;**5**:362–9. doi:10.1080/14653240310003026
- 55 Gimble JM, Katz AJ, Bunnell B a. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007;**100**:1249–60. doi:10.1161/01.RES.0000265074.83288.09
- 56 Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, *et al.* Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008;**45**:115–20. doi:10.1016/j.ymeth.2008.03.006
- 57 Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, *et al.* Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 2005;**23**:412–23. doi:10.1634/stemcells.2004-0021
- 58 Li H, Zimmerlin L, Marra KG, *et al.* Adipogenic potential of adipose stem cell subpopulations. *Plast Reconstr Surg* 2011;**128**:663–72. doi:10.1097/PRS.0b013e318221db33
- 59 Crisan M, Yap S, Casteilla L, *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008;**3**:301–13. doi:10.1016/j.stem.2008.07.003
- 60 El Atat O, Antonios D, Hilal G, *et al.* An Evaluation of the Stemness, Paracrine, and Tumorigenic Characteristics of Highly Expanded, Minimally Passaged Adipose-Derived Stem Cells. *PLoS One* 2016;**11**:e0162332. doi:10.1371/journal.pone.0162332
- 61 Nowakowski A, Walczak P, Janowski M, *et al.* Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Stem Cells Dev* 2015;**24**:2219–42. doi:10.1089/scd.2015.0062
- 62 Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, *et al.* Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**314**:420–7. doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.109
- 63 Gwak S, Bhang SH, Yang HS, *et al.* In vitro cardiomyogenic differentiation of adipose-derived stromal cells using transforming growth factor- b 1. 2009;:148–54. doi:10.1002/cbf
- 64 Burchfield JS, Paul AL, Lanka V, *et al.* Pharmacological priming of adipose-derived stem cells promotes myocardial repair. *J Investig Med* 2016;**64**:50–62. doi:10.1136/jim-2015-000018
- 65 van Dijk A, Niessen HWM, Zandieh Doulabi B, *et al.* Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin. *Cell Tissue Res* 2008;**334**:457–67. doi:10.1007/s00441-008-0713-6
- 66 Park E, Patel AN. PKC-delta induces cardiomyogenic gene expression in human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;**393**:582–6. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.018
- 67 Carvalho PH, Paula A, Daibert F, *et al.* Differentiation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Into Cardiomyocytes. *Arq Bras Cardiol* 2012.
- 68 Zhao L, Ju D, Gao Q, *et al.* Over-expression of Nkx2.5 and/or cardiac a-actin inhibit the contraction ability of ADSCs-derived cardiomyocytes. *Mol Biol Rep* 2012;**39**:2585–95. doi:10.1007/s11033-011-1011-z
- 69 van der Spoel TIG, Jansen of Lorkeers SJ, Agostoni P, *et al.* Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 2011;**91**:649–58. doi:10.1093/cvr/cvr113
- 70 Strem BM, Zhu M, Alfonso Z, *et al.* Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy* 2005;**7**:282–91. doi:10.1080/14653240510027226
- 71 Jiang M, He B, Zhang Q, *et al.* Randomized controlled trials on the therapeutic effects of adult progenitor cells for myocardial infarction: meta-analysis. *Expert Opin Biol Ther* 2010;**10**:667–80. doi:10.1517/14712591003716437
- 72 Menasché P. Skeletal myoblasts and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2008;**45**:545–53. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.11.009
- 73 Gneocchi M, Danieli P, Cervio E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascul Pharmacol* 2012;**57**:48–55. doi:10.1016/j.vph.2012.04.002
- 74 li M, Horii M, Yokoyama A, *et al.* Synergistic effect of adipose-derived stem cell therapy and bone marrow progenitor recruitment in ischemic heart. *Lab Invest* 2011;**91**:539–52. doi:10.1038/labinvest.2010.191

- 75 Tatsumi T, Ashihara E, Yasui T, *et al.* Intracoronary transplantation of non-expanded peripheral blood-derived mononuclear cells promotes improvement of cardiac function in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 2007;**71**:1199–207.
- 76 Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 2002;**298**:2188–90. doi:10.1126/science.1077857
- 77 Fatima A, Xu G, Nguemo F, *et al.* Murine transgenic iPS cell line for monitoring and selection of cardiomyocytes. *Stem Cell Res* 2016;**17**:266–72. doi:10.1016/J.SCR.2016.07.007
- 78 Mummery CL, Zhang J, Ng ES, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res* 2012;**111**:344–58. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227512
- 79 Kolaparthi LK, Sanivarapu S, Moogla S, *et al.* Adipose Tissue - Adequate, Accessible Regenerative Material. *Int J Stem Cells* 2015;**8**:121–7. doi:10.15283/ijsc.2015.8.2.121
- 80 Song YH, Gehmert S, Sadat S, *et al.* VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;**354**:999–1003. doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.095
- 81 Ibarra-Ibarra BR. *Patrones de expresión durante el proceso de diferenciación de células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea y de tejido adiposo.* Tesis de Maestría en Ciencias UNAM 2015.
- 82 Hh C, Kk S, Yj K, *et al.* NF-kappaB activation stimulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue by increasing TAZ expression . 2010;**223**:22024. doi:10.1002/jcp.22024.NF-kappaB
- 83 Guttridge DC, Mayo MW, Madrid L V, *et al.* NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* 2000;**289**:2363–6.
- 84 Hernández-Gutierrez S, García-Peláez I, Zentella-Dehesa A, *et al.* NF-kappaB signaling blockade by Bay 11-7085 during early cardiac morphogenesis induces alterations of the outflow tract in chicken heart. *Apoptosis* 2006;**11**:1101–9. doi:10.1007/s10495-006-6984-z
- 85 Ehler E, Moore-Morris T, Lange S. Isolation and culture of neonatal mouse cardiomyocytes. *J Vis Exp* 2013;**15**:e50154. doi:10.3791/50154
- 86 Ibarra-Ibarra, Blanca Rebeca Franco M, Paez A, Varela López E, *et al.* Improved Efficiency of Cardiomyocyte-Like Cell Differentiation from Rat Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells with a Directed Differentiation Protocol. *Stem Cell Int* 2019 (En prensa).
- 87 Shembade N, Harhaj EW. Regulation of NF-κB signaling by the A20 deubiquitinase. *Cell Mol Immunol* 2012;**9**:123–30. doi:10.1038/cmi.2011.59
- 88 Dubois NC, Craft AM, Sharma P, *et al.* SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011;**29**:1011–8. doi:10.1038/nbt.2005
- 89 Kadari A, Mekala S, Wagner N, *et al.* Robust Generation of Cardiomyocytes from Human iPS Cells Requires Precise Modulation of BMP and WNT Signaling. *Stem Cell Rev Reports* 2015;**11**:560–9. doi:10.1007/s12015-014-9564-6
- 90 Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, *et al.* Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:9875–80. doi:10.1073/pnas.1100816108
- 91 Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, *et al.* Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. *Nat Protoc* 2013;**8**:1391–415. doi:10.1038/nprot.2013.076
- 92 Simerman A a, Dumesic D a, Chazenbalk GD. Pluripotent muse cells derived from human adipose tissue: a new perspective on regenerative medicine and cell therapy. *Clin Transl Med* 2014;**3**:12. doi:10.1186/2001-1326-3-12

Anexo 1.

Hindawi
Stem Cells International
Article ID 8940365

Research Article

Improved Efficiency of Cardiomyocyte-Like Cell Differentiation from Rat Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells with a Directed Differentiation Protocol

1 Blanca Rebeca Ibarra-Ibarra,¹ Martha Franco,² Araceli Paez,¹ Elvira Varela López,¹ and Felipe Massó¹

¹Laboratory of Translational Medicine, UNAM-INCAR Research Unit, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

²Department of Nephrology, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

Correspondence should be addressed to Felipe Massó; f_masso@yahoo.com

Received 7 September 2018; Revised 6 November 2018; Accepted 20 December 2018

Guest Editor: Emilio Satoshi Hara

Copyright © 2019 Blanca Rebeca Ibarra-Ibarra et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2 Cell-based therapy has become a resource for the treatment of cardiovascular diseases; however, there are some conundrums to achieve. *In vitro* cardiomyocyte generation could be a solution for scaling options in clinical applications. Variability on cardiac differentiation in previously reported studies from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ASCs) and the lack of measuring of the cardiomyocyte differentiation efficiency motivate the present study. Here, we improved the ASC-derived cardiomyocyte-like cell differentiation efficiency with a directed cardiomyocyte differentiation protocol: BMP-4 + VEGF (days 0-4) followed by a methylcellulose-based medium with cytokines (IL-6 and IL-3) (days 5-21). Cultures treated with the directed cardiomyocyte differentiation protocol showed cardiac-like cells and "rosette-like structures" from day 7. The percentage of cardiac troponin T- (cTnT-) positive cells was evaluated by flow cytometry to assess the cardiomyocyte differentiation efficiency in a quantitative manner. ASCs treated with the directed cardiomyocyte differentiation protocol obtained a differentiation efficiency of up to 44.03% (39.96%±3.78) at day 15 without any enrichment step. Also, at day 21 we observed by immunofluorescence the positive expression of early, late, and cardiac maturation differentiation markers (Gata-4, cTnT, cardiac myosin heavy chain (MyH), and the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCa2)) in cultures treated with the directed cardiomyocyte differentiation protocol. Unlike other protocols, the use of critical factors of embryonic cardiomyogenesis coupled with a methylcellulose-based medium containing previously reported cardiogenic cytokines (IL-6 and IL-3) seems to be favorable for *in vitro* cardiomyocyte generation. This novel efficient culture protocol makes ASC-derived cardiac differentiation more efficient. Further investigation is needed to identify an ASC-derived cardiomyocyte surface marker for cardiac enrichment.

1. Introduction

3 Stem cells are a source of immature renewable cells that can lead to the development of various cell types; this makes its use attractive for tissue regeneration. The differentiation capacity of the stem cells is well known; however, the differentiation efficiency is sometimes variable depending on the cell type and protocol used [1, 2]. Cardiomyocyte

in vitro generation has advantages for clinical applications, controlling the number of cells, and knowing the cardiomyocyte subtype transplanted in patients with myocardial infarction [3, 4] or other cardiovascular diseases such as refractory angina or ischemic cardiomyopathy [5]. Great advances have been developed in this matter; nevertheless, there are some limitations to translate these findings to clinical applications [2].

Cardiomyocyte differentiation was described before in distinct types of stem cells such as mesenchymal stem cells (MSCs) [6, 7], embryonic stem cells (ESCs) [8, 9], and induced pluripotent stem cells (iPSCs) [1, 10, 11]. Despite having a high differentiation efficiency from ESCs and iPSCs, the use of these cells has been restricted in clinic usage because of their tumorigenic potential, dedifferentiation, and higher costs to generate them [2, 12]. Otherwise, MSCs such as adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ASCs) have shown a lower differentiation efficiency depending on the method used, but their lower tumorigenic potential, and costs, as well as easier accessibility, make them attractive to use for scale-up options and for clinical applications [4, 13].

Some reports have described the induction of ASC-derived cardiomyocyte-like cells with different approaches in different species (mouse, rat, rabbit, and human). Until now, there is no consensus on the best cardiomyocyte induction protocol. These strategies obtained a low and variable source of spontaneously beating cardiomyocyte-like cells sometimes expressing specific cardiac markers compatible with a cardiomyocyte morphology [6, 14, 15]. The great majority induce undifferentiated ASCs with a unique small molecule or growth factor [6, 7, 16–18]. Others have used cocultivated ASCs and cardiomyocytes, but its use is restricted for further scalability for clinical applications [15, 19]. Higher efficiency was observed by isolating the beating clusters; however, this method depends on the number of spontaneously beating cardiac-like cells [7]. In addition, very few studies have measured the differentiation efficiency towards cardiomyocytes from ASCs with a quantitative method that allows us to compare between different protocols and be able to identify which is optimal for further applications [7, 16].

Directed cardiomyocyte differentiation protocols consist in the manipulation of different signaling pathways via combination of some growth factors (BMP-4, VEGF, and bFGF), small molecules, and cytokines, among others, mimicking the embryonic cardiomyogenesis; as was observed in the recent years with ESCs and iPSCs, cardiomyocyte differentiation protocols achieve a higher differentiation efficiency (nearly 90%) with different kinds of combinations [1, 10, 11, 20–22]. So far, iPSC studies have overshadowed the studies carried out in ASCs, and very few studies have explored the use of directed cardiomyocyte differentiation protocols in ASCs [23].

Stem cell cardiac differentiation is a spatiotemporal complex process, and *in vitro* differentiation is not easy either because of the lack of many conditions observed *in vivo*. The aim of the present study was to improve the efficiency of rat ASC-derived cardiomyocytes to optimize their *in vitro* generation for further applications. ASCs were induced to cardiomyocyte lineage using a combination of two growth factors critically implicated in embryonic cardiomyogenesis (BMP-4 and VEGF) followed by a commercial methylcellulose-based medium with cytokines (IL-3 and IL-6), which had previously reported a cardiomyogenic potential.

2. Materials and Methods

2.1. Isolation and Maintenance of Cell Culture of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. ASCs were isolated with a combination of mechanical dissociation and collagenase incubation from Wistar rat subcutaneous adipose tissue, following previously reported protocols [24], adapted for rat tissue. Briefly, the rats were euthanized in a CO₂ chamber accordingly with the institution's ethical guidelines for animal research procedures. With an antiseptic technique, rat adipose subcutaneous tissue was obtained and cut in small pieces until the tissue had an emulsion appearance. To digest the tissue, we used 0.1% collagenase type II (Sigma) and shaken-incubated at 37°C for 45 minutes. Then, collagenase activity was inactivated with Dulbecco's modified Eagle medium low glucose (DMEM-lg) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Corning) and 1% antibiotic-antimycotic (Anti-Anti (100x), 100 U/mL penicillin, 10 mg streptomycin, and 25 µg amphotericin B per mL, Gibco). The inactivated digestion was passed through a sterile layer of chiffon. The remaining adipocytes and fats were discarded by centrifugation. The pellet stromal vascular fraction (SVF) was washed with DMEM-lg-supplemented medium and resuspended with 1x ACK lysis buffer to lyse red blood cells in the SVF. After 2 steps of centrifugation with DMEM-lg-supplemented medium, the cell pellets containing the ASCs were resuspended in DMEM-lg-supplemented medium, passed through a 100 µm strainer, and then seeded in plates. The cells were evaluated every 24 hours with an inverted microscope, and the medium was changed every 3 days until cells have reached 70–80% confluence for cell passage.

2.2. Isolation of Rat Neonatal Cardiomyocytes. Rat neonatal cardiomyocytes were isolated from hearts of 1- to 4-day old neonate rats. The extracted hearts were shaken-incubated with trypsin 0.01% (trypsin type III from bovine pancreas) (Sigma) and Ham's F-10 media (Gibco) without serum until the tissue was disaggregated. Every 15 minutes, the supernatant was collected and inactivated with Ham's F-10 media with 20% FBS. The solution with disaggregated heart cells was centrifuged at 1,200 RPM for 5 minutes. The cell pellet was resuspended and seeded with Ham's F-10 media with calcium chloride 135 mg/mL, 20% FBS, and 1% antibiotic-antimycotic (Anti-Anti (100x), 100 U/mL penicillin, 10 mg streptomycin, and 25 µg amphotericin B per mL, Gibco). To obtain a pure cardiomyocyte culture, the seeded cells were incubated for 45–60 minutes at 37°C in a humid 5% CO₂ incubator, and noncardiomyocyte cells adhere to the flask. After 45–60 minutes, the nonadherent cells (cardiomyocytes) were collected and seeded in a new flask. We observed contractile clusters 24 hours post-isolation of the rat neonatal cardiomyocyte cells. The cardiomyocytes were maintained in culture until being processed as a positive control for experiments.

2.3. Flow Cytometry. Characterization of rat ASC was performed by characteristic stem cell surface markers (CD90, RT1A, CD44, CD29, CD73, CD31, CD45, and CD34) using

flow cytometry. Cell analysis was achieved in the platform BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) with CellQuest software (Becton Dickinson). Other surface markers related to cardiomyocyte differentiation such as CD106 (VCAM) and SIRPα (CD172a) were also evaluated. Cardiac troponin T (cTnT) was evaluated in undifferentiated ASCs and in a pool of rat neonatal cardiomyocytes. To quantify the efficiency of cardiomyocyte differentiation, the percentage of cTnT-positive cells was determined by flow cytometry. Cells were harvested from culture flasks or plates using trypsin 0.25% (Gibco) and centrifuged at 1,500 rpm for 5 minutes. The cell pellet was washed twice with 1 mL of 1x PBS 0.8% bovine albumin (BSA) and 0.02% sodium azide. Fixation and permeabilization were performed with an Intracellular Staining Kit (Invitrogen), following the protocol according to the specifications provided by the manufacturer. ASCs were washed in 1 mL of 1x PBS plus 0.8% BSA and 0.02% sodium azide. The primary antibodies were incubated for 30–45 min at room temperature; in some cases, primary antibodies were directly labeled with a fluorophore. In other cases, we used secondary antibodies coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), or CFL 647 for 30–45 min at room temperature. An unstained control and a negative control (an appropriate isotype control) were used for each antibody. Antibodies used are listed in Supplementary Table 1.

2.4. Immunofluorescence Staining. The expressions of the stem cell marker CD90 and cardiac markers were analyzed in undifferentiated ASCs and in experimental condition cultures using immunofluorescence staining. The protocol used was as follows: cell cultures were washed 3 times with 1x PBS at 4°C; the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes at 4°C. Each plate was washed three times with 1x PBS, and the cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 solution for 10 minutes and washed again 3 times with 1x PBS at 4°C. Then, they were incubated with a blocking solution (Biocare Medical, Background Sniper) for 10 minutes and washed 3 times with 1x PBS at 4°C. The primary antibodies were incubated for 45–60 minutes at room temperature (1:100–1:200). Cells were washed 3 times with 1x PBS at 4°C, and secondary antibodies were incubated (1:200–1:300) for 45 minutes at room temperature. Stained cell cultures were mounted with a mounting media containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Santa Cruz ChemCruz™ Ultracruz™ Mounting Medium). The images were obtained by confocal microscopy using a LSM 700 Zeiss microscope.

2.5. In Vitro Cardiomyocyte Differentiation from ASCs. To optimize the terminal efficiency toward a cardiac lineage, we performed a directed cardiomyocyte differentiation protocol using a combination of important growth factors involved in the cardiac mesoderm specification and a methylcellulose-based medium with cytokines with a cardiomyogenic potential. For each biological replicate, the cells were stained with trypan blue and counted in a Neubauer chamber. Undifferentiated ASCs were seeded in a monolayer in 6-well plates (3×10^5). ASCs were treated for 4 days with

DMEM-Ig medium supplemented with human BMP-4 [30 ng/mL] (ProSpec) and rat VEGF-C [10 ng/mL] (ProSpec). At day 5, the medium was changed by a commercial methylcellulose medium with cytokines (MethoCult™ GF M3534, STEMCELL Technologies) mainly containing Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), 1% methylcellulose, fetal bovine serum, bovine serum albumin, recombinant human insulin, human transferrin (iron-saturated), 2-mercaptoethanol, recombinant mouse stem cell factor (SCF), recombinant mouse interleukin 3 (IL-3), recombinant human interleukin 6 (IL-6), and supplements (Figure 1(a)).

To assess reproducibility, we performed three biological replicates. Each experiment condition (untreated ASCs control, treated only with factors BMP-4 + VEGF) and the directed cardiomyocyte differentiation protocol (BMP-4 + VEGF followed by M3534) and each biological replicate were followed every day under a bright-light microscope. To determine the efficiency of cardiomyocyte differentiation, the expression of cardiac markers such as cardiac troponin T (cTnT), Gata-4, myosin heavy chain (MyH), and SerCa2 was analyzed, by flow cytometry and/or immunofluorescence.

2.6. Statistics. Data are presented as mean \pm SD. Two-tailed Student's *t*-test was used to determine the statistical significance of differences between groups. A *p* value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Isolation and ASC Characterization. ASCs were obtained from subcutaneous rat adipose tissue by mechanical disaggregation and enzymatic digestion. The plated cells were monitored every 24 hours. During their proliferation, the isolated ASCs showed the distinctive spindle fibroblast-like morphology (Figure 1(b)). On passage 3 ($n = 3$), the cells were evaluated and characterized by flow cytometry and immunofluorescence to confirm that isolated ASCs maintain their phenotypic characteristics after growth in culture.

For characterization, the ASC immunophenotype was performed with previously established stem cell surface markers. It was observed that ASCs present characteristic stem cell surface markers. ASCs in the undifferentiated state were positive for CD90 (99.36 \pm 0.59%), CD29 (88.47 \pm 17.74%), CD44 (89.91 \pm 10.68%), RT1A (96.91 \pm 4.18%), and CD73 (97.75 \pm 1.93%) and were negative for hematopoietic markers such as CD45 (0.53 \pm 0.24%), CD34 (0.44 \pm 0.11%), and the endothelial marker CD31 (0.47 \pm 0.26%) (Figure 1(c)). Immunofluorescence observed by a confocal microscope showed the presence of CD90 in undifferentiated ASCs (Supplementary Figure 1).

3.2. Undifferentiated ASCs and Cardiomyocyte Markers. To evaluate if ASCs ($n = 3$) in the undifferentiated state express cardiomyocyte markers, ASCs were analyzed for the presence of positive cells for the cTnT marker by flow cytometry; the cells do not express cTnT in the undifferentiated state (1.57 \pm 0.77%) (Figure 2(a)). No positive cells were observed for cardiomyocyte markers such as Gata-4, cTnT, Myh, and SerCa2 by immunofluorescence (Figure 2(b)).

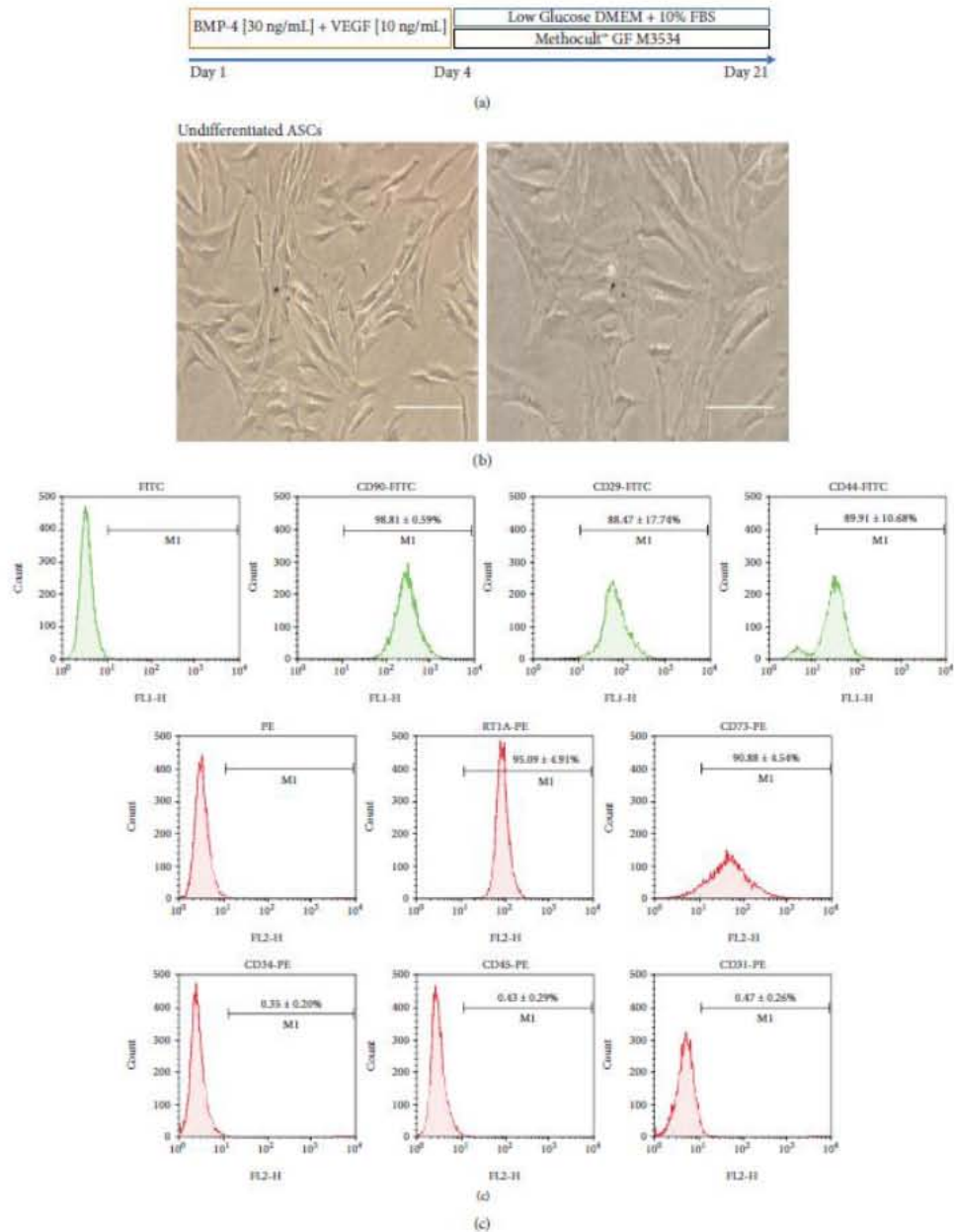


FIGURE 1: (a) Schematic outline of the directed cardiomyocyte differentiation protocol (days). Only growth factors and the combination of growth factors plus MethoCult M3534 conditions are shown. Undifferentiated ASCs. (b) A spindle fibroblast-like cell morphology was assessed by inverted microscope imaging (scale bar, 100 μ m). (c) Flow cytometry histograms for stem cell surface markers versus forward scatter (FSC), M1 (percentage of positive cells (%), mean \pm SD, $n = 3$).

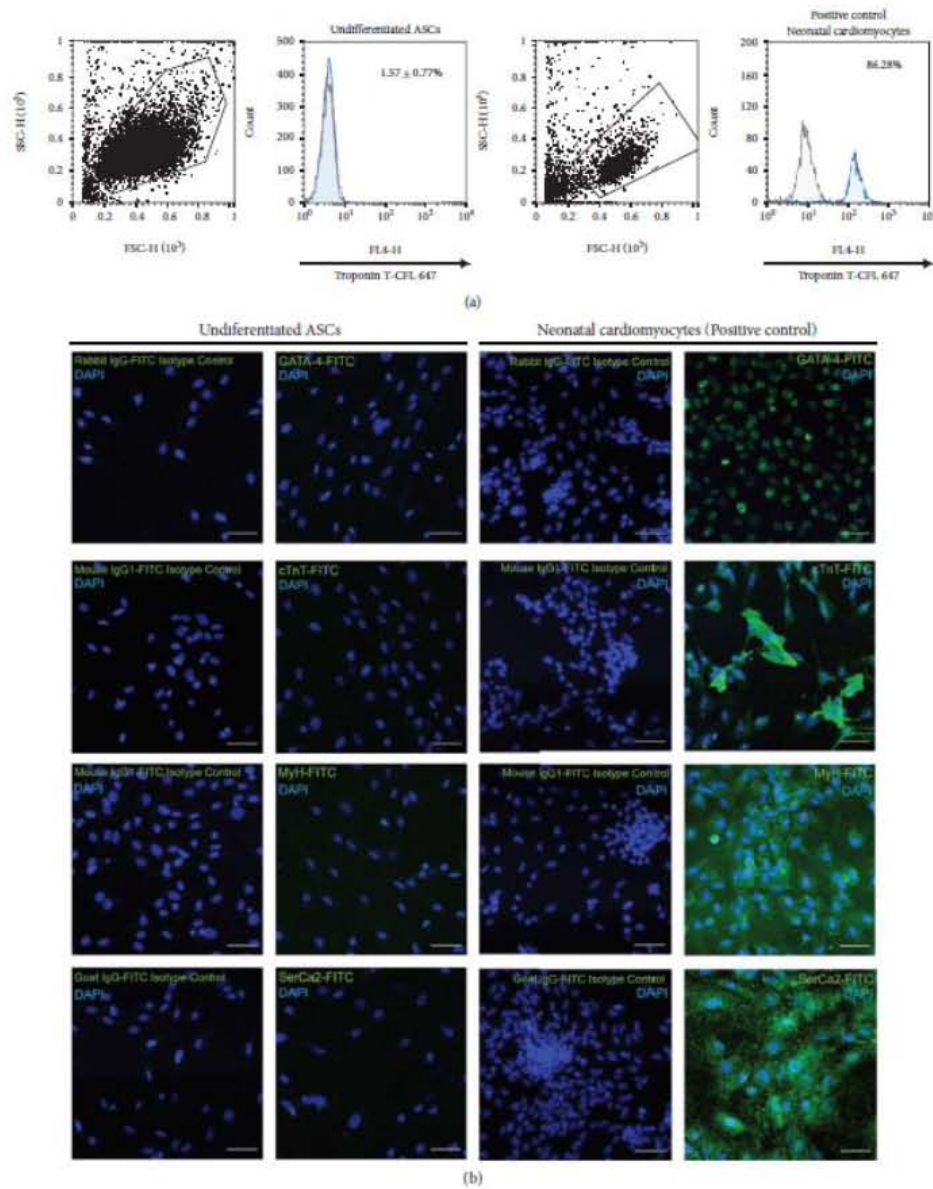


FIGURE 2: Undifferentiated ASCs do not express cTnT, a specific cardiomyocyte marker. Flow cytometry analysis of cTnT of undifferentiated ASCs. Histogram overlay showing isotype control goat IgG-CFL-647 (black line) and cTnT-CFL 647 (blue). Percentage of cTnT-positive cells by flow cytometry; results are shown as mean \pm SD ASCs ($n = 3$). Flow cytometry analysis of cTnT was performed in a pool of neonatal cardiomyocytes (isolation of 10 neonatal rat hearts); histogram overlay showing isotype control goat IgG-CFL-647 (black line) and cTnT-CFL 647 (blue). Flow cytometry for cTnT. (b) Undifferentiated ASCs do not express specific cardiomyocyte markers. Undifferentiated ASC and rat neonatal cardiomyocyte (positive control) immunostaining for Gata-4, cTnT, MyH, and SerCa2, each one with its isotype control (negative control); image obtained by confocal microscopy (scale bars, 50 μm).

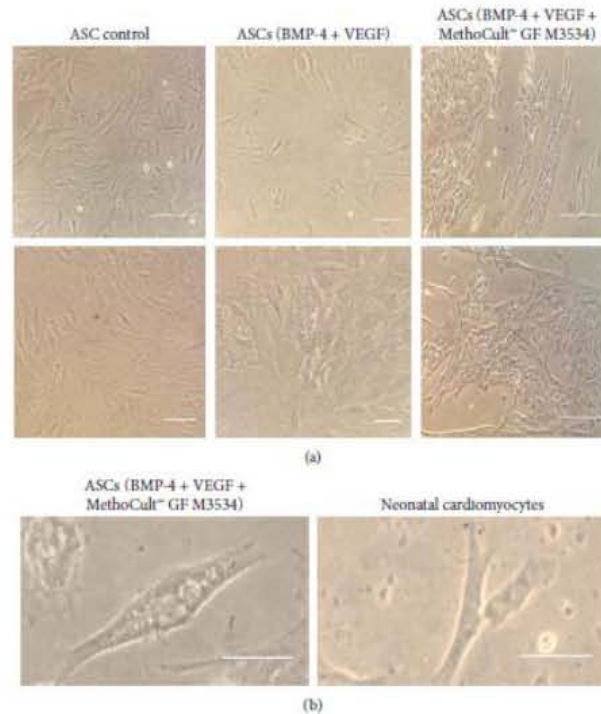


FIGURE 3: Cell morphology during cardiomyocyte differentiation from ASCs. (a) Control, only factors (BMP-4 + VEGF), and the directed cardiomyocyte differentiation protocol (MethoCult™ GF M3534 plus factors) conditions were observed by inverted microscope imaging (scale bar, 100 μ m). (b) Binucleated cardiomyocyte-like cells observed at day 10 in the directed cardiomyocyte differentiation protocol (MethoCult™ GF M3534 plus factors) conditions and an image of binucleated rat neonatal cardiomyocyte (scale bar, 100 μ m).

3.3. ASC Differentiation toward Cardiomyocytes with a Directed Cardiomyocyte Differentiation Protocol. To increase the terminal efficiency of cardiomyocyte differentiation from ASCs, we conducted an induction differentiation experiment using a combination of different culture conditions without previous culture selection. We induced cardiac differentiation from ASCs in three independent biological replicates, with a directed cardiomyocyte differentiation protocol that includes two critical cardiomyogenesis growth factors (BMP-4 [30 ng/mL] and VEGF [10 ng/mL]) and a methylcellulose-based medium with cytokines (MethoCult™ GF M3534) (Figure 1(a)).

From day 7, some cell morphology changes were observed during the cardiac induction experiments (Figure 3). Compared with only factors and nontreated control conditions, the changes were evident in cell cultures within the condition induced with the directed cardiomyocyte differentiation protocol. Cell cultures treated with the directed cardiomyocyte differentiation protocol showed a cell alignment pattern, elongated cells, dense cytoplasm with myofilament-like structures (Figure 3(a)), and some binucleated cells similar to cardiomyocytes (Figure 3(b)). Also, cell

clusters were observed at day 15; these clusters were not observed in only factors and nontreated control conditions (Figure 4(a)). Despite that we observed morphologic changes compatible with cardiomyocyte characteristics, there were no spontaneous beating cells; however, we observed that these cell clusters express cTnT showed by immunofluorescence in the cultures treated with the factors plus MethoCult™ GF M3534 (Figure 4(b)).

To assess the efficiency of ASC-derived cardiac differentiation, we evaluated the percentage of cTnT-positive cells by flow cytometry at day 15. ASCs treated with the cardiomyocyte differentiation protocol obtained the highest percentages of cTnT-positive cells ($39.96\% \pm 3.78$, $p < 0.0001$ and $p = 0.0001$) in comparison with the induction with only factors ($4.21 \pm 2.02\%$) and control ($3.58 \pm 1.47\%$) conditions (Figures 5(a) and 5(b)).

On day 21, further characterization was performed in ASC-derived cardiac-like cells. It was observed, by immunofluorescence, that ASCs induced with the directed cardiomyocyte differentiation protocol express specific cardiomyocyte markers such as Gata-4 (Figure 6), Troponin T (cTnT) (Figure 7), Myh (Figure 8), and SerCa2

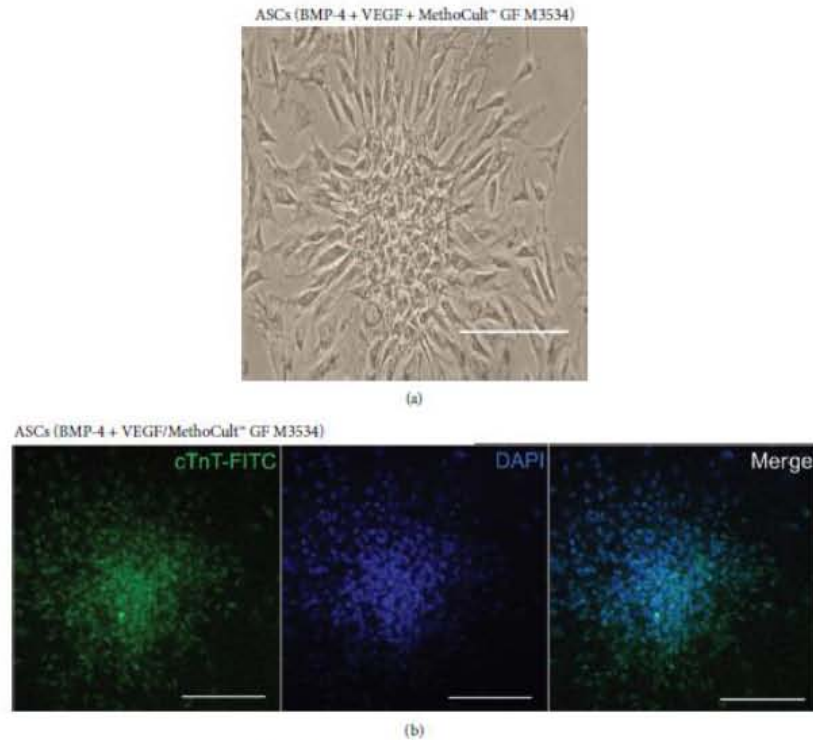


FIGURE 4: Cell cluster formation at day 15 in the directed cardiomyocyte differentiation protocol showing the "Rosette-like structures" that express cTnT. (a) Images obtained by inverted microscope imaging in conditions were observed by inverted microscope imaging (scale bar, 100 μ m). (b) Immunostaining for cTnT; image obtained by confocal microscopy (scale bars, 50 μ m).

(Figure 9), but their expression was lower compared with the rat neonatal cardiomyocytes.

3.4. CD106 and SIRP α Characterization in Undifferentiated ASCs. Expressions of CD106 (VCAM) and SIRP α (CD172a) have been reported to be useful for iPSC-derived cardiomyocyte enrichment and separation with cell sorting. We characterized undifferentiated ASCs with these two cardiomyocyte surface markers to know if it was possible to use these markers for an enrichment step after ASC-derived cardiomyocyte experiments. Both markers showed a high percentage of positive cells (Figure 10(a)), CD106 ($97.04 \pm 3.68\%$), and SIRP α ($90.52 \pm 15.02\%$). Also, as it was observed by immunofluorescence, undifferentiated ASCs were highly expressed, limiting its use for an enrichment step after ASC cardiomyocyte induction with the directed cardiomyocyte differentiation protocol (Figure 10(b)).

4. Discussion

The ability to differentiate into a cardiogenic lineage has been studied in different kinds of stem cells. The most efficient

protocol was reported in iPSC-derived cardiomyocytes with a high differentiation efficiency, but until now their uses in clinical applications have been diminished by its potentially tumorigenic formation and some other limitations [2, 12]. ASCs are suitable for clinical applications with some advantages over other types of stem cells. ASC-derived cardiomyocytes are an alternative; however, the protocols so far have shown a low and variable *in vitro* cardiomyocyte differentiation; besides, they do not quantify the differentiation efficiency with a quantitative method.

Here, we performed a novel directed cardiomyocyte differentiation protocol from rat ASCs that combined the use of critical cardiomyogenic growth factors, such as BMP-4 [25] and VEGF [26, 27], in the first 4 days of the experiment to commit undifferentiated ASCs to cardiac progenitor cells, followed by a semi-solid commercial medium based on methylcellulose and cytokines (IL-3 and IL-6) that had previously been reported with cardiomyogenic potential [6, 7, 23, 28], to further cardiomyocyte differentiation.

Our novel approach improved the *in vitro* differentiation of rat ASCs toward cardiomyocyte-like cells in up to 44.03%, showing a high efficiency and reproducibility without a

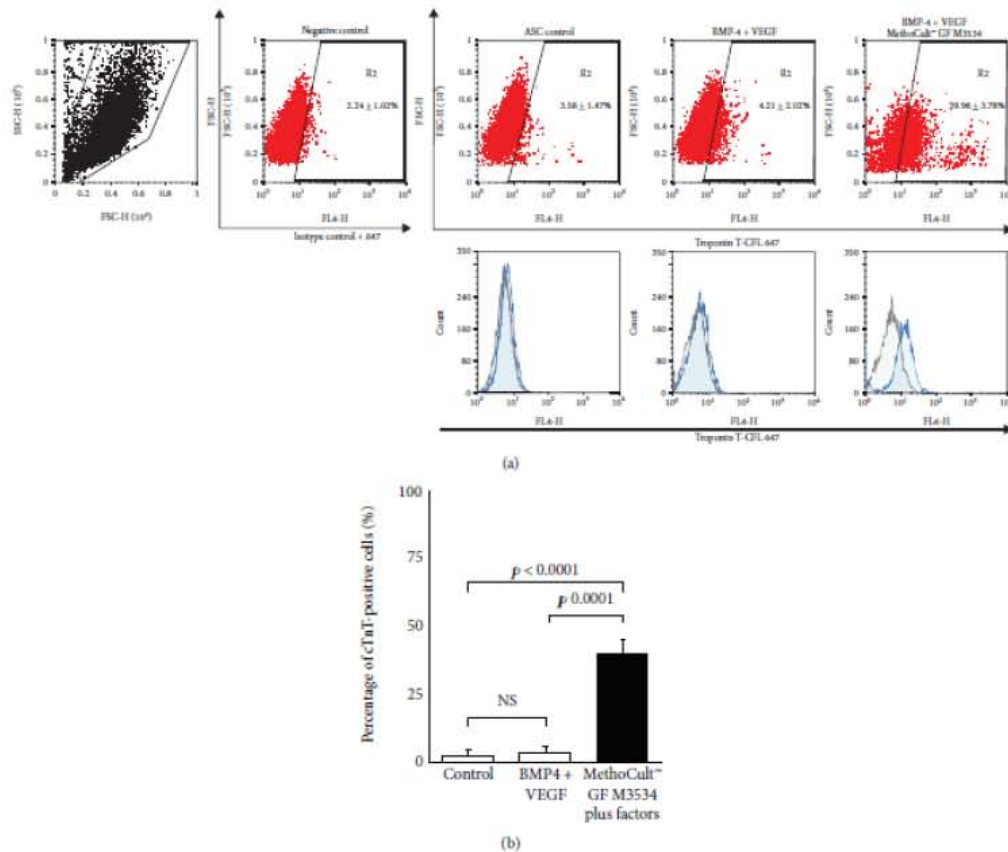


FIGURE 5: ASC-derived cardiomyocyte-like cells. (a) Flow cytometry for cTnT versus forward scatter (FSC) was performed at day 15. The scatter plot shows R2 (percentage of positive cells (%), mean \pm SD). Histogram overlays showing isotype control goat IgG-CFL-647 (black line) and cTnT-CFL 647 (blue). (b) Percentage of cTnT-positive cells obtained by flow cytometry at day 15. Results are shown as mean \pm SD of three independent experiments ($n = 3$). Each condition was compared (Student's *t*-test) against control and factors against the directed cardiomyocyte differentiation protocol (MethoCult™ GF M3534 plus factors).

selection step for cardiomyocyte enrichment. The induction with the directed cardiomyocyte differentiation protocol significantly increased the differentiation efficiency toward an immature cardiomyocyte with a positive expression of early (Gata-4) and late cardiac differentiation markers (cTnT and Myh). Moreover, we also observed cardiomyocyte maturation features with the expression at day 21 of SERCa2.

ASC-derived cardiomyocyte protocol performed in the present study was assessed in three independent biological replicates, evaluating quantitatively the cardiomyocyte differentiation efficiency. The cardiomyocyte differentiation efficiency was measured with a quantitative tool. This is important because it is the only way to compare protocols and to know the number of cells that are useful for further applications. Flow cytometry is a reliable way to assess it because it is a high-sensitivity analytical tool [22]. So far, only

two studies and ours quantify the cardiomyocyte differentiation efficiency by flow cytometry [7, 16]. The great majority of ASC-derived cardiomyocyte protocols count the number of beating clones or the percentage of positive expressing cells for cardiac markers in a qualitative manner [6, 14, 17–19, 23, 29–31].

The proposed cardiomyocyte differentiation directed protocol in the present study improves the efficiency to obtain ASC-derived cardiac-like cells without any selection steps. Léobon and collaborators [7] propose a three-step process to improve cardiomyocyte differentiation efficiency from ASCs: (1) seed the ASCs in a methylcellulose medium until the cell clusters appear, (2) dissect under an inverted microscope to recollect manually the cell clusters, and (3) seed the recovered clusters in a BHK-21 liquid medium, obtaining two types of populations (nonadherent and adherent cells)

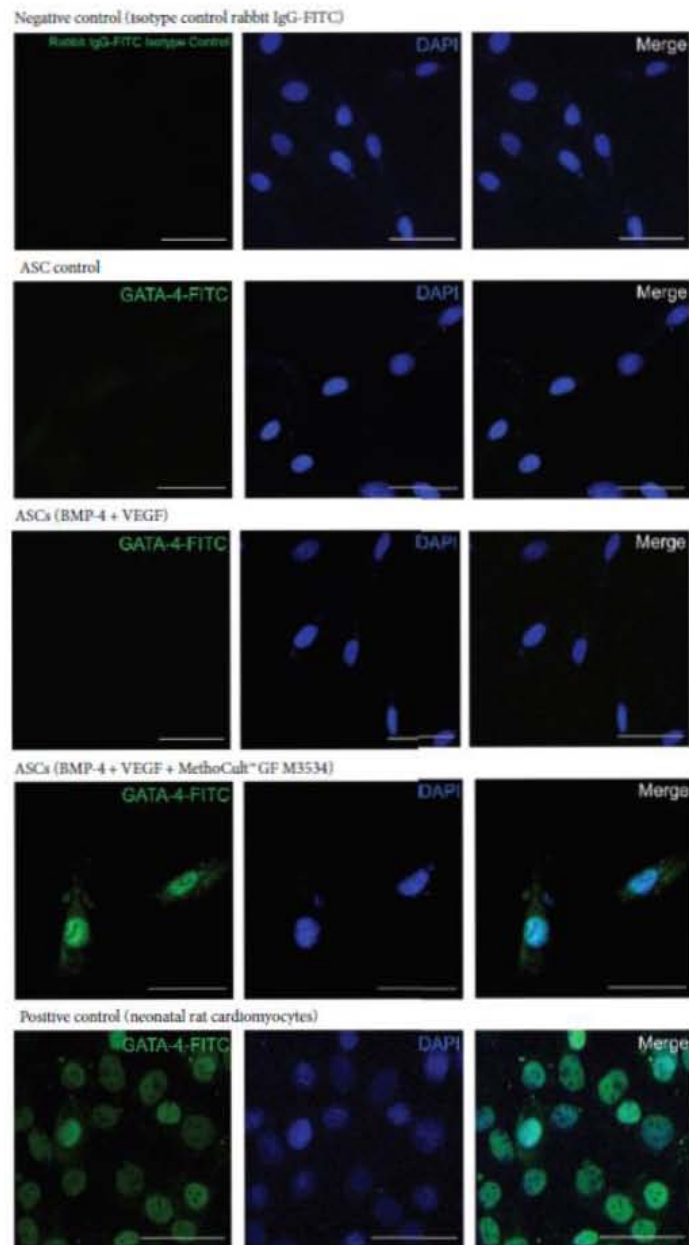


FIGURE 6: ASC-derived cardiomyocyte-like cells express cardiomyocyte markers. Immunostaining at day 21 for Gata-4 isotype control (negative control), ASC control, ASCs treated only with growth factors (BMP-4 and VEGF), and the directed cardiomyocyte differentiation protocol (MethoCult™ GF M3534 plus factors), and rat neonatal image cardiomyocyte, obtained by confocal microscopy (scale bars, 50 μm).

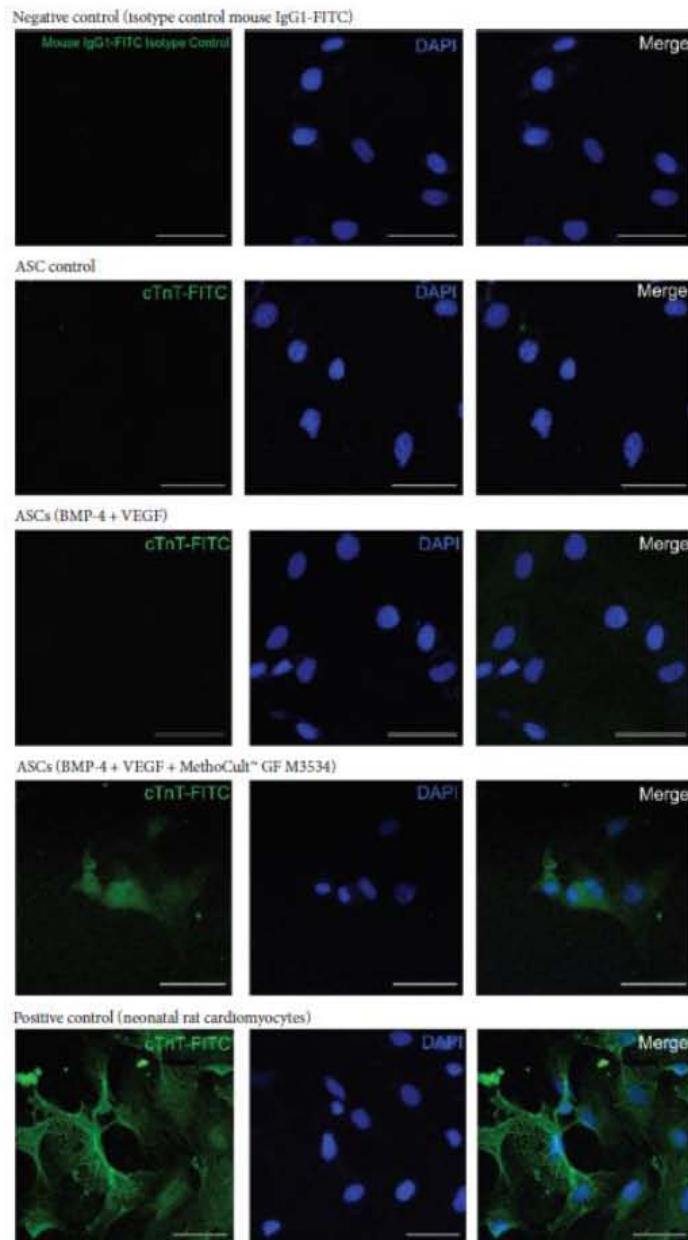


FIGURE 7: ASC-derived cardiomyocyte-like cells express cardiomyocyte markers. Immunostaining at day 21 for cTnT isotype control (negative control), ASC control, ASCs treated only with growth factors (BMP-4 and VEGF), and the directed cardiomyocyte differentiation protocol (MethoCult™ GF M3534 plus factors), and rat neonatal image cardiomyocyte, obtained by confocal microscopy (scale bars, 50 μm).

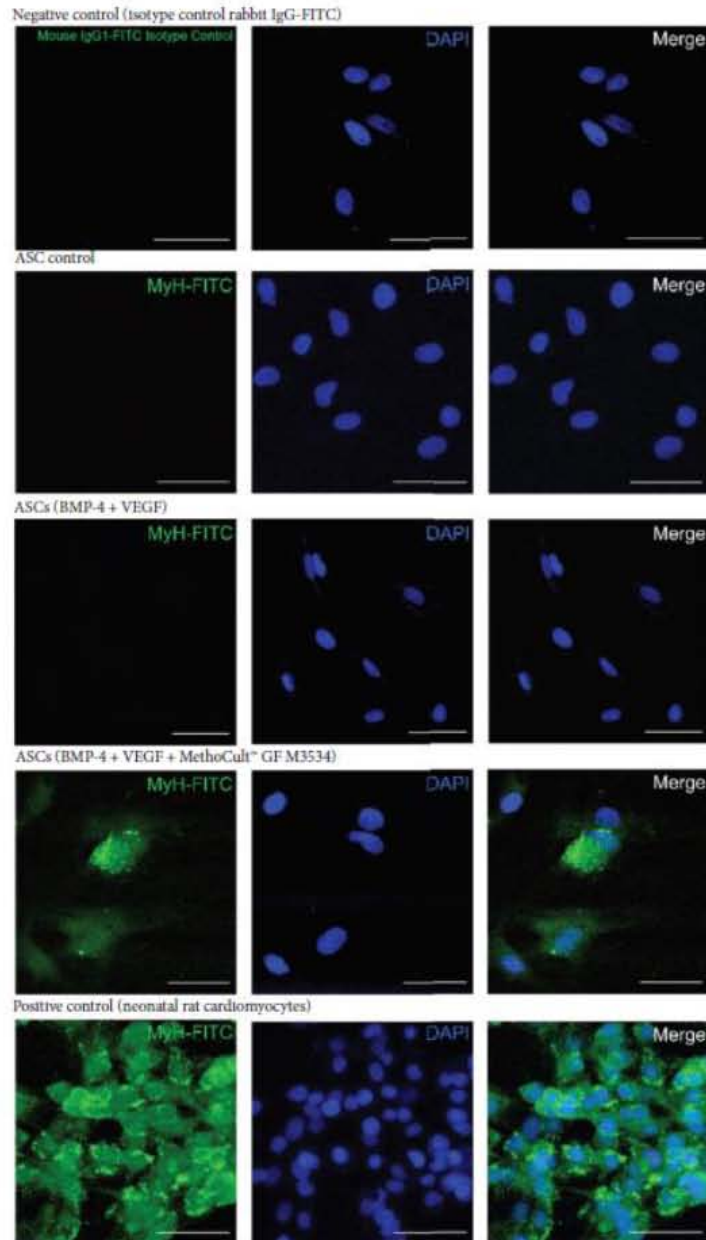


FIGURE 8: ASC-derived cardiomyocyte-like cells express cardiomyocyte markers. Immunostaining at day 21 for MyH. Isotype control (negative control), ASC control, ASCs treated only with growth factors (BMP-4 and VEGF), and the directed cardiomyocyte differentiation protocol (MethoCult™ GF M3534 plus factors), and rat neonatal image cardiomyocyte, obtained by confocal microscopy (Scale bars, 50 μ m).

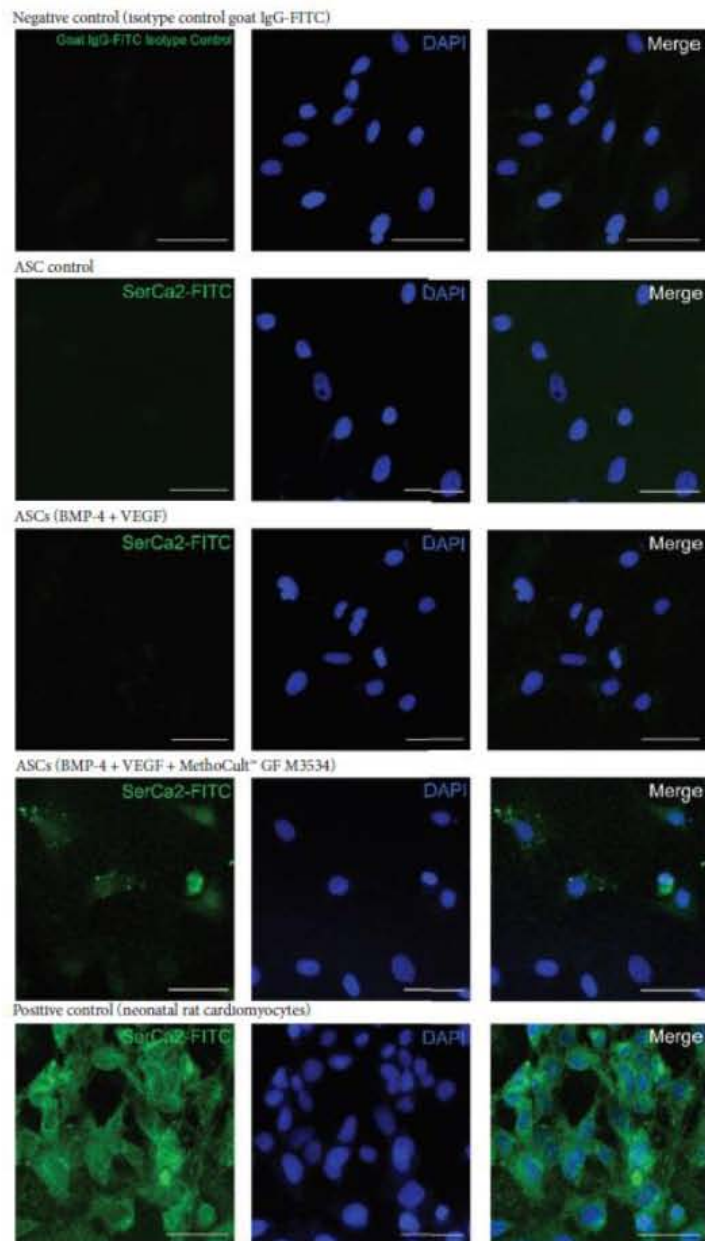


FIGURE 9: ASC-derived cardiomyocyte-like cells express cardiomyocyte markers. Immunostaining at day 21 for SerCa2. Isotype control (negative control), ASC control, ASCs treated only with growth factors (BMP-4 and VEGF), and the directed cardiomyocyte differentiation protocol (MethoCult™ GF M3534 plus factors), and rat neonatal image cardiomyocyte, obtained by confocal microscopy (scale bars, 50 μm).

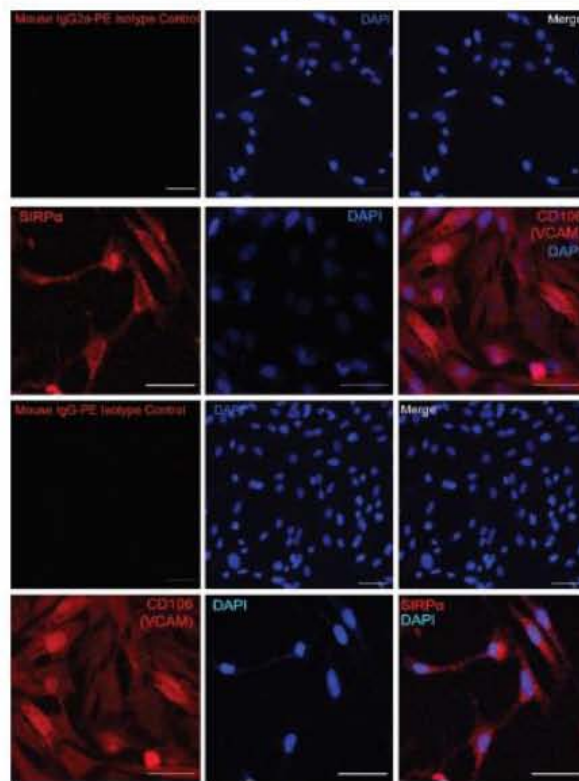
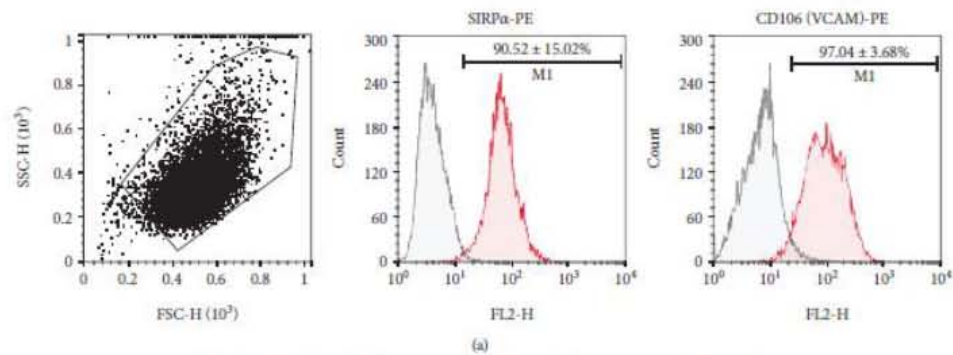


FIGURE 10: Undifferentiated ASCs highly express CD106 and SIRP α . (a) Flow cytometry histogram overlays, isotype control (black line) and CD106 or SIRP α (red), and percentage of CD106 and SIRP α positive cells obtained by flow cytometry; results are shown as mean \pm SD ($n = 3$). (b) Immunostaining for CD106, SIRP α , and isotype controls; image obtained by confocal microscopy (scale bars, 50 μ m).

approximately with 50% cTnT-positive cells each one [7]. If the selection step was not assessed, the percentage of cTnT-positive cells was reduced to 10% [7]. Our cardiac differentiation protocol showed similarly high differentiation

efficiency as the previously reported study [7], with a high percentage of cTnT-positive cells and the advantage of skipping the pick-up selection step for cardiomyocyte enrichment.

Compatible cardiomyocyte morphological changes were observed during the cell culture monitoring, such as elongated, bifurcated, and binucleated cells. The presence of a cellular alignment and the development of cell clusters resembling rosette-like structures caught our attention. The formation of these structures has been linked as an essential process in morphogenesis, both *in vitro* and *in vivo* [32]. Rosette-like structures observed in cultures treated with the directed cardiomyocyte differentiation protocols support the cardiomyocyte development from undifferentiated ASCs.

Unlike previous studies, no spontaneous beating that would allow us to perform a functional analysis was observed. Spontaneous beating or automatism in an *in vivo* environment is a characteristic of early fetal cardiomyocytes; as the development occurs, the cells become more specialized allowing the intervention of the nodal system, losing their automaticity as cells mature. Pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes show a significantly reduced SERCa2 expression, and only in the long term could cultures overcome its expression and enhance cardiomyocyte maturation [2]. Despite not having observed spontaneous beating cells in our differentiation protocol, the positive expression of a sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCa2) implicated in the control of calcium transportation in the cardiomyocyte endoplasmic reticulum shows a further cardiomyocyte maturation [33], which could explain in some way the lack of automatism in ASC-derived adult cardiomyocyte-like cells.

No surface marker capable of separating the ASC-derived cardiomyocytes has been reported before. So far, almost all pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes with high efficiency include a cardiomyocyte purification step to enhance the differentiation yield [11, 34–37]. In an attempt to obtain a purer population and a higher efficiency of ASC-derived cardiomyocytes-like cells, we considered to enrich by fluorescence-activated cell sorting using two iPSC-derived cardiomyocyte surface markers previously reported, CD106 (VCAM) and SIRP α (CD172a) [38, 39]; unfortunately, both were highly expressed in the undifferentiated ASCs making difficult its use for enrichment of the differentiated ASC-derived cardiac-like cells.

Cardiomyocyte development *in vitro* has a high grade of complexity; therefore, differentiating cells with a single small molecule or single growth factor is insufficient to induce cardiomyogenesis in ASCs. Cardiomyogenesis is an extremely complex process that depends on the interaction of different signaling pathways, in a time-, space-, and dose-dependent manner. To date, the better and high-efficiency stem cell differentiation protocols require the combination of several small molecules and growth factors, cocultures, and even three-dimensional structures, mimicking the embryonic cardiac development [1].

Not surprisingly, the directed cardiomyocyte differentiation protocol presented here that resembles the cardiac embryonic development with cardiac-specific growth factors and cardiogenic cytokines breaks the paradigm that undifferentiated ASCs should be treated differently as pluripotent stem cells in matters of cardiomyocyte differentiation. Stimulation with growth factors or small molecules critically

involved in cardiomyogenesis was also evaluated in other protocols, such as the use of TGF- β 1 [16] or Wnt noncanonical antagonist (Wnt5a + Dkk1) [23]. Both studies result in an induction of cardiac-like cells of cultured ASCs. Moreover, some undifferentiated ASCs have been reported with a positive expression of pluripotent markers, such as Oct3/4, Sox2, Nanog, SSEA-3, and SSEA-4 [40–42], supporting this hypothesis.

Despite the high efficiency observed to obtain cardiomyocyte-like cells with the presented method, more research is needed to optimize differentiation toward a more mature and functional cardiomyocyte for modeling-disease or pathophysiological applications. However, probably induced ASCs toward a cardiac lineage with the present directed cardiomyocyte differentiation protocol could be transplanted in an *in vivo* environment to continue the maturation process and, at the same time, could amend the infarction myocardium to a better prognosis [18, 43].

It is crucial to look for an appropriate ASC-derived cardiomyocyte-like cell cardiac surface marker as it would be advantageous for an enrichment step that could increment considerably the differentiation efficiency. The high cost of the growth factors can limit the present protocol for scale-up purposes; substituting them with interchangeable small molecules implicated in the cardiogenic signaling pathways could lower the cost. This novel and easy method could be useful as a basis for further research in cardiomyocyte differentiation from ASCs. Evaluation of the present protocol in human ASCs is very important: once efficiency in human cells is proven, this method could be implemented in different applications, such as disease modeling, cell therapy, and drug discovery.

5. Conclusions

The ASC-derived cardiomyocyte is a suitable alternative for clinical applications, but cardiomyocyte development *in vitro* has a high grade of complexity. For that reason, it is important to search and describe the most appropriate protocol to ensure optimal results. The combination of BMP-4 and VEGF plus a semisolid methylcellulose-based medium containing IL-3 and IL-6 appears to be a good inducer of cardiac differentiation in the present protocol with a high differentiation efficiency. It is a challenge to identify the best combinatorial, but this is an example that by stimulating the pathways involved in embryonic cardiomyogenesis, we can increase the efficiency of cardiomyocyte differentiation derived from ASCs. Clinical applications will be possible for a long term and with further research.

Data Availability

Access to the datasets used to support the findings of this study will be considered by the author upon request.

Disclosure

Some advances of this research were presented as part of an internal academic activity held in our institution ("V

Jornadas de Investigación del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, August 2018). The abstract presented in this internal academic activity was not published in any abstract book or elsewhere.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

Financial support was provided by the Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico. We acknowledge the support provided by CONACyT granting a Ph.D. scholarship during 3 years to B.R.L.I.

Supplementary Materials

Supplementary Table 1: list of primary and secondary antibodies used for flow cytometry and immunofluorescence. Supplementary Figure 1: undifferentiated ASC immunostaining for CD90, image obtained by confocal microscopy (scale bars, 50 μm). Supplementary Figure 2: bar plots containing the mean fluorescence intensity of the immunofluorescence images for different cardiac markers in ASCs control, BMP4 + VEGF, BMP-4 + VEGF plus MethoCult™ GF M3534, and rat neonatal cardiomyocytes. Results are shown as the mean \pm SD. MFI was analyzed with ZEN 2.5 Blue edition software, Carl Zeiss AG. (Supplementary Materials)

References

- [1] P. W. Burridge, G. Keller, J. D. Gold, and J. C. Wu, "Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming," *Cell Stem Cell*, vol. 10, no. 1, pp. 16–28, 2012.
- [2] M. E. Hartman, D. F. Dai, and M. A. Laflamme, "Human pluripotent stem cells: prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for in vitro modeling and cell-based cardiac repair," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 96, pp. 3–17, 2016.
- [3] M. F. Pittenger and B. J. Martin, "Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics," *Circulation Research*, vol. 95, no. 1, pp. 9–20, 2004.
- [4] J. M. Gimble, A. J. Katz, and B. A. Bunnell, "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine," *Circulation Research*, vol. 100, no. 9, pp. 1249–1260, 2007.
- [5] M. N. Banerjee, R. Bolli, and J. M. Hare, "Clinical studies of cell therapy in cardiovascular medicine: recent developments and future directions," *Circulation Research*, vol. 123, no. 2, pp. 266–287, 2018.
- [6] V. Planat-Bénard, C. Menard, M. André et al., "Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells," *Circulation Research*, vol. 94, no. 2, pp. 223–229, 2004.
- [7] B. Léobon, J. Roncalli, C. Joffre et al., "Adipose-derived cardiomyogenic cells: in vitro expansion and functional improvement in a mouse model of myocardial infarction," *Cardiovascular Research*, vol. 83, no. 4, pp. 757–767, 2009.
- [8] X. Wu, S. Ding, Q. Ding, N. S. Gray, and P. G. Schultz, "Small molecules that induce cardiomyogenesis in embryonic stem cells," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, no. 6, pp. 1590–1591, 2004.
- [9] M. A. Laflamme, K. Y. Chen, A. V. Naumova et al., "Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts," *Nature Biotechnology*, vol. 25, no. 9, pp. 1015–1024, 2007.
- [10] Y.-Y. Cheng, Y.-T. Yan, D. J. Lundy et al., "Reprogramming-derived gene cocktail increases cardiomyocyte proliferation for heart regeneration," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 9, no. 2, pp. 251–264, 2017.
- [11] N. Cao, Y. Huang, J. Zheng et al., "Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules," *Science*, vol. 352, no. 6290, pp. 1216–1220, 2016.
- [12] Y. Zhang, D. Wang, M. Chen, B. Yang, F. Zhang, and K. Cao, "Intramyocardial transplantation of undifferentiated rat induced pluripotent stem cells causes tumorigenesis in the heart," *PLoS One*, vol. 6, no. 4, article e19012, 2011.
- [13] J. K. Fraser, R. Schreiber, B. Strem et al., "Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes," *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine*, vol. 3, pp. S33–S37, 2006.
- [14] S. Rangappa, C. Fen, E. H. Lee, A. Bongso, and E. S. K. Wei, "Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes," *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 75, no. 3, pp. 775–779, 2003.
- [15] Y. S. Choi, G. J. Dusting, S. Stubbs et al., "Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 14, no. 4, pp. 878–889, 2010.
- [16] S.-J. Gwak, S. H. Bhang, H. S. Yang et al., "In vitro cardiomyogenic differentiation of adipose-derived stromal cells using transforming growth factor- β 1," *Cell Biochemistry and Function*, vol. 27, no. 3, pp. 148–154, 2009.
- [17] E. Park and A. N. Patel, "PKC-delta induces cardiomyogenic gene expression in human adipose-derived stem cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 393, no. 4, pp. 582–586, 2010.
- [18] J. S. Burchfield, A. L. Paul, V. Lanka et al., "Pharmacological priming of adipose-derived stem cells promotes myocardial repair," *Journal of Investigative Medicine*, vol. 64, no. 1, pp. 50–62, 2016.
- [19] K. G. Gaustad, A. C. Boquest, B. E. Anderson, A. M. Gerdes, and P. Collas, "Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 314, no. 2, pp. 420–427, 2004.
- [20] C. L. Mummery, J. Zhang, E. S. Ng, D. A. Elliott, A. G. Elefanti, and T. J. Kamp, "Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview," *Circulation Research*, vol. 111, no. 3, pp. 344–358, 2012.
- [21] X. Lian, C. Hsiao, G. Wilson et al., "Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 27, pp. E1848–E1857, 2012.
- [22] S. Bhattacharya, P. W. Burridge, E. M. Kropp et al., "High efficiency differentiation of human pluripotent stem cells to cardiomyocytes and characterization by flow cytometry," *Journal of Visualized Experiments*, no. 91, 2014.

- [23] N. J. Palpant, S. Yasuda, O. MacDougald, and J. M. Metzger, "Non-canonical Wnt signaling enhances differentiation of Sca1⁺/c-kit⁺ adipose-derived murine stromal vascular cells into spontaneously beating cardiac myocytes," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 43, no. 3, pp. 362–370, 2007.
- [24] Y.-J. Chen, H.-Y. Liu, Y.-T. Chang et al., "Isolation and differentiation of adipose-derived stem cells from porcine subcutaneous adipose tissues," *Journal of Visualized Experiments*, vol. 109, no. 109, article e53886, 2016.
- [25] T. M. Schultheiss, J. B. Burch, and A. B. Lassar, "A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis," *Genes & Development*, vol. 11, no. 4, pp. 451–462, 1997.
- [26] L. Yang, M. H. Soonpaa, E. D. Adler et al., "Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR⁺ embryonic-stem-cell-derived population," *Nature*, vol. 453, no. 7194, pp. 524–528, 2008.
- [27] L. Ye, S. Zhang, L. Greder et al., "Effective cardiac myocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells requires VEGF," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, article e53764, 2013.
- [28] M. A. D'amico, B. Ghinassi, P. Izzicupo, A. di Ruscio, and A. di Baldassarre, "IL-6 activates PI3K and PKC ζ signaling and determines cardiac differentiation in rat embryonic H9c2 cells," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 231, no. 3, pp. 576–586, 2016.
- [29] A. van Dijk, H. W. M. Niessen, B. Zandieh Doulabi, F. C. Visser, and F. J. van Milligen, "Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin," *Cell and Tissue Research*, vol. 334, no. 3, pp. 457–467, 2008.
- [30] Z. Bagheri-Hosseinabadi, P. Salehinejad, and S. A. Mesbah-Namin, "Differentiation of human adipose-derived stem cells into cardiomyocyte-like cells in fibrin scaffold by a histone deacetylase inhibitor," *Biomedical Engineering Online*, vol. 16, no. 1, p. 134, 2017.
- [31] G. Yang, Z. Xiao, X. Ren et al., "Obtaining spontaneously beating cardiomyocyte-like cells from adipose-derived stromal vascular fractions cultured on enzyme-crosslinked gelatin hydrogels," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- [32] M. J. Harding, H. F. McGraw, and A. Nechiporuk, "The roles and regulation of multicellular rosette structures during morphogenesis," *Development*, vol. 141, no. 13, pp. 2549–2558, 2014.
- [33] A. C. Fijnvandraat, A. C. G. van Ginneken, P. A. J. de Boer et al., "Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube," *Cardiovascular Research*, vol. 58, no. 2, pp. 399–409, 2003.
- [34] I. Kehat, D. Kenyagin-Karsenti, M. Snir et al., "Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 108, no. 3, pp. 407–414, 2001.
- [35] C. Mummery, D. Ward-van Oostwaard, P. Doevendans et al., "Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells," *Circulation*, vol. 107, no. 21, pp. 2733–2740, 2003.
- [36] C. Xu, S. Police, M. Hassanipour, and J. D. Gold, "Cardiac bodies: a novel culture method for enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells," *Stem Cells and Development*, vol. 15, no. 5, pp. 631–639, 2006.
- [37] F. Hattori, H. Chen, H. Yamashita et al., "Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes," *Nature Methods*, vol. 7, no. 1, pp. 61–66, 2009.
- [38] H. Uosaki, H. Fukushima, A. Takeuchi et al., "Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression," *PLoS One*, vol. 6, no. 8, article e23657, 2011.
- [39] N. C. Dubois, A. M. Craft, P. Sharma et al., "SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells," *Nature Biotechnology*, vol. 29, no. 11, pp. 1011–1018, 2011.
- [40] R. Izadpanah, C. Trygg, B. Patel et al., "Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 99, no. 5, pp. 1285–1297, 2006.
- [41] Y. Kuroda, S. Wakao, M. Kitada, T. Murakami, M. Nojima, and M. Dezawa, "Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells," *Nature Protocols*, vol. 8, no. 7, pp. 1391–1415, 2013.
- [42] S.-M. Han, S.-H. Han, Y.-R. Koh et al., "Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells," *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 46, no. 6, article e101, 2014.
- [43] B. M. Strem, M. Zhu, Z. Alfonso et al., "Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury," *Cytotherapy*, vol. 7, no. 3, pp. 282–291, 2005.

Anexo 2.

Tabla 1. Experimentos de diferenciación cardíaca a partir de ASC.

ID	Condiciones del cultivo	Días	Eficiencia de diferenciación a cardiomiocito (% Troponina T)	Observaciones
1	BMP[10]+ FGF2[50]	14	6.3 %	NOC
2	BMP4 +FGF2 (DMEM/HAMF10/M-199)	14	12.4 %	NOC
3	BMP4 +VEGF +NRG1+ DMSO	-	NV	DMSO 1% (Tóxico para las células)
4	BMP4 + FGF2+VEGF+NRG1+IL6	14	4 %	NOC
5	AdA20 +BMP4+VEGF+IL6+IGF1+HGF	14/21	10.3 %/2.91 %	Células rectangulares binucleadas/alineamiento celular
6	Cocultivo directo	11	NV	Crecimiento de células pequeñas de morfología cúbica con crecimiento rápido (Suspendido)
7	Cocultivo indirecto	14	16.7 %	Células alargadas/patrón de alineamiento IF (7d): Nkx2.5-/MyH-/TnT-
8	Cardiogenol C	15	7.4 %	Células con estructuras similares a miofilamentos/Células rectangulares
9	M3134+ BMP4+VEGF+IL6	14	18.3 %	Células rectangulares a partir del día 5.
10	M3534 (IL3, IL6 y SCF) + BMP4+VEGF	15/21	44 %	Morfología compatible con cardiomiocito. IP (21d): Gata4+/TnT+/MyH+/SerCa2+ Ibarra-Ibarra BR., <i>Stem cell International</i> , 2019.

*En color verde se indican los protocolos de diferenciación con mayor eficiencia de diferenciación a cardiomiocito.
 NOC: No se observaron cambios morfológicos compatible con cardiomiocito.
 NV: No valorable

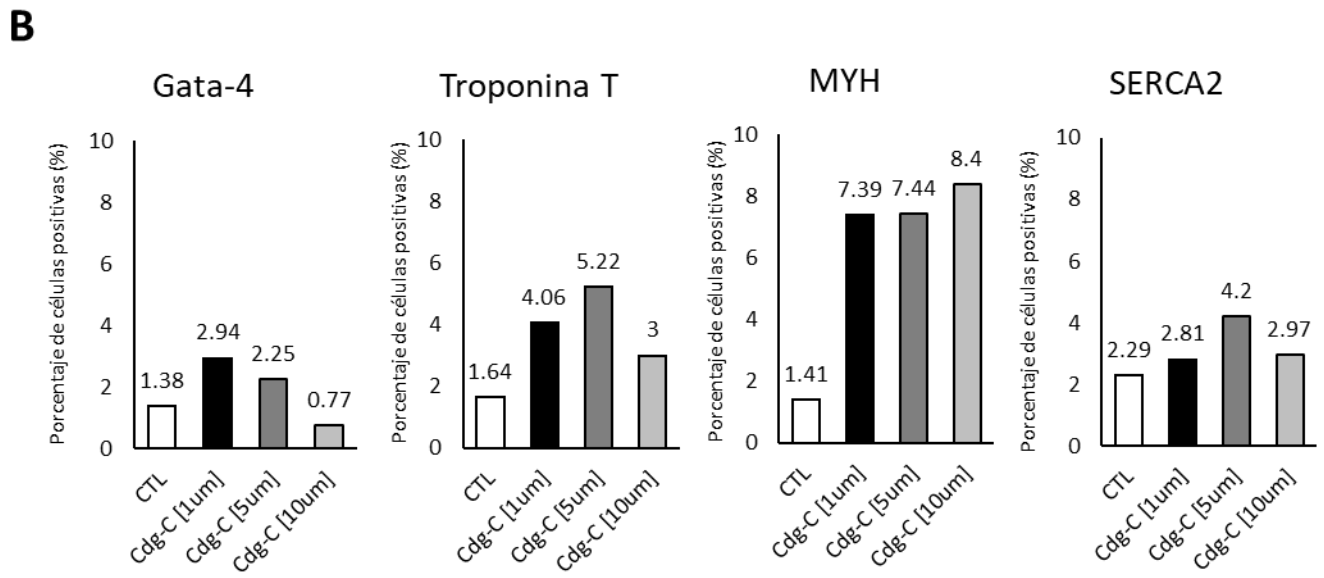


Figura 1. A) Esquema del experimento (días). **B)** Gráficas del porcentaje de células positivas por citometría de flujo para los marcadores de diferenciación cardíaca Gata-4, TnT, Myh y SerCa2 para las diferentes condiciones de cultivo a los 15 días.

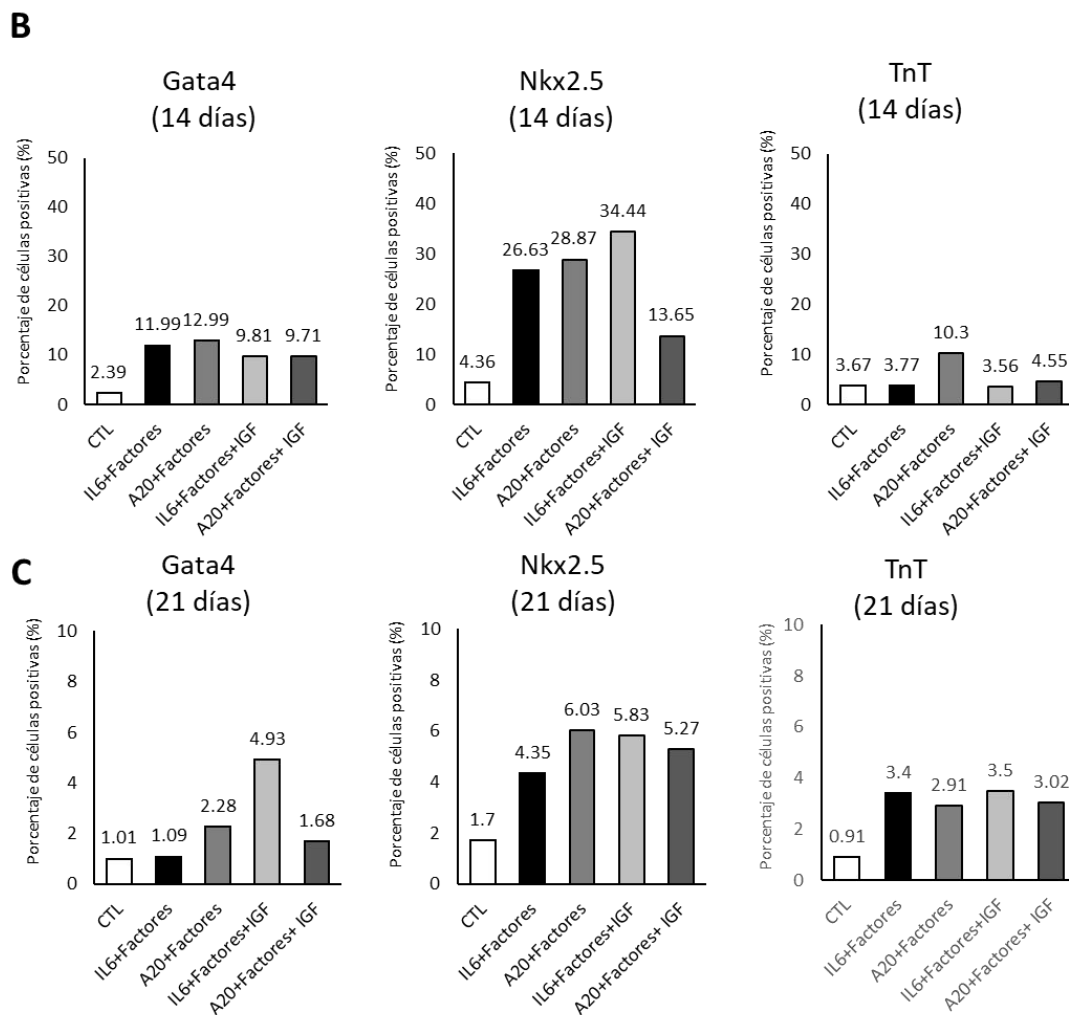
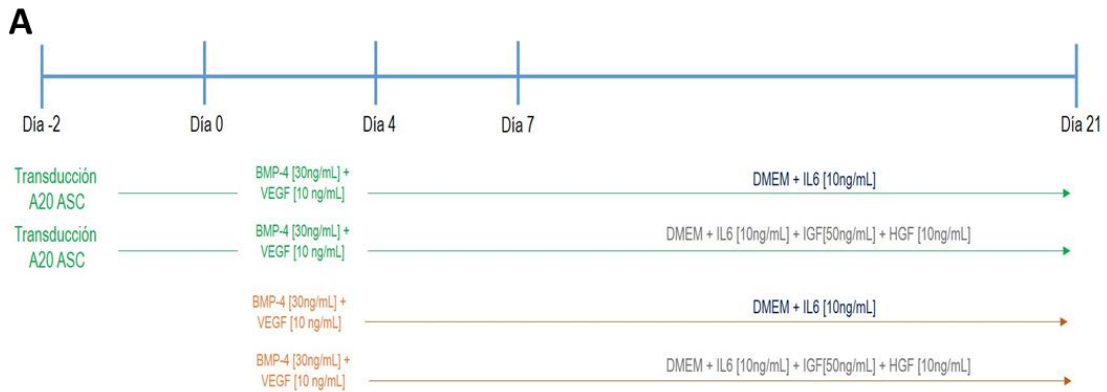


Figura 2. A) Esquema del experimento (días). **B)** Gráficas del porcentaje de células positivas por citometría de flujo para los marcadores de diferenciación cardíaca Gata-4, Nkx2.5 y TnT para las diferentes condiciones de cultivo a los 14 días. **C)** Gráficas del porcentaje de células positivas por citometría de flujo para los marcadores de diferenciación cardíaca Gata-4, Nkx2.5 y TnT para las diferentes condiciones de cultivo a los 21 días.

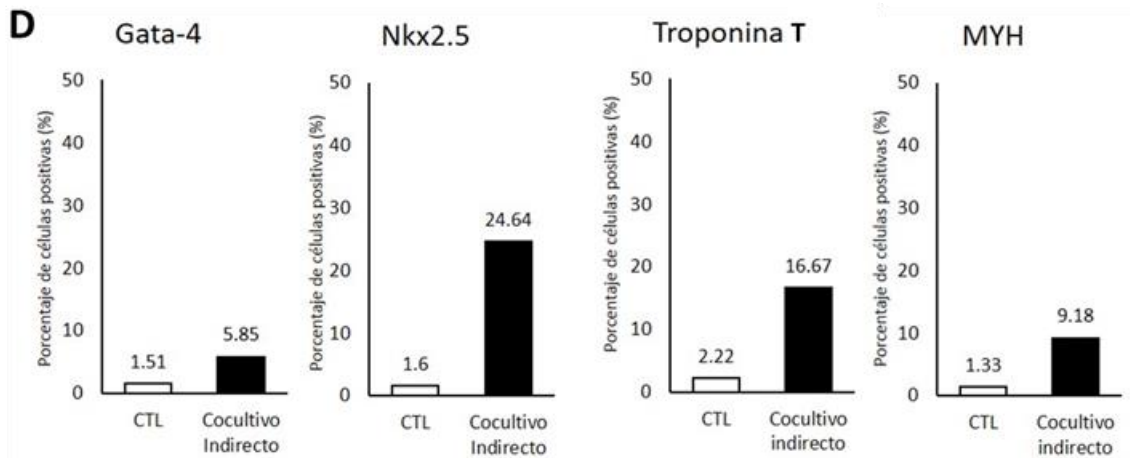
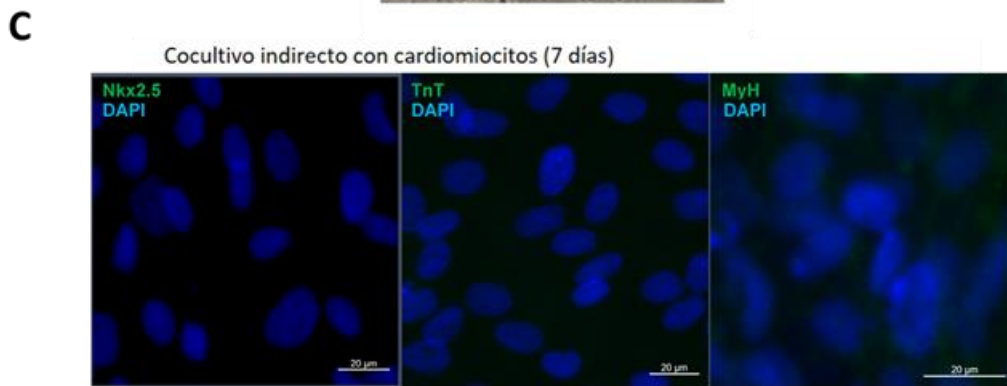
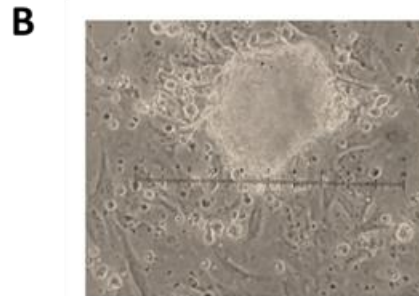


Figura 3. A) Esquema del experimento (días) **B)** Imágenes del cultivo de cardiomiocitos neonatales. **C)** Imágenes obtenidas con microscopio confocal de las inmunofluorescencias de las ASC a los 7 días de cocultivo indirecto. **D)** Gráficas del porcentaje de células positivas por citometría de flujo para los marcadores de diferenciación cardíaca Gata-4, TnT y Myh para las diferentes condiciones de cultivo a los 14 días.

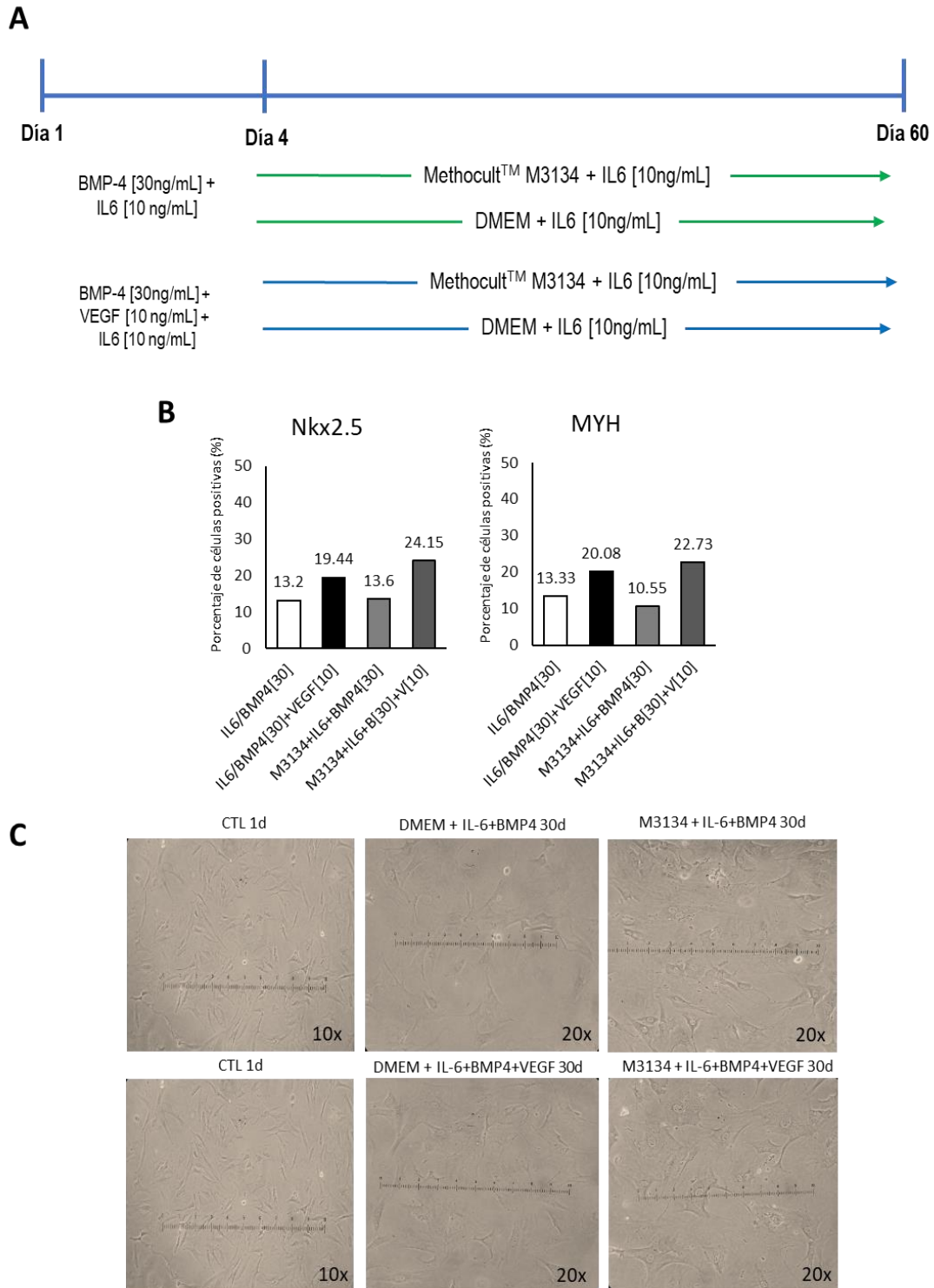


Figura 4. **A)** Esquema del experimento (días). **B)** Gráficas del porcentaje de células positivas por citometría de flujo para los marcadores de diferenciación cardíaca Nkx2.5 y Myh para las diferentes condiciones de cultivo a los 30 días. **C)** Imágenes de los días 1 y 30 de las diferentes condiciones de cultivo.