

# Índice de contenidos

<b>Resumen</b> .....	11
<b>Abreviaturas</b> .....	14
<b>Introducción</b> .....	17
<b>1. El sistema cardiovascular humano</b> .....	<b>19</b>
1.1. Anatomía básica del corazón .....	19
1.2. Composición celular del corazón .....	20
1.3. Fisiología del corazón .....	22
<b>2. Enfermedades cardiovasculares</b> .....	<b>23</b>
2.1 Fisiopatología de la enfermedad coronaria .....	24
2.3. Mecanismos que conducen a la pérdida de CM: Daño por IR .....	29
2.4. Mecanismos y dinámica de activación de los Fb cardíacos .....	31
2.2. Insuficiencia cardíaca .....	33
<b>3. Terapia celular</b> .....	<b>33</b>
3.1. Células estromales mesenquimales.....	34
3.2. MSCs en terapia cardíaca .....	35
<b>4. Vesículas extracelulares</b> .....	<b>37</b>
4.1. Biogénesis de las EVs.....	38
4.1.1. Exosomas .....	39
4.1.2. Microvesículas .....	41
4.2. Las EVs como mecanismo de comunicación .....	42
4.3. EVs y su papel en la regeneración cardíaca .....	43
4.3.1. EVs y promoción de la angiogénesis.....	43
4.3.2. EVs y reducción de la apoptosis .....	44
4.3.3. EVs y resolución de la inflamación .....	45
<b>5. Mejora del potencial terapéutico de las EVs</b> .....	<b>45</b>
5.1. La vía de señalización de la OSM.....	46
5.2. La vía de señalización de Notch .....	47
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	53
<b>1. Hipótesis</b> .....	<b>55</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>55</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	57

<b>1. Cultivos celulares.....</b>	<b>59</b>
1.1. MSC .....	59
1.2. Fibroblastos cardíacos humanos (HCF) .....	59
1.3. Células endoteliales humanas (HUVEC) .....	59
1.4. Cardiomiocitos de rata (H9c2) .....	60
1.5. Células empaquetadoras (HEK-293T).....	60
<b>2. Modificación genética de MSC .....</b>	<b>60</b>
2.1. Producción de partículas virales .....	60
2.1.1. Transformación de bacterias.....	60
2.1.2. Producción y aislamiento del plásmido .....	61
2.1.3. Generación de lentivirus con las células HEK-293T .....	61
2.2. Infección de MSCs .....	62
<b>3. Aislamiento y caracterización de EVs.....</b>	<b>62</b>
3.1. Aislamiento de EVs por ultracentrifugación .....	63
3.2. Aislamiento de EVs por TFF y SEC .....	63
3.3. Cuantificación y caracterización de las EVs.....	64
3.4. Análisis proteómico de las EVs.....	65
3.5. Análisis de miARNseq de las EVs.....	66
<b>4. Análisis de expresión génica .....</b>	<b>67</b>
4.1 Análisis de ARN.....	67
4.1.1 Extracción de ARN .....	67
4.1.2 Retrotranscripción .....	67
4.1.3 RT-PCR .....	68
4.2 Análisis de miARN .....	69
4.2.1 Extracción de miARN .....	69
4.2.2 Retrotranscripción .....	70
4.2.3 RT-PCR .....	70
<b>5. Análisis de expresión de proteínas .....</b>	<b>71</b>
5.1 Western blot .....	71
5.1.1 Extracción de proteínas .....	71
5.1.2 Cuantificación de proteínas.....	71
5.1.3 Electroforesis de proteínas.....	71
5.1.4 Transferencia y detección de proteínas .....	72
5.2 Inmunocitoquímica .....	72
<b>6. Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad .....</b>	<b>73</b>

6.1 CCK-8 .....	73
6.2 Cuantificación de la actividad LDH .....	74
6.3 DCFH-DA .....	74
6.4 MitoSOX .....	75
<b>7. Modelo de hipertrofia <i>in vitro</i> .....</b>	<b>75</b>
<b>8. Inducción de la fibrosis <i>in vitro</i> .....</b>	<b>75</b>
<b>9. Ensayo de cierre de herida en HCF .....</b>	<b>76</b>
<b>10. Ensayo de formación de tubos en Matrigel .....</b>	<b>76</b>
<b>11. Modelos <i>in vivo</i> .....</b>	<b>77</b>
11.1 Modelo de insuficiencia cardíaca inducida por isoproterenol .....	77
11.2 Modelo de estenosis aórtica mediante constricción .....	77
11.3 Sacrificio y perfusión .....	78
<b>12. Histología .....</b>	<b>78</b>
12.1 Inclusión en parafina .....	78
12.2 Corte y desparafinado .....	79
12.3 Tinción con Picrosirius Rojo .....	79
12.4 Inmunofluorescencias en tejido .....	79
<b>13. Análisis estadístico .....</b>	<b>80</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>82</b>
<b>1. Sobreexpresión de OSM fusionada a CD81 en MSC .....</b>	<b>85</b>
1.1 Generación de la línea de MSC-OSM .....	85
1.2 La expresión de los receptores de OSM en fibroblastos ventriculares humanos aumenta tras la estimulación con TGF- $\beta$ 1 .....	91
1.3 Las MutOSM-CD81-EVs suprimen la proliferación de fibroblastos ventriculares cardíacos humanos después de la privación de nutrientes .....	92
1.4 Las EVs enriquecidas con MatOSM y mutOSM contrarrestan la expresión de Telo- colágeno $1\alpha$ 1 en un modelo <i>in vitro</i> de fibrosis cardíaca .....	94
1.5 Las MutOSM-CD81-EVs reducen la fibrosis cardíaca en un modelo de infarto de miocardio de tipo 2 inducido por isoproterenol .....	96
1.6 Las MutOSM-CD81-EVs muestran una tendencia a la reducción de la fibrosis en el modelo de TAC .....	100
<b>2. Sobreexpresión de N1ICD y HIF1A .....</b>	<b>102</b>
2.1 Generación de la línea de MSC-N1ICD y MSC-N1ICD-HIF1A .....	102
2.2 Caracterización de las EVs derivadas de las diferentes líneas de MSCs .....	106
2.3 Las TN-EVs y THN-EVs reducen la expresión de marcadores de fibrosis en fibroblastos cardíacos estimulados .....	115

2.4 Las THN-EVs reducen la migración en fibroblastos cardíacos estimulados .....	118
2.5 Las THN-EVs protegen a los CM en un modelo <i>in vitro</i> de isquemia .....	119
2.6 Las EVs derivadas de MSCs reducen los marcadores de hipertrofia cardíaca en un modelo <i>in vitro</i> de estimulación con Ang II.....	122
2.7 Las THN-EVs aumentan la formación de tubos en células endoteliales <i>in vitro</i> ....	123
2.8 Las THN-EVs reducen la fibrosis cardíaca en un modelo de infarto de miocardio de tipo 2 inducido por isoproterenol .....	124
2.9 Las THN-EVs reducen la hipertrofia cardíaca inducida por la infusión de isoproterenol.....	125
2.10 Las THN-EVs aumentan la angiogénesis tras el daño cardíaco producido por el isoproterenol.....	126
<b>Discusión</b> .....	<b>129</b>
<b>1. MSC-EVs cargadas con OSM</b> .....	<b>132</b>
<b>2. EVs derivadas de MSCs que sobreexpresan N1ICD y HIF1A</b> .....	<b>136</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>143</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>147</b>