



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Investigación
Sanitaria La Fe

Modificación genética de células estromales mesenquimales para potenciar la eficacia de las vesículas extracelulares en el ámbito de la terapia cardíaca

Marc Buigues Caravaca

Directora: Pilar Sepúlveda Sanchis

Tutora UPV: María Adelaida García Gimeno

Valencia, Febrero de 2024

«En todo momento estamos dejando de ser lo que
fuimos, estamos siendo lo que somos, y estamos
comenzando a ser lo que seremos»

Alejandro Jodorowsky

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar la gracias a la Dra. Pilar Sepúlveda, directora de este trabajo, por brindarme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en el grupo de Regeneración y Trasplante Cardíaco. Agradezco sinceramente tu orientación y los consejos recibidos desde el inicio de este viaje de aprendizaje, cuando allá por el 2017 entré a realizar el TFM. También te quiero agradecer la paciencia que has demostrado conmigo y el haber sabido apretar las “tuercas” correctas para sacar lo mejor de mí. Gracias por tu confianza y por haberme permitido desarrollar mis propias ideas con libertad, ha sido para mí un placer poder trabajar en tu laboratorio.

A la Dra. Imelda Ontoria, mi agradecimiento por todo el apoyo y la ayuda recibidos, tanto a nivel profesional como personal. Gracias por estar siempre dispuesta a echar una mano en lo que haga falta. Al Dr. Akaitz Dorronsoro, agradezco su orientación durante mi etapa de TFM y por ayudarme a dar mis primeros pasos en el mundo de la ciencia.

Agradezco a Rosa Vives por su disposición y buen corazón. Gracias por estar siempre ahí para ayudarme en todo, desde la gestión de pedidos hasta cuestiones relacionadas con la histología. A la Dra. Marina Piquer, agradezco su carácter alegre y amable. Gracias por ser mi mentora en el animalario y por los gratos momentos que compartimos durante las operaciones. A la Dra. Amparo Hernández, gracias por compartir tu experiencia y brindarme consejos tanto a nivel profesional como personal. Al Dr. Anastasio Montero, agradezco su constante implicación en mi trabajo, aportando valiosas opiniones e ideas.

A los Dres. Rafael Sánchez y Marta Gómez, que han sido como hermanos mayores para mí. Gracias por todo lo que me habéis enseñado desde que entré al laboratorio, por ayudarme en todo y comprenderme siempre. Espero que nuestra amistad nunca acabe. Al Dr. Nacho Reinal, por los buenos momentos compartidos y los que están por venir. Gracias por tu constante apoyo durante esta tesis; espero que te vaya muy bien en el futuro. A Elena Amaro, agradezco su serenidad y por estar allí para escucharme en los momentos buenos y los no tan buenos. Tienes un corazón excepcional, y deseo que logres todo lo que te propongas. A Marta Selva, gracias por tu vitalidad y tu energía para todo. Espero que alcances con éxito tus metas en la tesis. A Marilù Casini, gracias por tu efusividad y el afecto que me has demostrado, has sido una gran compañera. Eres una persona con una gran creatividad y no tengo ninguna duda de que te irá genial. A Rosana Castro, gracias por haberte implicado en este trabajo de la forma que lo hiciste durante tu TFM. Espero que consigas todo lo que te propongas. A mis excompañeros, los Dres. María Círia, Hernán González-King y Sandra Tejedor, porque de alguna manera u otra han contribuido a que este trabajo haya sido posible.

No soy una persona con una gran facilidad para expresar mis sentimientos, pero os puedo asegurar que no hubiera podido estar en ningún lugar mejor que en el grupo de

RETRACAR. Además del nivel profesional, creo que la calidad humana del grupo es altísima y me habéis hecho sentir como uno más de la familia.

Quiero continuar dando las gracias a mis amigos y, en especial, a mis primos Salva y Borja, que para mí son como hermanos, por todo el apoyo emocional que me han dado a lo largo de estos años y, especialmente, estos últimos meses que han sido los más difíciles.

Quiero agradecer también a mis suegros Ramón y Laura, por toda la ayuda y apoyo que me han brindado. Gracias por buscar siempre lo mejor para mí.

A mi hermano Pau, porque pese a ser más joven, para mí es una fuente de inspiración tanto en lo profesional como en lo personal. *Gràcies per estar ahí sempre i per la bona persona que eres.* A mi padres Paco y M^a Rosa, por ser mis referentes y un pilar fundamental en mi vida. *Tot el que soc vos ho dec i vos estic profundament agraït per confiar en mi i donar-me suport en esta etapa, i en totes les anteriors. Gràcies per aguantar sempre disposats a tot, fins i tot davant la meua falta de comunicació o el meu caràcter que a vegades no ha sigut el que vos mereixeu. No ho haguera aconseguit sense vosaltres.*

Por último, quiero darle las gracias a Inés por no dejar nunca que el barco se hunda. Gracias por quererme, cuidarme y preocuparte por mí incluso más que yo mismo. Gracias por tu paciencia y tu comprensión en los peores momentos y por confiar siempre en mí. Sin ti todo sería más gris.

Índice de contenidos

Resumen	11
Abreviaturas	14
Introducción.....	17
1. El sistema cardiovascular humano	19
1.1. Anatomía básica del corazón	19
1.2. Composición celular del corazón	20
1.3. Fisiología del corazón	22
2. Enfermedades cardiovasculares	23
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
3. Terapia celular.....	33
3.1. Células estromales mesenquimales.....	34
3.2. MSCs en terapia cardíaca.....	35
4. Vesículas extracelulares.....	37
4.1. Biogénesis de las EVs.....	38
4.1.1. Exosomas	39
4.1.2. Microvesículas	41
4.2. Mecanismo de comunicación de las EVs.....	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
5. Mejora del potencial terapéutico de las EVs	45
5.1. La vía de señalización de la OSM.....	46
5.2. La vía de señalización de Notch	47
Hipótesis y objetivos	53
1. Hipótesis.....	55
2. Objetivos.....	55
Materiales y métodos	57

1. Cultivos celulares	59
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
2. Modificación genética de MSC	60
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
3. Aislamiento y caracterización de EVs.....	62
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
4. Análisis de expresión génica.....	67
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
5. Análisis de expresión de proteínas	71
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
6. Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad	73
6.1 CCK-8.....	73
6.2 Cuantificación de la actividad LDH	74
6.3 DCFH-DA	74
6.4 MitoSOX.....	75
7. Modelo de hipertrofia <i>in vitro</i>	75
8. Inducción de la fibrosis <i>in vitro</i>	75
9. Ensayo de cierre de herida en HCF.....	76
10. Ensayo de formación de tubos en Matrigel	76
11. Modelos <i>in vivo</i>.....	77
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
12. Histología.....	78
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
13. Análisis estadístico.....	80
Resultados	82
1. Sobreexpresión de OSM fusionada a CD81 en MSC.....	85
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- β 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 α 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
2. Sobreexpresión de N1ICD y HIF1A	102
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
Discusión.....	129
1. MSC-EVs cargadas con OSM	132
2. EVs derivadas de MSCs que sobreexpresan N1ICD y HIF1A	136
Conclusiones.....	143
Bibliografía	147

Resumen

La cardiopatía isquémica, caracterizada por la falta de suministro adecuado de oxígeno al tejido cardíaco, es una afección grave que puede desencadenar un infarto agudo de miocardio y contribuir al desarrollo de la insuficiencia cardíaca (IC). A pesar de las terapias actuales, la IC sigue siendo una enfermedad con alta morbilidad y mortalidad, lo que destaca la necesidad de estrategias terapéuticas más efectivas. En este contexto, las células madre mesenquimales (MSCs) y, en especial sus vesículas extracelulares (EVs), han surgido como opciones prometedoras por sus propiedades regenerativas, pro-angiogénicas e inmunomoduladoras. Sin embargo, el reto actual se centra en mejorar la eficacia terapéutica de las EVs, ya sea mejorando su biodisponibilidad en el tejido cardíaco o potenciando sus capacidades intrínsecas, con el fin de hacer viable una terapia basada en las mismas.

En este trabajo, nos hemos centrado en la mejora de las EVs mediante la modificación genética de las MSCs. Hemos seguido dos enfoques: la carga de oncostatina M (OSM) en la superficie de las EVs y la sobreexpresión inducible del dominio intracelular de Notch1 (N1ICD) junto con el factor inducible por hipoxia 1-alfa (HIF1A) en MSCs para enriquecer las EVs con factores terapéuticos, con la expectativa de mejorar su eficacia en el contexto de la isquemia cardíaca.

Los resultados obtenidos muestran que las EVs cargadas con OSM poseen propiedades antifibroticas superiores a las EVs nativas, además de reducir el daño cardíaco provocado por la infusión de isoproterenol *in vivo*. Por otro lado, la sobreexpresión de N1ICD y HIF1A actúa a modo de preconditionamiento genético favoreciendo la carga de diferentes moléculas terapéuticas en las EVs. Estas EVs han demostrado ejercer efectos beneficiosos *in vitro* como la reducción de la fibrosis, la protección de los cardiomiocitos y reducción de la hipertrofia, la disminución de especies reactivas de oxígeno, y el aumento de la angiogénesis. En el estudio *in vivo* estas EVs redujeron el daño provocado por la infusión de isoproterenol.

En conclusión, hemos generado dos tipos de EVs con un potencial terapéutico superior a las EVs nativas en el contexto de la patología cardíaca. Este trabajo abre la puerta al diseño de nuevas estrategias terapéuticas basadas en EVs, abordando de manera integral los diversos aspectos de la enfermedad cardíaca.

Summary

Ischemic heart disease, characterized by a lack of adequate oxygen delivery to the heart tissue, is a serious condition that can trigger acute myocardial infarction and contribute to the development of heart failure (HF). Despite current therapies, HF remains a disease with high morbidity and mortality, highlighting the need for more effective therapeutic strategies. In this context, mesenchymal stem cells (MSCs) and, especially their extracellular vesicles (EVs), have emerged as promising options due to their regenerative, pro-angiogenic and immunomodulatory properties. However, the current challenge focuses on improving the therapeutic efficacy of EVs, either by improving their bioavailability in cardiac tissue or by enhancing their intrinsic capabilities, in order to make a therapy based on them viable.

In this work, we have focused on the improvement of EVs through genetic modification of MSCs. We have followed two approaches: loading of oncostatin M (OSM) on the surface of EVs and inducible overexpression of Notch1 intracellular domain (N1ICD) together with hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1A) in MSCs to enrich EVs with therapeutic factors, with the expectation of improving its effectiveness in the context of cardiac ischemia.

The results obtained show that OSM-loaded EVs have superior antifibrotic properties than native EVs, in addition to reducing cardiac damage caused by isoproterenol infusion *in vivo*. On the other hand, the overexpression of N1ICD and HIF1A acts as genetic preconditioning, favouring the loading of different therapeutic molecules in EVs. These EVs have been shown to exert beneficial effects *in vitro* such as reducing fibrosis, protecting cardiomyocytes and reducing hypertrophy, decreasing reactive oxygen species, and increasing angiogenesis. In the *in vivo* study, these EVs reduced the isoproterenol-induced myocardial damage.

In conclusion, we have generated two types of EVs with a therapeutic potential superior to native EVs in the context of cardiac pathology. This work opens the door to the design of new therapeutic strategies based on EVs, comprehensively addressing the various aspects of heart disease.

Resum

La cardiopatia isquèmica, caracteritzada per la falta de subministrament adequat d'oxigen al teixit cardíac, és una afecció greu que pot desencadenar un infart agut de miocardi i contribuir al desenvolupament de la insuficiència cardíaca (IC). Malgrat les teràpies actuals, la IC continua sent una malaltia amb alta morbiditat i mortalitat, la qual cosa destaca la necessitat d'estratègies terapèutiques més efectives. En este context, les cèl·lules mare mesenquimals (MSCs) i, especialment les seues vesícules extracel·lulars (EVs), han sorgit com a opcions prometedores per les seues propietats regeneratives, pro-angiogèniques i immunomoduladores. No obstant això, el repte actual se centra en millorar l'eficàcia terapèutica de les EVs, ja siga millorant la seua biodisponibilitat en el teixit cardíac o potenciant les seues capacitats intrínseques, amb la finalitat de fer viable una teràpia basada en estes.

En este treball, ens hem centrat en la millora de les EVs mitjançant la modificació genètica de les MSCs. Hem seguit dos enfocaments: la càrrega d'oncostatina M (OSM) en la superfície de les EVs i la sobreexpressió induïble del domini intracel·lular de Notch1 (N1ICD) juntament amb el factor induïble per hipòxia 1-alfa (HIF1A) en MSCs per a enriquir les EVs amb factors terapèutics, amb l'expectativa de millorar la seua eficàcia en el context de la isquèmia cardíaca.

Els resultats obtinguts mostren que les EVs carregades amb OSM posseeixen propietats antifibròtiques superiors a les EVs natives, a més de reduir el dany cardíac provocat per la infusió d'isoproterenol *in vivo*. D'altra banda, la sobreexpressió de N1ICD i HIF1A actua a mode de preconditionament genètic afavorint la càrrega de diferents molècules terapèutiques en les EVs. Estes EVs han demostrat exercir efectes beneficiosos *in vitro* com la reducció de la fibrosi, la protecció dels cardiomiòcits i reducció de la hipertròfia, la disminució d'espècies reactives d'oxigen, i l'augment de l'angiogènesis. En l'estudi *in vivo* estes EVs van reduir el dany provocat per la infusió d'isoproterenol.

En conclusió, hem generat dos tipus de EVs amb un potencial terapèutic superior a les EVs nadiues en el context de la patologia cardíaca. Este treball obri la porta al disseny de noves estratègies terapèutiques basades en EVs, abordant de manera integral els diversos aspectes de la malaltia cardíaca.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AngII	Angiotensina II
ANP	Péptido natriurético auricular
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ensayo de ácido bicinconínico
BMP	Proteína morfogénica ósea
BNP	Péptido natriurético cerebral
CAD	Enfermedad de las arterias coronarias
CCK-8	Kit para conteo celular-8
CCL-	Ligando de quimiocina con motivo CC
CD	Clúster de diferenciación
COL-	Colágeno
COX2	Ciclooxigenasa2
CPC	Progenitores cardíacos
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
CxCL	Ligando de quimiocina con motivo C-X-C
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
DCFH-DA	Diacetato de 2'-7'diclorofluorescina
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
EC	Célula endotelial
ECV	Enfermedades cerebrovasculares
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
Estim	Medio de estimulación
EtOH	Etanol
EVs	Vesículas extracelulares
FAP	Proteína de activación de fibroblastos
Fb	Fibroblasto
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGM-3	Medio de crecimiento de fibroblastos-3
FN	Fibronectina
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína fluorescente verde
GO	Ontología génica
HCF	Fibroblasto cardíaco humano
HEY	Proteína 2 con motivo YRPW asociada a HES

HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia 1 α
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HSP70	Proteína de choque térmico 70
HUVEC	Células endoteliales de la vena umbilical humana
IAM	Infarto agudo de miocardio
IC	Insuficiencia cardíaca
Ig	Inmunoglobulina
IL-	Interleuquina
ILV	Vesículas intraluminales
IP	Intraperitoneal
IR	Isquemia/Reperfusión
ISCT	Sociedad Internacional para la Terapia Celular
ISO	Isoproterenol
JAG1	Jagged1
kDa	Kilodalton
LB	Caldo de lisogenia
LDH	Lactato deshidrogenasa
LIF-R	Receptor del factor inhibidor de la leucemia
MatOSM	Oncostatina M madura
MFI	Intensidad de fluorescencia media
MHC I	Complejo mayor de histocompatibilidad I
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad II
miARN	microARN
MMP	Metaloproteasa de la matriz extracelular
mPTP	Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial
MSC	Célula estromal mesenquimal
MutOSM	Oncostatina M mutante
MVB	Cuerpo multivesicular
M Φ	Macrófago
N1ICD	Dominio intracelular de Notch1
NEAA	Aminoácidos no esenciales
NECD	Dominio extracelular de Notch
NF- κ B	Factor nuclear κ B
NRF2	Factor nuclear eritroide similar al factor 2
NTA	Análisis de seguimiento de nanopartículas
OGD	Privación de oxígeno y glucosa
OSM	Oncostatina M
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PFA	Paraformaldehído
P/S	Penicilina/estreptomicina
rh	Recombinante humano
RIPA	Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación

ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SE	Sitio de escisión
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
SR	Retículo sarcoplásmico
Starv	Medio de privación de nutrientes
STAT5	Transductor de señal y activador de la transcripción 5
TAC	Constricción de la aorta transversa
TBS	Solución salina tamponada con tris
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TERT	Transcriptasa reversa de la telomerasa
TFF	Filtración de flujo tangencial
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	Western blot
WGA	Aglutinina de germen de trigo
α -SMA	α -actina de músculo liso
β -MHC	Cadena pesada de la miosina β

Introducción

1. El sistema cardiovascular humano

El corazón y toda la red de vasos sanguíneos forman el sistema cardiovascular, que es un sistema tubular cerrado. Este sistema es el responsable de intercambiar gases y solutos entre el plasma sanguíneo y el líquido intersticial para mantener la homeostasis. El órgano principal de este sistema es el corazón, un músculo hueco de forma cónica que se sitúa en el centro de la cavidad torácica y bombea sangre a través de las arterias sanguíneas mediante contracciones y relajaciones coordinadas y recurrentes. Este órgano está recubierto por una membrana fibrosa denominada pericardio y está suspendido por uniones a los grandes vasos. Una pequeña cantidad de líquido dentro de esta membrana lubrica la superficie del corazón, permitiendo un movimiento sin restricciones durante la contracciones y la relajaciones [1,2].

1.1. Anatomía básica del corazón

A nivel anatómico, el corazón está dividido por una pared muscular (septo auricular y ventricular) en una mitad izquierda y una mitad derecha. Éstas, por su parte, presentan dos cavidades cada una: la superior llamada aurícula, y la inferior, llamada ventrículo. De tal forma que en el corazón encontramos cuatro cavidades: la aurícula izquierda, la aurícula derecha, el ventrículo izquierdo y el ventrículo derecho.

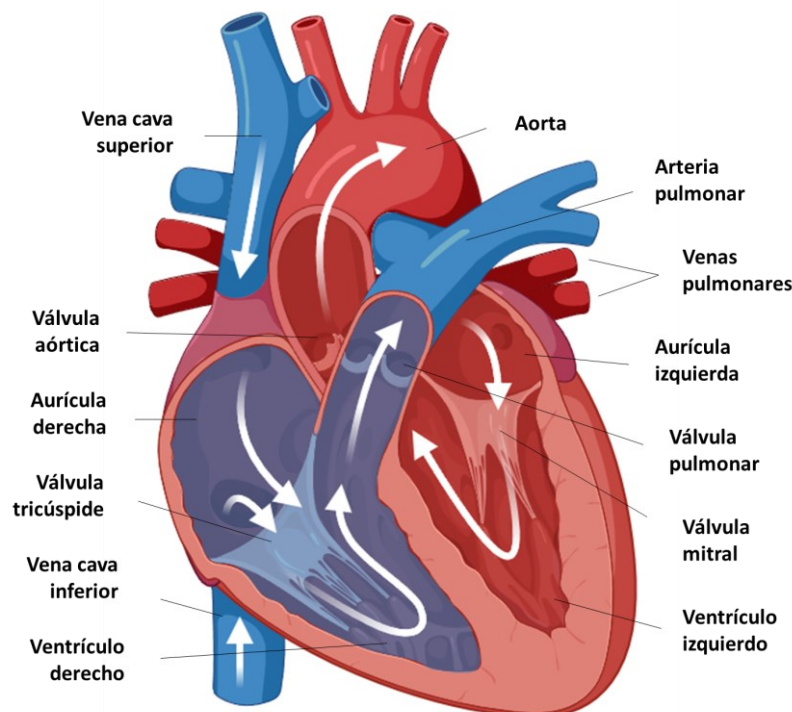


Figura 1. Anatomía cardíaca.

La válvula tricúspide, llamada así por estar formada por tres segmentos o membranas con forma de triángulo, está situada entre la aurícula y el ventrículo derechos. Por el contrario, la válvula bicúspide o mitral, compuesta por dos membranas que se asemejan anatómicamente, está situada entre la aurícula y el ventrículo izquierdos. La válvula aórtica (situada en el ventrículo izquierdo) y la válvula pulmonar (situada en el ventrículo derecho) reciben sus nombres de las dos arterias principales que salen de los dos ventrículos (Figura 1). La circulación sistémica es el flujo de sangre desde el ventrículo izquierdo, a través del cuerpo, hasta el lado derecho del corazón, mientras que la circulación pulmonar es el flujo de sangre desde el ventrículo derecho, a través de los pulmones, hasta el lado izquierdo del corazón [1,2].

A nivel histológico, el corazón está compuesto por tres capas: endocardio, miocardio y pericardio. El endocardio es la parte interna y en consecuencia está en contacto con las cavidades cardíacas. Está compuesto por endotelio y tejido conectivo. La capa intermedia y más gruesa es el miocardio, que está compuesto por músculo cardíaco estriado (principalmente células contráctiles llamadas cardiomiocitos (CM)), matriz extracelular (ECM), que es una red arquitectónica compleja que consta de proteínas estructurales y no estructurales, creando fuerza y plasticidad, y capilares sanguíneos. La capa externa es el pericardio, que se divide en pericardio visceral (también llamado epicardio), espacio pericárdico, pericardio parietal y pericardio fibroso, y está compuesto principalmente por tejido conectivo, incluidas fibras elásticas y tejido adiposo. El pericardio forma una membrana que cubre y sostiene el corazón, evitando además el roce de este con otras estructuras o la distensión ventricular durante el latido cardíaco [3].

1.2. Composición celular del corazón

El corazón adulto está compuesto por varios tipos celulares cada uno de ellos con unas funciones específicas para permitir la contracción y relajación continuas a través de diferentes presiones, tensiones y estímulos biofísicos en cada cámara [4]. Entre ellos, los que ocupan un mayor volumen son los CM, seguidos de las células endoteliales (EC) y los fibroblastos (Fb) cardíacos [5] (Figura 2). Los CM son células de gran tamaño que presentan una abundante cantidad de miofibrillas dispuestas en sarcómeros, posibilitando así su contracción individual y espontánea [6]. Debido a su actividad ininterrumpida, los CM necesitan un aporte energético constante. Por este motivo, son células con un metabolismo fundamentalmente aeróbico que presentan un elevado número de mitocondrias [7]. La α -actina sarcomérica y la conexina 43 son proteínas características de estas células [8]. Asimismo, gran parte de los CM presenta más de un núcleo en el corazón adulto, hecho que se ha relacionado con la pérdida de su capacidad proliferativa [9]. Aunque los CM representan el 30-40% de las células presentes en el corazón, debido a su gran tamaño (≈ 20 -25 veces mayor que el de las EC y Fb), ocupan alrededor del 70-85% del volumen del mismo, por tanto, se pueden considerar el principal tipo celular de corazón [5] (Figura 2). Sin embargo, para la correcta actividad

del músculo cardíaco también se requieren otros tipos celulares que actúan junto a los CM de manera conjunta; las células no miocíticas.

Dentro de las células no miocíticas encontramos EC, Fb, células del músculo liso y pericitos, células del sistema inmune, células nerviosas y poblaciones de progenitores propios del corazón (Figura 2). Como hemos mencionado, el corazón es un órgano que trabaja de forma continua e ininterrumpida, hecho que lo sitúa como el segundo órgano del cuerpo (después del cerebro) que más glucosa consume por término medio [10]. Por ello, se requiere una amplia red vascular que garantice un suministro constante de nutrientes y oxígeno para su adecuado funcionamiento. En este sentido, las EC, el tipo de célula más prevalente del corazón, representan entre el 40 y el 55% de todas las células cardíacas [5] (Figura 2). Las EC se caracterizan por la expresión de proteínas como CD31 o CDH5 [11]. Una parte de esta vasculatura coronaria está unida a células musculares lisas y pericitos formando arterias. Las EC se encuentran en constante renovación y permiten el crecimiento y funcionamiento adecuados de la vasculatura cardíaca, de la cual depende en gran medida la respuesta a una lesión cardíaca [12].

Los fibroblastos son los componentes primarios del tejido conjuntivo y se encargan de producir la mayor parte de la ECM del corazón, ayudando a mantener la estructura cardíaca y permitiendo la transmisión de señales intercelulares. Constituyen alrededor del 15% de las células del corazón [5] y están formados por una diversa gama de células que tienen la capacidad de producir proteínas como FSP1, PDGFRA y CD90 [13]. Además, dada su capacidad de activarse y dar lugar a miofibroblastos, son esenciales para la respuesta temprana a la lesión cardíaca [14].

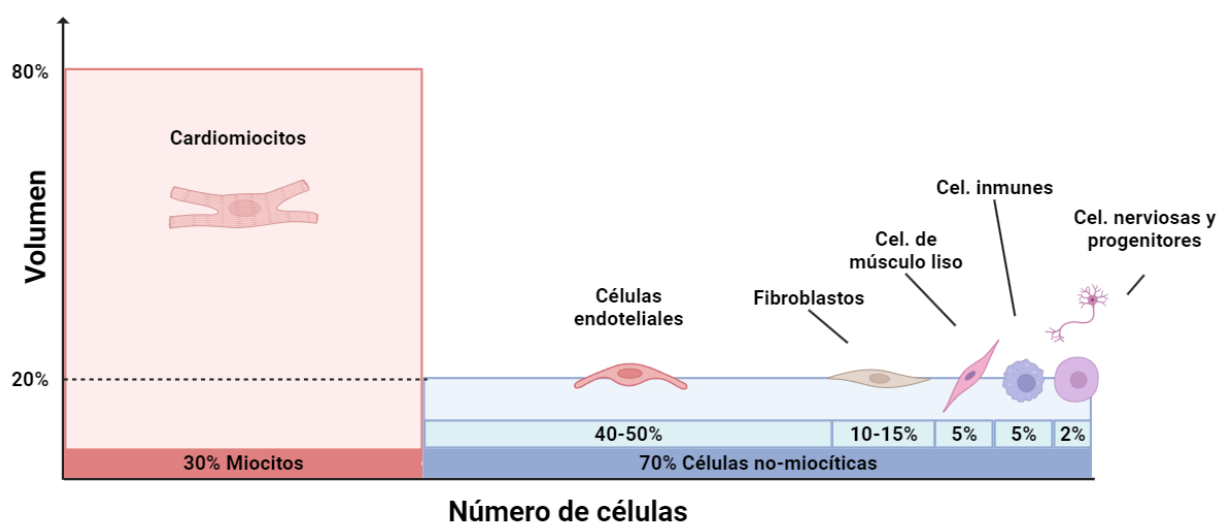


Figura 2. Principales tipos celulares que componen el corazón.

Aunque en menor cantidad, en el corazón también encontramos células nerviosas y células inmunes. Las células nerviosas se agrupan formando fibras nerviosas, tanto

simpáticas como parasimpáticas, las cuales, a través de impulsos nerviosos, regulan la frecuencia e intensidad de las contracciones cardíacas en respuesta a diversas situaciones fisiológicas, como el reposo, el ejercicio, la temperatura, así como frente a estímulos potencialmente perjudiciales, como el estrés y el miedo [15]. Además, se ha demostrado que estas fibras nerviosas intervienen en el proceso de regeneración cardíaco, aportando diferentes factores de crecimiento y coordinando la respuesta inmune [16]. En el corazón residen también diferentes tipos celulares pertenecientes al sistema inmunitario, entre los que destacan los linfocitos B y los macrófagos, los cuales desempeñan un papel crucial en la coordinación de la respuesta frente al daño cardíaco [17]. Por último, se encuentran las denominadas células progenitoras cardíacas (CPCs), que constituyen poblaciones multipotentes residentes involucradas en la homeostasis cardíaca y en los procesos de reparación del corazón. Sin embargo, la gran diversidad de marcadores potenciales ha dificultado la identificación inequívoca y la definición molecular precisa de estas CPCs [18].

1.3. Fisiología del corazón

El corazón se contrae rítmicamente con una frecuencia media de 70 latidos por minuto. Cada ciclo cardíaco, formado por dos periodos, se inicia con una ola de contracción, también llamada *periodo de actividad*, a la que le sigue un *periodo de descanso*. Se pueden diferenciar tres fases en cada ciclo cardíaco: la sístole auricular, que es la contracción simultánea y breve de ambas aurículas; la sístole ventricular, que es la contracción simultánea y prolongada de ambos ventrículos; y un periodo de reposo, que es la relajación completa del corazón. Las válvulas mitral y tricúspide se cierran durante la contracción ventricular para impedir que la sangre retroceda hacia las aurículas. La sangre sale de los ventrículos cuando la presión en su interior aumenta por encima de la presión en el interior de la arteria pulmonar y la aorta, dando lugar a la apertura de las válvulas que cubren estos vasos sanguíneos. Una vez finalizada la sístole ventricular, la presión sanguínea en estas arterias sella las válvulas para impedir que la sangre retorne hacia los ventrículos [2].

El corazón está irrigado por una amplia red vascular llamada circulación coronaria debido a la distribución de los vasos alrededor del órgano, formando una especie de corona invertida. Las arterias coronarias izquierda y derecha, que toman su nombre de los senos aórticos izquierdo y derecho, respectivamente, son las principales arterias que componen esta red. Estas dos arterias tienen un diámetro de unos 3-4 mm en el corazón adulto. La ramificación de la arteria coronaria izquierda da lugar a la arteria descendente anterior izquierda y a la arteria circunfleja, mientras que la arteria coronaria derecha emite la arteria descendente posterior. Debido a la densidad de tejido muscular cardíaco, estas arterias se ramifican hasta llegar a una densidad de unos 3.000 capilares/mm², asegurando así una correcta irrigación. En términos de volumen, el corazón recibe un mililitro de sangre por minuto y gramo de tejido en reposo, es decir, entre 200 y 250 mililitros por minuto. Esto equivale al 4% del gasto cardíaco, cuyo valor en reposo es de 5 litros [19].

Para lograr un bombeo eficaz, millones de células cardíacas individuales deben contraerse coordinadamente y con precisión. El principal mecanismo para lograr esta coordinación es la conducción de potenciales de acción desde las células vecinas a través de las uniones *gap*, que unen todas las células cardíacas en un sincitio funcional. Además, algunas regiones cardíacas tienen células musculares especialmente diseñadas para regular la vía de conducción, la frecuencia de la excitación cardíaca y el ritmo al que se propagan los impulsos por el corazón. Las fibras de Purkinje, el haz de His, el nódulo auriculoventricular y el nódulo sinoauricular son los componentes clave de este particular sistema de excitación y conducción [2].

Cuando un determinado CM es alcanzado por un potencial de acción, se produce la activación de los canales de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico debido a la despolarización de la membrana plasmática. El aumento de la concentración citosólica de este ion desencadena la contracción de las miofibrillas. En milisegundos, esta señal viaja a cada sarcómero, la unidad funcional del músculo, haciendo que cada sarcómero de la célula afectada se contraiga simultáneamente. Los sarcómeros están compuestos por filamentos finos y gruesos, y se agrupan en paralelo solapándose parcialmente. Los filamentos finos están formados por actina, miosina y tropomiosina, y están unidos a los discos Z en ambos extremos del sarcómero. En el centro del sarcómero, los filamentos finos se solapan con los filamentos gruesos, que se componen por determinadas isoformas de miosina [20].

2. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. Se estima que más de 17 millones de personas mueren cada año por este grupo de enfermedades, lo cual representa alrededor del 32% de las muertes que se registran en el mundo [21]. Las ECV son un grupo de enfermedades de los vasos sanguíneos y el corazón que incluye las enfermedades coronarias (CAD), los accidentes cerebrovasculares, las enfermedades vasculares periféricas, las cardiopatías reumáticas, las cardiopatías congénitas y las valvulopatías, entre otras [21]. Hasta el 85% de todas las muertes por ECV se deben a enfermedades coronarias y accidentes cerebrovasculares, y la supervivencia a los 5 años tras el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca (IC) se sitúa alrededor del 50%, a pesar de los grandes avances realizados en el campo de la investigación cardiovascular [22,23]. Los factores de riesgo de las ECV comprenden factores conductuales, entre los que se incluyen el tabaquismo, una dieta poco saludable, el consumo excesivo de alcohol y la ausencia de actividad física; y factores fisiológicos, como la hipertensión, la diabetes y la obesidad [24]. En consecuencia, la prevención de parte de estas enfermedades se podría conseguir controlando los principales factores de riesgo a través de cambios en el estilo de vida y de tratamiento farmacológico en casos necesarios.

La CAD es la causa más prevalente y con mayor tasa de mortalidad dentro de las ECV. Comprender su fisiopatología desde el inicio de la misma hasta el punto de desarrollar

una IC resulta imprescindible a la hora idear nuevas estrategias terapéuticas y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

2.1 Fisiopatología de la enfermedad coronaria

La CAD, también llamada cardiopatía isquémica, es una condición en la que hay un suministro inadecuado de sangre y oxígeno al miocardio debido a la oclusión, total (infarto de miocardio) o parcial (angina de pecho), de las arterias coronarias [25,26].

Atendiendo a la etiología y la patogénesis de la oclusión de la arteria coronaria, el infarto agudo de miocardio (IAM) puede clasificarse en 5 tipos [25–27]:

- **IAM de tipo 1:** Se produce una oclusión por la erosión de una placa de ateroma o por su rotura y desprendimiento, dando lugar a una oclusión total (con elevación del segmento ST; STEMI) o parcial (sin elevación del segmento ST; NSTEMI) (Figura 3).
- **IAM de tipo 2:** Se trata de un desequilibrio entre la demanda y el aporte de oxígeno en el músculo cardíaco que puede producirse por un vasoespasmo, por la presencia de una placa de ateroma o por sí solo, sin ningún tipo de obstrucción, pero que presenta una clínica de IAM, produciendo una zona de isquemia. Factores como la taquicardia, el estrés o la hipoxia favorecen este tipo de infartos (Figura 3).
- **IAM de tipo 3:** Se clasifica como IAM de tipo 3 aquellos casos en los que los pacientes con síntomas compatibles isquemia miocárdica mueren antes de obtenerse muestras sanguíneas para la determinación de biomarcadores o antes de que se haya producido un aumento detectable de estos.
- **IAM de tipo 4:** Se produce como resultado de una intervención coronaria percutánea o debido a la aparición de trombosis en un stent.
- **IAM de tipo 5:** Se produce como consecuencia de la realización de un baipás coronario.

La privación de oxígeno y nutrientes de una zona del corazón producida por un IAM tiene como consecuencia la muerte celular de la región infartada. El grado de extensión de la muerte celular dependerá del tiempo y la severidad de la oclusión de la arteria afectada, y de la magnitud de flujo de las arterias colaterales [28–30]. Se ha comprobado que los CM de mamíferos adultos conservan una cierta plasticidad celular, incluyendo la capacidad de des-diferenciarse, proliferar y adquirir fenotipos propios de células progenitoras. Sin embargo, su tasa de recambio ($\approx 1\text{-}2\%$ por año) es muy limitada en comparación con la pérdida celular producida por IAM [31–33].

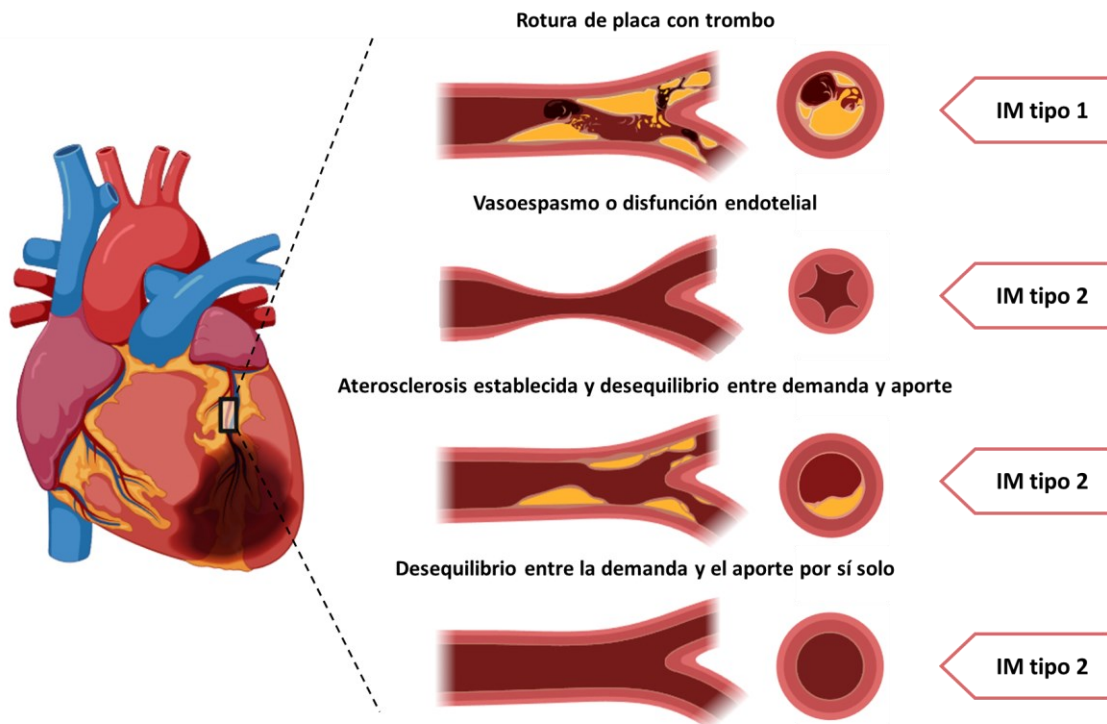


Figura 3. Infarto de miocardio de tipo 1 y 2. En el IM de tipo 1 la oclusión de la arteria coronaria se produce por la rotura de una placa de ateroma y la posterior formación de un trombo. El IM de tipo 2 puede suceder de varias maneras: la oclusión de la coronaria por un vasoespasmismo o por una disfunción endotelial, o que haya un desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno, ya sea por la presencia de aterosclerosis o por sí solo. Modificada de la Revista Española de Cardiología [28].

Comúnmente, cuando hablamos de IAM nos referimos a un evento coronario trombótico agudo que produce una oclusión completa y persistente del flujo sanguíneo. Este tipo de IAM se identifica mediante un electrocardiograma de superficie por producir la elevación del segmento ST característica de una obstrucción total en una arteria coronaria [25–27]. Dicha obstrucción se suele producir tras la ruptura de la cubierta de una placa de fibroateroma. La exposición al torrente coronario del factor tisular presente en el interior de la placa inicia una cascada de adhesión, activación y agregación de las plaquetas, que dará como resultado la formación de un trombo. El crecimiento del trombo acabará ocluyendo la luz del vaso donde se encuentra o se desprenderá y acabará ocluyendo un vaso sanguíneo de menor diámetro [29–32].

El daño causado por el infarto se desarrolla en forma de frente de onda, empezando en las capas subendocárdicas del área infartada y progresando hacia las capas subepicárdicas hacia los bordes de la zona de riesgo mientras dura la oclusión [33,34]. Aunque la reperfusión, que es la apertura de la arteria ocluida, resulta crucial para evitar la progresión del daño, también inflige lesiones adicionales e irreversibles como el aumento del tamaño del infarto y la disfunción microvascular [35].

Se pueden distinguir tres fases superpuestas después de un IAM: la fase inflamatoria, la fase de proliferación y la fase de cicatrización [36]:

- **Fase inflamatoria:** A pesar de los efectos cardioprotectores de algunas citoquinas y quimioquinas secretadas tanto en el tejido infartado como en las regiones circundantes no afectadas, la capacidad local de reparación del corazón es limitada y la muerte de los CM desencadena una respuesta inflamatoria aguda. Esta inflamación inicial se modula a través de selectinas, integrinas, moléculas de adhesión celular y ligandos endógenos, también llamados patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), atrayendo a las células inmunitarias circulantes [37,38]. Las primeras células infiltradas en el área dañada son los neutrófilos, que alcanzan su punto máximo ≈ 24 h después del IAM. Al llegar, los neutrófilos liberan enzimas proteolíticas y especies reactivas de oxígeno (ROS), dañando directamente las células circundantes [38,39]. Además, liberan factores quimiotácticos [40] e inducen la acumulación de monocitos, que alcanzan el pico a los ≈ 3 días tras la reperfusión [41]. Estos monocitos se diferencian a macrófagos con un fenotipo proinflamatorio o M1 y tienen funciones proteolíticas y fagocíticas, promoviendo la digestión del tejido dañado y limpiándolo de restos celulares necróticos [42].

Por tanto, se necesita una presencia breve y controlada de neutrófilos para iniciar la reacción inflamatoria y allanar el camino a los monocitos. Sin embargo, la explosión de mediadores inflamatorios conduce a un ciclo de automantenimiento que provoca un aumento del daño miocárdico. Precisamente, la reducción específica de la infiltración de neutrófilos ha sido ampliamente estudiada como método para limitar el tamaño del infarto [43–45].

- **Fase de proliferación:** La pared del corazón, limpia ya de CM muertos y restos de matriz, se rompería inevitablemente bajo la alta presión y fuerza mecánica a la que está sometida de no haber nuevas estructuras de soporte que la refuercen. Por tanto, esta fase de proliferación se caracteriza por la resolución de la inflamación y la proliferación de Fb para iniciar la formación de una cicatriz rica en colágeno que de soporte y mantenga la integridad del miocardio, y tiene lugar entre los 4-7 días posteriores al IAM.

Los neutrófilos que se habían infiltrado en la zona dañada poco después de la reperfusión entran en apoptosis y son fagocitados por los macrófagos, lo que induce un cambio hacia un fenotipo pro-resolutivo o M2. Estos macrófagos promueven la reparación del tejido cardíaco a través de una mayor expresión de factores antiinflamatorios, pro-fibróticos y angiogénicos, como la IL-10, el

factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [46]. El reclutamiento e infiltración de linfocitos T reguladores en el área infartada también promueve la resolución de la inflamación y limita el remodelado ventricular adverso [47,48] (Figura 4).

Por otro lado, los Fb intentan compensar la pérdida de CM produciendo matriz extracelular y brindando soporte mecánico a las estructuras recién formadas. Los Fb, tanto residentes como reclutados, se activan y se diferencian en miofibroblastos bajo la estimulación de TGF- β [49] y CCL2 [50], desarrollando características morfológicas y contráctiles similares a las células de músculo liso [51,52]. Los miofibroblastos diferenciados entran en una fase de proliferación y de síntesis de proteínas de la matriz extracelular (ECM), como colágenos, proteoglicanos y glicoproteínas, iniciando así la formación de la cicatriz [43,53] (Figura 4).

- **Fase de cicatrización:** En la fase de cicatrización, que comienza alrededor de 2-3 semanas después del IAM, la cicatriz emergente sufre un proceso de maduración en el que las proteínas de la ECM se entrecruzan y las células reparadoras, incluidos los miofibroblastos, se desactivan, entran en estado de reposo y pueden sufrir apoptosis [54].

Por otra parte, la remodelación tardía que se produce tras un IAM se caracteriza por la aparición de inflamación y fibrosis intersticial en el miocardio no infartado, fenómeno que se conoce como fibrosis reactiva [55]. Este escenario se produce, en parte, por la activación de macrófagos y fibroblastos en el miocardio remoto no infartado. Aunque los mecanismos celulares responsables de esta activación siguen siendo poco conocidos, puede producirse como resultado del aumento de la tensión de la pared, derivada de la pérdida de actividad contráctil del área infartada [56,57]. Se ha sugerido, también, que una resolución incompleta o alterada de la inflamación miocárdica en las últimas fases de la reparación puede conducir a la amplificación de la lesión provocada por el IAM, y promover una remodelación adversa del ventrículo izquierdo [57]. Los estudios clínicos demuestran que este tipo de remodelado es más común en pacientes con grandes infartos, así como en aquellos que presentan una mayor activación inflamatoria inicial [58,59]. Estos patrones de remodelado cardíaco pueden conducir a la dilatación del ventrículo izquierdo, la disfunción sistólica global y la aparición de IC [46,56] (Figura 4).

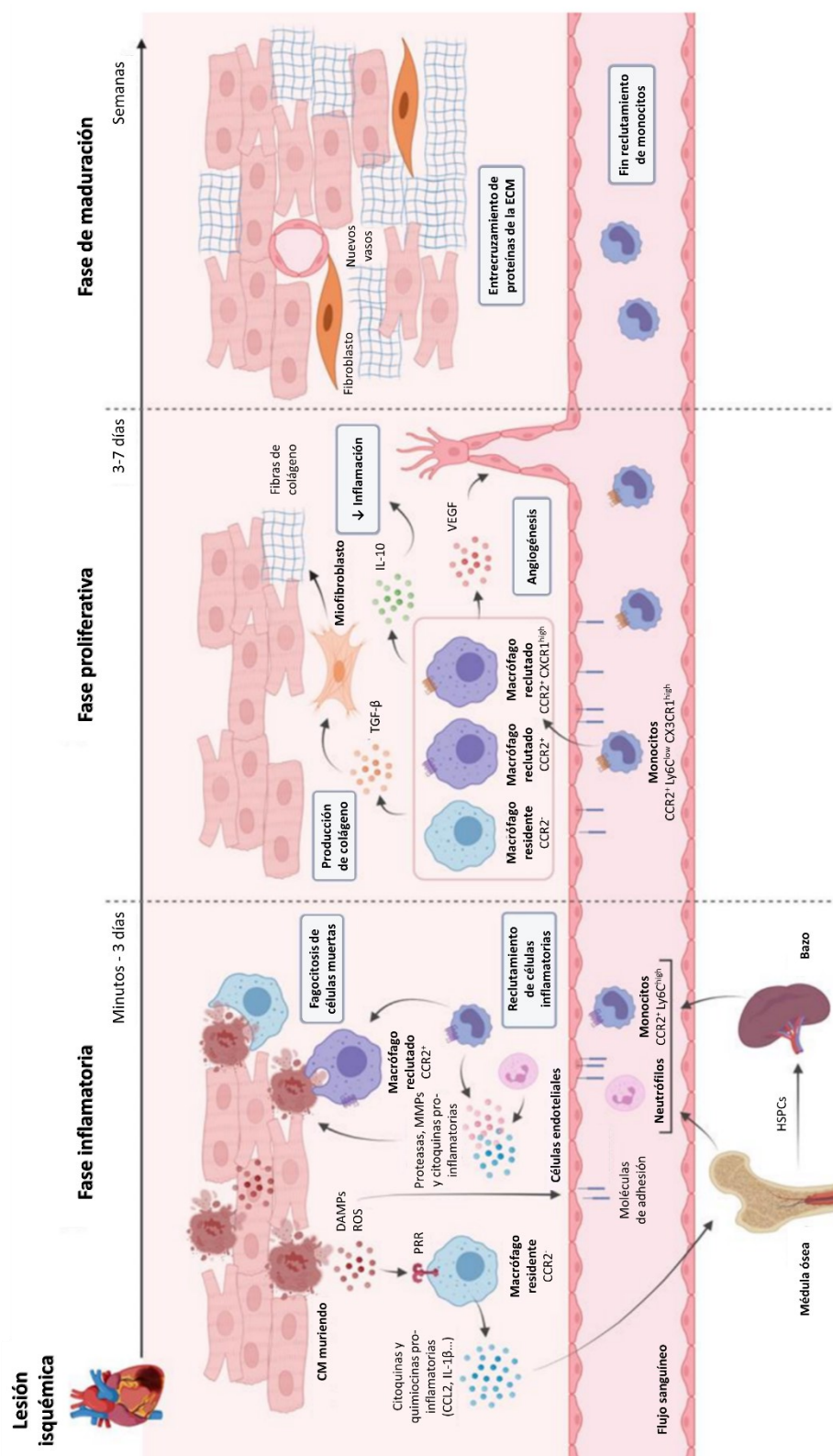


Figura 4. Fases tras un IAM. Se pueden distinguir 3 fases tras un IAM: la fase inflamatoria, donde los CM muertos liberan señales que activan la inflamación, la fase proliferativa, en la que los Fb empiezan a proliferar y a producir una mayor cantidad de proteínas de la ECM, y la fase de maduración

cuando tenemos una cicatriz bien formada y se resuelve la inflamación. Adaptado de M. Viola *et al.* (2021) [60].

A la luz de lo mencionado, los principales problemas tras un IAM son la pérdida masiva de tejido contráctil, que no se puede recuperar debido a la baja tasa de regeneración de los CM y que determinará el tamaño del infarto, así como el pronóstico

del paciente, y la posterior proliferación excesiva de miofibroblastos, originando un corazón rígido, con una capacidad contráctil disminuida y con una morfología alterada. Por ello, a continuación, revisaremos los mecanismos moleculares subyacentes a estos eventos.

2.3. Mecanismos que conducen a la pérdida de CM: Daño por IR

La zona miocárdica hipoperfundida durante el IAM debido al bloqueo de la arteria coronaria, conocida como, área en riesgo (AAR), se vuelve rápidamente necrótica si la reperusión no se reestablece rápidamente. Aun así, el miocardio, después de la reperusión, muestra bandas de contracción, cariólisis, anomalías en las mitocondrias y alteración de la membrana de los CM, junto con inflamación, hemorragia intersticial y daños en la microvasculatura [61]. Esta lesión, conocida como daño por isquemia-reperusión, es un proceso complejo que involucra varios factores relacionados entre sí, entre los que se incluye una disminución en los niveles celulares de ATP, acumulación de iones de hidrógeno, sobrecarga de calcio y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [62]. Todos estos factores promueven colectivamente el daño celular y la posterior muerte de los CM.

Inicialmente, la isquemia provoca que la fosforilación oxidativa mitocondrial se detenga debido al aporte insuficiente de oxígeno, lo que lleva a una reducción en la producción de ATP. Para compensar esto, los CM afectados realizan una glucólisis anaeróbica para producir ATP, lo que conduce a la acumulación de protones y lactato, provocando acidosis intracelular. La elevación de los niveles de H^+ intracelular activa el intercambiador Na^+/H^+ de la membrana plasmática, expulsando H^+ de la célula a cambio de Na^+ , lo que lleva a un aumento del Na^+ intracelular. Además, la disminución de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa debido a la disminución del pH y a la insuficiencia de ATP también contribuye al aumento del Na^+ intracelular, lo que conduce a la activación del intercambiador de Na^+/Ca^{2+} , expulsando Na^+ al exterior y produciendo una acumulación de Ca^{2+} intracelular [63] (Figura 5).

Tras la reperusión, la actividad respiratoria, el potencial mitocondrial y la síntesis de ATP se restablecen, y el pH intracelular se restaura rápidamente a un nivel normal, lo que provoca la activación de una proteasa dependiente de Ca^{2+} , la calpaína, que degrada el citoesqueleto y el sarcolema [64]. La mayor disponibilidad de ATP tras la reperusión en presencia del elevado nivel de Ca^{2+} intracelular, activa la captación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico (SR), superando el umbral de los canales de rianodina, que liberan Ca^{2+} al citosol. La repetición cíclica de este proceso conduce a oscilaciones de Ca^{2+} que provocan una hipercontracción miofibrilar incontrolada y también promueven la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) [63,65,66]. La apertura de mPTP da como resultado la hinchazón de la matriz mitocondrial (debido a la presión coloidosmótica que existe entre el citosol y la matriz mitocondrial), lo que en última instancia provoca la ruptura de la membrana externa mitocondrial y la liberación

del contenido del espacio intermembranoso mitocondrial, como el citocromo c, en el citosol [67,68]. El citocromo c es el encargado de desencadenar la muerte celular programada mediante la activación de la cascada de caspasas. Paralelamente, si un gran número de mitocondrias sufre la apertura del mPTP, la célula pierde la capacidad de generar ATP, fuente energética necesaria para mantener la homeostasis iónica, que en consecuencia se ve comprometida. Esto resulta en un aumento del volumen celular, la ruptura de la membrana plasmática y la muerte celular por necrosis [69] (Figura 5).

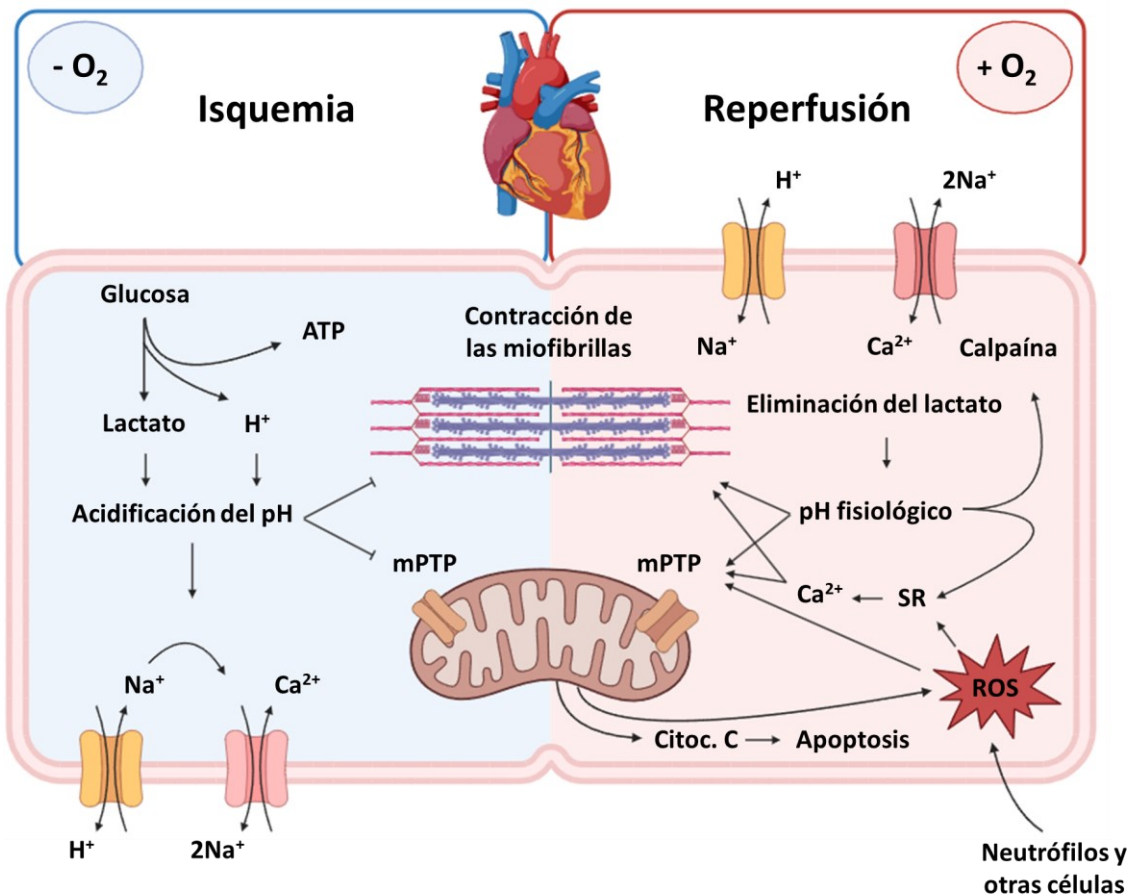


Figura 5. Mecanismos del daño por isquemia/reperfusión en los CM. La falta de oxígeno durante la isquemia detiene la fosforilación oxidativa y fuerza la glucólisis anaerobia acidificando el medio intracelular. Esto conduce a la activación de los intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, produciendo la acumulación de Ca^{2+} intracelular. Tras la reperusión, se restablece el pH, activando proteasas dependientes de calcio como la calpaína. Las oscilaciones de Ca^{2+} que se producen, junto con el aumento de las ROS, provoca la apertura del mPTP. La continua apertura del mPTP puede llevar a apoptosis del CM por medio de la liberación del citocromo c y la activación de la cascada de caspasas, o a la necrosis del CM por medio de la rotura de la membrana plasmática.

Por otra parte, el aumento de las oscilaciones de Ca^{2+} también aumenta la actividad de las xantina oxidasas, promoviendo la producción de ROS, lo que exacerba aún más el daño al promover directamente la apertura del mPTP y, por lo tanto, contribuyendo a la muerte celular o necrosis, como acabamos de comentar [67,68]. Los ROS son producidos

principalmente por los diferentes tipos de células de la zona isquémica, incluidos los CM afectados, las células endoteliales y los neutrófilos. La entrada de neutrófilos a la zona isquémica agrava aún más el daño celular al liberar mediadores inflamatorios, causando obstrucción microvascular e inflamación local y eventualmente sistémica [62] (Figura 5).

En conclusión, una variedad de vías actúa conjuntamente durante el daño por isquemia-reperfusión, dando como resultado la apoptosis y necrosis de los CM de la zona infartada. Como hemos comentado en el punto anterior, esta masa muscular perdida será reemplazada por Fb cardíacos, necesarios para mantener la integridad de la pared miocárdica afectada. Sin embargo, la sobreactivación de los mismos puede agravar aún más la situación.

2.4. Mecanismos y dinámica de activación de los Fb cardíacos

Los Fb son un tipo celular con una gran plasticidad fenotípica en respuesta a estímulos, ya sean mediadores solubles, como citoquinas, o físicos, como el estrés mecánico [70]. Por ello, vamos a empezar definiendo el término Fb como aquel tipo celular localizado en el tejido conectivo, que sintetiza colágeno y otros componentes de la ECM. Anteriormente, se pensaba que los Fb permanecían en un estado quiescente o inactivo, y se activaban en respuesta a señales como el daño o la inflamación. Sin embargo, ahora sabemos que los Fb cumplen una papel activo en el mantenimiento de la homeostasis en el miocardio sano, preservando la ECM y ayudando a los CM a desempeñar una correcta función contráctil [71]. Por otra parte, esta activación de los Fb que acabamos de mencionar se define como la transición fenotípica que sufre un Fb de fenotipo homeostático durante las fases de remodelado cardíaco tras un IAM [72]. Aunque la activación de los Fb es un término amplio que puede utilizarse para referirse genéricamente a cualquier aumento o cambio en la actividad de los Fb, se suele emplear para hacer referencia al desarrollo del fenotipo miofibroblástico a partir del fenotipo homeostático. Los miofibroblastos son un tipo de Fb que se caracterizan por tener capacidad contráctil, gracias a la expresión de α -actina de músculo liso (α -SMA) [73], así como por un aumento de la producción y secreción de proteínas de la ECM, como el colágeno I y III, la fibronectina y la periostina [74].

Tras un IAM, los CM necróticos liberan DAMPs, provocando la activación de células residentes no miocíticas y la infiltración de leucocitos que liberan citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Los fibroblastos responden a estas señales ambientales, liberando factores solubles como TNF- α , IL-6 o IL-1 β , y contribuyendo así a la señalización proinflamatoria [75]. Durante el día 1 post IAM, los patrones de expresión de los Fb cardíacos muestran la adopción de un fenotipo antiproliferativo y antimigratorio. Sin embargo, esta situación cambia a los 3 días post-IAM, cuando los Fb se polarizan hacia un fenotipo proliferativo, proangiogénico y antiinflamatorio. Esto se puede constatar por una disminución en la expresión de proteínas pro-apoptóticas, como la caspasa 3, junto con el aumento de la expresión de la proteína 4 asociada al citoesqueleto (Ckap4),

marcador de proliferación de fibroblastos [70]. Los Fb empiezan también a sobreexpresar proteínas profibróticas. En este sentido, se ha identificado a la galectina-3 como un activador de la vía TGF- β 1/ α -SMA/Colágeno I en Fb cardíacos durante esta fase, lo que conduce a la acumulación de ECM [76]. El TGF- β 1 es un conocido factor de crecimiento profibrótico y una señal paracrina clave para inducir la activación de los fibroblastos y el aumento de la síntesis de proteínas de la ECM [77]. El TGF- β 1 y el VEGF, liberados tanto por macrófagos como por Fb cardíacos, aumentan la secreción del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) por los Fb. El incremento de CTGF potencia el proceso de fibrosis y promueve la hipertrofia cardíaca, otra de las características del remodelado cardíaco [78]. La señalización del TGF- β 1 también induce la expresión de α -SMA y la aparición de fibras de estrés, marcadores distintivos de los miofibroblastos [79]. Esta expresión de α -SMA va a ir aumentando paulatina y uniformemente hasta el día 7 post-IAM. En ese momento, una gran parte de los Fb presentes en la zona dañada son miofibroblastos. Estos miofibroblastos continúan produciendo componentes de la ECM y contribuyendo a la formación de la cicatriz. Destacan la producción de colágeno I y III, fibronectina y periostina [70]. Además, también se observa un aumento de la secreción de trombospodina-1 (Thbs-1) lo que resulta un efecto antiangiogénico [70].

Una vez formada la cicatriz, algunos de estos miofibroblastos pueden eliminarse mediante apoptosis. Se conocen varias vías que pueden desencadenar este proceso apoptótico, en las que participan proteínas como Fas [80], TGF- β 1 [81] y el receptor de la angiotensina II (AngII) de tipo I (AT1) [82]. La disminución del estrés mecánico, debido al soporte que brinda la cicatriz, también se ha identificado como un fuerte promotor de la apoptosis en miofibroblastos. Por otra parte, también se ha observado la desdiferenciación de miofibroblastos a Fb α -SMA negativos, fenómeno que se ha atribuido a la desensibilización de los miofibroblastos al TGF- β 1 [14]. Sin embargo, también hay miofibroblastos que pueden permanecer activos durante años. La sobreexpresión de AngII y TGF- β 1 por parte de los CM en el borde de la zona infartada puede llevar a la activación de estas vías en regiones alejadas del área de infarto por medio de la difusión a través del espacio intersticial. La activación de la vía de señalización de la AngII y del TGF- β 1 en zonas remotas al infarto, estimula la producción de colágenos, fibronectina y proteoglicanos, dando lugar a fibrosis intersticial [83,84]. La activación de estas vías también estimula la producción de AngII y TGF- β 1 por los propios miofibroblastos, estableciendo así un ciclo autocrino de diferenciación y activación miofibroblástica [85].

La fibrosis intersticial miocárdica contribuye directamente al remodelado estructural adverso en diversas enfermedades cardiovasculares. De hecho, la fibrosis que se desarrolla en regiones remotas al infarto puede, con el tiempo, llegar a representar la mayor parte del tejido conectivo presente en el miocardio [86]. Además de las alteraciones producidas por la deposición intersticial de colágenos y otras proteínas de la ECM en áreas no lesionadas, la fibrosis de reemplazo (necesaria inicialmente para mantener la morfología e integridad ventricular tras una IAM), también puede contribuir a provocar cambios geométricos y al deterioro funcional progresivo, hasta llevar a la aparición de IC [87].

2.2. Insuficiencia cardíaca

La IC se define como la incapacidad del corazón para suministrar a los tejidos periféricos la cantidad necesaria de sangre y oxígeno para satisfacer sus demandas metabólicas. Se trata de un síndrome complejo y heterogéneo que resulta de la alteración del llenado ventricular o de su capacidad de eyección, ya sea por un fallo estructural y/o funcional del corazón [88,89].

A pesar de los notables avances en el tratamiento de la CAD y el IAM durante las últimas dos décadas, el remodelado adverso después de un IAM sigue siendo la causa más común de IC [90,91]. Como hemos comentado anteriormente, la pérdida de músculo ventricular durante el IAM y las complejas alteraciones arquitectónicas posteriores que afectan tanto al miocardio infartado como al no infartado contribuyen a la evolución de la IC. El adelgazamiento de la pared y la expansión del infarto son las alteraciones más notables en la región afectada por el infarto, y pueden conducir a una disfunción tanto sistólica (disminución de la contracción), como diastólica (disminución de la relajación). La dilatación ventricular se da en algunos casos como mecanismo compensatorio para mantener el volumen sistólico después de la pérdida de tejido contráctil. Sin embargo, un aumento del volumen de la cavidad con una hipertrofia compensadora insuficiente da como resultado el aumento del estrés sistólico, lo que promueve un mayor agrandamiento y disfunción [86,92].

Debido al aumento de la supervivencia tras un IAM, cada vez más personas corren el riesgo de desarrollar IC. Se calcula que, durante los 6 años posteriores a un evento clínico agudo, el 22% de los hombres y el 46% de las mujeres desarrollarán IC [93]. Además, el desarrollo de IC después de un IAM tiene un impacto significativo en el pronóstico y la supervivencia del paciente. Entre los pacientes con antecedentes de IAM, el desarrollo de IC aumenta tres veces el riesgo de mortalidad total y cuatro veces el riesgo de mortalidad cardiovascular [91,94]. El momento del desarrollo de la IC también tiene un impacto en los eventos adversos. Aquellos pacientes que desarrollan IC pasados 3 días o más tras el IAM tienen un riesgo de mortalidad un 43% mayor en comparación con los pacientes con IC que se desarrolla en los primeros 3 días después del IAM [94].

Se calcula que la IC ocasiona un gasto a los sistemas sanitarios a nivel mundial de unos 108.000 millones de dólares tanto en gastos directos (65.000 millones) como en gastos indirectos a través de problemas de morbilidad, mortalidad prematura o falta de productividad (43.000 millones). Además, debido al aumento de la esperanza de vida y el crecimiento de la población, se prevé un aumento de los recursos destinados a abordar esta enfermedad [90,95].

3. Terapia celular

La terapia celular se define como la transferencia de material celular, autólogo o alogénico, a un paciente con fines médicos [96]. El año 1889 fue testigo de las primeras prácticas de terapia celular de Charles-Édouard Brown-Séquard, pionero en la terapia

hormonal en ese momento, quien intentó suprimir los efectos del envejecimiento mediante inyecciones de extractos de testículos animales [97]. Sin embargo, el verdadero auge de la terapia celular surgió a partir de 1963, a raíz del descubrimiento de Ernest McCulloch y James Trill, quienes observaron que las células de médula ósea trasplantadas a ratones irradiados eran capaces de multiplicarse y diferenciarse [98,99]. En la actualidad, la terapia celular sigue evolucionando con las investigaciones en curso sobre seguridad y eficacia clínicas, y con un tamaño de mercado global que se estima que se expandirá desde los 21.600 millones de USD en 2022 hasta los 63.000 millones de USD en 2030 [100].

La terapia celular puede basarse en un único tipo celular o ser una terapia multicelular en la que se utilicen diferentes tipos celulares. Se pueden emplear células autólogas (del propio individuo) o alogénicas (de otro individuo), a las cuales se las puede someter a procesos de ingeniería genética. Como método de administración se suelen usar la vía tópica, la inyección, la infusión o la administración por medio de *bioscaffolds*. Actualmente, la terapia celular abarca múltiples áreas terapéuticas, como la medicina regenerativa, la inmunoterapia y la terapia contra el cáncer.

3.1. Células estromales mesenquimales

Friedenstein y sus colegas descubrieron a finales de la década de 1960 una población de células estromales derivadas de la médula ósea que se parecían a los fibroblastos y presentaban los siguientes rasgos: capacidad para formar colonias o clones *in vitro*, adhesión al plástico, alto potencial de proliferación y capacidad de autorrenovación y diferenciación [101]. La investigación de Friedenstein dio lugar a la identificación de un tipo particular de células primarias, que en 1991 fueron acuñadas como células madre mesenquimales debido a su capacidad para convertirse en adipocitos, osteoblastos y condrocitos, tres linajes distintos del tejido mesodérmico. [102]. Sin embargo, el término “célula madre mesenquimal” se considera inapropiado actualmente ya que no se ha podido demostrar que cumplan con todos los criterios específicos de células madre, como la capacidad de renovación y multipotencia *in vivo*. Por este motivo, el Comité de Células Madre Mesenquimales y Tisulares de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso el término célula estromal mesenquimal (MSC) para referirse a este tipo de células [103,104].

Durante el año 2006, el ISCT estableció los criterios básicos para definir una célula como MSC. Una MSC es una célula con capacidad de adherencia al plástico y morfología fibroblastoide. Tiene capacidad de diferenciación a adipocito, condrocito y osteoblasto. Además de esto, y debido a la usencia de marcadores específicos que identifiquen una MSC, se caracterizan mediante la presencia de CD73, CD90 y CD105 y la ausencia de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 y del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Aun así, al tratarse de un tipo celular relativamente heterogéneo, no existe un único conjunto de marcadores para identificarlas [104–106]. Una de las razones por las que sucede esto es por la alta diversidad de tejidos de los que pueden

se aisladas. Además de la médula ósea, donde fueron descubiertas originalmente, se han podido aislar MSCs de otros tejidos adultos, como el adiposo [107], la pulpa dentaria [108], la dermis [109], el líquido sinovial [110] o el periostio [111], y de tejidos perinatales, como el cordón umbilical [112], la placenta y el líquido amniótico [113]. Estos diferentes microambientes en los que residen las MSCs pueden influenciar directamente tanto su potencial de diferenciación y proliferación, como su patrón de expresión de marcadores [114–117] (Figura 6).

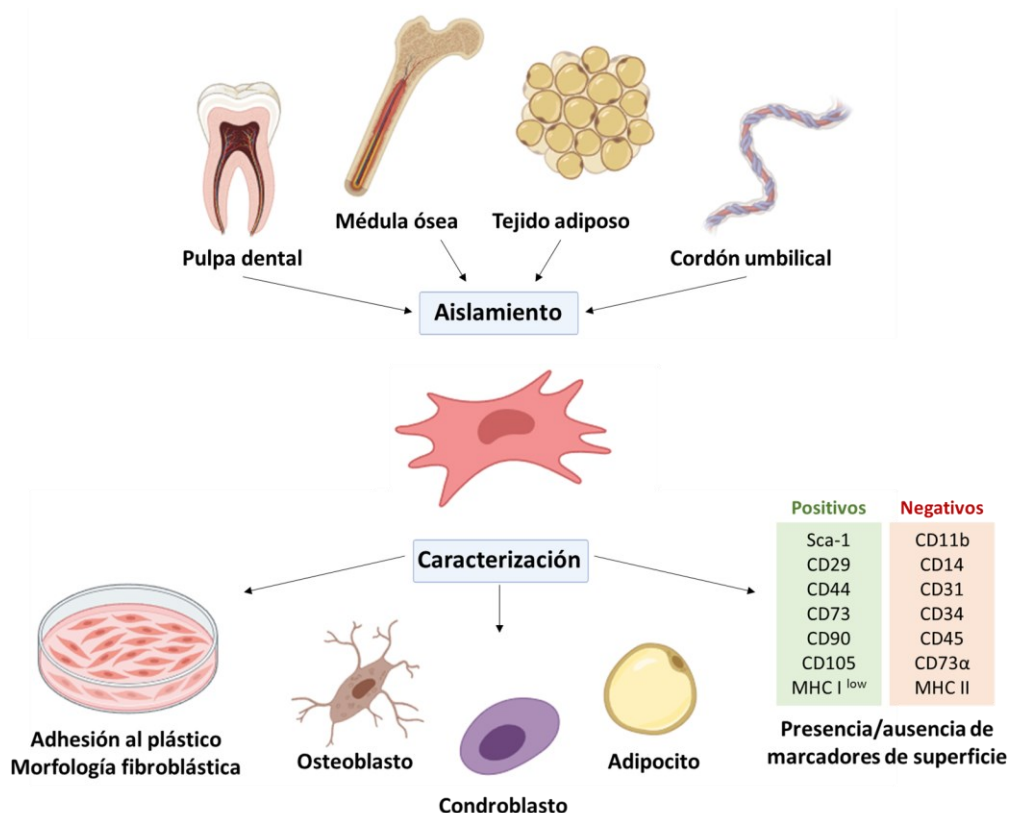


Figura 6. Aislamiento y caracterización de las MSCs. Se han aislado MSCs de diferentes tejidos. Entre los más comunes destacan la pulpa dental, la médula ósea, el tejido adiposo y el cordón umbilical. Tras su expansión *in vitro*, las MSCs se pueden caracterizar siguiendo las directrices establecidas por la ISCT. Las MSCs tienen una morfología similar a la de los fibroblastos y crecen como cultivos adherentes. También tienen el potencial de diferenciarse en osteoblastos, condroblastos y adipocitos. Por último, tienen que expresan un panel de marcadores positivos y negativos.

3.2. MSCs en terapia cardíaca

Inicialmente, se propuso que el miocardio dañado podría regenerarse mediante la diferenciación de MSC a CM en el área de infarto [118]. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la retención de las MSCs en el corazón dañado, así como su capacidad de diferenciación a CM era muy reducida [119,120]. A pesar de esto, existen varios estudios que demuestran que la administración intravenosa,

intracoronaria o intramiocárdica de MSC mejora la función cardíaca tras un IAM [117–119]. Debido a la falta de evidencia de que se produzca un reemplazo de tejido directo y duradero, el consenso actual es que la terapia cardíaca con MSCs ejerce su efecto terapéutico a través de mecanismos paracrinos que estimulan la reparación endógena [124–126], ya sea estimulando los progenitores cardíacos endógenos y la proliferación de CM [126–129], secretando moléculas y microvesículas proangiogénicas y prosupervivencia [130,131], o modulando el sistema inmunitario [132–135].

La terapia con MSC promueve la supervivencia y la proliferación de CM adultos a través de vías mediadas por Akt [126,136]. Además, la secreción de SDF-1 por las MSC aumenta la migración y proliferación de progenitores cardíacos endógenos cKit+, y su diferenciación a CM [127,137]. Las MSC también ejercen efectos beneficiosos sobre la remodelación de la ECM. Se ha visto que son capaces de modular el fenotipo de los fibroblastos cardíacos y su capacidad para degradar la ECM y, en consecuencia, promover la reducción de la fibrosis en los tejidos cicatrizados [138]. Algunos de los efectos cardioprotectores más potentes de la administración de MSC se obtienen a través de sus propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Las MSC atenúan la actividad citotóxica de los linfocitos esplénicos, inhiben el factor nuclear κB (NF- κB), reducen la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de la proteína IL-6, y estimulan la expresión de IL-10 en el miocardio peri-infartado [139,140]. El TNF- α es un importante activador de la inflamación y los niveles de TNF- α aumentan en las enfermedades cardíacas [46]. En el ensayo clínico POSEIDON-DCM (ClinicalTrials.gov: NCT01392625), pacientes con miocardiopatía dilatada no isquémica presentaban niveles elevados de TNF- α al inicio del estudio, pero estos niveles se redujeron significativamente 6 meses después de la administración de MSC de médula ósea alogénicas o autólogas, aunque las alogénicas mostraron una eficacia superior. Esta reducción se correlacionó también con mejoras en la función cardíaca [141]. En otro ensayo clínico, el ixCELL-DCM (ClinicalTrials.gov: NCT01670981), se inyectó ixmyelocel-T, una población mixta de células mononucleares de médula ósea enriquecidas en MSC y macrófagos M2, a pacientes con IC terminal debido a miocardiopatía isquémica dilatada. La administración transendocárdica de ixmyelocel-T redujo significativamente los eventos cardíacos adversos y mejoró la evolución de los pacientes [142].

Como hemos visto, la comunicación intercelular juega un papel crucial en el mecanismo de acción de las MSC. Además de la liberación de factores paracrinos, las MSC tienen otras vías de comunicación, como la formación de nanotúbulos con células adyacentes capaces de transferir orgánulos, como las mitocondrias [143], y la liberación de vesículas extracelulares (EVs) [144]. En este sentido, las EV han ganado relevancia en los últimos años debido a la amplia gama de proteínas funcionales, ARNm y microARN (miARN) que pueden contener, ejerciendo una actividad biológica similar a la de las propias MSC [145]. Estas EVs derivadas de MSC (MSC-EV) se ha visto que son capaces de proteger el tejido cardíaco de la lesión isquémica al promover la formación de vasos sanguíneos, reducir la apoptosis, mejorar la proliferación celular y modular la inflamación, reduciendo así el tamaño del infarto y preservando la función cardíaca [146–148].

4. Vesículas extracelulares

Todas las células son capaces de secretar varios tipos de vesículas con membrana, conocidas como EVs, y este proceso se conserva a lo largo de la evolución desde bacterias y arqueas hasta mamíferos y plantas [149,150]. La secreción de EVs se describió en un primer momento como una forma de eliminación de compuestos innecesarios para la célula [151]. Sin embargo, ahora sabemos que las EVs son más que meras portadoras de desechos, y el interés que suscitan surge de su capacidad para intercambiar componentes entre células, que van desde ácidos nucleicos hasta lípidos y proteínas, y actuar como vehículos de señalización en procesos celulares tanto homeostáticos como patológicos [152,153]. Aunque actualmente se utiliza el término genérico de EV para referirse a todas las vesículas membranosas secretadas, las EVs son en realidad muy heterogéneas, lo cual ha dificultado en gran medida su caracterización y la manipulación de sus propiedades y funciones. En base al conocimiento actual sobre su biogénesis, adquirido mediante microscopía electrónica y técnicas bioquímicas, las EVs se pueden dividir en dos categorías principales: exosomas y microvesículas [154,155].

El término exosoma se usó inicialmente para designar un tipo de vesículas liberadas por células en cultivo que tenían actividad 5'-nucleotidasa [156]. Posteriormente, se adoptó el término exosoma para referirse a las vesículas, de 30-150 nm de diámetro, liberadas por los reticulocitos durante su diferenciación [151]. Finalmente, los exosomas se describieron como vesículas intraluminales (ILV) formadas por la gemación interna de la membrana endosomal durante la maduración de los endosomas multivesiculares (MVE), y que se secretan tras la fusión de los MVE con la superficie celular [151]. A mediados de la década de 1990, se descubrió que los exosomas se secretaban también por linfocitos B y células dendríticas, y que tenían funciones relacionadas con la regulación inmunitaria, llegando a considerarse una terapia antitumoral con ellas [157,158]. Sin embargo, actualmente sabemos que la secreción de exosomas se produce por muchos tipos celulares, y sus múltiples implicaciones en la comunicación intercelular, tanto en estados homeostáticos como patológicos, están bien documentadas [159].

Por otro lado, las microvesículas se describieron por primera vez como material subcelular que se originaba a partir de plaquetas y que se encontraba en plasma y suero normales [160]. Posteriormente, se describió la ectocitosis, proceso que permite la liberación de vesículas de la membrana plasmática, en neutrófilos estimulados [161]. Aunque las microvesículas se empezaron a estudiar principalmente por su papel en la coagulación de la sangre [162,163], más recientemente se ha visto que tienen un papel en la comunicación intercelular en varios tipos de células, incluidas las células cancerosas [164], donde generalmente se denominan oncosomas. Las microvesículas varían en tamaño desde los 50 nm hasta los 1000 nm de diámetro por lo general, pero pueden ser más grandes, llegando hasta los 10 μ m, como en el caso de los oncosomas.

A diferencia de los exosomas, de origen endosomal, las microvesículas se generan por la gemación hacia afuera y la fisión de la membrana plasmática, liberándose así hacia el espacio extracelular [165] (Tabla 1).

	EXOSOMAS	MICROVESÍCULAS
ORIGEN	Endosoma	Membrana plasmática
TAMAÑO	50-150 nm	100-1000 nm
OTROS NOMBRES (según origen, tamaño y morfología)	• Nanovesículas • Protasomas • Tolerosomas • Dexosomas • Vesículas similares a exosomas	• Micropartículas • Oncosomas • ARRM's • Migrasomas • Neuroesferas • Cuerpos apoptóticos

Tabla 1. Diferencias entre exosomas y microvesículas.

Cada tipo de célula modula la biogénesis de EV dependiendo de su estado fisiológico, liberando así vesículas con composiciones particulares de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos [165]. Debido a que la mayoría de los estudios publicados sobre las EV se han centrado más en sus funciones potenciales que en sus orígenes, aún no está claro qué subespecie de vesículas es responsable de un efecto determinado. Los protocolos disponibles actualmente para aislar EV a partir de sobrenadantes de cultivos celulares o muestras de biopsias líquidas dan como resultado una población heterogénea de vesículas de origen desconocido. Estas diferentes subpoblaciones de EV pueden presentar distintas propiedades moleculares y biológicas [166]. El solapamiento en cuanto a rango de tamaño, la morfología similar y la heterogeneidad del contenido, obstaculizan el diseño de una nomenclatura más precisa para las EV [167]. Por este motivo, el término EV se emplea de modo general cuando nos referimos a aislados de vesículas, debido a la dificultad técnica que supone separar específicamente exosomas y microvesículas. No obstante, se siguen desarrollando nuevos métodos de aislamiento y caracterización que permitan un estudio más completo de las funciones de los diferentes tipos de EV y, por tanto, nos permitan establecer una clasificación y terminología adecuada.

4.1. Biogénesis de las EVs

Como hemos comentado, los exosomas y las microvesículas tienen diferentes modos de biogénesis (pero ambos involucran procesos de tráfico de membrana): los exosomas se generan dentro del sistema endosómico como ILV y se secretan durante la fusión de los MVE con la membrana celular (Figura 7), mientras que las microvesículas se originan por una gemación hacia afuera en la membrana plasmática.

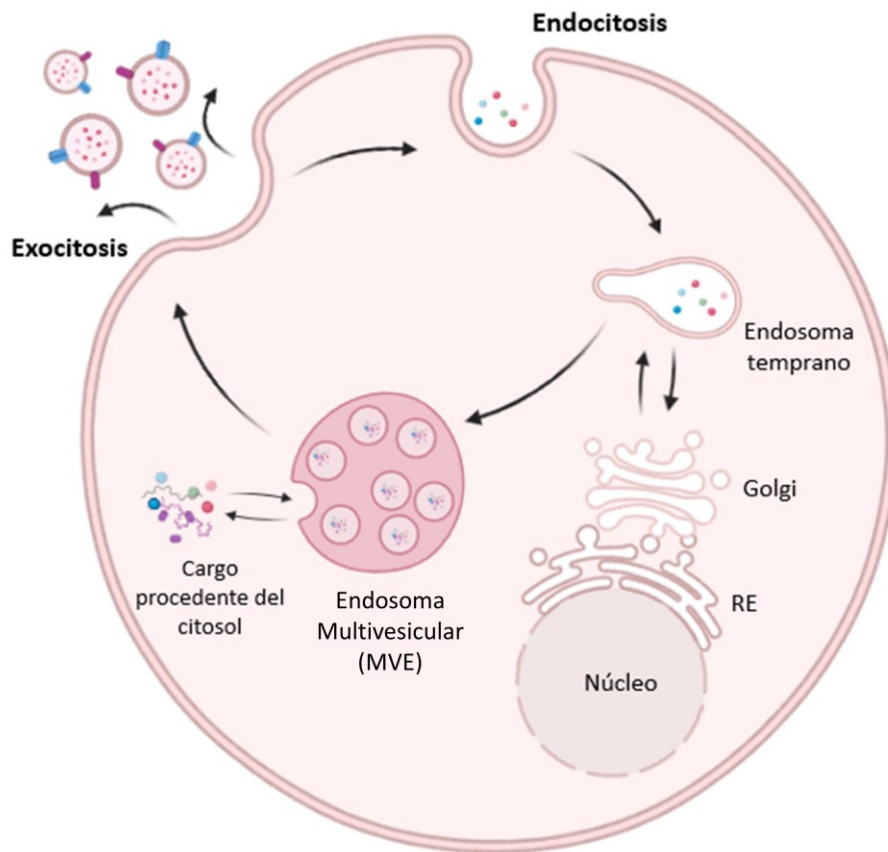


Figura 7. Biogénesis de los exosomas. Los exosomas son producidos durante la maduración de un endosoma temprano a un endosoma multivesicular o cuerpo multivesicular. En este proceso, diferentes maquinarias de clasificación pueden actuar para seleccionar el cargo que se incorporará dentro del exosoma. También se puede dar la carga pasiva de moléculas presentes en el citosol de la célula productora. Finalmente, los exosomas serán liberados mediante la fusión del MVE a la membrana plasmática de la célula.

Aunque la generación de microvesículas y exosomas ocurre en sitios distintos dentro de la célula, en la biogénesis de ambos tipos de vesículas están involucrados mecanismos intracelulares y maquinarias de clasificación comunes. En muchos casos, estos mecanismos compartidos dificultan la posibilidad de distinguir entre las diferentes subpoblaciones de vesículas [159].

4.1.1. Exosomas

Los exosomas se generan como ILV dentro de los endosomas durante su maduración a MVE, un proceso que involucra a los complejos de clasificación endosomal necesarios para el transporte (ESCRT). La maquinaria ESCRT se compone de 4 subunidades (ESCRT-0,-I,-II,III) y de proteínas accesorias (como Alix y VSP4), y actúa de manera escalonada: las subunidades ESCRT-0 y ESCRT-I agrupan cargos transmembrana ubiquitinados en microdominios en la membrana del MVE, y reclutan, a través de ESCRT-II, los

subcomplejos ESCRT-III que realizan la gemación y fisión de estos microdominios hacia el interior del MVE [168,169]. La comprensión del papel de la maquinaria ESCRT en la formación de las ILV abre la puerta a la posible modulación de la formación de exosomas mediante la manipulación de los componentes de ESCRT (Figura 7).

Los exosomas también pueden formarse por una vía independiente de ESCRT, ya que se ha confirmado la formación de MVE incluso tras la depleción de los 4 complejos ESCRT [170]. El mecanismo de biogénesis de exosomas independiente de ESCRT requiere la generación de ceramidas por parte de la esfingomielinasa neutra de tipo II, que hidroliza la esfingomielina a ceramida. Las ceramidas forman subdominios de membrana, los cuales imponen una curvatura negativa espontánea en la membrana e inician así la gemación hacia el interior del MVE [171,172]. Alternativamente, las ceramidas podrían metabolizarse en esfingosina 1-fosfato y activar el receptor de esfingosina 1-fosfato acoplado a proteína G, dando lugar a la formación de ILV [173]. Por otro lado, se ha demostrado que varias proteínas de la familia de las tetraspaninas regulan la carga endosomal independiente de ESCRT. Entre ellas destacan CD63, CD81, CD82 y CD9, que están especialmente enriquecidas en la superficie de los exosomas y se ha visto que están directamente involucradas en la incorporación del cargo en los exosomas [174,175]. Estas proteínas forman clústeres con otras tetraspaninas, así como con diferentes proteínas transmembrana y citosólicas, formando microdominios que facilitan la gemación hacia el interior del MVE [176]. Aunque las tetraspaninas, en especial CD9, CD63 y CD81, se han utilizado durante mucho tiempo como marcadores típicos de exosomas, por su alto grado de enriquecimiento, recientemente se ha visto que las EV pequeñas que las presentan también pueden surgir por gemación directa de la membrana plasmática [177,178].

Como hemos comentado, el cargo transmembrana presente en las EV depende en gran medida de las maquinarias de clasificación endosomal. Sin embargo, existen otros mecanismos que participan en la selección de los cargos solubles o asociados a la membrana que se dirigen a los exosomas. Por ejemplo, la incorporación de proteínas citosólicas a las ILV puede producirse por su coorganización con otras proteínas, como la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) y la proteína *heat shock cognate* de 71kDa (HSC70), las cuales se encuentran en los exosomas derivados de la mayoría de los tipos celulares [179]. Otros cargos de membrana, como las proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol, están presentes en los exosomas debido a su afinidad por las balsas lipídicas, las cuales pueden estar directamente implicadas en la generación de ILV debido al efecto que ejercen sobre las propiedades biofísicas de la membrana [180]. La ubiquitilación [181] o farnesilación [182] de algunas proteínas citosólicas también aumenta su incorporación a los exosomas, aunque no están claros los mecanismos subyacentes. Además de proteínas, las EV también transportan ácidos nucleicos, incluyendo ARN (ARNm y ARNs no codificantes, como microARNs (miARNs)) [183] y ADN [184]. En este sentido, se ha demostrado que los miARN se incorporan diferencialmente en los exosomas en función de su secuencia, por la presencia de motivos específicos, lo que indica que se trata de un proceso regulado [185]. Se han propuesto diferentes maquinarias mediante las cuales puede tener lugar la carga específica de ácidos

nucleicos en los exosomas, destacando el subcomplejo ESCRT-II, que podría actuar como un complejo de unión a ARN [186], los microdominios enriquecidos en tetraspaninas que podrían secuestrar proteínas de unión a ARN [187] o el complejo de silenciamiento inducido por miARN (miRISC) y la proteína argonauta 2 (AGO2), que median en los procesos de silenciamiento de ARN [188]. Recientemente, también se han descrito nuevos reguladores de la incorporación de miARN en exosomas, entre los que se incluyen la vía de señalización KRAS-MEK, que actúa a través de AGO2 [189], y las proteínas de unión a ARN: MVP [190], YBX1 [191], MEX3C [192] y La [193]. Sin embargo, la contribución relativa de la carga pasiva y activa de ARN en las EV sigue sin estar clara, por lo que la simple sobreexpresión de un miARN puede ser suficiente para aumentar su presencia en exosomas [194].

La biogénesis de los exosomas es, por tanto, un proceso complejo, que varía en función de del cargo del propio exosoma y del tipo celular en el que se produce, y que puede verse influido por otras señales y estímulos patológicos que reciba la célula. En este contexto, puede darse que diferentes mecanismos de clasificación actúen sobre el mismo compartimento endosomal [174], que diferentes maquinarias se utilicen para dirigir el mismo cargo (como en el caso del MHC II, que puede dirigirse al MVE tanto por la vía dependiente de ESCRT como por vías independientes de ESCRT) [175], o que se utilicen diferentes vías según el estado de maduración del cargo (como en el caso de la proteína PMEL, cuyo dominio luminal, que se genera por proteólisis, se incorpora por mecanismos independientes de ESCRT, mientras que el dominio transmembrana se incorpora por la vía dependiente de ESCRT) [174]. Por lo tanto, varios mecanismos pueden actuar de forma conjunta o secuencial en la formación de MVE, permitiendo así la incorporación de diversos cargos en diferentes etapas de maduración del MVE, y a su vez, originando diferentes subpoblaciones de MVE [174,195]. En consecuencia, la mayoría de las células alberga subpoblaciones de MVE que presentan diferentes composiciones de lípidos y proteínas, y difieren en su morfología.

4.1.2. Microvesículas

Mientras que desde hace tiempo se sabe que la deformación de la membrana plasmática durante la apoptosis produce microvesículas en forma de cuerpos apoptóticos [196], la liberación de microvesículas por parte de células sanas y los mecanismos implicados en esta secreción están aún poco caracterizados. Esta biogénesis requiere de varios reordenamientos moleculares dentro de la membrana plasmática, incluyendo cambios en los componentes lipídicos y en la composición proteica, así como en los niveles de Ca^{2+} [197]. Las alteraciones en los niveles de Ca^{2+} provocan el reclutamiento y activación de las enzimas dependientes de Ca^{2+} , entre las que se incluyen las translocasas de aminofosfolípidos (flipasas y flopasas), las escramblasas y la calpaína. Estas enzimas promueven reordenamientos de los fosfolípidos de la membrana plasmática, llegando a producir la flexión física de la membrana y la reestructuración del citoesqueleto de actina, favoreciendo así la gemación de la membrana y la formación de microvesículas [197,198].

4.2. Las EVs como mecanismo de comunicación

Las EVs han mostrado ser una importante vía de comunicación intercelular, tanto paracrina como endocrina. La información que contienen puede transmitirse a través de diferentes mecanismos (Figura 8):

- **Interacción con receptores de membrana de la célula diana:** Las EVs pueden transportar en su membrana lipídica diferentes combinaciones de ligandos que se unan o interaccionen con receptores presentes en las células diana, activando diversas vías de señalización de forma análoga a como lo haría la interacción entre dos células.
- **Fusión de las membranas lipídicas:** La membrana lipídica de las EVs puede fusionarse con la membrana plasmática de las células diana. De esta manera, se permite la liberación de las moléculas contenidas en las EVs al citoplasma, al mismo tiempo que se les transfieren lípidos y proteínas de membrana, lo que resulta en la adquisición de nuevas propiedades por parte de las células diana [199].
- **Endocitosis, fagocitosis y macropinocitosis:** Las EVs pueden ser captadas por las células diana a través de diferentes mecanismos de endocitosis (mediada por clatrina, por caveolinas o por balsas lipídicas), fagocitosis o macropinocitosis. Este mecanismo puede suponer la liberación al citoplasma del contenido de proteínas y miARNs presentes en las EVs [199].
- **Liberación al espacio extracelular del contenido:** Las EVs han demostrado ser portadoras de mediadores solubles importantes, como citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas, los cuales deben salir de las EVs para ejercer su función en la célula diana. Se ha visto que la estimulación de los receptores purinérgicos presentes en las EVs mediante ATP extracelular desencadena la lisis de las EVs y la liberación del contenido intravesicular [200].

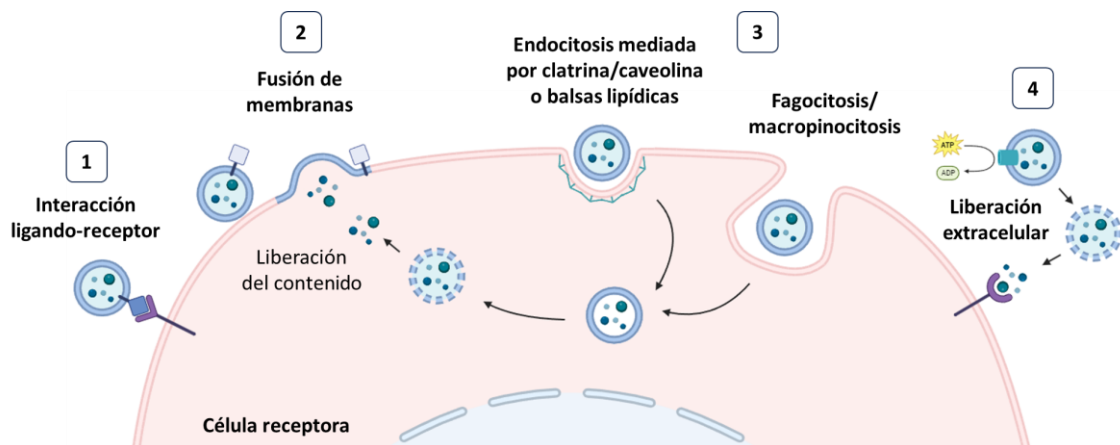


Figura 8. Mecanismos de acción de las EVs sobre las células diana. Las EVs modulan el comportamiento de la célula huésped a través de múltiples mecanismos: 1) las proteínas de la membrana de la vesícula interactúan con los receptores de la membrana plasmática de la célula diana, iniciando cascadas de señalización intracelular; 2) las EVs se fusionan con la membrana plasmática, entregando su carga directamente al citosol y proporcionando lípidos y receptores de membrana; 3) las EVs son fagocitadas y macropinocitadas, así como endocitadas ya sea por clatrina, caveolina o balsas lipídicas; 4) el contenido de las vesículas se libera extracelularmente, mediado por la acción de receptores purinérgicos.

4.3. EVs y su papel en la regeneración cardíaca

Como se ha comentado anteriormente, las EVs recapitulan el efecto biológico de sus células madre de origen, de hecho, algunos de los resultados observados en la terapia celular se atribuyen directamente al efecto de las EVs [201]. Por ello, las EVs se consideran una opción alternativa a la terapia celular en la regeneración cardíaca. Además, se ha demostrado ampliamente que los tratamientos con EV secretadas por células madre o progenitoras ofrecen ventajas significativas en comparación con las propias células madre, como una menor inmunogenicidad, un almacenamiento y producción sencillos y un costo más asequible en comparación con las células madre vivas. Por todo esto, el interés en las EVs para el desarrollo de tratamientos libres de células ha aumentado rápidamente en los últimos años. A continuación, comentaremos el papel emergente de las EVs en la promoción de la regeneración cardíaca.

4.3.1. EVs y promoción de la angiogénesis

Tras el daño, la formación de nuevos vasos sanguíneos es fundamental para la recuperación del tejido cardíaco. Se ha demostrado que las EVs liberadas por las CPCs tienen efectos cardioprotectores en corazones infartados al incrementar la densidad de los vasos sanguíneos. Este efecto se debe al enriquecimiento del miR-132 en las EVs, que mejora la formación de nuevos vasos al regular su proteína objetivo, RasGAP-p120[202]. La capacidad proangiogénica de las EVs liberadas por las CPCs también fue estudiada por Andriolo et al., quienes observaron una mayor expresión de CD31 en las células expuestas al tratamiento con EVs de CPCs [203]. Un estudio reciente demostró que las EVs derivadas de CPCs promueven la angiogénesis al mejorar la migración de células endoteliales y, que, cuando estas CPCs se cultivan con un 5 % de O₂, generan EVs con un mayor potencial angiogénico [204]. Por otra parte, se ha visto que EVs de CPCs diseñadas mediante ingeniería genética y transfectadas con el miR-322 proangiogénico estimulan la respuesta angiogénica en el corazón lesionado [205].

Por otro lado, se ha demostrado que las EVs derivadas de MSCs expuestas a isquemia contienen varias proteínas relacionadas con la angiogénesis, incluyendo el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), lo que induce estímulos proangiogénicos para promover la curación del tejido [206]. En línea con el preconditionamiento hipóxico, experimentos realizados por nuestro grupo demostraron que las EVs de MSCs

que sobreexpresan el factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) tienen una capacidad angiogénica potenciada, aumentando su capacidad terapéutica en enfermedades isquémicas [207]. Otro estudio reciente mostró que las EVs obtenidas de MSCs pretratadas con atorvastatina aumentan la densidad de arteriolas y capilares, mejorando la función cardíaca en corazones infartados [208].

4.3.2. EVs y reducción de la apoptosis

Las EVs también se han estudiado por su efecto antiapoptótico durante la reparación cardíaca. Las EVs derivadas de MSCs reducen la apoptosis de los CM limitando la extensión de la lesión cardíaca, mediante la disminución de la expresión de la proteína proapoptótica Bax y el aumento de la expresión de la proteína prosupervivencia Bcl-2 [209]. Barile et al., en el mismo estudio que hemos citado en el apartado anterior, también descubrieron que las EVs liberadas por las CPCs estaban enriquecidas con los miARNs miR-210, miR-132 y miR-146a-3p y reducían la muerte de los CM al inhibir el proceso apoptótico [202]. Más concretamente, el miR-210 y el miR-132 inhiben la apoptosis en la línea celular de CM HL-1, mientras que el silenciamiento del miR-210 aumenta significativamente la apoptosis. La disminución de la efrina 3 y PTP1, dos dianas del miR-210, se asocia con el efecto antiapoptótico observado.

Otro mecanismo que contribuye a la protección contra la apoptosis es la autofagia [210]. En este sentido, el miR-30a transferido desde las EVs, liberadas por CM hipóxicos, atenúa la apoptosis actuando sobre los genes beclina-1 y Atg12 [211]. Por otro lado, se ha demostrado que las EVs del plasma reducen la muerte celular después de una lesión por isquemia/reperfusión. Este efecto se produce por la interacción entre la proteína de choque térmico 70 (HSP70) exosomal y el receptor TLR4, que activa las kinasas reguladas por señales extracelulares uno y dos (ERK1/2) y la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (p38MAPK) [212].

En un modelo de IAM en rata, Dergilev et al. probaron el potencial terapéutico de MSCs que sobreexpresaban el factor de células madre (SCF) [212,213]. El análisis proteómico reveló que estas EVs estaban enriquecidas en proteínas del citoesqueleto y chaperonas, así como en moléculas asociadas con procesos metabólicos, lo que previene la remodelación cardíaca adversa y confiere mejoras en la función cardíaca.

Un estudio reciente demostró que las EVs aisladas del suero de pacientes con síndrome coronario agudo antes de la intervención coronaria percutánea protegen contra el daño inducido por isquemia/reperfusión en CM al activar la vía SAFE [214].

En conjunto, estos estudios proporcionan evidencia de que las EVs, derivadas de diferentes tipos celulares, tienen propiedades antiapoptóticas que promueven la reparación cardíaca.

4.3.3. EVs y resolución de la inflamación

La reparación cardíaca mediada por EVs también depende de su efecto sobre la inflamación. Dos estudios demostraron que las EVs derivadas de todas las células cardíacas tienen la capacidad de regular la secreción de citoquinas y la polarización de las células inmunitarias, particularmente el cambio de fenotipo de M1 a M2 [215,216]. Más recientemente, se ha demostrado que las EVs derivadas de CPCs reducen el proceso inflamatorio al modular la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 α , IL-2 e IL-6 [216]. Además, también comprobaron que las EVs derivadas de las CPCs aumentan el número de macrófagos M2 antiinflamatorios y reducen el número de monocitos proinflamatorios y macrófagos M1 *in vitro*.

En cuanto a EVs derivadas de MSCs, se ha observado que su inyección en el corazón infartado también mitiga la inflamación al disminuir los macrófagos CD68⁺ (macrófagos M1), debido a su enriquecimiento en miARNs antiinflamatorios [217]. La infusión intravenosa de EVs derivadas de MSCs en un modelo de IAM en ratón mostró una reducción de las citoquinas proinflamatorias circulantes y reguló el equilibrio entre los macrófagos M1 y M2 a través de la activación de la vía de señalización JAK2/STAT6 [209]. De manera similar, Xu et al. descubrieron que las EVs de las MSCs inducen la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2 y estimulan la liberación de la citoquina antiinflamatoria IL-10 por parte de los mismos, a través de la inhibición de la translocación nuclear de NF- κ B p65 y la fosforilación de AKT1/2 [218]. Un estudio reciente, ha demostrado que las EVs derivadas de MSCs preconditionadas con atorvastatina mejoran aún más la función cardíaca tras un IAM mediante la polarización de macrófagos del fenotipo M1 a M2 a través de la vía miR-139-3p/Stat1 [219].

En conjunto, estos resultados muestran mejoras en la función cardíaca tras un IAM gracias a la acción de las EVs en la resolución de la inflamación, polarizando los macrófagos de un fenotipo M1 inflamatorio a un fenotipo M2 antiinflamatorio.

5. Mejora del potencial terapéutico de las EVs

A lo largo del apartado anterior, se han estado citando diferentes estudios sobre el uso de EVs en terapia cardíaca. Muchos de ellos, se han basado en la modificación de estas EVs para la mejora de su potencial terapéutico, ya sea preconditionando las células secretoras o modificándolas genéticamente, o mediante la transfección directa de miARNs en las EVs. Durante este trabajo, se han propuesto varias modificaciones genéticas en MSCs para la mejora de la eficacia terapéutica de las EVs. A continuación, comentaremos la principales vías objeto de estudio y sus implicaciones en la terapia cardíaca.

5.1. La vía de señalización de la OSM

La Oncostatina M (OSM) fue descrita y purificada por primera vez a partir de medios condicionados de células monocíticas U937 después del tratamiento con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) por Zarling J.M. et al., en 1986 [220]. La OSM es un citoquina de la familia de la IL-6 y hoy en día sabemos que se secreta principalmente a partir de fuentes hematopoyéticas, como linfocitos T activados, macrófagos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y mastocitos [221]. Aunque los mecanismos que regulan la expresión de OSM no están completamente descritos, diversos trabajos de investigación han relacionado al transductor de señal y activador de la transcripción 5 (STAT5) como inductor de la expresión de OSM. Esta inducción dependiente de STAT5 puede producirse por la acción de citoquinas como la eritropoyetina, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), la IL-2 y la IL-33 [222].

A nivel estructural, la OSM humana está formada inicialmente por 252 aminoácidos y dividida en tres partes: el péptido señal, la cadena principal y el propéptido. El péptido señal y el propéptido se escinden mediante escisión proteolítica dentro de las células para secretar la OSM madura al espacio extracelular. La forma madura de la OSM tiene una estructura de haz de cuatro hélices unidas por bucles, dos enlaces disulfuro y dos sitios de glicosilación [221]. Una vez liberada, la OSM puede interactuar con dos heterodímeros específicos presentes en la superficie de las células diana, denominados complejos receptores de Tipo I y de Tipo II. El complejo receptor de Tipo I está formado por el receptor del factor inhibidor de la leucemia (LIF-R) y la glicoproteína 130 (gp130) o IL31-RA; mientras que el complejo receptor de tipo II está formado por el receptor de oncostatina-M (OSMR; también llamado IL-31RB) e IL-31RA. Evidencias científicas han demostrado que el receptor de Tipo I puede interactuar con diferentes proteínas de la familia de citoquinas de la familia de la IL-6, mientras que el heterodímero tipo II es específico para la OSM [223–225].

La unión de la OSM al receptor de Tipo I o Tipo II induce la activación de las quinasas Janus (JAK) JAK1-2 y TYK2, mediante la fosforilación de tirosina. Estas quinasas, una vez activadas inducen la activación y translocación nuclear de las proteínas STAT (STAT1, 3, 5A y B). Más concretamente, el complejo de Tipo I activa STAT1 y 3, mientras que el complejo de Tipo II activa STAT1, 3 y 5 [226,227]. De forma alternativa, los complejos receptores activados también pueden activar otras vías de señalización entre las que se incluyen la vía de las MAP quinasas (ERK, p38 y JNK), la de la PI 3-quinasa y la de la proteína quinasa C delta (PKC δ). Sin embargo, aún quedan detalles por esclarecer acerca de las vías de señalización activadas por la OSM [228].

La función biológica de la OSM varía entre especies y depende, tanto de la concentración de la misma como de tipo de célula diana, así como de su estado fisiológico y el microambiente en el que se encuentre [229]. La OSM se ha relacionado con propiedades tanto pro como antiinflamatorias. Las respuestas pleiotrópicas a la OSM incluyen la producción de quimioquinas y citoquinas inflamatorias, la expresión de

factores de adhesión de leucocitos y la producción de componentes de la ECM. La OSM también se relaciona con la modulación de la proliferación y la diferenciación celular. Bajo una regulación adecuada, las respuestas mencionadas anteriormente contribuyen a la homeostasis y la reparación de tejidos después de una lesión. Por el contrario, la expresión desregulada de la OSM puede promover una inflamación sostenida y una disfunción de los órganos afectados [230,231].

- **OSM en la reparación cardíaca**

Atendiendo al sistema cardiovascular, la OSM se ha relacionado con la proliferación, quimiotaxis y formación de tubos en cultivos de células endoteliales microvasculares humanas [232–234]. Además, la OSM también es capaz de regular indirectamente la angiogénesis, definida como el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células endoteliales preexistentes, modificando la expresión de factores como el VEGF [235], el FGF-2 [233], la angiopoyetina-2 [236] y el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) [237]. En este sentido, se ha visto que la OSM promueve la revascularización y la regeneración tisular en un modelo IAM en ratón [238]. El hecho de que la OSM actúe sobre las células endoteliales, no solo implica efectos en la angiogénesis, sino que también se ha demostrado que puede influir en la respuesta inflamatoria, promoviendo el reclutamiento y la extravasación de los neutrófilos [239,240].

En CM y Fb cardíacos, se ha descrito la secreción de citoquinas, como CXCL1,2 y 5, en respuesta al tratamiento con OSM, lo que respalda la hipótesis de que la OSM es un modulador de la inflamación después de una lesión en el tejido cardíaco [241]. Además de esto, estudios recientes publicados por Abe H. et al. y Huguier V. et al., han demostrado que la OSM desempeña un papel importante tras el IAM contrarrestando los efectos profibróticos causados por el TGF- β 1 [242,243]. Por otro lado, se ha demostrado que la OSM promueve la desdiferenciación de los CM y la regeneración tisular después de una lesión cardíaca [244,245]. No obstante, los mismos estudios señalan que estos efectos son consecuencia de la estimulación puntual con OSM, y que la producción sostenida de OSM puede tener efectos perjudiciales en el corazón, provocando IC y miocardiopatía dilatada [244,245].

5.2. La vía de señalización de Notch

El descubrimiento y estudio de la vía de señalización Notch en *Drosophila melanogaster* se remonta a hace más de 100 años, pero no fue hasta la década de los 80 cuando se identificó por primera vez el gen *NOTCH* y se publicó su secuencia [246]. Esta vía de señalización, centrada en el receptor Notch, está altamente conservada en el reino animal. En *Drosophila*, se identificó un receptor y dos ligandos (Delta y Serrate), mientras que en humanos existen hasta 4 receptores (Notch 1-4) y 5 ligandos: ligandos similares a Delta (DLL1, DLL3, DLL4) y Jagged (JAG1 y JAG2) [247].

Las proteínas Notch pertenecen a la familia de proteínas transmembrana unipaso (que atraviesan la bicapa lipídica de la membrana celular una sola vez). Esta característica da lugar a la separación de sus dos dominios principales: el dominio extracelular de Notch (NECD) y el dominio intracelular de Notch (NICD), los cuales están conectados por el dominio transmembrana de un solo paso. NECD se compone de varias repeticiones similares al factor de crecimiento epidermal (EGF), un motivo muy conservado evolutivamente en la región extracelular de proteínas transmembrana. Además, presenta una región reguladora negativa adyacente a la membrana celular, encargada de impedir la activación de Notch en ausencia de ligando [248]. NICD actúa como un factor de transcripción que es liberado una vez que el ligando activa su clivaje. Contiene una secuencia de localización nuclear (NLS) que permite su translocación al núcleo. También posee repeticiones de Akirina (ANK) y módulos de asociación a RBPJ (RAM) que ayudan en la activación génica.

Los receptores Notch sufren varias modificaciones durante su proceso de maduración en el RE/Golgi que determinan la especificidad ligando-receptor y que son esenciales para su correcta activación. Entre estas modificaciones, se produce la escisión en el sitio S1, controlada por una furina convertasa. Esta escisión da lugar a un heterodímero unido de forma no-covalente que viaja hacia la membrana celular donde se presenta como receptor [255,256]. Además, diversas glicosiltransferasas completan con residuos de azúcar las repeticiones en tándem similares a EGF presentes en el NECD [256].

La unión ligando-receptor Notch lleva a la endocitosis del ligando, ejerciendo la fuerza mecánica necesaria para provocar cambios conformacionales en el receptor. Estos cambios conformacionales exponen el sitio de escisión S2, de manera que es reconocido por las metaloproteasas ADAM. También en la región transmembrana se haya el sitio de escisión 3 (S3), donde ejerce su acción el complejo γ -secretasa, liberando el dominio intracelular NICD [257][258]. Tras su liberación, NICD se transloca al núcleo celular, donde forma un complejo con el factor de transcripción RBPJ. Esta unión permite el reclutamiento de coactivadores como la proteína Mastermind-like (MAML) y la consiguiente activación de la expresión génica [259,260] (Figura 9).

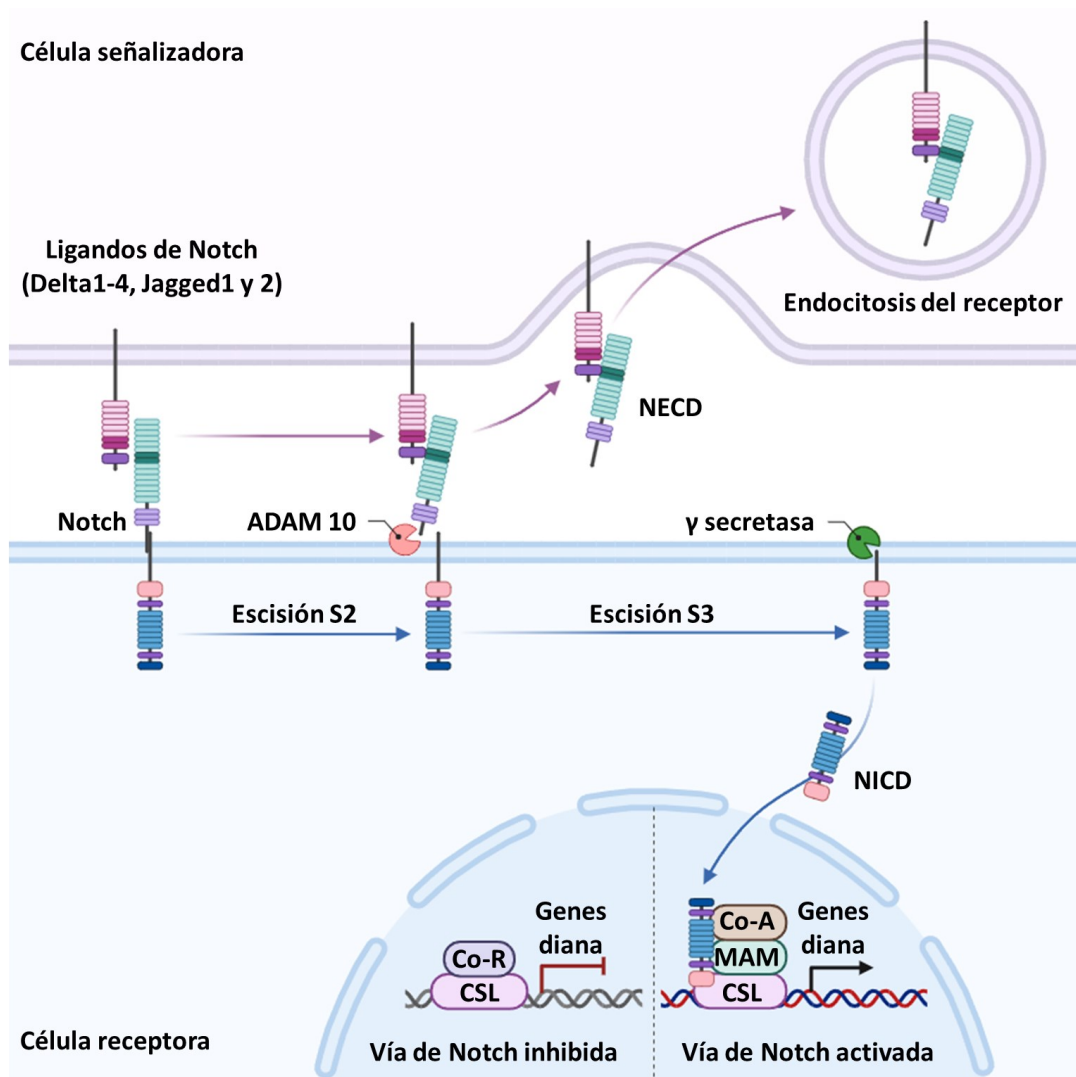


Figura 9. Esquema de la vía de señalización de Notch. Tras su paso por el RE y el aparato de Golgi, el receptor Notch se expone en la superficie celular. La unión de un ligando lleva a la endocitosis del receptor, exponiendo el sitio de corte S2 y el S3, sobre los cuales actúan una metaloproteasa ADAM y una γ -secretasa, respectivamente. Estos dos clivajes llevan a la liberación del NICD. Posteriormente, NICD se transloca al núcleo donde se une a otros coactivadores como MAM y actúa como factor de transcripción.

La vía de señalización de Notch tiene una gran relevancia en el desarrollo embrionario en mamíferos y mantiene su importancia en el tiempo al participar en la comunicación intercelular. En el transcurso de la morfogénesis del corazón, Notch participa en la formación del canal auriculoventricular, las válvulas, las arterias coronarias y la diferenciación del endocardio, miocardio y epicardio [249]. El factor de transcripción Notch es necesario en la regulación de la cardiogénesis a través de diferentes elementos de esta vía, como *HEY1* y *HEY2*, que son genes *downstream* implicados en la diferenciación del endocardio [250]. Anomalías en la vía Notch pueden ocasionar malformaciones congénitas del corazón. Las malformaciones más comunes asociadas a esta vía son la válvula aórtica bicúspide y la calcificación de la válvula aórtica, ambas estrechamente relacionadas con mutaciones en *NOTCH1* [251,252].

Debido a su participación en procesos de desarrollo y diferenciación, la vía de señalización Notch también es de especial interés en el estudio del corazón isquémico y la regeneración cardíaca, y en procesos de angiogénesis y fibrosis:

- **Notch en el daño por isquemia y regeneración cardíaca**

Notch1 juega un importante papel protector en la lesión por I/R. A pesar de que este receptor no esté activo en células cardíacas adultas, esta vía se reactiva tras la lesión producida por la reperfusión tras el IAM [253]. Notch1 actúa reduciendo el estrés oxidativo, regulando la función mitocondrial y la mitofagia [254]. También está implicado en la supervivencia de los CM, aumentando la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y reduciendo la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax [255]. Pei *et al.* demostraron que la administración del ligando JAG1, con la consiguiente activación de la vía de Notch, reduce la apoptosis en el miocardio en un modelo de infarto en ratón, destacando así el papel cardioprotector de esta vía [256][257].

Además de tener un papel protector en los CM, la vía de Notch participa en la formación de tejido y la morfogénesis creando un equilibrio entre la cantidad de células progenitoras y el número de células diferenciadas [258][259]. Se ha demostrado que bloqueando la señal del receptor Notch mediante una molécula inhibidora, se producen fallos en la diferenciación de cardiomiocitos y la proliferación, lo que lleva a un fracaso de la regeneración cardíaca tras el daño tisular [260]. Además, mediante análisis transcriptómicos, se demostró que la inhibición de Notch reducía la expresión de las moléculas antagonistas de Wnt, incrementando la expresión de este y frenando la proliferación de los CM y la consiguiente regeneración cardíaca [261]. Por el contrario, la activación de Notch en el endocardio induce las vías de señalización de Erbb2 y BMP, responsables de la reprogramación y proliferación de los CM en el miocardio [262][263].

- **Notch en la angiogénesis**

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células endoteliales preexistentes. Este proceso se inicia por la liberación de factores de crecimiento, como VEGF y es de especial relevancia tras un evento isquémico, ayudando a la reparación tisular y disminuyendo el remodelado cardíaco. Se ha observado que varios componentes de la vía de señalización Notch se expresan en las células endoteliales vasculares y desempeñan un importante papel en la angiogénesis, interactuando con la vía de señalización del VEGF [264][265]. Diferentes ligandos de Notch ejercen efectos diferentes en la regulación de la angiogénesis, lo que pone de manifiesto la complejidad de esta ruta. El ligando DLL4 es crucial para inhibir una angiogénesis en exceso, regulando negativamente receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR) [266]. Por el contrario, el ligando JAG1 compite con DLL4 actuando como un potente regulador pro-angiogénico [267,268]. Del mismo modo, se ha observado la interacción de la vía Notch con el factor inducible por hipoxia-1 α

(HIF-1 α), el cual se estabiliza en condiciones de isquemia e induce la expresión de VEGF [269,270]. Estudios previos de nuestro grupo mostraron que las EVs derivadas de MSC que sobreexpresan *HIF-1 α* presentan un alto contenido en JAG1, lo que sugiere que su efecto pro-angiogénico se debe, en parte, a su interacción con la vía de Notch [207].

- **Notch en la fibrosis**

Como hemos mencionado anteriormente, uno de los principales mediadores proinflamatorios que tras un daño cardíaco es el TGF- β . El TGF- β es un fuerte inductor de la activación de los Fb cardíacos promoviendo su diferenciación a miofibroblastos. En este sentido, varios estudios han mostrado que la inhibición de la vía de señalización Notch induce la diferenciación a miofibroblastos, exacerbando el remodelado y reduciendo la función cardíaca, mientras que la sobreexpresión de estos receptores o la administración de sus ligandos puede reducir la fibrosis cardíaca [271–273]. El principal mecanismo por el cual la vía Notch interfiere en la diferenciación a miofibroblastos es comportándose como antagonista de la vía TGF- β /Smad3 [249].

Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis

A pesar de las terapias actuales, la cardiopatía isquémica sigue siendo una enfermedad con alta morbilidad y mortalidad, lo que destaca la necesidad de estrategias terapéuticas más efectivas. En este contexto, las MSCs y, en especial sus EVs, han surgido como opciones prometedoras por sus propiedades regenerativas, pro-angiogénicas e inmunomoduladoras. Sin embargo, el reto actual se centra en mejorar la eficacia terapéutica de las EVs con el fin de hacer viable una terapia basada en las mismas. En este contexto, se plantea que la modificación genética de las MSCs para mejorar las propiedades terapéuticas de sus EVs es una estrategia prometedora. Por ello la hipótesis del trabajo ha sido la siguiente:

Se postula que tanto la carga de OSM en la superficie de las EVs como la sobreexpresión de N1ICD y HIF1A en MSCs para enriquecer sus EVs con factores terapéuticos, potencien las propiedades cardioprotectoras y cardioregeneradoras de las EVs.

2. Objetivos

Con el fin de corroborar la hipótesis se establecieron los siguientes objetivos:

- 1.1 Generar una línea de MSCs que exprese OSM en la superficie de sus EVs.
- 1.2 Aislar las EVs y confirmar la presencia de OSM en su superficie.
- 2.1 Generar una línea de MSCs que sobreexprese N1ICD y HIF1A.
- 2.2 Aislar la EVs y analizar con profundidad el contenido de moléculas terapéuticas en comparación con las EVs nativas.
- 3.1 Evaluar el efecto de las EVs modificadas sobre los principales tipos celulares del corazón *in vitro*.
- 3.2 Evaluar el potencial terapéutico de las EVs modificadas en un modelo *in vivo* de daño cardíaco inducido por isoproterenol.

Materiales y métodos

1. Cultivos celulares

1.1. MSC

Para la realización de este trabajo se han empleado MSC obtenidas a partir de pulpa dentaria de terceros molares humanos. Estas células fueron aisladas previamente por miembros del grupo y se comprobó su patrón de marcadores (CD34, CD45, CD14, CD73, CD90 y CD105) y su capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica para confirmar que se trataba de MSC. Posteriormente, las MSC fueron immortalizadas mediante la sobreexpresión del gen *hTERT* (MSC-T) y se realizaron pruebas adicionales para comprobar que dicha sobreexpresión no interfería ni en la características básicas de las células, ni en su patrón de marcadores y capacidad de diferenciación [274]. Estas MSC-T se han utilizado como base celular para las posteriores modificaciones genéticas realizadas durante esta tesis con el fin de mejorar su capacidad terapéutica en enfermedades cardíacas. Las MSC-T se cultivaron en medio Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con baja glucosa suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) a 37 °C y 5% CO₂.

Para el cultivo del resto de MSC-T modificadas que se han usado durante este trabajo (MSC-T-CD81, MSC-T-CD81-matOSM, MSC-T-CD81-MutOSM, MSC-T-N1ICD y MSC-T-HIF-N1ICD) se empleó FBS libre de tetraciclinas (TTC), ya que todas estas líneas cuentan con el sistema inducible Tet-On, el cual puede ser activado por la presencia de TTC residuales.

1.2. Fibroblastos cardíacos humanos (HCF)

Para la realización de los experimentos relacionados con la fibrosis cardíaca *in vitro* se han empleado fibroblastos cardíacos humanos primarios aislados de ventrículos de corazones adultos. Estas células fueron adquiridas de PromoCell y se cultivaron con el medio Fibroblast Growth Medium-3 Bulletkit™ (PromoCell) a 37 °C y 5% CO₂ para su crecimiento. Debido a su naturaleza, el cultivo en condiciones estándar de estas células promueve el aumento paulatino de marcadores profibróticos. Por este motivo, todos los experimentos de este trabajo fueron realizados con HCF en un pase 4 o inferior.

1.3. Células endoteliales humanas (HUVEC)

Para los experimentos relacionados con función endotelial, se han empleado células primarias endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC). Estas células provienen de la vena del cordón umbilical de recién nacidos (14 días o menos) y son utilizadas frecuentemente para evaluar la capacidad angiogénica *in vitro*. Las HUVEC se adquirieron de ATCC y se cultivaron a 37 °C y 5% CO₂ para su crecimiento en el medio Endothelial Cell Growth Medium -2 Bulletkit™ (Lonza).

1.4. Cardiomiocitos de rata (H9c2)

Los cardiomiocitos adultos son células con una tasa de proliferación muy reducida, lo cual dificulta su cultivo y encarece considerablemente el coste de la investigación al tener que adquirir constantemente viales. Por este motivo, la línea celular H9c2 está ampliamente extendida en el campo de la investigación cardiovascular como herramienta efectiva y reproducible para modelar diferentes afecciones cardíacas *in vitro*. Las células H9c2 son cardiomioblastos procedentes de tejido cardíaco de rata que han demostrado tener una respuesta frente a estímulos hipertróficos [275] y un metabolismo energético frente a situaciones de hipoxia-reoxigenación [276] muy próximos a los de los cardiomiocitos primarios. Las células H9c2 fueron adquiridas de ATCC y se cultivaron en DMEM con alta glucosa, suplementado con un 10% de FBS a 37 °C y 5% CO₂ para su expansión y mantenimiento.

1.5. Células empaquetadoras (HEK-293T)

La línea celular HEK-293T, una línea embrionaria que proviene de riñón humano (ATCC), fue empleada para la producción de partículas lentivirales. Su rápido crecimiento y la facilidad a la hora de transfectarlas ha extendido su uso para tales fines. Estas células se cultivaron en DMEM con alta glucosa, suplementado con un 10% de FBS a 37 °C y 5% CO₂ para su expansión y mantenimiento.

2. Modificación genética de MSC

Para la realización de este trabajo se han utilizado vectores lentivirales para modificar genéticamente las MSC. Para ello, se ha seguido el proceso que se detalla a continuación.

2.1. Producción de partículas virales

2.1.1. Transformación de bacterias

Para la amplificación de los plásmidos, se transformaron bacterias de la cepa competente *Escherichia coli* DH5- α (ThermoFisher Scientific). Esta cepa de bacterias no patógenas presenta las mutaciones *recA1* y *endA1* que ayudan a la inserción del plásmido, maximizando la eficiencia de transformación.

La transformación se llevó a cabo mediante choque térmico: en primer lugar, 100 μ l de la suspensión de bacterias se incubaron con 500 ng del plásmido correspondiente en hielo durante 20 minutos, y a continuación, se produjo el choque térmico introduciéndolas durante 45 segundos en un baño a 42 °C y nuevamente en hielo durante 2 minutos. Tras esto, se les añadió 1 mL de medio LB y se incubaron a 37 °C en agitación (180 rpm) durante 1 hora, con el fin de expandirlas. A continuación, se

centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos y el pellet de bacterias se resuspendió en 50 µl de LB. Esta suspensión se sembró por estrías en placas Petri previamente preparadas con LB-agar y ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Los plásmidos utilizados en este trabajo contienen un gen de resistencia a la ampicilina, de tal forma que al día siguiente de la incubación se seleccionan las colonias de bacterias que hayan crecido y, por tanto, hayan incorporado el plásmido.

2.1.2. Producción y aislamiento del plásmido

La colonia de bacterias que haya incorporado el plásmido se pica con una punta de pipeta estéril y se deposita en un matraz Erlenmeyer con 300 mL de LB con ampicilina (100 µg/mL) y se deja durante 24 horas a 37 °C en agitación (180 rpm). Una vez crecidas las bacterias se procede al aislamiento y purificación del plásmido mediante el kit JetStar™ 2.0 Plasmid Maxiprep Kit (Genomed). Siguiendo las indicaciones del fabricante se obtiene un pellet de ADN plásmidico, que posteriormente se resuspende en agua y se cuantifica mediante espectrofotometría utilizando el Nanodrop 2000 (Termofisher). Finalmente, el plásmido se diluye a una concentración de 1 µg/ml.

2.1.3. Generación de lentivirus con las células HEK-293T

Las partículas lentivirales se generaron utilizando la línea HEK-293T. Para ello se procedió de la siguiente manera:

- **Día 1: Siembra de las HEK-293T.** Las HEK-293T se siembran en placas de 55 cm² a una densidad de $6 \cdot 10^6$ células por placa.
- **Día 2: Transfección de los plásmidos.** Una hora antes de la transfección de los plásmidos se les cambia el medio de cultivo a las HEK-293T por DMEM alto en glucosa con cloroquina a una concentración de 25 µM. Durante este tiempo se preparan las soluciones A y B (Tabla 2). Una vez preparadas las soluciones A y B, la solución A se agrega a la solución B gota a gota manteniendo la solución B en agitación ligera en un vórtex. Después de eso, la mezcla se deja quieta durante 10-15 minutos y se añade con cuidado a las células HEK-293T. Pasadas 8 horas, el medio de cultivo celular se reemplaza por medio de cultivo de las células a las que vamos a infectar en un futuro, en este caso MSCs (DMEM bajo en glucosa suplementado con 10% de FBS sin TTC y 1% de P/S), durante 48 horas. Durante este tiempo, la línea celular empaquetadora producirá partículas lentivirales con la construcción genética de interés en su interior.
- **Día 4: Recolección de las partículas virales.** Tras 48 horas, se recoge el sobrenadante, rico en partículas virales, se centrifuga a 300 g durante 5 minutos y se pasa a través de un filtro de 0,45 µm, para limpiar cualquier resto

celular o debris que pudiera quedar. Una vez hecho esto, se almacena a -80°C hasta el momento de la infección.

Solución A	Plásmido de interés	5 μl
	psPAX2	3 μl
	pMD2.G	1,5 μl
	CaCl_2 2M	62 μl
	H_2O	428,5 μl
Solución B	HBS (2x) *	500 μl

Tabla 2. Soluciones para la transfección de plásmidos. La concentración de los plásmidos utilizados es de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. **HEPES tampón salino: 10mM glucosa, 40mM HEPES, 10mM KCl, 270mM NaCl, 1.5mM Na_2HPO_4 , pH 7,1.

2.2. Infección de MSCs

El día previo a la infección, se siembran las MSCs a una densidad de 2.000 células/ cm^2 . Al día siguiente, se les añade las partículas lentivirales suplementadas con el polímero catiónico polibreno a 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich), ya que mejora la eficiencia de la infección. Las MSCs se incuban durante 6 horas junto con los lentivirus y, transcurrido este tiempo, el medio de las células se reemplaza por DMEM bajo en glucosa suplementado con 10% FBS sin TTC y 1% P/S. Una vez que incorporan el ADN plasmídico en el genoma, las células establecen la expresión constitutiva de la proteína de interés y del gen reportero. El gen reportero en los plásmidos utilizados fue el de resistencia a la puomicina, excepto en el plásmido de hTERT y de HIF-1 α , que fueron el gen de resistencia a la higromicina y el de la GFP respectivamente.

72 horas después de la infección se evalúa la eficacia de la misma mediante la adición de puomicina o higromicina, o mediante citometría de flujo para comprobar el número de células positivas para GFP. Con los genes de resistencia a antibióticos, se consigue además un cultivo puro de células transgénicas, ya que se puede realizar una selección de las mismas con concentraciones relativamente bajas de antibióticos (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 72 horas).

3. Aislamiento y caracterización de EVs

Para el aislamiento de la EVs en primer lugar se debe preparar el medio de extracción de EVs, que es un medio de cultivo libre de EVs. Aunque el FBS se utiliza habitualmente como suplemento del medio de cultivo para favorecer el crecimiento celular, contiene un gran número de EVs que pueden interferir en nuestros análisis y experimentos. Para evitar esto, el FBS se mezcla al 50% con DMEM bajo en glucosa y se centrifuga a 100.000 g durante 16 horas. Durante este trabajo se utilizó un rotor de ángulo fijo 50.2Ti

(Beckman Coulter) y una ultracentrífuga CD80NX (Hitachi). Esta mezcla del FBS con medio de cultivo reduce la viscosidad del FBS y permite una mejor depleción de vesículas. Terminado el ciclo de centrifugación, se recoge el sobrenadante y se filtra a través de un filtro de $0,2\ \mu\text{m}$ para retirar posibles contaminantes.

Una vez las células se encuentran en una confluencia cercana al 80-90%, se les retira el medio, se lavan con PBS para limpiar cualquier posible resto de vesículas de FBS que pudieran contener y se les pone el medio de extracción de EVs. Además, se les añade $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de doxiclina (Sigma) para inducir la expresión de los vectores Tet-on (CD81, MutOSM-CD81, MatOSM-CD81 y N1ICD). Pasadas 48h, se recoge el medio y se desechan las placas. El medio condicionado obtenido puede emplearse inmediatamente para aislar las EVs o almacenarse a $-80\ ^\circ\text{C}$.

Durante este trabajo se han empleado dos métodos diferentes de aislamiento de EVs, uno basado en ultracentrifugaciones seriadas y otro basado en filtración de flujo tangencial (TFF) seguida de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC).

3.1. Aislamiento de EVs por ultracentrifugación

Para el aislamiento de EVs por ultracentrifugación, en primer lugar, se lleva a cabo una centrifugación a $2.000\ \text{g}$ durante 20 minutos a $4\ ^\circ\text{C}$ (centrífuga de sobremesa Eppendorf 5804, rotor A-4-62), seguida de otra a $10.000\ \text{g}$ durante 60 minutos también a $4\ ^\circ\text{C}$ (centrífuga Hitachi CP100NX, rotor Beckman Coulter 50.2 Ti). De esta forma eliminamos posibles restos celulares y debrís. A continuación, se filtran los sobrenadantes a través de un filtro $0,22\ \mu\text{m}$ para descartar las EVs de mayor tamaño. El siguiente paso es concentrar las EVs presentes en el sobrenadante mediante 2 rondas de centrifugación a $100.000\ \text{g}$ y $4\ ^\circ\text{C}$ durante 2 horas cada. Entre la primera y la segunda, se realiza un paso de lavado mediante la resuspensión del pellet en PBS filtrado. Finalmente, se resuspende el pellet en $100\ \mu\text{l}$ de PBS y se filtra por un filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ para mantener la esterilidad.

3.2. Aislamiento de EVs por TFF y SEC

A lo largo de la realización de este trabajo, se implementó un nuevo método de aislamiento de EVs en el laboratorio que consta de un primer paso de filtración de flujo tangencial, seguido de una cromatografía de exclusión por tamaño. Este método, ofrece un mayor rendimiento de EVs además de un mayor grado de pureza, ya que con la ultracentrifugación se arrastran una gran cantidad de proteínas, principalmente del FBS. Por este motivo, es el método que se utiliza actualmente en nuestro grupo y con el que se han aislado una parte de las EVs de este trabajo.

En primer lugar, se lleva a cabo una centrifugación a $2.000\ \text{g}$ durante 20 minutos a 4°C (centrífuga de sobremesa Eppendorf 5804, rotor A-4-62) para eliminar restos celulares, al igual que se hace antes de las ultracentrifugaciones. Después, se pasa el

sobrenadante por un filtro de 0,22 μm y se concentra mediante el uso de los filtros TFF-Easy (HansaBiomed Life Sciences). El TFF-Easy es un cartucho filtrante de fibras huecas fabricado en polisulfona, que permite la concentración y de pequeñas moléculas y vesículas. El resultado de la concentración nos proporciona una reducción en el volumen aproximada de 20 veces. A continuación, se procede a la realización de la SEC para separar la fracción de las EVs de otras moléculas como proteínas. Este proceso se lleva a cabo mediante el uso de las columnas comerciales *Extracellular Vesicle SEC Columns* de 2 ml (StemCell Technologies).

3.3. Cuantificación y caracterización de las EVs

Como métodos rutinarios de cuantificación de EV se emplearon el BCA de Pierce y el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA):

- **BCA:** Mediante el ensayo BCA de Pierce (Thermo Fisher) se cuantificaba de forma rutinaria la cantidad de proteína en nuestros aislados de EVs. Para ello, las EVs aisladas mediante ultracentrifugación, se lisaban con RIPA (1 % de NP40, 0,5 % de desoxicolato, 0,1 % de dodecilsulfato de sodio en solución salina tamponada con Tris (TBS), (Sigma-Aldrich)) en una proporción 1:1, y se calculaba la concentración de proteínas con la ayuda de una curva patrón de albumina de suero bovino (BSA). Esta técnica nos ofrecía una medida indirecta de la cantidad de EVs. Sin embargo, en la actualidad el grupo ha optado por la realización únicamente de técnicas de medición directas como el NTA.
- **NTA:** El NTA es una técnica que además de cuantificar la concentración de partículas en nuestros aislados, nos ofrece información sobre su tamaño. De esta forma podemos saber tanto la distribución de tamaños como el tamaño medio de las EVs. Esta información es de gran utilidad a la hora de utilizar diferentes lotes de EVs, ya que nos sirve como punto de control adicional para confirmar su homogeneidad. Para realizar esta técnica, se emplea el sistema NanoSight NS3000 (Malvern Instruments). Las muestras se diluyen entre 100 y 1000 veces para alcanzar una concentración óptima para las mediciones ($2 \cdot 10^8$ - $2 \cdot 10^9$ partículas/ml) y se realizan 5 mediciones por muestra para la obtención de los resultados.

Para la caracterización morfológica y fenotípica se utilizaron las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y el análisis por ExoView:

- **TEM:** La microscopía electrónica se realizó de acuerdo con el protocolo descrito previamente por la unidad de microscopía del Centro de Investigación Príncipe Felipe [219]. Las EVs se diluyeron en PBS, se cargaron en rejillas recubiertas de carbón Formvar y se contrastaron con acetato de uranilo al 2 %. Las muestras se examinaron posteriormente con un

microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 Spirit y las imágenes fueron adquiridas con una cámara CCD Morada (Olympus Soft Image Solutions GmbH).

- **Exoview:** El Exoview es un análisis realizado con el sistema Nanoview N2000 (actualmente llamado Leprechaun, de Unchained Labs). Este sistema se basa en la utilización de unos chips comerciales que, en nuestro caso, están funcionalizados con anticuerpos anti-CD9, anti-CD81 y anti-CD63. Estos 3 anticuerpos detectan 3 tetraspaninas características de los exosomas y presentes en la mayoría de ellos. Para realizar el análisis con Exoview, las diferentes muestras de EVs se dejan incubar sobre los chips toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, los chips se lavan y se incuban con un cóctel de 3 anticuerpos, anti-CD9, anti-CD81 y anti-CD63, esta vez conjugados a fluoróforos (Figura 10). En nuestro caso, el anticuerpo anti-CD63, fue sustituido por anti-OSM o anti-JAG1 conjugados al mismo fluoróforo que el CD63 (ya que el analizador tiene las longitudes de onda predeterminadas). Tras 1 hora, se lavan y se analizan con el Nanoview N2000. Este análisis nos permite ver la coexpresión de las tetraspaninas y analizar diferentes subpoblaciones de EVs. Además, al sustituir uno de los anticuerpos del kit por uno de nuestra elección, podemos ver el porcentaje de Evs que expresan dichas proteínas en su superficie (también se podría analizar el cargo mediante un protocolo de permeabilización). Finalmente, el análisis también nos ofrece datos de tamaño, obtenidos mediante interferometría.

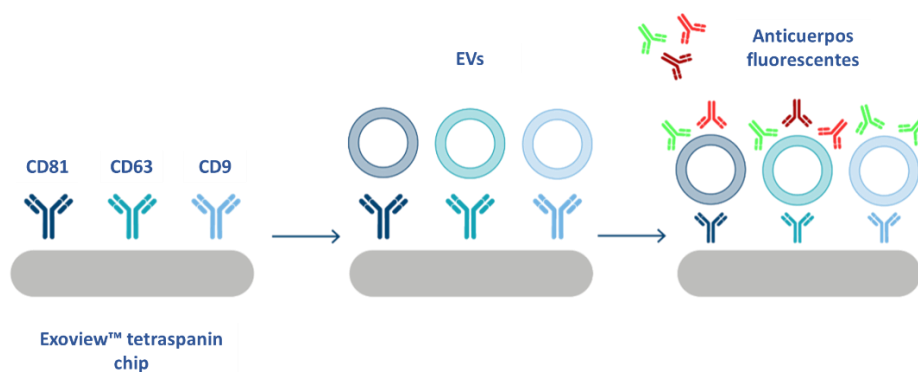


Figura 10. Captura de EVs con el chip del sistema Exoview. Las EVs se capturan con anticuerpos anti-tetraspaninas (CD63, CD9 y CD81) y posteriormente se incuban con anticuerpos conjugados para detectar los marcadores presentes en sus superficie. Tomada de Proteintech [277].

3.4. Análisis proteómico de las EVs

Para analizar el contenido proteico de las EVs se llevó a cabo un análisis proteómico de los diferentes tipos de EVs (T-EVs, TN-EVs, TH-EVs y THN-EVs), como se había descrito

anteriormente [278]. El análisis proteómico se realizó en la instalación de proteómica de la SCSIE Universidad de Valencia, perteneciente a Proteored, PRB3, y cuenta con el apoyo de la subvención PT17/0019, del PE I+D+i 2013-2016, financiada por el ISCIII y FEDER. Las muestras se diluyeron en el tampón de lisis RIPA y se cuantificaron usando Qubit® Protein Assay Kit (Invitrogen). Un total de 30 µg de las proteínas por muestra se cargaron en un gel de 12.5% de acrilamida 1D SDS-PAGE. Seguidamente, se cortó la banda con todas las proteínas y fueron digeridas con tripsina. La digestión se detuvo usando una solución del 1% de ácido trifluoroacético 5µL se usaron para una cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

Los datos fueron analizados con el software String. Las proteínas se ordenaron siguiendo una puntuación llamada Unused Protein Score, la cual se trata de una medida de comparación entre las proteínas obtenidas vs las proteínas de la base de datos. Sólo las proteínas con al menos un único péptido y un valor Unused de > 1,2 fueron consideradas para los siguientes análisis. Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional para detectar las asociaciones entre los diferentes GOs y los grupos experimentales. Esta caracterización funcional nos permitió determinar el conjunto de procesos biológicos que se encuentran sobrerrepresentados en nuestro subgrupo de proteínas. Los procesos biológicos diferencialmente expresados se recogen en un TreeMap usando la función web REVIGO que permite la comparación de resultados entre grupos y es de especial utilidad para revelar patrones funcionales.

3.5. Análisis de miARNseq de las EVs

Las EVs se resuspendieron en PBS y se enviaron a la Unidad de Genómica del Centro de Regulación Genómica de Barcelona, donde se llevó a cabo la secuenciación de los miARNs de las EVs. Las bibliotecas se prepararon utilizando el kit NEBNext® Small RNA Library Prep Set de Illumina® (E7330), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, entre 1-5 ng de ARN aislado de las EVs se sometieron a ligadura de adaptadores 3' y 5' y a la síntesis de ADNc de primera cadena. La amplificación de las bibliotecas se realizó mediante PCR utilizando los cebadores indexados suministrados en el kit. Todos los pasos de purificación se realizaron con beads AgenCourt AMPure XP (ref. A63882). Las bibliotecas finales se analizaron con el bioanalizador Agilent (5067-4626) para estimar la cantidad y comprobar la distribución de tamaños. Se realizó un pool para realizar la selección de tamaño utilizando geles Novex TBE PAGE al 6 % (EC6265BOX) y el conjunto final se cuantificó mediante qPCR utilizando el kit KAPA Library Quantification (KK4835, KapaBiosystems). Finalmente se secuenciaron en el NextSeq2000 de Illumina.

El análisis de la secuenciación fue llevado a cabo por el Grupo de Ingeniería Estadística Multivariante (GEIM) de la Universidad Politécnica de Valencia. Los archivos FASTQ fueron tratados con Cutadapt y alineados con Kallisto para obtener la tabla de conteos de cada miARN. Se emplearon varios métodos de expresión diferencial para buscar miARNs alterados entre grupos: prueba binomial negativa de edgeR, modelos de

regresión de lima y prueba no paramétrica de NOISeq. El modelo edgeR se aplicó a los recuentos de miARN no normalizados y a la normalización proporcionada por CQN, mientras que el modelo limma se aplicó solo a los datos normalizados por CQN, que incluían una transformación logarítmica de los valores de expresión. Los datos normalizados por CQN sin transformación logarítmica se analizaron con el modelo NOISeq. Para seleccionar los miARNs expresados diferencialmente a partir de los resultados de edgeR y limma se utilizó un valor de corte p de 0,05, mientras que para el valor p ajustado por FDR de NOISeq se utilizó un valor de corte de 0,10. Seleccionamos aquellos miARN con recuentos acumulativos superiores a 100 y se realizó un análisis de enriquecimiento funcional en los miARN seleccionados a través de la plataforma GeneCodis, tanto para las bases de datos de Ontología Génica como de KEGG.

4. Análisis de expresión génica

4.1 Análisis de ARN

4.1.1 Extracción de ARN

Para aislar el ARN de las células, éstas se mantuvieron en hielo y se lavaron con PBS frío antes de añadir el tampón de lisis celular conocido como RLT. Se recogió del pocillo el lisado celular y se le añadió el mismo volumen de EtOH 70%. A continuación, se usó el kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) para la purificación de ARN por columnas siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se determinó usando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). La calidad de la extracción se evaluó usando el ratio 260/280 (indicador de contaminación por proteínas) y el ratio 260/230 (indicador de contaminación causada por componentes orgánicos o agentes caotrópicos). La calidad del ARN se consideró aceptable cuando los ratios fueron $> 1,8$ y > 2 respectivamente.

4.1.2 Retrotranscripción

Una vez aislado y cuantificado el ARN, éste puede usarse como molde para obtener el DNA complementario (cDNA) por transcripción inversa. Para ello, se utilizó el kit PrimeScript RT Reagent Kit (Takara) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf partiendo de 1 μg de ARN en todas las muestras con los siguientes ciclos de temperatura:

1. 15 minutos a 37 °C: La temperatura de 37 °C es óptima para la actividad de la enzima transcriptasa inversa, que se utiliza para convertir el ARN en cDNA.
2. 5 segundos a 85 °C: Luego, se aumenta la temperatura a 85 °C durante un corto período de tiempo. Esto se hace para desactivar la enzima transcriptasa inversa y detener la reacción de retrotranscripción.

- Finalmente, la reacción se enfría a 4 °C para detener cualquier actividad enzimática no deseada y estabilizar el cDNA.

Después de la retrotranscripción, el cDNA resultante se guarda a -20 °C. Al almacenar el cDNA a esta temperatura, se evita su degradación y se mantiene estable hasta que esté listo para su uso en la qPCR.

4.1.3 RT-PCR

Los cebadores (oligonucleótidos cortos de DNA) específicos para cada gen y especie (humano y rata) fueron diseñados utilizando la herramienta informática Primer-Blast. Estos cebadores están diseñados para dirigirse a regiones específicas de genes humanos de interés y amplificar esas regiones durante la qPCR. Los cebadores diseñados se adquirieron a través de Condalab (Madrid). Para cada reacción de RT-qPCR, se utilizó SYBR™ Green PCR Master Mix de Applied Biosystems. Este master mix es una mezcla que contiene todos los componentes necesarios para la reacción de PCR, incluyendo la enzima polimerasa, nucleótidos y SYBR™ Green, un tinte que se une al ADN amplificado y permite la detección en tiempo real. Cada reacción de qPCR contenía los siguientes componentes: 2 µl de cDNA, 0,34 µl de cada cebador (uno sentido y uno antisentido), 2,32 µl de agua molecular y 5 µl del SYBR™ Green PCR Master Mix, con un volumen final de 10 µl por reacción. La reacción se realizó en placas de 384 pocillos en un sistema de PCR Viia 7 (Applied Biosystems). Los ciclos de temperatura para la qPCR fueron los siguientes:

- Desnaturalización inicial: 95°C durante 10 minutos.
- Ciclos de amplificación: 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos (denominado desnaturalización) seguidos de 60 °C durante 1 minuto (denominado anillamiento/elongación). Durante estos ciclos, se amplificará selectivamente el ADN de interés si está presente en la muestra.
- Curva de melting: En esta etapa, el termociclador calienta la muestra de manera gradual y controlada, midiendo la fluorescencia en todo momento para verificar la pureza y especificidad de la amplificación.

La monitorización de la reacción se llevó a cabo usando el Software QuantStudio Real-Time PCR Software and DataAssist v3.01 (Applied Biosystem). Como control se utilizó el gen *GAPDH*. Los cebadores que se han diseñado y utilizado en este trabajo se detallan a continuación:

Gen	Cebador Forward	Cebador Reverse
h <i>ACTA2</i>	AGCGTGGCTATTCCTTCGTT	GCAGTGGCCATCTCATTTTC
h <i>BMP1.3</i>	ACAACAAGCACGACTGCAAA	ACTCAGGCTGGGACTCGAT
h <i>COL1A1</i>	AGTGGTTTGGATGGTGCCAA	GCACCATCATTTCCACGAGC
h <i>CXCR4</i>	GCGGGGCAGAGGAGTTAGCC	AGTGGGCTAAGGGCACAAGAGAA

<i>h FAP</i>	CACAGATCCAGTGACCCACG	ACCAATAAGGCAAGCACAGC
<i>h FN1</i>	TATGAGCAAGGAACCAGAAATAC	CCACTTCATGTTGTCTCTTC
<i>h GAPDH</i>	CCCCTCTGCTGATGCCCCCA	TGACCTTGCCAGGGGTGCT
<i>h HEY1</i>	AGGTAATGGAGCAAGGATCTGC	CCCGAAATCCCAAACCTCCGA
<i>h HEY2</i>	AAGAGCCGCTAGGAGCAGAC	CCCCGAGTAATTGTTCTCGCT
<i>h HIF1A</i>	CACAGCCTGGATATGAA	GAATTCTTGGTGTTATATATG
<i>h JAG1</i>	AGCTATTTGCCGACAAGGCT	CACTGCCAGGGCTCATTACA
<i>h MMP2</i>	TACAAAGGGATTGCCAGGAC	TAGCGCCTCCATCGTAGC
<i>h N1ICD</i>	GAATGGTCAATGCGAGTGCC	CCGCAGAGGGTTGTATTGGT
<i>h NOTCH1</i>	GCAAGAACGCCGGGACA	CTTGTAATCCGTCAGCGTGAG
<i>h NRF2</i>	CTTCATCTAGTTGTAAGTGAAG	AGAATAAAGTGGCTGCTCAG
<i>h SOX2</i>	CCCCCGCGGGCAATAGCAT	TCGGCGCCGGGGAGATACAT
<i>h WNT1</i>	CTTCGGCAAGATCGTCAACC	GCCGAAGTCAATGTTGTGCGC
<i>r Anp</i>	CCTGGACTGGGGAAGTCAAC	ATCTATCGGAGGGGTCCCAG
<i>r Bnp</i>	TGACGGGCTGAGGTTGTTTT	AACTGTGGCAAGTTTGTGC
<i>r Gapdh</i>	GCATCTTCTGTGCAAGTGCC	GATGGTGATGGGTTTCCCGT
<i>r β-Mhc</i>	AGTGAAGAGCCTCCAGAGTTT	TCTTCTTCTGGTTGATGAGGCT

Tabla 3. Lista de cebadores empleados para la RT-PCR de mARNs.

4.2 Análisis de miARN

4.2.1 Extracción de miARN

Para aislar los miARNs de las células, éstas se lavaron con PBS frío antes de añadir 700 µl del tampón de lisis celular conocido como Qiazol directamente a las células. El Qiazol es una solución que contiene fenol y guanidina isocianato, y se utiliza para romper las membranas celulares y liberar los componentes celulares, incluyendo los miARN. Luego, se mezcla el Qiazol con 140 µl de cloroformo. La adición de cloroformo ayuda a separar las fases acuosas y orgánicas de la muestra. Los miARN se encontrarán en la fase acuosa, mientras que otras moléculas, como proteínas y DNA, estarán en la fase orgánica. La mezcla de Qiazol y cloroformo se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, los tubos que contienen la mezcla se centrifugan a alta velocidad (12.000 g) durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C. La centrifugación permite separar las fases de manera efectiva, y los miARN se acumulan en la fase acuosa, que estará en la parte superior de la solución después de la centrifugación. Tras la centrifugación, se recoge cuidadosamente la fase acuosa. Esta fase se transfiere a un nuevo tubo sin contaminar con la fase orgánica y se mezcla con 1,5 volúmenes de EtOH 100 %. A continuación, se emplea el kit miRNeasy Mini Kit (Qiagen), con el que de manera análoga a como se hace con el ARN, se aíslan los miARNs mediante columnas. Una vez aislados, pueden usarse justo después o congelarse a -80 °C.

4.2.2 Retrotranscripción

Para pasar los miARNs a cDNA, se utiliza el kit de transcripción inversa miRCURY LNA Universal RT microARN PCR Kit (Qiagen). Para cada reacción se mezclan: 2 µl del miARNs eluído, 2 µl de Buffer de Reacción 5x, 1 µL del mix enzimático y agua libre de nucleasas alcanzando así un volumen final de 10 µL. La mezcla se incubó durante 60 min a 42°C seguido de una inactivación de la transcriptasa mediante una incubación de 5 min a 95°C. Una vez llevada a cabo esta reacción el producto se congela a -20°C.

4.2.3 RT-PCR

Para la realización de la RT-PCR se utiliza el kit miRCURY LNA Universal RT microARN PCR Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, el cDNA obtenido en la etapa anterior se diluye en una proporción de 1:80 en agua libre de nucleasas. A continuación, se mezclan para cada reacción: 4 µl de la dilución de cDNA, 1 µl de cebador y 5 µl de la Master Mix incluida en el kit, la cual contiene la enzima polimerasa y los dNTPs.

La reacción de qPCR se lleva a cabo utilizando el Viia TM 7 Real-Time PCR System de Applied Biosystems. Los ciclos de temperatura utilizados son los siguientes:

1. Desnaturalización inicial: 95°C durante 10 minutos.
2. Ciclos de amplificación: 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos seguidos de 60°C durante 1 minuto.

La monitorización de la reacción de qPCR se lleva a cabo utilizando el software QuantStudio Real-Time PCR Software and DataAssist v3.01 de Applied Biosystems. Como miARN control se utilizó el miARN U6.

A continuación, se detallan los cebadores de miARN utilizados en este trabajo adquiridos de Qiagen:

Cebador	Referencia
hsa-miR-30b-5p	YP00204765
hsa-miR-30c-5p	YP00204783
hsa-miR-92a-3p	YP00204258
hsa-miR-92b-3p	YP00204384
hsa-miR-148a-3p	YP00205867
hsa-miR-150-5p	YP00204660
hsa-miR-486-5p	YP00204001
hsa-miR-4732-3p	YP02106069
U6 snRNA	YP00203907

Tabla 4. Lista de cebadores empleados para la RT-PCR de miARNs.

5. Análisis de expresión de proteínas

5.1 Western blot

5.1.1 Extracción de proteínas

Para la extracción de las proteínas, las células se lisaron en 100 µl de tampón RIPA que contiene inhibidores de proteasas (Complete, Sigma-Aldrich) y fosfatasa (PhosSTOP, Sigma-Aldrich). Estos inhibidores ayudan a preservar la integridad de las proteínas y evitan su degradación durante el proceso de extracción. Además, todo el proceso de obtención de extractos se lleva a cabo en hielo para evitar la degradación proteica y mantener la integridad de las proteínas. Los extractos se mantienen en hielo durante 15 minutos, realizando un agitado en un agitador de vórtex cada 5 minutos. Este proceso ayuda a disgregar las muestras y asegura una extracción efectiva de las proteínas. Después de la etapa de lisis, los extractos se centrifugan a 4 °C a máxima velocidad durante 15 minutos utilizando una centrífuga Eppendorf 5417 R. Tras la centrifugación, se recuperan los sobrenadantes, que contienen las proteínas solubles extraídas de las células. Estos sobrenadantes se utilizarán para la cuantificación de proteínas.

5.1.2 Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteínas en los sobrenadantes se cuantifica mediante el método colorimétrico BCA (Ácido bicinónico). Para ello, se utiliza el BCA Protein Assay Kit (Pierce, Culti) en placas de 96 pocillos. En primer lugar, se prepara una curva patrón utilizando diferentes concentraciones conocidas de BSA (albúmina de suero bovina) en el tampón RIPA. Estas concentraciones conocidas se utilizan como referencia. A continuación, se añaden pocillos con 10 µl del extracto proteico de las distintas muestras a cuantificar. Luego, se agregan 190 µl de la solución de trabajo del kit BCA sobre los 10 µl de muestra y se incuban a 37 °C durante 30 minutos. Después del período de incubación, se mide la absorbancia a 562 nm en un lector de placas. La absorbancia de las muestras se compara con la curva patrón y se utiliza para calcular la concentración de proteína en cada muestra. Los extractos proteicos se pueden conservar a -80 °C hasta su uso.

5.1.3 Electroforesis de proteínas

Para separar las proteínas por tamaños se utilizó un gel de SDS-poliacrilamida al 10 %. El tampón de corrida utilizado contiene 27 mM de glicina, 0,1 % de SDS y 50 mM de tris-HCl. La glicina se utiliza para mantener un pH adecuado y facilitar la migración de las proteínas a través del gel. El SDS desnaturaliza las proteínas y les da una carga negativa

uniforme. Como marcador de peso molecular se utilizó el Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ de BioRad. La electroforesis se realizó a una corriente constante de 50 mA. Se cargaron un total de 35 µg de proteína total por carril. Las proteínas cargadas negativamente migran a través del gel hacia el polo positivo debido a la carga eléctrica. Las proteínas más pequeñas se mueven más rápidamente a través del gel y llegan antes al extremo positivo, mientras que las proteínas más grandes se mueven más lentamente y se quedan más atrás.

5.1.4 Transferencia y detección de proteínas

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfieren desde el gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), en este caso, Immobilon-P de Millipore. La membrana de PVDF se activa previamente con metanol durante 2 minutos para facilitar la unión de las proteínas a la membrana. La transferencia se realiza en un tampón compuesto por 20 % de metanol, 20 mM de tris y 150 mM de glicina. La transferencia se lleva a cabo en frío a una corriente constante de 250 mA durante 3 horas. Durante este tiempo, las proteínas migran desde el gel a la membrana. Después de la transferencia, las membranas se bloquean para evitar la unión no específica de anticuerpos. En este caso, se utilizó una solución de TBS (Tris-buffered saline) que contiene un 5 % (p/v) de leche en polvo no grasa y un 0,1 % de Tween-20. El bloqueo de la membrana se realiza durante 1 hora. Una vez bloqueada la membrana, se preparan los anticuerpos primarios seleccionados a la dilución deseada y se incuban junto con las membranas durante toda la noche a 4 °C en agitación suave. Al día siguiente, se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno en agitación con TBS para eliminar los anticuerpos que no se hayan unido. A continuación, se incuban las membranas con anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa HRP (peroxidasa de rábano picante) durante 1 hora en agitación suave. Estos anticuerpos secundarios se unen a los anticuerpos primarios que se han unido previamente a las proteínas de interés. Finalmente, se realizan 3 lavados adicionales con TBS para eliminar los anticuerpos secundarios no unidos.

La membrana se reveló utilizando los kits de quimioluminiscencia ECL Plus de GE Healthcare y SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate de ThermoFisher. Las reacciones de quimioluminiscencia generan señales luminiscentes en las zonas donde los anticuerpos secundarios unidos a HRP se han unido a las proteínas de interés. Las señales de quimioluminiscencia se detectan utilizando un equipo de imagen, en este caso, el Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Las bandas resultantes se cuantifican utilizando el software de análisis de imágenes ImageJ.

5.2 Inmunocitoquímica

Esta técnica de inmunofluorescencia se utilizó para visualizar y cuantificar la localización y expresión de proteínas específicas en células. Para la realización de las

inmunofluorescencias, las células se sembraron previamente en cristales a la densidad requerida según el experimento.

Una vez realizado el tratamiento correspondiente, las células se lavaron con PBS frío (solución salina tamponada con fosfato) para eliminar los medios de cultivo y luego se fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en frío durante 10 minutos. La fijación preserva la estructura celular y las proteínas en su lugar. Tras la fijación, las células se lavaron tres veces con PBS para eliminar el PFA y cualquier otro residuo. Las células se permeabilizaron y bloquearon con una solución de bloqueo que contiene PBS, 10 % de suero fetal bovino (FBS) y 1 % de Triton X-100. La permeabilización permite que los anticuerpos puedan penetrar en las células y unirse a las proteínas intracelulares. El bloqueo ayuda a evitar la unión no específica de los anticuerpos y a reducir el ruido de fondo. Se incubaron las células con anticuerpos primarios específicos durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo para inmunofluorescencias con células han sido: anti- α SMA de ratón (dilución 1/100; clon 1A4; Dako), anti- α -Ki-67 de conejo (dilución 1/100; Abcam) y α -teloColágeno1 α 1 de conejo (dilución 1/100; Abcam). Al día siguiente, las células se lavaron tres veces con PBS para eliminar los anticuerpos primarios no unidos y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos durante 1 hora en oscuridad. Después de la incubación, se realizaron tres lavados adicionales con PBS para eliminar los anticuerpos secundarios no unidos. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 2 μ g/mL. Las células se montaron en portaobjetos con las células hacia abajo utilizando el medio de montaje FluorSaveTM para preservar la fluorescencia y proteger las muestras. La cuantificación de la localización de la fluorescencia se realizó utilizando el software ImageJ. Se tomaron imágenes de las células marcadas y se cuantificó la intensidad de fluorescencia.

6. Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad

6.1 CCK-8

El ensayo Cell Counting Kit-8 (CCK-8) es una técnica ampliamente utilizada para determinar la viabilidad celular en cultivos. Funciona basándose en la capacidad de las células vivas para reducir la sal de tetrazolio soluble en el medio, lo que genera un producto coloreado llamado formazán que se puede cuantificar.

En primer lugar, se sembraron células H9C2 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo. Al día siguiente se les cambió el medio por medio DMEM sin glucosa, sin glutamina y sin rojo fenol (Gibco) previamente desoxigenado, y se introdujeron en un incubador en condiciones de hipoxia ($\leq 1\%$ O₂). Estas condiciones de privación de oxígeno y glucosa (OGD) se han empleado para simular el estrés sufrido por los cardiomiocitos en un contexto de oclusión coronaria. Las células permanecieron

en condiciones OGD con o sin EVs durante 7 horas. Pasado este tiempo, se añadió una solución al 10% del reactivo CCK-8 a las células en la placa de cultivo y se incubaron durante 1-2 horas más en condiciones de normoxia. Finalmente, se midió la absorbancia de la solución de formazán a 460 nm utilizando un lector de placas. La intensidad de la absorbancia es proporcional al número de células viables presentes en el cultivo.

6.2 Cuantificación de la actividad LDH

Con el fin de medir la citotoxicidad provocada por el modelo de OGD en células H9C2, se cuantificó la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) empleando el kit comercial Cytotoxicity Detection Kit LDH (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo mide la liberación de LDH que se produce tras la lisis celular. Para ello, se sembraron células H9C2 en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo. Al día siguiente, las células se incubaron en las condiciones de OGD previamente descritas con o sin EVs durante 7h. Pasado este tiempo, el sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos y se le añadió los reactivos del kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción entre el reactivo y la LDH presente en el medio de cultivo produce un cambio de color que se puede medir a 492 nm utilizando un lector de placas multi-pocillo. A mayor absorbancia, mayor cantidad de LDH liberada y, por tanto, mayor citotoxicidad.

6.3 DCFH-DA

Para medir el nivel de ROS generado por el modelo de OGD, se sembraron 20.000 células H9C2/pocillo en placas de 24 pocillos. Al día siguiente, las células se incubaron en las condiciones de OGD previamente descritas con o sin EVs durante 7h. Pasado este tiempo, se agregó DCFH-DA (Sigma-Aldrich) al medio de cultivo de las células a la concentración recomendada por el fabricante y se dejaron incubando durante 20 minutos. En el caso de las células en normoxia, los pocillos se lavaron y se incubaron con el reactivo en medio sin FBS. El DCFH-DA es una molécula que puede penetrar en las células y se convierte en diclorofluoresceína (DCFH) cuando es capturada por las células. Dentro de las células, el DCFH se convierte en DCFH oxidado en presencia de ROS. Cuanto mayor sea la cantidad de ROS en las células, mayor será la cantidad de DCFH que se oxidará. El DCFH oxidada emite fluorescencia verde y permite cuantificar la cantidad de ROS intracelular mediante citometría de flujo. Pasados los 20 minutos de incubación, las células se levantaron con tripsina y se visualizaron con un citómetro BD FACSCanto™ II (BD Biosciencias). Los resultados de la citometría se analizaron con el software FlowJo (FlowJo LLC).

6.4 MitoSOX

El MitoSOX™ (Invitrogen) es un compuesto fluorogénico utilizado para medir la producción de superóxido en las mitocondrias. Los superóxidos son una forma de ROS que se generan en las mitocondrias y pueden tener efectos importantes en la función celular y el estrés oxidativo. Para evaluar el nivel de superóxido mitocondrial en células H9C2 sometidas a OGD, las células se sembraron a una densidad de 20.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos. Al día siguiente, las células en las condiciones de OGD previamente descritas con o sin EVs durante 7 horas. Transcurrido este tiempo, se procedió a la tinción con MitoSOX añadiéndolo al medio a la concentración recomendada por el fabricante (500 nM) y se dejó incubar durante 30 minutos. En el caso de las células en normoxia, los pocillos se lavaron y se incubaron con el reactivo en medio sin FBS. Pasados los 30 minutos de incubación, las células se levantaron con tripsina y se visualizaron con un citómetro BD FACSCanto™ II (BD Biosciencias). Los resultados de la citometría se analizaron con el software FlowJo (FlowJo LLC).

7. Modelo de hipertrofia *in vitro*

Para evaluar la hipertrofia celular sobre CM, se sembraron 20.000 células H9C2 por pocillo en placas de 24 pocillos. Las células se incubaron durante 24 horas en medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco) sin FBS. A continuación, las células se estimularon utilizando DMEM/F12 sin FBS al que se agregó angiotensina II (Sigma, A9525) a una concentración final de 1 μ M. La angiotensina II es una hormona ampliamente utilizada para inducir la hipertrofia celular, especialmente en células cardíacas y musculares. Las células se incubaron en estas condiciones estimuladas durante 24 horas con o sin EVs. Tras la incubación, se procedió a la extracción de ARN de las células (apartado 4.1) para evaluar cambios en la expresión de genes relacionados con la hipertrofia.

8. Inducción de la fibrosis *in vitro*

Para inducir la fibrosis *in vitro* se sembraron HCF a una densidad de 25.000 células/cm² y se dejaron adherir durante 24 horas. Posteriormente, el medio de cultivo se reemplazó con medio de privación de nutrientes (DMEM con alto contenido de glucosa, 0,5 % de FBS sin vesículas, 1 % de aminoácidos no esenciales y 1 % de P/S). Después de 16 horas, los fibroblastos se estimularon con el medio de estimulación compuesto por 100 μ M de ácido L-ascórbico 2-fosfato (Sigma-Aldrich), 3,16 ng/ml de TGF- β 1 recombinante (R&D Systems) y 3,16 μ g/ml de sulfato de dextrano (Sigma-Aldrich), como describieron Palano G. *et al.* [279]. Las EVs se agregaron a las células al mismo tiempo que se le añadió el medio de estimulación. Los HCF permanecieron en el medio de estimulación 24 o 48 horas en función del experimento.

9. Ensayo de cierre de herida en HCF

El ensayo de cierre de herida es una técnica utilizada para evaluar la capacidad de migración de células en cultivo, en este caso, HCF. Para ello los HCF se sembraron en placas de 48 pocillos con $4 \cdot 10^4$ células por pocillo, con el objetivo de que al día siguiente cada pocillo esté con una confluencia adecuada para el ensayo (alrededor del 80%). En ese momento, se les añadió el medio de estimulación y los tratamientos correspondientes y se incubaron durante 24 horas más. Pasado este tiempo, se realizó una incisión uniforme en la monocapa de células en cada pocillo utilizando para ello una punta de pipeta y creando así una “herida” o área libre de células. A continuación, se lavaron los pocillos cuidadosamente para eliminar cualquier resto celular suelto que hubiera podido quedar y se cambió el medio de cultivo a FGM-3. Entonces, se adquirieron las imágenes iniciales (tiempo 0) de las heridas, y luego a diferentes tiempos hasta que la herida se cerrara en alguna de las condiciones (en nuestro caso 24 horas). Finalmente, se utilizó el software de análisis de imágenes ImageJ para cuantificar el área cerrada en cada imagen y calcular el porcentaje de cierre de la herida en función del tiempo.

10. Ensayo de formación de tubos en Matrigel

El ensayo de formación de tubos en Matrigel se llevó a cabo para evaluar la angiogénesis. El Matrigel proporciona una matriz tridimensional que imita las condiciones naturales del tejido y permite que las células interactúen y se organicen de manera similar a como lo harían en el cuerpo. Como resultado, las células forman estructuras tubulares que se asemejan a pequeños vasos sanguíneos, y esto nos sirvió para evaluar la capacidad angiogénica de las células tras el tratamiento con las diferentes EVs.

En primer lugar, se prepararon las placas con 50 μ l de Matrigel Growth Factor Reduced (BD Biosciences) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. La placa se centrifugó durante 12 segundos a velocidad baja para distribuir uniformemente el Matrigel en el fondo de cada pocillo, y luego se incubó durante 15 minutos a 37°C para que el Matrigel solidificase.

Una vez preparada la placa, se sembraron 5.000 células HUVEC por pocillo, se les añadió los tratamientos correspondientes y se incubaron en condiciones de hipoxia durante 9 horas. Tras esto, se adquirieron las imágenes en un microscopio invertido Leica DM6000 y se analizaron diferentes parámetros relacionados con la angiogénesis con el software WimTube de Wimasys.

11. Modelos *in vivo*

Todos los procedimientos experimentales que implican el uso de animales fueron aprobados por los comités institucionales de ética y cuidado animal de acuerdo con las directrices de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo sobre la protección de los animales utilizados con fines científicos, aplicada en la legislación española mediante el Real Decreto 1201. /2005.

11.1 Modelo de insuficiencia cardíaca inducida por isoproterenol

La Generalitat Valenciana autorizó el procedimiento 2021/VSC/PEA/0214 para el modelo de insuficiencia cardíaca inducida por isoproterenol (ISO). Para realizar este modelo, se seleccionaron ratones macho adultos de la cepa C3H/HeNCrl de 10 a 14 semanas de edad, con un peso de 35 a 40 g (Charles River Laboratories). Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales (n = 5 en cada grupo): grupo con ISO, ratones tratados con CD81-EVs (ISO + CD81-EVs), ratones tratados con mutOSM-CD81-EVs (ISO + mutOSM-CD81-EVs) y ratones tratados con THN-EVs (ISO + THN-EVs).

El daño cardíaco se indujo mediante la infusión subcutánea de isoproterenol (I5627, Sigma-Aldrich) durante 5 días consecutivos. El ISO actúa aumentando el ritmo cardíaco, lo cual conduce a un desbalance entre de demanda/aporte de oxígeno y nutrientes al músculo cardíaco que acaba produciendo la muerte y necrosis de los cardiomiocitos. La dosis utilizada fue de 150 mg/kg/día. Después de la primera inyección de isoproterenol, se inyectaron intraperitonealmente 100 µg de EVs a los ratones del grupo ISO+CD81-EVs, del grupo ISO+mutOSM-CD81-EVs y del grupo ISO+THN-EVs. Una semana después, los mismos grupos recibieron una segunda inyección intraperitoneal con 50 µg de EVs. Se inyectaron volúmenes equivalentes de PBS en el grupo ISO. Se realizó la eutanasia después de 21 días y se resecaron los tejidos cardíacos para su posterior análisis.

11.2 Modelo de estenosis aórtica mediante constricción

La Generalitat Valenciana autorizó el procedimiento 2020/VSC/PEA/0174 constricción de la aorta transversa (TAC). Para realizar este modelo se emplearon ratones macho adultos de la cepa C57BL/6J de 8 a 12 semanas de edad, con un peso de ente 27 y 32 g (Charles River Laboratories).

Se eligió hacer este modelo debido a las similitudes que el mismo tiene con la estenosis clínica en humanos en cuanto a la progresión hacia la fibrosis y la insuficiencia cardíaca. En primer lugar, los ratones son anestesiados con fentanilo y dexmedetomidina y sedados con 2% de sevoflurano y respiración asistida. A continuación, se le realiza una toracotomía y se aísla el arco aórtico pasando una sutura

de seda 6/0 entre el tronco braquicefálico y la carótida izquierda. Se coloca una aguja de 27G que hará de tope a la hora de realizar el nudo y un vez hecho éste, se retira la aguja dejando una luz en ese punto equivalente al tamaño de la aguja. Finalmente se cose y cierra la incisión. Al terminar la operación y los días posteriores se les inyecta analgesia a los ratones (buprenorfina). Los animales son sacrificados 28 días después de la operación para la extracción y análisis del tejido cardíaco.

11.3 Sacrificio y perfusión

Una vez llegados al punto final de cada modelo, se procede al sacrificio del animal para extraer el corazón. En primer lugar, se inyectan al animal 0,15 ml de tiopental por vía intraperitoneal y se deja que haga efecto. Una vez que se comprueba que el ratón deja de responder a estímulos en la pata se procede a abrir la cavidad torácica del animal hasta dejar el corazón visible. Se inyecta una palometa por el ápex del corazón y se perfora la aurícula derecha para dejar salir las soluciones que se van a perfundir. Se empieza perfundiendo 5 ml de cloruro de potasio para detener el corazón en diástole. Seguidamente se pasa otros 5 ml de suero salino y finalmente se perfunde con 20 ml de PFA al 2%. Una vez pasado este volumen, se reseca el corazón y se retiran las aurículas para facilitar la penetración del PFA. Los corazones se dejan a 4 °C en PFA durante toda la noche y al día siguiente se les realizan 5 lavados con tampón fosfato 0,1 M durante 15 minutos.

12. Histología

12.1 Inclusión en parafina

Una vez se ha fijado el tejido se procede a su inclusión en parafina para poder cortarlo. Para ello las muestras de tejido se someten al siguiente protocolo:

- Etanol al 70% durante la noche en agitación (225 rpm) y a 4°C
- EtOH al 70% durante 1h en agitación
- EtOH al 96% durante 1 h (2 veces) en agitación
- EtOH al 100% durante 1 h (2 veces) en agitación
- Xilol durante 30 min (2 veces) en agitación
- El tejido se cambia a parafina “sucia” durante 1 h (estufa a 60°C)
- El tejido se cambia a parafina “limpia” y se deja toda la noche en la estufa a 60°C
- Al día siguiente se incluyen los tejidos en los “cassetes” para generar los bloques.

12.2 Corte y desparafinado

Una vez tenemos el tejido en bloques de parafina, se cortan en un microtomo a 5 μm de grosor y se depositan sobre portaobjetos recubiertos de gelatina-alumbre para poder proceder a la visualización por microscopio óptico. Para realizar cualquier tinción acuosa o inmunofluorescencia los cortes han de desparafinarse. Para ello se sigue el siguiente protocolo:

- Se mantienen los cortes sobre los portaobjetos en estufa a 60°C durante 25 minutos
- Xilol durante 10 min (2 veces)
- EtOH 100% durante 10 min (2 veces)
- EtOH 96% durante 10 minutos
- EtOH 70% durante 10 minutos.
- Mantener en agua destilada hasta empezar la tinción

12.3 Tinción con Picrosirius Rojo

Una vez desparafinado el tejido, se procedió al siguiente protocolo para llevar a cabo la tinción:

- Preparación del Picrosirius Rojo: Por una parte, se mezclaron 4 g de Ácido Pícrico (Sigma-Aldrich) saturado con 90 ml de agua destilada y se agitó durante 30 min. Por otra, se pesaron 0,1 g de Direct Red 80 (Sigma-Aldrich) y se disolvieron en 10 ml de agua destilada. Mezclamos ambas disoluciones y esperamos 48 horas. Finalmente, lo filtramos en el momento de usar.
- Incubar las muestras con Picrosirius Rojo a temperatura ambiente durante 30 minutos
- Transferir a agua acética (0,5 % de ácido acético en agua) durante 5 min (2 veces)
- EtOH 100% durante 5 min (2 veces)
- Xilol durante 5 min (2 veces)
- Se mantiene en xilol hasta el montaje
- Tras el montaje, los portaobjetos se visualizaron con un microscopio digital Leica DMD108 (Leica Microsystems).

12.4 Inmunofluorescencias en tejido

Antes de realizar inmunofluorescencias en tejido, se procedió al desenmascaramiento antigénico de la siguiente manera:

- Preparación del tampón de Tris-EDTA: 10mM Tris Base, 1mM EDTA, 0,05% Tween 20, pH 9.0
- Precalentar el baño de agua con un recipiente de tinción que contenga tampón Tris-EDTA hasta que la temperatura alcance 95-100 °C.
- Sumergir los portaobjetos en el recipiente de tinción e incubar durante 20 minutos.
- Apagar el baño de agua, retirar el recipiente de tinción a temperatura ambiente y dejar que los portaobjetos se enfríen durante 20 minutos.

Una vez hecho realizada la recuperación antigénica, los cortes se bloquean con suero de el suero apropiado durante 1 hora y se incubaron durante la noche en una cámara humidificada a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios:

- anti-POSTN de conejo (dilución 1/100; ProteinTech)
- anti-CD31 de conejo (dilución 1/200; clon M-20; Santa Cruz)
- anti- α SMA de ratón (dilución, 1/100; clon 1A4; Dako)
- anti-F4/F80 de rata (dilución 1/200; Abcam)
- anti-CD274 de conejo (dilución 1/200; AB Clonal A11273)
- anti-CD206 de conejo (dilución 1/200; Abcam)

Al día siguiente los portaobjetos se lavaron tres veces durante 5 minutos en PBS. Luego, se incubaron con el anticuerpo secundarios anti-IgG de rata, ratón o conejo conjugados a diferentes fluoróforos durante 1 hora a temperatura ambiente. En el caso de la tinción con aglutinina de germen de trigo (WGA), las secciones se incubaron con WGA-Texas Red (Invitrogen) a una concentración de 1 μ g/ml. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS. Para detectar el núcleo celular, estos se tiñeron con DAPI (0,5 μ g/ml) y los portaobjetos se montaron con el reactivo FluorSave™ (Merck Millipore). Las secciones se visualizaron bajo el microscopio fluorescente Leica DM2500 (Leica Microsystems). El procesamiento final de las imágenes y la cuantificación se realizaron con el software ImageJ.

13. Análisis estadístico

Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar (SD) o error estándar de la media (SEM), según se especifica en cada experimento. Se utilizó la prueba t de Student, pareado o no pareado dependiendo del experimento, para comparar la media de una variable en dos grupos experimentales con una distribución normal. Cuando la distribución no se ajustaba a la normalidad se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba post hoc de Tukey para comparar las medias de una variable entre 3 o más grupos. Los análisis se realizaron

con el software Prism 8 de GraphPad. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un $p < 0,05$ con un intervalo de confianza del 95%.

Resultados

Durante esta tesis se ha trabajado en la mejora de genética de las MSCs con el fin de potenciar las propiedades terapéuticas de sus EVs. En la Figura 11a se muestra un esquema del flujo de trabajo seguido para alcanzar los objetivos.

Los resultados obtenidos se han dividido en dos secciones principales que corresponden a las dos estrategias adoptadas para mejorar las EVs (Figura 11b). En la primera parte de la tesis, se presentarán los resultados derivados de la modificación directa del contenido de las EVs, enriqueciendo su superficie con Oncostatina M. En la segunda parte de la tesis, se expondrán los resultados obtenidos a través de la modificación indirecta del contenido de las EVs, lograda mediante el “priming” genético.

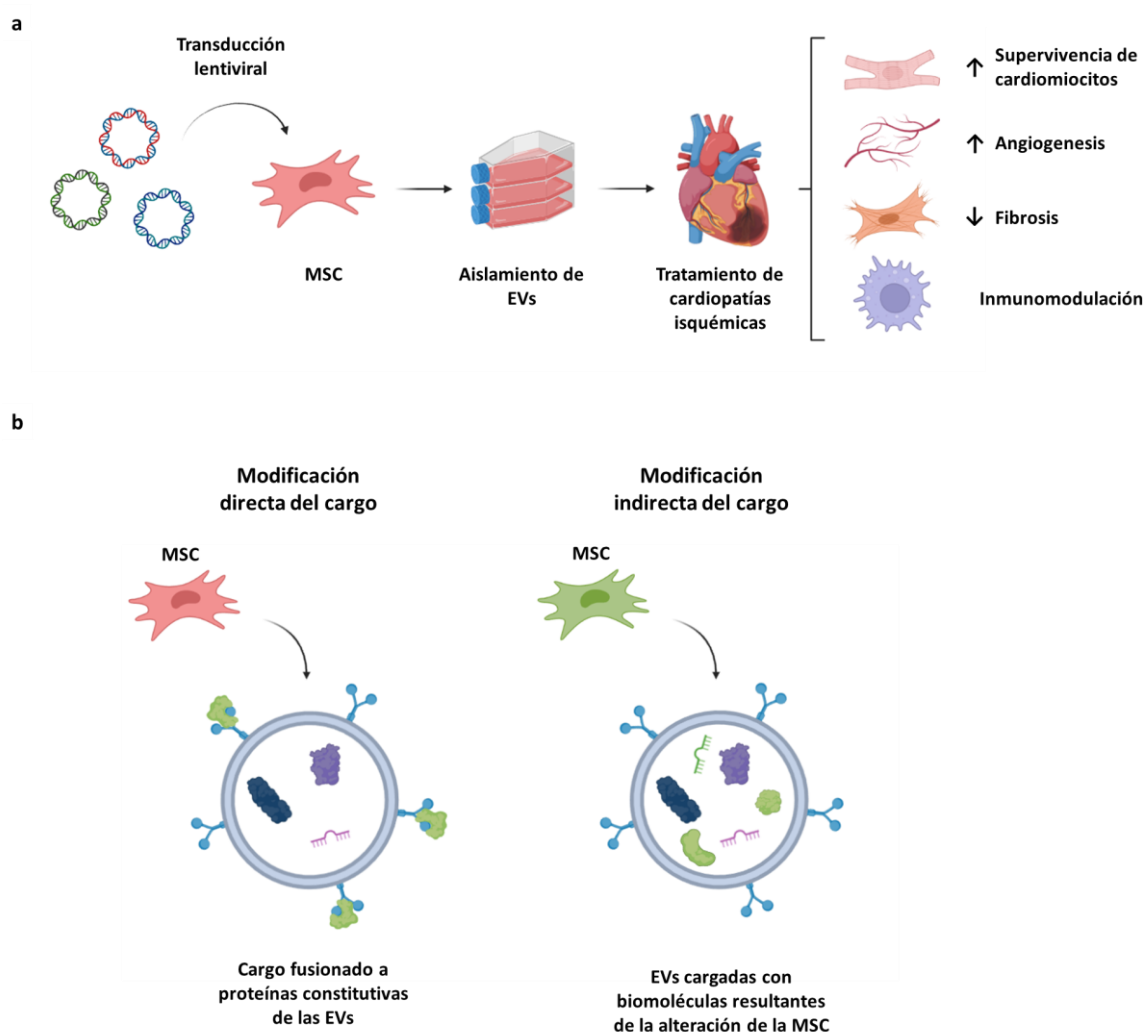


Figura 11. Resumen gráfico del trabajo. (a) Esquema general del procedimiento experimental seguido durante este trabajo. Se ha modificado genéticamente MSCs con diferentes plásmidos y se ha procedido al aislamiento y caracterización de las EVs derivadas de las mismas para su posterior evaluación en modelos *in vivo* e *in vitro* de daño cardíaco. (b) Las dos principales

propuestas de modificación que se han estudiado han sido la modificación directa de la superficie de las vesículas (sobreexpresión de OSM ligada a CD81TM) y la modificación indirecta del cargo, mediante un *priming* genético de las MSCs (sobreexpresión de HIF1 α , N1ICD, o ambas).

1. Sobreexpresión de OSM fusionada a CD81 en MSC

1.1 Generación de la línea de MSC-OSM

A lo largo de este trabajo se han realizado diferentes tipos de modificaciones genéticas mediante vectores lentivirales sobre MSC con el fin de mejorar su capacidad terapéutica. Para ello se han utilizado MSC aisladas de pulpa dental, a las cuales se les introdujo la sobreexpresión del gen de la telomerasa reversa (TERT; MSC-T). La expresión constitutiva de TERT impide el acortamiento de los telómeros y, en consecuencia, que las células no entren en senescencia. Esta modificación es realmente importante ya que nos permite por un lado alargar la vida útil de las células, evitando tener que cambiar de biopsia, y, por otro lado, permite una mayor estandarización de las EVs que se obtienen de las mismas, aumentando así la reproducibilidad de los resultados [274].

Para la sobreexpresión dirigida de OSM en EVs se fusionó ésta con CD81TM. CD81TM es una construcción que consiste en la hélice transmembrana de PDGFR β fusionada con el extremo N-terminal de CD81, proteína principalmente dirigida a EVs. Esta construcción asegura la expresión extraluminal en la superficie de las EVs de cualquier proteína que se fusione a la región de la hélice transmembrana [280].

Como se ha comentado en la introducción, la secuencia de la OSM consta de un propéptido (PP), de un péptido señal (PS) y de la cadena principal. Antes de ser liberada al espacio extracelular, la OSM se procesa enzimáticamente hasta alcanzar su forma madura. El procesamiento ocurre en dos sitios de escisión (SE): uno entre el PS y la cadena principal y el otro entre la cadena principal y el PP (Figura 12). Experimentos previos del grupo demostraron que, en condiciones fisiológicas, el producto de la fusión entre OSM y CD81TM era escindido en el sitio de escisión 1 y, por tanto, la OSM no llegaba a estar presente en las EVs. Para evitar el problema que supone la escisión y lograr una correcta carga de OSM en las EVs, se diseñaron dos versiones mutadas de la OSM que incluían una modificación de secuencia específica para sustituir una arginina (R) por una glicina (G) en el SE2 (Figura 12, posiciones media y derecha), evitando que sea reconocido por proteasas. Esta mutación se ubica entre la cadena principal y el PP. La primera variante contenía la secuencia de la OSM sin la secuencia PP (matOSM, que se muestra en el medio), y la segunda variante incluía la secuencia completa de la OSM

(mutOSM, que se muestra a la derecha). En ambas variantes, la secuencia de la OSM se fusionó con CD81TM.

Una vez diseñados los diferentes plásmidos, se transfectaron a la línea de MSC-T. De esta forma se obtuvieron dos líneas con sobreexpresión de OSM, una con el plásmido de la variante matOSM, y otra con el plásmido de la variante mutOSM, ambas conectadas a CD81TM para asegurar su disposición en la superficie de las EVs. Por último, se diseñó una tercera línea que contenía solo CD81TM para obtener EVs control. En todos los casos, la expresión de OSM se reguló mediante un promotor inducible (Tet-on), ya que experimentos previos habían mostrado que la expresión constitutiva o la exposición de MSC a OSM recombinante (rhOSM) reducía la tasa de migración y proliferación celular.

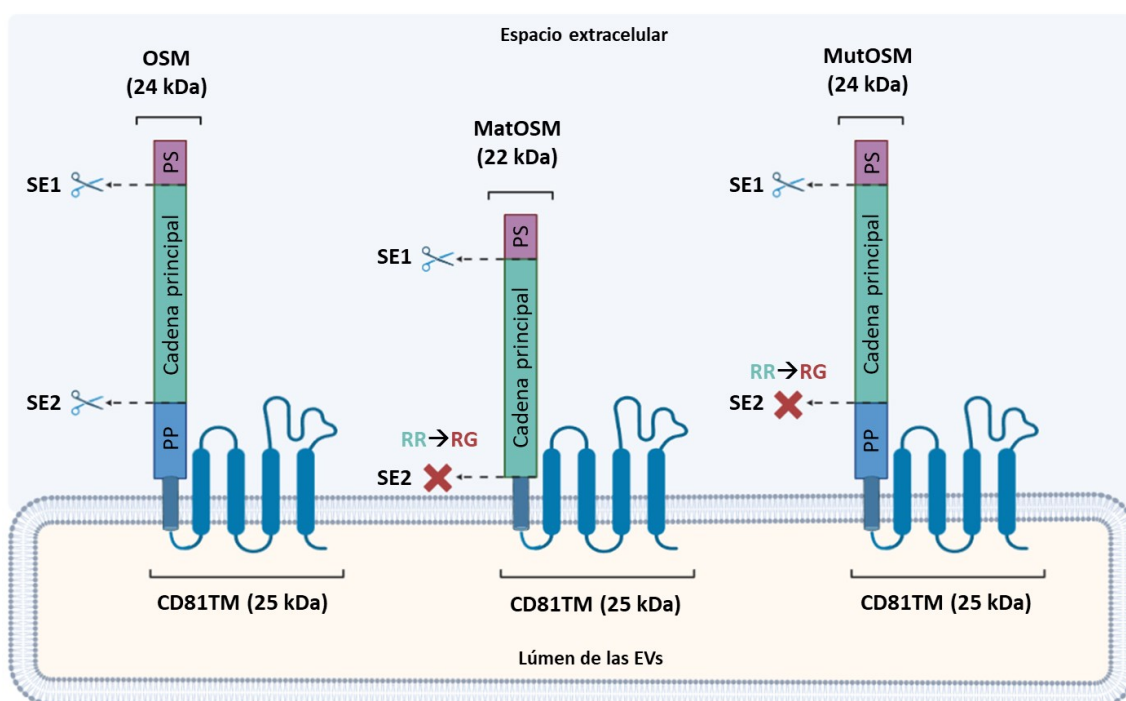


Figura 12. Generación de MSC-EVs cargadas con OSM mediante la modificación de la secuencia de la OSM y su fusión a CD81TM. Esquema de la estructura de la proteína nativa y las proteínas recombinantes, señalando las variantes introducidas en la secuencia de la OSM. La secuencia del dominio PP se eliminó en la OSM maduro (matOSM) y se introdujo una mutación de nucleótidos para cambiar una R por una G en el SE2 para bloquear la escisión de la matOSM de la membrana de las EVs. La secuencia de la OSM completa se mantuvo en versión llamada OSM mutante (mutOSM), pero se introdujo la misma mutación R a G en el SE2. Tanto las secuencias matOSM como mutOSM están ancladas a CD81TM para favorecer su disposición hacia el espacio extraluminal en la superficie de las EVs. Las tijeras representan dónde se produce la escisión de la OSM, mientras que las cruces rojas representan dónde no se produce la escisión. OSM, oncostatina M; SP, péptido señal; SE, sitio de escisión; PP, propéptido; R, arginina; G, glicina, EVs, vesículas extracelulares.

Tras la transducción lentiviral, se expandieron las nuevas líneas de MSC-T genéticamente modificadas (que, de ahora en adelante, se denominarán CD81, MatOSM-CD81 y MutOSM-CD81), y se aislaron y caracterizaron las EVs liberadas por las mismas. También se incluyeron células MSC-T sin ninguna transfección posterior y sus EVs como control adicional a las MSC-CD81. En la Figura 13 se muestra una representación esquemática del proceso. El éxito de la transducción se evaluó midiendo la expresión de GFP (presente en todos los plásmidos como una unidad de transcripción separada controlada por un promotor constitutivo), utilizando citometría de flujo. Más del 87 % de las células MSC-T transducidas con los diferentes plásmidos dieron positivo para GFP, y el porcentaje de células positivas para GFP se mantuvo por encima del 85 % en las tres líneas celulares generadas durante los pases celulares para los experimentos. La evaluación de un perfil de marcador de MSC establecido por el Comité de células madre de tejidos y mesenquimales [40] mostró que la transducción de MSC-T no cambió la identidad de las células MSC. Para la expansión y el aislamiento de las EVs, se incubaron las células MSC-T, MSC-T-CD81, MSC-T-MatOSM-CD81 y MSC-T-MutOSM-CD81 en medio de recolección (MR) de EVs, que contenía 1 µg/ml de doxiciclina, durante 48 horas (Figura 13). Pasadas las 48 horas, se recogió el medio de las placas de cultivo y se utilizó para el aislamiento de EVs mediante ultracentrifugación diferencial y filtración (Figura 13).

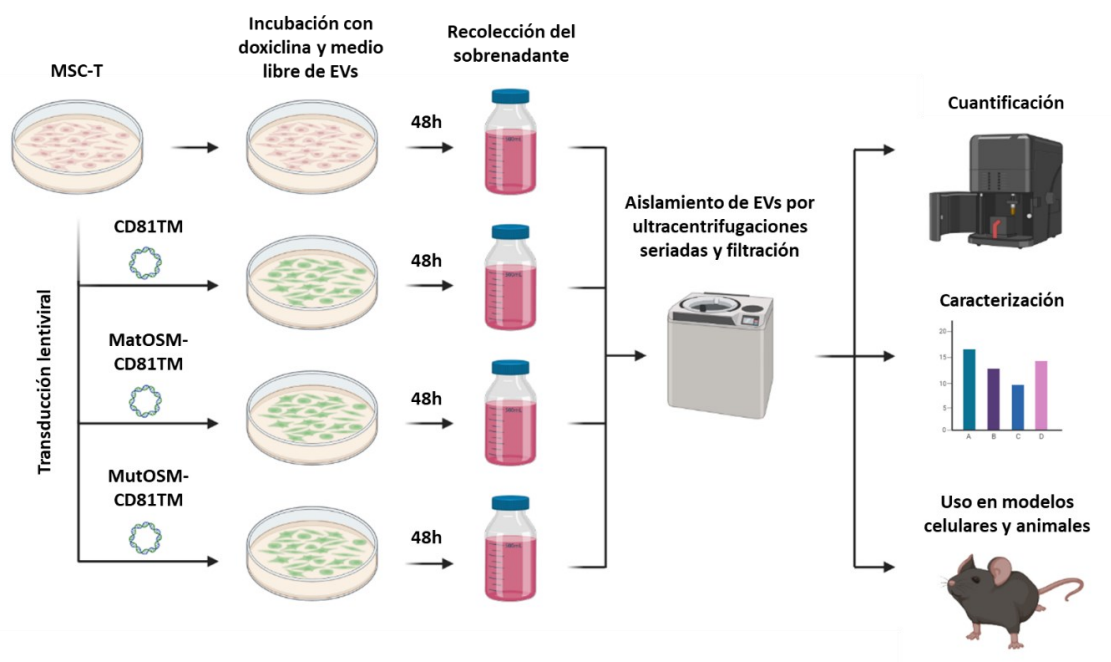


Figura 13. Representación esquemática del flujo de trabajo seguido para la obtención y evaluación de las EVs cargadas con OSM. Paso 1: Generación de las líneas de MSC-T con las diferentes construcciones. Se utilizaron lentivirus que contenían los vectores para la sobreexpresión CD81, matOSM-CD81 o mutOSM-CD81. Paso 2: Expansión de las diferentes líneas

Resultados

de MSCs y aislamiento de las EVs. Una vez expandidas las MSCs, se incubaron con medio libre de EVs junto con doxiciclina (para la inducción de la expresión) durante 48 h para la recolección de sobrenadante. Las EVs se aislaron mediante ultracentrifugaciones seriadas y filtración. Paso 3: Cuantificación de las EVs mediante BCA y NTA, caracterización mediante ExoView y TEM, y evaluación de su potencial terapéutico en modelos celulares y animales.

Las EVs aisladas del medio de cultivo de MSC-T, MSC-T-CD81, MSC-T-MatOSM-CD81 y MSC-T-MutOSM-CD81 se caracterizaron mediante microscopía electrónica y NTA. La microscopía electrónica mostró que los cuatro grupos de EVs exhibían la morfología convexa esperada, característica de vesículas lipídicas (Figura 14a), mientras que el NTA reveló una distribución de tamaños similar en todos los grupos, poseyendo la mayoría de las partículas un tamaño de entre 90 y 150 nm (Figura 14b y c). Además, la concentración de partículas aisladas a partir de la misma cantidad de medio después de sembrar el mismo número de células de cada tipo fue similar en todos los grupos, lo que indica que las modificaciones genéticas no influyeron en la secreción de EVs (control-EVs, $7.62 \times 10^8 \pm 4,8 \times 10^7$ partículas/mL, CD81-EVs; $9,71 \times 10^8 \pm 4,93 \times 10^7$ partículas/mL; matOSM-CD81-EVs, $1,12 \times 10^9 \pm 1,26 \times 10^8$ partículas/mL y mutOSM-CD81-EVs; $9,18 \times 10^8 \pm 1,08 \times 10^8$ partículas/mL).

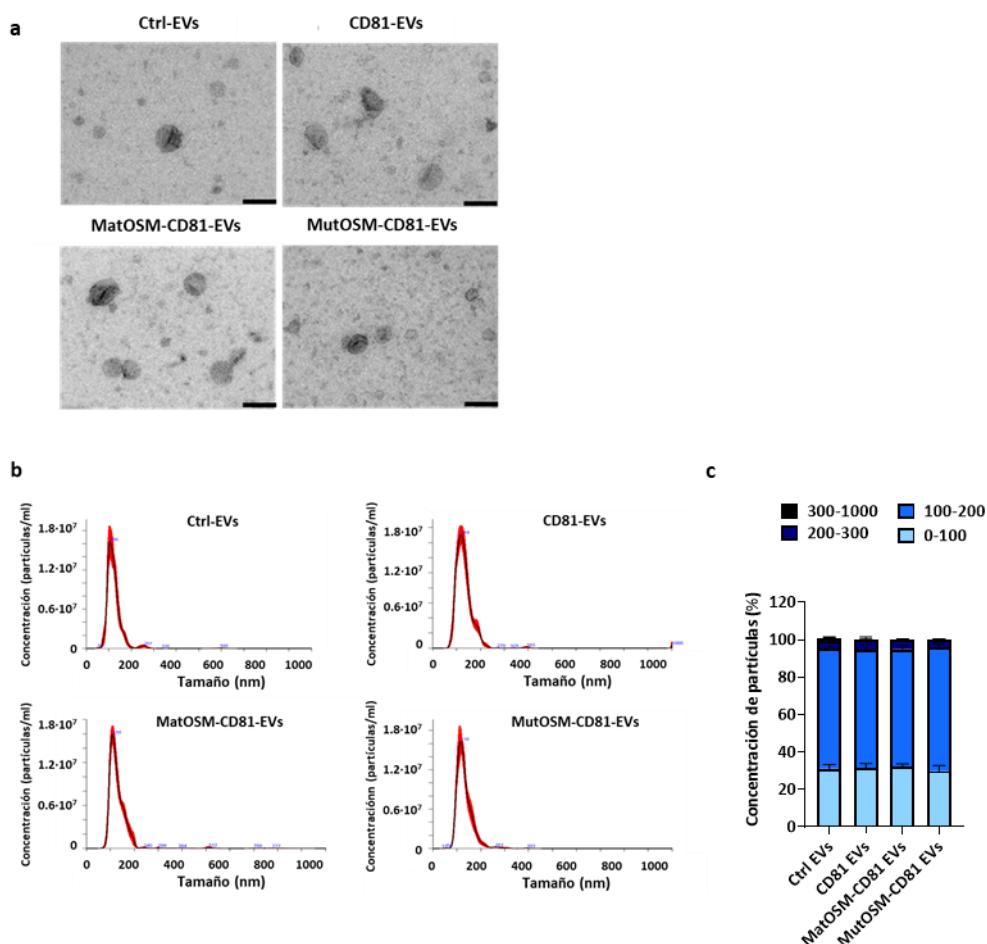


Figura 14. Las modificaciones genéticas de las MSCs no afectan a la morfología ni distribución de tamaños de sus EVs. (a) Imágenes representativas de EVs obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (barra de escala = 100 nm). (b,c) Resultado del NTA donde se aprecia el tamaño promedio de las EVs (nm) y los histogramas de distribución de tamaño de las EVs.

Finalmente, las EVs aisladas se analizaron también utilizando la plataforma ExoView (ExoView® R100; NanoView Biosciences, Boston, MA, EE. UU.) para la inmunofenotipificación de las diferentes subpoblaciones de EV. Las EVs se capturaron e inmovilizaron en una matriz de sustrato de silicio funcionalizada con tres anticuerpos contra proteínas comunes en la membrana de las EVs, las tetraspaninas CD63, CD81 y CD9, cada uno en un spot diferente del chip. Además, se usó un spot adicional funcionalizado con un isotipo IgG como control de adsorción no específica de EVs al sustrato del chip.

La plataforma ExoView ofrece la posibilidad de realizar un análisis multiplexado de las EVs mediante su tinción con anticuerpos conjugados a fluoróforos tras su captura en el chip. Los anticuerpos incluidos en el kit detectan las tetraspaninas CD63, CD81 y CD9. De este forma se pueden diferenciar distintas poblaciones de EVs según la co-expresión de estas 3 proteínas. Sin embargo, el ExoView también ofrece la posibilidad de sustituir uno de estos 3 anticuerpos por algún otro de interés, siempre conjugado al mismo fluoróforo al que sustituye. En nuestro caso, asesorados por el personal técnico de Nanoview Biosciences, se decidió sustituir el anticuerpo anti-CD63 por el anticuerpo anti-OSM. Por este motivo, la información ofrecida por el spot funcionalizado con anti-CD63 (Figura 15b) es superior a la de los spots con anti-CD81 y anti-CD9 (Figuras 15c y d, respectivamente), ya que estos no aportan ninguna información sobre CD63.

El número de EVs doble positivas para CD63/CD81 y CD63/CD9 no cambió entre los cuatro grupos experimentales (Figura 15a). Sin embargo, la sobreexpresión de CD81 promovió la liberación de EVs triple positivas para CD63/CD81/CD9 parte de las MSCs (Figura 15b). Como se esperaba, una pequeña parte de las EVs de los grupos experimentales MatOSM-CD81 y MutOSM-CD81 mostró la presencia de OSM en su superficie, independientemente del spot donde fueron capturadas (Figuras 15a-d).

La proporción de EVs positivas para OSM fue similar en las matOSM-CD81 y mutOSM-CD81, lo que indica que la presencia del PP no influye en la distribución de la proteína recombinante en la superficie de las EVs. Estos resultados demuestran la viabilidad de anclar una citoquina típicamente soluble (OSM) en las EVs secretadas por MSC-T mediante la modificación de un único aminoácido en su secuencia. También es importante destacar que tanto las células modificadas genéticamente como sus EVs no mostraron cambios notables en sus características después de la introducción de las nuevas proteínas recombinantes.

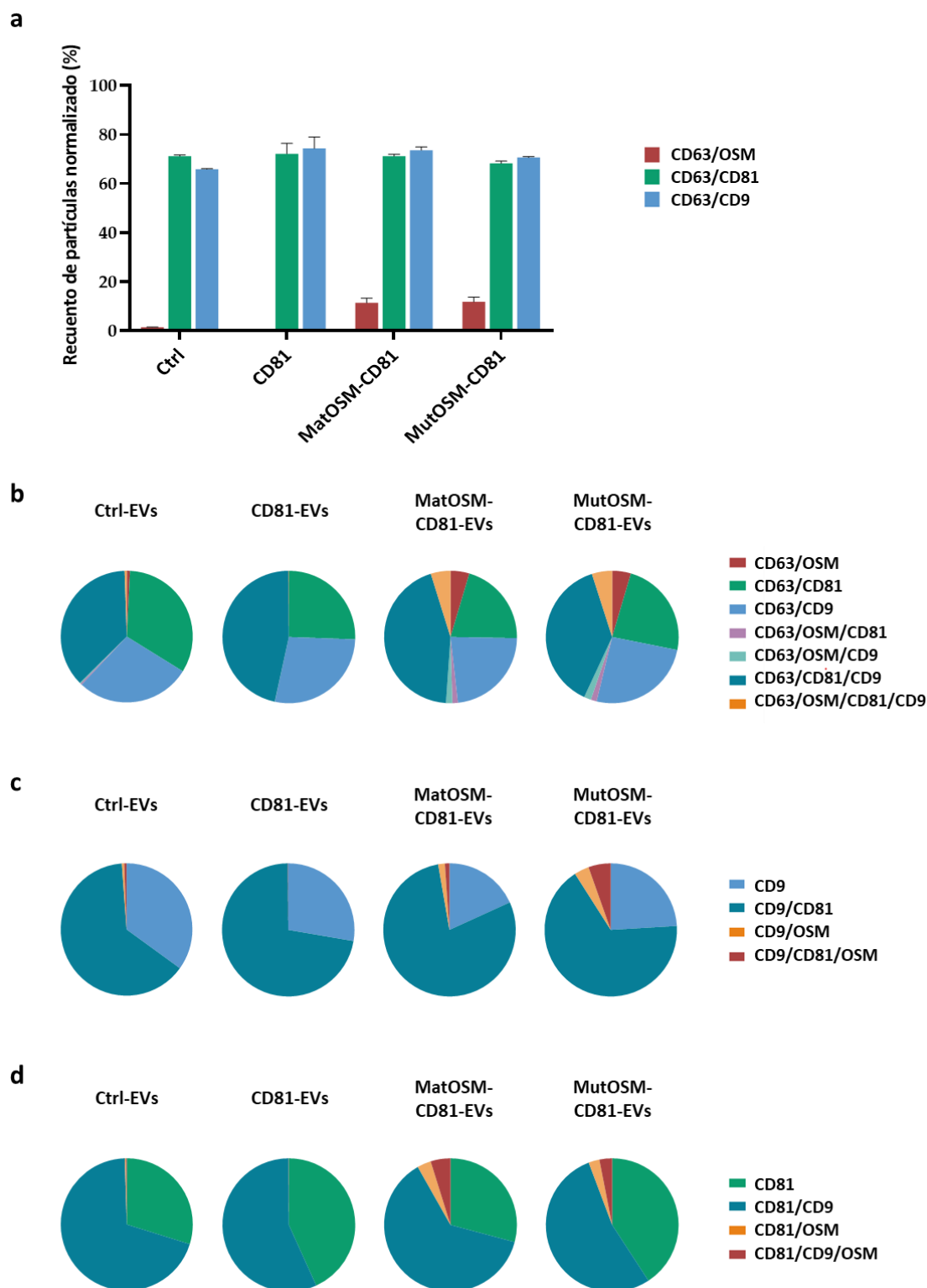


Figura 15. Las EVs derivadas de MSCs modificadas genéticamente llevan las proteínas recombinantes mat/mutOSM en su superficie. (a) Análisis ExoView que muestra el porcentaje de EVs positivas para OSM, CD81 o CD9 en aislados de las diferentes líneas de MSCs, tras la captura con CD63. Se representa la media $\pm$ SD. Los gráficos circulares que muestran la co-expresión de las diferentes proteínas (OSM, CD81 y CD9) en EVs capturadas con (b) CD63, (c) CD9 o (d) CD81.

1.2 La expresión de los receptores de OSM en fibroblastos ventriculares humanos aumenta tras la estimulación con TGF- β 1

En estudios previos, se ha descrito el potencial de la OSM para contrarrestar los efectos profibróticos del TGF- β 1 en modelos de isquemia cardíaca [242,243]. Para ejercer su función, la OSM debe secretarse en el espacio extracelular e interactuar con el receptor de tipo I (heterodímero compuesto por IL-31RA/LIF-R y GP130) o el receptor de tipo II (heterodímero compuesto por IL-31RB y GP130) en las células diana. Por lo tanto, se procedió a evaluar los niveles de proteína de estos tres receptores de la OSM en HCF procedentes del ventrículo. Para ello se obtuvieron extractos de proteína de HCF tras la privación de glucosa y FBS (Starved) y a diferentes puntos de tiempo después de la estimulación *in vitro* con un cóctel profibrótico que se compone de ácido L-ascórbico 2-fosfato, sulfato de dextrano y TGF- β 1. Como control se usaron HCF con su medio habitual (FGM-3).

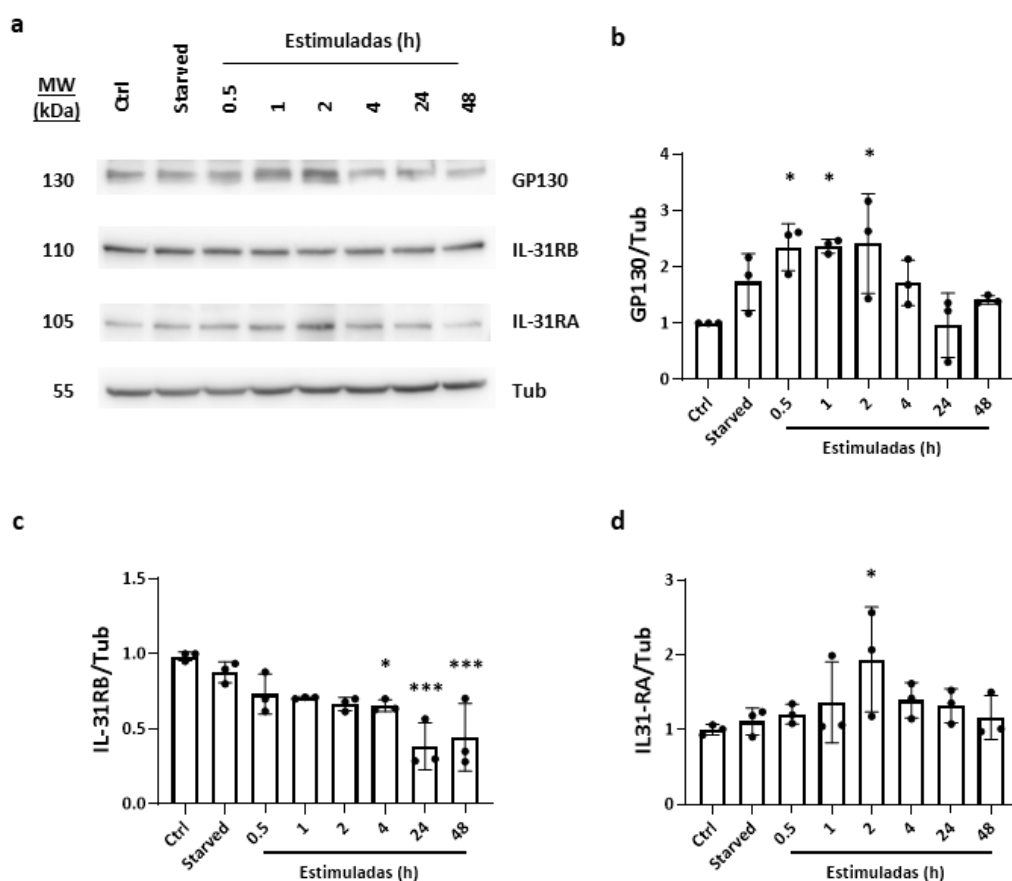


Figura 16. Los niveles de las proteínas que forman los complejos receptores de la OSM (GP130 e IL-31RA) aumentan después de la estimulación de HCF *in vitro*. (a) Imágenes representativas de

los Western Blot de GP130, IL-31RA e IL-31RB, y de β -tubulina (Tub) como control de carga. La muestras de proteína se tomaron en condiciones basales (Ctrl, medio FGM-3), en condiciones de privación de nutrientes (glucosa y FBS) (Starved, medio DMEM sin FBS) y tras la estimulación pro-fibrótica (Estimuladas, medio de inanición junto con un cóctel profibrótico basado en sulfato de dextrano, ácido L-ascórbico 2-fosfato y TGF- β 1). (b) Cuantificación de la expresión de la proteína GP130. (c) Cuantificación de la expresión de la proteína IL-31RB. (d) Cuantificación de la expresión de la proteína IL-31RA. El contenido de proteína se midió mediante densitometría en ImageJ utilizando la Tub como control de carga para cada condición. Los pertenecen a tres experimentos independientes y se analizaron con ANOVA y la prueba post hoc de Tukey, utilizando los valores Ctrl como referencia. Se representa la media $\pm$ SD (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

La transferencia de Western (Figura 16a-d) mostró que los niveles del receptor IL-31RA eran comparables entre las células de la condición control y las células de la condición “Starved”, pero aumentaron significativamente 2 h después de la estimulación con el cóctel pro-fibrótico, lo que apunta a una producción rápida de esta proteína bajo estas condiciones experimentales ($p < 0,05$ después de 2 h de estimulación). La expresión de la proteína GP130 fue mayor en las células privadas de alimento que en las células de control y aumentó de 0,5 a 2 h de estimulación ($p < 0,05$). Finalmente, en contraste con IL-31RA, los niveles de IL-31RB fueron significativamente menores en las células HCF-V a partir de las 4 h de estimulación ($p < 0,05$ tras 4 h de estimulación y $p < 0,001$ tras 24 y 48 h de estimulación).

Estos resultados indican que los receptores implicados en la activación de la vía de señalización de la OSM están regulados positivamente en fibroblastos cardíacos sometidos a privación de nutrientes y en los primeros momentos tras la estimulación de la fibrosis *in vitro*, lo que apunta a su posible capacidad de respuesta frente a las EVs enriquecidas con OSM.

1.3 Las MutOSM-CD81-EVs suprimen la proliferación de fibroblastos ventriculares cardíacos humanos después de la privación de nutrientes

Para evaluar el potencial de las EVs enriquecidas con OSM sobre la proliferación de HCF, se tiñeron y cuantificaron los núcleos con Ki-67. En primer lugar, se incubaron los HCF en medio de privación (DMEM bajo en glucosa, 0,1% FBS y 1% NEAA) con o sin EVs durante 24 horas. Como se observa en la Figura 17 las células no tratadas y las tratadas con Ctrl-EVs y CD81-EVs mostraron tasas de proliferación similares ($27,49 \pm 3,06\%$, $31,80 \pm 2,61\%$ y $32,18 \pm 0,28\%$, respectivamente), y no se observaron diferencias significativas entre ellas. El tratamiento con MatOSM-CD81-EVs resultó en una ligera disminución en

la tasa de proliferación de los HCF ($23,95 \pm 3,37\%$), sin embargo, tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los datos con los de la condición no tratada. Por el contrario, el tratamiento de los fibroblastos con MutOSM-CD81-EVs disminuyó significativamente la tasa de células en proliferación en comparación con las células no tratadas ($p < 0,05$) y las tratadas con Ctrl-EVs o CD81-EVs ($p < 0,01$).

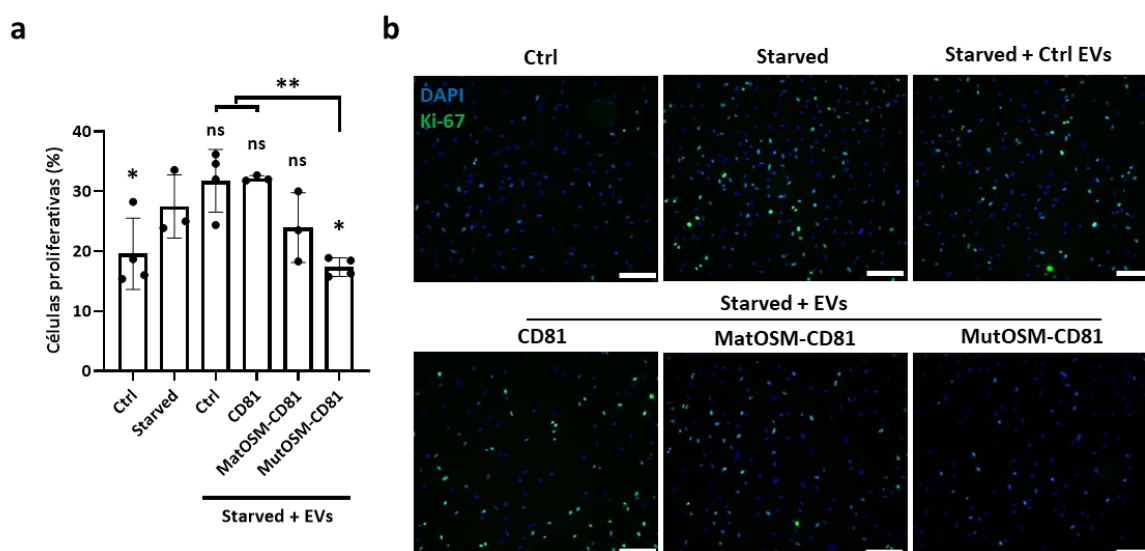


Figura 17. Las EVs cargadas con MutOSM-CD81 reducen la proliferación en HCF tras la privación de nutrientes *in vitro*. (a) Cuantificación de la tasa de proliferación en HCF en condiciones basales (Ctrl), después de la privación de nutrientes (starved) y después del tratamiento con EVs. Se muestra la relación entre el número de células proliferativas (núcleos positivos para Ki-67, en verde) y el número total de células (núcleos positivos para DAPI, en azul). (b) Imágenes representativas de la tinción de núcleos Ki-67 y DAPI para cada condición experimental. Todos los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes y se analizaron con ANOVA y la prueba post hoc de Tukey. Los resultados se representan como media $\pm$ SD (ns, diferencias no significativas; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs condición Starved).

Estos resultados apuntan a un papel funcional de las MutOSM-EVs en la modulación de la proliferación de HCF después de la privación de nutrientes *in vitro*, lo que indica que cargar esta versión modificada de la OSM en la superficie de las EVs derivadas de MSC-T podría promover respuestas antifibróticas en los fibroblastos ventriculares.

1.4 Las EVs enriquecidas con MatOSM y mutOSM contrarrestan la expresión de Telo-colágeno1 α 1 en un modelo *in vitro* de fibrosis cardíaca

Por otro lado, se quiso estudiar el efecto de las EVs sobre la transición a un fenotipo fibrótico por parte de los HCF. Para esto, los HCF fueron incubados en el medio de privación de nutrientes o en el medio de estimulación con o sin EVs durante 48 horas. Tras esto se realizó una inmunocitoquímica para la detección y cuantificación de colágeno maduro (telo-colágeno1 α 1). Esta proteína se sintetiza y secreta al espacio extracelular por parte de los fibroblastos en respuesta a estímulos pro-fibróticos. En la Figura 18a se muestran imágenes representativas de cada condición experimental. La señal fluorescente del telo-colágeno1 α 1 se cuantificó mediante dos métodos diferentes: midiendo la intensidad de fluorescencia media (MFI) por número de células (núcleos teñidos de azul usando DAPI, Figura 18b), y midiendo el área ocupada por telo-colágeno1 α 1 extracelular en relación con la área total (Figura 18c). La señal fluorescente de telo-colágeno1 α 1 apenas se observó en la condición control (medio FGM-3) y en la condición de privación. Sin embargo, tanto la MFI como el área cubierta por telo-colágeno1 α 1 se elevaron significativamente cuando los HCF fueron estimulados con un cóctel profibrótico que contenía TGF- β 1, ácido L-ascórbico 2-fosfato y sulfato de dextrano ($p < 0,001$ para las condiciones control y starved frente a la condición de HCF estimulados). La MFI y el área de telo-colágeno1 α 1 fueron ligeramente menores en las células tratadas con Ctrl-EVs, siendo ambos valores significativamente más bajos que en las células estimuladas ($p < 0,01$), mientras que las CD81-EVs solo redujeron significativamente la secreción extracelular de telo-colágeno1 α 1 en comparación con los HCF estimulados ($p < 0,01$). En cuanto al tratamiento de las células HCF con MatOSM-CD81-EVs y con MutOSM-CD81-EVs, se observó una reducción significativa de la MFI y la deposición extracelular de telo-colágeno1 α 1 en comparación con las células estimuladas y sin EVs ($p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente). Con respecto a las CD81-EVs, el tratamiento con MatOSM-CD81-EVs o MutOSM-CD81-EVs no produjo diferencias significativas en la MFI; sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en términos de deposición de telo-colágeno1 α 1 extracelular ($p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente). Esto sugiere que, aunque la producción de telo-colágeno1 α 1 no se vea reducida, las EVs enriquecidas con OSM juegan un papel activo en la reducción de la deposición de telo-colágeno1 α 1 extracelular después de la estimulación pro-fibrótica *in vitro*.

Estos resultados indican que las EVs derivadas de MSC-T tienen una cierta capacidad intrínseca para contrarrestar la activación de los fibroblastos tras la estimulación. La adición de OSM a estas EVs puede aumentar este efecto, convirtiéndolas en una buena opción terapéutica para atenuar la fibrosis cardíaca después de una lesión.

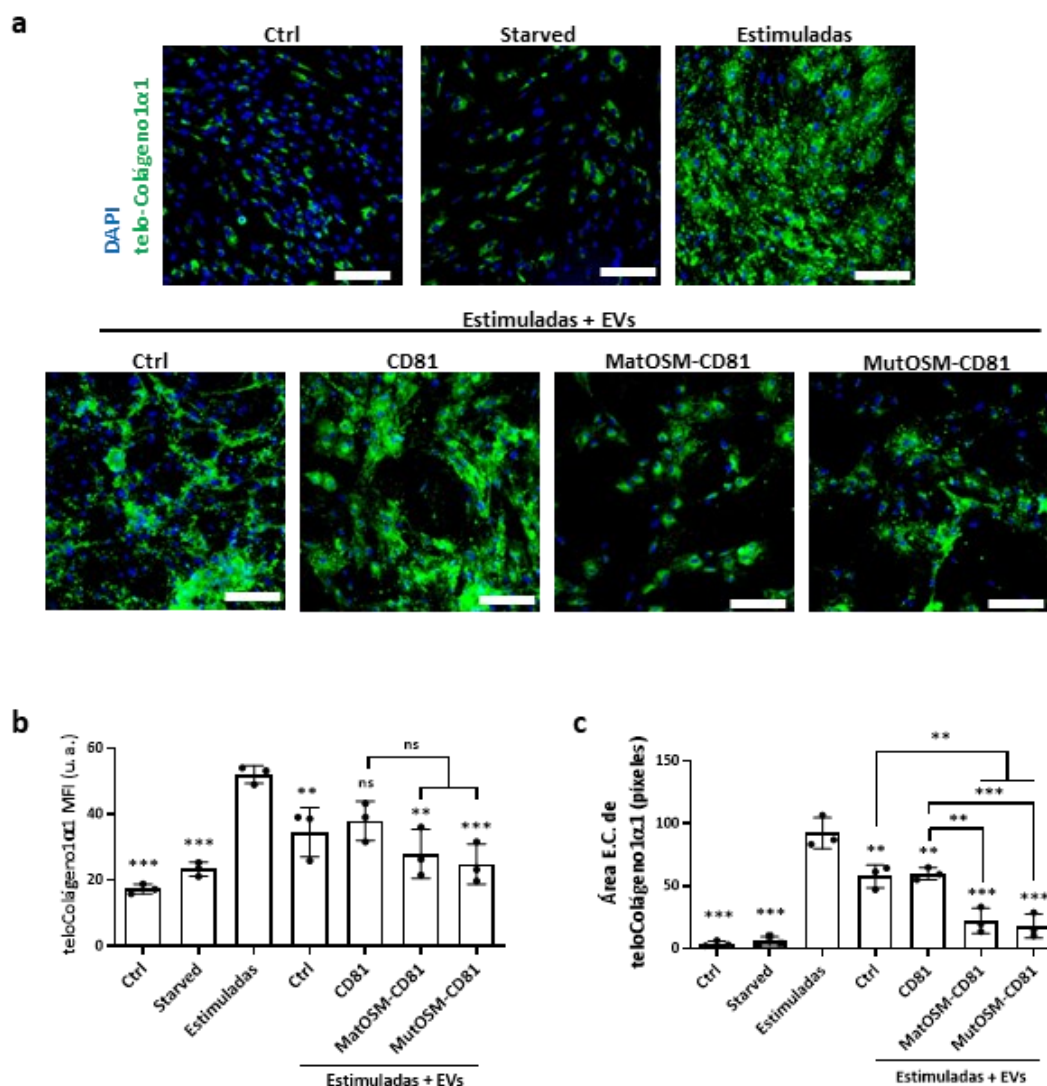


Figura 18. Las EVs cargadas con mutOSM-CD81 tienen una mayor capacidad de reducir la secreción de telo-colágeno1α1 por parte de los HCF *in vitro*. (a) Imágenes representativas de la detección de telo-colágeno1α1 (en verde) en condiciones basales, de privación de glucosa y FBS, de estimulación junto con los diferentes tipos de vesículas. Se utilizó DAPI para la tinción de núcleos (en azul). Barra de escala = 200 μm. (b) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de telo-colágeno1α1 en las diferentes condiciones experimentales. (c) Cuantificación del área ocupada por telo-colágeno1α1 en las diferentes condiciones experimentales. Todos los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes y se analizaron con ANOVA y la prueba post hoc de Tukey. Las diferentes condiciones experimentales se compararon tanto con la condición de estimulación como con la condición de estimulación con los diferentes tipos de EVs. Los resultados se representan como media ± SD (ns, diferencias no significativas; * p < 0,05, ** p < 0,01, y *** p < 0,001 vs condición Estimuladas).

1.5 Las MutOSM-CD81-EVs reducen la fibrosis cardíaca en un modelo de infarto de miocardio de tipo 2 inducido por isoproterenol

La comparación funcional de las MatOSM-CD81-EVs y MutOSM-CD81-EVs *in vitro* no mostró grandes diferencias entre ellas, aunque las MutOSM-CD81-EVs sí demostraron ser más efectivas a la hora de controlar la proliferación de fibroblastos (Figura 17). Por lo tanto, siguiendo el principio de las 3 Rs, se decidió evaluar solamente la función de las MutOSM-CD81-EVs *in vivo*, usando como control animales tratados con CD81-EVs. Para ello, indujimos hipertrofia cardíaca y fibrosis intersticial en ratones utilizando isoproterenol (ISO), un agonista β -adrenérgico no selectivo que se ha utilizado ampliamente en modelos murinos [281–284]. El efecto fisiopatológico de la infusión de ISO imita el infarto de miocardio tipo 2 [284], que ocurre cuando hay un desajuste entre el suministro y la demanda de oxígeno. El ISO actúa aumentando el ritmo cardíaco, lo cual conduce a un desbalance entre de demanda/aporte de oxígeno y nutrientes al músculo cardíaco que acaba produciendo la muerte y necrosis de los cardiomiocitos. Al no tratarse de una lesión localizada (como puede ser la oclusión de una arteria coronaria), este modelo da lugar a la aparición de fibrosis intersticial a lo largo de todo el miocardio y, más concretamente, en la zona endocárdica. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes tres grupos experimentales: ISO + CD81-EVs, ISO + MutOSM-EVs y control (ISO), en los que se inyectaron volúmenes equivalentes de PBS. A los ratones se les inyectó 150 mg/kg/día de ISO por vía subcutánea durante 5 días consecutivos, y los tratamientos (EVs o PBS) se administraron los días 1 y 7. Los animales fueron sacrificados el día 21 para histología (Figura 19).

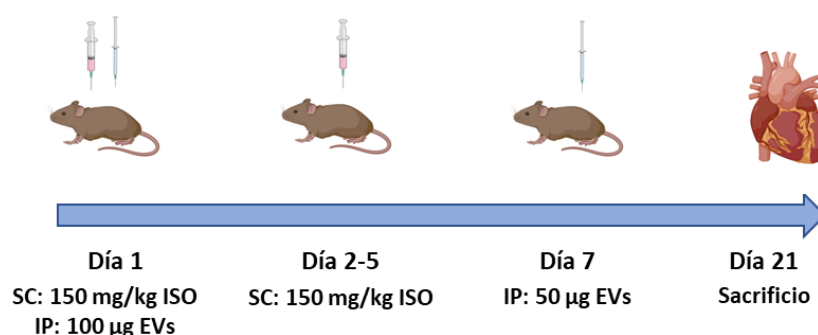


Figura 19. Esquema experimental del modelo de daño por isoproterenol. Se conformaron tres grupos experimentales: ISO (ctrl), ISO + CD81-EVs e ISO + mutOSM-CD81-EVs. El daño cardíaco se indujo mediante inyecciones subcutáneas (SC) ISO diarias (dosis: 150 mg/kg/día) durante 5 días consecutivos. Se inyectaron dos dosis intraperitoneales (IP) de EVs (CD81 o mutOSM-CD81) en el día 1 y el día 7. Un volumen equivalente de vehículo (PBS) se inyectó en el grupo experimental que solo recibió ISO. A los 21 días después de la primera inyección de ISO se sacrificaron los animales.

Para analizar la fibrosis miocárdica, las secciones del corazón se tiñeron con Picrosirius rojo y se cuantificó el área de colágeno. Con esta tinción, el tejido muscular se marca en amarillo mientras que las fibras de colágeno se marcan en rojo, facilitando así el análisis y cuantificación del área fibrótica (Figura 20a y b).

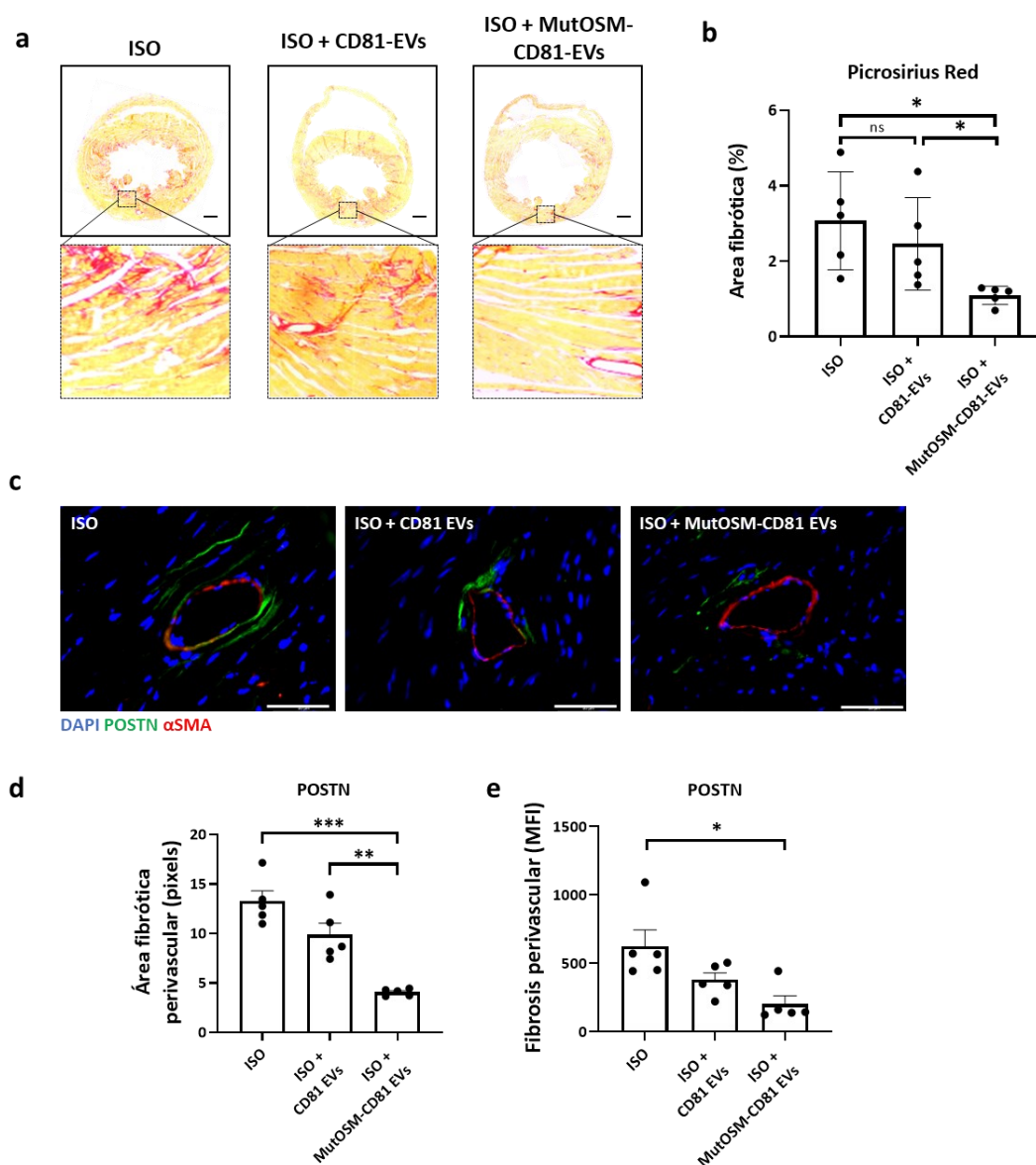


Figura 20. Las mutOSM-CD81-EVs reducen la fibrosis resultante del daño causado por isoproterenol *in vivo*. (a) Imágenes representativas de la tinción Picrosirius red. Barra de escala = 200 μ m. (b) Cuantificación del área fibrótica en secciones de corazón teñidas con rojo Picrosirius. Para cada animal se representa el porcentaje de área cubierta de colágeno en relación con el área total del corazón. (c) Imágenes representativas de la tinción doble con periostina (POSTN) y α -actina de músculo liso (α SMA). Barra de escala = 50 μ m. (d) Cuantificación de la fibrosis perivascular mediante la tinción anti-periostina (POSTN). El resultado se expresa en píxeles y MFI. Se incluyeron cinco animales en cada grupo experimental. Para el análisis y cuantificación de las imágenes se utilizó ImageJ. Los datos se analizaron

con ANOVA y la prueba post hoc de Tukey, utilizando valores del grupo ctrl (ISO) como referencia y representados como media $\pm$ SEM. También se compararon los datos de los grupos CD81-EVs y mutOSM-CD81-EVs entre sí (ns, no significativo; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

No se observaron diferencias significativas en el área de colágeno entre los ratones tratados con CD81-EVs y los ratones del grupo control (solo ISO). Por el contrario, el área teñida con colágeno fue significativamente menor en los ratones tratados con MutOSM-EVs que en los ratones control y los tratados con CD81-EVs ($p < 0,05$ en ambos casos). A continuación, se evaluó la presencia de miofibroblastos 21 días después de iniciar el tratamiento ISO en zonas cercanas a vasos para cuantificar la fibrosis perivascular. Para ello, las secciones del corazón se tiñeron con el anticuerpo anti-periostina. La periostina es una proteína clave en la regulación de la ECM y está involucrada en la patogénesis de la fibrosis cardíaca, contribuyendo al aumento del tejido conectivo y la disfunción cardíaca. La periostina se secreta principalmente por miofibroblastos y, por tanto, también se usa como marcador de estas células, así como del proceso de fibrosis y remodelación cardíaca. Como se esperaba, la tinción de periostina fue significativamente menor en los ratones tratados con MutOSM-CD81-EVs que en los ratones control y los tratados con CD81-EVs ($p < 0,05$, Figura 20c-e).

Como hemos mencionado anteriormente, la administración de isoproterenol provoca un aumento de la frecuencia cardíaca y, por tanto, un aumento de la carga de trabajo del miocardio. Esto conduce a una respuesta de hipertrofia ventricular con el fin de aumentar la capacidad de bombeo del corazón. Para analizar el efecto de las EVs sobre la hipertrofia cardíaca patológica, las secciones del corazón se tiñeron con aglutinina de germen de trigo (WGA). La WGA es una lectina que se une selectivamente a los residuos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetil neuramínico (ácido siálico). Como resultado, los conjugados de WGA se pueden utilizar para marcar membranas celulares, facilitando en nuestro caso la cuantificación del área promedio de los cardiomiocitos (Figura 21a y b). Aunque el área transversal promedio de los cardiomiocitos era menor en los ratones tratados con CD81-EVs que en los ratones de control (solo ISO) no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,07$). Por el contrario, en los ratones tratados con MutOSM-CD81-EVs sí se cuantificó un área transversal significativamente menor en comparación con los ratones del grupo control ($p < 0,01$) y con los ratones tratados con CD81-EVs ($p < 0,05$).

Por otro lado, son varios los estudios que manifiestan el papel de la OSM en la polarización de macrófagos hacia un fenotipo pro-resolutivo M2 [285,286]. Los macrófagos M2 están asociados con funciones antiinflamatorias y de reparación de tejidos, por ello, investigamos si el tratamiento con EVs enriquecidas con OSM también tiene un impacto en la polarización de los macrófagos hacia este fenotipo (Figura 21c y d). El análisis fenotípico de los macrófagos infiltrados en el tejido cardíaco reveló una menor presencia de macrófagos proinflamatorios M1 (F4/F80+-PD-L1+) y una

abundancia similar de macrófagos inmunomoduladores tipo M2 (F4/F80+-CD206+) en animales tratados con MutOSM-CD81-EVs en comparación con aquellos tratados solo con ISO ($p < 0,05$).

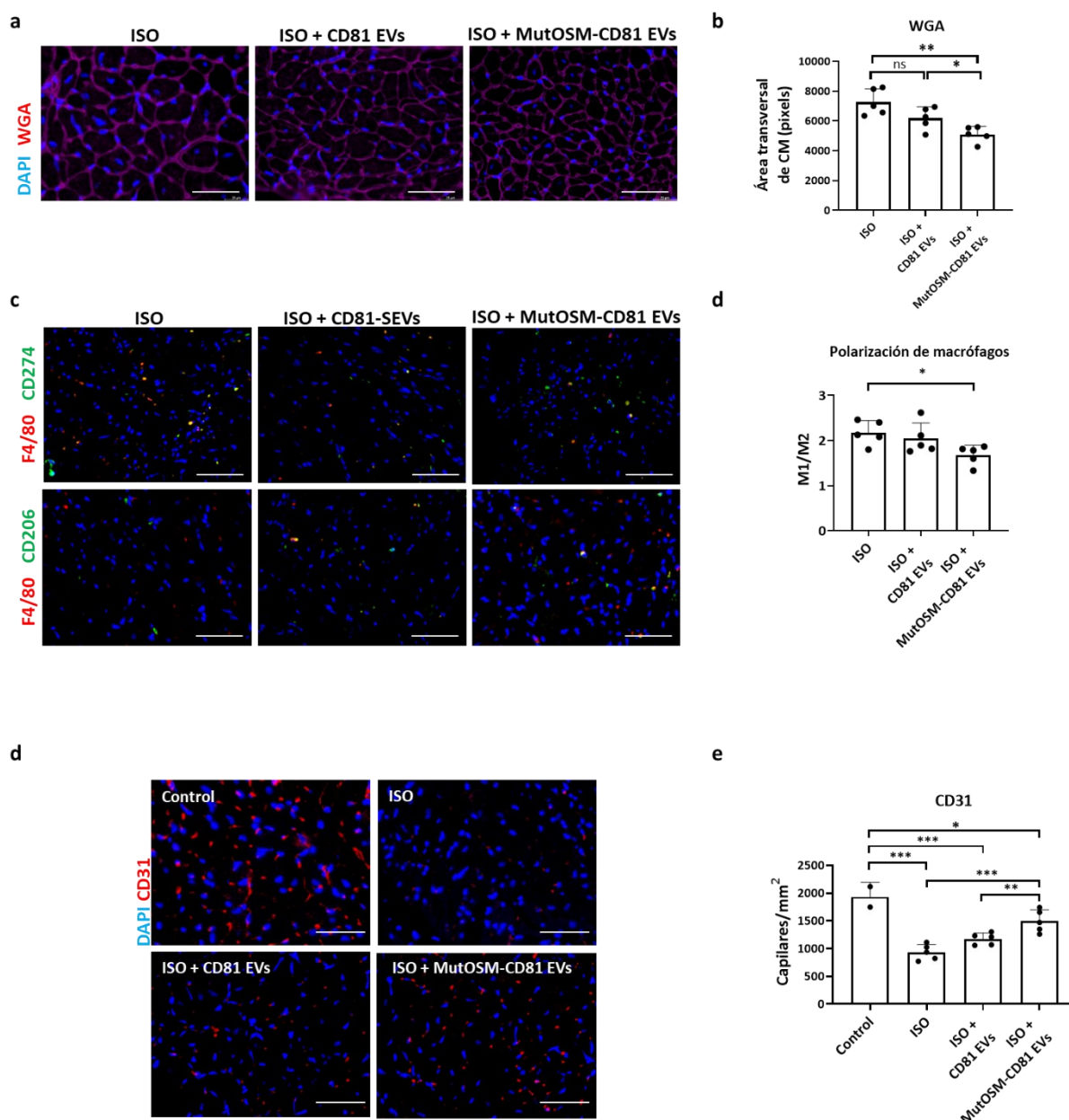


Figura 21. Las mutOSM-CD81-EVs reducen la hipertrofia, disminuyen el ratio M1/M2 y aumentan la angiogénesis en el modelo *in vivo* de infarto de miocardio por isoproterenol. (a) Imágenes representativas de la tinción con aglutinina de germen de trigo (WGA) (en rojo) y la tinción de núcleos (DAPI, en azul) para cada grupo experimental. Barra de escala = 50 μ m. (b) Medición del área de sección transversal de los cardiomiocitos mediante tinción WGA en cortes de corazón de animales. (c) Inmunodetección de F4/F80 (marcador pan-macrófago; rojo) y CD274 (PD-L1; marcador pro-inflamatorio M ϕ 1; verde) o CD206 (marcador pro-regenerativo M ϕ 2; verde) en muestras de corazón 21 días después del tratamiento ISO. Barra de escala = 50 μ m. (d)

Cuantificación de células doble positivas por mm^2 . Se analizaron cinco secciones de $0,14 \text{ mm}^2$ por ratón. (e) Medición de la microvasculatura, utilizando un anticuerpo contra CD31. Se contaron las estructuras teñidas circulares con un área de hasta $23,5 \mu\text{m}^2$. (f) Imágenes representativas de tinción con CD31 (en rojo) y tinción de núcleos (DAPI, en azul) para cada grupo experimental. Barra de escala = $50 \mu\text{m}$. Se incluyeron cinco animales en cada grupo. Se utilizó el software ImageJ para el análisis de las imágenes y la cuantificación colorimétrica y de fluorescencia. Los datos se analizaron con ANOVA y la prueba post hoc de Tukey, utilizando los datos del grupo de control (ISO) como valores referencia y representados como media $\pm$ SEM. También se compararon los datos de los grupos CD81-EVs y mutOSM-CD81-EVs entre sí (ns, diferencias estadísticas no significativas; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

Finalmente, se decidió analizar la densidad microvascular cardíaca, la cual se relaciona siempre con un mejor pronóstico tras sufrir daño cardíaco. Para ello se cuantificó la angiogénesis utilizando un anticuerpo contra CD31 (Figura 21e y f). Los resultados de la tinción mostraron una mayor densidad capilar en ratones tratados con MutOSM-CD81-EVs en comparación con el grupo control ($p < 0,01$) y el grupo tratado con CD81-EVs ($p < 0,001$).

En conjunto, los resultados del modelo *in vivo* de daño cardíaco por isoproterenol apuntan a una mejora del potencial terapéutico de las EVs derivadas de MSC-T al cargar OSM en su superficie, dando lugar a una disminución en la deposición de colágeno y en la hipertrofia de los cardiomiocitos, a la polarización de $\text{M}\phi$ a un fenotipo M2 y al aumento de la angiogénesis y la densidad capilar.

1.6 Las MutOSM-CD81-EVs muestran una tendencia a la reducción de la fibrosis en el modelo de TAC

A la luz de los resultados anteriores, se quiso evaluar el potencial terapéutico de las MutOSM-CD81-EVs sobre el modelo de constricción de la aorta transversa (TAC). Este modelo se basa en la realización de una constricción en la aorta transversa, entre el tronco braquiocefálico y la carótida izquierda (Figura 22). Como resultado se produce un aumento de la carga hemodinámica (similar al que se da en casos de estenosis aórtica) y que conduce finalmente a la insuficiencia cardíaca. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes tres grupos experimentales: TAC + CD81-EVs, TAC + MutOSM-EVs y TAC + PBS. Tras la operación, se inyectaron $100 \mu\text{g}$ de EVs (o un volumen equivalente de PBS) a los ratones por vía intraperitoneal. El sacrificio se produjo 28 días después de la operación.

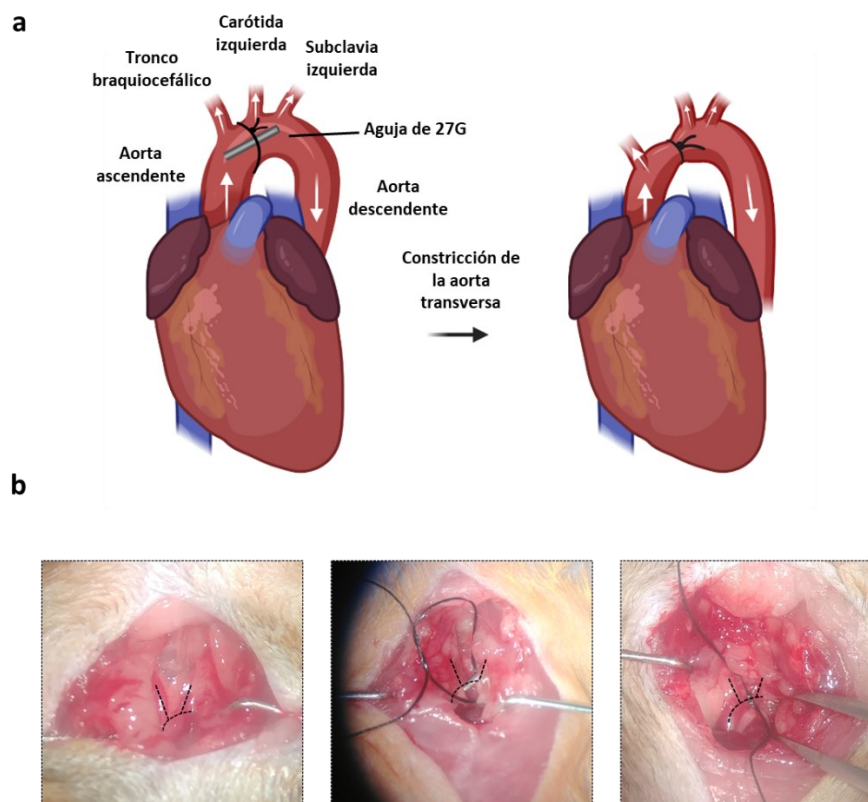


Figura 22. Esquema del modelo *in vivo* de constricción de la aorta transversa (TAC). (a) Esquema del modelo de TAC. Mediante una aguja de 27G se realiza una constricción de la aorta transversa, entre el tronco braquiocefálico y la carótida izquierda. Este estrechamiento aumenta la poscarga cardíaca de modo similar a como lo haría una estenosis valvular, induciendo daño cardíaco y fibrosis. (b) Imágenes tomadas durante el procedimiento donde se aprecia el arco aórtico, el tronco braquiocefálico y la carótida izquierda (izquierda), el trozo de aguja antes de realizar el nudo (centro) y la constricción ya realizada (derecha).

Con el modelo de TAC se analizaron la fibrosis y la hipertrofia cardíaca. Los resultados mostraron una tendencia a la disminución del área fibrótica (Figura 23a y b) y del área transversal de los cardiomiocitos (Figura 23c y d) al tratar a los ratones con MutOSM-CD81-EVs. Sin embargo, debido a la severidad del daño cardíaco ocasionado y a la alta mortalidad que estábamos registrando, se decidió no continuar con el modelo de TAC.

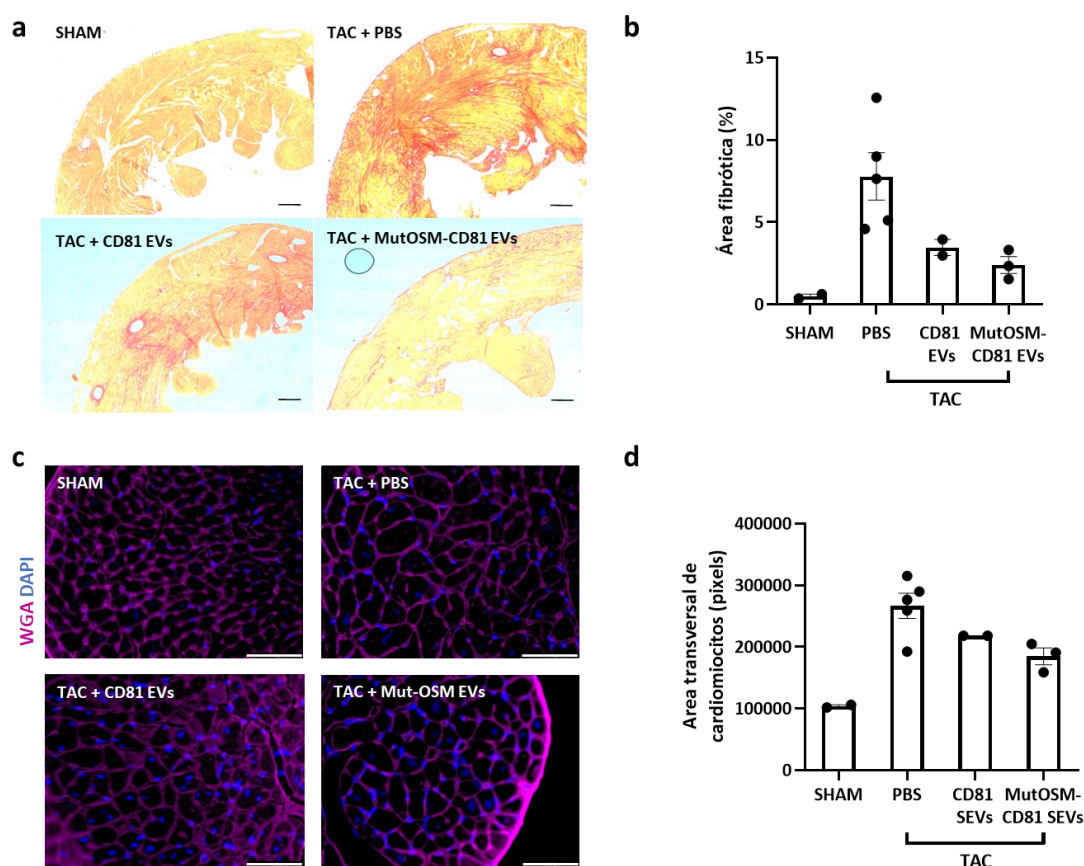


Figura 23. Las mutOSM-EVs muestran una tendencia a la reducción de la fibrosis y la hipertrofia inducidas por el modelo de TAC. (a) Imágenes representativas de la tinción Picrosirius rojo. Barra de escala = 200 μ m. (b) Cuantificación del área fibrótica en secciones de corazón teñidas con Picrosirius rojo. Para cada animal se representa el porcentaje de área cubierta de colágeno en relación con el área total del corazón. (c) Imágenes representativas de la tinción con aglutinina de germen de trigo (WGA) (en magenta) y la tinción de núcleos (DAPI, en azul) para cada grupo experimental. Barra de escala = 50 μ m. (d) Medición del área de sección transversal de los cardiomiocitos mediante tinción WGA en cortes de corazón de animales.

2. Sobreexpresión de N1ICD y HIF1A

2.1 Generación de la línea de MSC-N1ICD y MSC-N1ICD-HIF1A

Como en el apartado anterior, para la generación de las líneas con sobreexpresión de N1ICD y HIF1A también partimos de MSC-T. Por un lado, se sobreexpresó el dominio intracelular de Notch1 (N1ICD) mediante la transducción lentiviral del plásmido pLIX-hN1ICD (Addgene #91897). Este plásmido contiene un promotor inducible por doxiciclina (Tet-on) y como reportero contiene el gen de resistencia a la puomicina. Se optó por utilizar un promotor inducible ya que en experimentos previos se vio que con un promotor constitutivo la sobreexpresión de N1ICD acababa por detener el

crecimiento de las MSCs, a pesar incluso de la sobreexpresión de hTERT. Por otro lado, la resistencia a la puromicina facilitó en gran medida el trabajo, al poder obtener un cultivo puro de células que hubieran incorporado el plásmido mediante selección. Por otro lado, se introdujo el plásmido pWPI-HIF1A-GFP, de expresión constitutiva y con GFP como reportero. En este caso, el éxito de la transducción se evaluó mediante citometría de flujo, asegurando al menos un 85 % de células positivas para GFP. Este plásmido y las células resultantes de su sobreexpresión ya habían sido utilizados previamente por el grupo para la realización de experimentos relacionados con la angiogénesis y la regulación del sistema inmune [132,207].

Tras la transducción, las diferentes líneas generadas, que de ahora en adelante llamaremos MSC-TN, MSC-TH y MSC-THN, se expandieron y se aislaron y caracterizaron las EVs liberadas por las mismas. Para ello las MSCs se incubaron en medio de recolección que contenía 1 µg/ml de doxiciclina, durante 48 horas (Figura 24). Las MSC-T y sus EVs se incluyeron como control. En este punto del trabajo se implantó el grupo otro método de aislamiento de EVs, como se ha comentado en el apartado 2.3.2. De esta forma, las EVs pasaron de aislarse mediante ultracentrifugación a aislarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño precedida de un paso de concentración mediante filtración de flujo tangencial (Figura 24).

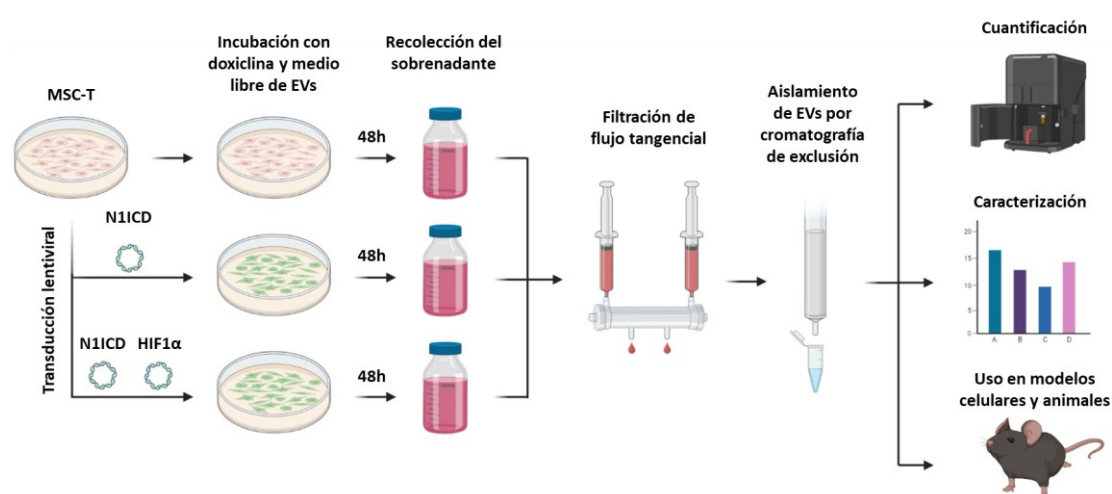


Figura 24. Representación esquemática del flujo de trabajo seguido para la obtención y evaluación de las EVs derivadas de MSC que sobreexpresan N1ICD o HIF1α/N1ICD. Paso 1: Generación de las líneas de MSC-T con las diferentes construcciones. Se utilizaron lentivirus que contenían los vectores para la sobreexpresión de HIF-1α y N1ICD. Paso 2: Expansión de las diferentes líneas de MSCs y aislamiento de las EVs. Una vez expandidas las MSCs, se incubaron con medio libre de EVs junto con doxiciclina (para inducir la expresión de N1ICD) durante 48 h y se recogió el sobrenadante. Las EVs se aislaron mediante filtración de flujo tangencial y cromatografía de exclusión por tamaño. Paso 3: Cuantificación de las EVs mediante NTA, caracterización mediante ExoView y TEM y evaluación de su potencial terapéutico en modelos celulares y animales.

Antes de pasar a analizar las EVs liberadas por las diferentes líneas de MSCs, se evaluó el nivel de expresión de ciertos genes, entre ellos *HIF1A* Y *N1ICD* (Figura 25). La sobreexpresión de *N1ICD* resultó en el aumento de expresión de *HEY1* y *HEY2*, genes activados por la vía de Notch, dando a entender que el aumento de expresión de *N1ICD* observado se traduciría en una proteína funcional y activa. Cabe mencionar que *N1ICD* no es un gen real, si no que forma parte del gen *NOCTH1*. Para evaluar la sobreexpresión del dominio intracelular se diseñaron cebadores específicos de esta región y, por tanto, la gráfica de expresión de *N1ICD* que aparece en la Figura 25 representa la expresión del gen *NOTCH1* junto con la expresión del cDNA de la región N1ICD introducido mediante transducción lentiviral. Como era esperable, la expresión de *HIF1A* se encontraba aumentada en las MSC-TH. Este aumento fue aún mayor en el caso de las MSC-THN, sugiriendo una acción sinérgica entre la sobreexpresión de *HIF1A* y *N1ICD*. Por otro lado, se comprobó también los niveles de expresión de otros genes como el gen de pluripotencia *SOX2* que desempeña un papel crucial en el mantenimiento de las características troncales de las MSCs; *CXCR4*, un receptor de quimiocinas clave en la movilización y migración de MSCs hacia el sitio de lesión cardíaca; *NRF2*, factor de transcripción que regula la expresión de proteínas antioxidantes; y *JAG1*, principal ligando de Notch en el corazón adulto y fundamental en la regeneración cardíaca tras un daño (Figura 25). La introducción de *HIF1A* y *N1ICD* en las MSC-T aumentó la expresión de todos estos genes relacionados con mecanismos de protección y reparación cardíaca, sugiriendo una mejor respuesta por parte de las MSC-THN y sus EVs en un contexto de patología cardíaca.

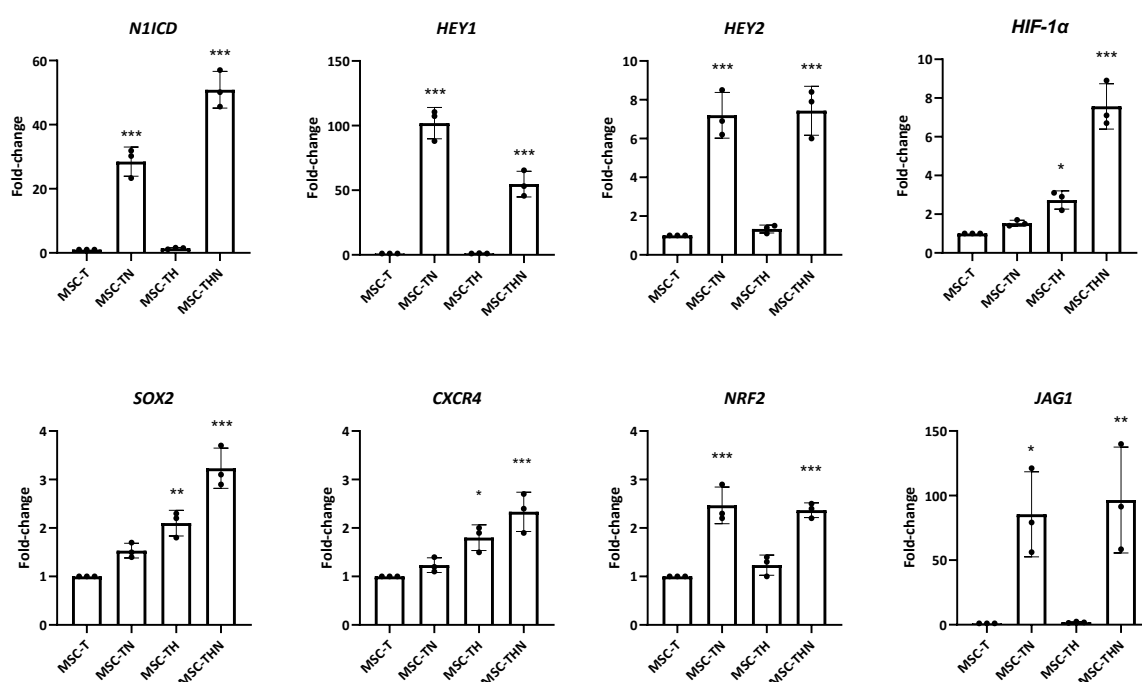


Figura 25. Expresión de genes de interés en MSC controles o sobreexpresando *HIF1α* y/o *N1ICD* (MSC-T, MSC-TN, MSC-TH y MSC-THN). La expresión se muestra como media $\pm$ SD normalizada

frente a las células MSC-T. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Del mismo modo, se analizó si existían diferencias en la expresión de algunos miARNs conocidos por su efecto cardioprotector cuando se inducía la sobreexpresión de N1ICD. Se observó una tendencia hacia el aumento de todos los miARNs analizados en las MSC-THN, que fue significativa en el caso del miR-30c-5p, miR-92a-5p, miR-92b-3p, miR-150-5p, miR-192-5p y miR-4732-3p tras la exposición de las células a doxiciclina. En base a estos resultados se deduce que la activación de la vía Notch podría desencadenar mecanismos cardioprotectores a partir de un aumento de la expresión de estos miARNs.

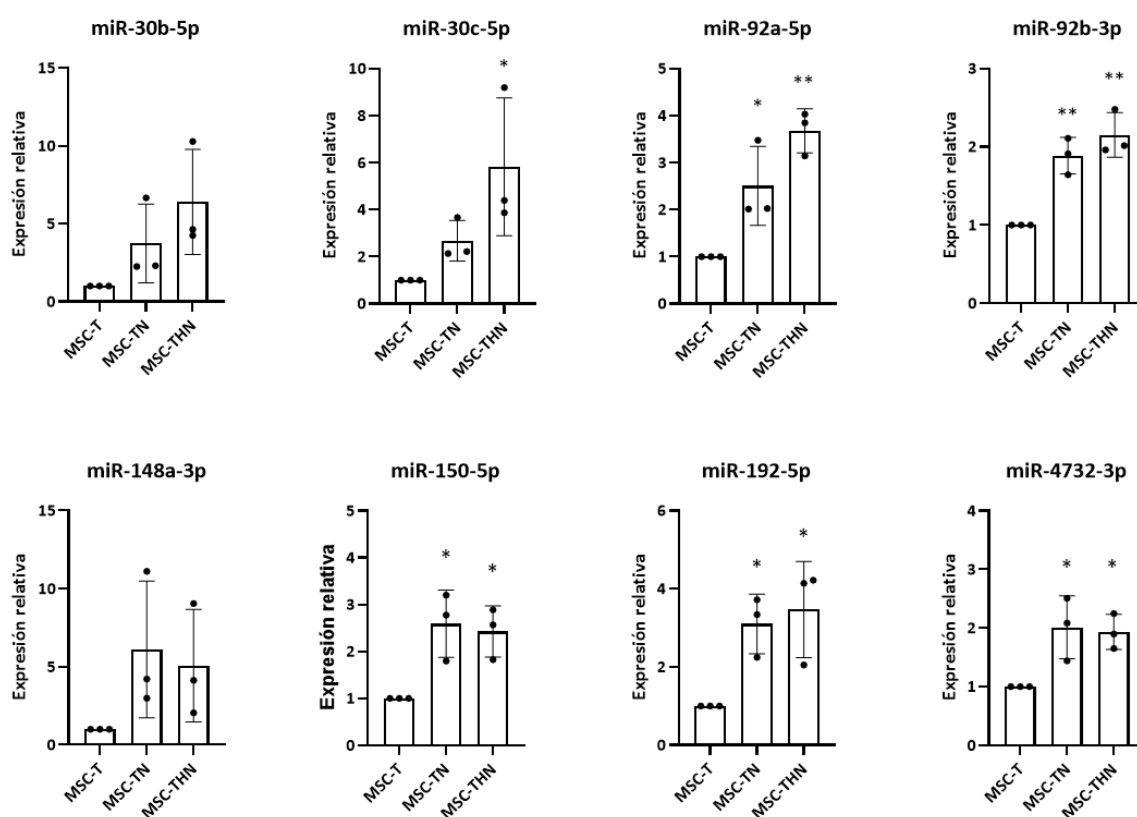


Figura 26. La sobreexpresión de N1ICD o HIF1 α -N1ICD en MSCs aumenta la expresión de miARNs relacionados con la cardioprotección. La expresión se muestra como media $\pm$ SD normalizada frente a las células MSC-T. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

2.2 Caracterización de las EVs derivadas de las diferentes líneas de MSCs

A continuación, se pasó a analizar las EVs secretadas por las MSC-T, MSC-TN, MSC-TH y MSC-THN. En primer lugar, se analizó la morfología de las EVs mediante microscopía electrónica, mostrando todas la muestras una morfología convexa característica de vesículas lipídicas (Figura 27a). Por otro lado, el NTA reveló una distribución de tamaños similar en todos los grupos, poseyendo la mayoría de las partículas un tamaño de entre 90 y 150 nm (Figura 27b y c). Estos resultados indican que la morfología, tamaño y cantidad de EVs no se ve alterada por las modificaciones genéticas introducidas.

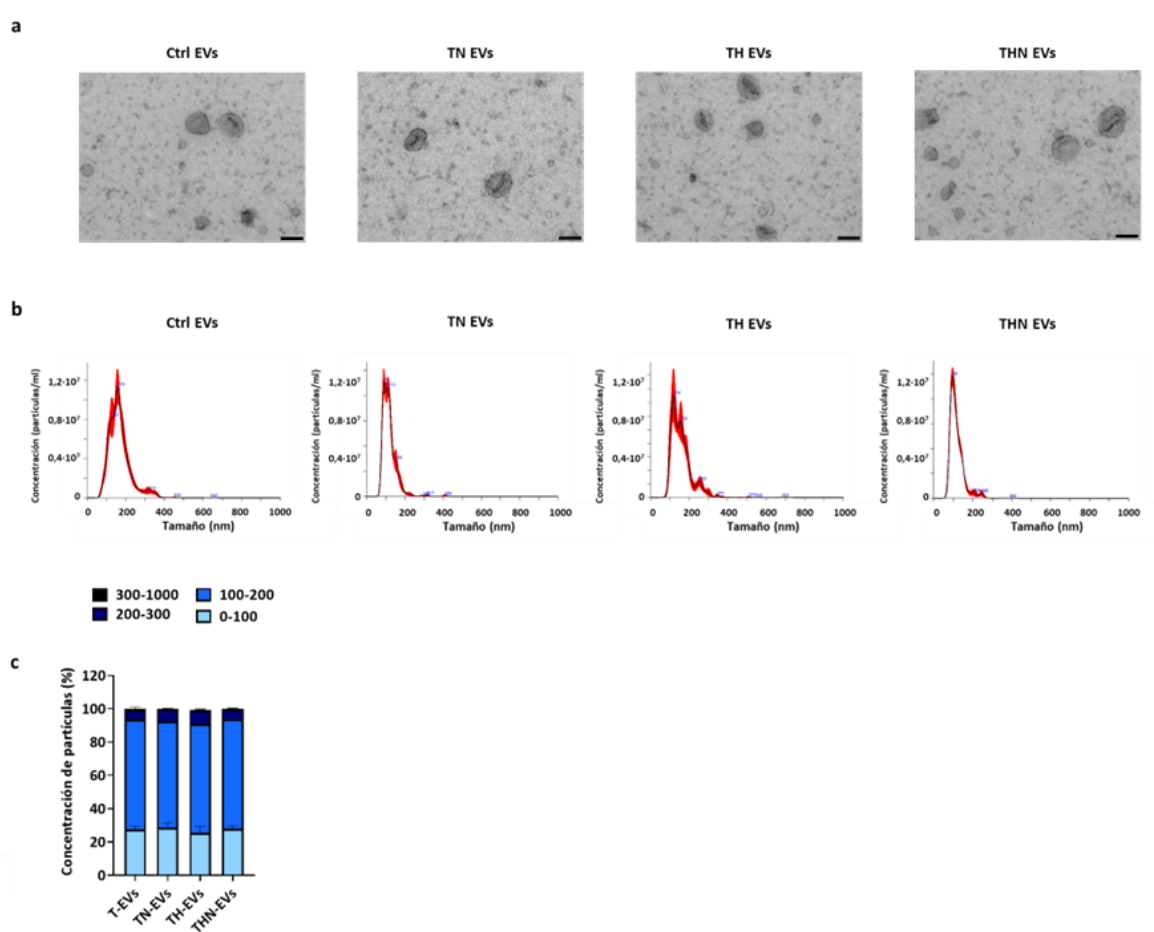
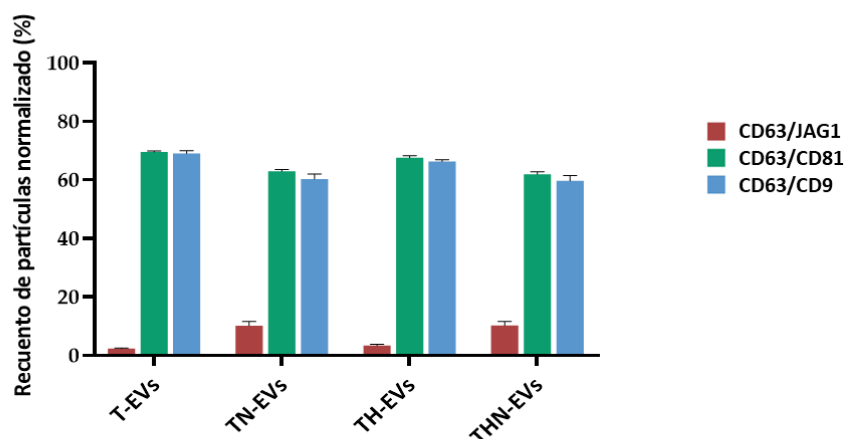


Figura 27. Las modificaciones genéticas de las MSCs no afectan a la morfología ni distribución de tamaños de sus EVs. (a) Imágenes representativas de EVs obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (barra de escala = 100 nm). (b,c) Resultado del NTA donde se aprecia el tamaño promedio de las EVs (nm) y los histogramas de distribución de tamaño de las EVs.

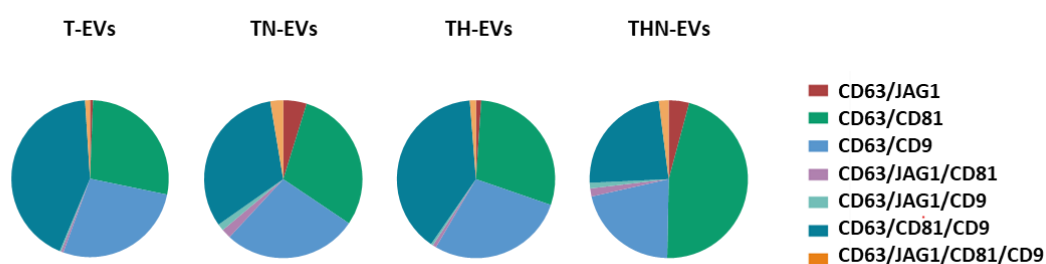
El siguiente paso fue estudiar el contenido de las EVs aisladas. Para ello, se empezó realizando un análisis utilizando la plataforma ExoView para la inmuno-fenotipificación de las diferentes subpoblaciones de EV. Como se ha comentado anteriormente, las EVs

se capturaron e inmovilizaron en una matriz de sustrato de silicio funcionalizada con tres anticuerpos contra proteínas comunes en la membrana de las EVs, las tetraspaninas CD63, CD81 y CD9, cada uno en un spot diferente del chip. Además, se usó un spot adicional funcionalizado con un isotipo IgG como control de adsorción no específica de EVs al sustrato del chip.

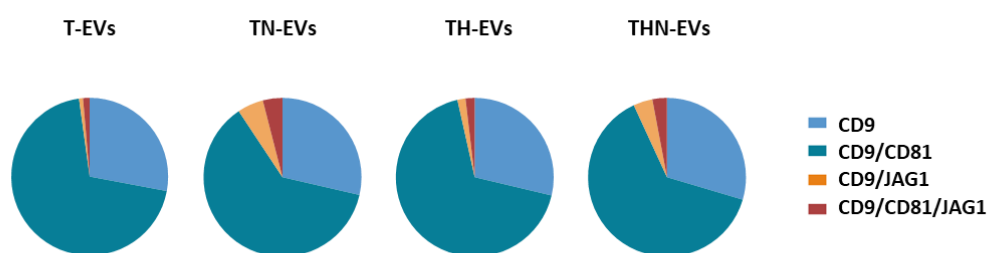
a



b



c



d

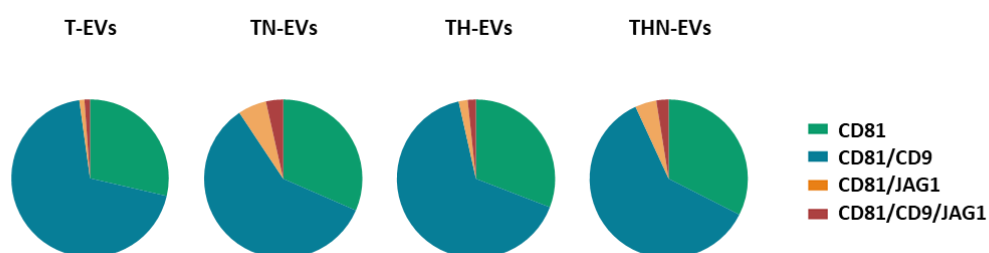


Figura 28. Las EVs derivadas de MSCs que sobreexpresan N1ICD llevan una mayor cantidad del ligando JAG1 en su superficie. (a) Análisis ExoView que muestra el porcentaje de EVs positivas para JAG1, CD81 o CD9 en aislados de las diferentes líneas de MSCs, tras la captura con CD63. Se representa la media $\pm$ SD. Gráficos circulares que muestran la co-expresión de las diferentes proteínas (JAG1, CD81 y CD9) en EVs capturadas con (b) CD63, (c) CD9 o (d) CD81.

Una vez capturadas las EVs, los chips se incubaron con una mezcla de 3 anticuerpos que pueden ser CD81, CD9 y CD63. A diferencia del análisis realizado con las EVs enriquecidas con OSM, en este caso el anticuerpo anti-CD63 fue sustituido por un anti-JAG1. Como hemos mencionado, JAG1 es uno de los ligando de Notch1 y está ampliamente relacionado con la protección y regeneración cardíacas. De hecho, un trabajo previo del grupo relacionó el incremento del efecto angiogénico de las MSC-TH EVs con la presencia de JAG1 en la superficie de las mismas [207]. Dado que el análisis de expresión de JAG1 en MSC-TN y MSC-THN era más de 50 veces superior al de las MSC-T (Figura 25), se decidió comprobar si esta proteína podía también estar siendo cargada en mayor medida en las EVs derivadas de estas células.

El número de EVs doble positivas para CD63/CD81 y CD63/CD9 no cambió entre los cuatro grupos experimentales (Figura 28a). Se detectó la presencia de JAG1 en la superficie de parte de las EVs de los grupos experimentales TN-EVs y THN-EVs, independientemente del spot donde fueron capturadas (Figuras 28a-d). La proporción de EVs para JAG1 fue similar en ambos grupos experimentales, lo que sugiere que la principal causa de su enriquecimiento en las EVs es la sobreexpresión de N1ICD. El grupo de TH-EVs también tuvo un porcentaje de vesículas positivas para JAG1 ligeramente superior al de T-EVs, pero muy inferior al mostrado por los grupos TN-EVs y THN-EVs. Estos resultados sugieren que las TN-EVs y THN-EVs pueden tener un efecto terapéutico tras el daño cardíaco al activar la vía de Notch1.

Para profundizar en el análisis proteico de las EVs, se realizó un estudio de proteómica de las mismas. Se identificaron un total de 56 proteínas comunes para los 4 grupos experimentales y 17, 9, 7 y 11 proteínas únicas para los grupos T-EVs, TH-EVs, TN-EVs y THN-EVs respectivamente. En el siguiente diagrama de Venn se pueden apreciar las proteínas identificadas en cada uno de los grupos (Figura 29).

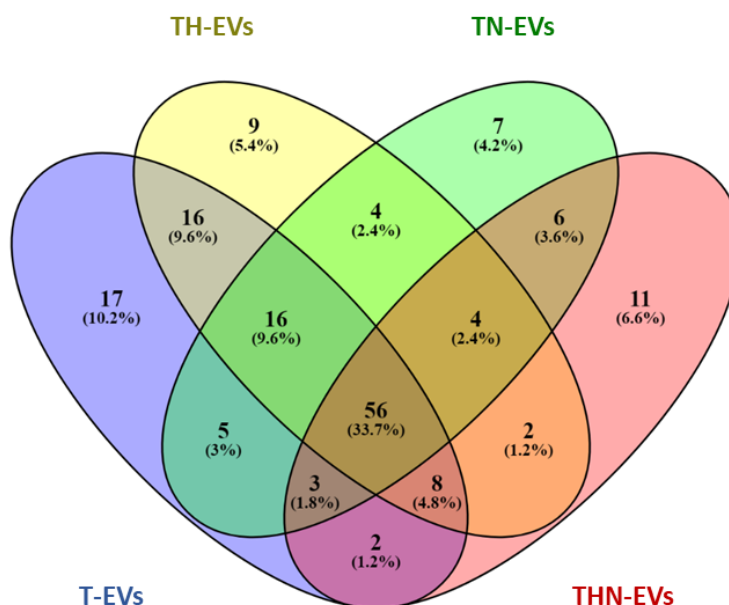
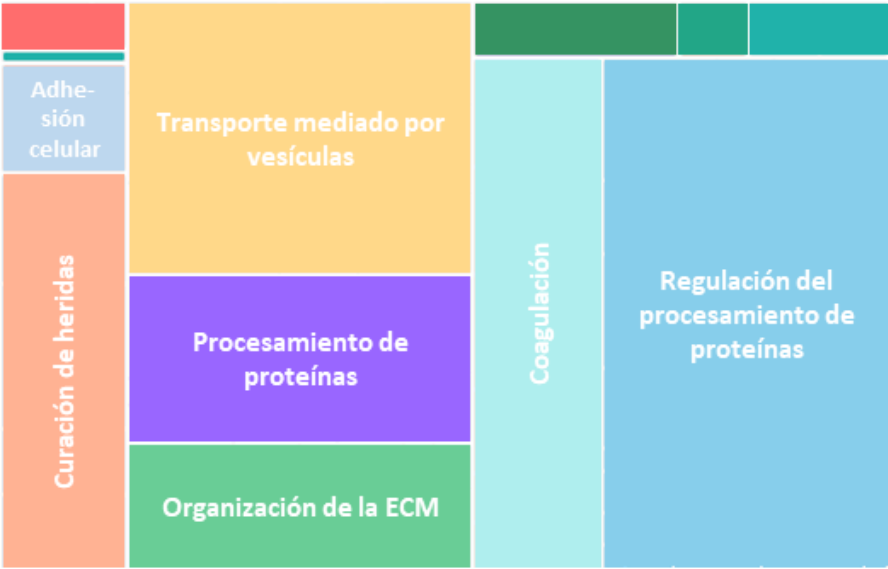


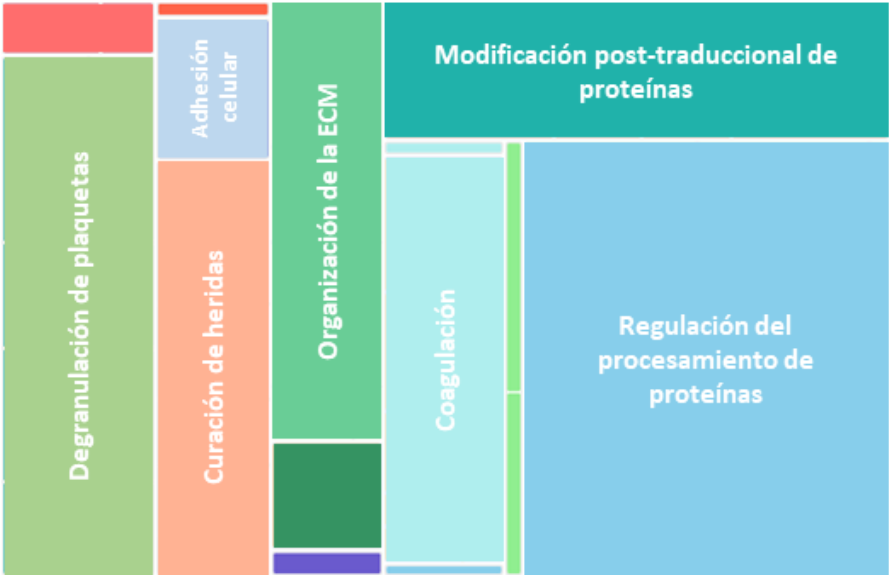
Figura 29. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas en EVs derivadas de MSCs tras el análisis proteómico.

A continuación, se visualizan los “clusters” en los que se agrupan los GOs identificados en cada uno de los grupos experimentales. Se representan como un *treemap* creado utilizando la herramienta web REVIGO (Figura 30).

T-EVs



TH-EVs



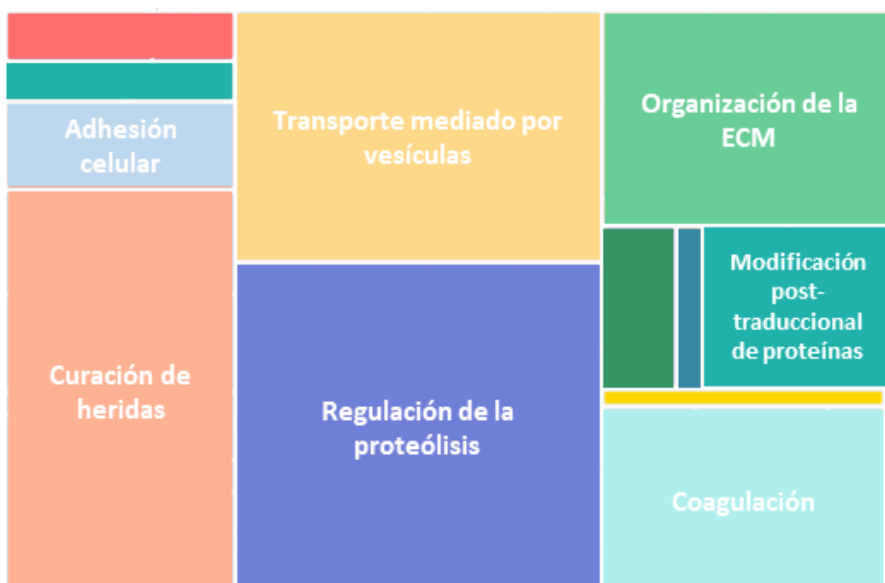
TN-EVs**THN-EVs**

Figura 30. Diagramas treemap de los procesos biológicos de las EVs derivadas de MSC-T, MSC-TH, MSC-TN y MSC-THN. Los diagramas se realizaron usando la herramienta REVIGO después del análisis proteómico.

Las 4 muestras de EVs contenían una carga proteica implicada en 5 clústeres de procesos biológicos comunes: la organización de la matriz extracelular, la adhesión celular, la curación de heridas, la coagulación y la adhesión célula-sustrato. Todos estos procesos están relacionados con la actividad paracrina y regeneradora de las MSC.

Cuando se les introduce la sobreexpresión de HIF1A y N1ICD aparece el clúster de modificación post-traducciona de proteínas. En el caso de la sobreexpresión de N1ICD aparece también el clúster de regulación de la proteólisis. Estos dos clústeres involucran procesos relacionados con la regulación de sistema inmune y la activación de proteínas y cascadas de señalización. Por otro lado, cabe destacar que los clústeres identificados, así como su representación relativa muestran una mayor similitud entre el grupo de TN-EVs y el de THN-EVs que entre el de T-EVs o el de TH-EVs. Esto sugiere que la sobreexpresión de N1ICD tiene un impacto predominante en el tipo de proteínas cargadas en las EVs, más allá de que HIF1A esté también sobreexpresado o no.

El análisis individual de la ontología génica (GO) de las proteínas identificadas no reveló grandes diferencias entre ellas. Aun así, ciertos términos de GO como “Cardiovascular system development”, “Vasculature development” o “Endothelial cell migration”, sí que aparecieron sobrerrepresentados en las EVs derivadas de MSC-TN y MSC-THN con respecto a las MSC-T EVs. Otros términos, como “Regulation of response to stress” aparecieron solamente en EVs tras las sobreexpresión de HIF1A (Figura 31).

Término	GO:id	p valor ajustado			
		T	TN	TH	THN
Response to wounding	GO:0009611	<2,2E-16	<2,2E-16	<2,2E16	<2,2E-16
Vesicle-mediated transport	GO:0016192	<2,2E-16	1,48E-11	5,05E-13	1,68E-13
Wound healing	GO:0042060	<2,2E-16	<2,2E-16	<2,2E16	2,52E-13
Defense response	GO:0006952	n/a	n/a	n/a	1,11E-08
Cardiovascular system development	GO:0072358	n/a	1,50E-08	n/a	n/a
Blood vessel development	GO:0001568	1,19E-10	5,95E-09	1,87E-10	2,23E-08
Vasculature development	GO:0001944	n/a	1,25E-08	4,00E-10	4,32E-08
Immune response	GO:0006955	2,02E-11	2,08E-05	n/a	1,09E-07
Cellular response to transforming growth factor beta stimulus	GO:0071560	1,01E-07	1,87E-08	4,35E-07	2,73E-05
Phagocytosis, engulfment	GO:0006911	4,73E-04	2,68E-04	n/a	1,79E-04
Regulation of response to stress	GO:0080134	n/a	n/a	3,51E-05	2,50E-04
Regulation of vasculature development	GO:1901342	n/a	n/a	n/a	2,82E-04
Cellular oxidant detoxification	GO:0098869	2,36E-04	9,75E-05	1,68E-04	5,61E-04
Regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	GO:0017015	3,13E-03	n/a	2,58E-03	8,28E-03
Endothelial cell migration	GO:0043542	n/a	5,02E-03	n/a	1,48E-02
Response to nutrient levels	GO:0031667	1,29E-02	8,82E-03	2,90E-02	2,25E-02

Figura 31. Tabla de GOs extraída del análisis proteómico de las EVs derivadas de las distintas líneas de MSCs. Se muestran GOs relacionados con el desarrollo cardiovascular, angiogénesis y la respuesta al estrés, junto a su p valor ajustado para los diferentes tipos de EVs. Los GOs no detectados en alguna de las muestras se muestran en la casilla correspondiente de la tabla en color gris.

Finalmente, se analizó el contenido de miARNs de los diferentes tipos de EVs. Como se ha mencionado en la introducción, los miARNs son una de las moléculas presentes en

las EVs que más interés están suscitando en los últimos años. Dado que en análisis preliminares se observó una sobreexpresión de varios miARNs con efectos cardioprotectores en las MSC-TN y MSC-THN (Figura 26), se decidió investigar qué miARNs podrían estar siendo transportados en las EVs. Para ello, se realizó un ARNseq de los diferentes tipos de EVs y sólo se tuvieron en cuenta aquellos miARNs con un número superior a 100 conteos. En la Figura 32 se muestran el número de miARNs encontrados en cada uno de los grupos experimentales. Como se puede observar, la sobreexpresión de N1ICD incrementó drásticamente el número de miARNs identificados en EVs. Además, pudimos comprobar la presencia de todos los miARNs analizados en la Figura 26 tanto en TN-EVs como en THN-EVs, con la única excepción del miR-4732-5p. Entre los miARNs comunes a ambas poblaciones de EVs se identificó también la presencia de otros miARNs reconocidos por sus efectos beneficiosos en el contexto del daño cardíaco, tales como el miR-26b-5p [287], el miR-29b-3p [288,289], el miR-30d-5p [290–292], el miR-99a-5p [293,294], el miR-125b-3p [295–297], el miR-126-3p [298], el miR-146b-5p [299] y el miR-214-3p [300,301].

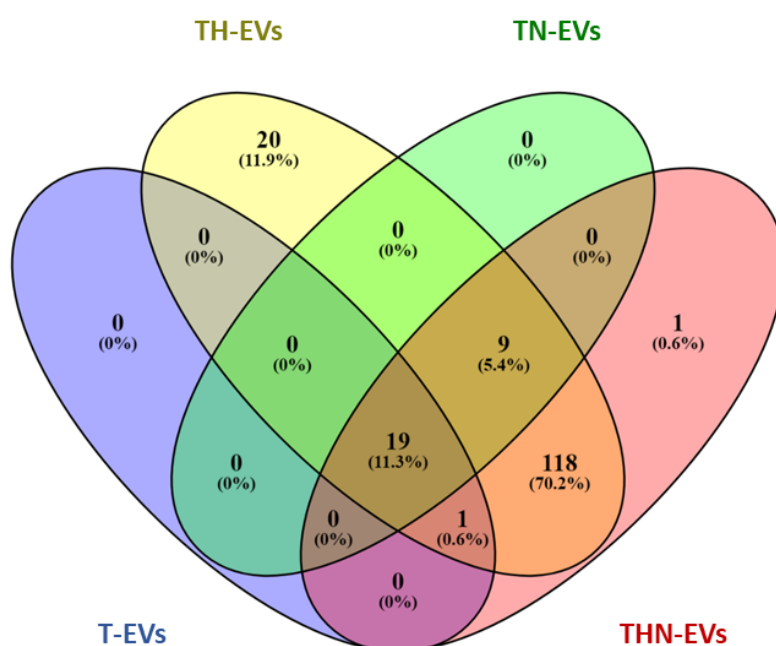


Figura 32. Diagrama de Venn de los miARNs encontrados en EVs derivadas de MSCs tras el miARNseq. Solo se han incluido los miARNs con más de 100 conteos tras su secuenciación.

A continuación, se analizaron los términos de GO de los miARNs identificados. Como se puede observar en la Figura 33, la sobreexpresión de N1ICD aumento términos relacionados con la diferenciación, proliferación y regeneración del músculo cardíaco. También se produjo un aumento en GOs relacionados con el aumento de la angiogénesis

y el desarrollo de la vasculatura coronaria. Como era de esperar, términos relacionados con la vía de Notch también aparecieron sobrerrepresentados en TN-EVs y THN-EVs. En relación con la fibrosis, aumentaron GOs antifibróticos como la regulación positiva del proceso apoptótico en fibroblastos o la regulación negativa de la diferenciación de miofibroblastos. Por último, también se vio un aumento en términos relacionados con la respuesta a la isquemia y al estrés celular, así como con la autofagia (Figura 33).

Término	GO: id	p valor ajustado			
		T	TN	TH	THN
cardiac muscle					
cardiac muscle tissue development	GO:0048738	3,24E-03	3,54E-13	1,90E-05	2,65E-11
cardiac muscle cell proliferation	GO:0060038	n/a	7,42E-13	2,46E-03	1,71E-10
negative regulation of cardiac muscle hypertrophy	GO:0010614	5,39E-01	3,27E-13	1,50E-01	1,56E-09
cardiac muscle cell differentiation	GO:0055007	1,93E-02	5,73E-06	1,12E-03	4,52E-05
cardiac muscle tissue regeneration	GO:0061026	2,29E-02	8,91E-07	1,24E-01	5,83E-04
angiogenesis					
angiogenesis	GO:0001525	2,75E-04	1,03E-23	8,41E-10	1,47E-23
positive regulation of angiogenesis	GO:0045766	3,77E-04	6,94E-20	1,80E-09	5,11E-19
sprouting angiogenesis	GO:0002040	3,13E-05	1,75E-16	2,18E-07	1,16E-14
positive regulation of sprouting angiogenesis	GO:1903672	1,15E-04	1,47E-09	1,56E-06	1,25E-08
angiogenesis involved in coronary vascular morphogenesis	GO:0060978	3,45E-01	2,93E-05	6,63E-03	8,74E-06
cell migration involved in coronary angiogenesis	GO:0060981	9,78E-04	2,06E-03	3,76E-04	9,89E-03
heart/notch					
heart development	GO:0007507	1,13E-03	1,97E-28	2,95E-09	1,11E-26
positive regulation of Notch signaling pathway	GO:0045747	2,46E-02	6,41E-22	3,87E-07	4,11E-20
Notch signaling pathway	GO:0007219	4,54E-03	7,34E-23	1,19E-08	5,15E-20
heart morphogenesis	GO:0003007	1,29E-04	1,98E-12	2,50E-04	8,32E-11
Notch signaling involved in heart development	GO:0061314	2,06E-01	7,48E-12	2,20E-02	7,07E-10
adult heart development	GO:0007512	2,42E-01	1,74E-04	6,66E-03	7,44E-05
fibroblast					
negative regulation of fibroblast proliferation	GO:0048147	7,07E-04	2,90E-11	1,13E-06	2,95E-12
positive regulation of fibroblast apoptotic process	GO:2000271	1,16E-01	3,73E-08	1,50E-01	6,01E-09
negative regulation of fibroblast growth factor receptor signaling pathway	GO:0040037	4,47E-02	9,65E-05	5,80E-03	9,71E-05
negative regulation of myofibroblast differentiation	GO:1904761	9,64E-02	2,94E-04	1,22E-01	1,01E-04
ischemia					
cellular response to decreased oxygen levels	GO:0036294	4,33E-03	2,62E-13	3,67E-05	1,06E-13
response to ischemia	GO:0002931	n/a	2,00E-15	1,95E-06	2,43E-13
cellular response to oxygen-glucose deprivation	GO:0090650	1,69E-01	4,94E-02	1,17E-02	3,66E-02
autophagy					
positive regulation of macroautophagy	GO:0016239	1,08E-03	1,74E-14	5,23E-05	1,37E-13
autophagy	GO:0006914	1,42E-03	8,26E-14	5,88E-04	4,93E-13
autophagy of mitochondrion	GO:0000422	3,71E-02	3,20E-13	5,80E-03	1,92E-11
positive regulation of autophagy in response to ER overload	GO:0034263	2,68E-01	3,87E-09	1,85E-01	9,08E-10
stress					
cellular response to reactive oxygen species	GO:0034614	2,80E-04	2,00E-15	2,93E-07	1,76E-15
negative regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway	GO:1902176	2,10E-02	2,95E-12	8,55E-03	3,87E-11
cellular response to oxidative stress	GO:0034599	1,17E-02	5,05E-12	5,85E-06	2,10E-09
vasculature/vascular					
positive regulation of vascular endothelial growth factor production	GO:0010575	1,52E-03	6,93E-13	3,20E-06	3,81E-12
vasculogenesis involved in coronary vascular morphogenesis	GO:0060979	2,29E-02	3,26E-11	1,70E-03	2,85E-08
positive regulation of vascular endothelial cell proliferation	GO:1905564	1,14E-02	2,73E-08	6,99E-06	4,05E-07

Figura 33. Tabla de GOs extraída del análisis de miARNseq de las EVs derivadas de las distintas líneas de MSCs. Se muestran GOs relacionados con la cardioprotección, regeneración tisular,

angiogénesis y fibrosis, junto a su p valor ajustado para los diferentes tipos de EVs. Los p valores no significativos ($> 0,05$) se muestran en la tabla en color gris.

En conjunto, los resultados mostrados en este apartado indican que las EVs derivadas de MSCs que sobreexpresan N1ICD podrían proporcionar un mayor beneficio terapéutico en enfermedades cardiovasculares. Además, estos resultados sugieren que la sobreexpresión adicional de HIF1A podría mejorar aún más este potencial terapéutico.

2.3 Las TN-EVs y THN-EVs reducen la expresión de marcadores de fibrosis en fibroblastos cardíacos estimulados

Una vez caracterizadas las nuevas líneas de MSCs y las EVs secretadas por las mismas, se procedió a comprobar el efecto de estas vesículas en HCF estimulados para diferenciarse a miofibroblastos. Esta diferenciación se consiguió incubando los HCF en el medio de estimulación descrito previamente durante 24 horas. Los diferentes tipos de EVs se añadieron al mismo tiempo y se dejaron actuar también durante 24 horas. Tras este tiempo, se analizó la expresión de genes relacionados con el proceso de fibrosis en HCF.

La estimulación de los HCF aumento la expresión de *NOTCH1* ($p < 0,001$) (Figura 34). La vía de señalización NOTCH ejerce una función antagónica con respecto a la vía de señalización del TGF- β . En consecuencia, este aumento en la expresión de *NOTCH1* podría considerarse un mecanismo celular inhibitorio que, al facilitar la activación a través de alguno de sus ligandos, contribuyera a la activación de la vía y, por ende, previniera la propagación de la fibrosis. Como se mostró en apartado anterior, las THN-EVs y las TN-EVs contienen cierta cantidad del ligando JAG1. Por lo tanto, existe la posibilidad de que estas vesículas puedan inducir una respuesta antifibrótica al interactuar con los miofibroblastos de esta manera.

Se analizó también la expresión de la α -actina de músculo liso (α -SMA; *ACTA2*) y de la proteína de activación de fibroblastos (*FAP*) marcadores típicos de miofibroblastos. La estimulación de los HCF condujo un aumento significativo de la expresión de *ACTA2* ($p < 0,001$). Posteriormente, el tratamiento de los HCF con las T-EVs produjo una ligera reducción en la expresión de *ACTA2* ($p < 0,05$). Sin embargo, los tratamientos con vesículas derivadas de MSC-TN y de MSC-THN lograron una reducción aún más significativa en la expresión de *ACTA2* ($p < 0,01$ en comparación con las células no tratadas y $p < 0,05$ en comparación con el tratamiento con T-EVs). En el caso de *FAP*, la estimulación de los HCF también condujo a un aumento no significativo de la expresión

($p = 0,07$). En este caso, el tratamiento con T-EVs no provocó ninguna disminución de la expresión. En cambio, el tratamiento con THN-EVs redujo la expresión de *FAP* ($p < 0,05$ con respecto a los HCF no tratados), como también lo hizo el tratamiento con TN-EVs ($p < 0,05$ con respecto a los HCF no tratados y los tratados con T-EVs) (Figura 34).

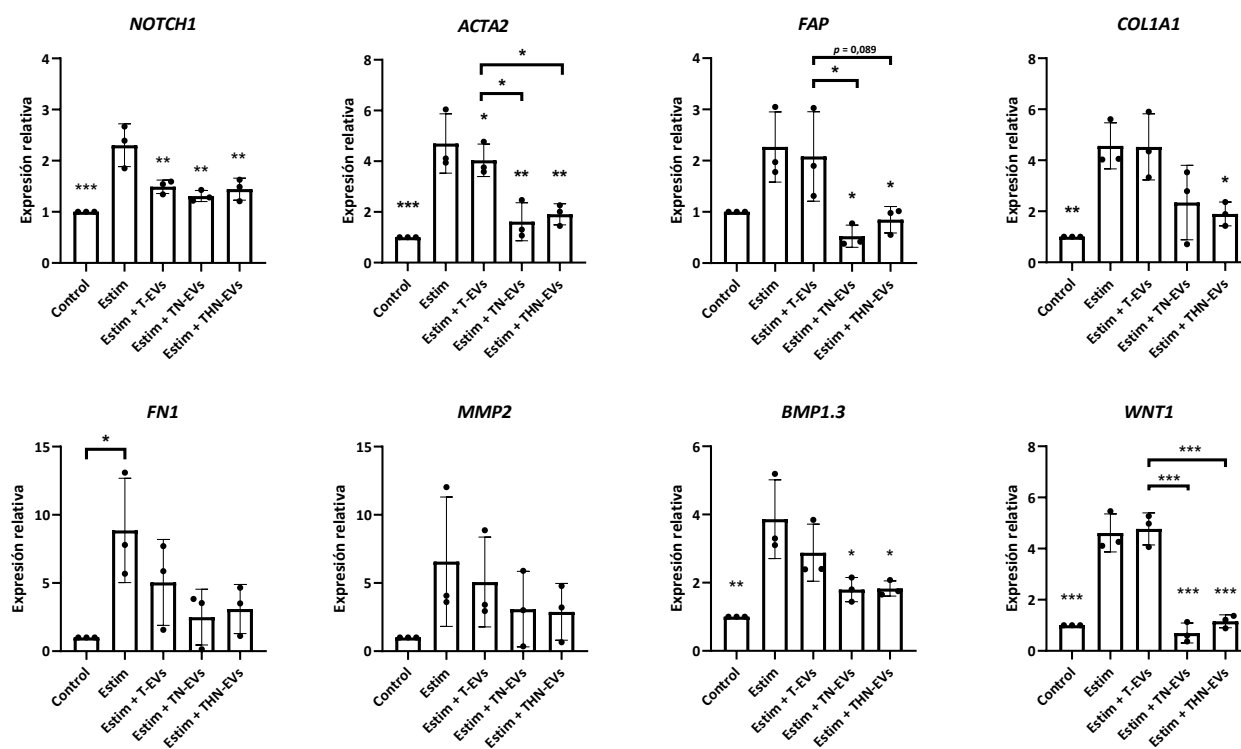


Figura 34. Expresión de genes relacionados con la fibrosis cardíaca en HCF. Expresión de genes profibróticos tras las estimulación con el cóctel pro-fibrótico (sulfato de dextrano, ácido ascórbico 2-fosfato, TGF- β 1) durante 24 horas, con o sin EVs. Los resultados se muestran como media $\pm$ SD normalizada frente a la condición Control (fibroblastos sin estimular). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Por otro lado, se comprobó la expresión de genes involucrados en el proceso fibrótico y de remodelado cardíaco como el colágeno 1 (*COL1A1*), la fibronectina (*FN1*), la metaloproteasa de matriz 2 (*MMP2*) y la proteína morfogénica ósea 1.3 (*BMP1.3*). La expresión de *COL1A1* aumentó tras la estimulación de los HCF ($p < 0,01$) pero solo se redujo significativamente con el tratamiento de THN-EVs ($p < 0,05$). La expresión de *FN1* también aumentó tras la estimulación de los HCF ($p < 0,05$), y aunque se observó una tendencia a la reducción con los tratamientos de TN-EVs y THN-EVs, no llegó a ser significativa. Lo mismo ocurrió en el caso de *MMP2*, donde los tratamientos produjeron

una reducción no significativa de su expresión. La expresión de *BMP1.3* en cambio sí se redujo tras el tratamiento con TN-EVs y THN-EVs ($p < 0,05$) (Figura 34).

Por último, se analizó la expresión de *WNT1*, la cual aumentó significativamente tras la estimulación de los HCF ($p < 0,001$). Sin embargo, el tratamiento tanto con TN-EVs como con THN-EVs resultó en una bajada drástica de su expresión ($p < 0,001$ en comparación con las células no tratadas y las tratadas con T-EVs) (Figura 34). Dado que la vía de WNT converge con la del TGF- β en el proceso de fibrosis cardíaca, la reducción de su expresión podría tener implicaciones terapéuticas beneficiosas

Además de la expresión de genes, también se quiso estudiar el efecto de las EVs sobre la transición de los HCF a miofibroblastos mediante inmunocitoquímica. Para esto, los HCF fueron incubados del mismo modo, en medio de estimulación durante 24 horas con o sin EVs. Tras esto se realizó una inmunocitoquímica para la detección y cuantificación de α -SMA. Como hemos mencionado anteriormente, la α -SMA es una proteína utilizada habitualmente como marcador de fibroblastos activados. En la Figura 35a se muestran imágenes representativas de cada condición experimental. La señal fluorescente de α -SMA se cuantificó midiendo la MFI por número de células (núcleos teñidos de azul usando DAPI, Figura 35b). La señal fluorescente de α -SMA apenas se observó en la condición control (medio FGM-3). Sin embargo, la MFI se elevó significativamente cuando los HCF fueron estimulados con el medio de estimulación profibrótico descrito previamente ($p < 0,001$). La MFI fue ligeramente menor en las células tratadas con T-EVs que en las células estimuladas ($p < 0,01$). En cuanto al tratamiento de las células HCF con TN-EVs y THN-EVs, se observó una reducción significativa de la MFI de α -SMA en comparación con las células estimuladas ($p < 0,001$) y también en comparación con las células tratadas con T-EVs ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente).

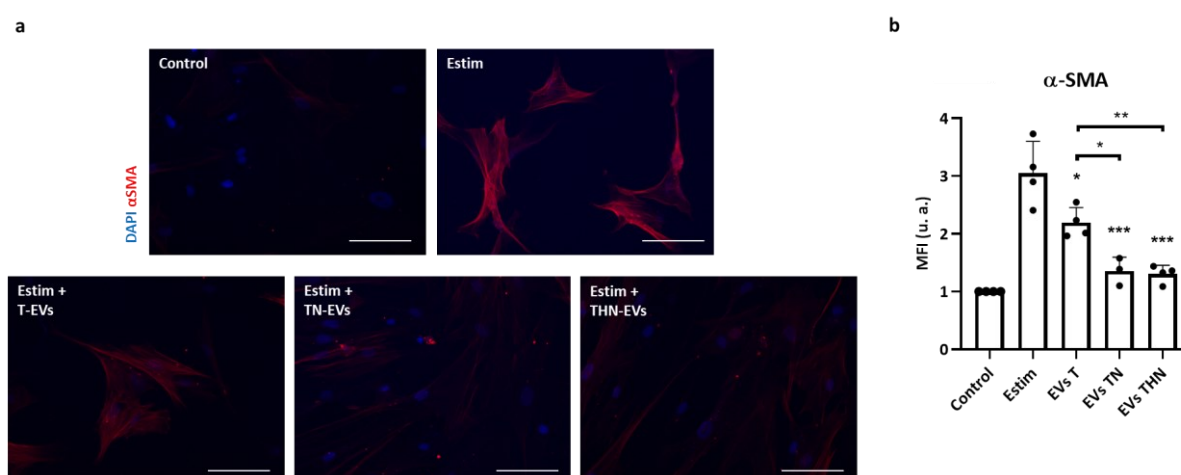


Figura 35. Las TN-EVs y THN-EVs reducen la expresión de α -SMA en fibroblastos cardíacos estimulados con TGF- β 1. (a) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de α -SMA en HCF tras su estimulación con el cóctel profibrótico (sulfato de dextrano, ácido ascórbico 2-fosfato,

TGF- β 1) durante 24 horas, con o sin EVs. Barra de escala = 50 μ m (b) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia. Cada punto representa un experimento independiente. Se muestra la media $\pm$ SD para cada condición normalizada a la condición control. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$

Los resultados obtenidos en este apartado indican que las EVs derivadas de MSC-T tienen una cierta capacidad intrínseca para mitigar la activación de los fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos tras la estimulación. Además, se observa que la sobreexpresión de N1ICD y N1ICD-HIF1A por parte de las MSC-T mejora el potencial terapéutico de las EVs en la inhibición del proceso fibrótico.

2.4 Las THN-EVs reducen la migración en fibroblastos cardíacos estimulados

Además de la producción excesiva de componentes de la ECM, el proceso fibrótico se caracteriza también por la invasión de miofibroblastos desde otras partes del tejido dañado. Por ello, se comprobó la capacidad de migración de los HCF mediante un ensayo de cierre de herida. Para llevar a cabo este ensayo, los HCF se incubaron en el medio de estimulación durante 24 horas con o sin EVs. Transcurrido este tiempo, se realizó una “herida” en los pocillos con una punta de pipeta y se fue monitoreando la migración de las células hasta el cierre de alguna de las condiciones. Se observó el cierre completo de la herida en HCF estimulados no tratados 24 horas después del inicio del ensayo. El tratamiento con TN-EVs redujo la migración de los HCF ($p < 0,05$). Esta reducción fue aún mayor cuando los HCF se trataron con THN-EVs ($p < 0,01$, Figura 36).

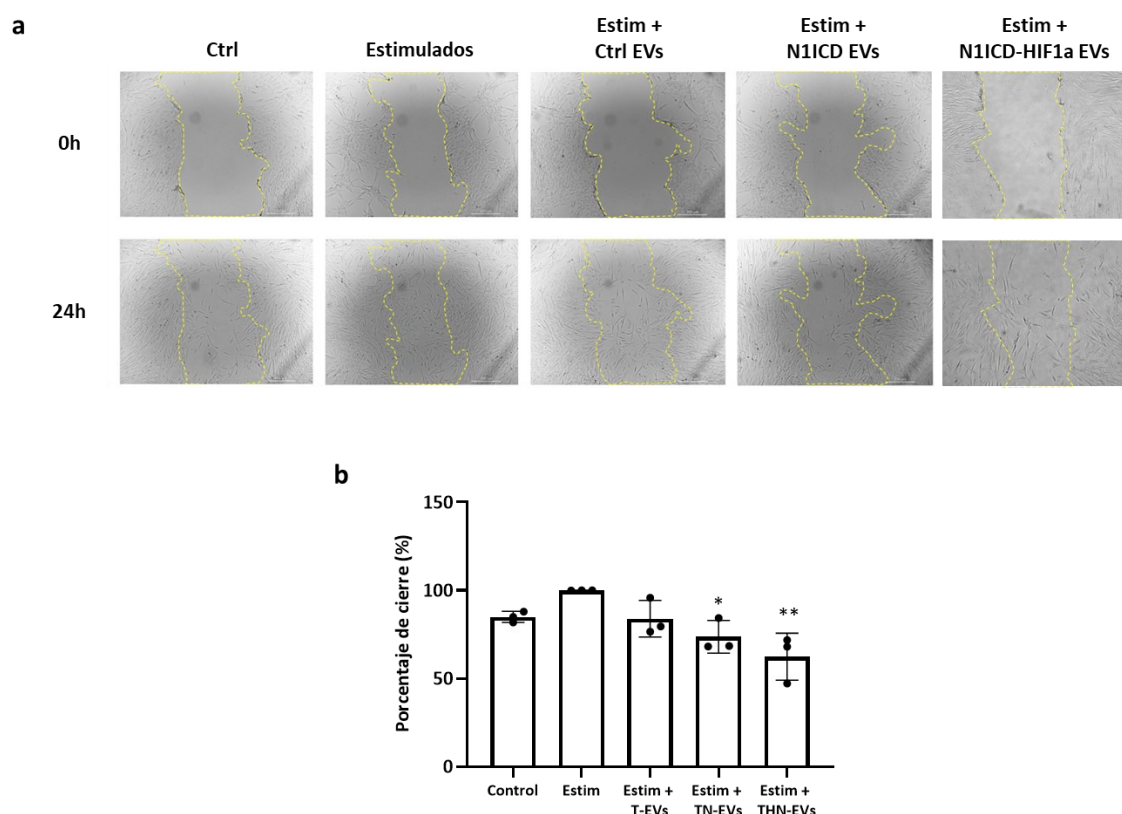


Figura 36. Las THN-EVs reducen la migración de HCF. (a) Imágenes representativas del ensayo de cierre de herida en HCF tras la estimulación con un cóctel pro-fibrótico. (b) Cuantificación de la migración mediante la medida del porcentaje de cierre a las 24 horas, calculado como área ocupada por células/área de herida inicial. Los valores se han normalizado frente a la condición de estimulación con el cóctel pro-fibrótico. Se muestra la media $\pm$ SD, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

2.5 Las THN-EVs protegen a los CM en un modelo *in vitro* de isquemia

Después de evaluar el impacto de las vesículas extracelulares en los fibroblastos, procedimos a llevar a cabo experimentos utilizando la línea de mioblastos de rata H9C2, ampliamente reconocida por su similitud con los cardiomiocitos.

Como se ha comentado en la introducción, los cardiomiocitos son células muy susceptibles a los niveles de oxígeno. Cuando se produce un daño por isquemia, se genera una zona necrótica como resultado de la muerte celular de estas células debida el estrés oxidativo que sufren. Para comprobar si los diferentes tipos de EVs presentaban potencial anti-apoptótico se realizaron dos ensayos de viabilidad de células H9C2 tratadas con EVs y sometidas OGD durante 7 horas. Cabe destacar que la línea de mioblastos de rata H9C2 se utiliza ampliamente en investigación debido a su similitud con los cardiomiocitos. Por una parte, se midió la actividad metabólica de las H9C2

mediante un ensayo con CCK-8 (Figura 37a). Por otra parte, se evaluó la integridad de la membrana plasmática mediante la cuantificación de la actividad de la enzima LDH presente en el medio (Figura 37b). En ambos ensayos, se observó un aumento de la viabilidad celular cuando se trataron las células con THN-EVs ($p < 0,05$). En el ensayo de CCK-8 también se observó un aumento significativo de la viabilidad al tratar las células con TN-EVs ($p < 0,05$).

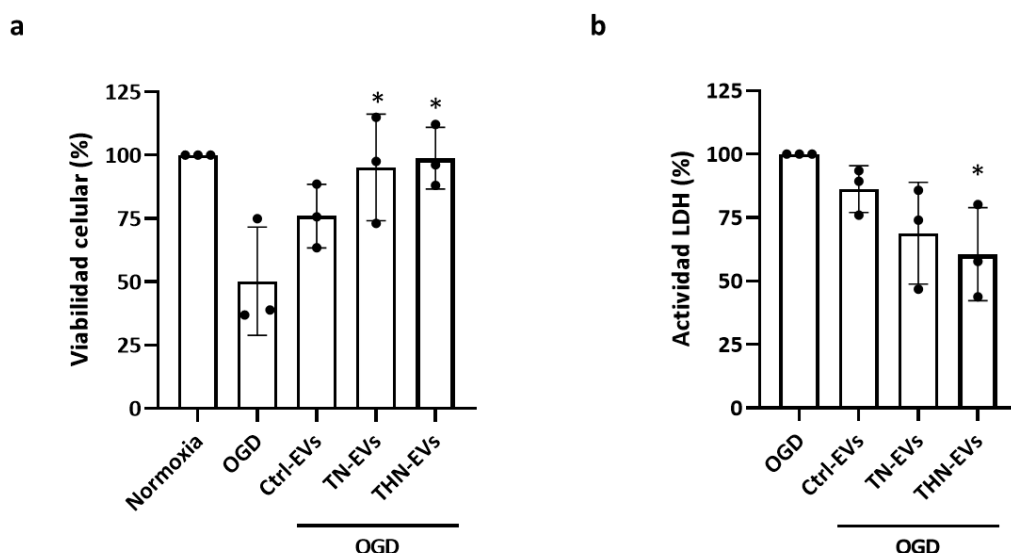


Figura 37. Las THN-EVs protegen a los cardiomiocitos frente al daño por OGD. (a) Viabilidad celular medida mediante el ensayo de CCK-8 en mioblastos de rata (células H9C2) tras 7 horas de OGD con/sin EVs. (b) Medida de la actividad LDH para evaluar indirectamente la integridad de la membrana plasmática de células H9C2 tras 7 horas de OGD con/sin EVs. Las gráficas muestran la media $\pm$ SD normalizada frente a la condición de normoxia. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$

Una vez demostrado que las THN-EVs protegían a las células del daño por OGD, se quiso indagar en los niveles de ROS generados durante el OGD. Para ello realizamos dos ensayos siguiendo siempre el protocolo anterior de mantener las células en OGD durante 7 horas con o sin la adición de EVs. En primer lugar, se realizó una tinción con DCFH-DA. El DCFH-DA (2'-7'-Diclorofluoresceína diacetato) es una molécula que, una vez incorporada a las células, se convierte en DCFH por la acción de las enzimas intracelulares. El DCFH es una molécula no fluorescente que, cuando se encuentra en presencia de ROS, experimenta una oxidación y se convierte en DCF, que es altamente fluorescente y nos permite cuantificar la producción de ROS intracelular. Como se puede observar en la Figura 38a y b, el protocolo de OGD aumentó los niveles de ROS, mientras que los tratamientos con las EVs lo disminuyeron, siendo significativo en el caso de las TN-EVs y THN-EVs ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente). Además, es importante destacar que la reducción de los niveles de ROS inducida por el tratamiento con THN-EVs también fue significativamente mayor en comparación con la condición tratada con T-EVs ($p < 0,05$).

Por otro lado, también se evaluó la producción de superóxido en las mitocondrias utilizando la tinción MitoSOX. Las mitocondrias desempeñan un papel crucial en los cardiomiocitos y son una de las partes de la célula más afectadas en condiciones de isquemia. Por tanto, se examinó el efecto de las diferentes EVs en la generación de superóxido en las mitocondrias durante el protocolo de OGD. Como se observa en la Figura 38c y d, la exposición de las células al protocolo de OGD sin tratamiento resultó en un significativo aumento en la producción de superóxido en las mitocondrias ($p < 0,01$). Sin embargo, los tratamientos con T-EVs y TN-EVs lograron reducir la generación de este superóxido mitocondrial ($p < 0,01$ en ambos casos). Finalmente, el tratamiento con THN-EVs disminuyó significativamente la cantidad de superóxido en las mitocondrias en comparación con las células sin tratamiento ($p < 0,001$) y con las células tratadas con T-EVs ($p < 0,05$). Además, es relevante señalar que los niveles de superóxido detectados después del tratamiento con THN-EVs fueron incluso inferiores a los observados en las células en condiciones normoxicas ($p < 0,05$), lo que indica un potente efecto antioxidante ejercido por estas vesículas extracelulares.

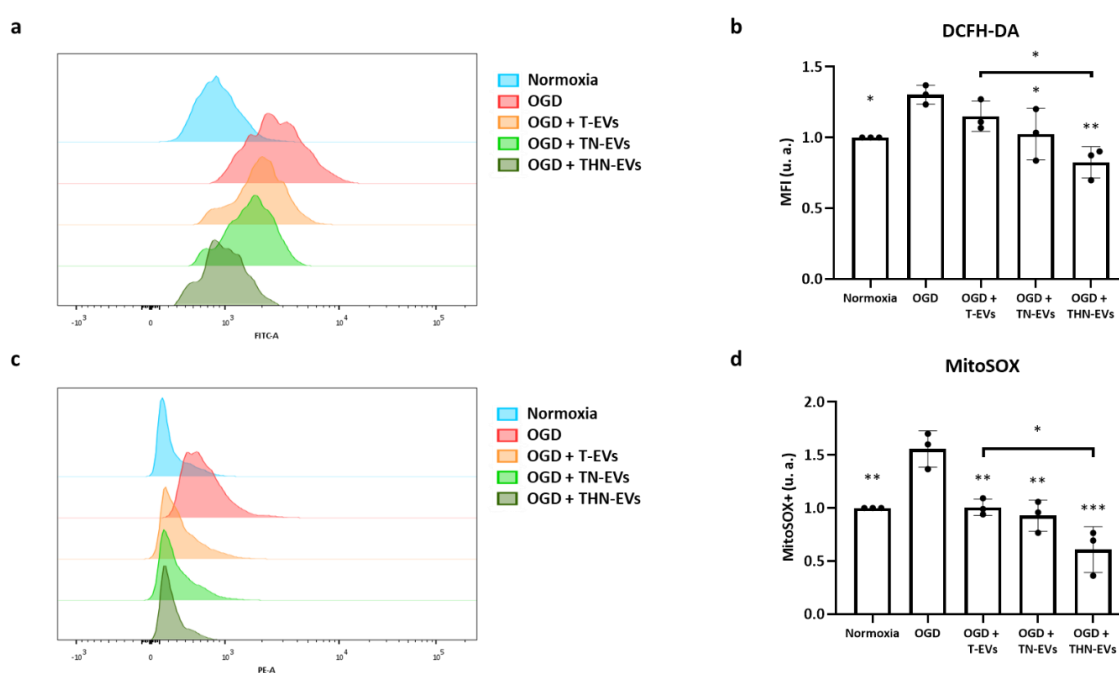


Figura 38. Las EVs reducen el estrés oxidativo provocado por OGD en cardiomiocitos *in vitro*. (a) Histogramas representativos de la citometría de flujo de células H9C2 teñidas con DCFH-DA tras 7 horas de OGD. (b) Valores de DCFH-DA (ROS intracelular) en células H9C2. (c) Histogramas representativos de la citometría de flujo de células H9C2 teñidas con MitoSOX tras 7 horas de OGD. (d) Valores de MitoSOX (superóxido mitocondrial) en células H9C2. Las gráficas muestran la media $\pm$ SD normalizada frente a la condición de normoxia. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs condición OGD.

En conjunto, los resultados presentados en este apartado sugieren un papel anti-apoptótico y antioxidante por parte de las THN-EVs sobre cardiomiocitos en isquemia. La capacidad de las THN-EVs para preservar la viabilidad celular y disminuir los niveles de ROS podría tener aplicaciones terapéuticas importantes en el contexto de enfermedades cardíacas isquémicas, donde preservar la viabilidad y la función de los cardiomiocitos es esencial para mitigar el daño cardíaco.

2.6 Las EVs derivadas de MSCs reducen los marcadores de hipertrofia cardíaca en un modelo *in vitro* de estimulación con Ang II

La hipertrofia patológica de los cardiomiocitos es una característica del remodelado cardíaco que conduce a la insuficiencia cardíaca, y se produce como respuesta al aumento de la tensión en la pared del ventrículo. Para evaluar el impacto de los diferentes tipos de EVs sobre la hipertrofia celular, se indujo la hipertrofia en las células H9C2 mediante la estimulación con angiotensina II (Ang II), seguida de la adición de las EVs y un período de incubación de 24 horas.

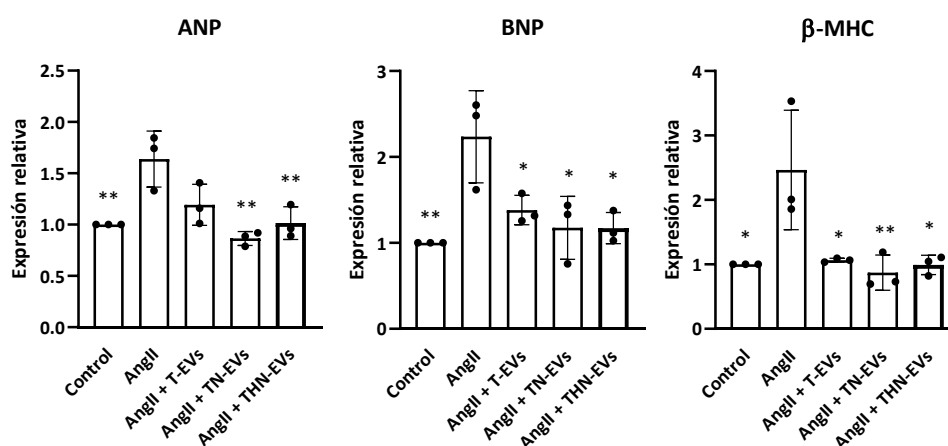


Figura 39. Las EVs reducen los marcadores de hipertrofia en cardiomiocitos *in vitro*. Las gráficas muestran la expresión relativa de los principales genes relacionados con la hipertrofia en cardiomiocitos: el péptido natriurético auricular (ANP), el péptido natriurético cerebral (BNP) y la cadena pesada de la miosina β (β -MHC), tras su exposición a angiotensina II (AngII, estímulo hipertrófico). Se representa la media $\pm$ SD normalizada frente a la condición AngII. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs condición OGD.

La Ang II es conocida por ser un potente inductor de la hipertrofia cardíaca y se utiliza ampliamente en estudios *in vitro* e *in vivo*. Después de este período de exposición a la Ang II, se analizó la expresión de tres marcadores clásicos de la hipertrofia cardíaca: el péptido natriurético auricular (ANP), el péptido natriurético cerebral (BNP) y la cadena pesada de la miosina β (β -MHC). Los resultados mostraron que la exposición a Ang II provocó un aumento significativo en la expresión de los tres marcadores (como se muestra en la Figura 39). El tratamiento con EVs redujo la expresión de todos estos marcadores, con la excepción de ANP en el caso del tratamiento con T-EVs, donde no se observó una reducción significativa en su expresión. En general, los tres tipos de EVs demostraron ser altamente efectivos para contrarrestar los efectos de la Ang II en la inducción de la hipertrofia celular, lo que sugiere un potencial terapéutico en el contexto de enfermedades cardíacas relacionadas con la hipertrofia.

2.7 Las THN-EVs aumentan la formación de tubos en células endoteliales *in vitro*

Un aspecto crucial en la reparación del tejido cardíaco dañado es la capacidad angiogénica de las células endoteliales presentes en el corazón. Para evaluar el potencial pro-angiogénico de los diferentes tipos de EVs, se llevó a cabo un ensayo funcional de formación de tubos. En este ensayo, se sembraron células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) sobre una capa de Matrigel. El Matrigel es una matriz extracelular derivada de células tumorales que se utiliza en investigaciones biológicas y experimentos *in vitro* para proporcionar un ambiente tridimensional que simula el tejido extracelular natural. En el contexto de la formación de tubos en células endoteliales, el Matrigel actúa como un sustrato que permite que estas células se organicen y formen estructuras tubulares similares a vasos sanguíneos.

Una vez sembradas las células se introdujeron en un incubador de hipoxia durante 9 horas con o sin la adición de EVs. De esta forma, evaluamos el potencial angiogénico de las EVs en una condiciones similares a las producidas en una cardiopatía isquémica, aunque, a diferencia de los experimentos anteriores con células H9C2, en este caso no se privó a las células de nutrientes durante el período de hipoxia. El motivo fue que las condiciones OGD en el caso de las HUVEC resultaron en una inhibición completa de la formación de estructuras tubulares.

Los resultados obtenidos, como se aprecia en la Figura 40, muestran un aumento significativo de la longitud total de los tubos, así como de los tubos totales en las células tratadas con TN-EVs y THN-EVs con respecto a las células no tratadas o tratadas con T-EVs. En cuanto a los puntos de ramificación, solo las THN-EVs lograron aumentarlos significativamente ($p < 0,01$ con respecto a las células no tratadas y las tratadas con T-EVs, y $p < 0,05$ con respecto a las células tratadas con TN-EVs). Lo mismo ocurrió con los

loops totales, donde solo las THN-EVs lograron producir un aumento significativo con respecto a la condición sin tratamiento ($p < 0,05$).

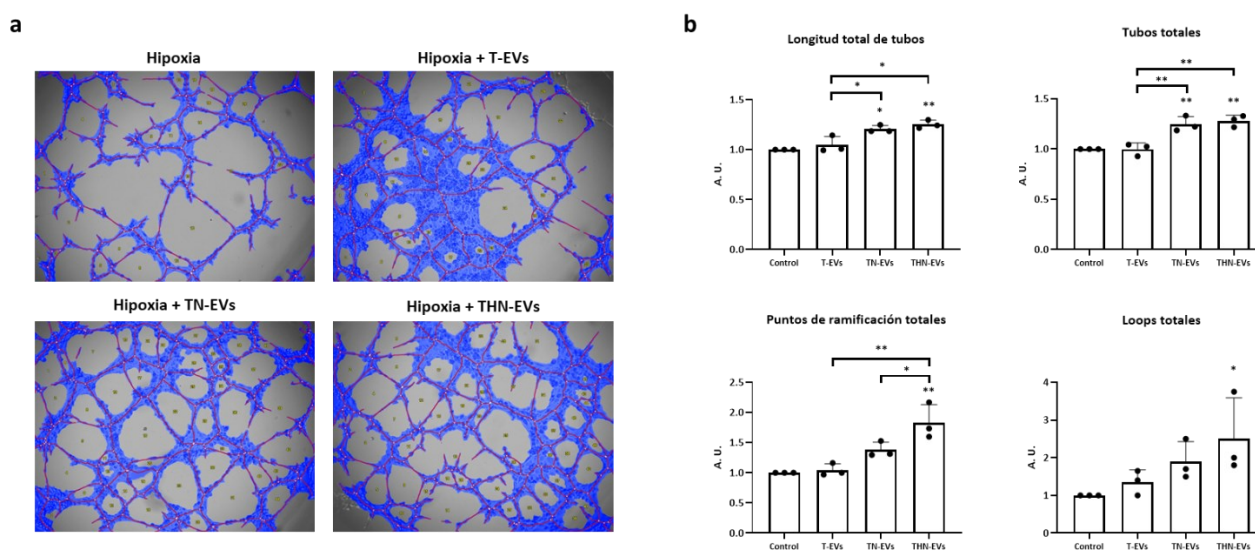


Figura 40. Las THN-EVs promueven la formación de tubos en células endoteliales *in vitro*. (a) Imágenes representativas del ensayo de formación de tubos sobre Matrigel utilizando células HUVEC en hipoxia. (b) Cuantificación de parámetros relacionados con el potencial angiogénico: longitud de tubos, tubos totales, puntos de ramificación totales y loops totales. Las gráficas muestran valores de media $\pm$ SD normalizados frente a la condición control (hipoxia). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de HIF1A, sumada la de N1ICD, en este caso sí es determinante a la hora de obtener un efecto pro-angiogénico más robusto en condiciones de hipoxia. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que las EVs enriquecidas con N1ICD y HIF1A pueden representar una herramienta terapéutica prometedora en el contexto de una enfermedad cardiovascular como la cardiopatía isquémica, donde la formación de nuevos vasos sanguíneos es esencial para la regeneración del tejido dañado.

2.8 Las THN-EVs reducen la fibrosis cardíaca en un modelo de infarto de miocardio de tipo 2 inducido por isoproterenol

Una vez evaluado el efecto *in vitro* de las THN-EVs, se pasó a inyectarlas en el modelo *in vivo* de daño cardíaco inducido por isoproterenol descrito previamente. El protocolo utilizado fue el mismo que en el caso de las MutOSM-EVs, que consiste en administrar

una dosis diaria de 150 mg/kg de isoproterenol durante 5 días, con inyección de EVs en el primer y séptimo día, y posteriormente realizar el sacrificio de los animales a los 21 días. Cabe mencionar que en los resultados también se incluyen los datos de los animales tratados previamente con ISO y con ISO + MutOSM-EVs para poder comparar el efecto de las EVs derivadas de MSC-THN en este contexto experimental.

Para analizar la fibrosis miocárdica, las secciones del corazón se tiñeron con Picrosirius rojo y se cuantificó el área de colágeno. En la Figura 41a se pueden observar secciones representativas de los diferentes grupos experimentales. El tratamiento de los ratones con las THN-EVs redujo significativamente el área fibrótica con respecto al grupo control ($p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el área de colágeno entre los ratones tratados con MutOSM-CD81-EVs y los tratados con THN-EVs (Figura 41b).

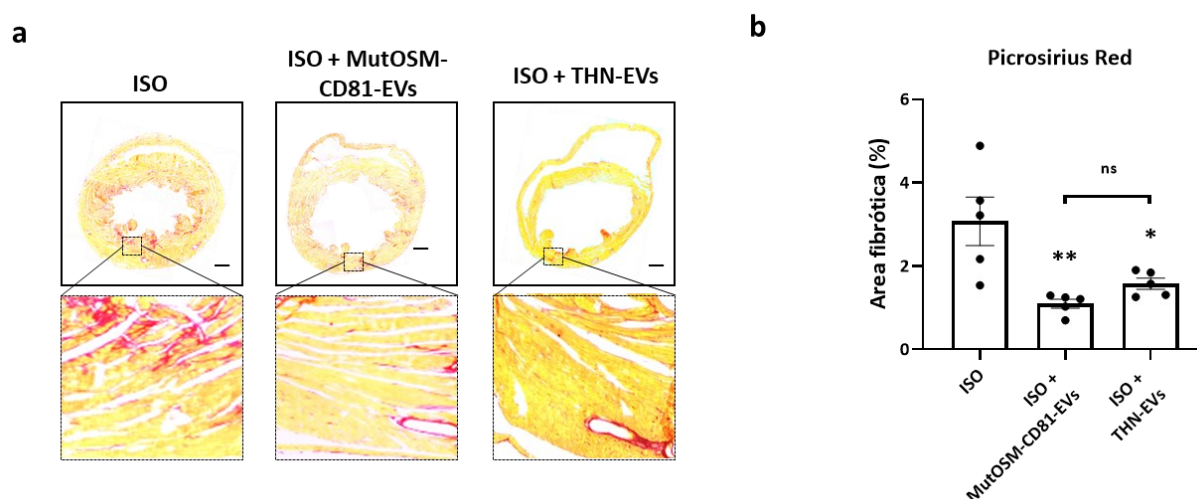


Figura 41. Las THN-EVs reducen la fibrosis cardíaca provocada por el tratamiento con ISO. (a) Imágenes representativas de la tinción de picrosirius rojo en corazones de ratones sometidos al modelo de daño por ISO. Barra de escala = 200 μ m. (b) Cuantificación del área fibrótica en secciones de corazón. Para cada animal se representa el porcentaje de área cubierta de colágeno en relación con el área total del corazón. Se han incluido los animales del grupo MutOSM-CD81-EVs a modo de comparativa. Para el análisis y cuantificación de las imágenes se utilizó ImageJ. Los datos se analizaron con ANOVA y la prueba post hoc de Tukey, utilizando valores del grupo ISO como referencia y representados como media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

2.9 Las THN-EVs reducen la hipertrofia cardíaca inducida por la infusión de isoproterenol

A continuación, se pasó a evaluar el efecto de las THN-EVs sobre la hipertrofia cardíaca patológica causada por la administración de ISO. Para ello, las secciones del corazón se tiñeron con WGA, como se describió previamente, con el fin de marcar las

membranas celulares y facilitar la cuantificación del área promedio de los cardiomiocitos (Figura 42). El tratamiento de los ratones con THN-EVs redujo drásticamente el área promedio de los cardiomiocitos ($p < 0,001$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los ratones tratados con MutOSM-CD81-EVs y los tratados con THN-EVs.

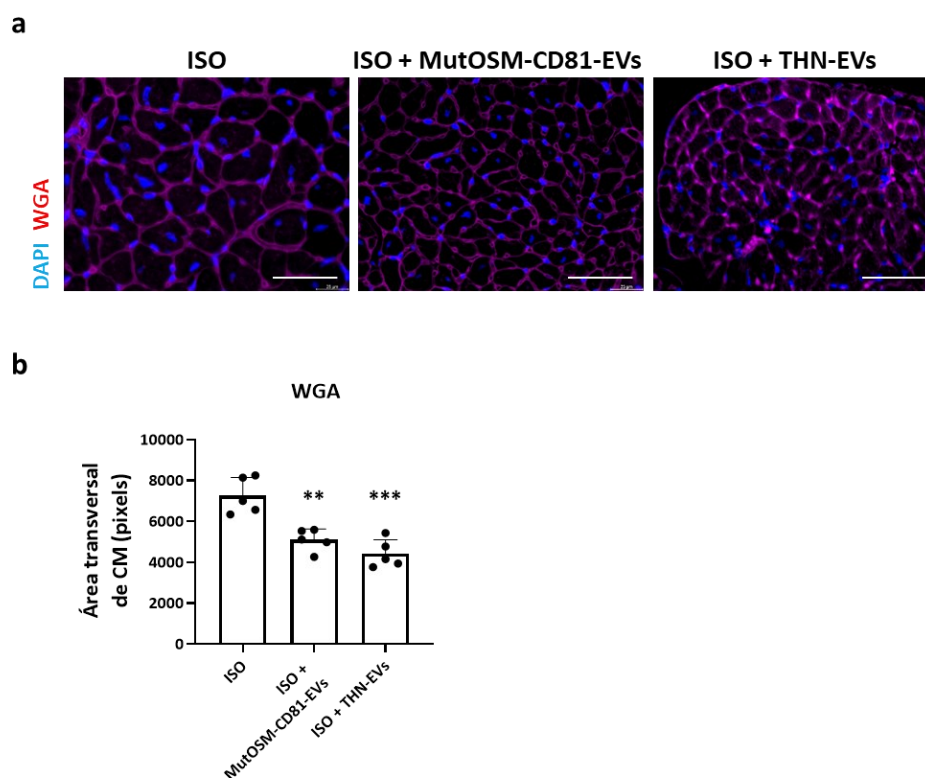


Figura 42. Las THN-EVs reducen la hipertrofia en los cardiomiocitos de los ratones tratados con isoproterenol. (a) Imágenes representativas de la tinción con aglutinina de germen de trigo (WGA) (en rojo) y la tinción de núcleos (DAPI, en azul) para cada grupo experimental. Barra de escala = 50 μ m. (b) Medición del área de sección transversal de los cardiomiocitos mediante tinción WGA en cortes de corazón de animales. Se incluyeron cinco animales en cada grupo. Se utilizó el software ImageJ para el análisis de las imágenes y la cuantificación colorimétrica y de fluorescencia. Los datos se analizaron con ANOVA y la prueba post hoc de Tukey se representan como media $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

2.10 Las THN-EVs aumentan la angiogénesis tras el daño cardíaco producido por el isoproterenol

Por último, se decidió analizar la densidad microvascular cardíaca, la cual se relaciona siempre con un mejor pronóstico tras sufrir daño cardíaco. Para ello se cuantificó la angiogénesis utilizando un anticuerpo contra CD31 (Figura 43). Los buenos resultados obtenidos en términos de angiogénesis *in vitro* con la THN-EVs, se replicaron en el modelo *in vivo*. Los ratones tratados con estas vesículas mostraron una mayor en comparación con el grupo control ($p < 0,001$).

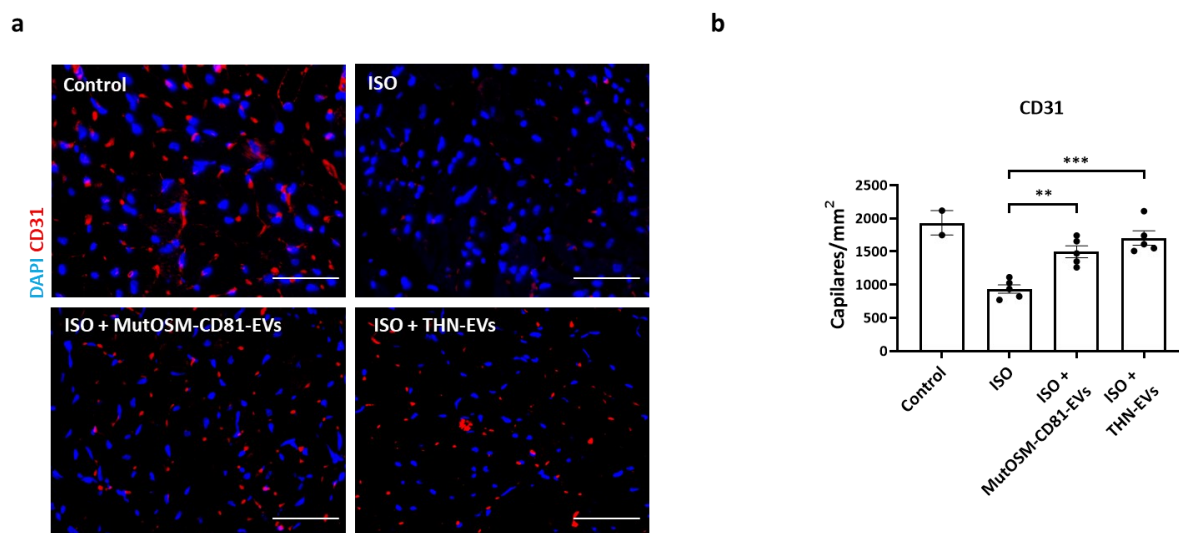


Figura 43. Las THN-EVs aumentan la angiogénesis en el modelo *in vivo* de insuficiencia cardíaca crónica inducida por isoproterenol (ISO). (a) Imágenes representativas de tinción con CD31 (en rojo) y tinción de núcleos (DAPI, en azul) para medir la microvasculatura. Barra de escala = 50 μm . (b) Cuantificación de la microvasculatura utilizando un anticuerpo contra CD31. Se contaron las estructuras teñidas circulares con un área de hasta 23,5 μm^2 . Se incluyeron cinco animales en cada grupo. Se utilizó el software ImageJ para el análisis de las imágenes. Los datos se analizaron con ANOVA y la prueba post hoc de Tukey y se representan como media $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

En conjunto, los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* con las THN-EVs ofrecen perspectivas prometedoras para su aplicación en el tratamiento de enfermedades cardíacas como la cardiopatía isquémica, reduciendo la fibrosis y la hipertrofia cardíacas y aumentando la angiogénesis y la densidad vascular de los corazones dañados.

Discusión

La cardiopatía isquémica es una afección cardíaca potencialmente mortal caracterizada por un aporte insuficiente de nutrientes y oxígeno al tejido cardíaco, llevando a la pérdida de miocitos cardíacos y a la disminución de la función cardíaca. Es una de las principales enfermedades cardiovasculares, pudiendo llegar a producir un IAM y siendo la etiología más común en el desarrollo de la IC [302]. La IC se estima que afecta a más de 60 millones de personas en todo el mundo y es particularmente frecuente en los países industrializados, donde tiene una prevalencia de entre el 3-5% de la población y genera altos costos tanto en diagnóstico como en el tratamiento de la misma [302,303].

Las terapias actuales para la IC se centran principalmente en el alivio de los síntomas y la mejora de la calidad de vida de los pacientes. Estas estrategias terapéuticas abarcan una variedad de enfoques, incluyendo el uso de medicamentos como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, betabloqueantes, diuréticos y antagonistas de la aldosterona. Estos fármacos desempeñan un papel fundamental en la reducción de la sobrecarga de volumen y presión en el corazón, lo que conlleva a un alivio de los síntomas de la insuficiencia cardíaca [304–306]. Además, en ciertos casos se recurre también a dispositivos médicos como marcapasos y desfibriladores para la terapia de resincronización cardíaca, o a dispositivos de asistencia ventricular, llegando a ser necesario el trasplante cardíaco en las situaciones más graves [304–306]. Sin embargo, a pesar de todas estas estrategias terapéuticas, la IC sigue siendo una afección que conlleva una alta morbilidad y mortalidad, y que a menudo suele ser progresiva y tender a agravarse. Por lo tanto, existe una necesidad apremiante de buscar nuevas terapias que aborden las causas subyacentes de la enfermedad y ofrezcan un enfoque más efectivo y duradero para el tratamiento de la IC, frenando su progreso y mejorando la función cardíaca.

En contexto, el uso de MSCs y, más concretamente, de sus EVs, se presenta como una opción terapéutica prometedora. Varios estudios han demostrado el papel de las EVs derivadas de MSCs en el tratamiento de diversas patologías cardíacas, entre ellas la cardiopatía isquémica y el IAM [131,209,307–309]. No obstante, el desafío que enfrenta la investigación actual en este campo radica en mejorar el potencial terapéutico de estas EVs, con el fin de hacer viable una terapia basada en las mismas en la práctica clínica. Para ello hay planteadas dos estrategias distintas. Por un lado, la mejora de la biodisponibilidad de las EVs en el tejido cardíaco ya sea mediante el uso de *scaffolds* [310] o hidrogeles [311] cargados con EVs, o dirigiéndolas mediante modificaciones en su superficie [312]. Por otro lado, la mejora de su capacidad terapéutica intrínseca mediante el preconditionamiento de las MSCs o su modificación genética [274,313]. En este sentido, nuestro grupo de investigación ya propuso varias modificaciones genéticas para mejorar el potencial terapéutico de las MSCs.

En primer lugar, MSCs de pulpa dentaria se immortalizaron mediante la sobreexpresión de hTERT. Las MSCs no se dividen de forma ilimitada y pierden características terapéuticas tras periodos prolongados de cultivo. Esto supone un hándicap a la hora de diseñar y estandarizar adecuadamente cualquier terapia basada en EVs secretadas por MSCs. La immortalización de las MSCs con hTERT ha sido también descrita por otros grupos como un método válido para eludir la senescencia y favorecer un mayor tiempo de cultivo sin alterar las características terapéuticas [314–316]. Por otro lado, nuestro grupo también estudió la sobreexpresión del factor HIF-1A en MSCs como método para aumentar el potencial angiogénico e inmunomodulador de sus EVs [207,274]. El preconditionamiento hipóxico de las MSCs ya había sido estudiado con anterioridad [317]. Sin embargo, la sobreexpresión de HIF-1A representa un avance significativo al activar selectivamente esta vía que mejora la capacidad terapéutica de las MSCs, sin involucrar otras vías perjudiciales que se activan en condiciones de hipoxia.

Partiendo de esta base, en este trabajo se propusieron dos estrategias para mejorar la capacidad terapéutica de las EVs derivadas de MSC, ambas involucrando la modificación genética de las mismas. Por un lado, cargar directamente OSM en la superficie de las EVs, y por otro, la sobreexpresión inducible de N1ICD en MSCs a modo de preconditionamiento genético, con la hipótesis de que las EVs resultantes estarán enriquecidas en factores terapéuticos que mejoren su eficacia frente a las EVs nativas en el contexto de la isquemia cardíaca.

1. MSC-EVs cargadas con OSM

La OSM es una citoquina de la familia de la IL-6 con efectos pleiotrópicos que pueden conducir a la desdiferenciación de los cardiomiocitos (CM) [245]. Este mecanismo proporciona una ventaja competitiva en un contexto de isquemia cardíaca, ya que el desensamblaje de los sarcómeros durante el proceso de desdiferenciación aumenta la resistencia del CM a la hipoxia. Por otro lado, la OSM está relacionada con la proliferación, la quimiotaxis y la formación de tubos en cultivos de células endoteliales microvasculares humanas [232–234], así como con la inhibición de la proliferación de fibroblastos cardíacos tras la estimulación que se produce después de una lesión [242,243]. De hecho, estudios en animales han demostrado que el tratamiento con OSM puede mejorar la función cardíaca [244]. Además, la interacción entre la OSM y la IL-6 en CM puede inducir una mayor cardioprotección y potenciar el efecto terapéutico de la OSM frente al remodelado cardíaco adverso [318]. Sin embargo, cabe señalar que, para lograr una terapia exitosa, es fundamental conseguir que la activación de la vía de señalización de la OSM sea temporal y que, además, la inducción de esta vía se produzca dentro de un rango fisiológico. Esto se debe a que la desdiferenciación persistente de los CM podría contribuir a una remodelación cardíaca adversa, subrayando así la importancia de una calibración precisa de los tratamientos basados en OSM [244]. Por

este motivo, se planteó la administración de EVs como una estrategia para activar transitoriamente la señalización OSM en el corazón. Partiendo de las MSC inmortalizadas que hemos comentado anteriormente, se buscó la expresión de OSM en la superficie de las MSC-EVs mediante la transducción lentiviral de variantes de OSM mutadas para ser resistentes a la escisión postraduccional por proteasas.

Las tetraspaninas CD63, CD9, TSPAN14 y CD81, así como lamp2b y el dominio C1C2 de la lactadherina, son proteínas comúnmente utilizadas para cargar carga en EVs. Trabajos previos mostraron que fusionar el dominio transmembrana (TM) de PDGFRB a TSPAN14, CD63 y CD81 era la forma más eficiente de dirigir y cargar proteínas en las EVs [280]. Finalmente, se decidió fusionar las variantes de OSM mutadas al dominio TM unido a su vez a CD81 (CD81TM). Esta fusión a CD81TM nos proporcionó una carga eficiente de las variantes de OSM las EVs derivadas de MSCs, además de asegurar su disposición en la superficie.

Experimentos previos, mostraron que la sobreexpresión de OSM en MSCs disminuía su tasa de proliferación. Por este motivo, se optó por el sistema inducible Tet-On para controlar la expresión de MutOSM-CD81, de MatOSM-CD81 y de CD81, y así activarla solo en el momento de la recolección de EVs. Por otro lado, los vectores lentivirales también incluyeron GFP para monitorizar la estabilidad de la línea transfectada a lo largo de los pases celulares. La caracterización morfológica no mostró diferencias entre los diferentes grupos de experimentales. Sin embargo, el análisis fenotípico de las EVs sí mostró que las muestras de MatOSM-CD81 y MutOSM-CD81 presentaban una pequeña proporción de EVs que portaban OSM en su superficie. Este resultado fue similar entre ambos grupos experimentales independientemente del spot (CD9, CD81 o CD63) donde fueran capturadas las EVs, indicando una eficiencia de carga de OSM similar entre MatOSM-CD81 y MutOSM-CD81. Por último, cabe destacar que ~50% de las EVs capturadas en el spot de CD63 y positivas para OSM, fueron también positivas para CD81 y CD9, indicando un mecanismo de clasificación preferencial en esta subpoblación de vesículas.

Como hemos mencionado anteriormente, la OSM se ha relacionado con un posible efecto antifibrótico tras un lesión cardíaca. Por lo tanto, procedimos a evaluar la función de las EVs que expresan OSM sobre los HCF. En primer lugar, verificamos la presencia de los receptores de la OSM en la superficie de HCF cultivados en condiciones de privación de nutrientes para inducir estrés celular. Observamos que la expresión de GP130 e IL31RA aumentó en un lapso de tan solo 30 minutos después de la privación de nutrientes, lo que sugiere que las EVs MatOSM-CD81 y MutOSM-CD81 podrían interactuar de manera efectiva con fibroblastos cardíacos estresados a través de los receptores de la OSM. De hecho, la capacidad de las EVs para interactuar con receptores de fibroblastos ya se había documentado en el contexto de exosomas derivados de líneas celulares cancerosas [319]. El estudio demostró que estos exosomas presentaban TGF- β en su superficie, el cual tenía la capacidad de interactuar con los receptores de

TGF- β en los fibroblastos, induciendo así su activación y su diferenciación a miofibroblastos *in vitro* [319]. Además, en otro estudio se observó que la expresión de GP130 se activa en el tejido miocárdico de ratas sometidas a un IAM tan solo un día después de la ligadura de la arteria coronaria, y esta activación se mantiene durante al menos dos meses después de la lesión [320]. Este hallazgo también sugiere que las EVs que contienen OSM en su superficie podrían interactuar con los receptores mencionados anteriormente *in vivo*.

A continuación, realizamos ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de las EVs cargadas con OSM para reducir la proliferación de fibroblastos y la deposición de ECM. Observamos que tanto las MatOSM-CD81-EVs como las MutOSM-CD81-EVs inhibían la proliferación celular y la secreción de telo-colágeno1 α 1 en HCF activados, indicando un efecto antifibrótico de las EVs cargadas con OSM. Por lo general, el análisis no reveló diferencias significativas en los efectos *in vitro* entre las MatOSM-CD81-EVs y MutOSM-CD81-EVs. Sin embargo, sí observamos una mayor reducción en la proliferación de los fibroblastos cardíacos en condiciones de privación de nutrientes cuando se trataron con MutOSM-CD81-EVs en comparación con MatOSM-CD81-EVs. En consecuencia, decidimos continuar con los estudios *in vivo* utilizando solo las MutOSM-CD81-EVs, con las CD81-EVs como control, siguiendo los principios de las 3Rs.

Iniciamos el estudio *in vivo* mediante la implementación del modelo de infusión de ISO con el propósito de inducir hipertrofia y fibrosis cardíaca. El isoproterenol es un agonista β -adrenérgico no selectivo que actúa estimulando los receptores β -adrenérgicos, lo que resulta en un aumento significativo de la frecuencia cardíaca. Este aumento sostenido de la frecuencia cardíaca genera un desequilibrio entre la demanda y el suministro de oxígeno y nutrientes al músculo cardíaco, lo que, en última instancia, conduce a la muerte y necrosis de los cardiomiocitos. Este modelo, basado en la administración de isoproterenol, es un enfoque ampliamente utilizado en investigaciones en modelos murinos [281–284]. Los efectos fisiopatológicos provocados por la infusión de isoproterenol reproducen en gran medida el contexto de un infarto de miocardio tipo 2 [284].

Para evaluar la fibrosis inducida por el modelo en el tejido cardíaco, procedimos a cuantificarla utilizando las tinciones de rojo Picrosirius y periostina. La periostina es una proteína secretada por los miofibroblastos, que se diferencian a partir de fibroblastos residentes activados en respuesta al estrés y en diversas condiciones patológicas del corazón. Estas condiciones abarcan desde el infarto de miocardio hasta la miocardiopatía dilatada. La periostina es liberada al medio extracelular y se acumula en las áreas de fibrosis y deposición de colágeno. Esto la convierte en un marcador altamente relevante para identificar la presencia de fibrosis cardíaca y, más específicamente, para detectar la activación de miofibroblastos [321–324]. La infusión de MutOSM-CD81-EVs demostró ser efectiva en la reducción de la fibrosis, lo cual concuerda con estudios previos que han destacado el papel de la OSM en la regulación

de la fibrosis y la degradación de la ECM en el contexto de la reparación cardíaca después de una lesión [242,325]. Asimismo, aunque en un contexto diferente, la presencia de OSM durante la curación de cicatrices queloides o hipertróficas también ha demostrado modular la secreción de componentes de la ECM y reducir la cicatrización excesiva [243]. Además, los animales tratados con MutOSM-CD81-EVs exhibieron una mayor densidad vascular en el tejido cardíaco en comparación con los animales control. Esto es coherente con investigaciones previas que han documentado un potente efecto angiogénico de la OSM en un contexto inflamatorio [232,326].

La administración de MutOSM-CD81-EVs en animales tratados con ISO también ejerció un efecto positivo sobre la hipertrofia cardíaca. Esto se evidenció mediante la cuantificación del área transversal de los CM, la cual resultó ser menor en los animales tratados que en los controles. Este resultado concuerda con los estudios mencionados previamente que demuestran la capacidad de OSM para mantener el estado desdiferenciado de los CM, evitando el aumento de su anchura y longitud, y, por ende, la distorsión de la arquitectura cardíaca [244,318]. Como hemos comentado, aunque la activación de las cascadas de señalización la OSM tiene un efecto protector en condiciones de estrés agudo, su activación crónica contribuye al desarrollo de insuficiencia cardíaca [25]. No obstante, la administración de MutOSM-CD81-EVs reduce el riesgo de una activación crónica de las cascadas de OSM, ya que la capacidad de las EVs para permanecer en los tejidos después de la infusión es limitada y el sistema inmunológico innato tiende a eliminarlas rápidamente [327], a menos que estén encapsuladas en matrices poliméricas [328,329]. Nuestros hallazgos respaldan la idea de que incluso un breve período de retención de EVs en la circulación es suficiente para inducir un cambio en la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo similar a M2, facilitando así la fase proresolutiva. Además, investigaciones anteriores han revelado que, en ratones, tanto los macrófagos cardíacos residentes como los peritoneales exhiben perfiles transcripcionales comparables, incluyendo la presencia de receptores de OSM, conocidos por su participación en la inducción de la angiogénesis [238,330]. Por lo tanto, la administración intraperitoneal de MutOSM-CD81-EVs también podría estar ejerciendo el papel cardioprotector observado interactuando con macrófagos peritoneales.

Cabe mencionar que, aunque el tratamiento con CD81-EVs y Ctrl-EVs redujo la acumulación de *telo-colágeno1 α 1* *in vitro*, no observamos un efecto antifibrótico significativo *in vivo*, ni tampoco un aumento de la angiogénesis con estas vesículas. Sin embargo, investigaciones previas han demostrado las propiedades antifibróticas y proangiogénicas de las MSC-EVs nativas en el contexto de la isquemia miocárdica [148,307,309,310,331]. La utilización de una dosis más baja en el presente estudio, así como la vía de administración, podrían explicar estas discrepancias y subrayar la eficacia de la estrategia propuesta para aumentar el potencial terapéutico de las MSC-EVs.

A pesar de estos prometedores resultados, existen algunas limitaciones de este estudio que deben tenerse en cuenta. En primer lugar, no realizamos estudios de biodistribución, lo que limita nuestra capacidad de sacar conclusiones sobre la localización y distribución de las EVs *in vivo*. Además, nuestro análisis histológico de macrófagos M1/M2 en tejido cardíaco no nos permitió diferenciar entre macrófagos cardíacos residentes y aquellos que se infiltran a partir de monocitos circulantes. En consecuencia, no podemos determinar de manera concluyente si la vía de señalización de la OSM se activa mediante la interacción directa de las MutOSM-EVs con células del tejido cardíaco, como CM o células endoteliales, o mediante la activación de macrófagos peritoneales que puedan servir como mediadores primarios del proceso reparativo. En conclusión, generamos una línea celular MSC genéticamente modificada capaz de liberar EVs que expresan proteínas OSM funcionales en su superficie, lo que puede promover procesos de restauración cardíaca. Estos hallazgos podrían guiar el desarrollo de estrategias refinadas relacionadas con MSC-EVs para la reparación cardíaca.

2. EVs derivadas de MSCs que sobreexpresan N1ICD y HIF1A

En esta segunda parte del trabajo nos hemos centrado en la mejora de las EVs mediante la activación de la vía de Notch en las células MSC parentales, ya que es una de las principales rutas de señalización implicadas en la reparación y regeneración del tejido cardíaco [332,333]. Esta vía se ha relacionado con la regulación de procesos clave para la salud cardíaca, incluyendo la modulación de la proliferación y diferenciación celular, la angiogénesis, la regulación de la respuesta inflamatoria y la formación de tejido cardíaco funcional en lugar de tejido cicatricial [332,333]. Para ello, sobreexpresamos el dominio intracelular de Notch1 (N1ICD), que es la forma activa del receptor, en MSC-T. Además, apoyados en la evidencia previa de nuestro laboratorio y en la convergencia de las vías de Notch y HIF en diferentes contextos [334–336], decidimos llevar a cabo un enfoque más integral y generamos otra línea celular con la sobreexpresión de ambas proteínas. El objetivo de la activación de ambas vías era lograr un efecto sinérgico que nos permitiera obtener EVs potencialmente más efectivas en el contexto de la protección y la reparación cardíaca.

El punto de partida de este trabajo, por tanto, fue generar las líneas MSC-TN, MSC-TH y MSC-THN. Para la sobreexpresión de *N1ICD* se utilizó un promotor Tet-On, lo que brinda la oportunidad de expandir las MSCs sin que esta modificación pueda interferir en el desarrollo normal de las células. Una vez generadas las líneas, comprobamos que la expresión de los genes *HEY1* y *HEY2*, dianas de Notch [337], estaba aumentada en MSC-TN y MSC-THN, indicando que la sobreexpresión de *N1ICD* reproducía la función biológica del receptor. Además, se observó un incremento en la expresión de los genes

SOX2, *CXCR4*, *JAG1* y *NRF2*. *SOX2* es un factor de transcripción esencial en células madre embrionarias y desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la pluripotencia y la auto-renovación de estas células. En el contexto de las MSCs, la expresión de *SOX2* ha sido objeto de investigación debido a su contribución a la plasticidad y las propiedades regenerativas de estas células. Se ha observado que la sobreexpresión de *SOX2* en MSCs está asociada con una mayor capacidad de autorrenovación y diferenciación en diversos linajes celulares, lo que amplía su potencial terapéutico en aplicaciones regenerativas [338,339]. La expresión de *CXCR4* en MSCs es de gran importancia, especialmente en el contexto de la reparación cardíaca, donde se ha asociado con efectos cardioprotectores, antifibróticos y pro-angiogénicos [340,341]. Sin embargo, uno de los aspectos claves de *CXCR4* es el papel central que desempeña en la migración y homing de las MSCs hacia el tejido cardíaco. Su interacción con el ligando natural, CXCL12 (también conocido como SDF-1), secretado en el tejido dañado, guía a las MSCs hacia el lugar donde se requiere reparación [341]. Esta capacidad de migración también se observó en las EVs derivadas de células progenitoras cardíacas que sobreexpresaban *CXCR4*, donde la presencia de *CXCR4* dirigió específicamente a las EVs hacia el lugar de infarto, destacando así su papel crucial en la terapia regenerativa cardiovascular [342]. *JAG1* es el ligando predominante de Notch en el corazón adulto y se ha visto que aumenta en el tejido cardíaco en condiciones de estrés [343]. En un estudio se demostró que la sobreexpresión de *JAG1* atenúa la hipertrofia cardíaca y la fibrosis en un modelo animal de sobrecarga de presión mediante constricción de la aorta transversa [344]. Por otra parte, el factor *NRF2* es un conocido regulador de la síntesis de proteínas antioxidantes, cuya expresión se ve incrementada rápidamente ante un estrés oxidativo, tanto endógeno como exógeno [345]. En resumen, el aumento en la expresión de *SOX2* y *CXCR4* en las MSC-THN sugiere que éstas podrían mantener de manera más efectiva sus características troncales y dirigir sus EVs hacia la zona dañada del corazón. Por otro lado, el incremento en la expresión de *JAG1* y *NRF2* en las MSC-THN sugiere que estas células podrían exhibir un mayor efecto cardioprotector y antioxidante en comparación con las MSC-T.

En los últimos años, numerosas investigaciones se han centrado en el estudio de los miARNs como posibles marcadores de daño cardíaco. Los miARNs forman parte del cargo de las EVs y se ha demostrado que pueden ejercer un papel en el remodelado cardíaco, la hipertrofia, la fibrosis o la disfunción cardíaca [346]. Por este motivo, además de caracterizar las MSC-THN mediante un análisis de la expresión génica, se evaluaron posibles cambios en la expresión de algunos de los miARNs descritos como cardioprotectores. Se observó un incremento significativo en la expresión del miR-30c-5p, miR-92a-5p, miR-92b-3p, miR-150-5p, miR-192-5p y miR-4732-3p. La sobreexpresión del miR-30c-5p se ha asociado con la protección frente al daño por I/R mediante la activación de *NRF2* y la supresión de la piroptosis [347,348]. Los miR-92a-5p y miR-92b-3p se han relacionado con la reducción del estrés oxidativo [349] y de la hipertrofia [350] en CM, respectivamente. El miR-150-5p ha sido asociado con la atenuación de la remodelación cardíaca adversa [351] y la protección de los CM frente

a la apoptosis [352] tras un IAM, y la inhibición de la activación de los fibroblastos cardíacos en un modelo de fibrosis por sobrecarga de presión [353]. En cuanto al miR-192-5p, *Li et al.* demostraron que el potencial anti-fibrótico de EVs derivadas de MSC de tejido adiposo se debía, en parte, al alto contenido en miR-192-5p que presentaban estas EVs [354]. De esta forma, el miR-192-5p actuaría reduciendo la expresión de proteínas pro-fibróticas en fibroblastos activados. Respecto al miR-4732-3p, nuestro grupo de investigación demostró que la administración de este miARN mejora la función cardíaca y reduce el tamaño de la zona infartada en un modelo de infarto de miocardio en rata [355]. Por último, cabe mencionar que, aunque las diferencias no fueron significativas en el caso de los miR-30b-5p y miR-148a-3p, sí se observó una clara tendencia hacia el aumento de la expresión de los por parte de las MSC-THN. Estos miARNs han sido relacionados en varios estudios con la mejora de insuficiencia cardíaca, la cardioprotección y la reducción de la fibrosis [356–358]. Como comentamos en la introducción, los mecanismos de clasificación exosomal son complejos y específicos; no obstante, la carga pasiva también supone un porcentaje importante del contenido de las EVs. Por este motivo, el incremento de la expresión de los genes anteriormente mencionados y de estos miARNs nos sugirió que las EVs provenientes de las MSC-THN podrían estar cargadas de proteínas y miARNs cardioprotectores.

Una vez obtenidas EVs de los diferentes grupos experimentales se pasó a su caracterización. El análisis morfológico no reveló diferencias entre las diferentes EVs, en cambio, su análisis fenotípico sí mostró diferencias como la presencia de JAG1 en la superficie de las THN-EVs y TN-EVs. Una pequeña fracción de las TH-EVs también mostró la presencia del ligando en su superficie, una observación que ya había sido descrita por nuestro grupo y que se asoció con el aumento de la angiogénesis inducido por este tipo de EVs [207]. No obstante, el porcentaje de EVs positivas para JAG1 no fue mayor en las MSC-THN en comparación con las MSC-TN, lo que sugiere que la sobreexpresión de N1ICD es el principal contribuyente a la presencia de JAG1 en las EVs. Este resultado también se correlaciona con la elevada expresión de JAG1 observada en las MSC-TN y MSC-THN en comparación con las MSC-T y MSC-TH. El análisis proteómico identificó un total de 56 proteínas comunes para los cuatro grupos experimentales, con 17, 9, 7 y 11 proteínas únicas para los grupos T-EVs, TH-EVs, TN-EVs y THN-EVs, respectivamente. Aunque el análisis individual de los GOs de las proteínas identificadas no reveló diferencias significativas, se observaron ciertos GOs como "Cardiovascular system development", "Vasculature development" o "Endothelial cell migration" sobreexpresados en las EVs de MSC-TN y MSC-THN en comparación con las MSC-T EVs. Además, algunos GOs, como "Regulation of response to stress", solo aparecieron en EVs después de la sobreexpresión de HIF1A, tanto en las MSC-TH EVs como las MSC-THN EVs. Por el contrario, el análisis de miARNseq de las diferentes EVs, sí mostró un claro enriquecimiento en miARNs relacionados con la protección y reparación cardíaca. En primer lugar, pudimos confirmar la presencia en las TN-EVs y THN-EVs de los miARNs analizados previamente que aparecían sobreexpresados en las MSC-TN y MSC-THN

(exceptuando el miR-4732-3p). Entre los miARNs comunes a ambas poblaciones de EVs pudimos identificar también la presencia de otros miARNs reconocidos por sus efectos beneficiosos en el contexto del daño cardíaco, tales como el miR-26b-5p [287], el miR-29b-3p [288,289], el miR-30d-5p [290–292], el miR-99a-5p [293,294], el miR-125b-3p [295–297], el miR-126-3p [298], el miR-146b-5p [299] y el miR-214-3p [300,301]. Esto se tradujo en un aumento de los términos de GO relacionados con la diferenciación, proliferación y regeneración del músculo cardíaco en las EVs tras la sobreexpresión de N1ICD. También se produjo un aumento en términos relacionados con el aumento de la angiogénesis y el desarrollo de la vasculatura coronaria. Como era de esperar, términos de GO relacionados con la vía de Notch también aparecieron sobrerrepresentados en TN-EVs y THN-EVs. En relación con la fibrosis, aumentaron términos anti-fibróticos como la regulación positiva del proceso apoptótico en fibroblastos o la regulación negativa de la diferenciación de miofibroblastos. Por último, también se vio un aumento en términos relacionados con la respuesta a la isquemia y al estrés celular. En conjunto, estos resultados subrayan el impacto de la modificación genética con N1ICD y HIF1A en la composición proteica de las EVs y en su contenido de miARNs, apuntando a un potencial incremento de la capacidad terapéutica de las THN-EVs en el contexto de la regeneración cardíaca.

Una vez caracterizadas las EVs, se procedió a evaluar su impacto en los principales tipos celulares del corazón, llevando a cabo diversos experimentos en HCF, CM y células endoteliales. En el caso de los HCF, estudios previos han demostrado el efecto anti-fibrótico de las EVs derivadas de MSC [359–361]. Algunos investigadores han planteado diversas estrategias para potenciar este efecto, como el acondicionamiento de las MSC [362,363] o la incorporación de las EVs en hidrogeles [364]. En este trabajo hemos comprobado que las EVs derivadas de MSC-TH y MSC-THN provocan cambios en la expresión de genes implicados en fibrosis en HCF. En primer lugar, pudimos observar que, tras la estimulación con TGF- β , los fibroblastos cardíacos aumentaban la expresión de *NOCTH1*. La interacción entre la vía de Notch y del TGF- β ha sido ampliamente descrita [365,366], por tanto, este aumento concuerda con un intento por parte de la célula por frenar la sobre-activación de la vía del TGF- β y regular el proceso fibrótico. Por otra parte, la aplicación de EVs a fibroblastos estimulados disminuyó la expresión de marcadores clásicos de fibrosis como la proteína de activación de fibroblastos, *FAP*, y el α -SMA, *ACTA2*. En el caso del α -SMA, la reducción de su expresión se comprobó también mediante inmunofluorescencia. Las EVs redujeron también la expresión de *WNT*. La vía de Wnt converge con la vía de TGF- β , como han demostrado varios estudios [367,368], de manera que su reducción también disminuiría la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. Las EVs de MSC-THN también promovieron una disminución de la expresión de proteínas relacionadas con la ECM, como el colágeno de tipo I, principal componente de la ECM [369], la metaloproteasa MMP2 y la BMP1.3, encargadas del correcto entrecruzamiento de los colágenos [370], y la fibronectina, que participa en la deposición del colágeno [371]. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de N1ICD

en MSCs da lugar a EVs más eficaces a la hora de reducir la producción exacerbada de ECM característica del proceso fibrótico y del remodelado cardíaco.

Otra de las particularidades de la fibrosis miocárdica es la migración e invasión por parte de miofibroblastos de tejido no dañado ni inflamado. Este fenómeno conocido como fibrosis reactiva contribuye a la expansión de la fibrosis por todo el miocardio y dista de aquel conocido como fibrosis de reemplazo donde lo que se busca es mantener la integridad del corazón mediante el reemplazo únicamente del tejido necrótico por fibroblastos. El resultado de esto es una mayor disminución en las propiedades electromecánicas del corazón, ya que los fibroblastos no se contraen y, además, producen alteraciones en la transmisión del impulso eléctrico [372]. Para estudiar el efecto de las EVs en este contexto, se utilizó un ensayo de cierre de herida, donde evaluamos la capacidad migratoria de HCF activados. En este caso la aplicación de THN-EVs sí resultó ser más efectiva que la de TN-EVs, frenando de manera significativa la migración de los HCF, lo que se podría interpretar como una disminución de la expansión de la fibrosis a lo largo del corazón.

Como se ha explicado previamente, la isquemia miocárdica surge debido a un desequilibrio entre el suministro y la demanda de oxígeno y nutrientes en el tejido cardíaco, lo que conduce a la muerte de los CM por la acumulación de ROS, entre otros factores. Para evaluar el efecto de las EVs en este contexto, realizamos dos ensayos para examinar su impacto en nuestro modelo de isquemia (OGD) utilizando células H9C2. Los resultados obtenidos muestran que las THN-EVs aumentaron la supervivencia y preservaron el metabolismo energético de las H9C2, sugiriendo un efecto cardioprotector frente al daño causado por la isquemia. Además, las THN-EVs redujeron de manera más efectiva la producción de ROS y superóxido mitocondrial en estas células. Este efecto antioxidante se respalda con los resultados obtenidos anteriormente, donde los términos relacionados con la actividad antioxidante aparecían sobreexpresados en estas EVs en el análisis proteómico y el miARNseq.

Uno de los aspectos claves del remodelado ventricular es la hipertrofia cardíaca que se origina para compensar la sobrecarga de presión que sufre el ventrículo izquierdo. En este escenario, la AngII actúa como estímulo hipertrófico, induciendo la producción de ROS en CM y activando la transcripción de factores relacionados con la hipertrofia [373]. Como se ha comentado anteriormente, hay estudios que demuestran que el aumento de JAG1 en el corazón tiene un papel cardioprotector y anti-hipertrófico [344]. Teniendo en cuenta que las EVs derivadas de las MSC-TN y MSC-THN presentaban este ligando en su superficie, presuponíamos que éstas podrían ejercer un efecto anti-hipertrófico mayor que el demostrado por las EVs de MSC [374]. Para ello, empleamos el modelo *in vitro* de inducción de hipertrofia mediante AngII. La aplicación de las TN-EVs y THN-EVs logró reducir de manera significativa la expresión de los marcadores característicos de hipertrofia *ANP*, *BNP* y *β -MHC*. Cabe señalar que, en este caso, los tres tipos de EVs mostraron una gran eficacia a la hora de reducir estos marcadores. De hecho, las T-EVs

también redujeron significativamente la expresión de *BNP* y *β -MHC*, lo que sugiere la necesidad de ajustar la dosis a un nivel más bajo para poder observar diferencias significativas entre ellas.

Los resultados presentados sobre HCF y CM sugieren que las EVs derivadas de MSC-THN podrían atenuar de manera más efectiva el proceso del remodelado cardíaco patológico. Sin embargo, una incorrecta revascularización de la zona dañada también juega un papel determinante en el desarrollo de la IC, teniendo como resultado un peor pronóstico. Por esto motivo, el siguiente experimento se enfocó en la evaluación del potencial angiogénico de las EVs. El principal desencadenante de la cardiopatía isquémica es la oclusión arterial ocasionada por la formación de placas de ateroma. Aunque en los últimos años se han desarrollado técnicas, principalmente hemodinámicas, para restablecer el flujo sanguíneo en los grandes vasos, aún existen limitaciones en la restauración de la microcirculación [375]. La angiogénesis se convierte así en un proceso crucial para la regeneración del tejido cardíaco tras un evento isquémico. Varios estudios han demostrado que las EVs de MSC contribuyen a mejorar la función cardíaca promoviendo la angiogénesis en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* [363,376]. En este sentido, nuestro grupo observó que la sobreexpresión de HIF1A en MSCs aumentaba el potencial angiogénico de estas vesículas, principalmente por la presencia de JAG1 en las mismas. Por este motivo, nos propusimos evaluar si la sobreexpresión de N1ICD en las MSCs podría potenciar este efecto angiogénico. Mediante un ensayo de formación de tubos en hipoxia, se observó un aumento en la formación de tubos en las células endoteliales tratadas con las EVs derivadas de MSC-TN. Este aumento de los parámetros angiogénicos fue mayor en el caso de las células tratadas con THN-EVs, lo que sugiere que el tratamiento con estas EVs podría ser efectivo en la regulación de la angiogénesis, promoviendo una restauración del flujo sanguíneo y del aporte de oxígeno al tejido cardíaco dañado.

Los resultados de este trabajo han mostrado que las EVs derivadas de MSC-TN presentan beneficios terapéuticos en el marco de las enfermedades cardiovasculares, especialmente en el daño cardíaco por isquemia. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de N1ICD en MSCs logra mejorar el potencial terapéutico de las EVs liberadas por estas células. Además, la sobreexpresión simultánea de N1ICD y HIF1A mejora aún más su efecto terapéutico en términos de reducción de ROS y apoptosis en CM y de aumento de angiogénesis en células endoteliales. Por ello, realizamos un estudio *in vivo* solo con las THN-EVs para comparar su efecto con las MutOSM-CD81-EVs. Los datos obtenidos muestran que las MutOSM-CD81-EVs redujeron ligeramente más la fibrosis que las THN-EVs; sin embargo, estas últimas exhibieron un efecto anti-hipertrófico y pro-angiogénico superior. Estos resultados sugieren un potencial terapéutico diversificado y subrayan la importancia de considerar estrategias combinadas para abordar las diversas facetas de la patología cardíaca. Asimismo, abren la puerta al diseño de nuevas EVs cargadas con moléculas específicas para abordar

diferentes aspectos y estadios de las enfermedades cardíacas. No obstante, es importante señalar que este estudio presenta algunas limitaciones que deben tenerse en cuenta. En primer lugar, como en la sección anterior, sería conveniente la realización de estudios de biodistribución. Si bien es cierto que el aumento de la expresión de CXCR4 podría estar dirigiendo a estas vesículas hacia la zona dañada como han demostrado otros estudios [341,342], sería interesante estudiarlo. Además, la comparación realizada entre los resultados *in vivo* con las THN-EVs y las MutOSM-CD81-EVs tiene la limitación de que las EVs se aislaron mediante dos métodos distintos: FFT con SEC y ultracentrifugaciones seriadas, respectivamente. Por último, este trabajo plantea la posibilidad de explorar nuevas estrategias terapéuticas, combinando diferentes tipos de vesículas o diferentes vías de administración en función de la fisiopatología de la enfermedad a tratar. Este enfoque abre la puerta a terapias más personalizadas y potencialmente más eficaces al abordar distintos aspectos de la patología cardíaca.

Conclusiones

- La sobreexpresión en MSCs de las variantes MatOSM y MutOSM unidas a CD81TM asegura la retención y disposición de esta citoquina en la superficie de sus EVs.
- Las MutOSM-CD81-EVs han demostrado tener un efecto anti-fibrótico *in vitro* mayor que las T-EVs.
- En el modelo *in vivo* de daño cardíaco inducido por ISO, las MutOSM-CD81-EVs fueron capaces de reducir la fibrosis, prevenir la hipertrofia y aumentar la angiogénesis. Esto podría deberse en parte a la polarizaron los macrófagos a un fenotipo M2 observada.
- La sobreexpresión de N1ICD en MSCs activa significativamente la vía de Notch y promueve la expresión de genes y miARNs cardioprotectores.
- Las THN-EVs presentan el ligando JAG1 en su superficie y además están enriquecidas en proteínas y miARNs relacionados con la reparación cardíaca.
- Las THN-EVs han demostrado una mayor eficacia que las T-EVs reduciendo marcadores de fibrosis en HCF estimulados, protegiendo frente al daño por OGD a las H9C2, reduciendo los marcadores de hipertrofia en H9C2 y aumentado la capacidad angiogénica de las HUVEC sometidas a hipoxia.
- Las THN-EVs han demostrado ser ligeramente más eficaces que las MutOSM-CD81-EVs en la prevención de la hipertrofia y el aumento de la angiogénesis en el modelo *in vivo* de infusión de ISO. No obstante, las MutOSM-CD81-EVs mostraron una reducción ligeramente superior en términos de fibrosis.
- Las EVs generadas en este trabajo podrían servir como base para el desarrollo nuevas terapias frente a cardiopatías isquémicas e IC. Al actuar sobre diferentes vías, pueden resultar una estrategia terapéutica más integral y eficaz para abordar distintos aspectos de la patología cardíaca.

Bibliografía

1. Gray, H.; Clemente, C.D. *Anatomy of the Human Body*; Lea & Febiger, 1985; ISBN 9780812106442.
2. Mohrman, D.E.; Heller, L.J. *Cardiovascular Physiology, Ninth Edition*; McGraw-Hill Education, 2018; ISBN 9781260026115.
3. Best, C.H.; Taylor, N.B.; West, J.B. *Best and Taylor's Physiological Basis of Medical Practice*; Williams & Wilkins, 1991; ISBN 9780683089479.
4. Litviňuková, M.; Talavera-López, C.; Maatz, H.; Reichart, D.; Worth, C.L.; Lindberg, E.L.; Kanda, M.; Polanski, K.; Heinig, M.; Lee, M.; et al. Cells of the Adult Human Heart. *Nature* **2020** *588*:7838 **2020**, 588, 466–472, doi:10.1038/s41586-020-2797-4.
5. Pinto, A.R.; Ilinykh, A.; Ivey, M.J.; Kuwabara, J.T.; D'antoni, M.L.; Debuque, R.; Chandran, A.; Wang, L.; Arora, K.; Rosenthal, N.A.; et al. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* **2016**, *118*, 400–409, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307778/-/DC1.
6. Gregorio, C.C.; Antin, P.B. To the Heart of Myofibril Assembly. *Trends Cell Biol* **2000**, *10*, 355–362, doi:10.1016/S0962-8924(00)01793-1.
7. Vendelin, M.; Béraud, N.; Guerrero, K.; Andrienko, T.; Kuznetsov, A. V.; Olivares, J.; Kay, L.; Saks, V.A. Mitochondrial Regular Arrangement in Muscle Cells: A “Crystal-like” Pattern. *Am J Physiol Cell Physiol* **2005**, *288*, doi:10.1152/AJPCELL.00281.2004.
8. Huber, I.; Itzhaki, I.; Caspi, O.; Arbel, G.; Tzukerman, M.; Gepstein, A.; Habib, M.; Yankelson, L.; Kehat, I.; Gepstein, L. Identification and Selection of Cardiomyocytes during Human Embryonic Stem Cell Differentiation. *FASEB J* **2007**, *21*, 2551–2563, doi:10.1096/FJ.05-5711COM.
9. Paradis, A.N.; Gay, M.S.; Zhang, L. Binucleation of Cardiomyocytes: The Transition from a Proliferative to a Terminally Differentiated State. *Drug Discov Today* **2014**, *19*, 602, doi:10.1016/J.DRUDIS.2013.10.019.
10. Kummitha, C.M.; Kalhan, S.C.; Saidel, G.M.; Lai, N. Relating Tissue/Organ Energy Expenditure to Metabolic Fluxes in Mouse and Human: Experimental Data Integrated with Mathematical Modeling. *Physiol Rep* **2014**, *2*, doi:10.14814/PHY2.12159.
11. Yu, Q.C.; Song, W.; Wang, D.; Zeng, Y.A. Identification of Blood Vascular Endothelial Stem Cells by the Expression of Protein C Receptor. *Cell Res* **2016**, *26*, 1079–1098, doi:10.1038/CR.2016.85.
12. Cappellari, O.; Cossu, G. Pericytes in Development and Pathology of Skeletal Muscle. *Circ Res* **2013**, *113*, 341–347, doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300203.
13. Doppler, S.A.; Carvalho, C.; Lahm, H.; Deutsch, M.A.; Dreßen, M.; Puluca, N.; Lange, R.; Krane, M. Cardiac Fibroblasts: More than Mechanical Support. *J Thorac Dis* **2017**, *9*, S36–S51, doi:10.21037/JTD.2017.03.122.
14. Hinz, B.; Phan, S.H.; Thannickal, V.J.; Galli, A.; Bochaton-Piallat, M.L.; Gabbiani, G. The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins. *Am J Pathol* **2007**, *170*, 1807–1816, doi:10.2353/AJPATH.2007.070112.

15. Cowley, K.C. A New Conceptual Framework for the Integrated Neural Control of Locomotor and Sympathetic Function: Implications for Exercise after Spinal Cord Injury. *Appl Physiol Nutr Metab* **2018**, *43*, 1140–1150, doi:10.1139/APNM-2018-0310.
16. Mahmoud, A.I.; O'Meara, C.C.; Gemberling, M.; Zhao, L.; Bryant, D.M.; Zheng, R.; Gannon, J.B.; Cai, L.; Choi, W.Y.; Egnaczyk, G.F.; et al. Nerves Regulate Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration. *Dev Cell* **2015**, *34*, 387, doi:10.1016/J.DEVCEL.2015.06.017.
17. Kologrivova, I.; Shtatolkina, M.; Suslova, T.; Ryabov, V. Cells of the Immune System in Cardiac Remodeling: Main Players in Resolution of Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Front Immunol* **2021**, *12*, 664457, doi:10.3389/FIMMU.2021.664457/BIBTEX.
18. Torán, J.L.; López, J.A.; Gomes-Alves, P.; Aguilar, S.; Torroja, C.; Trevisan-Herraz, M.; Moscoso, I.; Sebastião, M.J.; Serra, M.; Brito, C.; et al. Definition of a Cell Surface Signature for Human Cardiac Progenitor Cells after Comprehensive Comparative Transcriptomic and Proteomic Characterization. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 1–16, doi:10.1038/s41598-019-39571-x.
19. Cingolani, H.E.; Houssay, A.B. *Fisiología Humana*; El Ateneo, 2000; ISBN 9789500203760.
20. Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell*; W.W. Norton, 2017; ISBN 9781317563754.
21. Roth, G.A.; Abate, D.; Abate, K.H.; Abay, S.M.; Abbafati, C.; Abbasi, N.; Abbastabar, H.; Abd-Allah, F.; Abdela, J.; Abdelalim, A.; et al. Global, Regional, and National Age-Sex-Specific Mortality for 282 Causes of Death in 195 Countries and Territories, 1980-2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2018**, *392*, 1736–1788, doi:10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
22. Taylor, C.J.; Ordóñez-Mena, J.M.; Roalfe, A.K.; Lay-Flurrie, S.; Jones, N.R.; Marshall, T.; Hobbs, F.D.R. Trends in Survival after a Diagnosis of Heart Failure in the United Kingdom 2000-2017: Population Based Cohort Study. *BMJ* **2019**, *364*, 223, doi:10.1136/BMJ.L223.
23. Monnet, E.; Chachques, J.C. Animal Models of Heart Failure: What Is New? *Annals of Thoracic Surgery* **2005**, *79*, 1445–1453, doi:10.1016/j.athoracsur.2004.04.002.
24. Developing Countries, I. of M. (US) C. on P. the G.E. of C.D.M. the C. in; Fuster, V.; Kelly, B.B. Committee on Preventing the Global Epidemic of Cardiovascular Disease: Meeting the Challenges in Developing Countries. **2010**.
25. Thygesen, K.; Alpert, J.S.; Jaffe, A.S.; Chaitman, B.R.; Bax, J.J.; Morrow, D.A.; White, H.D.; Corbett, S.; Chettibi, M.; Hayrapetyan, H.; et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation* **2018**, *138*, e618–e651, doi:10.1161/CIR.0000000000000617.
26. Hilliard, A.L.; Winchester, D.E.; Russell, T.D.; Hilliard, R.D. Myocardial Infarction Classification and Its Implications on Measures of Cardiovascular Outcomes, Quality, and Racial/Ethnic Disparities. *Clin Cardiol* **2020**, *43*, 1076, doi:10.1002/CLC.23431.

27. Hartikainen, T.S.; Sorensen, N.A.; Haller, P.M.; Goßling, A.; Lehmacher, J.; Zeller, T.; Blankenberg, S.; Westermann, D.; Neumann, J.T. Clinical Application of the 4th Universal Definition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J* **2020**, *41*, 2209–2216, doi:10.1093/EURHEARTJ/EHAA035.
28. Consenso ESC 2018 Sobre La Cuarta Definición Universal Del Infarto. *Rev Esp Cardiol* **2019**, *72*, 72.e1–72.e27, doi:10.1016/J.RECESP.2018.11.011.
29. Kolodgie, F.D.; Burke, A.P.; Farb, A.; Gold, H.K.; Yuan, J.; Narula, J.; Finn, A. V.; Virmani, R. The Thin-Cap Fibroatheroma: A Type of Vulnerable Plaque: The Major Precursor Lesion to Acute Coronary Syndromes. *Curr Opin Cardiol* **2001**, *16*, 285–292, doi:10.1097/00001573-200109000-00006.
30. Scharf, R.E. Platelet Signaling in Primary Haemostasis and Arterial Thrombus Formation: Part 1. *Hamostaseologie* **2018**, *38*, 203–210, doi:10.1055/S-0038-1675144.
31. Shibata, N.; Okamoto, K.; Tatsumi, N. Mechanisms of Thrombus Formation. *N Engl J Med* **2008**, *359*, 211–229, doi:10.1056/NEJMRA0801082.
32. Glass, C.K.; Witztum, J.L. Atherosclerosis. the Road Ahead. *Cell* **2001**, *104*, 503–516, doi:10.1016/S0092-8674(01)00238-0.
33. Reimer, K.A.; Lowe, J.E.; Rasmussen, M.M.; Jennings, R.B. The Wavefront Phenomenon of Ischemic Cell Death. 1. Myocardial Infarct Size vs Duration of Coronary Occlusion in Dogs. *Circulation* **1977**, *56*, 786–794, doi:10.1161/01.CIR.56.5.786.
34. Jennings, R.B. Historical Perspective on the Pathology of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circ Res* **2013**, *113*, 428–438, doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300987.
35. Yellon, D.M.; Hausenloy, D.J. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med* **2007**, *357*, 1121–1135, doi:10.1056/NEJMRA071667.
36. Liehn, E.A.; Postea, O.; Curaj, A.; Marx, N. Repair after Myocardial Infarction, between Fantasy and Reality: The Role of Chemokines. *J Am Coll Cardiol* **2011**, *58*, 2357–2362, doi:10.1016/J.JACC.2011.08.034.
37. Arslan, F.; De Kleijn, D.P.; Pasterkamp, G. Innate Immune Signaling in Cardiac Ischemia. *Nat Rev Cardiol* **2011**, *8*, 292–300, doi:10.1038/NRCARDIO.2011.38.
38. Frangogiannis, N.G.; Smith, C.W.; Entman, M.L. The Inflammatory Response in Myocardial Infarction. *Cardiovasc Res* **2002**, *53*, 31–47, doi:10.1016/S0008-6363(01)00434-5.
39. Jaeschke, H.; Smith, C.W. Mechanisms of Neutrophil-Induced Parenchymal Cell Injury. *J Leukoc Biol* **1997**, *61*, 647–653, doi:10.1002/JLB.61.6.647.
40. Swirski, F.K.; Nahrendorf, M.; Etzrodt, M.; Wildgruber, M.; Cortez-Retamozo, V.; Panizzi, P.; Figueiredo, J.L.; Kohler, R.H.; Chudnovskiy, A.; Waterman, P.; et al. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science* **2009**, *325*, 612–616, doi:10.1126/SCIENCE.1175202.

41. Soehnlein, O.; Zerneck, A.; Weber, C. Neutrophils Launch Monocyte Extravasation by Release of Granule Proteins. *Thromb Haemost* **2009**, *102*, 198–205, doi:10.1160/TH08-11-0720.
42. Nahrendorf, M.; Pittet, M.J.; Swirski, F.K. Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair after Myocardial Infarction. *Circulation* **2010**, *121*, 2437–2445, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916346.
43. Weil, B.R.; Neelamegham, S. Selectins and Immune Cells in Acute Myocardial Infarction and Post-Infarction Ventricular Remodeling: Pathophysiology and Novel Treatments. *Front Immunol* **2019**, *10*, doi:10.3389/FIMMU.2019.00300.
44. Jolly, S.R.; Kane, W.J.; Hook, B.G.; Abrams, G.D.; Kunkel, S.L.; Lucchesi, B.R. Reduction of Myocardial Infarct Size by Neutrophil Depletion: Effect of Duration of Occlusion. *Am Heart J* **1986**, *112*, 682–690, doi:10.1016/0002-8703(86)90461-8.
45. Liehn, E.A.; Merx, M.W.; Postea, O.; Becher, S.; Djalali-Talab, Y.; Shagdarsuren, E.; Kelm, M.; Zerneck, A.; Weber, C. Ccr1 Deficiency Reduces Inflammatory Remodelling and Preserves Left Ventricular Function after Myocardial Infarction. *J Cell Mol Med* **2008**, *12*, 496–506, doi:10.1111/J.1582-4934.2007.00194.X.
46. Prabhu, S.D.; Frangogiannis, N.G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res* **2016**, *119*, 91–112, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303577.
47. Dobaczewski, M.; Xia, Y.; Bujak, M.; Gonzalez-Quesada, C.; Frangogiannis, N.G. CCR5 Signaling Suppresses Inflammation and Reduces Adverse Remodeling of the Infarcted Heart, Mediating Recruitment of Regulatory T Cells. *Am J Pathol* **2010**, *176*, 2177, doi:10.2353/AJPATH.2010.090759.
48. Hofmann, U.; Beyersdorf, N.; Weirather, J.; Podolskaya, A.; Bauersachs, J.; Ertl, G.; Kerkau, T.; Frantz, S. Activation of CD4⁺ T Lymphocytes Improves Wound Healing and Survival after Experimental Myocardial Infarction in Mice. *Circulation* **2012**, *125*, 1652–1663, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.044164.
49. Desmouliere, A.; Geinoz, A.; Gabbiani, F.; Gabbiani, G. Transforming Growth Factor-Beta 1 Induces Alpha-Smooth Muscle Actin Expression in Granulation Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts. *J Cell Biol* **1993**, *122*, 103–111, doi:10.1083/JCB.122.1.103.
50. Morimoto, H.; Takahashi, M.; Izawa, A.; Ise, H.; Hongo, M.; Kolattukudy, P.E.; Ikeda, U. Cardiac Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Transgenic Mice Prevents Cardiac Dysfunction and Remodeling after Myocardial Infarction. *Circ Res* **2006**, *99*, 891–899, doi:10.1161/01.RES.0000246113.82111.2D.
51. D'Urso, M.; Kurniawan, N.A. Mechanical and Physical Regulation of Fibroblast–Myofibroblast Transition: From Cellular Mechanoreponse to Tissue Pathology. *Front Bioeng Biotechnol* **2020**, *8*, 609653, doi:10.3389/FBIOE.2020.609653.
52. Shinde, A. V.; Humeres, C.; Frangogiannis, N.G. The Role of α -Smooth Muscle Actin in Fibroblast-Mediated Matrix Contraction and Remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2017**, *1863*, 298–309, doi:10.1016/J.BBADIS.2016.11.006.

53. Lindsey, M.L.; Mann, D.L.; Entman, M.L.; Spinale, F.G. Extracellular Matrix Remodeling Following Myocardial Injury. *Ann Med* **2003**, *35*, 316–326, doi:10.1080/07853890310001285.
54. Frangogiannis, N.G. The Extracellular Matrix in Myocardial Injury, Repair, and Remodeling. *J Clin Invest* **2017**, *127*, 1600–1612, doi:10.1172/JCI87491.
55. Hara, H.; Takeda, N.; Komuro, I. Pathophysiology and Therapeutic Potential of Cardiac Fibrosis. *Inflamm Regen* **2017**, *37*, 1–10, doi:10.1186/S41232-017-0046-5/FIGURES/3.
56. Venugopal, H.; Hanna, A.; Humeres, C.; Frangogiannis, N.G. Properties and Functions of Fibroblasts and Myofibroblasts in Myocardial Infarction. *Cells* **2022**, *11*, doi:10.3390/CELLS11091386.
57. Kubota, A.; Frangogiannis, N.G. Macrophages in Myocardial Infarction. *Am J Physiol Cell Physiol* **2022**, *323*, C1304–C1324, doi:10.1152/AJPCELL.00230.2022.
58. Larose, E.; Rodés-Cabau, J.; Pibarot, P.; Rinfret, S.; Proulx, G.; Nguyen, C.M.; Déry, J.P.; Gleeton, O.; Roy, L.; Noël, B.; et al. Predicting Late Myocardial Recovery and Outcomes in the Early Hours of ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: Traditional Measures Compared With Microvascular Obstruction, Salvaged Myocardium, and Necrosis Characteristics by Cardiovascular Magnetic Resonance. *J Am Coll Cardiol* **2010**, *55*, 2459–2469, doi:10.1016/J.JACC.2010.02.033.
59. Van Diepen, S.; Newby, L.K.; Lopes, R.D.; Stebbins, A.; Hasselblad, V.; James, S.; Roe, M.T.; Ezekowitz, J.A.; Moliterno, D.J.; Neumann, F.J.; et al. Prognostic Relevance of Baseline Pro- and Anti-Inflammatory Markers in STEMI: An APEX AMI Substudy. *Int J Cardiol* **2013**, *168*, 2127–2133, doi:10.1016/j.ijcard.2013.01.004.
60. Viola, M.; de Jager, S.C.A.; Sluijter, J.P.G. Targeting Inflammation after Myocardial Infarction: A Therapeutic Opportunity for Extracellular Vesicles? *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, Vol. 22, Page 7831 **2021**, *22*, 7831, doi:10.3390/IJMS22157831.
61. Reimer, K.A.; Jennings, R.B.; Tatum, A.H. Pathobiology of Acute Myocardial Ischemia: Metabolic, Functional and Ultrastructural Studies. *Am J Cardiol* **1983**, *52*, 72–81, doi:10.1016/0002-9149(83)90180-7.
62. Buja, L.M. Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. *Cardiovascular Pathology* **2005**, *14*, 170–175, doi:10.1016/J.CARPATH.2005.03.006.
63. Ladilov, Y. V.; Siegmund, B.; Piper, H.M. Protection of Reoxygenated Cardiomyocytes against Hypercontracture by Inhibition of Na⁺/H⁺ Exchange. *Am J Physiol* **1995**, *268*, doi:10.1152/AJPHEART.1995.268.4.H1531.
64. Inserte, J.; Hernando, V.; Garcia-Dorado, D. Contribution of Calpains to Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury. *Cardiovasc Res* **2012**, *96*, 23–31, doi:10.1093/CVR/CVS232.
65. Barrabés, J.A.; Garcia-Dorado, D.; Ruiz-Meana, M.; Piper, H.M.; Solares, J.; González, M.A.; Oliveras, J.; Herrejón, M.P.; Soler Soler, J. Myocardial Segment Shrinkage during Coronary Reperfusion in Situ: Relation to Hypercontracture and Myocardial Necrosis. *Pflugers Arch* **1996**, *431*, 519–526, doi:10.1007/BF02191898.

66. Ruiz-Meana, M.; García-Dorado, D.; González, M.A.; Barrabés, J.A.; Soler-Soler, J. Effect of Osmotic Stress on Sarcolemmal Integrity of Isolated Cardiomyocytes Following Transient Metabolic Inhibition. *Cardiovasc Res* **1995**, *30*, 64–69, doi:10.1016/S0008-6363(95)00008-9.
67. Halestrap, A.P.; Clarke, S.J.; Javadov, S.A. Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening during Myocardial Reperfusion--a Target for Cardioprotection. *Cardiovasc Res* **2004**, *61*, 372–385, doi:10.1016/S0008-6363(03)00533-9.
68. Ruiz-Meana, M.; Inserte, J.; Fernandez-Sanz, C.; Hernando, V.; Miro-Casas, E.; Barba, I.; Garcia-Dorado, D. The Role of Mitochondrial Permeability Transition in Reperfusion-Induced Cardiomyocyte Death Depends on the Duration of Ischemia. *Basic Res Cardiol* **2011**, *106*, 1259–1268, doi:10.1007/S00395-011-0225-5.
69. Kroemer, G.; Dallaporta, B.; Resche-Rigon, M. The Mitochondrial Death/Life Regulator in Apoptosis and Necrosis. *Annu Rev Physiol* **1998**, *60*, 619–642, doi:10.1146/ANNUREV.PHYSIOL.60.1.619.
70. Mouton, A.J.; Ma, Y.; Rivera Gonzalez, O.J.; Daseke, M.J.; Flynn, E.R.; Freeman, T.C.; Garrett, M.R.; DeLeon-Pennell, K.Y.; Lindsey, M.L. Fibroblast Polarization over the Myocardial Infarction Time Continuum Shifts Roles from Inflammation to Angiogenesis. *Basic Res Cardiol* **2019**, *114*, doi:10.1007/S00395-019-0715-4.
71. Vasquez, C.; Benamer, N.; Morley, G.E. The Cardiac Fibroblast: Functional and Electrophysiological Considerations in Healthy and Diseased Hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* **2011**, *57*, 380, doi:10.1097/FJC.0B013E31820CDA19.
72. Van Den Borne, S.W.M.; Diez, J.; Blankesteyn, W.M.; Verjans, J.; Hofstra, L.; Narula, J. Myocardial Remodeling after Infarction: The Role of Myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol* **2010**, *7*, 30–37, doi:10.1038/NRCARDIO.2009.199.
73. Hinz, B.; Celetta, G.; Tomasek, J.J.; Gabbiani, G.; Chaponnier, C. Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. *Mol Biol Cell* **2001**, *12*, 2730–2741, doi:10.1091/MBC.12.9.2730.
74. Klingberg, F.; Hinz, B.; White, E.S. The Myofibroblast Matrix: Implications for Tissue Repair and Fibrosis. *J Pathol* **2013**, *229*, 298, doi:10.1002/PATH.4104.
75. Jacobs, M.; Staufenberger, S.; Gergs, U.; Meuter, K.; Brandstätter, K.; Hafner, M.; Ertl, G.; Schorb, W. Tumor Necrosis Factor- α at Acute Myocardial Infarction in Rats and Effects on Cardiac Fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* **1999**, *31*, 1949–1959, doi:10.1006/jmcc.1999.1007.
76. Shen, H.; Wang, J.; Min, J.; Xi, W.; Gao, Y.; Yin, L.; Yu, Y.; Liu, K.; Xiao, J.; Zhang, Y.F.; et al. Activation of TGF- β 1/ α -SMA/Col I Profibrotic Pathway in Fibroblasts by Galectin-3 Contributes to Atrial Fibrosis in Experimental Models and Patients. *Cell Physiol Biochem* **2018**, *47*, 851–863, doi:10.1159/000490077.
77. Györfi, A.H.; Matei, A.E.; Distler, J.H.W. Targeting TGF- β Signaling for the Treatment of Fibrosis. *Matrix Biol* **2018**, *68–69*, 8–27, doi:10.1016/J.MATBIO.2017.12.016.
78. Vainio, L.E.; Szabó, Z.; Lin, R.; Ulvila, J.; Yrjölä, R.; Alakoski, T.; Piihola, J.; Koch, W.J.; Ruskoaho, H.; Fouse, S.D.; et al. Connective Tissue Growth Factor Inhibition Enhances

- Cardiac Repair and Limits Fibrosis After Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci* **2019**, 4, 83, doi:10.1016/J.JACBTS.2018.10.007.
79. Derynck, R.; Zhang, Y.E. Smad-Dependent and Smad-Independent Pathways in TGF-Beta Family Signalling. *Nature* **2003**, 425, 577–584, doi:10.1038/NATURE02006.
 80. Li, Y.; Takemura, G.; Kosai, K.I.; Takahashi, T.; Okada, H.; Miyata, S.; Yuge, K.; Nagano, S.; Esaki, M.; Khai, N.C.; et al. Critical Roles for the Fas/Fas Ligand System in Postinfarction Ventricular Remodeling and Heart Failure. *Circ Res* **2004**, 95, 627–636, doi:10.1161/01.RES.0000141528.54850.bd.
 81. Okada, H.; Takemura, G.; Kosai, K.I.; Li, Y.; Takahashi, T.; Esaki, M.; Yuge, K.; Miyata, S.; Maruyama, R.; Mikami, A.; et al. Postinfarction Gene Therapy against Transforming Growth Factor-Beta Signal Modulates Infarct Tissue Dynamics and Attenuates Left Ventricular Remodeling and Heart Failure. *Circulation* **2005**, 111, 2430–2437, doi:10.1161/01.CIR.0000165066.71481.8E.
 82. Kanamori, H.; Takemura, G.; Li, Y.; Okada, H.; Maruyama, R.; Aoyama, T.; Miyata, S.; Esaki, M.; Ogino, A.; Nakagawa, M.; et al. Inhibition of Fas-Associated Apoptosis in Granulation Tissue Cells Accompanies Attenuation of Postinfarction Left Ventricular Remodeling by Olmesartan. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2007**, 292, doi:10.1152/AJPHEART.01235.2006.
 83. Sun, Y.; Kiani, M.F.; Postlethwaite, A.E.; Weber, K.T. Infarct Scar as Living Tissue. *Basic Res Cardiol* **2002**, 97, 343–347, doi:10.1007/S00395-002-0365-8.
 84. Weber, K.T.; Sun, Y.; Katwa, L.C. Myofibroblasts and Local Angiotensin II in Rat Cardiac Tissue Repair. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **1997**, 29, 31–42, doi:10.1016/S1357-2725(96)00116-1.
 85. Wynn, T.A. Cellular and Molecular Mechanisms of Fibrosis. *J Pathol* **2008**, 214, 199–210, doi:10.1002/PATH.2277.
 86. Beltrami, C.A.; Finato, N.; Rocco, M.; Feruglio, G.A.; Puricelli, C.; Cigola, E.; Quaini, F.; Sonnenblick, E.H.; Olivetti, G.; Anversa, P. Structural Basis of End-Stage Failure in Ischemic Cardiomyopathy in Humans. *Circulation* **1994**, 89, 151–163, doi:10.1161/01.CIR.89.1.151.
 87. Opie, L.H.; Commerford, P.J.; Gersh, B.J.; Pfeffer, M.A. Controversies in Ventricular Remodelling. *Lancet* **2006**, 367, 356–367, doi:10.1016/S0140-6736(06)68074-4.
 88. Yancy, C.W.; Jessup, M.; Bozkurt, B.; Butler, J.; Casey, D.E.; Colvin, M.M.; Drazner, M.H.; Filippatos, G.S.; Fonarow, G.C.; Givertz, M.M.; et al. 2017 ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *J Am Coll Cardiol* **2017**, 70, 776–803, doi:10.1016/J.JACC.2017.04.025.
 89. Snipelisky, D.; Chaudhry, S.P.; Stewart, G.C. The Many Faces of Heart Failure. *Card Electrophysiol Clin* **2019**, 11, 11–20, doi:10.1016/J.CCEP.2018.11.001.
 90. Roger, V.L. Epidemiology of Heart Failure. *Circ Res* **2013**, 113, 646, doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300268.

91. Jenča, D.; Melenovský, V.; Stehlik, J.; Staněk, V.; Kettner, J.; Kautzner, J.; Adámková, V.; Wohlfahrt, P. Heart Failure after Myocardial Infarction: Incidence and Predictors. *ESC Heart Fail* **2021**, *8*, 222–237, doi:10.1002/EHF2.13144.
92. Mehra, I. V.; Weart, C.W. Diagnosis and Treatment of Heart Failure Due to Left Ventricular Dysfunction. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **1994**, *272*, 1324–1325, doi:10.1001/jama.1994.03520170034020.
93. Rosamond, W.; Flegal, K.; Furie, K.; Go, A.; Greenlund, K.; Haase, N.; Hailpern, S.M.; Ho, M.; Howard, V.; Kissela, B.; et al. Heart Disease and Stroke Statistics--2008 Update: A Report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **2008**, *117*, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.187998.
94. Gerber, Y.; Weston, S.A.; Enriquez-Sarano, M.; Berardi, C.; Chamberlain, A.M.; Manemann, S.M.; Jiang, R.; Dunlay, S.M.; Roger, V.L. Mortality Associated With Heart Failure After Myocardial Infarction: A Contemporary Community Perspective. *Circ Heart Fail* **2016**, *9*, e002460, doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002460.
95. Cook, C.; Cole, G.; Asaria, P.; Jabbour, R.; Francis, D.P. The Annual Global Economic Burden of Heart Failure. *Int J Cardiol* **2014**, *171*, 368–376, doi:10.1016/J.IJCARD.2013.12.028.
96. Kim, I. A Brief Overview of Cell Therapy and Its Product. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* **2013**, *39*, 201, doi:10.5125/JKAOMS.2013.39.5.201.
97. Lefrère, J.J.; Berche, P. [Doctor Brown-Sequard's Therapy]. *Ann Endocrinol (Paris)* **2010**, *71*, 69–75, doi:10.1016/J.ANDO.2010.01.003.
98. MCCULLOCH, E.A.; TILL, J.E. The Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells, Determined by Quantitative Marrow Transplantation into Irradiated Mice. *Radiat Res* **1960**, *13*, 115–125, doi:10.2307/3570877.
99. Sharkis, S.J. Canadian Stem Cell Scientists Take the Prize. *Cell* **2005**, *122*, 817–819, doi:10.1016/j.cell.2005.09.008.
100. Cell Therapy Market Size & Trends Analysis Report, 2030 Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/cell-therapy-market> (accessed on 14 March 2023).
101. Friedenstein, A.J.; Petrakova, K.V.; Kurolesova, A.I.; Frolova, G.P. Heterotopic of Bone Marrow. Analysis of Precursor Cells for Osteogenic and Hematopoietic Tissues. *Transplantation* **1968**, *6*, 230–247, doi:10.1097/00007890-196803000-00009.
102. Caplan, A.I. Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research* **1991**, *9*, 641–650, doi:10.1002/JOR.1100090504.
103. Bianco, P.; Robey, P.G.; Simmons, P.J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell* **2008**, *2*, 313, doi:10.1016/J.STEM.2008.03.002.
104. Horwitz, E.M.; Le Blanc, K.; Dominici, M.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Deans, R.J.; Krause, D.S.; Keating, A. Clarification of the Nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* **2005**, *7*, 393–395, doi:10.1080/14653240500319234.

105. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Krause, D.S.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317, doi:10.1080/14653240600855905.
106. Krampera, M.; Galipeau, J.; Shi, Y.; Tarte, K.; Sensebe, L. Immunological Characterization of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells—The International Society for Cellular Therapy (ISCT) Working Proposal. *Cytotherapy* **2013**, *15*, 1054–1061, doi:10.1016/J.JCYT.2013.02.010.
107. Zuk, P.A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J.W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H.P.; Hedrick, M.H. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng* **2001**, *7*, 211–228, doi:10.1089/107632701300062859.
108. Gronthos, S.; Mankani, M.; Brahimi, J.; Robey, P.G.; Shi, S. Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) in Vitro and in Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 13625–13630, doi:10.1073/PNAS.240309797.
109. Haniffa, M.A.; Wang, X.-N.; Holtick, U.; Rae, M.; Isaacs, J.D.; Dickinson, A.M.; Hilken, C.M.U.; Collin, M.P. Adult Human Fibroblasts Are Potent Immunoregulatory Cells and Functionally Equivalent to Mesenchymal Stem Cells. *The Journal of Immunology* **2007**, *179*, 1595–1604, doi:10.4049/JIMMUNOL.179.3.1595.
110. Jones, E.A.; English, A.; Henshaw, K.; Kinsey, S.E.; Markham, A.F.; Emery, P.; McGonagle, D. Enumeration and Phenotypic Characterization of Synovial Fluid Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells in Inflammatory and Degenerative Arthritis. *Arthritis Rheum* **2004**, *50*, 817–827, doi:10.1002/ART.20203.
111. Sakaguchi, Y.; Sekiya, I.; Yagishita, K.; Muneta, T. Comparison of Human Stem Cells Derived from Various Mesenchymal Tissues: Superiority of Synovium as a Cell Source. *Arthritis Rheum* **2005**, *52*, 2521–2529, doi:10.1002/ART.21212.
112. Wang, H.; Hung, S.; Peng, S.; Huang, C.; Wei, H.; Guo, Y.; Fu, Y.; Lai, M.; Chen, C. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cells* **2004**, *22*, 1330–1337, doi:10.1634/STEMCELLS.2004-0013.
113. Raynaud, C.M.; Maleki, M.; Lis, R.; Ahmed, B.; Al-Azwani, I.; Malek, J.; Safadi, F.F.; Rafii, A. Comprehensive Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Placenta and Fetal Membrane and Their Response to Osteoactivin Stimulation. *Stem Cells Int* **2012**, *2012*, doi:10.1155/2012/658356.
114. Elahi, K.C.; Klein, G.; Avci-Adali, M.; Sievert, K.D.; Macneil, S.; Aicher, W.K. Human Mesenchymal Stromal Cells from Different Sources Diverge in Their Expression of Cell Surface Proteins and Display Distinct Differentiation Patterns. *Stem Cells Int* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/5646384.
115. Kolf, C.M.; Cho, E.; Tuan, R.S. 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.
116. Pevsner-Fischer, M.; Levin, S.; Zipori, D. The Origins of Mesenchymal Stromal Cell Heterogeneity. *Stem Cell Rev Rep* **2011**, *7*, 560–568, doi:10.1007/S12015-011-9229-7.

117. Wang, Z.; Chai, C.; Wang, R.; Feng, Y.; Huang, L.; Zhang, Y.; Xiao, X.; Yang, S.; Zhang, Y.; Zhang, X. Single-Cell Transcriptome Atlas of Human Mesenchymal Stem Cells Exploring Cellular Heterogeneity. *Clin Transl Med* **2021**, *11*, doi:10.1002/CTM2.650.
118. Toma, C.; Pittenger, M.F.; Cahill, K.S.; Byrne, B.J.; Kessler, P.D. Human Mesenchymal Stem Cells Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart. *Circulation* **2002**, *105*, 93–98, doi:10.1161/HC0102.101442.
119. Noiseux, N.; Gneccchi, M.; Lopez-Illasaca, M.; Zhang, L.; Solomon, S.D.; Deb, A.; Dzau, V.J.; Pratt, R.E. Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Akt Dramatically Repair Infarcted Myocardium and Improve Cardiac Function despite Infrequent Cellular Fusion or Differentiation. *Mol Ther* **2006**, *14*, 840–850, doi:10.1016/J.YMTHE.2006.05.016.
120. Laflamme, M.A.; Murry, C.E. Regenerating the Heart. *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 845–856, doi:10.1038/NBT1117.
121. Liao, S.; Zhang, Y.; Ting, S.; Zhen, Z.; Luo, F.; Zhu, Z.; Jiang, Y.; Sun, S.; Lai, W.H.; Lian, Q.; et al. Potent Immunomodulation and Angiogenic Effects of Mesenchymal Stem Cells versus Cardiomyocytes Derived from Pluripotent Stem Cells for Treatment of Heart Failure. *Stem Cell Res Ther* **2019**, *10*, doi:10.1186/S13287-019-1183-3.
122. Hu, X.; Xu, Y.; Zhong, Z.; Wu, Y.; Zhao, J.; Wang, Y.; Cheng, H.; Kong, M.; Zhang, F.; Chen, Q.; et al. A Large-Scale Investigation of Hypoxia-Preconditioned Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Myocardial Repair in Nonhuman Primates: Paracrine Activity without Remuscularization. *Circ Res* **2016**, *118*, 970–983, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307516/-/DC1.
123. Bagno, L.; Hatzistergos, K.E.; Balkan, W.; Hare, J.M. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease: Progress and Challenges. *Molecular Therapy* **2018**, *26*, 1610, doi:10.1016/J.YMTHE.2018.05.009.
124. Eschenhagen, T.; Bolli, R.; Braun, T.; Field, L.J.; Fleischmann, B.K.; Frisén, J.; Giacca, M.; Hare, J.M.; Houser, S.; Lee, R.T.; et al. Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement. *Circulation* **2017**, *136*, 680–686, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029343.
125. Chow, A.; Stuckey, D.J.; Kidher, E.; Rocco, M.; Jabbour, R.J.; Mansfield, C.A.; Darzi, A.; Harding, S.E.; Stevens, M.M.; Athanasiou, T. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Encapsulating Bioactive Hydrogels Improve Rat Heart Function Post Myocardial Infarction. *Stem Cell Reports* **2017**, *9*, 1415–1422, doi:10.1016/J.STEMCR.2017.09.003.
126. Hatzistergos, K.E.; Quevedo, H.; Oskoue, B.N.; Hu, Q.; Feigenbaum, G.S.; Margitich, I.S.; Mazhari, R.; Boyle, A.J.; Zambrano, J.P.; Rodriguez, J.E.; et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stimulate Cardiac Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Circ Res* **2010**, *107*, 913–922, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.222703.
127. Hatzistergos, K.E.; Saur, D.; Seidler, B.; Balkan, W.; Breton, M.; Valasaki, K.; Takeuchi, L.M.; Landin, A.M.; Khan, A.; Hare, J.M. Stimulatory Effects of MSCs on CKit⁺ Cardiac Stem Cells Are Mediated by SDF1/CXCR4 and SCF/CKIT Signaling Pathways. *Circ Res* **2016**, *119*, 921, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309281.

128. Loffredo, F.S.; Steinhauser, M.L.; Gannon, J.; Lee, R.T. Bone Marrow-Derived Cell Therapy Stimulates Endogenous Cardiomyocyte Progenitors and Promotes Cardiac Repair. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 389–398, doi:10.1016/J.STEM.2011.02.002.
129. Khan, M.; Nickoloff, E.; Abramova, T.; Johnson, J.; Verma, S.K.; Krishnamurthy, P.; Mackie, A.R.; Vaughan, E.; Garikipati, V.N.S.; Benedict, C.; et al. Embryonic Stem Cell-Derived Exosomes Promote Endogenous Repair Mechanisms and Enhance Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circ Res* **2015**, *117*, 52–64, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.305990.
130. Duran, J.M.; Makarewich, C.A.; Sharp, T.E.; Starosta, T.; Zhu, F.; Hoffman, N.E.; Chiba, Y.; Madesh, M.; Berretta, R.M.; Kubo, H.; et al. Bone-Derived Stem Cells Repair the Heart after Myocardial Infarction Through Transdifferentiation and Paracrine Signaling Mechanisms. *Circ Res* **2013**, *113*, 539–552, doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301202.
131. Zhang, Z.; Yang, J.; Yan, W.; Li, Y.; Shen, Z.; Asahara, T. Pretreatment of Cardiac Stem Cells With Exosomes Derived From Mesenchymal Stem Cells Enhances Myocardial Repair. *J Am Heart Assoc* **2016**, *5*, doi:10.1161/JAHA.115.002856.
132. Gómez-Ferrer, M.; Amaro-Prellezo, E.; Dorronsoro, A.; Sánchez-Sánchez, R.; Vicente, Á.; Cosín-Roger, J.; Barrachina, M.D.; Baquero, M.C.; Valencia, J.; Sepúlveda, P. HIF-Overexpression and Pro-Inflammatory Priming in Human Mesenchymal Stromal Cells Improves the Healing Properties of Extracellular Vesicles in Experimental Crohn's Disease. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/IJMS222011269.
133. Natsumeda, M.; Florea, V.; Rieger, A.C.; Tompkins, B.A.; Banerjee, M.N.; Golpanian, S.; Fritsch, J.; Landin, A.M.; Kashikar, N.D.; Karantalis, V.; et al. A Combination of Allogeneic Stem Cells Promotes Cardiac Regeneration. *J Am Coll Cardiol* **2017**, *70*, 2504–2515, doi:10.1016/J.JACC.2017.09.036.
134. Bartolucci, J.; Verdugo, F.J.; González, P.L.; Larrea, R.E.; Abarzua, E.; Goset, C.; Rojo, P.; Palma, I.; Lamich, R.; Pedreros, P.A.; et al. Safety and Efficacy of the Intravenous Infusion of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Patients With Heart Failure: A Phase 1/2 Randomized Controlled Trial (RIMECARD Trial [Randomized Clinical Trial of Intravenous Infusion Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Cardiopathy]). *Circ Res* **2017**, *121*, 1192–1204, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310712.
135. Ledford, K.J.; Murphy, N.; Zeigler, F.; Bartel, R.L.; Tubo, R. Therapeutic Potential of Ixmyelocel-T, an Expanded Autologous Multicellular Therapy for Treatment of Ischemic Cardiovascular Diseases. *Stem Cell Res Ther* **2015**, *6*, doi:10.1186/S13287-015-0007-3.
136. Mirotso, M.; Zhang, Z.; Deb, A.; Zhang, L.; Gneccchi, M.; Noiseux, N.; Mu, H.; Pachori, A.; Dzau, V. Secreted Frizzled Related Protein 2 (Sfrp2) Is the Key Akt-Mesenchymal Stem Cell-Released Paracrine Factor Mediating Myocardial Survival and Repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 1643, doi:10.1073/PNAS.0610024104.
137. Suzuki, G.; Iyer, V.; Lee, T.C.; Canty, J.M. Autologous Mesenchymal Stem Cells Mobilize CKit+ and CD133+ Bone Marrow Progenitor Cells and Improve Regional Function in Hibernating Myocardium. *Circ Res* **2011**, *109*, 1044–1054, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.245969.

138. Mias, C.; Lairez, O.; Trouche, E.; Roncalli, J.; Calise, D.; Seguelas, M.H.; Ordener, C.; Piercecchi-Marti, M.D.; Auge, N.; Salvayre, A.N.; et al. Mesenchymal Stem Cells Promote Matrix Metalloproteinase Secretion by Cardiac Fibroblasts and Reduce Cardiac Ventricular Fibrosis after Myocardial Infarction. *Stem Cells* **2009**, *27*, 2734–2743, doi:10.1002/STEM.169.
139. Uccelli, A.; Pistoia, V.; Moretta, L. Mesenchymal Stem Cells: A New Strategy for Immunosuppression? *Trends Immunol* **2007**, *28*, 219–226, doi:10.1016/J.IT.2007.03.001.
140. Golpanian, S.; Wolf, A.; Hatzistergos, K.E.; Hare, J.M. Rebuilding the Damaged Heart: Mesenchymal Stem Cells, Cell-Based Therapy, and Engineered Heart Tissue. *Physiol Rev* **2016**, *96*, 1127–1168, doi:10.1152/PHYSREV.00019.2015.
141. Hare, J.M.; DiFede, D.L.; Rieger, A.C.; Florea, V.; Landin, A.M.; El-Khorazaty, J.; Khan, A.; Mushtaq, M.; Lowery, M.H.; Byrnes, J.J.; et al. Randomized Comparison of Allogeneic Vs. Autologous Mesenchymal Stem Cells for Non-Ischemic Dilated Cardiomyopathy: POSEIDON-DCM Trial. *J Am Coll Cardiol* **2017**, *69*, 526, doi:10.1016/J.JACC.2016.11.009.
142. Patel, A.N.; Henry, T.D.; Quyyumi, A.A.; Schaer, G.L.; Anderson, R.D.; Toma, C.; East, C.; Remmers, A.E.; Goodrich, J.; Desai, A.S.; et al. Ixmyelocel-T for Patients with Ischaemic Heart Failure: A Prospective Randomised Double-Blind Trial. *Lancet* **2016**, *387*, 2412–2421, doi:10.1016/S0140-6736(16)30137-4.
143. Ahmad, T.; Mukherjee, S.; Pattnaik, B.; Kumar, M.; Singh, S.; Rehman, R.; Tiwari, B.K.; Jha, K.A.; Barhanpurkar, A.P.; Wani, M.R.; et al. Miro1 Regulates Intercellular Mitochondrial Transport & Enhances Mesenchymal Stem Cell Rescue Efficacy. *EMBO J* **2014**, *33*, 994–1010, doi:10.1002/EMBJ.201386030.
144. Cervio, E.; Barile, L.; Moccetti, T.; Vassalli, G. Exosomes for Intramyocardial Intercellular Communication. *Stem Cells Int* **2015**, *2015*, doi:10.1155/2015/482171.
145. Rani, S.; Ryan, A.E.; Griffin, M.D.; Ritter, T. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-Free Therapeutic Applications. *Molecular Therapy* **2015**, *23*, 812, doi:10.1038/MT.2015.44.
146. You, B.; Yang, Y.; Zhou, Z.; Yan, Y.; Zhang, L.; Jin, J.; Qian, H. Extracellular Vesicles: A New Frontier for Cardiac Repair. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi:10.3390/PHARMACEUTICS14091848.
147. Femminò, S.; Bonelli, F.; Brizzi, M.F. Extracellular Vesicles in Cardiac Repair and Regeneration: Beyond Stem-Cell-Based Approaches. *Front Cell Dev Biol* **2022**, *10*, doi:10.3389/FCELL.2022.996887.
148. Bian, S.; Zhang, L.; Duan, L.; Wang, X.; Min, Y.; Yu, H. Extracellular Vesicles Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Angiogenesis in a Rat Myocardial Infarction Model. *J Mol Med (Berl)* **2014**, *92*, 387–397, doi:10.1007/S00109-013-1110-5.
149. Deatheragea, B.L.; Cooksona, B.T. Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: A Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. *Infect Immun* **2012**, *80*, 1948–1957, doi:10.1128/IAI.06014-11.

150. Robinson, D.G.; Ding, Y.; Jiang, L. Unconventional Protein Secretion in Plants: A Critical Assessment. *Protoplasma* **2016**, *253*, 31–43, doi:10.1007/S00709-015-0887-1.
151. Johnstone, R.M.; Adam, M.; Hammond, J.R.; Orr, L.; Turbide, C. Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation. Association of Plasma Membrane Activities with Released Vesicles (Exosomes). *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 9412–9420, doi:10.1016/s0021-9258(18)48095-7.
152. Yáñez-Mó, M.; Siljander, P.R.M.; Andreu, Z.; Zavec, A.B.; Borràs, F.E.; Buzas, E.I.; Buzas, K.; Casal, E.; Cappello, F.; Carvalho, J.; et al. Biological Properties of Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions. *J Extracell Vesicles* **2015**, *4*, 1–60, doi:10.3402/JEV.V4.27066.
153. Lo Cicero, A.; Stahl, P.D.; Raposo, G. Extracellular Vesicles Shuffling Intercellular Messages: For Good or for Bad. *Curr Opin Cell Biol* **2015**, *35*, 69–77, doi:10.1016/J.CEB.2015.04.013.
154. Théry, C.; Amigorena, S.; Raposo, G.; Clayton, A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol* **2006**, *30*, 3.22.1–3.22.29, doi:10.1002/0471143030.CB0322S30.
155. Raposo, G.; Stoorvogel, W. Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends. *J Cell Biol* **2013**, *200*, 373–383, doi:10.1083/JCB.201211138.
156. Trams, E.G.; Lauter, C.J.; Norman Salem, J.; Heine, U. Exfoliation of Membrane Ecto-Enzymes in the Form of Micro-Vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1981**, *645*, 63–70, doi:10.1016/0005-2736(81)90512-5.
157. Raposo, G.; Nijman, H.W.; Stoorvogel, W.; Leijendekker, R.; Harding, C. V.; Melief, C.J.M.; Geuze, H.J. B Lymphocytes Secrete Antigen-Presenting Vesicles. *J Exp Med* **1996**, *183*, 1161–1172, doi:10.1084/JEM.183.3.1161.
158. Zitvogel, L.; Regnault, A.; Lozier, A.; Wolfers, J.; Flament, C.; Tenza, D.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Raposo, G.; Amigorena, S. Eradication of Established Murine Tumors Using a Novel Cell-Free Vaccine: Dendritic Cell-Derived Exosomes. *Nat Med* **1998**, *4*, 594–600, doi:10.1038/NM0598-594.
159. Colombo, M.; Raposo, G.; Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2014**, *30*, 255–289, doi:10.1146/ANNUREV-CELLBIO-101512-122326.
160. Wolf, P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J Haematol* **1967**, *13*, 269–288, doi:10.1111/J.1365-2141.1967.TB08741.X.
161. Stein, J.M.; Luzio, J.P. Ectocytosis Caused by Sublytic Autologous Complement Attack on Human Neutrophils. The Sorting of Endogenous Plasma-Membrane Proteins and Lipids into Shed Vesicles. *Biochem J* **1991**, *274* (Pt 2), 381–386, doi:10.1042/BJ2740381.
162. Wiedmer, T.; Shattil, S.J.; Cunningham, M.; Sims, P.J. Role of Calcium and Calpain in Complement-Induced Vesiculation of the Platelet Plasma Membrane and in the Exposure of the Platelet Factor Va Receptor. *Biochemistry* **1990**, *29*, 623–632, doi:10.1021/bi00455a005.

163. Satta, N.; Freyssinet, J.M.; Toti, F. The Significance of Human Monocyte Thrombomodulin during Membrane Vesiculation and after Stimulation by Lipopolysaccharide. *Br J Haematol* **1997**, *96*, 534–542, doi:10.1046/j.1365-2141.1997.d01-2059.x.
164. Al-Nedawi, K.; Meehan, B.; Micallef, J.; Lhotak, V.; May, L.; Guha, A.; Rak, J. Intercellular Transfer of the Oncogenic Receptor EGFRvIII by Microvesicles Derived from Tumour Cells. *Nat Cell Biol* **2008**, *10*, 619–624, doi:10.1038/NCB1725.
165. Tricarico, C.; Clancy, J.; D'Souza-Schorey, C. Biology and Biogenesis of Shed Microvesicles. *Small GTPases* **2017**, *8*, 220–232, doi:10.1080/21541248.2016.1215283.
166. Willms, E.; Johansson, H.J.; Mäger, I.; Lee, Y.; Blomberg, K.E.M.; Sadik, M.; Alaarg, A.; Smith, C.I.E.; Lehtiö, J.; El Andaloussi, S.; et al. Cells Release Subpopulations of Exosomes with Distinct Molecular and Biological Properties. *Scientific Reports* **2016** *6*:1 **2016**, *6*, 1–12, doi:10.1038/srep22519.
167. Gould, S.J.; Raposo, G. As We Wait: Coping with an Imperfect Nomenclature for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* **2013**, *2*, doi:10.3402/JEV.V2I0.20389.
168. Hurley, J.H. ESCRT Complexes and the Biogenesis of Multivesicular Bodies. *Curr Opin Cell Biol* **2008**, *20*, 4–11, doi:10.1016/J.CEB.2007.12.002.
169. Tamai, K.; Tanaka, N.; Nakano, T.; Kakazu, E.; Kondo, Y.; Inoue, J.; Shiina, M.; Fukushima, K.; Hoshino, T.; Sano, K.; et al. Exosome Secretion of Dendritic Cells Is Regulated by Hrs, an ESCRT-0 Protein. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *399*, 384–390, doi:10.1016/J.BBRC.2010.07.083.
170. Stuffers, S.; Sem Wegner, C.; Stenmark, H.; Brech, A. Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. *Traffic* **2009**, *10*, 925–937, doi:10.1111/J.1600-0854.2009.00920.X.
171. Trajkovic, K.; Hsu, C.; Chiantia, S.; Rajendran, L.; Wenzel, D.; Wieland, F.; Schwille, P.; Brügger, B.; Simons, M. Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* **2008**, *319*, 1244–1247, doi:10.1126/SCIENCE.1153124.
172. Goñi, F.M.; Alonso, A. Effects of Ceramide and Other Simple Sphingolipids on Membrane Lateral Structure. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1788*, 169–177, doi:10.1016/J.BBAMEM.2008.09.002.
173. Kajimoto, T.; Okada, T.; Miya, S.; Zhang, L.; Nakamura, S.I. Ongoing Activation of Sphingosine 1-Phosphate Receptors Mediates Maturation of Exosomal Multivesicular Endosomes. *Nat Commun* **2013**, *4*, doi:10.1038/NCOMMS3712.
174. van Niel, G.; Charrin, S.; Simoes, S.; Romao, M.; Rochin, L.; Saftig, P.; Marks, M.S.; Rubinstein, E.; Raposo, G. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Dev Cell* **2011**, *21*, 708–721, doi:10.1016/J.DEVCEL.2011.08.019.
175. Buschow, S.I.; Nolte-'t Hoen, E.N.M.; van Niel, G.; Pols, M.S.; ten Broeke, T.; Lauwen, M.; Ossendorp, F.; Melief, C.J.M.; Raposo, G.; Wubbolts, R.; et al. MHC II in Dendritic

- Cells Is Targeted to Lysosomes or T Cell-Induced Exosomes via Distinct Multivesicular Body Pathways. *Traffic* **2009**, *10*, 1528–1542, doi:10.1111/J.1600-0854.2009.00963.X.
176. Charrin, S.; Jouannet, S.; Boucheix, C.; Rubinstein, E. Tetraspanins at a Glance. *J Cell Sci* **2014**, *127*, 3641–3648, doi:10.1242/JCS.154906.
 177. Fordjour, F.K.; Guo, C.; Ai, Y.; Daaboul, G.G.; Gould, S.J. A Shared, Stochastic Pathway Mediates Exosome Protein Budding along Plasma and Endosome Membranes. *J Biol Chem* **2022**, *298*, doi:10.1016/J.JBC.2022.102394.
 178. Mathieu, M.; Névo, N.; Jouve, M.; Valenzuela, J.I.; Maurin, M.; Verweij, F.J.; Palmulli, R.; Lankar, D.; Dingli, F.; Loew, D.; et al. Specificities of Exosome versus Small Ectosome Secretion Revealed by Live Intracellular Tracking of CD63 and CD9. *Nature Communications* **2021**, *12*, 1–18, doi:10.1038/s41467-021-24384-2.
 179. Géminard, C.; de Gassart, A.; Blanc, L.; Vidal, M. Degradation of AP2 during Reticulocyte Maturation Enhances Binding of Hsc70 and Alix to a Common Site on TFR for Sorting into Exosomes. *Traffic* **2004**, *5*, 181–193, doi:10.1111/J.1600-0854.2004.0167.X.
 180. De Gassart, A.; Géminard, C.; Février, B.; Raposo, G.; Vidal, M. Lipid Raft-Associated Protein Sorting in Exosomes. *Blood* **2003**, *102*, 4336–4344, doi:10.1182/BLOOD-2003-03-0871.
 181. Buschow, S.I.; Liefhebber, J.M.P.; Wubbolts, R.; Stoorvogel, W. Exosomes Contain Ubiquitinated Proteins. *Blood Cells Mol Dis* **2005**, *35*, 398–403, doi:10.1016/J.BCMD.2005.08.005.
 182. Luhtala, N.; Aslanian, A.; Yates, J.R.; Hunter, T. Secreted Glioblastoma Nanovesicles Contain Intracellular Signaling Proteins and Active Ras Incorporated in a Farnesylation-Dependent Manner. *J Biol Chem* **2017**, *292*, 611–628, doi:10.1074/JBC.M116.747618.
 183. Valadi, H.; Ekström, K.; Bossios, A.; Sjöstrand, M.; Lee, J.J.; Lötvall, J.O. Exosome-Mediated Transfer of MRNAs and MicroRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells. *Nat Cell Biol* **2007**, *9*, 654–659, doi:10.1038/NCB1596.
 184. Thakur, B.K.; Zhang, H.; Becker, A.; Matei, I.; Huang, Y.; Costa-Silva, B.; Zheng, Y.; Hoshino, A.; Brazier, H.; Xiang, J.; et al. Double-Stranded DNA in Exosomes: A Novel Biomarker in Cancer Detection. *Cell Research* **2014**, *24*, 766–769, doi:10.1038/cr.2014.44.
 185. Villarroja-Beltri, C.; Gutiérrez-Vázquez, C.; Sánchez-Cabo, F.; Pérez-Hernández, D.; Vázquez, J.; Martín-Cofreces, N.; Martínez-Herrera, D.J.; Pascual-Montano, A.; Mittelbrunn, M.; Sánchez-Madrid, F. Sumoylated HnRNP A2B1 Controls the Sorting of MiRNAs into Exosomes through Binding to Specific Motifs. *Nature Communications* **2013**, *4*, 1–10, doi:10.1038/ncomms3980.
 186. Irion, U.; St Johnston, D. Bicoid RNA Localization Requires Specific Binding of an Endosomal Sorting Complex. *Nature* **2007**, *445*, 554, doi:10.1038/NATURE05503.
 187. Perez-Hernandez, D.; Gutiérrez-Vázquez, C.; Jorge, I.; López-Martín, S.; Ursa, A.; Sánchez-Madrid, F.; Vázquez, J.; Yañez-Mó, M. The Intracellular Interactome of Tetraspanin-Enriched Microdomains Reveals Their Function as Sorting Machineries

- toward Exosomes. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 11649–11661, doi:10.1074/JBC.M112.445304.
188. Gibbings, D.J.; Ciaudo, C.; Erhardt, M.; Voinnet, O. Multivesicular Bodies Associate with Components of MiRNA Effector Complexes and Modulate MiRNA Activity. *Nat Cell Biol* **2009**, *11*, 1143–1149, doi:10.1038/NCB1929.
 189. McKenzie, A.J.; Hoshino, D.; Hong, N.H.; Cha, D.J.; Franklin, J.L.; Coffey, R.J.; Patton, J.G.; Weaver, A.M. KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. *Cell Rep* **2016**, *15*, 978–987, doi:10.1016/J.CELREP.2016.03.085.
 190. Teng, Y.; Ren, Y.; Hu, X.; Mu, J.; Samykutty, A.; Zhuang, X.; Deng, Z.; Kumar, A.; Zhang, L.; Merchant, M.L.; et al. MVP-Mediated Exosomal Sorting of MiR-193a Promotes Colon Cancer Progression. *Nature Communications* **2017**, *8*, 1–16, doi:10.1038/ncomms14448.
 191. Lin, F.; Zeng, Z.; Song, Y.; Li, L.; Wu, Z.; Zhang, X.; Li, Z.; Ke, X.; Hu, X. YBX-1 Mediated Sorting of MiR-133 into Hypoxia/Reoxygenation-Induced EPC-Derived Exosomes to Increase Fibroblast Angiogenesis and MEndoT. *Stem Cell Res Ther* **2019**, *10*, doi:10.1186/S13287-019-1377-8.
 192. Lu, P.; Li, H.; Li, N.; Singh, R.N.; Bishop, C.E.; Chen, X.; Lu, B. MEX3C Interacts with Adaptor-Related Protein Complex 2 and Involves in MiR-451a Exosomal Sorting. *PLoS One* **2017**, *12*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0185992.
 193. Temoche-Diaz, M.M.; Shurtleff, M.J.; Nottingham, R.M.; Yao, J.; Fadadu, R.P.; Lambowitz, A.M.; Schekman, R. Distinct Mechanisms of MicroRNA Sorting into Cancer Cell-Derived Extracellular Vesicle Subtypes. *Elife* **2019**, *8*, doi:10.7554/ELIFE.47544.
 194. Mateescu, B.; Kowal, E.J.K.; van Balkom, B.W.M.; Bartel, S.; Bhattacharyya, S.N.; Buzás, E.I.; Buck, A.H.; de Candia, P.; Chow, F.W.N.; Das, S.; et al. Obstacles and Opportunities in the Functional Analysis of Extracellular Vesicle RNA - an ISEV Position Paper. *J Extracell Vesicles* **2017**, *6*, doi:10.1080/20013078.2017.1286095.
 195. Edgar, J.R.; Eden, E.R.; Futter, C.E. Hrs- and CD63-Dependent Competing Mechanisms Make Different Sized Endosomal Intraluminal Vesicles. *Traffic* **2014**, *15*, 197–211, doi:10.1111/TRA.12139.
 196. Hristov, M.; Erl, W.; Linder, S.; Weber, P.C. Apoptotic Bodies from Endothelial Cells Enhance the Number and Initiate the Differentiation of Human Endothelial Progenitor Cells in Vitro. *Blood* **2004**, *104*, 2761–2766, doi:10.1182/BLOOD-2003-10-3614.
 197. Minciocchi, V.R.; Freeman, M.R.; Di Vizio, D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* **2015**, *40*, 41, doi:10.1016/J.SEMCDB.2015.02.010.
 198. Piccin, A.; Murphy, W.G.; Smith, O.P. Circulating Microparticles: Pathophysiology and Clinical Implications. *Blood Rev* **2007**, *21*, 157–171, doi:10.1016/J.BLRE.2006.09.001.
 199. Mulcahy, L.A.; Pink, R.C.; Carter, D.R.F. Routes and Mechanisms of Extracellular Vesicle Uptake. *J Extracell Vesicles* **2014**, *3*, doi:10.3402/JEV.V3.24641.

200. Pizzirani, C.; Ferrari, D.; Chiozzi, P.; Adinolfi, E.; Sandonà, D.; Savaglio, E.; Di Virgilio, F. Stimulation of P2 Receptors Causes Release of IL-1 β -Loaded Microvesicles from Human Dendritic Cells. *Blood* **2007**, *109*, 3856–3864, doi:10.1182/BLOOD-2005-06-031377.
201. Hur, Y.H.; Cerione, R.A.; Antonyak, M.A. Extracellular Vesicles and Their Roles in Stem Cell Biology. *Stem Cells* **2020**, *38*, 469–476, doi:10.1002/STEM.3140.
202. Barile, L.; Lionetti, V.; Cervio, E.; Matteucci, M.; Gherghiceanu, M.; Popescu, L.M.; Torre, T.; Siclari, F.; Moccetti, T.; Vassalli, G. Extracellular Vesicles from Human Cardiac Progenitor Cells Inhibit Cardiomyocyte Apoptosis and Improve Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Cardiovasc Res* **2014**, *103*, 530–541, doi:10.1093/CVR/CVU167.
203. Andriolo, G.; Provasi, E.; Lo Cicero, V.; Brambilla, A.; Soncin, S.; Torre, T.; Milano, G.; Biemmi, V.; Vassalli, G.; Turchetto, L.; et al. Exosomes From Human Cardiac Progenitor Cells for Therapeutic Applications: Development of a GMP-Grade Manufacturing Method. *Front Physiol* **2018**, *9*, doi:10.3389/FPHYS.2018.01169.
204. Dougherty, J.A.; Patel, N.; Kumar, N.; Rao, S.G.; Angelos, M.G.; Singh, H.; Cai, C.; Khan, M. Human Cardiac Progenitor Cells Enhance Exosome Release and Promote Angiogenesis Under Physoxia. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, doi:10.3389/FCELL.2020.00130.
205. Youn, S.W.; Li, Y.; Kim, Y.M.; Sudhakar, V.; Abdelsaid, K.; Kim, H.W.; Liu, Y.; Fulton, D.J.R.; Ashraf, M.; Tang, Y.; et al. Modification of Cardiac Progenitor Cell-Derived Exosomes by MiR-322 Provides Protection against Myocardial Infarction through Nox2-Dependent Angiogenesis. *Antioxidants (Basel)* **2019**, *8*, doi:10.3390/ANTIOX8010018.
206. Anderson, J.D.; Johansson, H.J.; Graham, C.S.; Vesterlund, M.; Pham, M.T.; Bramlett, C.S.; Montgomery, E.N.; Mellema, M.S.; Bordini, R.L.; Contreras, Z.; et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Mesenchymal Stem Cell Exosomes Reveals Modulation of Angiogenesis via Nuclear Factor-KappaB Signaling. *Stem Cells* **2016**, *34*, 601–613, doi:10.1002/STEM.2298.
207. Gonzalez-King, H.; García, N.A.; Ontoria-Oviedo, I.; Ciria, M.; Montero, J.A.; Sepúlveda, P. Hypoxia Inducible Factor-1 α Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Stem Cells* **2017**, *35*, 1747–1759, doi:10.1002/stem.2618.
208. Huang, P.; Wang, L.; Li, Q.; Tian, X.; Xu, J.; Xu, J.; Xiong, Y.; Chen, G.; Qian, H.; Jin, C.; et al. Atorvastatin Enhances the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes in Acute Myocardial Infarction via up-Regulating Long Non-Coding RNA H19. *Cardiovasc Res* **2020**, *116*, 353–367, doi:10.1093/CVR/CVZ139.
209. Sun, X.; Shan, A.; Wei, Z.; Xu, B. Intravenous Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorate Myocardial Inflammation in the Dilated Cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* **2018**, *503*, 2611–2618, doi:10.1016/J.BBRC.2018.08.012.
210. Thorburn, A. Apoptosis and Autophagy: Regulatory Connections between Two Supposedly Different Processes. *Apoptosis* **2008**, *13*, 1–9, doi:10.1007/S10495-007-0154-9.

211. Yang, Y.; Li, Y.; Chen, X.; Cheng, X.; Liao, Y.; Yu, X. Exosomal Transfer of MiR-30a between Cardiomyocytes Regulates Autophagy after Hypoxia. *J Mol Med (Berl)* **2016**, *94*, 711–724, doi:10.1007/S00109-016-1387-2.
212. Vicencio, J.M.; Yellon, D.M.; Sivaraman, V.; Das, D.; Boi-Doku, C.; Arjun, S.; Zheng, Y.; Riquelme, J.A.; Kearney, J.; Sharma, V.; et al. Plasma Exosomes Protect the Myocardium from Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Coll Cardiol* **2015**, *65*, 1525–1536, doi:10.1016/J.JACC.2015.02.026.
213. Dergilev, K. V.; Shevchenko, E.K.; Tsokolaeva, Z.I.; Beloglazova, I.B.; Zubkova, E.S.; Boldyreva, M.A.; Menshikov, M.Y.; Ratner, E.I.; Penkov, D.; Parfyonova, Y. V. Cell Sheet Comprised of Mesenchymal Stromal Cells Overexpressing Stem Cell Factor Promotes Epicardium Activation and Heart Function Improvement in a Rat Model of Myocardium Infarction. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 1–20, doi:10.3390/IJMS21249603.
214. D’Ascenzo, F.; Femminò, S.; Ravera, F.; Angelini, F.; Caccioppo, A.; Franchin, L.; Grosso, A.; Comità, S.; Cavallari, C.; Penna, C.; et al. Extracellular Vesicles from Patients with Acute Coronary Syndrome Impact on Ischemia-Reperfusion Injury. *Pharmacol Res* **2021**, *170*, doi:10.1016/J.PHRS.2021.105715.
215. Zhao, J.; Li, X.; Hu, J.; Chen, F.; Qiao, S.; Sun, X.; Gao, L.; Xie, J.; Xu, B. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Attenuate Myocardial Ischaemia-Reperfusion Injury through MiR-182-Regulated Macrophage Polarization. *Cardiovasc Res* **2019**, *115*, 1205–1216, doi:10.1093/CVR/CVZ040.
216. Lima Correa, B.; El Harane, N.; Gomez, I.; Rachid Hocine, H.; Vilar, J.; Desgres, M.; Bellamy, V.; Keirthishana, K.; Guillas, C.; Perotto, M.; et al. Extracellular Vesicles from Human Cardiovascular Progenitors Trigger a Reparative Immune Response in Infarcted Hearts. *Cardiovasc Res* **2021**, *117*, 292–307, doi:10.1093/CVR/CVAA028.
217. Shao, L.; Zhang, Y.; Lan, B.; Wang, J.; Zhang, Z.; Zhang, L.; Xiao, P.; Meng, Q.; Geng, Y.J.; Yu, X.Y.; et al. MiRNA-Sequence Indicates That Mesenchymal Stem Cells and Exosomes Have Similar Mechanism to Enhance Cardiac Repair. *Biomed Res Int* **2017**, *2017*, doi:10.1155/2017/4150705.
218. Xu, R.; Zhang, F.; Chai, R.; Zhou, W.; Hu, M.; Liu, B.; Chen, X.; Liu, M.; Xu, Q.; Liu, N.; et al. Exosomes Derived from Pro-Inflammatory Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Reduce Inflammation and Myocardial Injury via Mediating Macrophage Polarization. *J Cell Mol Med* **2019**, *23*, 7617–7631, doi:10.1111/JCMM.14635.
219. Ning, Y.; Huang, P.; Chen, G.; Xiong, Y.; Gong, Z.; Wu, C.; Xu, J.; Jiang, W.; Li, X.; Tang, R.; et al. Atorvastatin-Pretreated Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Cardiac Repair after Myocardial Infarction via Shifting Macrophage Polarization by Targeting MicroRNA-139-3p/Stat1 Pathway. *BMC Med* **2023**, *21*, doi:10.1186/S12916-023-02778-X.
220. Zarling, J.M.; Shoyab, M.; Marquardt, H.; Hanson, M.B.; Lioubin, M.N.; Todaro, G.J. Oncostatin M: A Growth Regulator Produced by Differentiated Histiocytic Lymphoma Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 9739–9743, doi:10.1073/PNAS.83.24.9739.
221. Nair, B.C.; DeVico, A.L.; Nakamura, S.; Copeland, T.D.; Chen, Y.; Patel, A.; O’Neil, T.; Oroszlan, S.; Gallo, R.C.; Sarngadharan, M.G. Identification of a Major Growth Factor for

- AIDS-Kaposi's Sarcoma Cells as Oncostatin M. *Science* **1992**, 255, 1430–1432, doi:10.1126/SCIENCE.1542792.
222. Yoshimura, A.; Ichihara, M.; Kinjyo, I.; Moriyama, M.; Copeland, N.G.; Gilbert, D.J.; Jenkins, N.A.; Hara, T.; Miyajima, A. Mouse Oncostatin M: An Immediate Early Gene Induced by Multiple Cytokines through the JAK-STAT5 Pathway. *EMBO J* **1996**, 15, 1055–1063, doi:10.1002/J.1460-2075.1996.TB00443.X.
 223. Mosley, B.; De Imus, C.; Friend, D.; Boiani, N.; Thoma, B.; Park, L.S.; Cosman, D. Dual Oncostatin M (OSM) Receptors. Cloning and Characterization of an Alternative Signaling Subunit Conferring OSM-Specific Receptor Activation. *J Biol Chem* **1996**, 271, 32635–32643, doi:10.1074/JBC.271.51.32635.
 224. Heinrich, P.C.; Behrmann, I.; Müller-Newen, G.; Schaper, F.; Graeve, L. Interleukin-6-Type Cytokine Signalling through the Gp130/Jak/STAT Pathway. *Biochem J* **1998**, 334 (Pt 2), 297–314, doi:10.1042/BJ3340297.
 225. Adrian-Segarra, J.M.; Schindler, N.; Gajawada, P.; Lörchner, H.; Braun, T.; Pöling, J. The AB Loop and D-Helix in Binding Site III of Human Oncostatin M (OSM) Are Required for OSM Receptor Activation. *J Biol Chem* **2018**, 293, 7017–7029, doi:10.1074/JBC.RA118.001920.
 226. Hemmann, U.; Gerhartz, C.; Heesel, B.; Sasse, J.; Kurapkat, G.; Grötzingerl, J.; Wollmert, A.; Zhong, Z.; Darnell, J.E.; Graeve, L.; et al. Differential Activation of Acute Phase Response Factor/Stat3 and Stat1 via the Cytoplasmic Domain of the Interleukin 6 Signal Transducer Gp130. II. Src Homology SH2 Domains Define the Specificity of Stat Factor Activation. *J Biol Chem* **1996**, 271, 12999–13007, doi:10.1074/JBC.271.22.12999.
 227. Stahl, N.; Farruggella, T.J.; Boulton, T.G.; Zhong, Z.; Darnell, J.E.; Yancopoulos, G.D. Choice of STATs and Other Substrates Specified by Modular Tyrosine-Based Motifs in Cytokine Receptors. *Science* **1995**, 267, 1349–1353, doi:10.1126/SCIENCE.7871433.
 228. Hermanns, H.M. Oncostatin M and Interleukin-31: Cytokines, Receptors, Signal Transduction and Physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* **2015**, 26, 545–558, doi:10.1016/J.CYTOGFR.2015.07.006.
 229. Richards, C.D. The Enigmatic Cytokine Oncostatin m and Roles in Disease. *ISRN Inflamm* **2013**, 2013, 1–23, doi:10.1155/2013/512103.
 230. Stawski, L.; Trojanowska, M. Oncostatin M and Its Role in Fibrosis. *Connect Tissue Res* **2019**, 60, 40, doi:10.1080/03008207.2018.1500558.
 231. West, N.R.; Owens, B.M.J.; Hegazy, A.N. The Oncostatin M-Stromal Cell Axis in Health and Disease. *Scand J Immunol* **2018**, 88, doi:10.1111/SJI.12694.
 232. Vasse, M.; Pourtau, J.; Trochon, V.; Muraine, M.; Vannier, J.P.; Lu, H.; Soria, J.; Soria, C. Oncostatin M Induces Angiogenesis in Vitro and in Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1999**, 19, 1835–1842, doi:10.1161/01.ATV.19.8.1835.
 233. Wijelath, E.S.; Carlsen, B.; Cole, T.; Chen, J.; Kothari, S.; Hammond, W.P. Oncostatin M Induces Basic Fibroblast Growth Factor Expression in Endothelial Cells and Promotes Endothelial Cell Proliferation, Migration and Spindle Morphology. *J Cell Sci* **1997**, 110 (Pt 7), 871–879, doi:10.1242/JCS.110.7.871.

234. Pourtau, J.; Mirshahi, F.; Li, H.; Muraine, M.; Vincent, L.; Tedgui, A.; Vannier, J.P.; Soria, J.; Vasse, M.; Soria, C. Cyclooxygenase-2 Activity Is Necessary for the Angiogenic Properties of Oncostatin M. *FEBS Lett* **1999**, *459*, 453–457, doi:10.1016/S0014-5793(99)01301-0.
235. Schnittker, D.; Kwofie, K.; Ashkar, A.; Trigatti, B.; Richards, C.D. Oncostatin M and TLR-4 Ligand Synergize to Induce MCP-1, IL-6, and VEGF in Human Aortic Adventitial Fibroblasts and Smooth Muscle Cells. *Mediators Inflamm* **2013**, *2013*, 317503–317503, doi:10.1155/2013/317503.
236. Rychli, K.; Kaun, C.; Hohensinner, P.J.; Rega, G.; Pfaffenberger, S.; Vyskocil, E.; Breuss, J.M.; Furnkranz, A.; Uhrin, P.; Zaujec, J.; et al. The Inflammatory Mediator Oncostatin M Induces Angiopoietin 2 Expression in Endothelial Cells in Vitro and in Vivo. *J Thromb Haemost* **2010**, *8*, 596, doi:10.1111/J.1538-7836.2010.03741.X.
237. Odekon, L.E.; Sato, Y.; Rifkin, D.B. Urokinase-type Plasminogen Activator Mediates Basic Fibroblast Growth Factor-induced Bovine Endothelial Cell Migration Independent of Its Proteolytic Activity. *J Cell Physiol* **1992**, *150*, 258–263, doi:10.1002/jcp.1041500206.
238. Zhang, X.; Zhu, D.; Wei, L.; Zhao, Z.; Qi, X.; Li, Z.; Sun, D. OSM Enhances Angiogenesis and Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, doi:10.1155/2015/317905.
239. Modur, V.; Feldhaus, M.J.; Weyrich, A.S.; Jicha, D.L.; Prescott, S.M.; Zimmerman, G.A.; McIntyre, T.M. Oncostatin M Is a Proinflammatory Mediator. In Vivo Effects Correlate with Endothelial Cell Expression of Inflammatory Cytokines and Adhesion Molecules. *Journal of Clinical Investigation* **1997**, *100*, 158, doi:10.1172/JCI119508.
240. Kerfoot, S.M.; Raharjo, E.; Ho, M.; Kaur, J.; Serirom, S.; McCafferty, D.M.; Burns, A.R.; Patel, K.D.; Kubes, P. Exclusive Neutrophil Recruitment with Oncostatin M in a Human System. *Am J Pathol* **2001**, *159*, 1531–1539, doi:10.1016/S0002-9440(10)62538-2.
241. Lafontant, P.J.; Burns, A.R.; Donnachie, E.; Haudek, S.B.; Smith, C.W.; Entman, M.L. Oncostatin M Differentially Regulates CXC Chemokines in Mouse Cardiac Fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **2006**, *291*, doi:10.1152/AJPCELL.00322.2005.
242. Abe, H.; Takeda, N.; Isagawa, T.; Semba, H.; Nishimura, S.; Morioka, M.S.; Nakagama, Y.; Sato, T.; Soma, K.; Koyama, K.; et al. Macrophage Hypoxia Signaling Regulates Cardiac Fibrosis via Oncostatin M. *Nature Communications* **2019**, *10*, 1–10, doi:10.1038/s41467-019-10859-w.
243. Huguier, V.; Giot, J.P.; Simonneau, M.; Levillain, P.; Charreau, S.; Garcia, M.; Jégou, J.F.; Bodet, C.; Morel, F.; Lecron, J.C.; et al. Oncostatin M Exerts a Protective Effect against Excessive Scarring by Counteracting the Inductive Effect of TGFβ1 on Fibrosis Markers. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 1–10, doi:10.1038/s41598-019-38572-0.
244. Kubin, T.; Pöling, J.; Kostin, S.; Gajawada, P.; Hein, S.; Rees, W.; Wietelmann, A.; Tanaka, M.; Lörchner, H.; Schimanski, S.; et al. Oncostatin M Is a Major Mediator of Cardiomyocyte Dedifferentiation and Remodeling. *Cell Stem Cell* **2011**, *9*, 420–432, doi:10.1016/J.STEM.2011.08.013.
245. Pöling, J.; Gajawada, P.; Lörchner, H.; Polyakova, V.; Szibor, M.; Böttger, T.; Warnecke, H.; Kubin, T.; Braun, T. The Janus Face of OSM-Mediated Cardiomyocyte

- Dedifferentiation during Cardiac Repair and Disease. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 439–445, doi:10.4161/CC.11.3.19024.
246. Kidd, S.; Kelley, M.R.; Young, M.W. Sequence of the Notch Locus of *Drosophila Melanogaster*: Relationship of the Encoded Protein to Mammalian Clotting and Growth Factors. *Mol Cell Biol* **1986**, *6*, 3094, doi:10.1128/MCB.6.9.3094.
 247. Monticone, G.; Miele, L. Notch Pathway: A Journey from Notching Phenotypes to Cancer Immunotherapy. *Adv Exp Med Biol* **2021**, *1287*, 201–222, doi:10.1007/978-3-030-55031-8_13.
 248. Li, K.; Li, Y.; Wu, W.; Gordon, W.R.; Chang, D.W.; Lu, M.; Scoggin, S.; Fu, T.; Vien, L.; Histen, G.; et al. Modulation of Notch Signaling by Antibodies Specific for the Extracellular Negative Regulatory Region of NOTCH3. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 8046–8054, doi:10.1074/JBC.M800170200.
 249. Nistri, S.; Sassoli, C.; Bani, D. Notch Signaling in Ischemic Damage and Fibrosis: Evidence and Clues from the Heart. *Front Pharmacol* **2017**, *8*, 260676, doi:10.3389/FPHAR.2017.00187/BIBTEX.
 250. Siebel, C.; Lendahl, U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev* **2017**, *97*, 1235–1294, doi:10.1152/PHYSREV.00005.2017.
 251. Zhou, X.L.; Liu, J.C. Role of Notch Signaling in the Mammalian. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2014**, *47*, 1, doi:10.1590/1414-431X20133177.
 252. Wang, Y.; Fang, Y.; Lu, P.; Wu, B.; Zhou, B. NOTCH Signaling in Aortic Valve Development and Calcific Aortic Valve Disease. *Front Cardiovasc Med* **2021**, *8*, 682298, doi:10.3389/FCVM.2021.682298.
 253. Gude, N.A.; Emmanuel, G.; Wu, W.; Cottage, C.T.; Fischer, K.; Quijada, P.; Muraski, J.A.; Alvarez, R.; Rubio, M.; Schaefer, E.; et al. Activation of Notch-Mediated Protective Signaling in the Myocardium. *Circ Res* **2008**, *102*, 1025–1035, doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.164749.
 254. Marracino, L.; Fortini, F.; Bouhamida, E.; Camponogara, F.; Severi, P.; Mazzoni, E.; Patergnani, S.; D’Aniello, E.; Campana, R.; Pinton, P.; et al. Adding a “Notch” to Cardiovascular Disease Therapeutics: A MicroRNA-Based Approach. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, 695114, doi:10.3389/FCCELL.2021.695114/BIBTEX.
 255. Zhou, X. liang; Wan, L.; Xu, Q. rong; Zhao, Y.; Liu, J. chun Notch Signaling Activation Contributes to Cardioprotection Provided by Ischemic Preconditioning and Postconditioning. *J Transl Med* **2013**, *11*, 251, doi:10.1186/1479-5876-11-251.
 256. Pei, H.; Song, X.; Peng, C.; Tan, Y.; Li, Y.; Li, X.; Ma, S.; Wang, Q.; Huang, R.; Yang, D.; et al. TNF- α Inhibitor Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury via Notch1-Mediated Suppression of Oxidative/Nitrative Stress. *Free Radic Biol Med* **2015**, *82*, 114–121, doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2015.02.002.
 257. Pei, H.; Song, X.; Peng, C.; Tan, Y.; Li, Y.; Li, X.; Ma, S.; Wang, Q.; Huang, R.; Yang, D.; et al. TNF- α Inhibitor Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury via Notch1-Mediated Suppression of Oxidative/Nitrative Stress. *Free Radic Biol Med* **2015**, *82*, 114–121, doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2015.02.002.

258. Fre, S.; Huyghe, M.; Mourikis, P.; Robine, S.; Louvard, D.; Artavanis-Tsakonas, S. Notch Signals Control the Fate of Immature Progenitor Cells in the Intestine. *Nature* **2005** *435*:7044 **2005**, 435, 964–968, doi:10.1038/nature03589.
259. Fre, S.; Huyghe, M.; Mourikis, P.; Robine, S.; Louvard, D.; Artavanis-Tsakonas, S. Notch Signals Control the Fate of Immature Progenitor Cells in the Intestine. *Nature* **2005** *435*:7044 **2005**, 435, 964–968, doi:10.1038/nature03589.
260. Zhang, R.; Han, P.; Yang, H.; Ouyang, K.; Lee, D.; Lin, Y.F.; Ocorr, K.; Kang, G.; Chen, J.; Stainier, D.Y.R.; et al. In Vivo Cardiac Reprogramming Contributes to Zebrafish Heart Regeneration. *Nature* **2013**, *498*, 497, doi:10.1038/NATURE12322.
261. Zhao, L.; Ben-Yair, R.; Burns, C.E.; Burns, C.G. Endocardial Notch Signaling Promotes Cardiomyocyte Proliferation in the Regenerating Zebrafish Heart through Wnt Pathway Antagonism. *Cell Rep* **2019**, *26*, 546-554.e5, doi:10.1016/J.CELREP.2018.12.048.
262. Gálvez-Santisteban, M.; Chen, D.; Zhang, R.; Serrano, R.; Nguyen, C.; Zhao, L.; Nerb, L.; Masutani, E.M.; Vermot, J.; Burns, C.G.; et al. Hemodynamic-Mediated Endocardial Signaling Controls in Vivo Myocardial Reprogramming. *Elife* **2019**, *8*, doi:10.7554/ELIFE.44816.
263. Gálvez-Santisteban, M.; Chen, D.; Zhang, R.; Serrano, R.; Nguyen, C.; Zhao, L.; Nerb, L.; Masutani, E.M.; Vermot, J.; Burns, C.G.; et al. Hemodynamic-Mediated Endocardial Signaling Controls in Vivo Myocardial Reprogramming. *Elife* **2019**, *8*, doi:10.7554/ELIFE.44816.
264. Garcia, A.; Kandel, J.J. Notch: A Key Regulator of Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Histol Histopathol* **2012**, *27*, 151–156, doi:10.14670/HH-27.151.
265. Garcia, A.; Kandel, J.J. Notch: A Key Regulator of Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Histol Histopathol* **2012**, *27*, 151, doi:10.14670/HH-27.151.
266. Akil, A.; Gutiérrez-García, A.K.; Guenter, R.; Rose, J.B.; Beck, A.W.; Chen, H.; Ren, B. Notch Signaling in Vascular Endothelial Cells, Angiogenesis, and Tumor Progression: An Update and Prospective. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, 642352, doi:10.3389/FCELL.2021.642352/BIBTEX.
267. Naito, H.; Iba, T.; Takakura, N. Mechanisms of New Blood-Vessel Formation and Proliferative Heterogeneity of Endothelial Cells. *Int Immunol* **2020**, *32*, 295–305, doi:10.1093/INTIMM/DXAA008.
268. Taslimi, S.; Das, S. Angiogenesis and Angiogenesis Inhibitors in Brain Tumors. *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy, Molecular Therapeutics, and Immunotherapy: Second Edition* **2018**, 361–371, doi:10.1016/B978-0-12-812100-9.00027-9.
269. Tsai, C.C.; Chen, Y.J.; Yew, T.L.; Chen, L.L.; Wang, J.Y.; Chiu, C.H.; Hung, S.C. Hypoxia Inhibits Senescence and Maintains Mesenchymal Stem Cell Properties through Down-Regulation of E2A-P21 by HIF-TWIST. *Blood* **2011**, *117*, 459–469, doi:10.1182/BLOOD-2010-05-287508.
270. Tian, Q.; Xue, Y.; Zheng, W.; Sun, R.; Ji, W.; Wang, X.; An, R. Overexpression of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Induces Migration and Invasion through Notch Signaling. *Int J Oncol* **2015**, *47*, 728–738, doi:10.3892/IJO.2015.3056/HTML.

271. Boopathy, A. V.; Martinez, M.D.; Smith, A.W.; Brown, M.E.; García, A.J.; Davis, M.E. Intramyocardial Delivery of Notch Ligand-Containing Hydrogels Improves Cardiac Function and Angiogenesis Following Infarction. *Tissue Eng Part A* **2015**, *21*, 2315, doi:10.1089/TEN.TEA.2014.0622.
272. Fan, Y.H.; Dong, H.; Pan, Q.; Cao, Y.J.; Li, H.; Wang, H.C. Notch Signaling May Negatively Regulate Neonatal Rat Cardiac Fibroblast-Myofibroblast Transformation. *Physiol Res* **2011**, *60*, 739–748, doi:10.33549/PHYSIOLRES.932149.
273. Zhang, M.; Pan, X.; Zou, Q.; Xia, Y.; Chen, J.; Hao, Q.; Wang, H.; Sun, D. Notch3 Ameliorates Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction by Inhibiting the TGF- β 1/Smad3 Pathway. *Cardiovasc Toxicol* **2016**, *16*, 316–324, doi:10.1007/S12012-015-9341-Z.
274. Gómez-Ferrer, M.; Villanueva-Badenas, E.; Sánchez-Sánchez, R.; Sánchez-López, C.M.; Baquero, M.C.; Sepúlveda, P.; Dorronsoro, A. Hif-1 α and pro-Inflammatory Signaling Improves the Immunomodulatory Activity of MSC-Derived Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/IJMS22073416/S1.
275. Watkins, S.J.; Borthwick, G.M.; Arthur, H.M. The H9C2 Cell Line and Primary Neonatal Cardiomyocyte Cells Show Similar Hypertrophic Responses in Vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2011**, *47*, 125–131, doi:10.1007/S11626-010-9368-1.
276. Kuznetsov, A. V.; Javadov, S.; Sickinger, S.; Frotschnig, S.; Grimm, M. H9c2 and HL-1 Cells Demonstrate Distinct Features of Energy Metabolism, Mitochondrial Function and Sensitivity to Hypoxia-Reoxygenation. *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1853*, 276–284, doi:10.1016/J.BBAMCR.2014.11.015.
277. New Ways to Study the Elusive Exosome | Proteintech Group Available online: <https://www.ptglab.com/news/blog/new-ways-to-study-the-elusive-exosome/> (accessed on 29 November 2023).
278. Garcia, N.A.; Ontoria-Oviedo, I.; González-King, H.; Diez-Juan, A.; Sepúlveda, P. Glucose Starvation in Cardiomyocytes Enhances Exosome Secretion and Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells. *PLoS One* **2015**, *10*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0138849.
279. Palano, G.; Jansson, M.; Backmark, A.; Martinsson, S.; Sabirsh, A.; Hultenby, K.; Åkerblad, P.; Granberg, K.L.; Jennbacken, K.; Müllers, E.; et al. A High-Content, in Vitro Cardiac Fibrosis Assay for High-Throughput, Phenotypic Identification of Compounds with Anti-Fibrotic Activity. *J Mol Cell Cardiol* **2020**, *142*, 105–117, doi:10.1016/J.YJMCC.2020.04.002.
280. Silva, A.M.; Lázaro-Ibáñez, E.; Gunnarsson, A.; Dhande, A.; Daaboul, G.; Peacock, B.; Osteikoetxea, X.; Salmond, N.; Friis, K.P.; Shatnyeva, O.; et al. Quantification of Protein Cargo Loading into Engineered Extracellular Vesicles at Single-vesicle and Single-molecule Resolution. *J Extracell Vesicles* **2021**, *10*, doi:10.1002/JEV2.12130.
281. Stanton, H.C.; Bowman, Z. Studies on Isoproterenol-Induced Cardiomegaly in Rats. *Proc West Pharmacol Soc* **1967**, *10*.
282. Chang, S.C.; Ren, S.; Rau, C.D.; Wang, J.J. Isoproterenol-Induced Heart Failure Mouse Model Using Osmotic Pump Implantation. *Methods Mol Biol* **2018**, *1816*, 207–220, doi:10.1007/978-1-4939-8597-5_16.

283. Jiang, X.Y.; Guan, F.F.; Ma, J.X.; Dong, W.; Qi, X.L.; Zhang, X.; Chen, W.; Gao, S.; Gao, X.; Pan, S.; et al. Cardiac-Specific Trim44 Knockout in Rat Attenuates Isoproterenol-Induced Cardiac Remodeling via Inhibition of AKT/MTOR Pathway. *Dis Model Mech* **2023**, *16*, doi:10.1242/DMM.049444.
284. Forte, E.; Panahi, M.; Baxan, N.; Ng, F.S.; Boyle, J.J.; Branca, J.; Bedard, O.; Hasham, M.G.; Benson, L.; Harding, S.E.; et al. Type 2 MI Induced by a Single High Dose of Isoproterenol in C57BL/6J Mice Triggers a Persistent Adaptive Immune Response against the Heart. *J Cell Mol Med* **2021**, *25*, 229–243, doi:10.1111/JCMM.15937.
285. Yuan, Y.; Zhang, Q.; Wu, B.; Huang, T.; Gong, P.; Xiang, L. Oncostatin M Regulates Macrophages Polarization in Osseointegration via Yes-Associated Protein. *Int Immunopharmacol* **2023**, *120*, 110348, doi:10.1016/J.INTIMP.2023.110348.
286. Shrivastava, R.; Asif, M.; Singh, V.; Dubey, P.; Ahmad Malik, S.; Lone, M.U.D.; Tewari, B.N.; Baghel, K.S.; Pal, S.; Nagar, G.K.; et al. M2 Polarization of Macrophages by Oncostatin M in Hypoxic Tumor Microenvironment Is Mediated by MTORC2 and Promotes Tumor Growth and Metastasis. *Cytokine* **2019**, *118*, 130–143, doi:10.1016/J.CYTO.2018.03.032.
287. Xiang, S.; Li, J.; Zhang, Z. MiR-26b Inhibits Isoproterenol-Induced Cardiac Fibrosis via the Keap1/Nrf2 Signaling Pathway. *Exp Ther Med* **2020**, *19*, 2067, doi:10.3892/ETM.2020.8455.
288. Xue, Y.; Fan, X.; Yang, R.; Jiao, Y.; Li, Y. MiR-29b-3p Inhibits Post-Infarct Cardiac Fibrosis by Targeting FOS. *Biosci Rep* **2020**, *40*, doi:10.1042/BSR20201227.
289. Li, Z.; Yi, N.; Chen, R.; Meng, Y.; Wang, Y.; Liu, H.; Cao, W.; Hu, Y.; Gu, Y.; Tong, C.; et al. MiR-29b-3p Protects Cardiomyocytes against Endotoxin-Induced Apoptosis and Inflammatory Response through Targeting FOXO3A. *Cell Signal* **2020**, *74*, 109716, doi:10.1016/J.CELLSIG.2020.109716.
290. Li, J.; Salvador, A.M.; Li, G.; Valkov, N.; Ziegler, O.; Yeri, A.; Yang Xiao, C.; Meechoovet, B.; Alsop, E.; Rodosthenous, R.S.; et al. Mir-30d Regulates Cardiac Remodeling by Intracellular and Paracrine Signaling. *Circ Res* **2021**, *128*, E1–E23, doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317244.
291. Li, J.; Sha, Z.; Zhu, X.; Xu, W.; Yuan, W.; Yang, T.; Jin, B.; Yan, Y.; Chen, R.; Wang, S.; et al. Targeting MiR-30d Reverses Pathological Cardiac Hypertrophy. *EBioMedicine* **2022**, *81*, doi:10.1016/j.ebiom.2022.104108.
292. Boxhammer, E.; Wernly, B.; Kiss, A.; Paar, V.; Aigner, A.; Podesser, B.K.; Zauner, R.; Wally, V.; Koeller, C.; Hackl, M.; et al. Agomir of MiRNA-30d – a Potential New Therapeutic Target for Prevention of Ischemic Cardiomyopathy after Myocardial Infarction? *Eur Heart J* **2022**, *43*, doi:10.1093/EURHEARTJ/EHAC544.2904.
293. Li, Q.; Xie, J.; Li, R.; Shi, J.; Sun, J.; Gu, R.; Ding, L.; Wang, L.; Xu, B. Overexpression of MicroRNA-99a Attenuates Heart Remodelling and Improves Cardiac Performance after Myocardial Infarction. *J Cell Mol Med* **2014**, *18*, 919–928, doi:10.1111/JCMM.12242.
294. Li, Q.; Xie, J.; Wang, B.; Li, R.; Bai, J.; Ding, L.; Gu, R.; Wang, L.; Xu, B. Overexpression of MicroRNA-99a Attenuates Cardiac Hypertrophy. *PLoS One* **2016**, *11*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0148480.

295. Zhang, B.; Mao, S.; Liu, X.; Li, S.; Zhou, H.; Gu, Y.; Liu, W.; Fu, L.; Liao, C.; Wang, P. MiR-125b Inhibits Cardiomyocyte Apoptosis by Targeting BAK1 in Heart Failure. *Molecular Medicine* **2021**, *27*, 1–12, doi:10.1186/S10020-021-00328-W/FIGURES/6.
296. Chen, C.Y.; Lee, D.S.; Choong, O.K.; Chang, S.K.; Hsu, T.; Nicholson, M.W.; Liu, L.W.; Lin, P.J.; Ruan, S.C.; Lin, S.W.; et al. Cardiac-Specific MicroRNA-125b Deficiency Induces Perinatal Death and Cardiac Hypertrophy. *Scientific Reports* **2021**, *11*, 1–15, doi:10.1038/s41598-021-81700-y.
297. Wu, Z.; Geng, J.; Bai, Y.; Qi, Y.; Chang, C.; Jiao, Y.; Guo, Z. MiR-125b-5p Alleviates the Damage of Myocardial Infarction by Inhibiting the NFAT2 to Reduce F2RL2 Expression. *Regenerative Med* **2023**, *18*, 543–559, doi:10.2217/RME-2022-0150.
298. Shi, C.C.; Pan, L.Y.; Peng, Z.Y.; Li, J.G. MiR-126 Regulated Myocardial Autophagy on Myocardial Infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2020**, *24*, 6971–6979, doi:10.26355/EURREV_202006_21689.
299. Di, Y.F.; Li, D.C.; Shen, Y.Q.; Wang, C.L.; Zhang, D.Y.; Shang, A.Q.; Hu, T. MiR-146b Protects Cardiomyocytes Injury in Myocardial Ischemia/Reperfusion by Targeting Smad4. *Am J Transl Res* **2017**, *9*, 656.
300. Zhu, W.; Wang, Q.; Zhang, J.; Sun, L.; Hong, X.; Du, W.; Duan, R.; Jiang, J.; Ji, Y.; Wang, H.; et al. Exosomes Derived from Mir-214-3p Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Promote Myocardial Repair. *Biomater Res* **2023**, *27*, 1–15, doi:10.1186/S40824-023-00410-W/FIGURES/7.
301. Yang, K.; Shi, J.; Hu, Z.; Hu, X. The Deficiency of MiR-214-3p Exacerbates Cardiac Fibrosis via MiR-214-3p/NLRC5 Axis. *Clin Sci (Lond)* **2019**, *133*, 1845–1856, doi:10.1042/CS20190203.
302. Segovia Cubero, J.; Alonso-Pulpón Rivera, L.; Peralta Moral, R.; Silva Melchor, L. Heart Failure: Etiology and Approach to Diagnosis. *Revista Española de Cardiología (English Edition)* **2004**, *57*, 250–259, doi:10.1016/S1885-5857(06)60143-6.
303. Shahim, B.; Kapelios, C.J.; Savarese, G.; Lund, L.H. Global Public Health Burden of Heart Failure: An Updated Review. *Card Fail Rev* **2023**, *9*, doi:10.15420/CFR.2023.05.
304. Tomasoni, D.; Vishram-Nielsen, J.K.K.; Pagnesi, M.; Adamo, M.; Lombardi, C.M.; Gustafsson, F.; Metra, M. Advanced Heart Failure: Guideline-Directed Medical Therapy, Diuretics, Inotropes, and Palliative Care. *ESC Heart Fail* **2022**, *9*, 1507–1523, doi:10.1002/EHF2.13859.
305. Goldstein, D.; Frishman, W.H. Diastolic Heart Failure: A Review of Current and Future Treatment Options. *Cardiol Rev* **2021**, *29*, 82–88, doi:10.1097/CRD.0000000000000303.
306. Omote, K.; Verbrugge, F.H.; Borlaug, B.A. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Mechanisms and Treatment Strategies. *Annu Rev Med* **2022**, *73*, 321–337, doi:10.1146/ANNUREV-MED-042220-022745.
307. Lai, R.C.; Arslan, F.; Lee, M.M.; Sze, N.S.K.; Choo, A.; Chen, T.S.; Salto-Tellez, M.; Timmers, L.; Lee, C.N.; El Oakley, R.M.; et al. Exosome Secreted by MSC Reduces Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Stem Cell Res* **2010**, *4*, 214–222, doi:10.1016/J.SCR.2009.12.003.

308. Kompa, A.R.; Greening, D.W.; Kong, A.M.; McMillan, P.J.; Fang, H.; Saxena, R.; Wong, R.C.B.; Lees, J.G.; Sivakumaran, P.; Newcomb, A.E.; et al. Sustained Subcutaneous Delivery of Secretome of Human Cardiac Stem Cells Promotes Cardiac Repair Following Myocardial Infarction. *Cardiovasc Res* **2021**, *117*, 918–929, doi:10.1093/CVR/CVAA088.
309. Arslan, F.; Lai, R.C.; Smeets, M.B.; Akeroyd, L.; Choo, A.; Aguor, E.N.E.; Timmers, L.; van Rijen, H. V.; Doevendans, P.A.; Pasterkamp, G.; et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Increase ATP Levels, Decrease Oxidative Stress and Activate PI3K/Akt Pathway to Enhance Myocardial Viability and Prevent Adverse Remodeling after Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Stem Cell Res* **2013**, *10*, 301–312, doi:10.1016/J.SCR.2013.01.002.
310. Monguió-Tortajada, M.; Prat-Vidal, C.; Martínez-Falguera, D.; Teis, A.; Soler-Botija, C.; Courageux, Y.; Munizaga-Larroudé, M.; Moron-Font, M.; Bayes-Genis, A.; Borràs, F.E.; et al. Acellular Cardiac Scaffolds Enriched with MSC-Derived Extracellular Vesicles Limit Ventricular Remodelling and Exert Local and Systemic Immunomodulation in a Myocardial Infarction Porcine Model. *Theranostics* **2022**, *12*, 4656–4670, doi:10.7150/THNO.72289.
311. Ju, Y.; Hu, Y.; Yang, P.; Xie, X.; Fang, B. Extracellular Vesicle-Loaded Hydrogels for Tissue Repair and Regeneration. *Mater Today Bio* **2022**, *18*, doi:10.1016/J.MTBIO.2022.100522.
312. Yin, X.; Jiang, L.H. Extracellular Vesicles: Targeting the Heart. *Front Cardiovasc Med* **2023**, *9*, 1041481, doi:10.3389/FCVM.2022.1041481/BIBTEX.
313. Matta, A.; Nader, V.; Lebrin, M.; Gross, F.; Prats, A.C.; Cussac, D.; Galinier, M.; Roncalli, J. Pre-Conditioning Methods and Novel Approaches with Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cardiovascular Disease. *Cells* **2022**, *11*, doi:10.3390/CELLS11101620.
314. Tsai, C.C.; Chen, C.L.; Liu, H.C.; Lee, Y.T.; Wang, H.W.; Hou, L.T.; Hung, S.C. Overexpression of HTERT Increases Stem-like Properties and Decreases Spontaneous Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cell Lines. *J Biomed Sci* **2010**, *17*, doi:10.1186/1423-0127-17-64.
315. Chen, Q.; Jin, M.; Wang, S.; Wang, K.; Chen, L.; Zhu, X.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Li, Y.; Li, S.; et al. Establishing an HTERT-Driven Immortalized Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Line and Its Therapeutic Application in Mice with Liver Failure. *J Tissue Eng* **2023**, *14*, doi:10.1177/20417314231200328.
316. Piñeiro-Ramil, M.; Sanjurjo-Rodríguez, C.; Rodríguez-Fernández, S.; Castro-Viñuelas, R.; Hermida-Gómez, T.; Blanco-García, F.J.; Fuentes-Boquete, I.; Díaz-Prado, S. Generation of Mesenchymal Cell Lines Derived from Aged Donors. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 10667, doi:10.3390/IJMS221910667.
317. Yang, Y.; Lee, E.H.; Yang, Z. Hypoxia-Conditioned Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration Application. *Tissue Eng Part B Rev* **2022**, *28*, 966–977, doi:10.1089/TEN.TEB.2021.0145.
318. Kubin, T.; Gajawada, P.; Bramlage, P.; Hein, S.; Berge, B.; Cetinkaya, A.; Burger, H.; Schönburg, M.; Schaper, W.; Choi, Y.H.; et al. The Role of Oncostatin M and Its Receptor Complexes in Cardiomyocyte Protection, Regeneration, and Failure. *International*

- Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 1811 **2022**, 23, 1811, doi:10.3390/IJMS23031811.
319. Webber, J.; Steadman, R.; Mason, M.D.; Tabi, Z.; Clayton, A. Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *Cancer Res* **2010**, *70*, 9621–9630, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1722.
 320. Aoyama, T.; Takimoto, Y.; Pennica, D.; Inoue, R.; Shinoda, E.; Hattori, R.; Yui, Y.; Sasayama, S. Augmented Expression of Cardiotrophin-1 and Its Receptor Component, Gp130, in Both Left and Right Ventricles after Myocardial Infarction in the Rat. *J Mol Cell Cardiol* **2000**, *32*, doi:10.1006/jmcc.2000.1218.
 321. Kanisicak, O.; Khalil, H.; Ivey, M.J.; Karch, J.; Maliken, B.D.; Correll, R.N.; Brody, M.J.; Lin, S.C.J.; Aronow, B.J.; Tallquist, M.D.; et al. Genetic Lineage Tracing Defines Myofibroblast Origin and Function in the Injured Heart. *Nat Commun* **2016**, *7*, doi:10.1038/ncomms12260.
 322. Dixon, I.M.C.; Landry, N.M.; Rattan, S.G. Periostin Reexpression in Heart Disease Contributes to Cardiac Interstitial Remodeling by Supporting the Cardiac Myofibroblast Phenotype. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; 2019; Vol. 1132.
 323. Zhao, S.; Wu, H.; Xia, W.; Chen, X.; Zhu, S.; Zhang, S.; Shao, Y.; Ma, W.; Yang, D.; Zhang, J. Periostin Expression Is Upregulated and Associated with Myocardial Fibrosis in Human Failing Hearts. *J Cardiol* **2014**, *63*, 373–378, doi:10.1016/J.JJCC.2013.09.013.
 324. de Boer, R.A.; De Keulenaer, G.; Bauersachs, J.; Brutsaert, D.; Cleland, J.G.; Diez, J.; Du, X.J.; Ford, P.; Heinzl, F.R.; Lipson, K.E.; et al. Towards Better Definition, Quantification and Treatment of Fibrosis in Heart Failure. A Scientific Roadmap by the Committee of Translational Research of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* **2019**, *21*, 272, doi:10.1002/EJHF.1406.
 325. Weiss, T.W.; Kvakan, H.; Kaun, C.; Zorn, G.; Speidl, W.S.; Pfaffenberger, S.; Maurer, G.; Huber, K.; Wojta, J. The Gp130 Ligand Oncostatin M Regulates Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 through ERK1/2 and P38 in Human Adult Cardiac Myocytes and in Human Adult Cardiac Fibroblasts: A Possible Role for the Gp130/Gp130 Ligand System in the Modulation of Extracellular Matrix Degradation in the Human Heart. *J Mol Cell Cardiol* **2005**, *39*, 545–551, doi:10.1016/J.YJMCC.2005.03.015.
 326. Hanlon, M.M.; Rakovich, T.; Cunningham, C.C.; Ansboro, S.; Veale, D.J.; Fearon, U.; McGarry, T. STAT3 Mediates the Differential Effects of Oncostatin M and TNF α on RA Synovial Fibroblast and Endothelial Cell Function. *Front Immunol* **2019**, *10*, 2056, doi:10.3389/FIMMU.2019.02056/BIBTEX.
 327. Imai, T.; Takahashi, Y.; Nishikawa, M.; Kato, K.; Morishita, M.; Yamashita, T.; Matsumoto, A.; Charoenviriyakul, C.; Takakura, Y. Macrophage-Dependent Clearance of Systemically Administered B16BL6-Derived Exosomes from the Blood Circulation in Mice. *J Extracell Vesicles* **2015**, *4*, 1–8, doi:10.3402/JEV.V4.26238.
 328. Hao, D.; Lu, L.; Song, H.; Duan, Y.; Chen, J.; Carney, R.; Li, J.J.; Zhou, P.; Nolta, J.; Lam, K.S.; et al. Engineered Extracellular Vesicles with High Collagen-Binding Affinity Present Superior in Situ Retention and Therapeutic Efficacy in Tissue Repair. *Theranostics* **2022**, *12*, 6021–6037, doi:10.7150/THNO.70448.

329. Zhang, K.; Zhao, X.; Chen, X.; Wei, Y.; Du, W.; Wang, Y.; Liu, L.; Zhao, W.; Han, Z.; Kong, D.; et al. Enhanced Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes with an Injectable Hydrogel for Hindlimb Ischemia Treatment. *ACS Appl Mater Interfaces* **2018**, *10*, 30081–30091, doi:10.1021/ACSAMI.8B08449.
330. Walter, W.; Alonso-Herranz, L.; Trappetti, V.; Crespo, I.; Ibberson, M.; Cedenilla, M.; Karaszewska, A.; Núñez, V.; Xenarios, I.; Arroyo, A.G.; et al. Deciphering the Dynamic Transcriptional and Post-Transcriptional Networks of Macrophages in the Healthy Heart and after Myocardial Injury. *Cell Rep* **2018**, *23*, 622–636, doi:10.1016/J.CELREP.2018.03.029.
331. Teng, X.; Chen, L.; Chen, W.; Yang, J.; Yang, Z.; Shen, Z. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Improve the Microenvironment of Infarcted Myocardium Contributing to Angiogenesis and Anti-Inflammation. *Cell Physiol Biochem* **2015**, *37*, 2415–2424, doi:10.1159/000438594.
332. Li, H.; Chang, C.; Li, X.; Zhang, R. The Roles and Activation of Endocardial Notch Signaling in Heart Regeneration. *Cell Regeneration* **2021**, *10*, doi:10.1186/S13619-020-00060-6.
333. Rusanescu, G.; Weissleder, R.; Aikawa, E. Notch Signaling in Cardiovascular Disease and Calcification. *Curr Cardiol Rev* **2008**, *4*, 148, doi:10.2174/157340308785160552.
334. Tsang, K.M.; Hyun, J.S.; Cheng, K.T.; Vargas, M.; Mehta, D.; Ushio-Fukai, M.; Zou, L.; Pajcini, K. V.; Rehman, J.; Malik, A.B. Embryonic Stem Cell Differentiation to Functional Arterial Endothelial Cells through Sequential Activation of ETV2 and NOTCH1 Signaling by HIF1 α . *Stem Cell Reports* **2017**, *9*, 796–806, doi:10.1016/j.stemcr.2017.07.001.
335. Sainson, R.C.; Harris, A.L. Hypoxia-Regulated Differentiation: Let's Step It up a Notch. *Trends Mol Med* **2006**, *12*, 141–143, doi:10.1016/j.molmed.2006.02.001.
336. Wang, K.; Ding, R.; Ha, Y.; Jia, Y.; Liao, X.; Wang, S.; Li, R.; Shen, Z.; Xiong, H.; Guo, J.; et al. Hypoxia-Stressed Cardiomyocytes Promote Early Cardiac Differentiation of Cardiac Stem Cells through HIF-1 α /Jagged1/Notch1 Signaling. *Acta Pharm Sin B* **2018**, *8*, 795–804, doi:10.1016/J.APSB.2018.06.003.
337. Espinoza, I.; Miele, L. Notch Inhibitors for Cancer Treatment. *Pharmacol Ther* **2013**, *139*, 95, doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2013.02.003.
338. Park, S.B.; Seo, K.W.; So, A.Y.; Seo, M.S.; Yu, K.R.; Kang, S.K.; Kang, K.S. SOX2 Has a Crucial Role in the Lineage Determination and Proliferation of Mesenchymal Stem Cells through Dickkopf-1 and c-MYC. *Cell Death Differ* **2012**, *19*, 534, doi:10.1038/CDD.2011.137.
339. Yoon, D.S.; Kim, Y.H.; Jung, H.S.; Paik, S.; Lee, J.W. Importance of Sox2 in Maintenance of Cell Proliferation and Multipotency of Mesenchymal Stem Cells in Low-Density Culture. *Cell Prolif* **2011**, *44*, 428–440, doi:10.1111/J.1365-2184.2011.00770.X.
340. Jiang, Q.; Huang, K.; Lu, F.; Deng, S.; Yang, Z.; Hu, S. Modifying Strategies for SDF-1/CXCR4 Interaction during Mesenchymal Stem Cell Transplantation. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* **2022**, *70*, 1, doi:10.1007/S11748-021-01696-0.

341. Cheng, Z.; Ou, L.; Zhou, X.; Li, F.; Jia, X.; Zhang, Y.; Liu, X.; Li, Y.; Ward, C.A.; Melo, L.G.; et al. Targeted Migration of Mesenchymal Stem Cells Modified with CXCR4 Gene to Infarcted Myocardium Improves Cardiac Performance. *Mol Ther* **2008**, *16*, 571–579, doi:10.1038/SJ.MT.6300374.
342. Ciullo, A.; Biemmi, V.; Milano, G.; Bolis, S.; Cervio, E.; Fertig, E.T.; Gherghiceanu, M.; Moccetti, T.; Camici, G.G.; Vassalli, G.; et al. Exosomal Expression of CXCR4 Targets Cardioprotective Vesicles to Myocardial Infarction and Improves Outcome after Systemic Administration. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/IJMS20030468.
343. Croquelois, A.; Domenighetti, A.A.; Nemir, M.; Lepore, M.; Rosenblatt-Velin, N.; Radtke, F.; Pedrazzini, T. Control of the Adaptive Response of the Heart to Stress via the Notch1 Receptor Pathway. *J Exp Med* **2008**, *205*, 3173, doi:10.1084/JEM.20081427.
344. Nemir, M.; Metrich, M.; Plaisance, I.; Lepore, M.; Cruchet, S.; Berthonneche, C.; Sarre, A.; Radtke, F.; Pedrazzini, T. The Notch Pathway Controls Fibrotic and Regenerative Repair in the Adult Heart. *Eur Heart J* **2014**, *35*, 2174–2185, doi:10.1093/EURHEARTJ/EHS269.
345. Wakabayashi, N.; Chartoumpekis, D. V.; Kensler, T.W. Crosstalk between Nrf2 and Notch Signaling. *Free Radic Biol Med* **2015**, *88*, 158, doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2015.05.017.
346. Li, J.; Salvador, A.M.; Li, G.; Valkov, N.; Ziegler, O.; Yeri, A.; Yang Xiao, C.; Meechoovet, B.; Alsop, E.; Rodosthenous, R.S.; et al. Mir-30d Regulates Cardiac Remodeling by Intracellular and Paracrine Signaling. *Circ Res* **2021**, *128*, e1, doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317244.
347. Nie, J.; Zhou, W.; Yu, S.; Cao, S.; Wang, H.; Yu, T. MiR-30c Reduces Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Targeting SOX9 and Suppressing Pyroptosis. *Exp Ther Med* **2023**, *25*, doi:10.3892/ETM.2023.11879.
348. Sun, M.; Guo, M.; Ma, G.; Zhang, N.; Pan, F.; Fan, X.; Wang, R. MicroRNA-30c-5p Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury via Regulation of Bach1/Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol* **2021**, *426*, doi:10.1016/J.TAAP.2021.115637.
349. Carena, M.C.; Badi, I.; Polkinghorne, M.; Akoumianakis, I.; Psarros, C.; Wahome, E.; Kotanidis, C.P.; Akawi, N.; Antonopoulos, A.S.; Chauhan, J.; et al. Role of Human Epicardial Adipose Tissue–Derived MiR-92a-3p in Myocardial Redox State. *J Am Coll Cardiol* **2023**, *82*, 317–332, doi:10.1016/J.JACC.2023.05.031.
350. Yu, X.J.; Huang, Y.Q.; Shan, Z.X.; Zhu, J.N.; Hu, Z.Q.; Huang, L.; Feng, Y.Q.; Geng, Q.S. MicroRNA-92b-3p Suppresses Angiotensin II-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy via Targeting HAND2. *Life Sci* **2019**, *232*, 116635, doi:10.1016/J.LFS.2019.116635.
351. Aonuma, T.; Moukette, B.; Kawaguchi, S.; Barupala, N.P.; Sepúlveda, M.N.; Frick, K.; Tang, Y.; Guglin, M.; Raman, S. V.; Cai, C.; et al. MiR-150 Attenuates Maladaptive Cardiac Remodeling Mediated by Long Noncoding RNA MIAT and Directly Represses Profibrotic Hoxa4. *Circ Heart Fail* **2022**, *15*, E008686, doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.121.008686.
352. Aonuma, T.; Moukette, B.; Kawaguchi, S.; Barupala, N.P.; Sepúlveda, M.N.; Corr, C.; Tang, Y.; Liangpunsakul, S.; Payne, R.M.; Willis, M.S.; et al. Cardiomyocyte MicroRNA-

- 150 Confers Cardiac Protection and Directly Represses Proapoptotic Small Proline-Rich Protein 1A. *JCI Insight* **2021**, *6*, doi:10.1172/JCI.INSIGHT.150405.
353. Deng, P.; Chen, L.; Liu, Z.; Ye, P.; Wang, S.; Wu, J.; Yao, Y.; Sun, Y.; Huang, X.; Ren, L.; et al. MicroRNA-150 Inhibits the Activation of Cardiac Fibroblasts by Regulating c-Myb. *Cellular Physiology and Biochemistry* **2016**, *38*, 2103–2122, doi:10.1159/000445568.
 354. Li, Y.; Zhang, J.; Shi, J.; Liu, K.; Wang, X.; Jia, Y.; He, T.; Shen, K.; Wang, Y.; Liu, J.; et al. Exosomes Derived from Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Attenuate Hypertrophic Scar Fibrosis by MiR-192-5p/IL-17RA/Smad Axis. *Stem Cell Res Ther* **2021**, *12*, doi:10.1186/S13287-021-02290-0.
 355. Sánchez-Sánchez, R.; Gómez-Ferrer, M.; Reinal, I.; Buigues, M.; Villanueva-Bádenas, E.; Ontoria-Oviedo, I.; Hernández, A.; González-King, H.; Peiró-Molina, E.; Dorronsoro, A.; et al. MiR-4732-3p in Extracellular Vesicles From Mesenchymal Stromal Cells Is Cardioprotective During Myocardial Ischemia. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, doi:10.3389/FCELL.2021.734143/FULL.
 356. Zhao, X.S.; Ren, Y.; Wu, Y.; Ren, H.K.; Chen, H. MiR-30b-5p and MiR-22-3p Restrain the Fibrogenesis of Post-Myocardial Infarction in Mice via Targeting PTAFR. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2020**, *24*, 3993–4004, doi:10.26355/EURREV_202004_20869.
 357. Yin, Q.; Wang, P.; Wu, X. MicroRNA -148 Alleviates Cardiac Dysfunction, Immune Disorders and Myocardial Apoptosis in Myocardial Ischemia-Reperfusion (MI/R) Injury by Targeting Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDK4): Myocardial Protection of MiR-148/PDK4 in Immature Rats. *Bioengineered* **2021**, *12*, 5552, doi:10.1080/21655979.2021.1965812.
 358. Hobuß, L.; Thum, T. The Janus Face of MiR-148a in Cardiac Remodeling and Heart Failure. *Molecular Therapy* **2019**, *27*, 489, doi:10.1016/J.YMTHE.2019.02.004.
 359. Wang, X.; Zhu, Y.; Wu, C.; Liu, W.; He, Y.; Yang, Q. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes Carry MicroRNA-671 to Alleviate Myocardial Infarction Through Inactivating the TGFBR2/Smad2 Axis. *Inflammation* **2021**, *44*, 1815, doi:10.1007/S10753-021-01460-9.
 360. Deng, S.; Zhou, X.; Ge, Z.; Song, Y.; Wang, H.; Liu, X.; Zhang, D. Exosomes from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Cardiac Damage after Myocardial Infarction by Activating S1P/SK1/S1PR1 Signaling and Promoting Macrophage M2 Polarization. *Int J Biochem Cell Biol* **2019**, *114*, 105564, doi:10.1016/J.BIOCEL.2019.105564.
 361. Chen, F.; Li, X.; Zhao, J.; Geng, J.; Xie, J.; Xu, B. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Attenuate Cardiac Hypertrophy and Fibrosis in Pressure Overload Induced Remodeling. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2020**, *56*, 567–576, doi:10.1007/S11626-020-00481-2/FIGURES/4.
 362. Feng, Y.; Huang, W.; Wani, M.; Yu, X.; Ashraf, M. Ischemic Preconditioning Potentiates the Protective Effect of Stem Cells through Secretion of Exosomes by Targeting Mecp2 via MiR-22. *PLoS One* **2014**, *9*, 88685, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0088685.
 363. Zhu, J.; Lu, K.; Zhang, N.; Zhao, Y.; Ma, Q.; Shen, J.; Lin, Y.; Xiang, P.; Tang, Y.; Hu, X.; et al. Myocardial Reparative Functions of Exosomes from Mesenchymal Stem Cells Are

- Enhanced by Hypoxia Treatment of the Cells via Transferring MicroRNA-210 in an NSMase2-Dependent Way. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2018**, *46*, 1659, doi:10.1080/21691401.2017.1388249.
364. Lv, K.; Li, Q.; Zhang, L.; Wang, Y.; Zhong, Z.; Zhao, J.; Lin, X.; Wang, J.; Zhu, K.; Xiao, C.; et al. Incorporation of Small Extracellular Vesicles in Sodium Alginate Hydrogel as a Novel Therapeutic Strategy for Myocardial Infarction. *Theranostics* **2019**, *9*, 7403, doi:10.7150/THNO.32637.
 365. Nistri, S.; Sassoli, C.; Bani, D. Notch Signaling in Ischemic Damage and Fibrosis: Evidence and Clues from the Heart. *Front Pharmacol* **2017**, *8*, doi:10.3389/FPHAR.2017.00187.
 366. Zhou, X. liang; Fang, Y. hu; Wan, L.; Xu, Q. rong; Huang, H.; Zhu, R. rong; Wu, Q. cai; Liu, J. chun Notch Signaling Inhibits Cardiac Fibroblast to Myofibroblast Transformation by Antagonizing TGF- β 1/Smad3 Signaling. *J Cell Physiol* **2019**, *234*, 8834–8845, doi:10.1002/JCP.27543.
 367. Carthy, J.M.; Garmaroudi, F.S.; Luo, Z.; McManus, B.M. Wnt3a Induces Myofibroblast Differentiation by Upregulating TGF- β Signaling through SMAD2 in a β -Catenin-Dependent Manner. *PLoS One* **2011**, *6*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0019809.
 368. Shafer, S.L.; Towler, D.A. Transcriptional Regulation of SM22 α by Wnt3a: Convergence with TGF β 1/Smad Signaling at a Novel Regulatory Element. *J Mol Cell Cardiol* **2009**, *46*, 621, doi:10.1016/J.YJMCC.2009.01.005.
 369. González, A.; López, B.; Ravassa, S.; San José, G.; Díez, J. The Complex Dynamics of Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure. Focus on Collagen Cross-Linking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2019**, *1866*, 1421–1432, doi:10.1016/J.BBAMCR.2019.06.001.
 370. Hardy, E.; Hardy-Sosa, A.; Fernandez-Patron, C. MMP-2: Is Too Low as Bad as Too High in the Cardiovascular System? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2018**, *315*, H1332–H1340, doi:10.1152/AJPHEART.00198.2018/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH40111826250001.JPEG.
 371. Valiente-Alandi, I.; Potter, S.J.; Salvador, A.M.; Schafer, A.E.; Schips, T.; Carrillo-Salinas, F.; Gibson, A.M.; Nieman, M.L.; Perkins, C.; Sargent, M.A.; et al. Inhibiting Fibronectin Attenuates Fibrosis and Improves Cardiac Function in a Model of Heart Failure. *Circulation* **2018**, *138*, 1236, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034609.
 372. Kong, P.; Christia, P.; Frangogiannis, N.G. The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis. *Cell Mol Life Sci* **2014**, *71*, 549, doi:10.1007/S00018-013-1349-6.
 373. Tham, Y.K.; Bernardo, B.C.; Ooi, J.Y.Y.; Weeks, K.L.; McMullen, J.R.; Tham, Y.K.; Bernardo, · B C; Ooi, J.Y.Y.; McMullen, · J R; McMullen, J.R.; et al. Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy and Heart Failure: Signaling Pathways and Novel Therapeutic Targets. *Archives of Toxicology* **2015**, *89*, 1401–1438, doi:10.1007/S00204-015-1477-X.
 374. Chen, F.; Li, X.; Zhao, J.; Geng, J.; Xie, J.; Xu, B. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Attenuate Cardiac Hypertrophy and Fibrosis in Pressure Overload Induced Remodeling. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2020**, *56*, 567–576, doi:10.1007/S11626-020-00481-2.

375. Gao, L.; Mei, S.; Zhang, S.; Qin, Q.; Li, H.; Liao, Y.; Fan, H.; Liu, Z.; Zhu, H. Cardio-Renal Exosomes in Myocardial Infarction Serum Regulate Proangiogenic Paracrine Signaling in Adipose Mesenchymal Stem Cells. *Theranostics* **2020**, *10*, 1060, doi:10.7150/THNO.37678.
376. Wang, N.; Chen, C.; Yang, D.; Liao, Q.; Luo, H.; Wang, X.; Zhou, F.; Yang, X.; Yang, J.; Zeng, C.; et al. Mesenchymal Stem Cells-Derived Extracellular Vesicles, via MiR-210, Improve Infarcted Cardiac Function by Promotion of Angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2017**, *1863*, 2085–2092, doi:10.1016/J.BBADIS.2017.02.023.