

INTRODUCCIÓN	22
1.Fisiopatología del corazón	23
1.1 Definición y epidemiología de la enfermedad	23
1.1.1 Factores de Riesgo	23
1.2 Tipos de patología cardiaca	24
1.2.1 Miocardiopatía isquémica	25
1.2.2 El daño por reperfusión	26
1.2.3 Cardiotoxicidad derivada de antraciclinas	33
2. Terapia celular	39
2.1 Contexto histórico de la terapia celular	39
2.2 Células MSC	40
2.2.1 MSC en la terapia cardiaca	42
3. Vesículas extracelulares (EVs)	44
3.1 Definición de vesículas extracelulares	44
3.2 Biogénesis y liberación de partículas	45
3.3 Métodos de aislamiento y caracterización	46
3.4 Caracterización de las vesículas extracelulares	48
3.5 Papel de las EVs en la terapia cardiaca	51
3.5.1 EVs derivadas de cardiomiocitos en comunicación celular.	51
3.5.2 EVs derivadas de otros tipos celulares como terapia cardiaca	52
3.5.3 Uso de EVs vs células	53
4.miRNAs	53
4.1 Definición de los miRNAs	53
4.2 Papel de los miRNAs en la terapia cardiaca	54
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	57
Hipótesis	58
MATERIALES Y MÉTODOS	60
1.Inclusión de pacientes	61
1.1 Parámetros clínicos	62
1.2 Ecocardiografía	62
1.3 Extracción de muestras de pacientes	62
2. Métodos Informáticos	63
2.1 Estadística y figuras	63
2.2 Secuenciamiento miRNA	63
2.3 Generación de algoritmo predictivo	64
2.4 Estudio del Interactoma	64
2.5 Análisis proteómicos	65
3.Métodos bioquímicos	65
3.1 Extracción de miRNAs y qPCR	65
3.2 Transcripción inversa	66
3.3 Cuantificación de miRNA por qPCR	66
3.4 Extracción de proteínas	67
3.5 Cuantificación de proteínas	68
3.5 Western Blot	68
3.7 Inmunofluorescencia	71
4.Modelos celulares	71

4.1 Medios de cultivo utilizados	71
4.2 Aislamiento de cardiomiocitos neonatales de rata	73
4.3 Medios de cultivo en condiciones de isquemia	74
4.4 Infección de las células mesenquimales	74
4.4.1 Transformación de bacterias	75
4.4.2 Crecimiento bacteriano y aislamiento del plásmido	75
4.4.3 Generación de los lentivirus	76
4.4.4 Titulación del virus	76
4.5 Transfección de células con miRNAs	77
5. Aislamiento de vesículas extracelulares	77
5.1 Caracterización de las vesículas	78
5.2 Electroporación de vesículas	80
6. Ensayos en modelos celulares	80
6.1 Ensayo de captación de vesículas	80
6.2 Ensayo de estrés oxidativo	81
6.3 Ensayo de Captación de Doxorubicina	81
6.4 Ensayo de formación de tubos	81
6.5 Ensayo de CCK8	82
6.6 Ensayo de Anexina por citometría de flujo	82
6.7 Ensayo de Wound Healing in vitro	83
7. Modelos animales	83
7.1 Modelo de infarto mediante ligadura permanente	83
7.2 Ecocardiografía de ratas nude	84
7.3 Sacrificio y fijación del corazón	84
7.4 Inyección de doxorubicina	85
7.3 Modelo de angiogénesis in vivo mediante Plug de Matrigel	85
7.3 Histoquímica	86
7.3.1 Parafinización del tejido	86
7.3.2 Desparafinación del tejido	86
7.3.3 Tricrómico de Mason	86
7.3.4 Rojo Sirio	87
RESULTADOS	88
1. Estudio de la comunicación intercelular cardiaca	89
1.1 Aislamiento y caracterización de vesículas en cardiomiocitos	89
1.1.1 Caracterización del contenido de las vesículas	90
1.2 Las vesículas de AC10 en condiciones de Hipoxia y Normoxia no tienen efecto en la multiplicación en líneas celulares cardiacas.	92
1.3 Las vesículas derivadas de cardiomiocitos en hipoxia son captadas preferencialmente en endotelio	93
1.4 Las vesículas derivadas de AC10 en Normoxia inducen un efecto angiogénico sobre las derivadas en hipoxia	94
1.5 Las vesículas derivadas de AC10 en estado de hipoxia inducen un aumento de la migración en fibroblastos	95
2. Estudio prospectivo de miRNAs circulantes pacientes con cáncer de mama	97
2.1 Caracterización de la cohorte de pacientes	97
2.2 Generación de lista de miRNAs diferencialmente expresados entre casos y controles	100
2.3 Integración de resultados miRNAseq	100
2.4 Evaluación de niveles de miRNA a lo largo del tratamiento quimioterapéutico	101
2.5 Selección de miRNAs diferencialmente expresados	102

2.6 Evaluación de los niveles de miRNA seleccionados	102
2.7 Validación del RNAseq por qPCR	103
1.7.1 Valores en la cohorte principal	104
1.7.2 Valores en la cohorte de validación	104
2.8 Generación de algoritmo de predicción de cardiotoxicidad	105
2.9 Estudio de las vías de señalización afectadas por el conjunto de miRNAs seleccionados	107
2.9.1 Enumeración de procesos biológicos diferencialmente expresados	107
2.9.2 Red de interacción de miRNAs con procesos biológicos relevantes	109
1.9.3 Procesos biológicos regulados por miRNAs diferencialmente expresados	110
3. Potencial terapéutico de las EVs de MSCs en la cardiotoxicidad derivada de antraciclinas	111
3.1 Generación de línea de mesenquimales inmortal MSC-TERT	111
3.1.2 Caracterización de las vesículas MSC-TERT	112
3.2 Las vesículas derivadas de MSC-TERT ejercen efecto terapéutico en el modelo de daño por doxorubicina.	112
3.3 Las vesículas derivadas de MSCs-TERT reducen los niveles de ROS en cardiomiocitos tratados con doxorubicina	114
3.4 La adición de EVs-MSC sobre un cultivo de cardiomiocitos reduce la cantidad de doxorubicina captada por ellos	114
3.6 El tratamiento con EVs no reduce la cantidad de doxorubicina captada por células tumorales	116
3.7 Las EVs derivadas de MSC-TERT mejoran la angiogénesis en células endoteliales tratadas con doxorubicina	117
3.8 Las vesículas de MSC-TERT no afectan a la supervivencia de los fibroblastos en el daño mediado por doxorubicina	118
3.9 El tratamiento de fibroblastos con EVs reduce la capacidad de migración de los fibroblastos	118
3.10 Las EVs derivadas de las MSC-TERT reducen marcadores de inducción a miofibroblastos, así como la generación de matriz extracelular	119
3.11 Modelos animales supervivencia con vesículas	120
3.11.1 La inyección conjunta de EVs y doxorubicina protege frente a la bajada de peso de los ratones	121
3.11.1 La inyección de doxorubicina a dosis aguda no ejerce un efecto fibrótico en el corazón	121
4. Estudio del contenido de miRNA en las vesículas de MSC	122
4.1 Comparación de niveles de miRNA en vesículas MSC frente a MSC-TERT.	122
4.2 Presencia de miRNAs involucrados en la función cardíaca en las vesículas extracelulares	123
5. Relación entre los niveles de miRNA y la patología cardíaca	124
5.1 Los niveles de miRNAs involucrados en la cardiotoxicidad varían sus niveles en células cardíacas después de un tratamiento con doxorubicina	124
5.2 El aumento de los niveles de estos miRNAs vía transfección ejerce un efecto protector sobre los cardiomiocitos en el daño por doxorubicina	125
5.4 La transfección del miRNA 4732-3p no ejerce un efecto proliferativo en líneas de cáncer de mama	126
6. Potencial terapéutico de las vesículas extracelulares derivadas de MSC-TERT y miRNA 4732-3p en el daño por isquemia.	127
6.1 Las vesículas derivadas de MSC-TERT así como el miRNA 4732-3p reducen el número de cardiomiocitos en estado de apoptosis después de un periodo isquémico	127
6.2 El miRNA 4732-3p y las MSC-EVs reducen los niveles de estrés oxidativo en cardiomiocitos durante la isquemia	128

6.3 Variación de marcadores celulares en cardiomiocitos tratados con MSC-EVs y miRNA 4732-3p	129
6.4 Las vesículas derivadas de MSC-TERT ejercen una protección frente a la pérdida de contracción de los cardiomiocitos in vitro	130
6.5 El tratamiento con miRNA 4732-3p disminuye los marcadores de fibrosis α -SMA y Col1A	131
6.6 El tratamiento con el miRNA 4732-3p induce una menor movilidad de los fibroblastos	133
6.7 El miRNA 4732 aumenta la angiogénesis in vitro en células endoteliales	134
6.8 El miRNA 4732-3p induce angiogénesis en modelo in vivo	135
6.9 Efecto de las EVs y el miRNA 4732-3p en el modelo de isquemia in vivo	136
DISCUSIÓN	139
1. Las vesículas Extracelulares derivadas de cardiomiocitos juegan un papel importante en la comunicación intercelular	140
2. Perfil diferencial de miRNAs en pacientes con cáncer de mama	143
3. El papel de las vesículas derivadas de MSC-TERT en la terapia contra el daño inducido por la doxorubicina.	148
4. miRNAs en el tratamiento de la patología cardíaca	151
CONCLUSIONES	156
BIBLIOGRAFÍA	158