

ÍNDICE

Agradecimientos.....	5
Abreviaturas.....	13
Resumen.....	15
Summary.....	16
Resum.....	17
INTRODUCCIÓN	
1. Infarto agudo de miocardio.....	21
1.1. Definición.....	21
1.1.1. Síntomas del IAM.....	21
1.1.2. Cambios electrocardiográficos.....	21
1.1.3. Biomarcadores de daño cardíaco.....	22
1.2. Epidemiología.....	22
1.3. Clasificación clínica.....	22
1.4. Tratamiento general del IAM.....	23
1.4.1. Estrategias terapéuticas en el STEMI.....	24
1.4.2. Estrategias terapéuticas en el NSTEMI.....	25
1.4.3. Terapias antitrombóticas.....	25
1.5. Papel de la inflamación en el IAM.....	25
1.5.1. Fase proinflamatoria.....	27
1.5.2. Fase pro-resolutiva o antiinflamatoria.....	30
1.5.3. Los macrófagos en el IAM.....	32
1.5.4. Los neutrófilos en el IAM.....	35
1.5.5. Los fibroblastos cardíacos en el IAM.....	36
1.5.6. Tratamientos frente la inflamación en el IAM.....	37
2. Terapia celular: células mesenquimales estromales.....	38

2.1. MSC: origen, definición, fuentes.....	39
2.2. Propiedades terapéuticas MSC.....	40
2.2.1. Propiedades tróficas de las MSC.....	40
2.2.2. Propiedades inmunomoduladoras de las MSC.....	41
2.3. MSC en IAM.....	42
3. Vesículas extracelulares (EVs).....	44
3.1. Definición y biogénesis.....	44
3.2. Composición.....	48
3.3. Métodos de aislamiento y caracterización de las EVs.....	50
3.3.1. Aislamiento de las EVs.....	50
3.3.2. Caracterización de las EVs.....	51
3.4. Efectos terapéuticos de las EVs derivadas de MSC.....	52
3.4.1. Efecto inmunomodulador de las EVs.....	52
3.4.2. Efecto regenerativo.....	55
3.5. Efecto terapéutico de las MSC-EVs en IAM.....	56
3.6. Las MSC-EVs como producto biológico terapéutico: ventajas y retos.....	57
3.6.1. Ventajas de las terapias basadas en MSC-EVs.....	57
3.6.2. Retos de las terapias basada en MSC-EVs.....	62
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
1. Hipótesis.....	65
2. Objetivos.....	65
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Declaraciones éticas.....	69
2. Cultivos celulares.....	69
2.1. Cultivos primarios.....	69

2.1.1. MSC inmortalizadas mediante la sobreexpresión de hTERT.....	69
2.1.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.....	69
2.1.3. Aislamiento y diferenciación de monocitos.....	70
2.1.4. Aislamiento y cultivo de neutrófilos.....	70
2.1.5. Cultivo de fibroblastos cardíacos humanos.....	72
3. Aislamiento de vesículas extracelulares.....	72
3.1. Ultracentrifugaciones seriadas (UC).....	72
3.2. Filtración de flujo tangencial-cromatografía de exclusión por tamaño (TFF-SEC).....	73
4. Caracterización de EVs	73
4.1. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).....	73
4.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	73
4.3. Análisis por dispersión dinámica de luz (DLS).....	73
4.4. Caracterización mediante reflectancia total atenuada - Infrarrojo por transformada de Fourier (ATR-FTIR).....	74
4.5. Imágenes de fluorescencia e interferometría de una sola partícula con ExoView®	74
5. Análisis proteómico de las EVs.....	75
6. Análisis lipidómico de las EVs.....	76
7. Secuenciación de miRNAs presentes en las EVs.....	76
8. Análisis de expresión génica.....	77
8.1. Extracción de ARN.....	77
8.2. Retrotranscripción de ARN.....	77
8.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).....	77

9. Análisis de expresión proteica.....	79
9.1. Western Blot.....	79
9.1.1. Extracción de proteína.....	79
9.1.2. Cuantificación de proteínas mediante ensayo de BCA.....	79
9.1.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	80
9.1.4. Transferencia a membrana de PVDF.....	81
9.1.5. Inmunodetección.....	81
9.2. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA).....	82
9.3. Ensayo MPO.....	83
10. Análisis de marcadores de monocitos por citometría de flujo.....	84
11. Ensayo funcional de eferocitosis.....	84
12. Ensayo de apoptosis con Anexina V y ioduro de propidio (PI).....	85
13. Ensayo de proliferación de linfocitos T.....	85
14. Ensayo de estrés oxidativo in vitro con DCFH-DA.....	86
15. Modelo experimental de infarto agudo de miocardio in vivo.....	87
15.1. Animales.....	87
15.2. Procedimiento de infarto agudo de miocardio y administración de EVs.....	87
15.3. Ecocardiografía en ratas.....	88
15.4. Sacrificio de los animales.....	88
15.4.1. Fijación por perfusión.....	88
15.4.2. Criopreservación de tejido.....	89
15.5. Técnicas histológicas.....	89
15.5.1. Inclusión en parafina y corte de los corazones.....	89
15.5.2. Desparafinación del tejido.....	90
15.5.3. Tinción de Tricrómico de Masson.....	90
15.5.4. Inmunofluorescencia en tejido.....	91

15.5.5. Medida del tamaño de infarto.....	92
15.6. Homogeneizado de tejido.....	92
15.7. Array de citocinas.....	92
16. Análisis estadístico.....	93
RESULTADOS	
1. Mejora del rendimiento en la extracción de MSC-EVs.....	97
2. Las EVs obtenidas de tres biopsias distintas de MSC presentan características y cargos similares.....	101
2.1. Los procesos biológicos en los que está implicado el cargo proteico de las EVs son iguales independientemente de la biopsia.....	104
2.2. El contenido lipídico de las EVs no varía entre las distintas biopsias de MSC.....	107
2.3. Los miRNAs cargados en las EVs son similares entre las biopsias y participan en procesos de inmunoregulación.....	108
3. Las MSC-EVs inducen la polarización in vitro de los macrófagos M1 hacia un fenotipo pro-resolutivo similar al de los M2.....	110
3.1. El tratamiento con EVs modifica los marcadores de membrana presentes en los macrófagos M1.....	110
3.2. Las EVs aumentan la capacidad de eferocitosis de los macrófagos.....	114
4. Las EVs modulan la expresión génica y el estrés oxidativo de los neutrófilos en presencia y ausencia de estímulos inflamatorios.....	116
5. Las EVs reducen la proliferación de PBMCs activadas.....	118
6. Las EVs modifican la expresión de genes implicados en el depósito de matriz extracelular en fibroblastos cardiacos humanos (HCF).....	119
7. Potencial inmunomodulador de las EVs en un modelo in vivo de infarto agudo de miocardio (IAM).....	121
7.1. Las EVs amortiguan el deterioro de la función cardíaca tras el IAM.....	123

7.2. El tejido cicatricial que se genera tras el IAM es menor tras el tratamiento con EVs.....	124
7.3. Las EVs reducen la expresión génica y proteica de marcadores de macrófagos M1 en la zona infartada a los 7 días tras el IAM.....	125
7.4. El tratamiento con EVs reduce el número de macrófagos M1 infiltrados en la zona de infarto.....	127
7.5. La zona infartada de ratas tratadas con EVs tienen un perfil de citocinas diferente a la de ratas tratadas con PBS.....	132
7.6. Las EVs reducen la infiltración y la activación de los neutrófilos tras el IAM.....	134
7.7. El tratamiento con EVs de DP-MSC no afecta a la angiogénesis tras el IAM.....	136

DISCUSIÓN

1. Las EVs derivadas de MSC como producto biológico.....	141
2. Capacidad inmunosupresora de las EVs de DP-MSC in vitro.....	144
3. Potencial terapéutico de las EVs de DP-MSC en un modelo in vivo de IAM.....	147

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA