



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



PRÍNCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION



Estudio de la comunicación intercelular mediada por exosomas y sus implicaciones terapéuticas

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

Realizada por: Nahuel Aquiles Garcia

Dirigida por: Dra. Pilar Sepulveda Sanchis

Dr. Antonio Diez Juan

Tutor: Dr. Ramón Serrano Salom

Valencia, Octubre 2014

Agradecimientos

Quiero dejar expresado en este apartado mi agradecimiento a todas las personas que ayudaron a realizar mi tesis doctoral. A mis amigos, mis compañeros de laboratorio, Ruben, Javi, Laura, Imelda, Marina, Delia y Mari Paz. A el personal de mantenimiento y el personal técnico tanto del CIPF como del IIS La Fe. A los investigadores en general que me han dado una mano ya sea para diseñar un experimento o prestándome reactivos (la lista de nombres es interminable), gracias por sus pequeñas gigantes colaboraciones. A la gente del servicio de Citómica del CIPF (Alicia, Domingo y Paco), a Alberto del confocal y al pirata Mario del electrónico.

A Domingo Baretino, mi primer tutor, quien ya no está entre nosotros, gracias por compartir conmigo excelentes debates científicos de los cuales aprendí muchísimo y por alentarme siempre a realizar ciencia de la buena, de la vieja escuela como él me decía...un fenómeno!. Al Dr. Ramón Serrano Salom, por aceptar ser mi nuevo tutor.

A Toni Diez, mi director, por demostrarme que pese a lo difíciles que puedan ponerse las cosas, uno debe aferrarse a la inquebrantable voluntad del científico por perseguir objetivos genuinos y de gran calidad científica. Gracias por enseñarme tantas cosas y compartir conmigo ideas geniales que son el patrimonio más valioso que tenemos la gente de ciencia.

A Pilar Sepulveda, mi directora, en primer lugar gracias por confiar en mí y permitirme realizar este trabajo en el laboratorio. Por lograr que en estos años difíciles para la ciencia jamás nos faltara nada a nadie en ningún aspecto, eso se dice fácil pero lograrlo es una tarea hercúlea y me has demostrado que con esfuerzo e inteligencia se puede hacer frente a las situaciones más complejas. Por nunca decirme NO a las mil locuras que te he planteado y por facilitarme siempre todo cuanto he querido. Y sobre todo gracias por demostrarme QUE VIVIMOS COMO REYES, que lo que hacemos nos encanta y que por eso con esfuerzo y dedicación lograremos lo que nos proponemos.

A mis padres, la Tota y Garcia, por siempre hacerme sentir que aunque este en donde esté ustedes están conmigo para lo que necesite. Gracias por enseñarme que las cosas verdaderamente importantes siempre están en su sitio y que realmente uno necesita muy poco para estar bien. Y finalmente a mi novia, Lucía. Por cumplir tu parte del trato, dejar absolutamente todo y venirte con este loco a la nada misma, para ayudarme con todo esto. Por soportar y apoyarme con mis extravagantes delirios. Gracias por el apoyo constante para poder hacer esta tesis y por la gigantesca cantidad de momentos hermosos que me has dado durante este tiempo y por la enormidad que nos resta vivir.

Índice

Índice

Abreviaturas	5
1. Introducción	15
1.1. El Corazón	17
1.1.1. Estructura y función	17
1.1.2. Metabolismo cardiaco	20
1.1.3. El infarto agudo de miocardio	21
1.1.3.1. Epidemiología	21
1.1.3.2. Fisiopatología del infarto de miocardio	21
1.1.3.3. El metabolismo cardiaco durante y después del IAM	23
1.1.3.4. Diagnóstico y tratamiento convencional del IAM	23
1.1.4. Terapias avanzadas para el tratamiento del IAM mediante el uso de células madre mesenquimales (MSC)	24
1.1.4.1. Características de las MSC	25
1.1.4.2. Mecanismos terapéuticos inducidos por las MSC: Hipótesis Paracrina	26
1.1.5. Los microRNAs en la enfermedad cardíaca: características generales de los microRNAs	27
1.1.5.1. Los microRNAs en la patología cardíaca	28
1.1.5.2. Los microRNAs y la regeneración cardíaca	29
1.2. Mecanismos de comunicación celular	30
1.2.1. Vías de señalización	34
1.2.2. Mecanismos de la ruta de secreción celular	35
1.2.3. Vía de endocitosis	38
1.3. Tráfico intracelular de transportadores de glucosa (GLUTs)	39
1.4. Exosomas como mecanismos de comunicación intercelular	41
2. Objetivos	43
3. Materiales y métodos	47
3.1. Animales	49
3.2. Cultivos Celulares	49
3.2.1. Cultivos Primarios	50
3.2.1.1. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata y ratón	50
3.2.1.2. Cultivo primario de endotelio	50
3.2.1.3. Cultivo primario de endotelio humano	51
3.2.1.4. Cultivo primario de células mesenquimales humanas	51
3.2.2. Líneas Celulares	51

3.2.3.	Expansión celular y criopreservación	51
3.2.4.	Recuento de la viabilidad celular	52
3.2.5.	Condiciones experimentales	52
3.3.	Plásmidos, Transfecciones y marcaje Lentiviral	53
3.3.1.	Plásmidos utilizados para la monitorización del tráfico intracelular de transportadores de glucosa	53
3.3.2.	Marcaje Lentiviral de exosomas	54
3.3.3.	Marcaje lentiviral de MSC	55
3.4.	Co-cultivos.....	55
3.5.	Aislamiento de exosomas a partir de medios de cultivo	56
3.5.1.	Método de ultracentrifugación	56
3.5.2.	Purificación mediante ensayo de afinidad.....	56
3.6.	Técnicas bioquímicas	57
3.6.1.	Obtención de extractos proteicos	57
3.6.2.	Cuantificación de proteínas	57
3.6.3.	Electroforesis en geles de poliacrilamida	58
3.6.4.	Transferencia mediante western blot.....	58
3.7.	Técnicas moleculares	59
3.7.1.	Extracción de rna	59
3.7.2.	Cuantificación del rna	59
3.7.3.	RT (transcripción reversa) y PCR en tiempo real.....	59
3.7.3.1.	Síntesis de cDNA: Transcripción reversa	59
3.7.3.2.	Amplificación del cDNA en tiempo real (qPCR)	61
3.7.3.3.	Análisis del producto de la qPCR	62
3.7.4.	Identificación y análisis de microRNAs de exosomas provenientes de cardiomiocitos neonatales de ratón y de MSC y MSC-HIF	62
3.7.4.1.	Extracción de microRNAs exosomales	62
3.7.4.2.	Síntesis de cDNA, qPCR y análisis.	62
3.8.	Inmunocitoquímicas	64
3.9.	Técnicas de imagen	65
3.9.1.	Microscopía óptica de fluorescencia	65
3.9.2.	Microscopía confocal	65
3.9.3.	Microscopía Electrónica e inmunocarraje con oro	66
3.9.4.	Co-Cultivos: Análisis de transferencia de exosomas y GLUTs entre células	67
3.9.4.1.	Microscopia confocal de paso de tiempo (Time Laspe Confocal Microscopy)....	67
3.9.4.2.	Cuantificación de la transferencia de exosomas y GLUTs en los co-cultivos	68
3.9.5.	Cuantificación en Incell de la colocalización de GLUTs y CD63 en cultivos de CM neonatales de rata	68

3.10. Cuantificación de síntesis y secreción de exosomas	69
3.10.1. Western Blot	69
3.10.2. Actividad Acetilcolinesterasa	69
3.10.3. Cuantificación en InCell Analyzer	70
3.11. Ensayos funcionales in vitro con exosomas	71
3.11.1. Internalización de exosomas	71
3.11.2. Activación de vías de señalización	71
3.11.3. Captación de Glucosa	71
3.11.3.1. Inhibición de GLUTs exosomales	72
3.11.4. Actividad transcripcional de HUVEC	72
3.11.5. Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH)	73
3.11.6. Cuantificación de Piruvato	73
3.12. Citometría	74
3.13. Proteómica	74
3.14. Técnicas in vivo: estudio del efecto terapéutico de los exosomas derivados de MSC y MSC-HIF en la reparación del IAM	75
3.14.1. Animales	75
3.14.2. Procedimientos quirúrgicos	75
3.14.2.1. El infarto agudo de miocardio	75
3.14.3. Parámetros de función cardíaca	76
3.14.4. Eutanasia	78
3.15. Análisis Estadístico	78
4. Resultados	79
4.1. MSC transfectadas con pWIPI-HIF-GFP sobreexpresan HIF-1 α	82
4.2. MSC y MSC-HIF liberan exosomas al medio de cultivo	83
4.3. Análisis de microRNAs contenidos en exosomas de MSC y MSC-HIF	84
4.4. Efecto de los exosomas derivados de MSC y MSC-HIF en un modelo de IAM en rata	87
4.5. El ayuno de glucosa incrementa la síntesis y la secreción de exosomas de cardiomiocitos neonatales de rata	89
4.5.1. El ayuno de glucosa incrementa la secreción de exosomas de un cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata	91
4.5.2. El ayuno de glucosa incrementa la síntesis de exosomas de un cultivo de CM neonatales de rata	91
4.5.3. El ayuno de glucosa en CM incrementa la actividad transcripcional de genes relacionados con el tráfico vesicular y las vías secretoras	92

4.6.	Análisis de la transferencia de exosomas desde CM hacia células endoteliales	93
4.6.1.	Caracterización de cultivos primarios de células endoteliales	94
4.6.1.1.	Caracterización de células endoteliales primarias de rata	94
4.6.1.2.	Caracterización de células endoteliales primarias de ratón RFP	95
4.6.2.	Marcaje lentiviral de exosomas	96
4.6.3.	Comportamiento de células H9c2-CD63-GFP	96
4.6.4.	Transferencia de Exosomas desde células cardiacas hacia células endoteliales	97
4.7.	Análisis de exosomas liberados por CM	99
4.7.1.	Análisis de microRNAs exosomales de CM neonatales de ratón	99
4.7.2.	Análisis masivo del contenido de proteínas en exosomas de CM neonatales de rata	102
4.8.	Exosomas liberados por CM alteran la actividad de células endoteliales	104
4.8.1.	Los exosomas derivados de CM neonatales de rata alteran la actividad transcripcional de las células HUVEC	104
4.8.2.	Los exosomas derivados de células cardiacas activan vías de señalización en células HUVEC	105
4.8.3.	Los exosomas derivados de CM neonatales de rata incrementan la captación de glucosa en células endoteliales de rata	106
4.9.	Estudio de la transferencia de GLUTs entre células cardiacas y endoteliales por mediación de exosomas	107
4.9.1.	Los exosomas derivados de CM ayunados de glucosa contienen GLUTs	107
4.9.2.	Co-localización entre CD63 y GLUTs en CM neonatales de rata	108
4.9.3.	Transferencia de GLUTs entre células cardiacas y endoteliales	109
4.10.	Los exosomas derivados de células H9c2 incrementan la actividad glicolítica de células HUVEC	113
4.10.1.	Los exosomas derivados de células cardiacas contienen LDH y GAPDH	114
4.10.2.	Los exosomas derivados de células H9c2 incrementan la actividad LDH de células HUVEC	115
4.10.3.	Los exosomas derivados de células H9c2 incrementan la cantidad de Piruvato producido por células HUVEC	115
5.	Discusión	119
6.	Conclusiones	133
7.	Bibliografía	137

Abreviaturas

1ario: Primario

2ario: Secundario

ACDAI: Arteria coronaria descendente anterior izquierda

ACN: acetonitrilo

ACTB: Actina beta

AD: Aurícula derecha

AI: Aurícula izquierda

AKT: Proteína kinasa B

ANGPT1: Angiopoyetina 1

ANGPT2: Angiopoyetina 2

ATP: adenosín trifosfato

AVId: Área del ventrículo izquierdo al final de la diástole

AVIs: Área del ventrículo izquierdo al final de la sístole

BSA: Albúmina del suero bovino

cAMP: Adenosina monofosfato cíclico

CEBA: Comité de ética y de bienestar animal

CK-MB: Creatinina Quinasa (Isoenzima MB)

CM: Cardiomiocitos

CPA: Cambio porcentual de área

D.O.: Densidad óptica

D: Derivada

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DVId: Diámetro del ventrículo izquierdo al final de la diástole

DVIs: Diámetro del ventrículo izquierdo al final de la sístole

DMEM: Medio de Eagle Modificado de Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DS: Desviación estándar

ECG: Electrocardiograma

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EPA: Engrosamiento de la pared anterior

ERK1/2: Quinasas reguladas por señal extracelular ½

ES: Error estándar

ESCRT: complejo de separación endosomal requerido para el transporte

FA: Fracción de acortamiento

FBS: Suero bovino fetal

g: Aceleración de la gravedad

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFP: Proteína verde fluorescente

GLUT1: Transportador de glucosa 1

GLUT4: Transportador de glucose 4

GLUTs: Transportadores de glucosa

GPA_d: Grosor de la pared anterior al final de la diástole

GPA_s: Grosor de la pared anterior al final de la sístole

GPP_d: Grosor de la pared posterior al final diástole

GPP_s: Grosor de la pared posterior al final sístole

GTP: Guanosín trifosfato

GTPasa: Guanosina trifosfatasa

H₂S: Gas sulfhídrico

H9c2: Mioblastos cardiacos de rata neonato

HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia-1 α

HRP: Peroxidasa de rábano picante

HUVEC: Células endoteliales de venas del cordón umbilical humano

Hx: Hipoxia

IAM: Infarto agudo de miocardio

IGF: Factor de crecimiento insulínico

IL-1 β : Interleuquina-1 β

ILV: Vesícula intraluminal

IP: Intraperitoneal

IRS: Sustrato del receptor de insulina

LC-MS/MS: cromatografía líquida-masas/masas

LDH: Lactato deshidrogenasa

M: Molar

MBV: Cuerpo multivesicular

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

Min: Minutos

mRNA: RNA mensajero

MSC: Células madre mesenquimales

MSC-HIF: Células madre mesenquimales que sobre-expresan el factor inducible por hipoxia-1 α

MyoD: Proteína 1 de diferenciación miogénica

N₂: Nitrógeno

Nº: Número

nm: Nanometros

NO: Óxido nítrico

Nx: Normoxia

Oligo: Oligonucleótido

P/E: Penicilina/ Estreptomina

P100: Placas de 10 centímetros de diámetro

PB: Tampón fosfato

PBS: Tampón fosfato salino

PFA: Paraformaldehído

PI3k: Fosfoinositol 3-quinasa

RAB: Proteína G monomérica de la superfamilia de las proteínas RAS

RFP: Proteína roja fluorescente

RIPA: Tampón de radioinmunoprecipitación

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: Revoluciones por minuto

RT-qPCR: Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SALINO: Suero salino fisiológico

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida-sodiododecilsulfato

Seg: Segundo

shRNA: RNA de silenciamiento

SNARE: Receptor snap

T/E: Tripsina/EDTA

TBS: Tampón tris salino

TBST: Tampón tris salino con tween-20

TFA: Ácido trifluoroacético

TGN: Red del trans Golgi

Tn T: Troponina T cardíaca

TNF: Factor de necrosis tumoral

UTR: Región no traducida

V: Voltios

VCAMs: Moléculas de adhesión vascular

VD: Ventrículo derecho

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR-2: Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular

VI: Ventrículo izquierdo

Vol: Volumen

vs: Versus

WB: Western Blot

St: "starvation"

-St: Sin ayuno de glucosa

+St: Con ayuno de glucosa

2-NBDG: 2-deoxy-2-((7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino)

Resumen

Las células de un organismo multicelular se comunican a través una amplia variedad de mecanismos que incluyen no sólo la transferencia directa por contacto célula-célula, sino también la secreción de las moléculas y vesículas que viajan a otras células. Las células de mamíferos segregan una gran variedad de vesículas extracelulares (EV). Los exosomas son vesículas extracelulares con un tamaño de entre 20-100 nanómetros que pueden transferir información en forma ácidos nucleicos o proteínas entre diferentes células por lo que son reconocidos como un potente mecanismo de comunicación intercelular. Este tipo de vesículas está siendo objeto de intensa investigación no solo en el proceso de metástasis tumoral, ya que se cree que los exosomas están relacionados con la extensión del tumor a órganos no relacionados, sino en el ámbito de la medicina regenerativa, puesto que se consideran potenciales candidatos implicados en los mecanismos paracrinos inducidos por las células madre. Por este motivo, en este trabajo se analizó el potencial terapéutico de los exosomas derivados de células madre mesenquimales (MSC). Así, nos planteamos la hipótesis de que las MSC fueran capaces de transferir exosomas hacia las células de los tejidos que reparan. Un trabajo reciente de nuestro grupo de investigación demostró que la sobreexpresión del factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) en MSC (MSC-HIF) potenciaba la capacidad terapéutica de las MSC para mejorar la función cardíaca tras un infarto agudo de miocardio (IAM). En consecuencia, estudiamos el contenido de microRNAs en los exosomas derivados de las MSC y las MSC-HIF. Se observó que las poblaciones de microRNAs presentes exosomas derivados de MSC y MSC-HIF cambiaron de manera reproducible en función de la disponibilidad de oxígeno que poseían las células, lo que interpretamos como un mecanismo respuesta celular mediada por exosomas. Así también, observamos que en las MSC-HIF la combinación de la sobreexpresión de HIF- 1α con las bajas tenciones de oxígeno generaban exosomas cargados con microRNAs con potencial terapéutico para el tratamiento del IAM. Sin embargo, no fuimos capaces de demostrar el potencial terapéutico de los exosomas aislados de dichas poblaciones celulares en un modelo de infarto experimental en rata, lo que pudo ser ocasionado por un diseño incorrecto del procedimiento experimental. Esto provocó un giro en la orientación de la tesis y decidimos centrarnos en los mecanismos celulares inducidos por los exosomas en el entorno cardíaco. En este contexto, recientemente se ha descrito la presencia de exosomas en cardiomiocitos (CM) humanos. A nivel de ultraestructura, la anatomía del tejido cardíaco revela una intrínseca relación entre los CM y las células endoteliales (ECs) que componen el endotelio microvascular coronario, el cual se encarga de nutrir a los CM realizando el transporte de combustibles metabólicos desde la sangre hacia los CM. El espacio perivascular

que separa a los CM de las ECs es de tan solo $1\mu\text{m}$, permitiendo el flujo de información a corta distancia entre los CM y las ECs. Mantener esta disposición es fundamental para lograr un acople metabólico entre ambos tipos celulares. El corazón no posee reservas apreciables de combustibles metabólicos por lo el aporte de nutrientes y oxígeno debe ser continuo y regulado. Por esto pensamos que el aporte energético del endotelio hacia el corazón debería estar finamente coordinado, no solo por el control exógeno del metabolismo en todo el organismo sino también por algún mecanismo en el que el propio cardiomiocito regule el transporte de su célula endotelial asociada. Además se sabe que las ECs liberan factores que alteran la actividad de los CM, y de la misma manera que los CM liberan factores que alteran las ECs. Sin embargo, se conoce poco a cerca de los mecanismos que regulan el flujo de nutrientes desde las ECs hacia los CM, especialmente es situaciones de estrés agudo en donde se requiere un mecanismo activo a nivel local que regule el transporte endotelial. En este trabajo se estudió cómo los exosomas derivados de los CM alteraban el transporte de glucosa en ECs. En primer lugar mostramos datos que indican que el ayuno de glucosa incrementa la síntesis y secreción de exosomas en cultivos de CM neonatales de rata. En segundo lugar demostramos que estos exosomas derivados de CM son internalizados por las ECs en una manera dependiente de la disponibilidad de glucosa del medio. Por último aportamos evidencias de que los exosomas derivados de los CM que fueron cultivados en condiciones de ayuno de glucosa fueron capaces de transferir transportadores de glucosa (GLUTs) hacia las ECs, en donde estos GLUTs transferidos mediante exosomas incrementaron la captación de glucosa y la actividad glicolítica de las ECs. Tomando en conjunto los resultados, en la presente tesis se propone un modelo de comunicación entre los CM y las ECs, en el cual el tráfico de proteínas mediado por exosomas desde los CM hacia las ECs trasladaría las necesidades metabólicas de los CM a las ECs las cuales están en contacto directo con los nutrientes presentes en el flujo coronario. Este novedoso mecanismo de acción a corta distancia revela una relación intrínseca entre la demanda de glucosa de los CM y el transporte de glucosa de las ECs permitiendo una rápida respuesta desde las ECs al incrementar la cantidad de transportadores de glucosa sin necesidad de síntesis *de novo* ni de la modificación de los perfiles de transcripción génica, lo que sin duda aumenta la eficiencia del proceso de comunicación celular.

Resum

Les cèl·lules d'un organisme multicel·lular es comuniquen a través d'una àmplia varietat de mecanismes que inclouen no només la transferència directa per contacte cèl·lula-cèl·lula, sinó també la secreció de les molècules i vesícules que viatgen a altres cèl·lules. Les cèl·lules de mamífers segreguen una gran varietat de vesícules extracel·lulars (EV). Els exosomes són vesícules extracel·lulars amb una mida d'entre 20-100 nanòmetres que poden transferir informació en forma d'àcids nucléics o proteïnes entre diferents cèl·lules pel que són reconeguts com un potent mecanisme de comunicació intercel·lular. Aquest tipus de vesícules està sent objecte d'intensa investigació no només en el procés de metàstasi tumoral, ja que es creu que els exosomes estan relacionats amb l'extensió del tumor a òrgans no relacionats, sinó en l'àmbit de la medicina regenerativa, ja que consideren potencials candidats implicats en els mecanismes paracrins induïts per les cèl·lules mare. Per aquest motiu, en aquest treball es va analitzar el potencial terapèutic dels exosomes derivats de cèl·lules mare mesenquimals (MSC). Així, ens plantejarem la hipòtesi que les MSC pugueren transferir exosomes cap a les cèl·lules dels teixits que reparen. Un treball recent del nostre grup d'investigació va demostrar que la sobreexpressió del factor induïble per hipòxia 1α (HIF- 1α) a MSC (MSC-HIF) potenciava la capacitat terapèutica de les MSC per millorar la funció cardíaca després d'un infart agut de miocardi (IAM). En conseqüència, estudiem el contingut de microRNAs en els exosomes derivats de les MSC i les MSC-HIF. Es va observar que les poblacions de microRNAs presents en els exosomes derivats de MSC i MSC-HIF canvien de manera reproducible en funció de la disponibilitat d'oxigen que posseïen les cèl·lules, el que interpretem com un mecanisme de resposta cel·lular mediat per exosomes. Així també, observem que en les MSC-HIF la combinació de la sobreexpressió de HIF- 1α amb les baixes intencions d'oxigen generaven exosomes carregats amb microRNAs amb potencial terapèutic per al tractament de l'IAM. No obstant això, no vam ser capaços de demostrar el potencial terapèutic dels exosomes aïllats d'aquestes poblacions cel·lulars en un model d'infart experimental en rata, el que va poder ser ocasionat per un disseny incorrecte del procediment experimental. Això va provocar un gir en l'orientació de la tesi i vam decidir centrar-nos en els mecanismes cel·lulars induïts pels exosomes a l'entorn cardíac. En aquest context, recentment s'ha descrit la presència d'exosomes en cardiomiòcits (CM) humans. A nivell de ultraestructura, l'anatomia del teixit cardíac revela una intrínseca relació entre els CM i les cèl·lules endotelials (ECS) que componen l'endoteli microvascular coronari, el qual s'encarrega de nodrir als CM realitzant el transport de combustibles metabòlics des de la sang cap a els CM. L'espai perivascular que separa els CM

de les ECS és de tan sols 1µm, permetent el flux d'informació a curta distància entre els CM i les ECS. Mantenir aquesta disposició és fonamental per aconseguir un acoblament metabòlic entre els dos tipus cel·lulars. El cor no posseeix reserves apreciables de combustibles metabòlics pel l'aportació de nutrients i oxigen ha de ser continu i regulat. Per això pensem que l'aportació energètica de l'endoteli cap al cor hauria d'estar finament coordinat, no només pel control exogen del metabolisme en tot l'organisme sinó també per algun mecanisme en el qual el propi cardiomiòcit reguli el transport de la seva cèl·lula endotelial associada. A més se sap que les ECS alliberen factors que alteren l'activitat dels CM, i de la mateixa manera que els CM alliberen factors que alteren les ECS. No obstant això, es coneix poc a prop dels mecanismes que regulen el flux de nutrients des de les ECS cap als CM, especialment és situacions d'estrès agut on es requereix un mecanisme actiu a nivell local que reguli el transport endotelial. En aquest treball es va estudiar com els exosomes derivats dels CM alteraven el transport de glucosa en ECS. En primer lloc mostrem dades que indiquen que el dejuni de glucosa incrementa la síntesi i secreció de exosomes en cultius de CM neonatals de rata. En segon lloc vam demostrar que aquests exosomes derivats de CM són internalitzats per les ECS en una manera dependent de la disponibilitat de glucosa del medi. Finalment aportem evidències que els exosomes derivats dels CM que van ser cultivats en condicions de dejuni de glucosa van ser capaços de transferir Transportadores de glucosa (Gluts) cap a les ECS, on aquests Gluts transferits mitjançant exosomes incrementar la captació de glucosa i l'activitat glicolítica de les ECS. Prenent en conjunt els resultats, en aquesta tesi es proposa un model de comunicació entre els CM i les ECS, en el qual el tràfic de proteïnes mediat per exosomes des dels CM feia les ECS traslladaria les necessitats metabòliques dels CM a les ECS les quals estan en contacte directe amb els nutrients presents en el flux coronari. Aquest nou mecanisme d'acció a curta distància revela una relació intrínseca entre la demanda de glucosa dels CM i el transport de glucosa de les ECS permetent una ràpida resposta des de les ECS en incrementar la quantitat de transportadors de glucosa sense necessitat de síntesi de novo ni de la modificació dels perfils de transcripció gènica, el que sens dubte augmenta l'eficiència del procés de comunicació cel·lular.

Summary

The cells in a multicellular organism communicate a wide variety of mechanisms which include not only the direct transfer from cell-cell contact, but also the secretion of molecules and vesicles traveling through other cells. Mammalian cells secrete a variety of extracellular vesicles (EV). Exosomes are extracellular vesicles with a size between 20-100 nanometers that can transfer information as nucleic acids and proteins from different cells, so they are recognized as a powerful mechanism for intercellular communication. Such vesicles is under intense investigation not only in the process of tumor metastasis, as it is believed that exosomes are related to the extent of tumor to organs not related, but in the field of regenerative medicine, as they are considered potential candidates in the paracrine mechanisms induced by stem cells. Therefore, in this study we analyzed the therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSC) derived exosomes. Thus, we hypothesized that MSCs were able to transfer exosomes to cells that repair tissues. Recent work by our research group showed that overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) in MSC (MSC-HIF) enhanced the therapeutic potential of MSCs to improve cardiac function after acute myocardial infarction (IAM). Accordingly, we studied the content of microRNAs in exosomes derived from MSC and MSC-HIF. We showed that microRNAs populations present in exosomes derived from MSC and MSC-HIF reproducibly changed depending on the oxygen availability for the cells, which we interpret as a cellular response mechanism mediated by exosomes. Moreover, we observed that in the MSC-HIF the combining overexpression of HIF-1 α with low oxygen tension generated exosomes loaded with microRNAs with therapeutic potential for the IAM treatment. However, we were unable to demonstrate the therapeutic potential of exosomes isolated from these cell populations in an experimental IAM model in rat, which could be caused by improper design of the experimental procedure. This caused a shift in the thesis orientation and we decided to focus on the cellular mechanisms induced by exosomes in the cardiac environment. In this context, recently described the presence of exosomes in human cardiomyocytes (CM). At ultrastructure level, anatomy of the heart tissue reveals an intrinsic relationship between CM and endothelial cells (ECs) composing the coronary microvascular endothelium, which is responsible for nurturing the CM by transporting metabolic fuel from the blood into CMs. The perivascular space between the CM of ECs is only 1 μ m, allowing the flow of information to short distance between the CM and ECs. Keep this anatomical disposition is essential to achieve a metabolic coupling between both cell types. The heart does not have significant reserves of metabolic fuel, so the supply of nutrients and

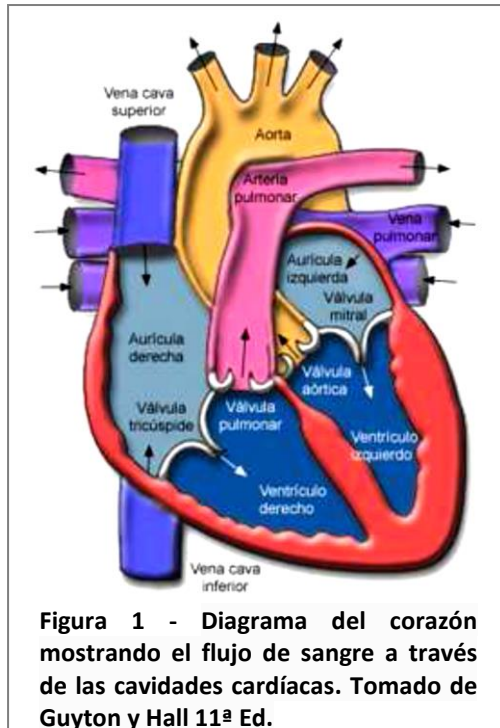
oxygen must be continuous and regulated. Therefore we think that the energy contribution of the endothelium to the heart should be finely coordinated not only by exogenous control of metabolism throughout the body but also for a mechanism in which the cardiomyocyte itself regulates the nutrient transportation of their associated ECs. Also known to the ECs release factors that alter the activity of the CM, and in the same way that the CM releasing factors that alter the ECs. However, little is known about the mechanisms that regulate the flow of nutrients from the ECs to the CM, especially in acute stress situations where an active local regulating endothelial transport mechanism is required. In this work we studied how exosomes derived from CM altered glucose transport in ECs. First we show evidence that glucose starvation increases the synthesis and secretion of exosomes in cultured neonatal rat CM. Secondly we show that these CM derived exosomes are internalized by ECs in a glucose availability dependent manner. Finally we provide evidence that exosomes derived from CM cultured under glucose starvation were able to transfer glucose transporters (GLUTs) to ECs, where these GLUTs transferred via exosomes increased the glucose uptake and the glycolytic activity of ECs. Taking together the results, in this thesis we propose a model of communication between CMs and ECs, in which protein trafficking mediated by exosomes from CM to ECs would move the metabolic needs of the CM to the ECs which are in direct contact with the coronary nutrients flow. This novel short distance action mechanism reveals an intrinsic relationship between glucose demand of CM and glucose transport of ECs allowing a quick response from ECs by increasing the amount of glucose transporters without de novo synthesis or modification of gene transcription profiles, which certainly increases the efficiency of cellular communication process.

1. Introducción

1.1. El Corazón

1.1.1. Estructura y función

La función del corazón es bombear la sangre hacia el organismo para aportar oxígeno y nutrientes a los tejidos. El corazón está formado por 4 cámaras (2 aurículas y 2 ventrículos). El

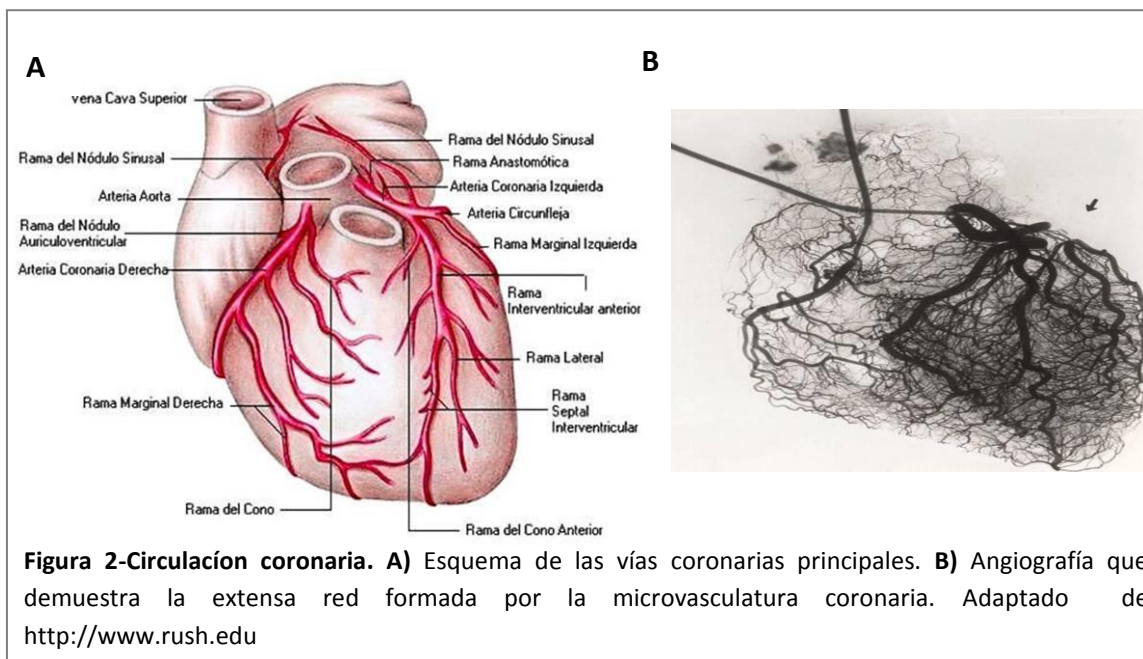


lado izquierdo y derecho del corazón están completamente separados por un tabique compuesto por una zona interauricular y otra interventricular. El lado derecho recibe a través de la aurícula derecha (AD) sangre venosa procedente del organismo, que a su vez es impulsada al ventrículo derecho (VD) a través de la válvula tricúspide. El VD propulsa la sangre a través de la válvula pulmonar por la arteria pulmonar a los pulmones; la sangre es oxigenada y pasa a la aurícula izquierda (AI) donde es impulsada al ventrículo izquierdo (VI) a través de la válvula mitral. Una vez el VI se rellena de sangre, ésta es impulsada a la circulación

periférica por la aorta para cubrir las necesidades de oxígeno y nutrientes del organismo (Figura 1). A nivel histológico, el corazón está formado por varias capas, que del interior al exterior se denominan endocardio, miocardio y epicardio. El endocardio consiste en una membrana serosa de endotelio y tejido conectivo, que recubre las cavidades y válvulas del corazón. El miocardio, la capa más gruesa, está formada principalmente por músculo estriado (en su mayoría células contráctiles denominadas cardiomiocitos) y cuya función principal es impulsar la sangre hacia el torrente circulatorio, mediante procesos de contracción y relajación. En la parte más externa se localiza el epicardio, una capa fina serosa de naturaleza mesotelial. Finalmente, el pericardio es una bolsa membranosa que envuelve al corazón y lo mantiene en una posición fija y además evita o minimiza la fricción en cada latido cardíaco. El ciclo cardíaco consta de dos fases principales: la diástole, en la cual se produce el llenado pasivo del corazón y la sístole, período en el que se produce la contracción activa. Cada ciclo es activado por un potencial de acción que se inicia en el nodo sinusal, localizado en la AD, el cual viaja rápidamente a través de ambas aurículas y continúa por el Haz de Hiss y las fibras de Purkinje. De este modo, las aurículas se contraen antes que los ventrículos teniendo una

función de “bombas cebadoras” de éstos, mientras que los ventrículos son la principal potencia para producir la circulación de la sangre por el organismo.

El músculo cardíaco se nutre a través de la circulación coronaria, la cual se encarga de asegurar la irrigación cardíaca (4) (Figura 2, A). La arteria coronaria izquierda cubre el aporte de nutrientes y de oxígeno de la parte anterior y lateral del ventrículo izquierdo (VI) y se ramifica en dos arterias principales, la arteria circunfleja y la arteria descendente anterior izquierda (ADAI), las cuales profundizan y se ramifican dentro del miocardio formando una extensa red de microvasculatura coronaria (Figura 2, B). Por otra parte, la arteria coronaria derecha irriga prácticamente todo el ventrículo derecho (VD) además de la parte posterior del VI. De la misma manera que la ADAI, esta arteria profundiza y se ramifica dentro del miocardio formando la red microvascular que aseguran el flujo de todo el tejido. El seno coronario recibe la mayor parte de la sangre venosa del VI, mientras que la sangre venosa del VD es drenada a través de las venas cardíacas anteriores.

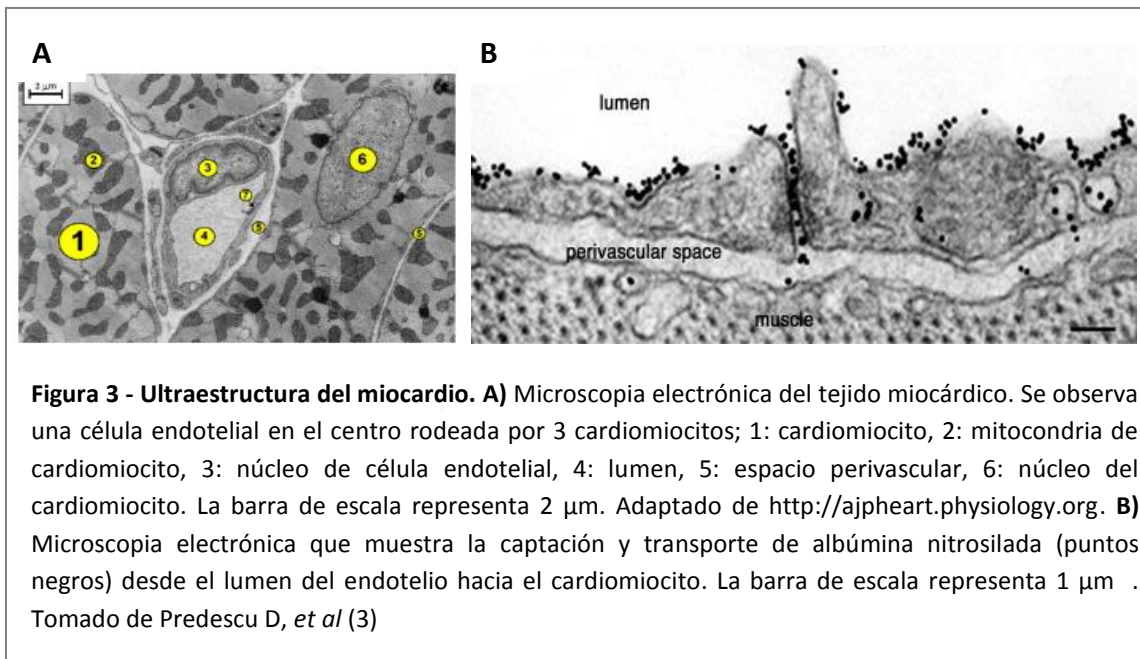


La regulación del flujo sanguíneo coronario depende principalmente de las necesidades metabólicas del miocardio. El corazón no posee reservas apreciables de combustibles metabólicos, por lo cual el consumo y la producción de ATP deben estar exhaustivamente coordinados con el aporte extrínseco de sustratos metabólicos y oxígeno que llegan a los cardiomiocitos. A nivel de la microvasculatura coronaria el flujo sanguíneo aumentará en proporción al consumo metabólico de los cardiomiocitos. En general, la perfusión del lecho coronario superior está determinada por la presión (resistencia) que ejerce el músculo cardíaco en la red de microvasculatura coronaria (5). Por ejemplo, durante el ejercicio, el

incremento en el riego coronario es principalmente mediado por la disminución durante la diástole de la resistencia microvascular. La regulación de la resistencia vascular coronaria es el resultado del balance entre tres señales tipos de señales, unas vasodilatadoras y vasoconstrictoras ejercidas por influencias neurohormonales, señales liberadas por el propio endotelio y señales derivadas de los cardiomiocitos. De esta manera, combinando estas señales se produce el correcto acoplamiento entre la demanda metabólica generada por los cardiomiocitos y el aporte de oxígeno y nutrientes que provee el endotelio desde la luz de los vasos.

A nivel de las vías coronarias superiores, el sistema nervioso autónomo tiene un efecto directo sobre la vascularización coronaria, siendo las fibras nerviosas parasimpáticas (vaginales) vasodilatadoras, mientras que la inervación simpática (adrenalina y noradrenalina) puede tener efecto vasoconstrictor o vasodilatador a nivel de la vascularización (6). Es interesante destacar que la inactivación farmacológica durante el ejercicio severo del control autonómico (hormonal) del riego coronario no genera zonas de isquemia, lo que demuestra que otros mecanismos son los encargados de generar la vasodilatación con la consecuente reducción de la resistencia y aumento del flujo sanguíneo durante situaciones de estrés (7). Esto sugiere que el control autonómico sirve para optimizar el acoplamiento entre el riego coronario y las necesidades metabólicas pero no es esencial en condiciones de esfuerzo severo.

A nivel de ultraestructura, la disposición del tejido cardíaco hace evidente la constante comunicación entre los cardiomiocitos y las células endoteliales necesaria para generar el acoplamiento entre demanda y aporte de nutrientes (8). Los cardiomiocitos liberan sustancias que alteran la función endotelial (desde el tono vascular, hasta la proliferación) así también como las células endoteliales alteran la actividad de los cardiomiocitos. En los corazones de los mamíferos la relación existente entre cardiomiocito-endotelio es aproximadamente de 3:1, es decir, por cada tres cardiomiocitos hay una célula endotelial, lo que determina que cada cardiomiocito está en contacto con al menos una célula endotelial (Figura 3). La corta distancia (aprox. 1 μm) que separa cada cardiomiocito de su célula endotelial asociada es crucial para el traspaso de moléculas y oxígeno entre los dos tipos celulares.



1.1.2. Metabolismo cardíaco

El corazón es un órgano especializado en la transformación de energía química en energía mecánica. Esta energía química proviene de la constante oxidación de sustratos exógenos como ácidos grasos, glucosa, cuerpos cetónicos y lactato) para generar ATP que se gasta en la contracción muscular (9). Esta energía en forma de ATP se obtiene en un 95% de la oxidación de sustratos en las mitocondrias de los cardiomiocitos, dejando el 5% restante para la glicólisis. Aunque hay una clara evidencia de que el corazón puede realizar el consumo selectivo de estos sustratos en diferentes situaciones, se conoce poco acerca de los mecanismos que regulan esta flexibilidad en la selección de combustibles metabólicos la cual es crucial para mantener la función cardíaca (10). En un corazón sano la oxidación de ácidos grasos representa aproximadamente entre el 60-70% de total de la energía consumida, dejando el 30-40% restantes a la glucosa y el lactato (11). El mantenimiento de esta proporción en la selección de combustibles es influenciado por el desarrollo y por las condiciones fisiopatológicas del corazón. Por ejemplo, en la transición del estado fetal al recién nacido hay un cambio en la preferencia del corazón desde oxidar glucosa hacia comenzar a oxidar ácidos grasos cuando incrementa la disponibilidad de oxígeno y los alimentos ricos en grasas (12, 13). Los corazones disfuncionales y con un grado de hipertrofia moderado presentan el mismo tipo de preferencia por oxidar glucosa que el corazón fetal (14, 15). Se cree que esto es debido al incremento en el flujo de la vía glicolítica asociado con el aumento en la captación de glucosa por una vía insulina-independiente que no genera cambios significativos ni en la expresión de enzimas glicolíticas ni en la cantidad de GLUTs (16, 17). Por otro lado, en corazones de

pacientes diabéticos, la combinación entre la resistencia a la insulina y los altos niveles de ácidos grasos libres circulantes hacen que el corazón utilice casi de manera exclusiva los ácidos grasos para producir ATP (18). En la obesidad se observa un fenotipo parecido a la diabetes en donde el corazón utiliza mayoritariamente ácidos grasos para la obtención de ATP (19). Se cree que el incremento patológico en la captación de ácidos grasos puede interpretarse como un exceso en la cantidad de nutrientes (a nivel energético) aportado al corazón. Esto conlleva al desacoplamiento entre el oxígeno disponible para oxidar sustratos y la cantidad de sustratos, lo que se refleja en un incremento en la captación de oxígeno y una disminución del rendimiento entre trabajo realizado y el oxígeno consumido, por lo que la obesidad y la diabetes están asociadas al estrés oxidativo y la lipotoxicidad producto del almacenamiento de ácidos grasos en el corazón (20, 21).

1.1.3. El infarto agudo de miocardio

1.1.3.1. Epidemiología

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte y de hospitalización en los países desarrollados. En España, el 31% del total se debe a la cardiopatía isquémica, siendo el infarto agudo de miocardio (IAM) la principal causa de muerte. En el mundo, más de 7 millones de personas sufren cada año infarto de miocardio (22). Además, gracias a los avances en el campo de la cirugía cardíaca, el número de pacientes crónicos con patología cardiovascular ha aumentado. Por otra parte, la mortalidad a 5 años tras el infarto es del 50 %. Así pues el IAM, además de suponer un drama para la sociedad, conlleva un gasto sanitario importante así como un gasto colateral derivado del absentismo laboral. Por tanto, encontrar una solución definitiva para el tratamiento del IAM sería muy beneficioso para la sociedad, además de muy ventajoso económicamente (23, 24).

1.1.3.2. Fisiopatología del infarto de miocardio

La cardiopatía isquémica se produce como consecuencia de un flujo coronario insuficiente, con el consiguiente déficit en el aporte de oxígeno para cubrir las necesidades metabólicas del miocardio. Las dos principales causas que reducen el flujo coronario originando como consecuencia cardiopatías isquémicas son la aterosclerosis y la oclusión coronaria aguda (25). La aterosclerosis es una patología que se produce por el depósito progresivo de colesterol en la zona subendotelial de las arterias, principalmente de las coronarias. Posteriormente el tejido fibroso invade esa zona y se forman placas de ateroma, provocando una obstrucción total o parcial del flujo sanguíneo (26). La oclusión coronaria aguda ocurre frecuentemente en

personas con una cardiopatía aterosclerótica coronaria grave subyacente y se debe a varios procesos, entre ellos, a la obstrucción de la arteria por la formación de un coágulo (trombo), originado por el depósito de células sanguíneas y fibrina sobre la superficie rugosa de las placas de ateroma, que crece hasta provocar la obstrucción de la luz del vaso. En ocasiones el trombo se desprende (pasando a denominarse émbolo) y circula por la sangre hasta obstruir un vaso cuyo diámetro es menor que el suyo propio (27).

La pérdida de viabilidad celular se produce entre 20 y 40 minutos después de ocurrir el cese del flujo sanguíneo por la oclusión coronaria. Este proceso conlleva la muerte celular, lo que se denomina infarto agudo de miocardio (IAM). Durante su fase inicial, la bajada de los niveles de oxígeno desencadena una liberación de contenidos celulares por parte de los cardiomiocitos dañados. Esto provoca una respuesta inflamatoria aguda mediada por la liberación de Interleuquina-1 β (IL-1 β) y del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), principalmente por parte de macrófagos residentes y neutrófilos. La IL-1 β es un importante mediador en la respuesta inflamatoria, además de jugar un papel importante en actividades celulares tales como apoptosis. Tanto el IL-1 β como la TNF- α inducen la expresión de moléculas de adhesión y de otras citoquinas que atraen a células inflamatorias hacia el sitio de la lesión. Además estimulan la proliferación de células endoteliales y fibroblastos, que aumentan el aporte sanguíneo en el sitio de lesión y contribuyen a la formación del tejido cicatricial, respectivamente.

Durante el IAM, se produce la muerte de las fibras musculares de la zona central del área donde no hay flujo sanguíneo. Así pues, el tejido miocárdico de esta zona no es funcional (aquínético/disquínético) puesto que no es capaz de contraerse adecuadamente y además hay fallo del impulso nervioso. Alrededor de esta zona existe una franja en la que el músculo cardíaco se contrae con debilidad (hipoquinético o aturdido), debido a la isquemia leve. A medida que va pasando el tiempo (entre unos días y tres semanas) la aparición de circulación colateral hace que parte de las fibras localizadas en el perímetro exterior de la zona no funcional se recupere, mientras que las fibras musculares localizadas en el interior de la zona no funcional y que sufren isquemia prolongada acaban muriendo aumentando así el área de la zona necrótica. La reabsorción del tejido necrótico y por tanto el remodelado ventricular, se ve favorecida por la sobre-expresión de la IL-1 β , junto con la IL-6 (cuya secreción se ve inducida por TNF- α) en la fase aguda del IAM. Este tejido necrótico va siendo reemplazado progresivamente por tejido conectivo fibrótico, que se va contrayendo hasta convertirse en una cicatriz fibrosa más pequeña a lo largo del tiempo (meses o años). Por el contrario, las zonas sanas del miocardio se hipertrofian para compensar en la medida de lo posible la pérdida de músculo cardíaco. A pesar de ello se produce una disminución del gasto cardíaco, ya que la capacidad de bombeo del ventrículo afectado disminuye. Este efecto se ve

exacerbado por la distensión sistólica. Este fenómeno consiste en que en cada sístole el tejido miocárdico sano se contrae, mientras que la zona isquémica, que ha perdido su capacidad contráctil, es incapaz de soportar la presión interna del ventrículo y es empujada al exterior, disipando parte de la fuerza de bombeo para impulsar la sangre desde el ventrículo hacia la circulación (28). Así, la sobrecarga sobre la zona sana va provocando en las zonas adyacentes cambios como hipertrofia celular y dilatación ventricular, con el consiguiente deterioro de la función cardíaca. Al conjunto de estos cambios estructurales junto con el adelgazamiento de la pared ventricular infartada, se le denomina remodelado ventricular. Además, la cicatriz miocárdica es un factor de riesgo para padecer arritmias, ya que la conducción del impulso eléctrico en esta zona es más lenta que en el tejido sano (29, 30). Con el tiempo, la afectación de la función cardíaca desencadena una insuficiencia cardíaca, que se define como la incapacidad del corazón para bombear la cantidad de sangre necesaria para cubrir las demandas de oxígeno y nutrientes del organismo.

1.1.3.3. El metabolismo cardíaco durante y tras el infarto

La oclusión de una arteria coronaria origina el cese brusco de la perfusión regional dejando dicha zona sin aporte de oxígeno ni nutrientes e impidiendo el recambio de metabolitos provenientes de la respiración celular (31). A medida que las mitocondrias van consumiendo el oxígeno disponible para generar ATP, se van produciendo condiciones anaerobias o isquémicas con el consiguiente cambio en la vía de obtención de la energía. Así pues, se produce el cese del metabolismo de ácidos grasos y comienza la glucólisis anaerobia, que conlleva la acumulación de iones hidrógeno y la producción de lactato, provocando acidosis tisular. La pérdida de adenina (compuesto obtenido a través de la degradación del ATP) conlleva una alteración celular grave y es una de las causas principales de muerte de cardiomiocitos tras la isquemia (32). Funcionalmente estos cambios se acompañan de una rápida pérdida de contractilidad de la región afectada y anormalidades eléctricas que pueden conducir a arritmias graves. Si estos cambios no son revertidos a tiempo, se producirá finalmente la necrosis del tejido hipóxico.

1.1.3.4. Diagnóstico y tratamiento convencional del IAM

Para diagnosticar un IAM es importante integrar la historia clínica con el examen físico del paciente. Además de esto son esenciales las siguientes pruebas complementarias: el electrocardiograma (ECG), los marcadores enzimáticos y la ecocardiografía. Los principales signos clínicos que aparecen en un IAM son: dolor en el pecho que se puede irradiar o proyectar al brazo izquierdo o zona izquierda del cuello, disnea (dificultad respiratoria),

náuseas, vómitos, palpitaciones, sudor y ansiedad. No obstante, hay que señalar que aproximadamente una cuarta parte de los IAM son asintomáticos (33). El ECG consiste en un examen no invasivo mediante el cual se obtiene en papel la actividad eléctrica del corazón. En caso de infarto se podrán observar cambios en el trazado; típicamente se produce una elevación o depresión del segmento ST (34, 35). Además, es fundamental la toma de muestras sanguíneas para medir las enzimas relacionadas con el daño miocárdico. Se trata de proteínas que pasan a sangre desde el cardiomiocito a través de su membrana celular dañada. En la actualidad se utilizan la CK-MB (un subtipo de la enzima Creatinina Quinasa) y las Troponinas cardíacas T e I, ya que son las más específicas para el diagnóstico de daño miocárdico (36, 37). Por último, la ecocardiografía nos dará una información muy valiosa sobre el estado del parénquima miocárdico y su función contráctil (38). En referencia al tratamiento del IAM, las modalidades terapéuticas actuales para el tratamiento del infarto agudo de miocardio son limitadas y van desde el tratamiento médico en la fase aguda, hasta la aplicación de dispositivos de asistencia mecánica al ventrículo izquierdo y el trasplante de corazón (39). Los objetivos del tratamiento en la fase aguda del infarto son detener la progresión del infarto, reducir las demandas al corazón, controlar el dolor y evitar complicaciones. El tratamiento convencional se basa en el uso de ácido acetilsalicílico, oxígeno, analgésicos, nitroglicerina y β -bloqueantes (40-42). El siguiente paso, tras estas medidas iniciales, es la reperfusión de la arteria coronaria bloqueada, ya sea de manera farmacológica (trombolisis) o de forma mecánica (angioplastia) o ambas (43, 44). El trasplante de corazón es hoy en día el único método realmente eficaz para tratar la insuficiencia cardíaca producida como consecuencia de un IAM. Sin embargo, este procedimiento está limitado por la escasez de órganos y las complicaciones que la necesaria terapia inmunosupresora crónica conlleva (45). Así, el desarrollar estrategias terapéuticas alternativas al trasplante constituye un importante reto y cualquier método capaz de reparar o regenerar el miocardio dañado o isquémico, contribuiría de forma muy significativa al tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

1.1.4. Terapias avanzadas para el tratamiento del IAM mediante el uso de células madre mesenquimales (MSC)

Recientemente se ha demostrado que el corazón no es un órgano post-mitótico sino que es capaz de auto-regenerarse, aunque de una manera muy limitada e insuficiente (46). Para promover una mayor recuperación es necesario un aporte externo, en el que además de restaurar el flujo sanguíneo para limitar el área afectada, se propicie la regeneración del tejido dañado. Así, viendo la limitada capacidad de regeneración del corazón, surgió la idea de las llamadas terapias avanzadas, que han consistido en el uso de células madre autólogas para

reparar y regenerar el miocardio dañado. Sin embargo, en la mayoría de ocasiones, bajo esta denominación se han utilizado poblaciones heterogéneas poco enriquecidas en células troncales adultas, como es el caso de las células de médula ósea mononucleadas y los mioblastos esqueléticos autólogos. Esto se debe a que los estudios clínicos han tratado de utilizar poblaciones celulares poco manipuladas en el laboratorio, asumiendo que el bajo porcentaje de células madre infundidas (alrededor del 3% de MSC en una muestra de médula total) sería capaz de reparar el infarto (47).

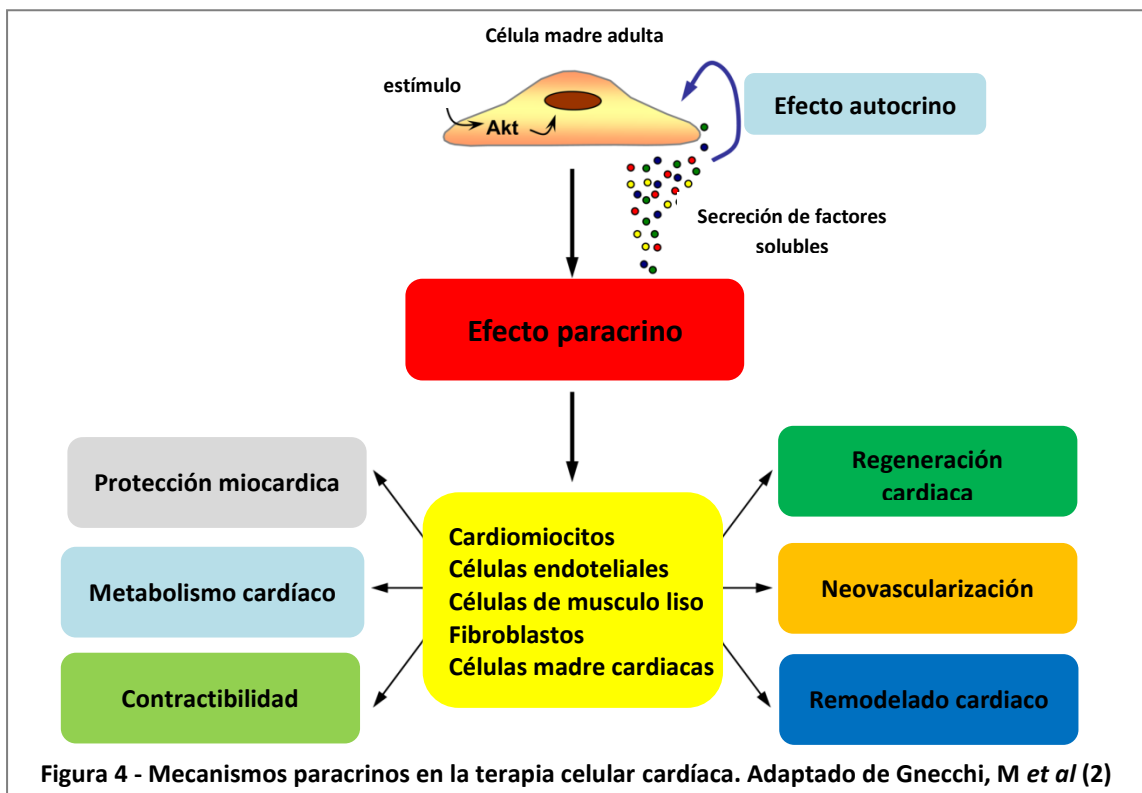
1.1.4.1. Características de las MSC

Las células madre mesenquimales (MSC), frecuentemente utilizadas en terapia celular, son células multipotentes identificadas por primera vez por Friedenstein y colaboradores (48) y aisladas del estroma de médula ósea por Pittenger y col. en 1999 (49). In vitro, son capaces de diferenciarse a adipocitos, condrocitos y osteoblastos (50) y, tras el trasplante en útero, pueden anidar y diferenciarse a múltiples tejidos (188). Su presencia en médula ósea recién extraída es baja (0,01-0,0001%), pero pueden expandirse ex vivo fácilmente debido a su capacidad de adhesión a superficies plásticas. Las MSC se han aislado de sangre periférica adulta, tejido adiposo, piel, pulpa dental, hígado, membrana sinovial, músculo esquelético, pulmón, sangre de cordón umbilical, líquido amniótico y placenta y otros. Las MSC aisladas de diferentes tejidos comparte los marcadores antigénicos CD13, CD29, CD31, CD44, CD54, CD63, CD73, CD90, CD105, CD106, CD140b y CD166 y son negativas para los marcadores antigénicos de células madre hematopoyéticas (CD34, CD45, CD14 y CD133) (51). Sin embargo, estudios con microarrays muestran diferencias en la expresión genética y diferenciación multilínea según su procedencia. El interés de las MSC humanas en terapia celular cardíaca radica en su relativa facilidad de obtención a partir de diferentes tejidos como médula ósea o tejido adiposo, en que el método para su aislamiento y expansión en medios de cultivo sea bastante sencillo y en el hecho de que parecen ser células inmunoprivilegiadas debido a la ausencia o bajos niveles de expresión en su superficie de moléculas MHC clase I y MHC clase II con ausencia de respuesta de células T en entorno alógeno (52). Un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación (53) comparó la terapia celular realizada con dos tipos celulares diferentes, las MSC derivadas de médula ósea frente a las células madre hematopoyéticas aisladas de sangre de cordón umbilical, en base a la capacidad de inducir una mejora en la función cardíaca luego de un IAM. En concreto, se observó que las MSC eran más eficaces que las hematopoyéticas porque reducían más el área del infarto y prevenían en cierto grado el remodelado ventricular.

1.1.4.2. Mecanismos terapéuticos inducidos por las MSC: Hipótesis Paracrina

Aun no son claros los mecanismos involucrados en la regeneración del tejido cardíaco producido por la terapia con células madre. Una de las hipótesis más influyentes, denominada, hipótesis paracrina, establece que, las células, en nuestro caso MSC inyectadas de manera intramiocárdica luego de un IAM provocado por ligación de una coronaria, secretan de manera paracrina una serie de factores incluyendo, factores de crecimiento, citoquinas, interleuquinas etc., que en su conjunto producen las mejoras observadas (Figura 4).

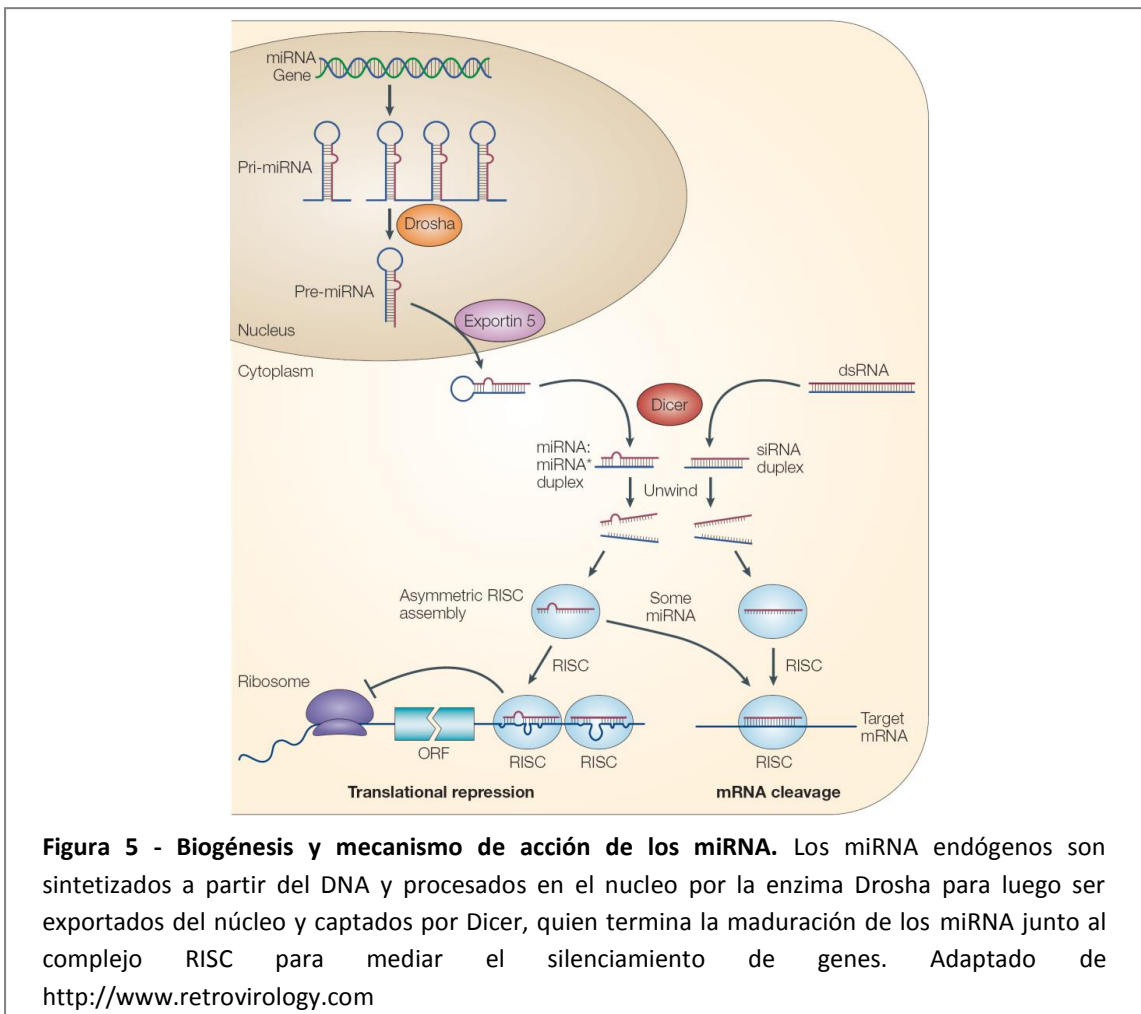
Hay fuertes evidencias de estudios en los que, los medios condicionados provenientes de células madre adultas son agregados a cultivos de cardiomiocitos; en estos experimentos se observa que los medios condicionados protegen los cultivos ante condiciones de estrés (54). Entre los factores de crecimiento, interleuquinas y citoquinas liberadas por MSC se encuentran la angiogenina, la angiopoyetina 1, la endotelina 1, la interleukina1, la interleukina 6, la interleukina 11, la metaloproteína de matriz 1, la metaloproteína de matriz 2, metaloproteína de matriz 9, el factor de crecimiento placentario, la pleiotrofina, y el factor de crecimiento vascular endotelial, entre otros.



Todo esto apunta a que las MSC tienen una gran capacidad de influir en otros tipos celulares a través del intercambio de sustancias, por lo que probablemente los mecanismos de comunicación celular ejercidos por estas células sean claves para comprender su efecto terapéutico.

1.1.5. Los miRNA en la enfermedad cardíaca: características generales de los miRNA

Un miRNA (o mir) es un RNA monocatenario, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, y que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos (55). La función de los miRNA está relacionada con la regulación de la expresión génica. De esta forma un miRNA es complementario a una parte de uno o más RNA mensajeros (mRNA). Los miRNA de animales suelen mostrar complementariedad imperfecta con la región 3' UTR, y generalmente inhiben la traducción del mRNA diana, mientras que los de plantas suelen mostrar complementariedad perfecta con regiones codificantes e inducen el corte y la posterior degradación del mRNA diana (Figura-5).



Los miRNA se transcriben a partir de diferentes localizaciones genómicas como largos transcritos primarios (pri-miRNA) por la RNA-polimerasa II (56). Los miRNA pueden encontrarse en muchos tipos de loci en el genoma:

- La transcripción de los miRNA puede estar regulada independientemente por promotores específicos, como ocurre con miR-1-1 y miR-133a-2, que están regulados por los factores de transcripción SRF (Serum Response Factor) y MyoD.

- La mayoría de los precursores de miRNA presentes en intrones tienen la misma orientación que el gen en el que se alojan y son inicialmente transcritos como parte de su RNA precursor. Por ejemplo, miR-208, que se expresa específicamente en el corazón de humano y ratón, reside en el intrón 28 de la cadena pesada de la α -miosina cardíaca. Los pri-miRNA intrónicos pueden producirse por corte del intrón por la endonucleasa Drosha, después de que se haya producido el proceso de splicing.
- Con pocas excepciones, los miRNA que están integrados o se superponen con exones de transcritos conocidos, están siempre en la misma orientación, y la mayoría se encuentran en las regiones no-codificantes UTRs 5' o 3' (por ejemplo, miR-198 en follistatin-like 1).

Aproximadamente el 50% de los miRNA están en grupos de miRNA que inicialmente se encuentran codificados como un transcrito policistrónico (que incluye varios genes), el cual posteriormente se fragmenta en múltiples miRNA. En la mayoría de los casos, los miRNA policistrónicos comparten el mismo patrón de expresión. Sin embargo, los niveles relativos de los miRNA dentro del grupo parecen estar regulados de una manera dependiente del desarrollo y la homeostasis, lo que sugiere una complejidad aún no definida en la regulación de la expresión génica. Los miRNA inducen la degradación de los mRNA diana mediante la eliminación de la caperuza (en el extremo 5') y de la cola de poliadeninas (poly-A, en el extremo 3') (57). Finalmente, los miRNA podrían también silenciar sus mRNA dianas secuestrándolos en sitios citoplásmicos discretos, los cuerpos de procesamiento de mRNA o P-bodies, que carecen de maquinaria de traducción. Sin embargo, a pesar de las discrepancias existentes entre los diferentes mecanismos propuestos, los apoyos experimentales para cada mecanismo son variados.

1.1.5.1. Los miRNA en la patología cardíaca

Un trabajo reciente de M. Small y E. N. Olson (58) hace una excelente recopilación del papel que ejercen los miRNA en la enfermedad cardíaca. Se ha observado que en la enfermedad cardiovascular hay una reexpresión de genes que normalmente se expresan en estadios tempranos del desarrollo del corazón así también como patrones definidos de expresión de miRNA (59). La importancia individual de los miRNA en la enfermedad cardíaca ha sido demostrada mediante la delección de genes en ratones sometidos a diferentes tipos de daño cardíaco. De esta manera, al día de hoy sabemos que, por ejemplo, el miR-1, el miR-133 y el miR-208 están involucrados en diversos tipos de arritmias (60, 61). Mientras que los miR-21 y

miR-29 están asociados a fibrosis (62) y los miR-208 y miR-133 se encuentran relacionados con el remodelado ventricular (63) (Figura 6).

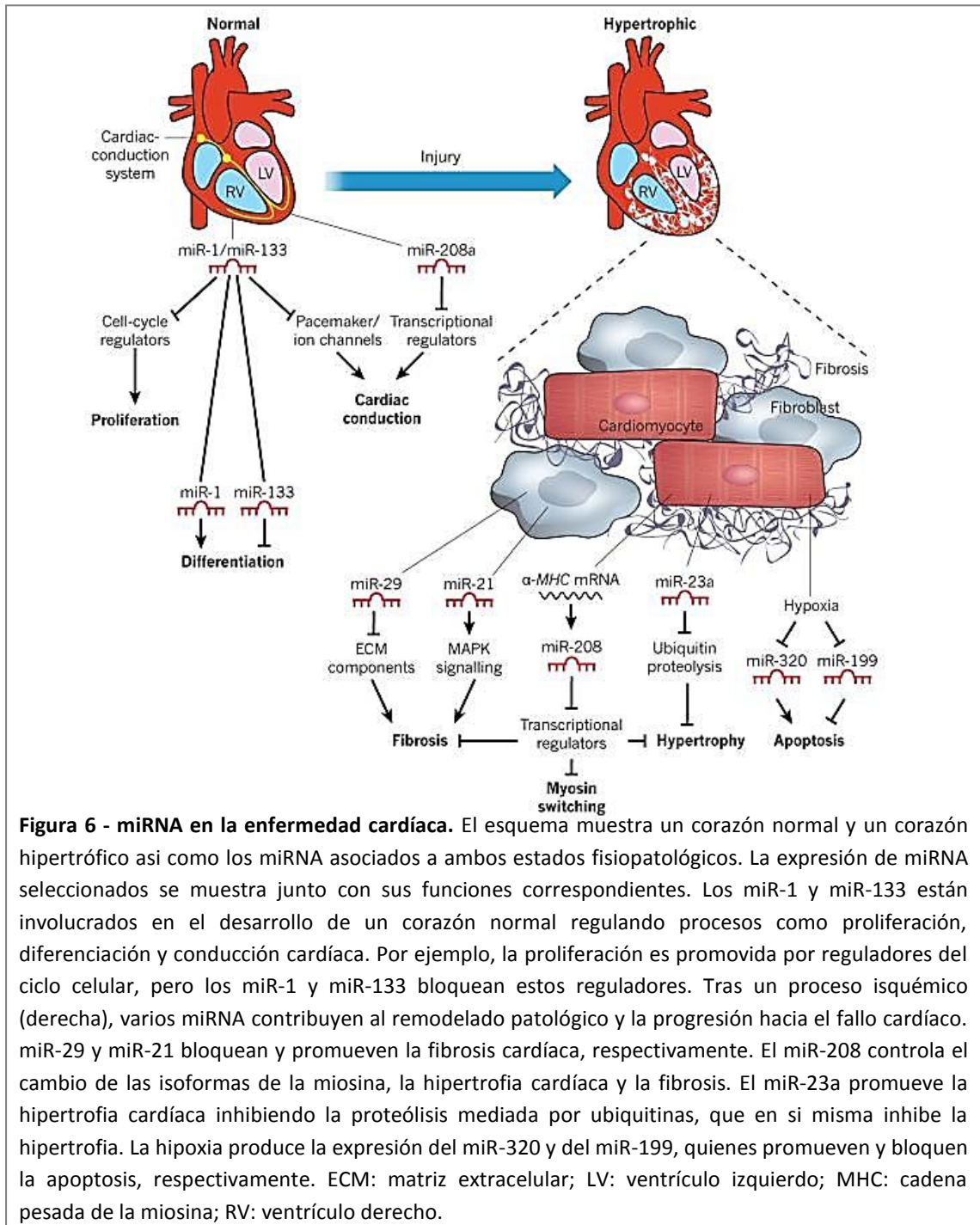


Figura 6 - miRNA en la enfermedad cardíaca. El esquema muestra un corazón normal y un corazón hipertrófico así como los miRNA asociados a ambos estados fisiopatológicos. La expresión de miRNA seleccionados se muestra junto con sus funciones correspondientes. Los miR-1 y miR-133 están involucrados en el desarrollo de un corazón normal regulando procesos como proliferación, diferenciación y conducción cardíaca. Por ejemplo, la proliferación es promovida por reguladores del ciclo celular, pero los miR-1 y miR-133 bloquean estos reguladores. Tras un proceso isquémico (derecha), varios miRNA contribuyen al remodelado patológico y la progresión hacia el fallo cardíaco. miR-29 y miR-21 bloquean y promueven la fibrosis cardíaca, respectivamente. El miR-208 controla el cambio de las isoformas de la miosina, la hipertrofia cardíaca y la fibrosis. El miR-23a promueve la hipertrofia cardíaca inhibiendo la proteólisis mediada por ubiquitinas, que en si misma inhibe la hipertrofia. La hipoxia produce la expresión del miR-320 y del miR-199, quienes promueven y bloquean la apoptosis, respectivamente. ECM: matriz extracelular; LV: ventrículo izquierdo; MHC: cadena pesada de la miosina; RV: ventrículo derecho.

1.1.5.2. Los miRNA y la regeneración cardíaca

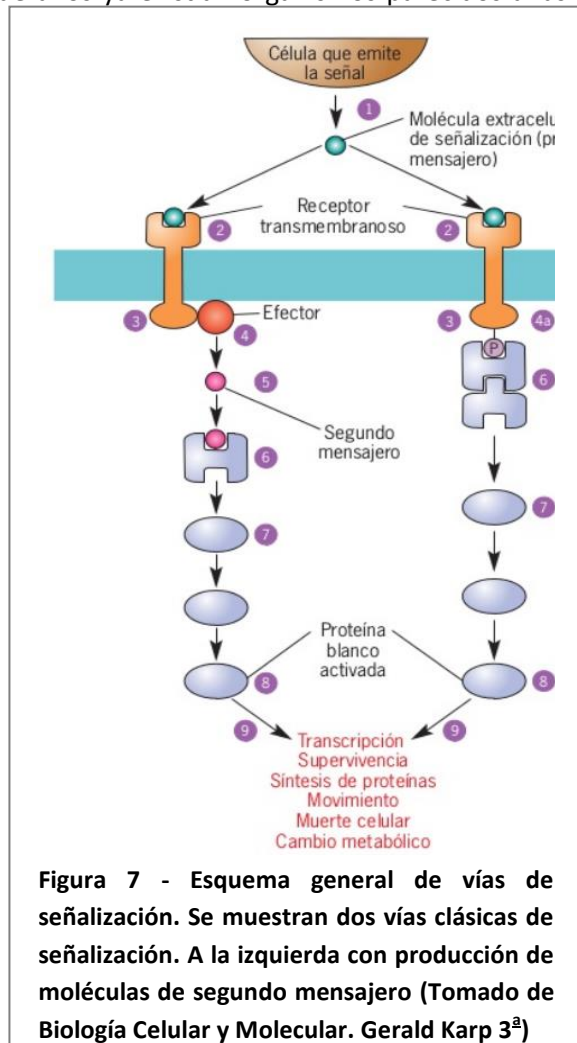
Varios trabajos actuales discuten la relevancia de los miRNA y su potencial a la hora de utilizarlos con fines terapéuticos en la regeneración cardíaca (64, 65). Por ejemplo, los miembros de la familia del miRNA-15 son sobreexpresados a partir del día 1 en corazones de ratones neonatales, coincidiendo con la pérdida de potencial de los cardiomiocitos para

dividirse. Se ha visto que la inhibición de esos miRNA en corazones de ratones adultos puede inducir la entrada en mitosis de los CM y confiere beneficios terapéuticos para el tratamiento del IAM (66). Por otra parte, el miRNA-199 y el miRNA-590 promueven la proliferación de los CM y su sobreexpresión se ha relacionado con la inducción de la regeneración cardiaca (67, 68).

1.2. Mecanismos de comunicación celular

El registro fósil sugiere que hace 3,5 millones de años ya existían organismos parecidos a las bacterias actuales, pero al parecer restaban otros 2,5 millones de años para que apareciera el primer organismo pluricelular (69). Posiblemente la razón por la cual la pluricelularidad tardó en evolucionar, estaría relacionada con la complejidad intrínseca de los mecanismos de comunicación intercelular que requiere un organismo pluricelular.

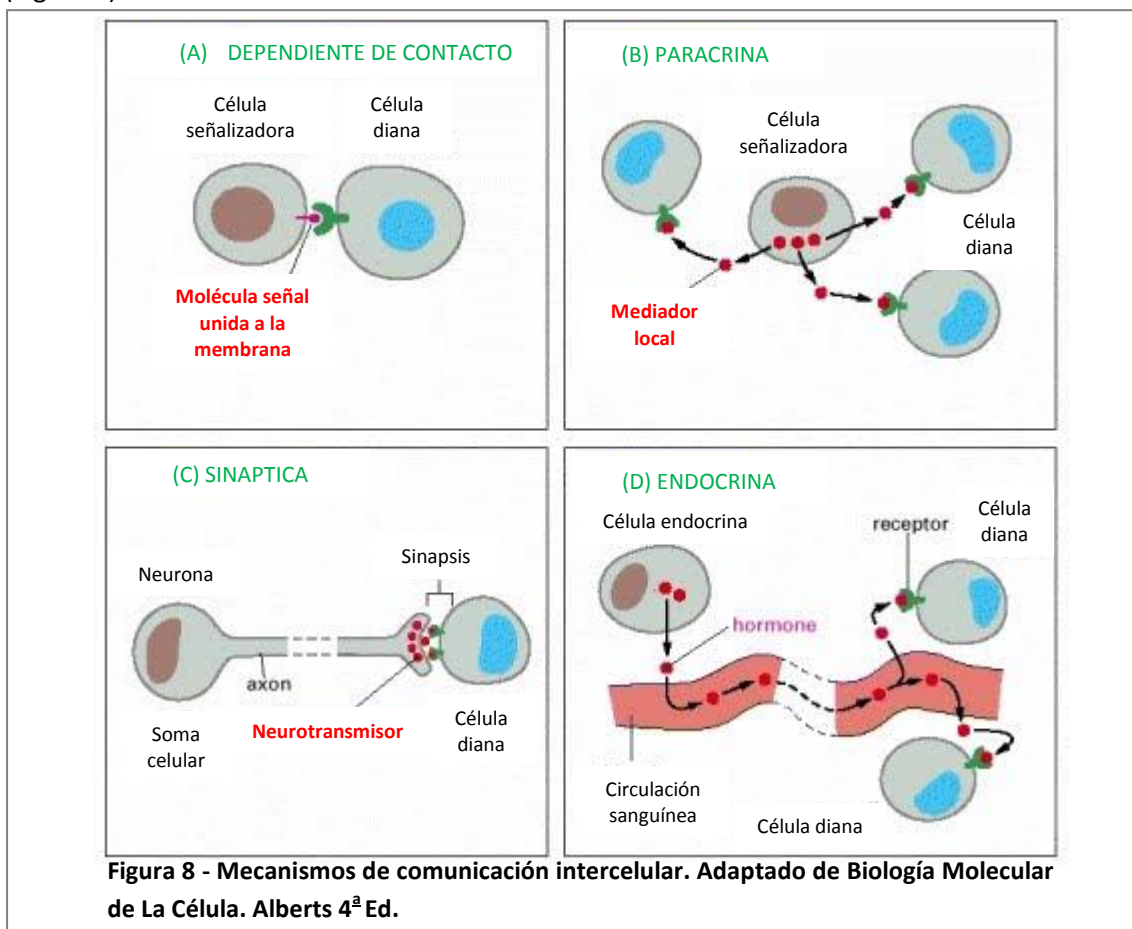
Los organismos unicelulares eucariotas, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, poseen mecanismos de comunicación intercelular; cuando un individuo haploide está preparado para el acoplamiento segrega un péptido denominado factor de acoplamiento para que las células con acoplamiento contrario dejen de dividirse y se preparen para el acoplamiento (70). Estudios con este tipo de levaduras mutantes, han permitido identificar una compleja red de proteínas involucradas en



los procesos de comunicación y señalización celular. A grandes rasgos esta red incluye moléculas señal, receptores de superficie celular o receptores intracelulares, proteínas de señalización intracelular y proteínas diana (blanco). De esta manera, las células de un organismo pluricelular interpretan su entorno respondiendo a una gran cantidad de estímulos químicos que llegan desde el exterior (Figura 7). Estos estímulos en forma de moléculas señal, activan receptores específicos en la superficie celular (o receptores citoplasmáticos) que pueden dar paso a la generación de segundos mensajeros logrando así una amplificación de la

señal recibida. Dependiendo del estímulo externo se activan diferentes vías de señalización celular que tendrán como objetivo final producir una respuesta biológica determinada. La habilidad de las células para percibir señales y responder correctamente hacia su entorno es la base del desarrollo, la reparación de los tejidos, de la inmunidad y del mantenimiento de la homeostasis en los tejidos (71).

Una célula puede producir moléculas señal para comunicarse con sus vecinas o con células lejanas, o incluso ajenas al propio organismo. De esta manera las moléculas señal pueden actuar a corta o larga distancia distinguiéndose así cuatro formas principales de comunicación (Figura 8).



Cuando una molécula señal permanece unida a la superficie de la célula señalizadora y solo influye las células que entran en contacto, se denomina señalización dependiente de contacto (Figura 8, A). Este tipo de comunicación es muy frecuente durante el desarrollo embrionario y en células del sistema inmune. Por otro lado, cuando las moléculas señal son secretadas, pueden actuar a corta distancia (inclusive si actúa sobre la misma célula se denomina señalización autócrina) alcanzando células vecinas a través de los espacios intercelulares dando lugar a un tipo de señalización paracrina (Figura 8, B). En organismos complejos y de gran tamaño, la señalización paracrina no es suficiente para coordinar los mecanismos

biológicos de manera global. Por eso han surgido mecanismos de comunicación que regulan la actividad de las células a grandes distancias. Si la molécula señal es una hormona secretada al torrente sanguíneo con el objetivo de actuar en células diana situadas a larga distancia, el proceso se conoce como señalización endócrina (Figura 8, D).

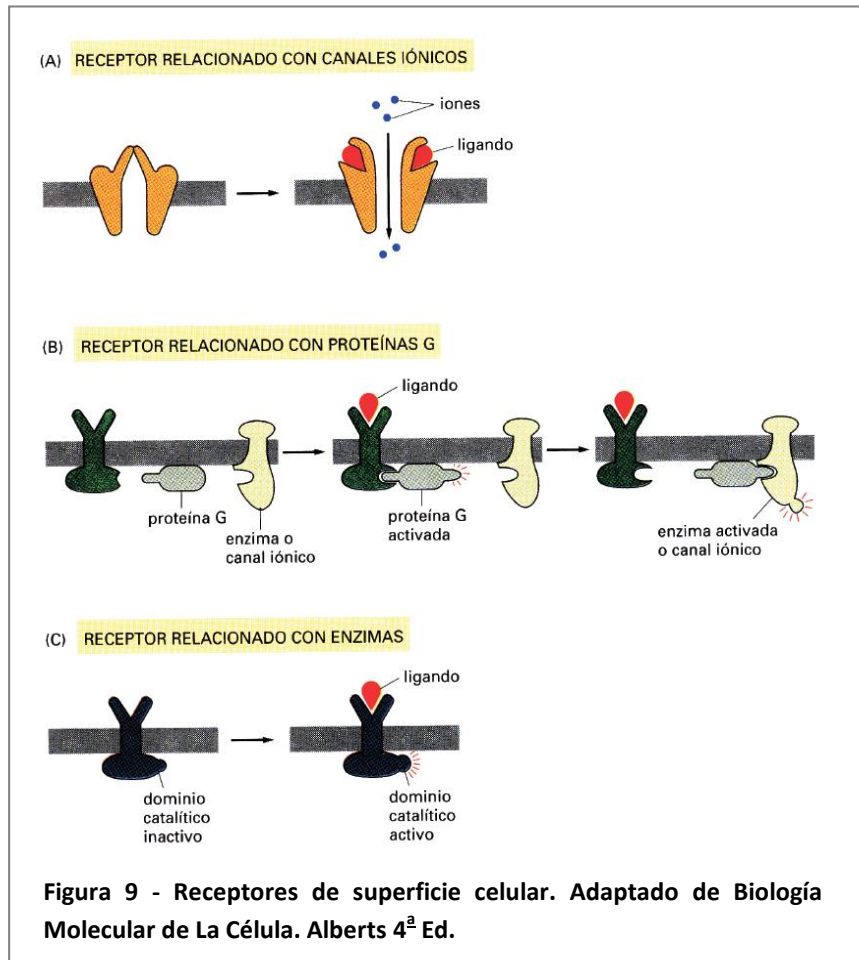
Otro mecanismo de comunicación a larga distancia, es la señalización sináptica (Figura 8, C), más rápida y precisa que la señalización endocrina. Las células nerviosas (neuronas) están diseñadas para transmitir información de manera rápida y a largas distancias. Las neuronas emiten prolongaciones (axones) que entran en contacto con célula diana alejadas. Cuando una neurona se activa por una señal del ambiente o por señales de otras células, envía impulsos eléctricos (potenciales de acción) a lo largo de su axón; cuando este impulso llega al final del axón desencadena la secreción de moléculas señal (neurotransmisores). El neurotransmisor se libera en un tipo de unión celular específica llamada uniones sinápticas, permitiendo que la señal pase de una neurona a una célula diana.

Para integrar las funciones biológicas de un organismo complejo, las células requieren una gran diversidad de moléculas que actúan como moléculas señal. Estas van desde gases como óxido nítrico (NO) y el gas sulfhídrico (H₂S) hasta moléculas más grandes como el cortisol, la testosterona o la tiroxina, que difunden por las membranas para unirse a receptores intracelulares.

Las moléculas señal hidrofílicas (incluyendo los neurotransmisores, las hormonas proteínas y los factores de crecimiento) que no atraviesan la membrana plasmática, actúan a través de la unión a receptores específicos de membrana. Se conocen tres tipos de proteínas receptoras de superficie celular: las asociadas a canales iónicos, las asociadas a proteínas G y las asociadas a enzimas (Figura 9). Estos receptores de superficie actúan como transductores transformando un evento extracelular en una cascada de señalización intracelular. Los receptores asociados a canales iónicos participan principalmente en la señalización sináptica. Los receptores asociados a proteínas G actúan regulando la actividad de una proteína ligada a la membrana plasmática (enzima o canal iónico) separada del receptor. La activación del receptor por la unión del ligando, produce la interacción del receptor con la proteína diana, esta interacción está mediada por una proteína trimérica de unión a GTP (proteína G). Frecuentemente la activación de la proteína diana genera una alteración en la concentración de una molécula intracelular que actúa como segundo mensajero (comúnmente cAMP).

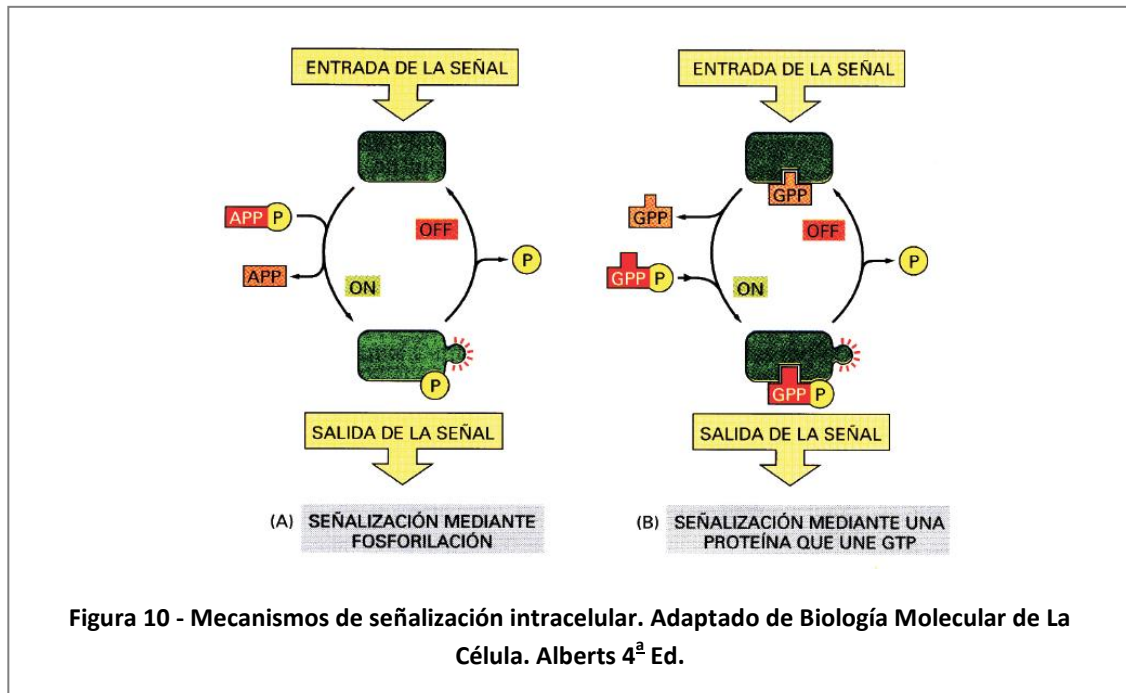
Por último, los receptores asociados a enzimas actúan directamente como enzimas o están asociados a enzimas; ellos mismos son proteínas quinasas o están asociados a proteínas quinasas que fosforilan conjuntos determinados de proteínas.

Otro tipo de mecanismo de comunicación entre



celulas vecinas son las uniones de tipo gap. Son estrechos canales que se forman entre las membranas plasmáticas de células adyacentes poniendo en contacto los citoplasmas de ambas células. Estos canales permiten el paso de pequeñas moléculas señal como el ión Ca^{++} y el AMP ciclico (cAMP). Las células de un embrión ensamblan y desensamblan uniones gap con patrones muy determinados, lo que sugiere que este tipo de uniones juega un papel importante en las señales que gobiernan el desarrollo.

Una vez iniciado el proceso de señalización, este ha de propagarse de manera ordenada por la célula. Dos procesos principales son los encargados de hacer avanzar un mecanismo de señalización (Figura 10). Uno de ellos es la fosforilación de proteínas diana, que se organiza en cascadas de fosforilación: una proteína quinasa, activada a través de la adición de grupos fosfato, fosforila a su vez de manera específica la proteína quinasa siguiente acoplada a ella transmitiendo la señal hacia delante. La otra clase principal de mecanismo son las proteínas de unión a GTP que alternan su estado activo, cuando están unidas a GTP, con el estado inactivo, cuando se unen a GDP.



1.2.1. Vías de señalización

Las células interpretan su entorno activando determinadas vías de señalización. La mayoría de las vías de señalización están interrelacionadas, lo que hace muy difícil su interpretación. Dependiendo del tipo de señal y del contexto biológico, los científicos han realizado agrupaciones de cascadas de señalización para facilitar su estudio. De esta manera, al día de hoy se sabe que las vías de señalización de ERK y AKT están directamente relacionadas con el metabolismo y la supervivencia celular (72). La vía de Wnt controla procesos como el tamaño celular, la proliferación y la migración. La vía de Notch controla las etapas de diferenciación en el desarrollo embrionario (73).

Con el fin de interpretar mecanismos de comunicación celular en un contexto metabólico, en el presente trabajo se estudió la activación de las vías AKT y ERK. Las células obtienen energía oxidando sustratos metabólicos como la glucosa. Para incorporar glucosa, la célula debe ser capaz de responder a señales desencadenadas por la insulina. La vía de AKT se ha relacionado directamente con la captación de glucosa. La fosforilación de AKT es requerida para la translocación del transportador de glucosa GLUT4 desde el citoplasma hacia la membrana en respuesta a la insulina. También se ha descrito que la ruta de ERK está relacionada con la sensibilidad a la insulina y el control del metabolismo de la glucosa (74).

1.2.2. Mecanismos de la ruta de secreción celular

La secreción de moléculas señal es un paso fundamental en la señalización intercelular. Las células poseen un complejo sistema de tráfico vesicular que se encarga de organizar el transporte de proteínas y moléculas solubles a través del citoplasma. En este sistema de control de tráfico vesicular convergen y funcionan simultáneamente la vía endocítica, la vía de tráfico intracelular y la vía de exocitosis (75).

El retículo endoplasmático y el aparato de Golgi son las organelas responsables de dirigir el tráfico vesicular citoplasmático (Figura 11). Se puede distinguir una vía biosintética en la que se sintetizan proteínas en el retículo endoplasmático, se modifican a su paso por el aparato de Golgi y se transportan del aparato de Golgi a varios destinos, como la membrana plasmática o un lisosoma. Esta ruta se conoce como la vía secretora, ya que muchas de las proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático, así como los polisacáridos complejos producidos en el aparato de Golgi, se secretan de la célula (76). Para asegurar el correcto desplazamiento de las vesículas entre los compartimientos membranosos, estas llevan combinaciones de proteínas específicas en su superficie (llamada

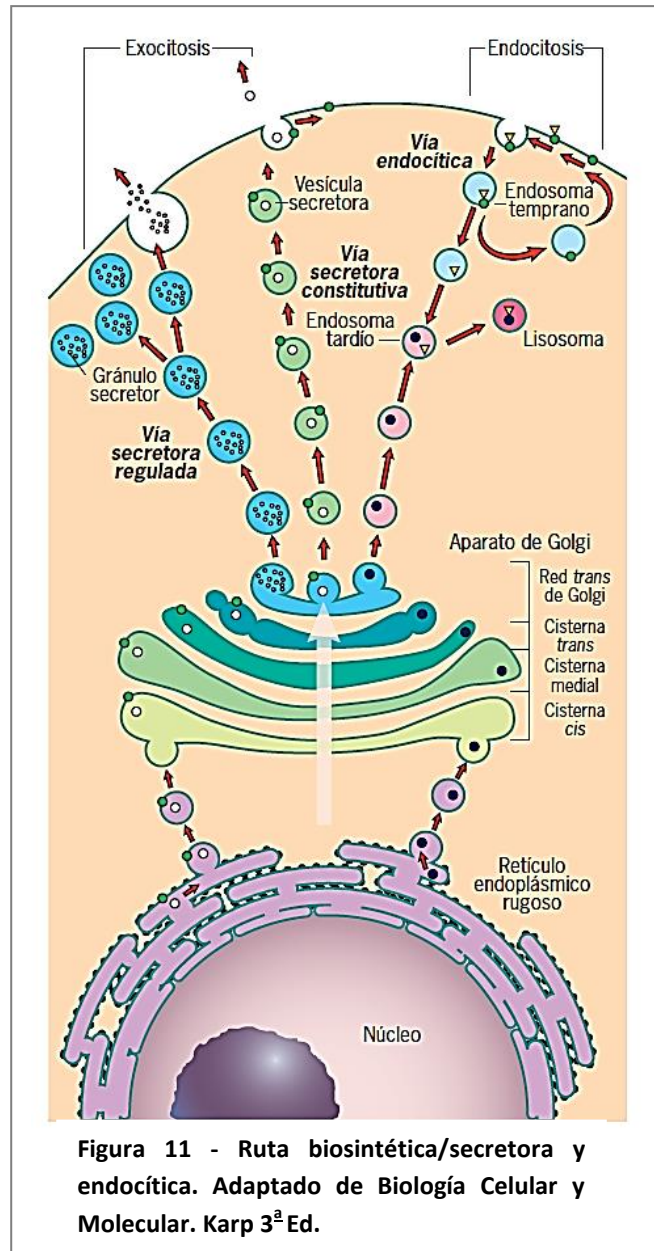


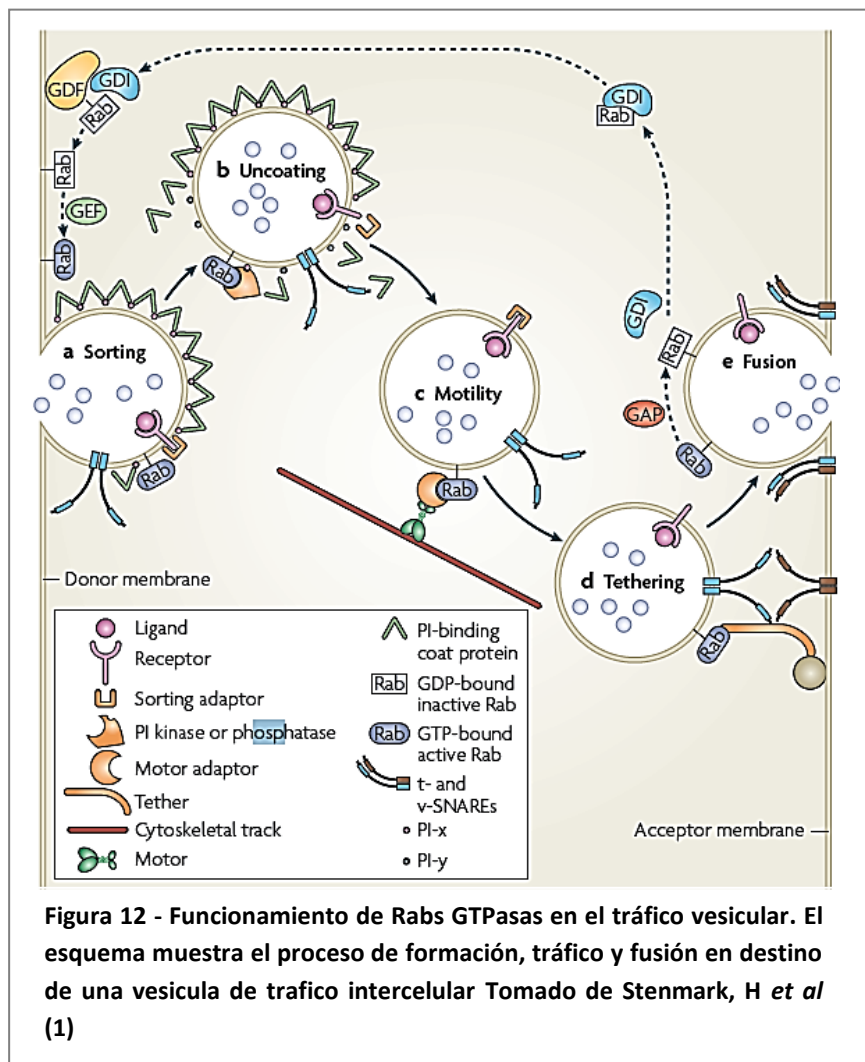
Figura 11 - Ruta biosintética/secretora y endocítica. Adaptado de Biología Celular y Molecular. Karp 3ª Ed.

cubierta proteica) que son reconocidas por proteínas receptoras en la estructura diana. Al llegar a destino, la vesícula se fusiona de manera específica con la membrana del compartimento receptor volcando su contenido. Las cubiertas de proteína tienen por lo menos dos funciones distintas: a) actuar como dispositivo mecánico que hace que la membrana se curve y forme una vesícula desprendible y b) proporcionar un mecanismo para seleccionar los

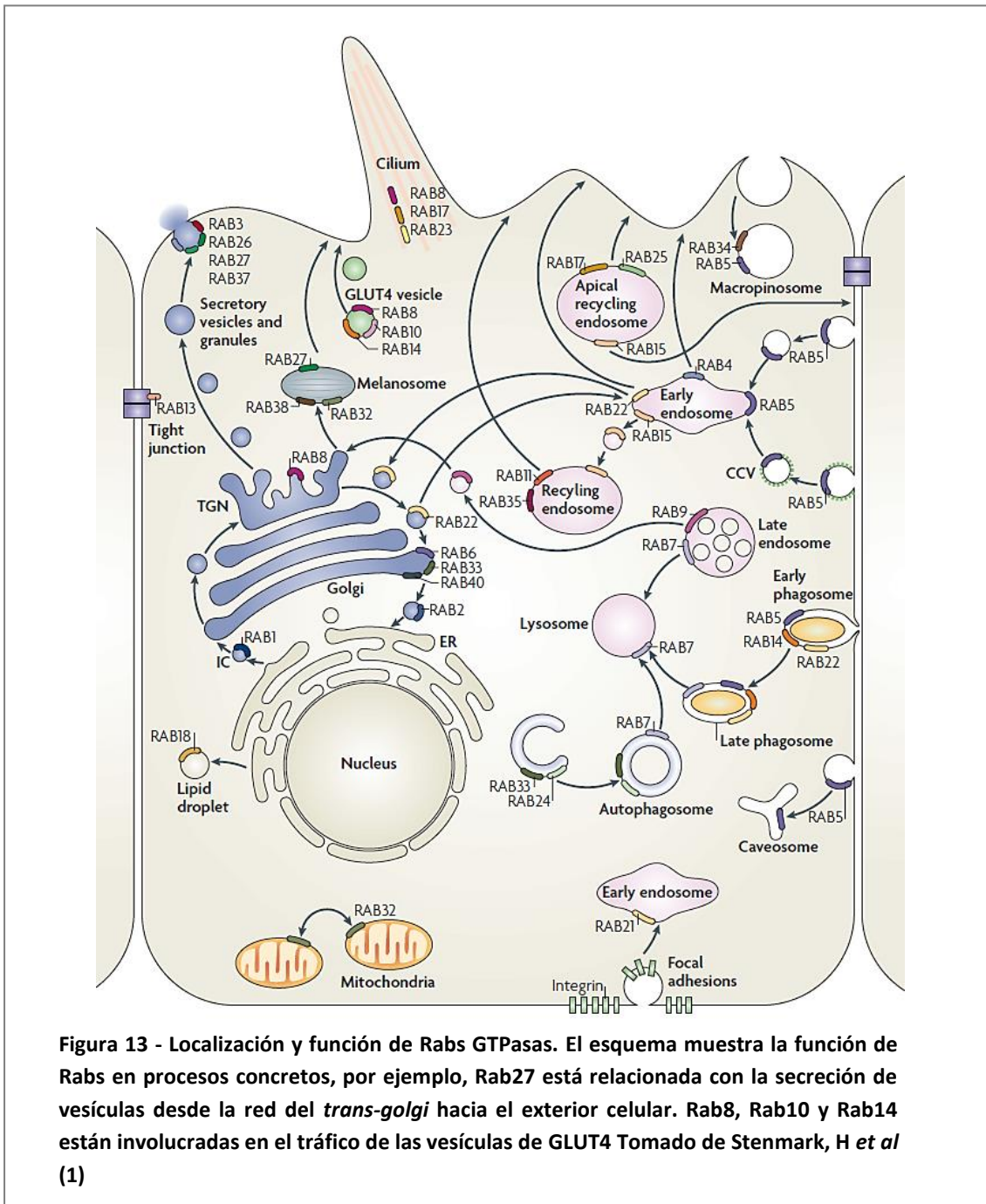
componentes que transporta la vesícula. Los componentes seleccionados incluyen proteínas secretoras, moléculas solubles, proteínas lisosómicas y proteínas de membrana que deben transportarse y la estructura necesaria para dirigir y conectar la vesícula con la membrana receptora correcta.

Las cubiertas proteicas más abundantes y por ende más estudiadas son las formadas por la proteína COP-II, la COP-I o la clatrina (76). Al día de hoy, no se comprenden por completo los mecanismos responsables del direccionamiento de una determinada vesícula hacia un tipo de compartimento en especial. Sin embargo se conoce la función de algunas de las proteínas implicadas en dicho proceso. Las proteínas Rab, son pequeñas proteínas con actividad GTPasa, y están implicadas en el transporte y acoplamiento específico temprano entre una vesícula y su diana (77).

Distintas proteínas Rab se vinculan con diferentes compartimentos de membrana. Esta localización preferencial da a cada compartimento una identidad de superficie única, necesaria para reclutar las proteínas implicadas en la especificidad de direccionamiento. Alternando entre su estado de unión a



GTP o GDP las Rabs de una vesícula en tránsito, experimentan cambios conformacionales que les permiten interactuar de manera específica con proteínas diana unidas a otras estructuras (Figura 12). Son más de 60 los genes Rabs encontrados en seres humanos. La figura 13 resume las actividades de transporte descubiertas para algunos Rabs (1).



Las proteínas clave que participan en la fusión específica entre la vesícula en tránsito y el compartimento diana se conocen como **SNARE** (78). Estas constituyen una familia de más de 35 proteínas de membrana cuyos miembros se localizan en compartimentos subcelulares específicos. Poseen un segmento en su dominio citosólico llamado motivo SNARE que consiste en 60 a 70 aminoácidos capaces de formar un complejo con otro motivo SNARE. Las SNARE pueden dividirse en dos categorías, **SNARE-v**, que se incorporan en las membranas de vesículas de transporte durante el desprendimiento, y **SNARE-t**, que se localizan en las membranas de los compartimentos diana. De esta manera, cuando una vesícula llega a

destino se produce un reconocimiento específico entre las proteínas v y t-SNARE que permite la fusión de la vesícula (Figura 12).

1.2.3. Vía de endocitosis

La vía de secreción de moléculas señal está íntimamente relacionada con la vía de endocitosis. Al igual que con la vía secretora, el conocimiento actual del funcionamiento de vía endocítica no es del todo completo. La endocitosis es un proceso por el cual la célula interioriza los receptores de la superficie celular y los ligandos extracelulares unidos a ellos (79). La endocitosis puede dividirse en dos categorías: la endocitosis por volumen y la endocitosis mediada por receptor. La endocitosis por volumen (también conocida como pinocitosis) es la captación inespecífica de líquidos extracelulares. La endocitosis mediada por receptor se refiere a la captación de macromoléculas extracelulares específicas (ligandos) después de su unión con receptores en la superficie externa de la membrana plasmática (Figura 14).

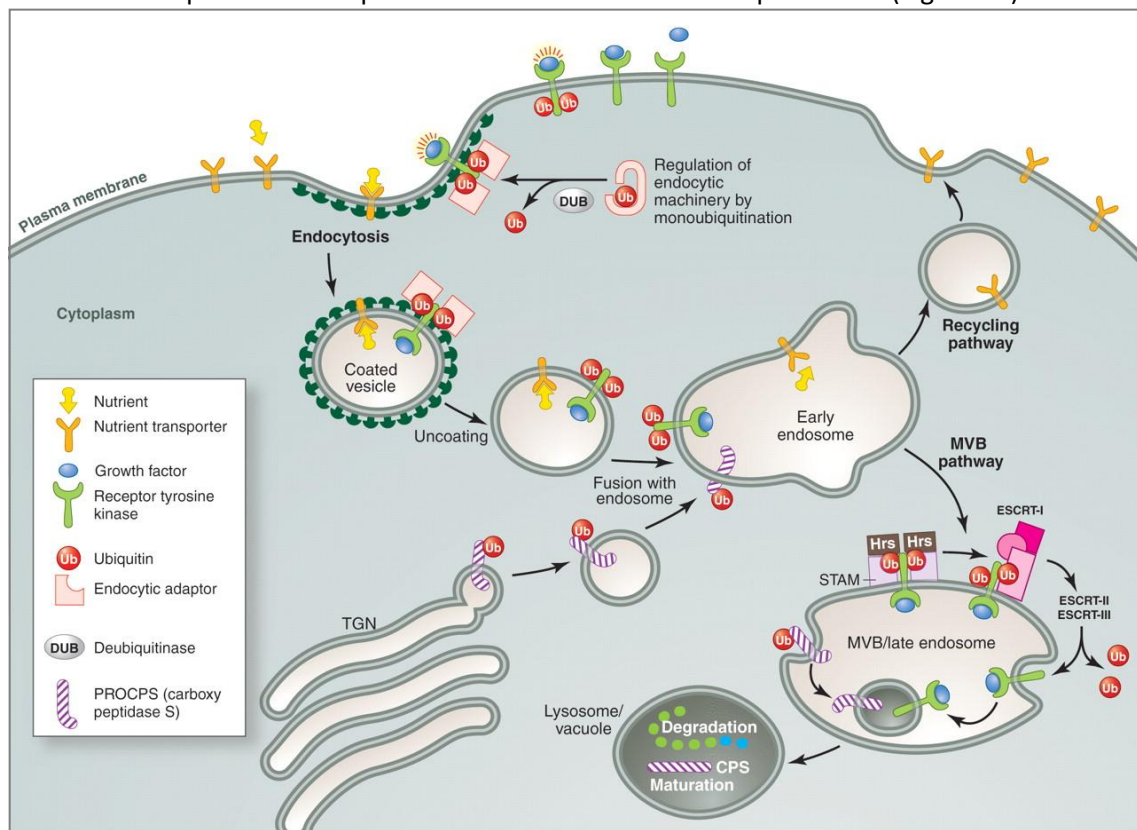


Figura 14 - Vía de endocitosis. Tomado de Mukhopadhyay, D (187)

En la endocitosis mediada por receptor una vez unido el ligando se produce la invaginación de la membrana plasmática y la formación de la vesícula que contiene el receptor con el ligando, denominada endosoma. Hay dos clases diferentes de endosomas, los endosomas tempranos, casi siempre localizados cerca de la región periférica de la célula, y los endosomas tardíos, que por lo general se hallan más cerca del núcleo. Los endosomas tardíos pueden contener

cantidades considerables de membrana interna que surge de las invaginaciones de la membrana limitante formando lo que se denominan vesículas intraluminales (ILVs). El conjunto de endosoma tardío con sus ILVs es denominado cuerpo multivesicular (MVB) (80). Las vesículas internas de los endosomas tardíos, frecuentemente denominados MBVs, a menudo contienen proteínas de la membrana plasmática que van en camino a ser destruidas o recicladas. Se conoce un importante conjunto de proteínas llamadas ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport), que juegan un papel fundamental tanto en la formación del MVB, como en la selección de los destinos de las proteínas que lo componen (81). Recapitulando, los receptores que se captan por endocitosis se transportan en vesículas a un endosoma temprano, el cual también sirve como estación clasificadora que dirige los distintos tipos de receptores y ligandos por vías diferentes. Por un lado, receptores encargados de aportar nutrientes a la células (receptor de transferrina o receptor de LDL), normalmente se separan de sus ligandos en un ambiente endosómico ácido y luego se concentran en compartimientos tubulares especializados del endosoma temprano, que representan centros de reciclaje que los devuelven a la membrana plasmática. En cambio, los ligandos liberados se concentran en un compartimiento de clasificación antes de enviarse hacia un endosoma tardío y al final a un lisosoma, donde ocurre el procesamiento final. Por otro lado los receptores de señalización (por ejemplo los receptores de factores de crecimiento), suelen adquirir marcas de ubiquitina en el proceso de internalización que logran la no recircularización a la membrana, siendo enviados al MVB, para su procesamiento por el ESCRT y posible degradación lisosomal.

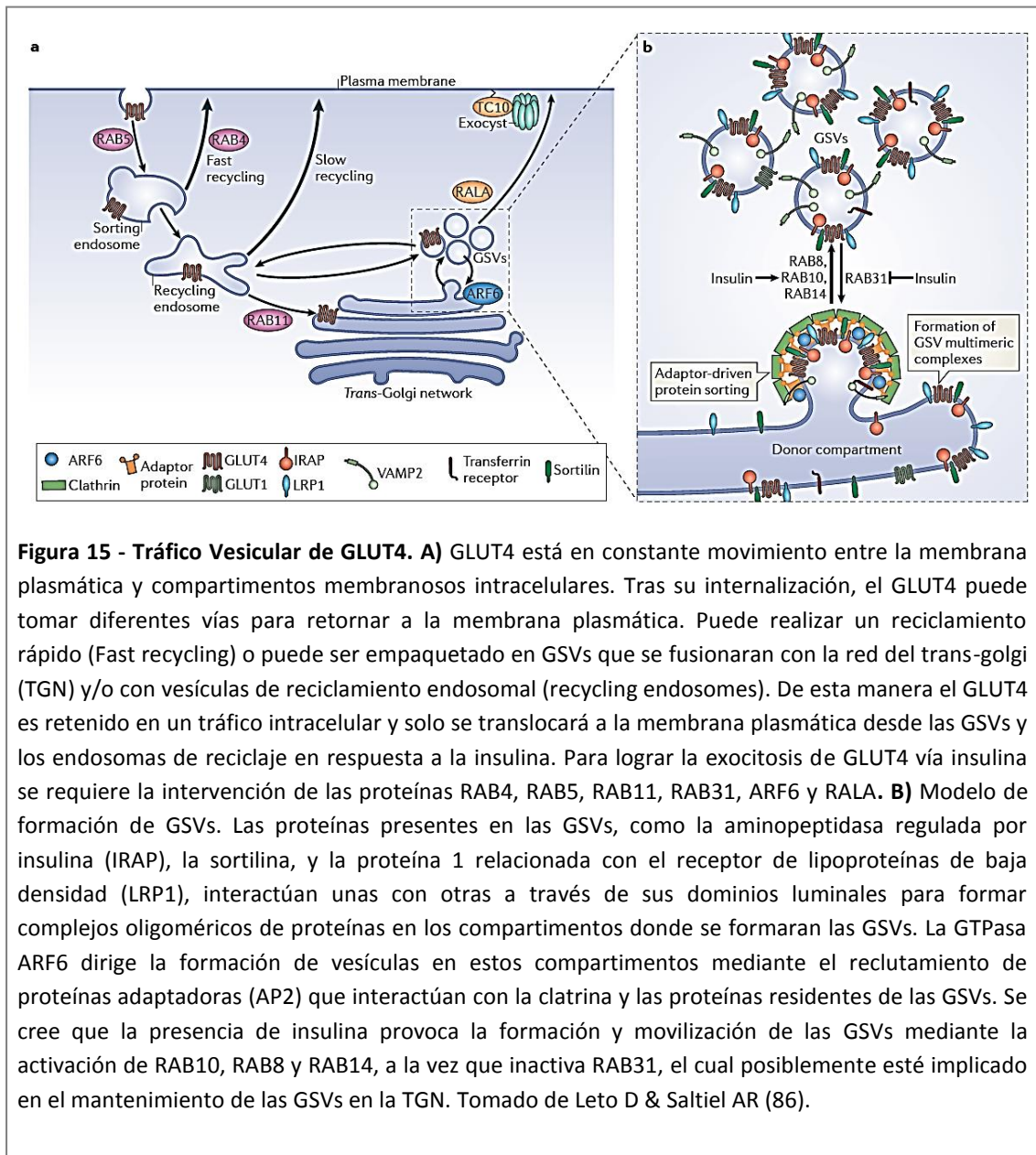
1.3. El tráfico intracelular de los transportadores de glucosa (GLUTs)

La glucosa es una fuente de energía fundamental para las células eucariotas. El transportador de glucosa GLUT4, es uno de los 14 miembros que constituyen la familia de transportadores de hexosas transmembrana. La función de los GLUTs es transportar hexosas desde el exterior al interior celular. De esta manera, GLUT4 es un transportador predominante en células musculares y adipocitos, capaz de captar la glucosa extracelular y mediante un cambio conformacional lograr que la glucosa ingrese a la célula (82).

En condiciones de reposo el 95% de GLUT4 se encuentra distribuido entre endosomas de la red del trans-golgi (TGN) y estructuras tubovesiculares correspondientes a la vía de clasificación endosomal y también se lo identifica en vesículas de almacenamiento de aproximadamente 50 nm especiales para GLUT4 (GSVs) (83). Solo el 5% restante es encontrado en la membrana plasmática (84, 85). El ejercicio o la presencia de insulina logran que GLUT4 se transloque

desde el citoplasma hacia la membrana plasmática en donde realiza el transporte de glucosa. Han pasado 26 años desde el descubrimiento de que la insulina estimula la incorporación de glucosa a la célula alterando el tráfico de GLUT4 y aunque desde entonces se han identificados muchos de los actores responsables de la movilización de los GLUTs, al día de hoy no se comprende de manera completa el mecanismo de acción (86).

La movilización de GLUT4 hacia la membrana en respuesta a insulina requiere un reconocimiento específico del tráfico, es decir, qué conjunto de vesículas se deben de movilizar y hacia dónde. Las mayores responsables de lograr este objetivo son, como se explicó en la sección 1.2, las proteínas Rabs y la proteína SNARE VAMP2 (86) (Figura 15).



1.4. Los exosomas como mecanismos de comunicación intercelular

Las vesículas celulares (VC), también llamadas exosomas, microvesículas (MVs), cuerpos apoptóticos, micropartículas o vesículas, son partículas esféricas de entre 30-1000 nm de diámetro, liberadas desde la membrana plasmática de la mayoría de los tipos celulares (87). Se ha visto que las VC participan en la comunicación celular transportando información entre las células en forma de mRNA, miRNA y de proteínas (88). De esta manera, una célula dadora produce las VC y otra célula receptora es capaz de incorporarlas e interpretar la información que hay en su interior. La información en forma de ácidos nucleicos y proteínas contenida en estas vesículas puede desencadenar procesos como la proliferación, diferenciación, de-diferenciación, migración o apoptosis en las células receptoras. Las VC están implicadas en procesos como la supresión inmune de tumores, la metástasis y la angiogénesis (89, 90). Por esto último, actualmente se estudia la función de las VC en la reparación de tejidos (91). Al ser un tema relativamente reciente, es necesario estandarizar la nomenclatura con la cual se hace referencia a los diferentes tipos de vesículas liberadas. Un artículo reciente de Maria Mittelbrun y Francisco Sanchez-Madrid (92) realiza una clasificación muy conveniente de los diferentes tipos de vesículas liberadas, a la vez que recopila información sobre los mecanismos de formación de estas vesículas (Figura 16).

En base a su origen y tamaño las vesículas extracelulares pueden ser clasificadas en tres grupos diferentes: **exosomas**, **ectosomas** (microvesículas) y **cuerpos Apoptóticos (CA)**. Los **exosomas** son vesículas de origen endosomal y tienen un diámetro aproximado de entre 30-100 nm. Primero se forman como vesículas intraluminales (ILVs), en el interior un endosoma tardío, también conocido como cuerpo multivesicular (MVBs) (93). Los MVBs liberan los exosomas al medio extracelular mediante fusión con la membrana plasmática en un proceso en el que intervienen proteínas como RAB11, RAB27 y RAB35 (94). Los exosomas tienen una composición proteica de superficie que es característica (Figura 16, B). De esta manera se utilizan las tetraspaninas CD81, CD9 y CD63 como marcadores específicos de exosomas. Por otro lado se encuentra la liberación de **microvesículas** (ectosomas en la figura 16). Su tamaño aproximado varía entre 100-1000 nm y proceden directamente de evaginaciones de la membrana plasmática (95). Estas microvesículas surgen de regiones de la membrana plasmática ricas en fosfatidilserina.

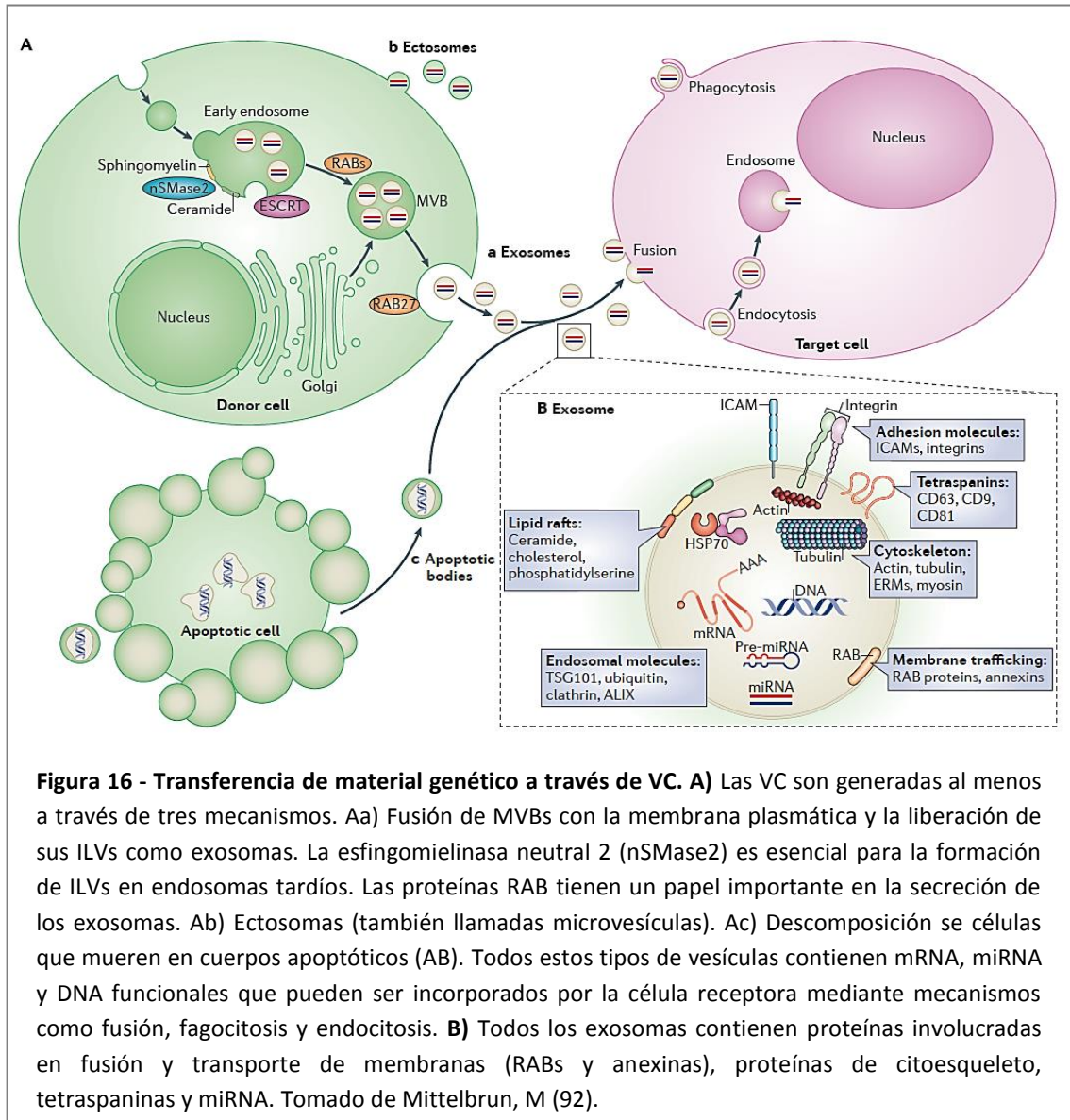


Figura 16 - Transferencia de material genético a través de VC. A) Las VC son generadas al menos a través de tres mecanismos. Aa) Fusión de MVBs con la membrana plasmática y la liberación de sus ILVs como exosomas. La esfingomielinasa neutral 2 (nSMase2) es esencial para la formación de ILVs en endosomas tardíos. Las proteínas RAB tienen un papel importante en la secreción de los exosomas. Ab) Ectosomas (también llamadas microvesículas). Ac) Descomposición de células que mueren en cuerpos apoptóticos (AB). Todos estos tipos de vesículas contienen mRNA, miRNA y DNA funcionales que pueden ser incorporados por la célula receptora mediante mecanismos como fusión, fagocitosis y endocitosis. **B)** Todos los exosomas contienen proteínas involucradas en fusión y transporte de membranas (RABs y anexinas), proteínas de citoesqueleto, tetraspaninas y miRNA. Tomado de Mittelbrun, M (92).

Por último se encuentran los **CA** los cuales poseen un mayor tamaño que las microvesículas y son liberados por células que entran en apoptosis. Se caracterizan por externalizar fosfatidilserina y contener fragmentos de DNA. Es interesante destacar que de entre los mecanismos biológicos en lo que se han identificado un papel funcional para los exosomas, se encuentra el tráfico de proteínas entre células, por ejemplo componentes de la vía de Notch y Wnt son secretados en exosomas (96-98). También antígenos cancerígenos presentes en los exosomas son reconocidos por células T para desencadenar la correspondiente respuesta antitumoral (99).

2. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis y objetivos

La anatomía cardíaca a nivel de ultraestructura miocárdica sugiere una constante comunicación por proximidad entre cardiomiocitos y células endoteliales. Muchos trabajos han demostrado que las células endoteliales alteran la función cardíaca. También se ha visto que los cardiomiocitos son capaces de alterar la función endotelial. Sin embargo no está claro como estos mecanismos se regulan en condiciones de estrés agudo donde es necesario el control del transporte de nutrientes desde el endotelio hacia los CM. Los exosomas actúan como mecanismo de comunicación intercelular, por lo que pueden ser buenos candidatos para mediar la comunicación cardiomiocito-endotelio a corta distancia, generando un control local del transporte de nutrientes, que acoplado a los mecanismos de control remoto tradicionales, regularían de manera eficiente la selección de combustibles metabólicos en el corazón.

En el presente trabajo se estudió la comunicación mediada por exosomas entre CM y células endoteliales durante el cambio en la disponibilidad de glucosa de los CM. Los objetivos particulares fueron:

- 1- Estudiar como la disponibilidad de glucosa alteraba la secreción de exosomas de cultivos neonatales de CM de rata.
- 2- Estudiar si los exosomas derivados de CM de rata eran capaces de ser captados por células endoteliales murinas.
- 3- Estudiar el contenido de miRNA y proteínas en los exosomas derivados de CM de rata durante diferentes condiciones de disponibilidad de glucosa.
- 4- Estudiar en un contexto metabólico la transferencia de proteínas mediada por exosomas desde cardiomiocitos hacia células endoteliales y analizar las consecuencias en el endotelio en modelos de comunicación celular murino *in vitro*.

Por otra parte, las células mesenquimales constituyen una importante alternativa para el tratamiento del infarto de miocardio. Sin embargo, los escasos estudios clínicos realizados con este tipo de células muestran que es necesario potenciar su efecto terapéutico, bien mediante el tratamiento con fármacos o sobre-expresión de genes. Entendemos que las MSC y las MSC-HIF podrían estar ejerciendo su papel terapéutico, al menos en parte y siendo consistentes con

la hipótesis paracrina, a través de la liberación de VC. Para esto, en primer lugar las MSC y las MSC-HIF tendrían que ser capaces de responder a condiciones externas utilizando las VC como mecanismo de comunicación. Con esta premisa, nos planteamos la hipótesis de que las VC secretadas por las MSC tuvieran un papel en el potencial terapéutico de dichas células mediado a través de un efecto paracrino. Para demostrar dicha hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1- Cultivar las MSC nativas o sobreexpresando el factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) (MSC-HIF) mediante modificación genética en condiciones de normoxia y de hipoxia.
- 2- Aislar las VC secretadas por dichas células en las distintas condiciones experimentales.
- 3- Identificar el material genético, en concreto los miRNA de las VC aisladas de MSC y MSC-HIF cultivadas en hipoxia y en normoxia.
- 4- Inyectar las VC aisladas de MSC y MSC-HIF en la zona borde del infarto de ratas sometidas a infarto experimental.
- 5- Evaluar el efecto terapéutico de las VC de MSC y MSC-HIF mediante la medida de la función cardíaca antes y después de la terapia mediante ecocardiografía.

3. Materiales y métodos

Materiales y métodos

3.1. Animales

El manejo de los animales se realizó según los requisitos estipulados por el Real Decreto 223/1988 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, y atendiendo a todas las normas y recomendaciones del Comité de Ética y de Bienestar Animal (CEBA) del Instituto de Investigación sanitaria La Fe y del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

En este trabajo se utilizaron ratas Wistar y ratones C57Bl6 (Charles River Laboratories inc. Willmington, MA, USA) como criadoras para el mantenimiento de colonias y la obtención de crías con las que se llevó a cabo el aislamiento y cultivo de cardiomiocitos y células endoteliales. Para algunos experimentos se utilizaron ratones transgénicos RFP (Tg(ACTB-DsRed*MTS)1Nagy/J) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA), como criadoras para el mantenimiento de colonias y la obtención de crías con las que se llevó a cabo el aislamiento y cultivo de células endoteliales. Estos ratones poseen el gen de la proteína roja fluorescente (RFP-DsRed) bajo el control del promotor de la actina beta. Dicha proteína posee un pico máximo de absorción/emisión a 557 nm y 592 nm, respectivamente, que al ser excitada con una longitud de onda de aprox. 557 nm emite en la franja del rojo.

3.2. Cultivos Celulares

En el presente trabajo se estudiaron principalmente dos tipos celulares; cardiomiocitos ventriculares y células endoteliales. También se realizaron experimentos con células madre mesenquimales de medula ósea humana (en adelante MSC) modificadas o no genéticamente mediante transducción lentiviral. Todos los tipos celulares fueron cultivados en un incubador Forma Series II modelo 3141 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) a 37 °C y 5% de CO₂.

3.2.1 Cultivos Primarios

3.2.1.1. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata y ratón

Los cardiomiocitos neonatales de rata y ratón (Wistar y C57Bl6, respectivamente) se extrajeron de los ventrículos de crías de 1-2 días. Para ello los corazones se diseccionaron en condiciones de esterilidad, se eliminaron las aurículas y los ventrículos se lavaron con HBSS 1x (*Hank's Balanced Salt Solution*, Invitrogen S.A.) suplementado con 1 % de Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich Química S.A.). Los ventrículos se homogeneizaron con tijeras para microcirugía en trozos de aproximadamente 1 mm³ y se digirieron 18 h a 4 °C en presencia de una solución de tripsina 0.05% en HBSS 1x (Sigma-Aldrich Química S.A.), seguido de una digestión de 40 min a 37 °C con 4 mg/ml de Colagenasa Tipo II (Invitrogen S.A.) en el mismo medio de disolución con agitación suave. Una vez transcurrido ese tiempo se recogió la suspensión celular, se filtró utilizando filtros de nylon de 40 µm (Cell Strainers, Corning Life Sciences) y se centrifugó a 90 g durante 5 min. EL sedimento celular se resuspendió en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-alto en glucosa, con L-Glutamina y Piruvato de Sodio, 10% de Suero Bovino Fetal (SBF) y 1% Penicilina-Estreptomicina (todos de Sigma-Aldrich Química S.A.) y se sembró durante 60 min. En ese tiempo los fibroblastos se adhieren a la placa, pero los cardiomiocitos no llegan a hacerlo, por lo que simplemente recogiendo las células no adheridas es posible eliminar gran parte de los fibroblastos, enriqueciendo así el cultivo en células cardiomiocíticas. Así, las células no adherentes se volvieron a sembrar a una densidad de 150.000 células por centímetro cuadrado, lo que constituyó el cultivo primario de cardiomiocitos.

3.2.1.2. Cultivo primario de endotelio

Los cultivos de endotelio se realizaron a partir de tejido aórtico de neonatos de ratas Wistar y de ratones transgénicos RFP. Para ambas especies se realizó el mismo protocolo. En condiciones de esterilidad se extrajo una porción de callado aortico de crías de 1-2 días. El tejido se diseccionó en segmentos de aprox. 1 mm³ y se colocó sobre placas de cultivo previamente tratadas con Matrigel (BD Biosciences). Tras 5 min se agregó medio de cultivo de endotelio EGM-2 BulletKit (Lonza), y el cultivo se mantuvo 24-48 h, tiempo a partir del cual se comenzó a observar el crecimiento de las células endoteliales formando tubos que se prolongaban desde los bordes de los explantes de tejido aórtico (100).

3.2.1.3. Cultivo primario de endotelio humano

El endotelio humano utilizado en este estudio provino de venas de cordón umbilical humano HUVECs (en inglés Human umbilical vein endothelial cells). Dicho cultivo primario fue adquirido de la colección americana de cultivos tipo (ATCC) y el medio de cultivo utilizado para su mantenimiento fue el EGM-2 BulletKit (Lonza).

3.2.1.4. Cultivo primario de células mesenquimales humanas

Las MSC en pase 1/2 se adquirieron del Banco Nacional de Líneas Celulares a través de la Fundación Inbiobank (San Sebastián, España) donde fueron procesadas según los procedimientos de referencia ISO9001:2000 bajo condiciones GMP. El medio de cultivo utilizado para su mantenimiento y expansión fue el Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-bajo en glucosa, con L-Glutamina y piruvato de Sodio, 10% de Suero Bovino Fetal (SBF) y 1% Penicilina-Estreptomicina (todos de Sigma-Aldrich Química S.A.).

3.2.2. Líneas Celulares

En algunos experimentos se utilizaron como células cardíacas las de la línea celular inmortalizada de mioblastos de tejido cardíaco embrionario de rata H9c2(2-1) la cual fue adquirida de la colección americana de cultivos tipo (ATCC). El medio de cultivo utilizado para su mantenimiento fue (DMEM)-alto en glucosa, con L-Glutamina y Piruvato de Sodio, 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) y 1% Penicilina-Estreptomicina (todos de Sigma-Aldrich Química S.A.).

3.2.3. Expansión celular y criopreservación

A excepción de los cardiomiocitos primarios, que son células post mitóticas y solo se dividen una o dos veces luego de realizar el aislamiento, los demás tipos celulares estudiados se cultivaron hasta alcanzar un 80% de confluencia y luego se realizaron pases celulares. Para ello las células se sometieron a una digestión con tripsina, una enzima capaz de romper las uniones intercelulares y las uniones al sustrato, y tras su contaje se sembraron a la densidad adecuada para cada tipo celular.

Para su congelación, las células se lavaron con PBS y se despegaron de la placa de cultivo mediante digestión con una solución Tripsina/EDTA 1X (Gibco). La acción de la tripsina se neutralizó con medio completo de cultivo y tras un lavado con PBS las células se resuspendieron en 1 mL de FBS y se homogeneizó la disolución. Para evitar la destrucción de las células durante la congelación, se añadieron 100 µL de DMSO por cada 900 µL de la disolución conteniendo células con FBS. Los criotubos se introdujeron en un recipiente con isopropanol (crioprotector) para permitir un descenso controlado de la temperatura de

aproximadamente 1°C por hora, y se colocó en un congelador a -80°C. Pasadas 24 horas, los criotubos se llevaron a nitrógeno líquido.

3.2.4. Recuento de la viabilidad celular

El recuento de la viabilidad celular se realizó mezclando en un eppendorf 10 µL de la suspensión celular a cuantificar con 10 µL de Azul de Tripán al 0,2% en PBS (Gibo-Invitrogen). El Azul de Tripán es un colorante que tiñe las células no viables ya que es capaz de entrar en la célula muerta debido a la alteración de la membrana de la misma. Se colocó una gota de dicha dilución en una cámara Neubauer y se procedió al recuento de las células viables por observación directa al microscopio. La fórmula para el conteo de la concentración celular fue: Nº de células viables/ mL= 10.000 x Nº células contadas en la cámara x 2 (dilución).

3.2.5. Condiciones experimentales

En este trabajo los cultivos celulares se sometieron a diferentes condiciones de estrés celular para estudiar sus respuestas biológicas y los mecanismos de comunicación celular. En el caso de los cultivos de cardiomiocitos se estudió el efecto de la eliminación de la glucosa en la generación de exosomas y su composición, incubando las células en (DMEM)-sin glucosa o bien en (DMEM)-alto en glucosa. Puesto que el FBS puede contener exosomas que interferirían en el estudio, dicho componente se sustituyó por un cóctel definido de nutrientes. De esta manera se generaron dos medios de cultivo que reflejaron las dos condiciones experimentales denominadas -St (abreviado del Inglés “starvation”) para el medio que contenía glucosa y +St para el medio que no contenía glucosa. Los medios se detallan a continuación:

- a) Medio sin ayuno de glucosa (-St): los cultivos se incubaron con un medio compuesto por (DMEM)-alto en glucosa, con L-Glutamina y Piruvato de Sodio (Sigma-Aldrich Química S.A.), 1% solución de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich Química S.A.), 1% MEM Eagle Vitamin mix (LONZA), 1% Insulina-Transferrina-Selenio (Gibco) y 1% Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich Química S.A.).
- b) Medio con ayuno de glucosa (+St): los cultivos se incubaron con un medio compuesto por (DMEM)-Sin Glucosa, con L-Glutamina (Gibco), 1% Piruvato de Sodio (Gibco), 1% solución de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich Química S.A.), 1% MEM Eagle Vitamin mix (LONZA), 1% Insulina-Transferrina-Selenio (Gibco) y 1% Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich Química S.A.).

En el caso de los cultivos de MSC, se estudió el efecto de la concentración de oxígeno en la generación y composición de los exosomas secretados al medio extracelular. El tratamiento

experimental consistió en incubar las células en hipoxia (1% de tensión de O₂) o normoxia (20% de tensión de oxígeno) durante 48hs con un medio de cultivo carente de FBS y con el mismo cóctel de nutrientes que en el caso anterior. Las condiciones experimentales se denominaron Hx (hipoxia), en el caso del cultivo en bajos niveles de oxígeno y Nx (normoxia), en el caso de cultivo en condiciones ambientales de oxígeno.

3.3. Plásmidos, Transfecciones y marcaje Lentiviral

Para monitorizar el tráfico celular tanto de exosomas como de transportadores de glucosa (GLUTs), se utilizaron plásmidos con la proteína de interés fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP).

Las MSC se transfectaron con lentivirus para que sobreexpresaran el factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α).

3.3.1. Plásmidos utilizados para la monitorización del tráfico intracelular de transportadores de glucosa

Los transportadores de glucosa (GLUTs) son una familia de proteínas de membrana que se ubican en la mayoría de las células de los mamíferos. Para monitorizar el tráfico de los GLUTs, las H9c2 fueron transfectadas con los siguientes plásmidos:

- a) pcDNA-DEST47 /hGLUT1-eGFP (Addegene, referencia 18729). Las células resultantes se denominaron H9c2-GLUT1-GFP. Estas células llevan el transportador de glucosa GLUT1 fusionado a la proteína GFP.
- b) GLUT4-GFP. Este plásmido fue amablemente cedido por el Dr. David E. James (101). Las células resultantes fueron llamadas H9c2-GLUT4-GFP. Estas células llevan el transportador de glucosa GLUT4 fusionado a la proteína GFP.

Ambos plásmidos fueron transfectados utilizando un método basado en la internalización de material genético mediante liposomas denominado FuGene HD (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez transfectadas las células fueron seleccionadas con el antibiótico G418 (Sigma-Aldrich Química S.A.).

3.3.2. Marcaje Lentiviral de exomas

Las tetraspaninas son una familia de proteínas de membrana que se encuentran en todos los eucariotas pluricelulares. Actualmente se cree que su función está relacionada con el anclaje de otras proteínas a membrana (102). Los exomas poseen abundantes cantidades de tetraspaninas en su superficie las cuales se consideran como antígenos específicos de dichas estructuras celulares (103). En particular, la tetraspanina CD63 ha sido utilizada en estudios previos para realizar el seguimiento del tráfico de exomas en células (104). En este trabajo células H9c2 fueron transfectadas mediante lentivirus con el plásmido lentiviral pCT-CD63-GFP (Figura 17) (pCMV, Exosome/Secretory, CD63 Tetraspanin Tag) (www.systembiosciences.com)

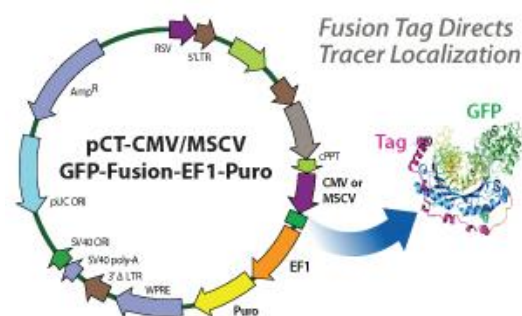


Figura 17 - Adaptado de www.systembiosciences.com

Las células resultantes, denominadas H9c2-CD63-GFP, expresan el marcador exosomal CD63 fusionado a la proteína GFP. Una vez integradas en el DNA genómico de las H9c2, el plásmido logra que la proteína GFP fusionada a la proteína CD63 se expresen de manera constitutiva al estar bajo el control del promotor de citomegalovirus. Para realizar el marcaje lentiviral, el sobrenadante obtenido de un cultivo de la línea celular empaquetadora 293 previamente transfectadas con el plásmido pCT-CD63-GFP y con el resto de plásmidos de la cápside para lograr la formación del lentivirus, se filtró con un filtro 0.45 µm. Dicho sobrenadante de medio de cultivo que ya contenía las partículas víricas, se agregó a las células H9c2 en presencia de 10 µg/ml de polibreno (Merk Millipore) durante 8 hs y luego reemplazado por medio fresco. El polibreno facilita la adhesión del virus a las células eucariotas y su internalización. El cultivo fue enriquecido en células transducidas mediante una selección con 5 µg/ml de Puomicina (Life Thechnologies), la eficiencia de la transfección fue evaluada por citometría de flujo cuantificando el porcentaje de la población celular GFP+.

3.3.3. Marcaje lentiviral de MSC

Las MSC se transfectaron usando lentivirus portadores de los plásmidos pWIPI-GFP y pWIPI-HIF-GFP, que codifican para la proteína verde fluorescente (GFP) unida o no con el factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α). Una vez integradas en el DNA genómico de las MSC, ambas construcciones logran que la proteína GFP o la proteína HIF-1 α se expresen de manera constitutiva al estar bajo el control del promotor EF-1.



De esta manera las células transfectadas con pWIPI-HIF-GFP se denominaron MSC-HIF.

Tanto las construcciones de los plásmidos (pWIPI-GFP y pWIPI-HIF-GFP) como los lentivirus se realizaron en la Fundación Inbiomed (San Sebastian). Una vez obtenidos los virus, se descongelaron y se añadieron a las MSC a una multiplicidad de infección de 10 (moi 10) en presencia de 10 ng/ μ l de protamina sulfato (que afecta a la polaridad de la membrana celular promoviendo la adhesión de los virus a la membrana de la célula a infectar) durante 6 horas. El proceso de infección se repitió durante 2 ciclos consecutivos. La eficiencia de la transfección fue evaluada por citometría de flujo cuantificando el porcentaje de la población celular GFP+.

3.4. Co-cultivos

Tanto para evidenciar como para cuantificar la transferencia de exosomas (y de proteínas contenidas en los exosomas) entre cardiomiocitos ventriculares y células endoteliales, se realizaron co-cultivos entre estos tipos celulares en los cuales se monitorizó y cuantificó mediante análisis de microscopia las proteínas de interés fusionadas a la proteína GFP.

Para observar el tráfico de exosomas en células H9c2, se construyó la línea H9c2-CD63-GFP. De la misma manera para monitorizar el tráfico de GLUT1 y GLUT4 se construyeron las líneas H9c2-GLUT1-GFP y H9c2-GLUT4-GFP respectivamente. Células endoteliales provenientes de ratones transgénicos RFP fueron crecidas durante 4 días luego del aislamiento primario en discos de vidrio de 25 mm (MENZEL-GLÄSER). 36 horas antes de la adquisición de las imágenes las células H9c2-CD63-GFP, H9c2-GLUT1-GFP o H9c2-GLUT4-GFP se agregaron al cultivo de endotelio. Luego de 12 hs se incubaron los co-cultivos con los medios -St o +St durante 24 hs. A continuación los discos de vidrio se colocaron en cámaras Attofluor cell chamber (Invitrogen), y se montaron en el microscopio confocal de láser invertido Leica TCS SP2 AOBS

(Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) para la adquisición de las imágenes.

Para cuantificar la cantidad de CD63, GLUT4 y GLUT1 transferidos en un co-cultivo desde las células H9c2 hacia células endoteliales en diferentes condiciones experimentales (+/- St), se realizó un co-cultivo entre células H9c2-CD63-GFP, H9c2-GLUT4-GFP o H9c2-GLUT1-GFP y células HUVEC. Se crecieron células HUVEC en placas de 24 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 50% y a continuación se agregaron las H9c2-CD63-GFP, H9c2-GLUT1-GFP o H9c2-GLUT4-GFP. Luego de 24 h, se agregaron por duplicado los tratamientos +/- St. Se incubaron los co-cultivos durante 24 h o 48 h y luego se lavaron rápidamente 2 veces con PBS y se fijaron con PFA al 2% en PBS para el posterior análisis.

3.5. Aislamiento de exosomas a partir de medios de cultivo

3.5.1. Método de ultracentrifugación

El aislamiento de los exosomas secretados por las células al medio extracelular se realiza mediante centrifugaciones diferenciales del medio de cultivo (105). En este trabajo, se crecieron los cultivos en los medios descritos en la sección 2.5 (-St y +St) sin FBS ya que el suero posee exosomas que pueden interferir con análisis posteriores. Una vez cultivadas las células entre 24-48 h, se recogió el medio de cultivo y se centrifugó a 2000 g durante 15 min para precipitar las células muertas. El sobrenadante se centrifugó a 10.000 g durante 30 min para precipitar el debris celular y luego se pasó por un filtro de 0.22 μ m. Los exosomas fueron obtenidos mediante una ultracentrifugación a 100.000 g durante 70 min en una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-100 XP (Beckman Coulter). El precipitado de exosomas fue resuspendido en PBS, o en diferentes tipos de soluciones según el análisis a realizar. Todos los pasos de centrifugación se llevaron a cabo a 4 °C.

3.5.2. Purificación mediante ensayo de afinidad

Para analizar el contenido de miRNA presentes en los exosomas, se utilizó el kit de purificación de exosomas Exoquick-TC (SystemBioscience) según las especificaciones del fabricante. Los cultivos primarios de cardiomiocitos neonatales de ratón fueron incubados durante 48 h con los medios +St o -St y los exosomas se aislaron a partir de 10 mL de sobrenadante de medio de cultivo. De la misma manera las MSC y las MSC-HIF fueron incubadas durante 48 h en normoxia o hipoxia con el medio indicado en la sección 2.5. Tras el tratamiento se mezclaron 10 ml de medio de cultivo (previamente centrifugado a 2000 g 15 min) con 2ml de ExoQuick-

TC. La mezcla se incubó durante 16 h a 4°C y luego se centrifugó a 1.500 g durante 30 min para obtener el sedimento de exosomas, el cual se resuspendió en tampón de lisis proporcionado por el Kit de aislamiento para proceder a la extracción de miRNA exosomales.

3.6. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

3.6.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

Para la obtención de los extractos proteicos se trabajó en todo momento en hielo. En primer lugar los cultivos celulares se lavaron 2 veces con PBS frío y se añadió tampón de lisis M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) según la cantidad indicada por el fabricante. El tampón de lisis se suplementó con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) e inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich). Las células se levantaron con un rascador estéril, se transfirieron a un tubo eppendorf y se pipeteó repetidas veces con el fin de disgregar y lisar el extracto. A continuación se incubaron en hielo durante 20 minutos, y se centrifugaron en una centrífuga refrigerada (Eppendorf 5417 R) a 4°C a máxima velocidad durante 15 minutos. Posteriormente el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y las muestras se conservaron a -80°C.

3.6.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Una vez obtenidos los extractos proteicos se cuantificó la cantidad de proteína mediante el método BCA (BCA protein assay kit (Pierce, Cultek)). El ensayo BCA está basado en el ácido bicinonínico (BCA) para la detección y cuantificación colorimétrica de la cantidad de proteína total de una muestra. La cuantificación de proteína total se realizó en una placa de 96 pocillos. En primer lugar se preparó la solución de trabajo formada por las soluciones A (carbonato sódico, bicarbonato sódico, ácido bicinonínico, tartrato sódico en hidróxido sódico 0,1 M) y B (sulfato de cobre al 4%) en una proporción 50:1 respectivamente. A continuación se añadieron 10 µl de cada estándar (para realizar la curva patrón) o de la muestra al pocillo correspondiente, se agregaron 200 µl por pocillo de la solución de trabajo y se agitó durante 30 segundos en un agitador orbital. La placa se cubrió y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Tras el periodo de incubación la placa se enfrió a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a 562 nm en un lector Victor con el programa Wallac 1420 Workstation.

3.6.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis es una técnica utilizada para la separación de proteínas según su movilidad en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica. Para ello, las proteínas se cargan con sustancias como el SDS (detergente) que incorpora cargas negativas de manera dependiente del peso molecular. En nuestro caso, las proteínas se analizaron por SDS-PAGE (electroforesis en gel de acrilamida con SDS como agente desnaturizante) en un sistema discontinuo donde un primer gel (al 8% de poliacrilamida) produce la acumulación de todas las proteínas en el frente de migración, lo que nos asegura que todas las proteínas empiezan a migrar en el mismo momento, y un segundo gel (al 10% o 12% de poliacrilamida) donde realmente se realiza la separación de las proteínas. Para el análisis se cargaron 30 µg de proteína total. Antes de realizar la carga, se añadió a las muestras tampón de carga concentrado 5 veces (15% SDS (Sigma-Aldrich), 50% glicerol (Sigma-Aldrich), 0,1% azul de bromofenol (Sigma-Aldrich), 16% β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), 312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8) y se calentaron a 96°C durante 5 minutos. Para su separación por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, se utilizó el sistema MiniProtean II (Bio-Rad) y un tampón compuesto por 27 mM Glicina, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl. Como marcador de pesos moleculares se utilizó el marcador SM0441 (Fermentas, MD). La electroforesis se realizó a 100 voltios (V) hasta que las muestras entraron en el gel separador, momento en que se pasó a 150 V durante aproximadamente 70-80 minutos.

3.6.4. TRANSFERENCIA MEDIANTE WESTERN BLOT

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon™-P Transfer Membrane, Millipore), previamente activada con metanol (2 minutos), durante 1 hora a 60 V en un aparato MiniProtean II (Bio-Rad) y con un tampón de transferencia compuesto por 20% Metanol, 20 mM Tris y 150 mM Glicina. Tras la transferencia, la membrana se lavó con TBS-T (Tris HCl 0,1 M pH 8, NaCl 150 mM (Sigma-Aldrich), 0,05% Tween-20 (Sigma- Aldrich) y se incubó en la solución de bloqueo (TBS-T, 5% BLOT-QuickBlocker (Chemicon) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave en un agitador Stuart SSM1. A continuación se incubó la membrana toda la noche a 4°C en agitación suave, con el anticuerpo primario para la forma fosforilada correspondiente. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 min en agitación con TBS-T y la membrana se incubó con un anticuerpo secundario unido a HRP durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. Luego se realizaron 3 lavados de 10 minutos en agitación con TBS-T y se reveló la membrana. A continuación en la tabla 1 se detallan los anticuerpos primarios y secundarios utilizados:

Anticuerpo	Dilución	Especie	Casa Comercial
anti-CD63	1/500	Conejo	Santa Cruz
anti-CD9	1/500	Conejo	Santa Cruz
anti-CD81	1/500	Conejo	Santa Cruz
anti-GLUT1	1/500	Conejo	Santa Cruz
anti-GLUT4	1/500	Conejo	Santa Cruz
anti-LDH	1/500	Conejo	Cell signaling
anti-GAPDH	1/500	Conejo	Cell signaling
anti- α -tubulina	1/500	Ratón	Cell signaling
anti-AMPK- α	1/500	Ratón	Cell signaling
anti-p-AMPK- α	1/500	Ratón	Cell signaling
anti-AMPK- β	1/500	Ratón	Cell signaling
anti-p-AMPK- β	1/500	Ratón	Cell signaling
anti-AKT	1/500	Conejo	Cell signaling
anti-p-AKT	1/500	Conejo	Cell signaling
anti-ERK	1/500	Conejo	Cell signaling
anti-p-ERK	1/500	Conejo	Cell signaling
anti-HIF-1 α	1/500	Ratón	BD
Anti-ratón IgG HRP	1/20000	Cabra	Promega
Anti-conejo IgG HRP	1/10000	Cabra	Santa Cruz

Tabla 1 - Listado de anticuerpos primarios utilizados para WB

La detección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia empleando el kit ECL-plus (Amersham). Las membranas se cubrieron con papel transparente y se procedió a su autorradiografía en películas CURIX RP2 PLUS (Agfa).

3.7. TÉCNICAS MOLECULARES

3.7.1. EXTRACCIÓN DE RNA

Para realizar la extracción de RNA de las células en cultivo, las placas se colocaron en hielo, se realizaron 2 lavados con PBS frío y se añadió 100 μ l de Trizol a las mismas (Tri-reagent, Sigma-Aldrich). Después y con la ayuda de un rascador se recogieron las células y se resuspendieron con el trizol para obtener una buena homogeneización. La suspensión celular se añadió a un tubo eppendorf y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 0,2 mL de cloroformo (Sigma-Aldrich), se dejó 2-3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4 $^{\circ}$ C. A continuación se recogió en otro eppendorf la fase acuosa (con cuidado de no aspirar la fase proteica), en el que se añadieron 0,5 mL de

Isopropanol (Panreac) y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 12.000 g durante 20 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante con vacío y se añadieron 0,8 mL de etanol al 70% para lavar el extracto de RNA. La suspensión se mezcló suavemente con la mano, se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se eliminó mediante vacío. Finalmente se procedió al secado al aire y por último se añadieron 50 µl de agua DEPC (Gibco-Invitrogen) para reconstituir el RNA y la muestra se conservó a -80°C.

3.7.2. CUANTIFICACIÓN DEL RNA

La determinación de la concentración del RNA se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Se añadió 1 µl de muestra al NanoDrop ND- 1000 y se obtuvo el espectro a partir del cual se calculó la concentración total de RNA y el ratio entre el área de los picos de RNA ribosomal 28S/18S. Los ratios comprendidos entre 1,5 y 2 indicaron un RNA puro. Para confirmar la integridad del RNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio, a un voltaje de 80 V (8 V/cm) hasta que el frente de electroforesis alcanzó el final del gel. La visualización de las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal se llevó a cabo en un transiluminador de luz UV (Bio-Rad).

3.7.3. RT (TRANSCRIPCIÓN REVERSA) Y PCR EN TIEMPO REAL

La reacción de qPCR consta de dos etapas. Primero tiene lugar la transcripción reversa (RT) mediada por una retrotranscriptasa que cataliza la conversión de RNA mensajero (mRNA) en ADN complementario (cDNA). A continuación, este cDNA sintetizado se emplea como molde en una reacción convencional de PCR.

3.7.3.1. Síntesis de cDNA: Transcripción reversa

La transcripción reversa consiste en la síntesis de cDNA desde una muestra de RNA que actúa como molde; el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias unas ADN polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Para la síntesis de cDNA a partir de mRNA de las muestras se utilizó la transcriptasa inversa MMLV-RT (Invitrogen) y la reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf partiendo de 1 µg de RNA como molde de la reacción y usando hexámeros de secuencia aleatoria (Applied Biosystems-Invitrogen) como cebadores. Esta reacción se llevó a cabo como se indica a continuación: en una primera etapa se añadió 1 µg de RNA, 1,25 µl de hexámeros de secuencia aleatoria 50 µM y agua DEPC (Sigma-Aldrich) hasta un volumen final de 12 µl. Esta reacción se

incubó durante 5 minutos a 37°C. A continuación se añadió a la reacción 4 µl de First Strand Buffer 5x (Invitrogen), 1,5 µl de la transcriptasa inversa M-MLV RT (Invitrogen), 1,25 µl del inhibidor de RNAasas RNaseOUT (Invitrogen) y 1,25 µl de la mezcla de dNTPs 10 mM (Invitrogen) y se incubó durante 1 hora a 37°C. El ADNc sintetizado se guardó a -20°C hasta la realización de la siguiente etapa.

3.7.3.2. Amplificación del cDNA en tiempo real (qPCR)

Los cebadores se adquirieron en el servicio “KiCqStart™ Primers” (SIGMA ALDRICH). Este servicio ofrece cebadores ya diseñados de los genes que se desee cuantificar su expresión mediante qPCR. Se adquirieron los pares de cebadores para cuantificar los genes de rata Vamp2, Pld2, Rab27a, Rab27b, Gosr1, CD63, Nppa, Rab4a, Rab4b, Rab5a, Rab5b, Rab8a, Rab8b, Rab11a, Rab11b, Rab10, Rab14, Rab35, Gapdh y Actb (estos dos últimos se utilizaron como controles internos (“housekepeenig”)). También se adquirieron los pares de cebadores para cuantificar los genes humanos TIMP1, ANGPTL4, ADANTS1, ANGPT1, HPSE y EFNB2, GAPDH, ACTB (estos dos últimos se utilizaron como genes normalizadores).

La amplificación del DNA complementario de cada gen de interés se realizó utilizando SYBR green master mix y Taq (Light Cycler 480 Sybr Green 1 Master Roche) en el termociclador Light Cycler 480 (Roche). Una vez sintetizado el cDNA, se amplificaron de forma selectiva secuencias específicas de DNA por medio de la reacción en cadena de la DNA-polimerasa (PCR). Cada reacción de PCR contenía 3 µl de cDNA sintetizado en el paso anterior, 1 µl Taq DNA polimerasa NETZYME (1 U/µl, NEED), 2,5 µl tampón de la polimerasa 10x, 1 µl MgCl2 50 mM, 2,5 µl dNTPs 2 mM, 0,5 µl primer Forward 6 µM, 0,5 µl primer Reverse 6 µM y la cantidad suficiente de agua milli-Q para un volumen final de 15 µl. Una vez preparada la reacción, las muestras se introdujeron en el termociclador siguiendo las condiciones de amplificación mostradas a continuación en la tabla 2:

PASO	TEMPERATURA	DURACIÓN	Nº CICLOS
PRE-INCUBACIÓN	95°C	10 minutos	
AMPLIFICACIÓN	95°C	15 seg	45
	58°C	10 seg	
	72°C	20 seg	
CURVA DE MELTING	94°C	5 seg	1
	60°C	15 seg	
	97°C	Continuo	
ENFRIAMIENTO	4°C	10 seg	

Tabla 2 – Condiciones de amplificación en la reacción de qPCR

3.7.3.3. Análisis del producto de la qPCR

Los resultados se normalizaron frente a los genes “housekeeping” (ACTB y GAPDH) y se expresaron como incremento del número de veces que la expresión aumentaba o disminuía respecto a los valores del tratamiento control. Los resultados se consideraron significativos con una inducción o represión de dos veces. Las muestras se analizaron por triplicado.

3.7.4. Identificación y análisis de miRNA de exosomas provenientes de cardiomiocitos neonatales de ratón y de MSC y MSC-HIF

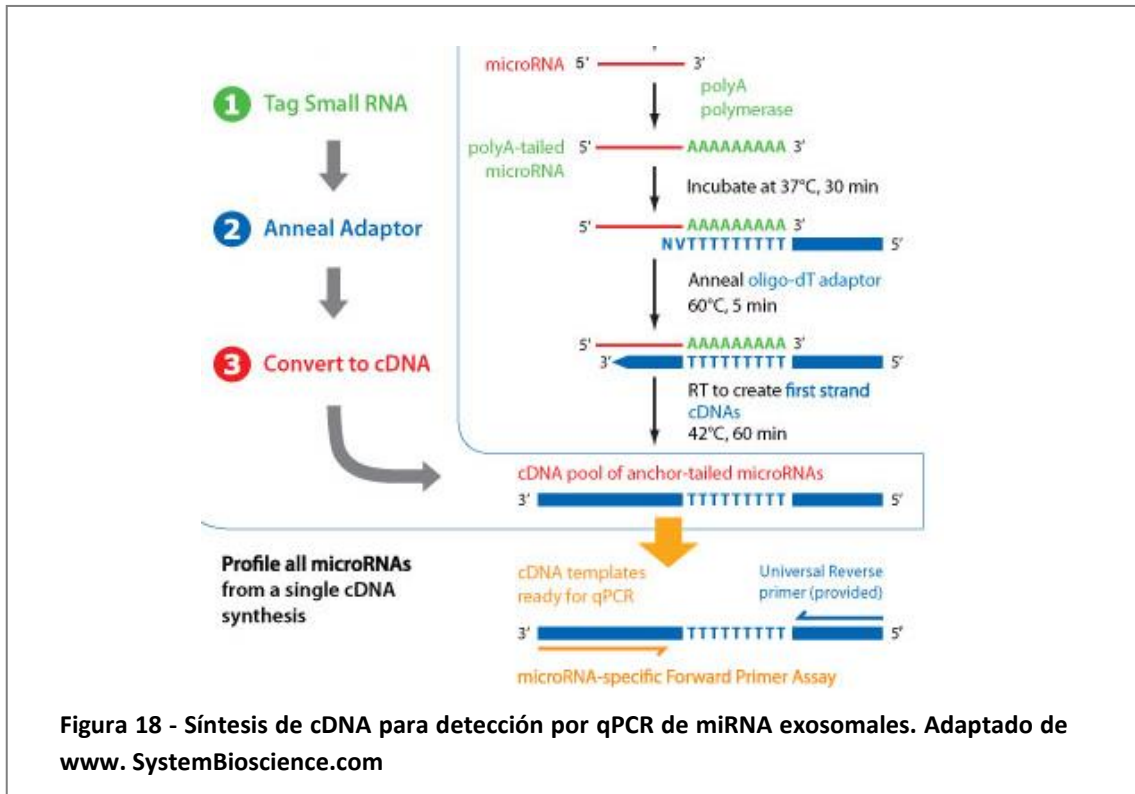
Se realizó la identificación y comparación de los niveles de expresión de los miRNA de exosomas provenientes de medio de cultivo de cardiomiocitos neonatales de ratón en diferentes condiciones experimentales (-St y +St). El mismo análisis se realizó para miRNA exosomales aislados desde el medio de cultivo de MSC y MSC-HIF cultivadas en normoxia o en hipoxia. Se utilizó el kit “Mouse Complete SeraMir Exosome RNA Amplification and Profiling Kit for Media and Urine” (SystemBioscience) en el caso de miRNA murinos y el “Human Complete SeraMir Exosome RNA Amplification and Profiling Kit for Media and Urine” (SystemBioscience) en el caso de miRNA humanos. Ambos kits se utilizaron según las indicaciones del fabricante. Estos Kits permiten analizar de forma comparativa los niveles de miRNA contenidos en exosomas provenientes de medio de cultivo, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR).

3.7.4.1. Extracción de miRNA exosomales

Una vez obtenido el precipitado de exosomas, (sección 4.2.) se resuspendió en tampón de lisis y se agregaron 5 µl de SeraMir control RNA spike-in. Luego se procedió a la obtención de los miRNA exosomales utilizando las columnas de purificación que provee el kit. Una vez obtenidos los miRNA se cuantificaron utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

3.7.4.2. Síntesis de cDNA, qPCR y análisis.

Se realizó la síntesis de cDNA y las qPCR según las indicaciones del fabricante. El resumen del proceso de amplificación de los miRNA se encuentra esquematizado en la siguiente figura:



Una vez obtenidos los miRNA, con las columnas de purificación que provee el kit, se agregó una cola de poli adeninas mediante la enzima poli-A polimerasa. Esta cola poli-A sirve de anclaje para unir un adaptador poli-T que utilizó en el siguiente paso la transcriptasa reversa para realizar la síntesis del cDNA. De esta manera se genera un cDNA que en su extremo 5' contiene una secuencia poli-T que en la reacción de qPCR unirá un primer universal y en su extremo 3' unirá de manera específica el primer forward del miRNA que se desee detectar. El kit provee 380 primer forward que amplifican 380 miRNA diferentes. También cuenta con controles internos (SeraMir control RNA spike-in) para poder comparar los diferentes experimentos. Los SeraMir control RNA spike-in son secuencias de nucleótidos que imitan la presencia de un miRNA. Estos se agregaron en una concentración determinada en el paso de obtención de los miRNA exosomales. Teniendo en cuenta esta premisa, para que los resultados de las amplificaciones sean comparables, los controles que se amplifican por triplicado deben tener un ciclo umbral (Ct; cycle threshold) entre el ciclo 15 y 20 de la reacción de qPCR.

Las amplificaciones de qPCR se llevaron a cabo en placas de 384 well (Roche, LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white; High-performance reaction device tailor-made for the LightCycler® 480 Instruments, 384-well versión), utilizando *Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)*, un fluorocromo que se une inespecíficamente al ADN de doble cadena que, excitado mediante luz azul ($\lambda_{max} = 488 \text{ nm}$) emite luz verde ($\lambda_{max} = 522 \text{ nm}$), que luego es detectada en un termociclador de tipo LightCycler® 480 (Roche).

Para comparar los niveles de miRNA exosomales obtenidos en los diferentes tipos de tratamientos se utilizó, en el caso de los miRNA murinos, el software “Free Analysis Software for Mouse 384 SeraMir qPCR Profiler array(.xls)” y para el análisis de los miRNA humanos el software “Free Analysis Software for Human 384 SeraMir qPCR Profiler array(.xls)”, ambos programas de la empresa System Bioscience. Se consideraron como significativos valores de inducción o represión de los microRNAs mayores a 3 veces entre las diferentes condiciones experimentales (-St y +St, en el caso de miRNA exosomales murinos; normoxia e hipoxia, en el caso de miRNA exosomales humanos).

Mediante el valor de Ct que se obtiene de la reacción de qPCR, el programa analiza de forma comparativa los niveles de miRNA provenientes de dos muestras diferentes, al normalizar cada una de las 380 comparaciones de Ct con el valor promedio de Ct obtenido de los controles.

3.8. Inmunocitoquímica

Una vez finalizados los tratamientos experimentales, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con PFA al 2% durante 10 min a 4 °C y se lavaron nuevamente 3 veces con PBS. Las células fijadas se conservaron en PB 0,1 M con azida sódica (Panreac) al 0,05% hasta ser utilizadas. Las preparaciones se bloquearon con PBS, 2% de FBS (Gibco) y 0,1% Triton X-100 durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con el/los anticuerpos primarios correspondientes 18h a 4 °C. Tras la incubación se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y se incubaron con el/los anticuerpos secundarios correspondientes en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 4 lavados de 5 min con PBS, se añadieron 20 µL del medio de montaje con DAPI (4',6- diamidino-2-fenilindol, un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias de ADN y que se utiliza para marcar células vivas o fijadas (ProLong Gold antifade with DAPI, Molecular Probes- Invitrogen). Por último se retiraron las celdillas y las muestras se cubrieron con un cubre-objetos (Menzel-Glaser, Afora) y se sellaron con laca de uñas. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se resumen en la siguiente tabla:

Anticuerpo	Dilución	Referencia	Casa Comercial
anti-CD63	1/500	sc-15363	Santa Cruz
anti-desmina	1/500	sc-34200	Santa Cruz
anti-CD31	1/500	ab24590	Abcam
RECA	1/500	ab9774	Abcam
anti-GLUT1	1/500	sc-1605	Santa Cruz
anti-GLUT4	1/500	sc-1608	Santa Cruz
anti-GFP	1/500	ab13970	Abcam
Alexa Fluor 488	1/1000	A21441	Life Technologies
Alexa Fluor 633	1/1000	A21082	Life Technologies
Alexa Fluor 633	1/1000	A21050	Life Technologies
Alexa Fluor 488	1/1000	A11039	Life Technologies

Tabla 3 - Listado de anticuerpos utilizados para Inmunocitoquímica

3.9. TÉCNICAS DE IMAGEN

3.9.1. Microscopía óptica de fluorescencia

Tras realizar la Inmunocitoquímica de fluorescencia, los preparados se fotografiaron con el microscopio óptico DM6000 de Leica, equipado con la cámara en blanco y negro Leica DFC350 y se analizaron con el software Leica Application Suite Version 2.4.0 R1. Se realizó una adquisición secuencial de imágenes con distintos filtros de barrera (adecuados para cada uno de los fluorocromos) que posteriormente se combinaron creando una imagen superpuesta en color.

3.9.2. Microscopía confocal

La microscopía confocal es un tipo de microscopía de fluorescencia basada en el uso de un láser que incide sobre la muestra de forma puntual y barre todos los puntos en un plano focal mientras que elimina la luz emitida que está fuera de dicho plano focal, de modo que sólo la luz que está dentro de este plano puede ser detectada, lo que hace que la calidad de imagen es mucho mejor que las de campo amplio. Esto permite realizar fotos secuenciales a distintos planos y crear una composición de imagen 3D libre de efectos de solapamiento de señales. Las muestras se analizaron con el microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS utilizando un objetivo de inmersión 63 X Plan- Apochromat-Lambda Blue 1.4. Se utilizaron láseres con longitudes de onda de excitación y emisión diferentes que incidieron sobre las muestras para la captación de la fluorescencia correspondiente. El análisis se realizó a través del servicio de microscopía confocal del Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia.

3.9.3. Microscopia electrónica e inmunocarraje con oro

Uno de los métodos diagnósticos para evidenciar la presencia de exosomas al finalizar el proceso de aislamiento de los exosomas es observar en el microscopio electrónico las vesículas obtenidas. Para tal fin, se tomaron 10 µl de la fracción exosomal proveniente de 100 mL de medio de cultivo (resuspendida en PBS) y se colocó en forma de gota sobre una rejilla de formwar carbono durante 10 min. A continuación, la rejilla con los exosomas adheridos se colocó sobre una gota de PFA al 2% en PB 0.1 M y los exosomas se fijaron durante 5 min. La rejilla se lavó 2 veces con PB 0.1 M (5 min cada lavado) y se contrastó con una solución al 2% de acetato de uranilo en PB 0.1 M. Tras un secado a temperatura ambiente de 20 min, las rejillas se observaron en el microscopio electrónico.

Para realizar el inmunomarcaje con oro, el precipitado obtenido por ultracentrifugación se resuspendió en 100 µl de una solución de 2% de PFA en PB 0.1 M. Se tomaron 10 µl de estos exosomas y se colocaron en una rejilla de formwar carbono durante 10 min. Se transfirió la rejilla a una gota de PBS durante 3 min y se repitió este lavado con PBS tres veces. Luego, de la misma manera, se realizaron 3 lavados con una solución de PBS/50 mM de glicina. Para realizar el bloqueo se colocó la rejilla en una gota de FBS al 2% durante 10 min. Después se incubó la rejilla con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 30 min. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-CD63, anti-GLUT4 y anti-GLUT1 (todos de Santa Cruz Biotechnology). La rejilla se lavó 5 veces con una gota de PBS durante 3 min. y se repitió el proceso 4 veces para un total de 5 lavados. Y la muestra se bloqueó con una gota de PBS/0.5% BSA (solución de bloqueo del anticuerpo secundario conjugado con oro) durante 3 min. Este proceso se repitió 5 veces y luego se añadió una gota de PBS/0.5% BSA con el anticuerpo secundario conjugado con nanopartículas de oro de 10 nm (SIGMA ALDRICH) durante 20 min. A continuación se transfirió la rejilla a una gota de PBS durante 2 min. Se repitió este último paso 7 veces. Por último la rejilla se fijo con una gota de 1% de glutaraldeido en PB 0.1M durante 5 min y se enjuagó con agua mediante lavados sucesivos (7 veces). Las rejillas se contrastaron con una solución al 2% de acetato de uranilo en PB 0.1 M. Se dejó secar las rejillas durante 20 min a temperatura ambiente y se observaron en el microscopio electrónico. Las muestras se analizaron en el servicio de microscopia electrónica del CIPF con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 Spirit (FEI Europe, Eindhoven, Netherlands) utilizando una cámara (Olympus Soft Image Solutions GmbH, Münster, Germany).

3.9.4. Co-Cultivos: Análisis de transferencia de exosomas y GLUTs entre células

Tanto para evidenciar como para cuantificar la transferencia de exosomas (y de proteínas contenidas en los exosomas) entre cardiomiocitos ventriculares y células endoteliales, se realizaron co-cultivos entre estos tipos celulares en los cuales se monitorizó y cuantificó mediante análisis de microscopia las proteínas de interés fusionadas a la proteína GFP.

3.9.4.1. Microscopia confocal “time-lapse”

El “time-lapse” es una técnica fotográfica cinematografía y fotografía, para mostrar diferentes sucesos que por lo general suceden a velocidades muy lentas e imperceptibles al ojo humano. El efecto visual que se logra en el “time-lapse” consiste en que todo lo que se haya capturado se mueva muy rápidamente, como puede ser el movimiento de las células en un cultivo *in vitro*.

Para observar si cardiomiocitos ventriculares en co-cultivo con células endoteliales eran capaces de realizar transferencia de exosomas o de GLUTs, se monitorizó con microscopia confocal en tiempo real la ubicación celular de estructuras de interés. Para observar el tráfico de exosomas en células H9c2, se construyó la línea H9c2-CD63-GFP. De la misma manera para monitorizar el tráfico de GLUT1 y GLUT4 se construyeron las líneas H9c2-GLUT1-GFP y H9c2-GLUT4-GFP respectivamente.

Células endoteliales provenientes de ratones transgénicos RFP fueron crecidas en discos de vidrio de 25 mm (MENZEL-GLÄSER). 36 horas antes de la adquisición de las imágenes las células H9c2-CD63-GFP, H9c2-GLUT1-GFP o H9c2-GLUT4-GFP se agregaron al cultivo de endotelio. Luego de 12 hs se incubaron los co-cultivos con los medios -st o +St durante 24 hs. A continuación los discos de vidrio se colocaron en cámaras Attofluor cell chamber (Invitrogen), y se montaron en el microscopio confocal de láser invertido Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany). Se utilizó el objetivo de inmersión en aceite 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A. Las longitudes de onda de excitación utilizadas fueron; 488 nm (laser de argón) para la detección de las construcciones con GFP (CD63-GFP, GLUT4-GFP y GLUT1-GFP); 561 nm (laser DPSS) para la detección de células endoteliales DsRed provenientes de los ratones transgénicos RFP; 633 nm (laser He/Ne) para la detección de membranas teñidas con CellMask™ Deep Red (Molecular Probes). Durante las observaciones, las muestras se mantuvieron a 37 °C y con una mezcla humidificada de 95 % de aire y 5% de CO₂. Imágenes en pseudo color (nivel de color 255) de 2 dimensiones fueron reunidas con un tamaño de 1024x1024 pixels con intervalo de tiempo de 1 min y 30 segundos. De esta manera, para cada experimento se tomaron imágenes del co-cultivo cada 1,5 min durante 1:45 hr.

3.9.4.2. Cuantificación de la transferencia de exosomas y GLUTs en los co-cultivos

Para cuantificar la cantidad de CD63, GLUT4 y GLUT1 transferidos en un co-cultivo desde las células H9c2 hacia células endoteliales en diferentes condiciones experimentales (+/- St), se realizó un co-cultivo entre células H9c2-CD63-GFP, H9c2-GLUT4-GFP o H9c2-GLUT1-GFP y células HUVEC. Se crecieron células HUVEC en placas de 24 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 50% y a continuación se agregaron las H9c2-CD63-GFP, H9c2-GLUT1-GFP o H9c2-GLUT4-GFP. Luego de 24 h, se agregaron por duplicado los tratamientos +/- St. Se incubaron los co-cultivos durante 24 h o 48 h y luego se lavaron rápidamente 2 veces con PBS y se fijaron con PFA al 2% en PBS. Se realizó un doble inmunomarcaje con anti-GFP (anticuerpo secundario Alexa Fluor-488, verde) y anti-CD31 (anticuerpo secundario Alexa Fluor-555, rojo). Para el análisis del doble inmunomarcaje se adquirieron imágenes de microscopia y se cuantificó la cantidad de señal verde (proveniente de CD63 o GLUT4 o GLUT1) solo dentro de células endoteliales CD31+. Este proceso se automatizó utilizando el microscopio de epifluorescencia In Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) para adquirir las imágenes. Se utilizó el objetivo de 40X para capturar la señal de fluorescencia y se aplicó una combinación de tres filtros de excitación/emisión para detectar DAPI (exc 405nm/em 450 nm), fluorescencia verde del marcaje anti-GFP (exc 475 nm/em 535 nm) y fluorescencia roja del marcaje anti-CD31 (exc 530 nm/em 620 nm). Para cada pocillo se tomaron 20 fotografías. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa In Cell Analyzer 1000 Workstation software (GE Healthcare). Primero se definieron las células utilizando una segmentación basada en la señal del DAPI y la señal roja del marcaje con CD31. La señal roja fue utilizada para definir la morfología celular alrededor del núcleo y también para descartar del análisis las células CD31-. Luego se cuantificó la intensidad de fluorescencia verde solo en las células CD31+. De esta manera, se cuantificó la señal verde proveniente de células H9c2 que logró transferirse a células HUVEC.

3.9.5. Cuantificación en Incell de la colocalización de GLUTs y CD63 en cultivos de CM neonatales de rata

Para llevar a cabo la identificación y cuantificación de la colocalización de GLUTs y CD63 en cultivos de CM neonatales de rata, se sembraron los CM neonatales en placas de 96 pocillos. Una vez establecidos los cultivos se aplicaron los tratamientos +/- St durante 24 h. Luego se fijaron las células con PFA al 2% y se realizó un doble inmunomarcaje con anticuerpos anti-CD63 (anticuerpo secundario Alexa fluor-488, verde) y anti-GLUT1 o anti-GLUT4 (anticuerpo

secundario Alexa fluor-647, rojo lejano) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). A continuación se tomaron imágenes de fluorescencia utilizando el microscopio InCell Analyzer 1000 (GE Healthcare) con una cámara CCD y un objetivo 20x/0.45 NA. Se utilizó un espejo policrómico Q505LP en conjunción con las siguientes combinación de filtros de excitación (x) y emisión (m): 405/20x, 535/50m para la detección del DAPI, 475/20x, 535/50m para la detección de los gránulos verdes de CD63 y 475/20 x, 620/60m para los gránulos rojos de GLUT1 o GLUT4. Se adquirieron 20 imágenes por cada pocillo y el análisis de las mismas se realizó con el software In Cell Analyzer 1000 Developer (GE Healthcare). Para llevar a cabo el análisis de segmentación de las imágenes se utilizó la tinción de los núcleos con DAPI y luego se definieron los parámetros para detectar los gránulos rojos y verdes. Así, el software realiza un algoritmo para identificar los puntos de colocación entre gránulos rojos y verdes definiendo estos puntos como gránulos amarillos. Finalmente se calculó el número de gránulos amarillos por célula para los diferentes tratamientos experimentales.

3.10. Cuantificación de síntesis y secreción de exosomas

3.10.1. Western Blot

Las tetraspaninas son muy abundantes en los exosomas. Para cuantificar la cantidad de exosomas liberados por un cultivo celular al medio, se analizó por Western Blot las cantidades de las tetraspaninas específicas de exosomas CD9, CD63 y CD81 presentes en la fracción exosomal obtenida a partir de la misma cantidad de medio de cultivo.

3.10.2. Actividad Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa es una enzima que se encuentra principalmente en tejido nervioso y glóbulos rojos. Su función es hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina (106) (Figura 19).

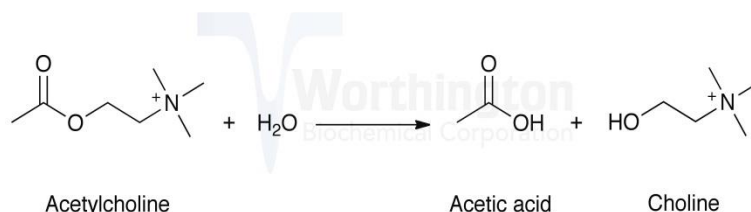


Figura 19 - Reacción catalizada por la enzima Acetilcolinesterasa. Adaptado de www.worthington.com.

Se ha descrito que los exosomas liberados por cultivos de diferentes tipos celulares contienen esta enzima (107, 108), por lo que puede utilizarse la actividad acetilcolinesterasa de extractos de exosomas para cuantificar de manera comparativa la cantidad de exosomas presentes en dichos extractos; a mayor actividad enzimática, mayor cantidad de exosomas.

En el presente trabajo, para medir la cantidad de exosomas liberados por cultivos de cardiomiocitos neonatales de rata, se resuspendió la fracción exosomal obtenida a partir de la misma cantidad de medio de cultivo para las diferentes condiciones experimentales (-St o +St) en 110 μl de H_2O . Se tomó 37.5 μl de la mezcla exosomas + H_2O y se colocó por duplicado en placas de 96 pocillos de fondo plano. Luego se agregaron 1.25 mM de acetiltiocolina y 0.1 mM de 5,5'-ditiobis (ácido 2 nitrobenzoico) (ambos reactivos de Sigma-Aldrich Química S.A.) en un volumen final de 300 μl . Se monitorizó el cambio de absorbancia a 412 nm cada 5 min en el espectrofotómetro Wallac Victor²V 1420 Multilabel (Perkin Elmer). Los datos mostrados representan la actividad enzimática luego de 30 min de incubación a 37 °C.

3.10.3. Cuantificación en InCell Analyzer

Para cuantificar la cantidad de exosomas producidos por un cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata, se realizó un doble inmunomarcaje de los cardiomiocitos. Los cultivos se sembraron por cuadruplicado en placas de InCell Analyzer de 96 pocillos y luego de incubarlos 24 h con los tratamientos -St o +St se lavaron con PBS y se fijaron durante 15 min a 4 °C con 2% PFA en PBS. A continuación se realizó el doble inmunomarcaje con Anti-CD63 (Santa Cruz Biotechnology) (anticuerpo secundario Alexa Fluor-488, life technology) y Anti-Desmin (Santa Cruz Biotechnology) (anticuerpo secundario Alexa Fluor-555, life technology). La adquisición de las imágenes fue realizada con el microscopio de epifluorescencia del In Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare). Se utilizó el objetivo de 20X y se aplicó una combinación de tres filtros de excitación y emisión para detectar DAPI (exc 405nm/em 450 nm), fluorescencia verde del marcate anti-CD63 (exc 475 nm/em 535 nm) y fluorescencia roja del marcate anti-desmina (exc 530 nm/em 620 nm). Para cada well se adquirieron 20 imágenes. El análisis se llevó a cabo con el software In Cell Analyzer 1000 Workstation (GE Healthcare). Primero se definieron las células utilizando una segmentación basada en el DAPI y en la señal roja de la desmina. La señal roja se utilizó para definir la morfología de la célula alrededor del núcleo y también para descartar las células negativas para marcate con desmina. Luego se cuantificó la cantidad de señal verde proveniente del marcate de CD63 solo en las células desmina+.

3.11. Ensayos funcionales *in vitro* con exosomas

3.11.1. Internalización de exosomas

Para evidenciar si las células de un cultivo de endotelio primario de rata eran capaces de internalizar exosomas provenientes de cardiomiocitos ventriculares, se sembraron explantos de aorta de rata neonato en Nunc Lab-Tek Chamber Slide System (SIGMA ALDRICH) de 8 pocillos. Se aislaron exosomas provenientes del medio de cultivo de células H9C2-CD63-GFP con 48 hs de tratamiento +/- st. Estos exosomas se agregaron en una concentración de 20 µg/ml directamente al medio de cultivo de las células endoteliales. Se incubaron los exosomas durante 30 min a 37 °C y luego se lavaron las células 3 veces con PBS y se fijaron en PFA al 2%. Se montaron las placas con medio de montaje y se tomaron imágenes con el microscopio de fluorescencia.

3.11.2. Activación de vías de señalización

Para analizar si los exosomas provenientes de células cardiacas eran capaces de activar vías de señalización relacionadas con el metabolismo de la glucosa en células endoteliales, se llevó a cabo el siguiente experimento. Se crecieron HUVEC hasta que alcanzaron la confluencia en placas de 6 pocillos. Una vez alcanzada la confluencia se incubaron las células 16 h con el medio EBM-2 (LONZA) con 1% solución de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich Química S.A.), 1% MEM Eagle Vitamin mix (LONZA) y 1% Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich Química S.A.). Se agregó directamente al medio los diferentes tratamientos compuestos por: 5% FBS (GIBCO); 0.1 µg/ml factor de crecimiento de insulina humano (hIGF1)(Life Technologies), 0.1 µg/ml factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF)(Life Technologies); 20 µg/ml de exosomas aislados desde el medio de cultivo de células H9c2; 1 µM Wortmannina (Sigma-Aldrich Química S.A.). Todos los tratamientos se agregaron al mismo tiempo y se incubaron durante 30 min a 37 °C. A continuación se lavaron las células rápidamente con PBS y se procedió con la extracción de proteínas como se describe en la sección 8.1. Luego se analizó por WB la actividad de las vías de AKT y ERK.

3.11.3. Captación de Glucosa

Para analizar si la captación de glucosa en células endoteliales se veía afectada por la presencia de exosomas provenientes de células cardiacas, se llevó a cabo un ensayo de captación de glucosa fluorescente 2-deoxy-2-((7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino), nombre comercial 2-NBDG (Life Technologies). Se cultivaron células de endotelio primario de rata en placas de 96

pocillos MatriPlate 96 well microplates (GE Healthcare). La cuantificación de la captación de 2-NBDG se realizó como previamente describió Kawauchi K, et al (109), con modificaciones menores. Una vez alcanzada la confluencia las células se lavaron con PBS y se agregó medio +St durante 2 hs. Luego se agregaron 20 µg/ml de exosomas provenientes del medio de cultivo de cardiomiocitos primarios, o PBS como control. Se incubaron las células a 37 °C durante 30 min. Luego se lavó el cultivo con PBS y se agregó DMEM-sin glucosa con L-Glutamina (GIBCO) y 150 µg/ml of 2-NBDG. Se incubaron las células durante 30 min y se lavaron 3 veces con PBS, para finalmente fijar el cultivo con PFA al 2% en PBS. El análisis de la captación de 2-NBDG se llevó a cabo con el microscopio de Epifluorescencia In Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare). Se utilizó el objetivo de 20X para adquirir la señal de fluorescencia y una combinación de dos filtros de excitación/emisión fue aplicada para detectar el DAPI (exc 405nm/em 450 nm) y la fluorescencia verde proveniente del 2-NBDG (exc 475 nm/em 535 nm). Para cada pocillo se adquirieron 40 imágenes y se analizaron con el programa In Cell Analyzer 1000 Workstation software (GE Healthcare) utilizando una plataforma para detectar los gránulos intracelulares de 2-NBDG. Para definir las células se utilizó la segmentación proveniente del DAPI y se llevó a cabo la cuantificación de los gránulos de 2-NBDG. Para cuantificar el nivel de captación de 2-NBDG se midió para cada imagen la relación “gránulos de 2-NBDG/número de células”.

3.11.3.1. Inhibición de GLUTs exosomales

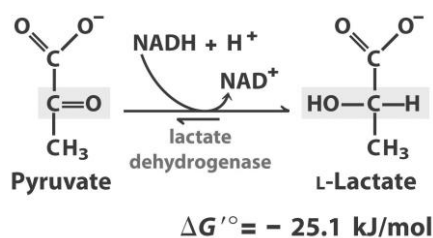
La molécula Fasentin (SIGMA ALDRICH) ha sido descrita como una molécula capaz de inhibir la actividad de los GLUTs (110). Para inhibir los GLUTs contenidos en exosomas aislados desde el medio de cultivo de cardiomiocitos primarios, una alícuota de la fracción exosomal fue tratada durante 1 hr con Fasentin 100 µM. Luego 20 µg/ml de estos exosomas con los GLUTs inhibidos fueron agregados a células endoteliales en un volumen final de 310 µl (3.22 µM Fasentin) e incubados durante 30 min a 37 °C. A continuación las células se lavaron y el ensayo de captación de 2-NBDG fue llevado a cabo como se describe en la sección 10.2.

3.11.4. Actividad transcripcional de HUVEC

Se analizó mediante qPCR si la presencia de exosomas provenientes de cardiomiocitos alteraba la actividad transcripcional de células HUVEC. Para realizar el experimento, las células HUVEC fueron crecidas en placas de 6 pocillos hasta alcanzar la confluencia y directamente al medio de cultivo fueron agregados 20 µg/ml de exosomas provenientes del medio de cultivo de cardiomiocitos primarios. Tras 40 min de incubación a 37°C, las células fueron lavadas con PBS y el mRNA fue extraído para el posterior análisis por qPCR. Los resultados presentados fueron normalizados contra el control de agregar 100 µl de PBS (en lugar de exosomas) a las HUVEC.

3.11.5. Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

La LDH es una enzima que cataliza la siguiente reacción:



Para medir la actividad LDH tanto en células como en exosomas se utilizó el kit “Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (SIGMA ALDRICH)” según las indicaciones del fabricante. Para determinar la actividad LDH de los exosomas, la fracción exosomal se resuspendió en LDH assay buffer.

Para determinar la actividad LDH de células HUVEC, estas se cultivaron hasta alcanzar la confluencia en placas de 6 pocillos. Una vez alcanzada la confluencia se agregó al medio de cultivo el total de la fracción exosomal obtenida a partir de 100 ml de medio de cultivo de células H9c2 (o 100 μl de PBS como control). Luego de 30 min de incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$, las HUVEC fueron rápidamente lavadas 2 veces con PBS frío y 150 μl de LDH Assay Buffer fue directamente agregado al pocillo. Los resultados mostrados provienen del promedio de dos experimentos independientes.

3.11.6. Cuantificación de piruvato

El Piruvato es un compuesto orgánico producido en la etapa final de la glicólisis. Para determinar la concentración de piruvato presente tanto en células como en su medio de cultivo, en el presente trabajo se utilizó el “Pyruvate Assay Kit (Abcam)” según las indicaciones del fabricante. Se cultivaron células HUVEC en placas de 6 pocillos. Una vez alcanzada la confluencia, las células se lavaron con PBS y el medio de crecimiento fue reemplazado por medio de ensayo de Piruvato compuesto por DMEM-sin glucosa, sin-piruvato (GIBCO), con todos los suplementos del EGM-2 BulletKit (LONZA) y D-(+)-Glucose 1 g/L (SIGMA ALDRICH). Inmediatamente se agregó al medio de ensayo la fracción exosomal total obtenida a partir de 100 ml de medio de cultivo de células H9c2 (o 100 μl de PBS como control). Luego de 30 min de incubación se tomó una alícuota del medio para cuantificar el piruvato que las HUVEC liberaron al medio de ensayo durante esos 30 min. Inmediatamente después las células se lavaron con PBS frío y se agregó 100 μl de Pyruvate Assay Buffer a cada pocillo. Los resultados mostrados provienen del promedio de dos experimentos independientes.

3.12. Citometría de flujo

Para analizar la expresión de la GFP, tanto en las H9c2-CD63-GFP como en las MSC-HIF, las células se sembraron en frascos de 75 cm² a una densidad de 2.000 células/cm². Cuando el cultivo alcanzó el 80% de confluencia, las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 400 g durante 7 minutos y se lavaron con PBS con 1% de Albúmina de Suero Bovino (BSA). Todos los lavados se realizaron con PBS suplementado con BSA para preservar la integridad celular. El sedimento celular se resuspendió en 1 mL de PBS y se distribuyó en alícuotas de 300 µl (50.000 células/tubo) en tubos de citometría. Las células marcadas con GFP se identificaron por su epifluorescencia verde con el citómetro de flujo Cytomics FC 500 de Beckman Coulter, realizado por el servicio de citómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

3.13. Proteómica

Para realizar el estudio del contenido proteico de los exosomas derivados de CM neonatales de rata, se cultivaron los CM durante 48 h con los medios experimentales -St y +St. Tras la incubación, se aislaron los exosomas desde los medios de cultivo por ultracentrifugación y la fracción exosomal obtenida fue resuspendida en tampón RIPA. El extracto proteico fue cargado con tampón Laemmli en un gel SDS-PAGE y la electroforesis se detuvo luego de que la banda de proteínas recorriera 1 cm en la zona resolutive del gel. A continuación se cortó la banda de proteínas y se digirió con tripsina. La digestión se detuvo con TFA a una concentración final del 1% y se realizó una doble extracción con ACN para generar la mezcla de péptidos (muestra). Las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Para ello, se cargó 5 µl de cada muestra en una columna trampa (NanoLC Column, 3µ C18-CL, 350umx0.5mm ; Eksigen), se desalaron con TFA y luego se cargaron en una columna analítica (LC Column, 3 µ C18-CL, 75umx12cm, Nikkyo). Los péptidos fueron analizados en el espectrómetro de masas nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX). Los datos obtenidos para las muestras fueron analizadas con el software ProteinPilot v4.5. search engine (ABSciex). Todo el proceso se realizó en el servicio de proteómica de la Universidad de Valencia.

3.14. Técnicas in vivo: estudio del efecto terapéutico de los exosomas derivados de MSC y MSC-HIF en la reparación del IAM

3.14.1. Animales

Un total de 18 ratas Wistar macho con un peso de 200-250 g (Charles River Laboratories) se incluyeron en el estudio. Los animales con una fracción de acortamiento tras el infarto superior al 35% se excluyeron del estudio. Los 18 animales se dividieron en tres grupos de 6 a los que les administro de manera intramiocárdica luego de generar el IAM experimental un tipo de tratamiento. Un grupo recibió la inyección intramiocárdica de PBS (a manera de control), otro grupo recibió exosomas derivados de MSC cultivadas 48 h en hipoxia y el último grupo recibió exosomas derivados de células MSC-HIF cultivadas durante 48 h en hipoxia.

3.14.2. Procedimientos quirúrgicos

3.14.2.1. El infarto agudo de miocardio

Las ratas se anestesiaron con anestesia inhalatoria Sevoflurano o Sevoflurano (2,5% v/v Abbott, Madrid, España) y se les inyectó intraperitonealmente Fentanilo (0,05 mg/Kg.) como analgésico. Los animales se colocaron en posición supina sobre una manta calefactora, se transiluminó la tráquea con una fuente de luz fría y se entubaron. Para comprobar la correcta entubación se constató la sincronía entre la expansión del pecho y los ciclos del ventilador. A partir de este momento la rata queda conectada al respirador (modelo 683, Harvard Apparatus), cuyos parámetros más importantes son un volumen tidal de 2.0 ml y un ritmo de respiración de 100 respiraciones por minuto.

Para la realización del infarto experimental, la rata se colocó en decúbito lateral derecho con la extremidad anterior izquierda en hiperextensión. A continuación se rasuró el hemitórax izquierdo y se preparó la zona quirúrgica asépticamente con betadine (Viatris Manufacturing) para la realización de una toracotomía lateral en el 4º espacio intercostal izquierdo. Para ello se realizó una incisión cutánea de dos centímetros y tras la disección de los músculos pectorales e intercostales (estos últimos cranealmente a la costilla para evitar el paquete vascular que corre caudalmente a las mismas) se accedió a la cavidad torácica. Se colocó un separador de Weitlaner con el que se consiguió un buen campo quirúrgico y con una torunda embebida en suero salino fisiológico se retiraron con delicadeza el timo cranealmente y el

lóbulo pulmonar dorsalmente. Consecutivamente, con ayuda de dos pinzas de microcirugía, se realizó una pericardiotomía permitiendo visualizar la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Inmediatamente se procedió a la oclusión de la misma mediante ligadura permanente con sutura de monofilamento no reabsorbible de 7/0 (Premilene, Braun). El cambio inmediato de coloración de la zona infartada (a un color azulado) permitió verificar que la técnica se había realizado de manera adecuada. Seguidamente se realizó el trasplante intramiocárdico con 20 μ l de PBS o 20 μ l de una suspensión de exosomas (provenientes de MSC o MSC-HIF cultivadas durante 48 h en hipoxia) con una concentración de 2 μ g/ μ l de proteína exosomal, con lo cual se inyectó un total de 40 μ g de exosomas por rata. Para ello se realizaron 3 inyecciones de 7 μ l en tres puntos diferentes del borde del infarto con una jeringuilla Hamilton de 25 μ l (Tecnokroma). Por último se procedió al cierre del tórax por capas (unión costilla costilla, planos musculares y sutura intradérmica) con sutura de monofilamento reabsorbible de 3/0 (Monosyn, Braun) y se limpió la herida con betadine. La rata despertó tras unos minutos desde la retirada del agente anestésico.

3.14.3. Parámetros de función cardíaca

La ecocardiografía es una prueba fundamental para ver la evolución de la función cardíaca en el tiempo. Con ella se obtiene información muy detallada, en tiempo real, de la morfología cardíaca. Además, es una técnica no invasiva y de bajo coste.

Para realizar la ecografía, se realizó la anestesia inhalatoria de la rata con mascarilla (Sevorane 2% v/v). Tras la colocación en decúbito supino, se rasuró el hemitórax izquierdo hasta el esternón, por donde se adquirieron las imágenes. En este estudio se utilizó el ecógrafo General Electric modelo Vivid 5 equipado con una sonda lineal de 10 MHz. El protocolo para la toma de imágenes ecocardiográficas fue el siguiente: se efectuó un día antes de la realización del infarto (*función cardíaca basal*) y 15 días post-infarto (*función cardíaca post-IAM*). El estudio ecocardiográfico en cada uno de los tiempos anteriormente comentados constaba de una ecocardiografía transtorácica en el eje corto (corte transversal del corazón a nivel de los músculos papilares) incluyendo la toma de imágenes tanto en modo-M (imagen lineal a la que se le ha introducido la variable tiempo) como 2D (imagen bidimensional en tiempo real). Los parámetros funcionales se calcularon en tres ciclos cardíacos consecutivos utilizando métodos estándares. En el modo-M se midieron el diámetro del ventrículo izquierdo (DVI), el grosor de la pared anterior (GPA) y el grosor de la pared posterior (GPP) tanto en diástole como en sístole (Figura 20). En las imágenes 2D se midió el área interna del ventrículo izquierdo (AVI) en diástole y en sístole.

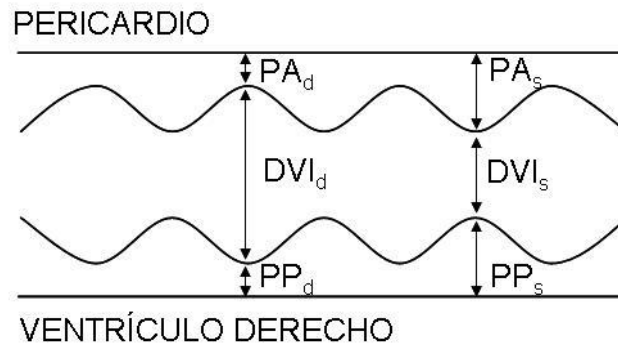


Figura 20 - Esquema representativo de una imagen modo-M donde se indican los diferentes parámetros a medir: PA_d , grosor pared anterior en diástole; DVI_d , diámetro ventrículo izquierdo en diástole; PP_d , grosor pared posterior en diástole; PA_s , grosor pared anterior en sístole; DVI_s , diámetro ventrículo en sístole; PP_s , grosor pared posterior en sístole.

A partir de estas medidas se calcularon los siguientes parámetros:

- Cambio Porcentual de Área (CPA):

$$\left[\frac{(AVI_d - AVI_s)}{AVI_d} \right] \times 100 \quad \text{donde:}$$

AVI_d : área ventrículo izquierdo diastólico.

AVI_s : área ventrículo izquierdo sistólico.

- Fracción de Acortamiento (FA):

$$\left[\frac{(DVI_d - DVI_s)}{DVI_d} \right] \times 100 \quad \text{donde:}$$

DVI_d : diámetro ventrículo izquierdo diastólico.

DVI_s : diámetro ventrículo izquierdo sistólico.

- Engrosamiento de la Pared Anterior (EPA):

$$(PA_s - PA_d - 1) \times 100 \quad \text{donde:}$$

PA_s : dimensión pared anterior en sístole

PA_d : dimensión pared anterior en diástole

3.14.4. Eutanasia

En los tiempos indicados los animales se sacrificaron por sobredosis de Tiopental (60 mg/Kg.) y Fentanilo (0,05 mg/Kg.) administrados mediante inyección intraperitoneal.

3.15. Análisis estadístico

Todos los datos de los experimentos realizados están expresados como media \pm desviación estándar (DS) o error estándar (ES). Se comprobó la normalidad de las distribuciones de las variables con el test de Kolmogorov-Smirnov y se estudiaron las diferencias de medias para parámetros cuantitativos mediante la aplicación del test de la t de Student para comparación de dos medias. Los análisis fueron realizados con los programas SPSS 9.0 y Graphpad 5. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con $p < 0,05$, con un intervalo de confianza del 95%.

4. Resultados

Resultados

En el presente trabajo se estudiaron por separado dos fenómenos celulares que involucran a los exosomas como mecanismo de comunicación intercelular, por lo cual los resultados se dividieron en dos secciones:

Sección A: Contenido de miRNA en exosomas de MSC y MSC-HIF

Sección B: Comunicación intercelular entre cardiomiocitos y endotelio mediada por exosomas

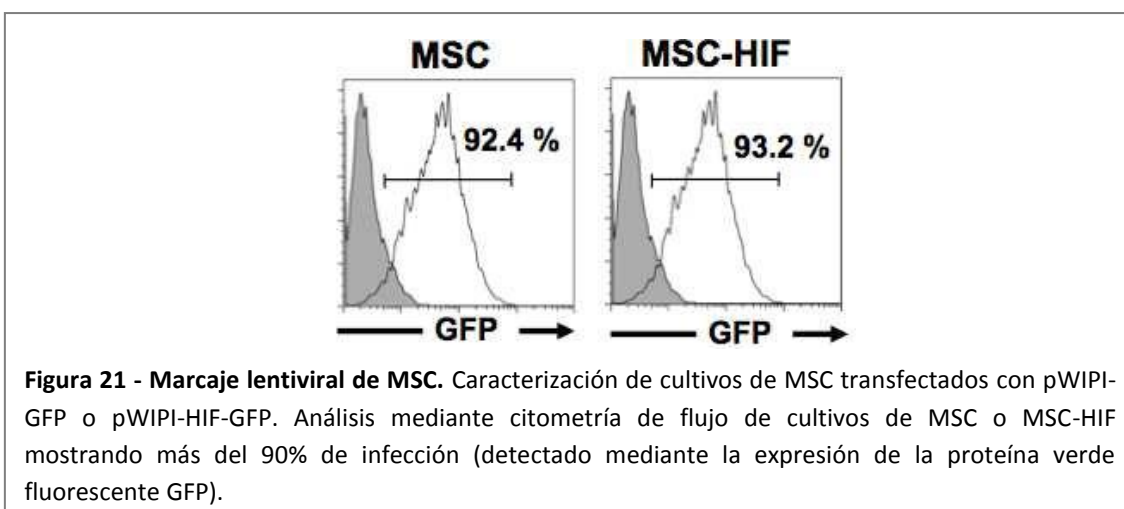
4. Resultados

Sección A: Estudio del contenido de miRNA en exosomas derivados de cultivos de MSC y MSC-HIF

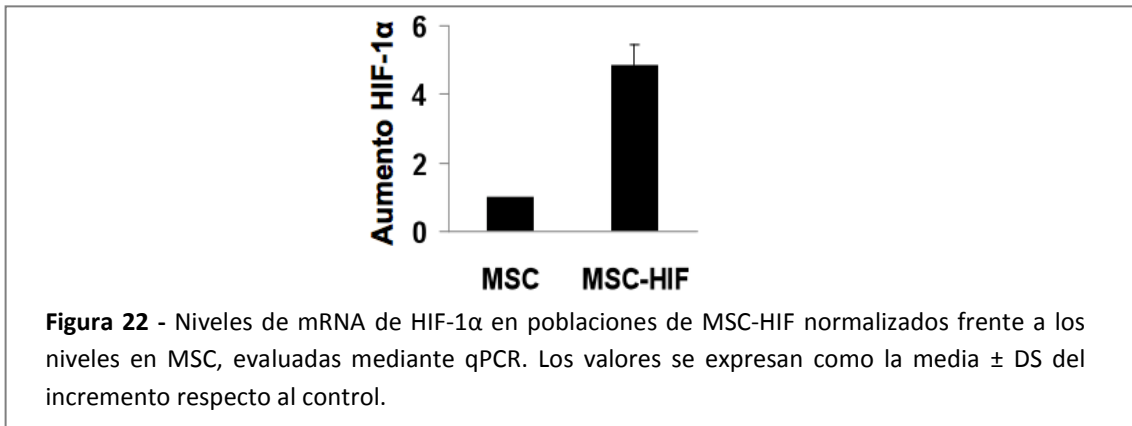
4.1. Las MSC transfectadas con pWIPI-HIF-GFP sobreexpresan HIF-1 α

Es sabido que el preconditionamiento con hipoxia de las MSC induce supervivencia en estas células a través de la vía Akt e incrementa su potencial terapéutico (111). El factor inducible por hipoxia (HIFs) ha sido identificado como una molécula clave en la adaptación de las células a la situación de hipoxia (112). Entre los genes regulados por HIF-1 α se encuentran el VEGF, la eritropoyetina y la angiopoyetina (113).

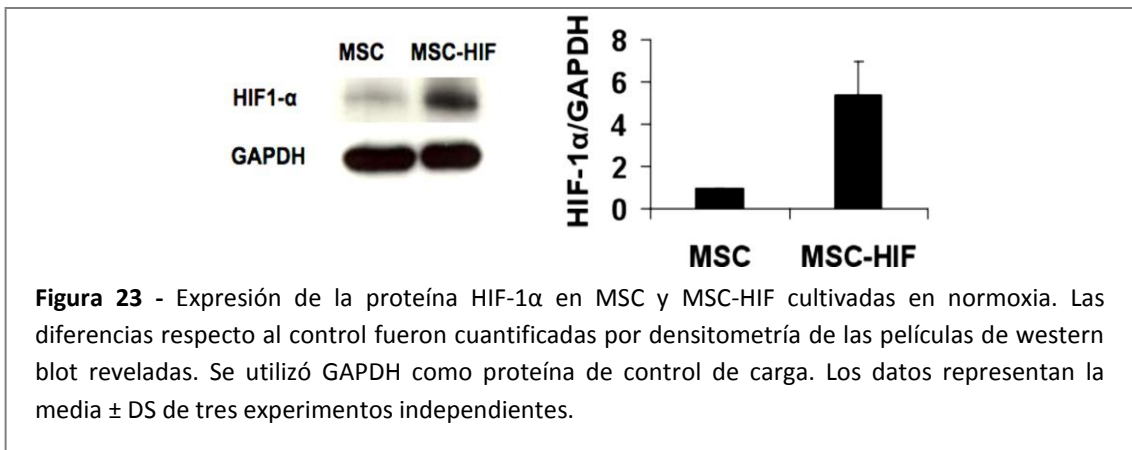
Las MSC fueron transfectadas con los vectores lentivirales pWIPI-GFP o pWIPI-HIF-GFP (en adelante denominadas MSC y MSC-HIF respectivamente). Tras dos ciclos de infección se analizó por citometría de flujo la expresión de la GFP en los cultivos, cuantificando así el grado de infección. El 90-95% de los cultivos celulares fueron GFP positivos (Figura 21).



Una vez comprobado que los cultivos poseían fluorescencia verde, lo que indicaba que estaban transfectados, se procedió a la cuantificación por qPCR de los niveles de mRNA para el gen HIF-1 α (Figura 22). Tras el análisis se observó que los niveles de mRNA de HIF-1 α estaban aumentados 4.88 ± 0.57 veces en las MSC-HIF con respecto a MSC.

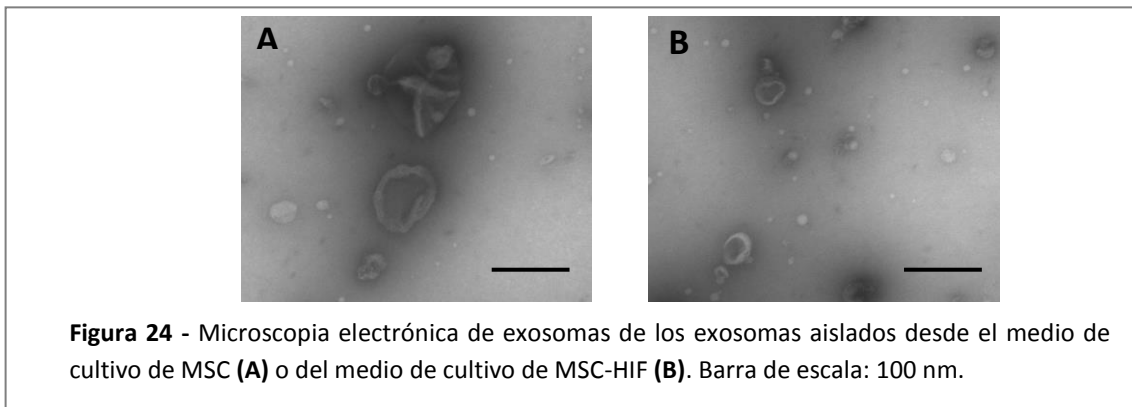


Por otra parte se analizó la estabilización de la proteína HIF-1 α en MSC-HIF frente a cultivos de MSC. Los cultivos MSC-HIF mostraron la expresión de la proteína HIF-1 α en normoxia (con un aumento de 5.4 ± 1.6 veces en MSC-HIF frente a MSC) (Figura 23).



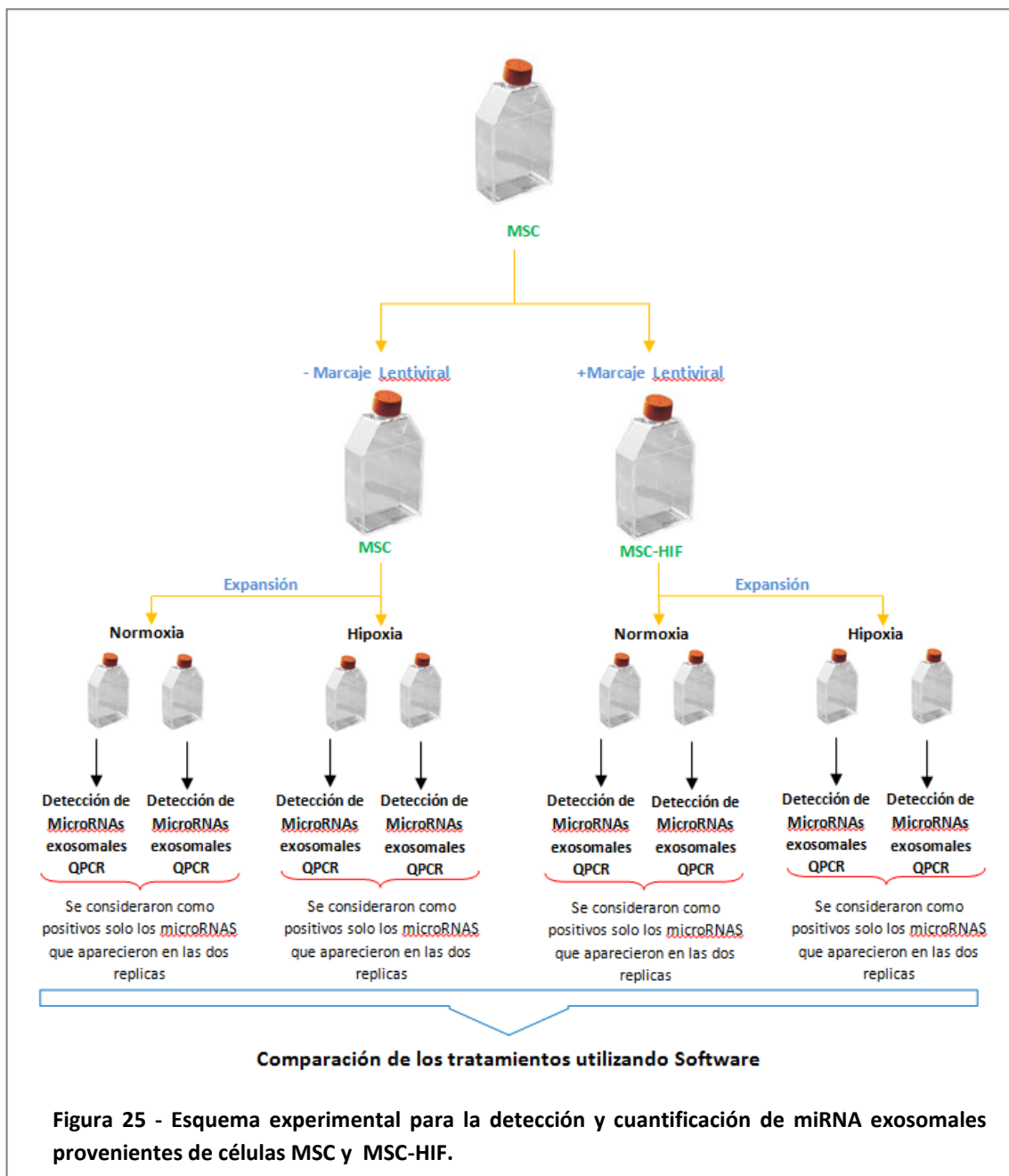
4.2. MSC y MSC-HIF liberan exosomas al medio de cultivo

Numerosos estudios previos han demostrado que las MSC en cultivo liberan exosomas al medio (114). Para confirmar el aislamiento de exosomas de MSC y MSC-HIF, las fracciones exosomales obtenidas a partir del medio de cultivo de MSC y MSC-HIF se analizaron por microscopía electrónica (Figura 24). Se observó que tanto MSC como MSC-HIF liberan al medio vesículas con el tamaño y la apariencia característica de los exosomas.

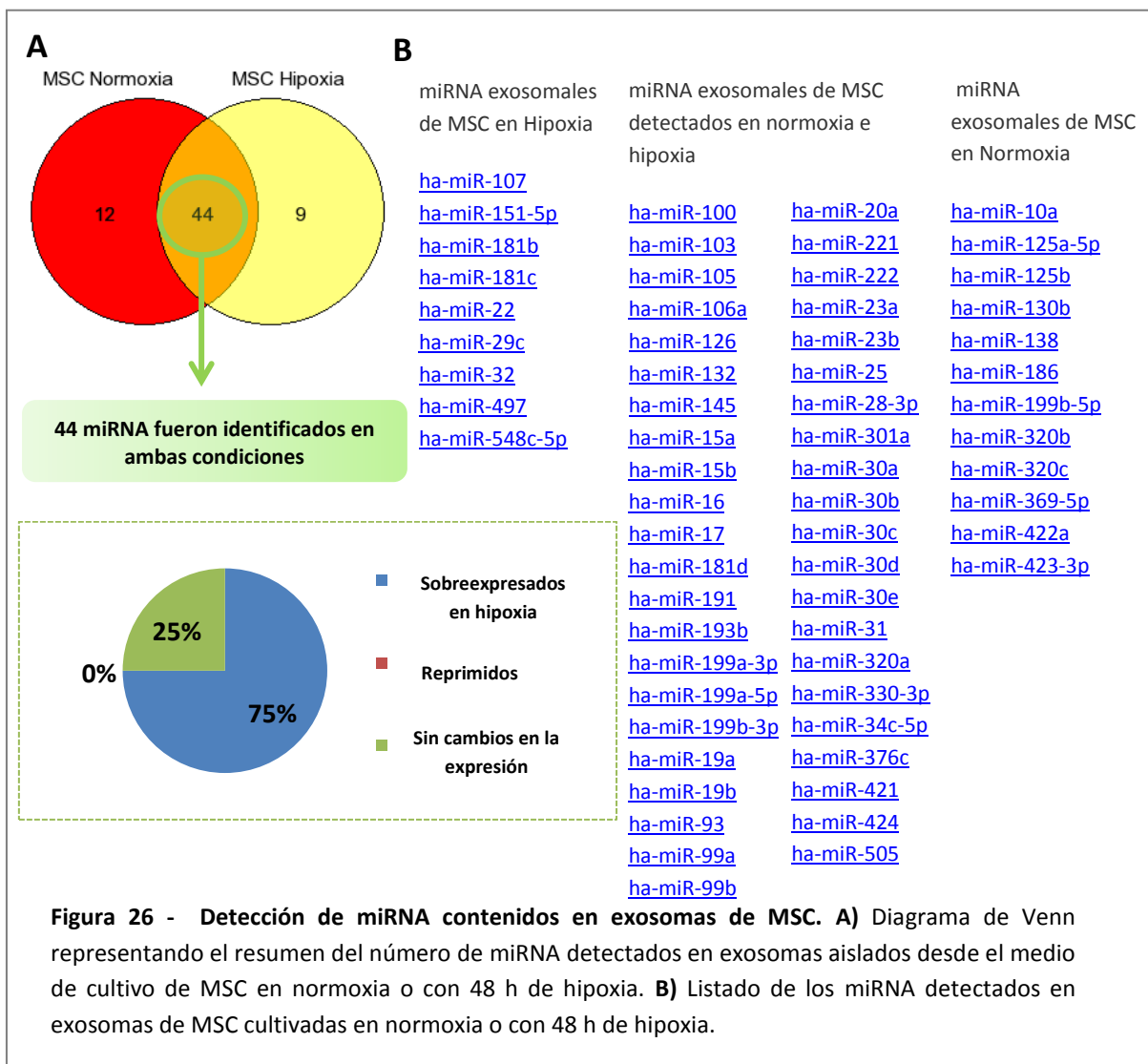


4.3. Análisis de miRNA contenidos en exosomas de MSC y MSC-HIF

Estudios previos han demostrado que las poblaciones de miRNA contenidas en los exosomas liberados por las células pueden variar dependiendo de las condiciones experimentales (115). En este trabajo se analizó mediante qPCR el contenido de miRNA presente en los exosomas liberados por MSC y MSC-HIF cultivadas en normoxia o hipoxia. Los experimentos se realizaron por duplicado, haciendo réplicas biológicas de cada condición. El siguiente esquema muestra el diseño experimental:

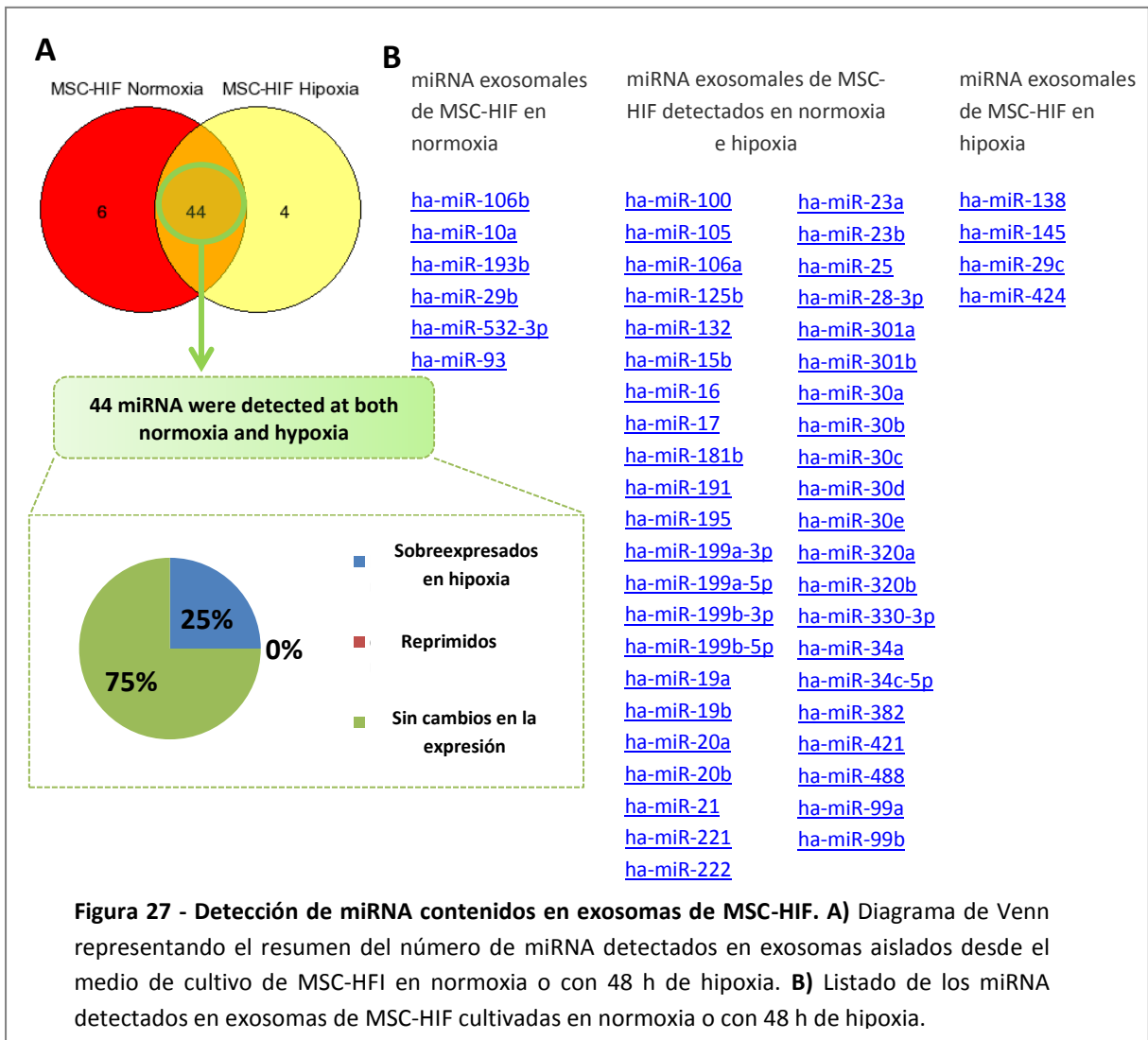


El resultado del análisis se muestra a continuación en las figuras 26 y 27.



La identificación de los miRNA contenidos en las 2 condiciones experimentales mostró que 12 miRNA eran exclusivos de los exosomas aislados de las MSC en normoxia mientras que 44 fueron identificados en las dos condiciones experimentales. Por otro lado se encontraron 9 miRNA que fueron exclusivos de la condición de hipoxia.

Utilizando el software “Free Analysis Software for Human 384 SeraMir qPCR Profiler array(.xls)”, se calculó la abundancia relativa de los 44 miRNA identificados en ambas condiciones. Se encontró que 33 de los 44 miRNA se aumentaban su abundancia relativa en hipoxia con un valor de incremento superior a 3 veces. Los 11 restantes miRNA permanecieron constantes. Es interesante destacar que ninguno de los 44 miRNA compartidos resultó reprimido en hipoxia.



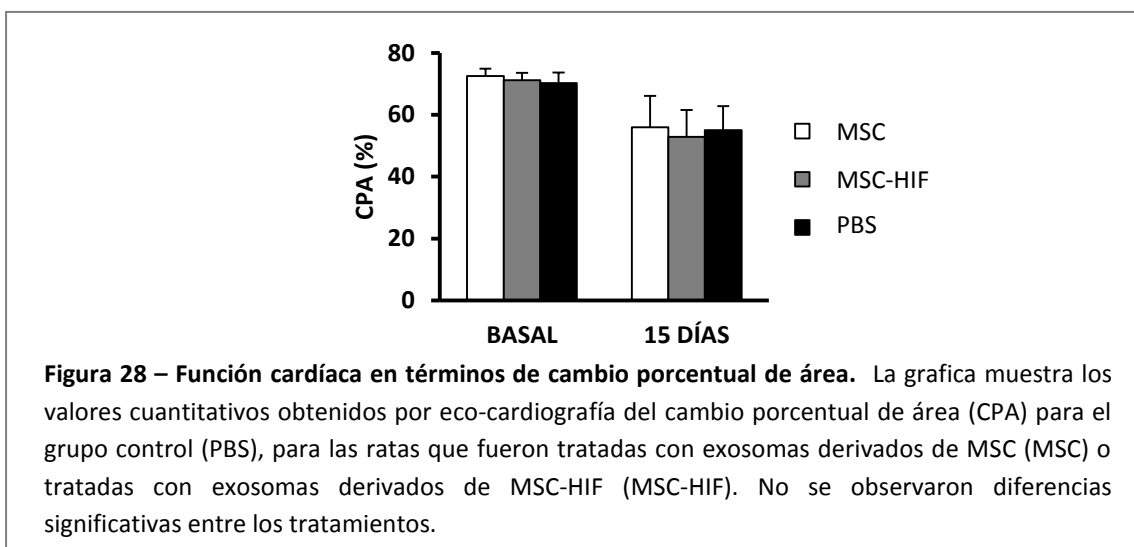
A continuación se realizó el mismo análisis para los exosomas aislados de las MSC-HIF. En normoxia se detectaron un total de 50 miRNA exosomales. De estos 50, 6 fueron exclusivos de exosomas de MSC-HIF en normoxia y 44 fueron compartidos con la condición experimental de hipoxia, mientras que 4 fueron exclusivos para la condición de hipoxia.

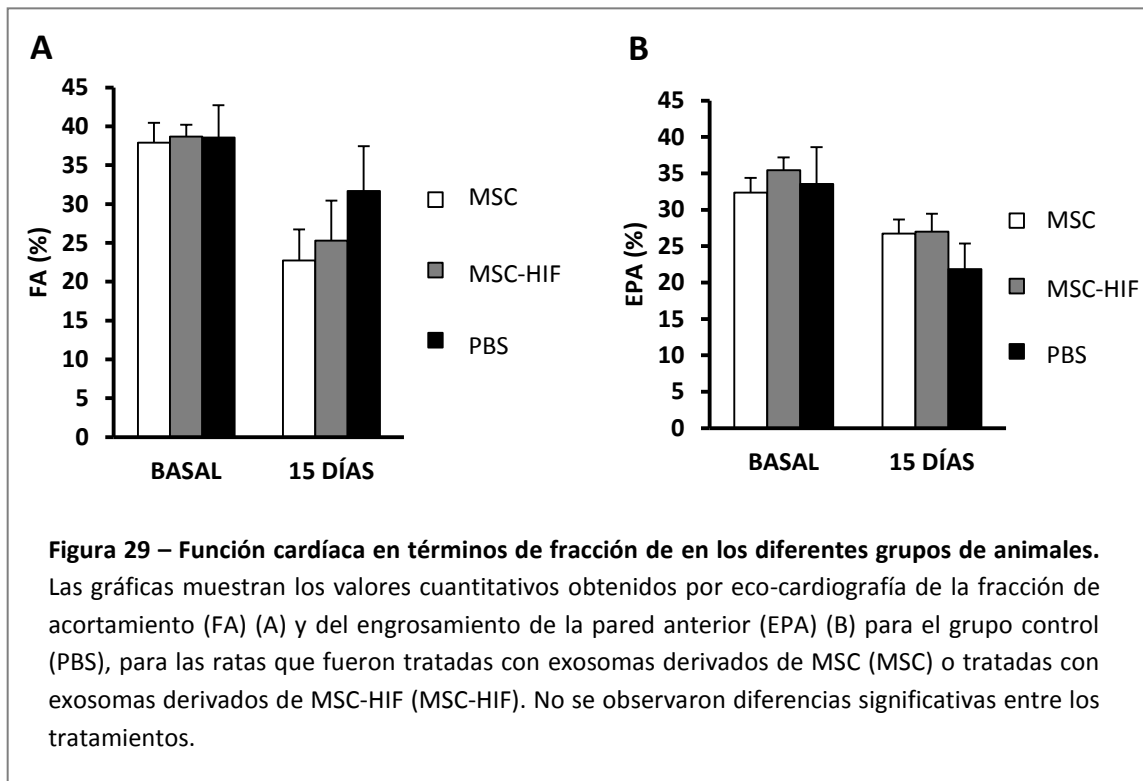
Utilizando el software “Free Analysis Software for Human 384 SeraMir qPCR Profiler array(.xls)”, se calculó la abundancia relativa de los 44 miRNA que se expresaban en ambas condiciones. Se observó que 33 de los 44 miRNA no variaron su expresión, mientras que los 11 restantes se up-regularon en más de 3 veces.

Es interesante destacar que la combinación de la sobreexpresión de HIF-1 α en las MSC-HIF junto con la condición hipóxica logró que los exosomas derivados de estas células se carguen con miRNA potencialmente terapéuticos. El paso siguiente fue probar si estos exosomas eran capaces de tener efectos terapéuticos en un modelo de IAM en rata.

4.4. Efecto de los exosomas derivados de MSC y MSC-HIF en un modelo de IAM en rata

Estudios previos han sugerido que los exosomas derivados de las MSC inyectados por vía venosa en un modelo de isquemia/reperfusión en ratón, tienen un efecto terapéutico al reducir la lesión causada por la isquemia/reperfusión (116). Teniendo en cuenta esta premisa y el dato obtenido en el presente estudio de que los exosomas derivados de MSC contenían miRNA potencialmente terapéuticos, se realizó un experimento para evidenciar el potencial terapéutico de los exosomas derivados de MSC y MSC-HIF en un ensayo funcional en el modelo de IAM en rata. Para ello se aislaron exosomas provenientes del medio de cultivo de células MSC y MSC-HIF tras incubarlas 48 h en hipoxia, y se inyectaron de manera intramiocárdica en ratas infatadas, tal como se describe en materiales y métodos. De esta manera se generaron 3 grupos experimentales, con 6 ratas cada uno, los cuales se llamaron grupo control (ratas que recibieron inyección de PBS), grupo MSC (ratas que recibieron inyección de exosomas derivados de MSC) y grupo MSC-HIF (ratas que recibieron inyección de exosomas derivados de MSC-HIF). Para cada grupo se monitorizaron parámetros cardíacos funcionales mediante eco-cardiografía antes (medidas basales) y 15 días después del IAM para evaluar el grado de recuperación funcional conseguido debido al trasplante de exosomas. Los resultados se muestran a continuación en la figura 28 y la figura 29.





Contrariamente a lo esperado, en términos generales no se observó una recuperación diferencial de los parámetros funcionales medidos en los animales tratados con exosomas con respecto a los controles. Es posible que la dosis no fuera la adecuada o que la permanencia de los exosomas en el sitio del implante fuera demasiado breve. Así pues, se decidió no continuar con este tipo de experimentos y centrarnos en los mecanismos celulares desencadenados por los exosomas en estudios *in vitro*.

Resultados

Sección B: Comunicación intercelular entre cardiomiocitos y endotelio mediada por exosomas

4.5. El ayuno de glucosa incrementa la síntesis y la secreción de exosomas de cardiomiocitos neonatales de rata

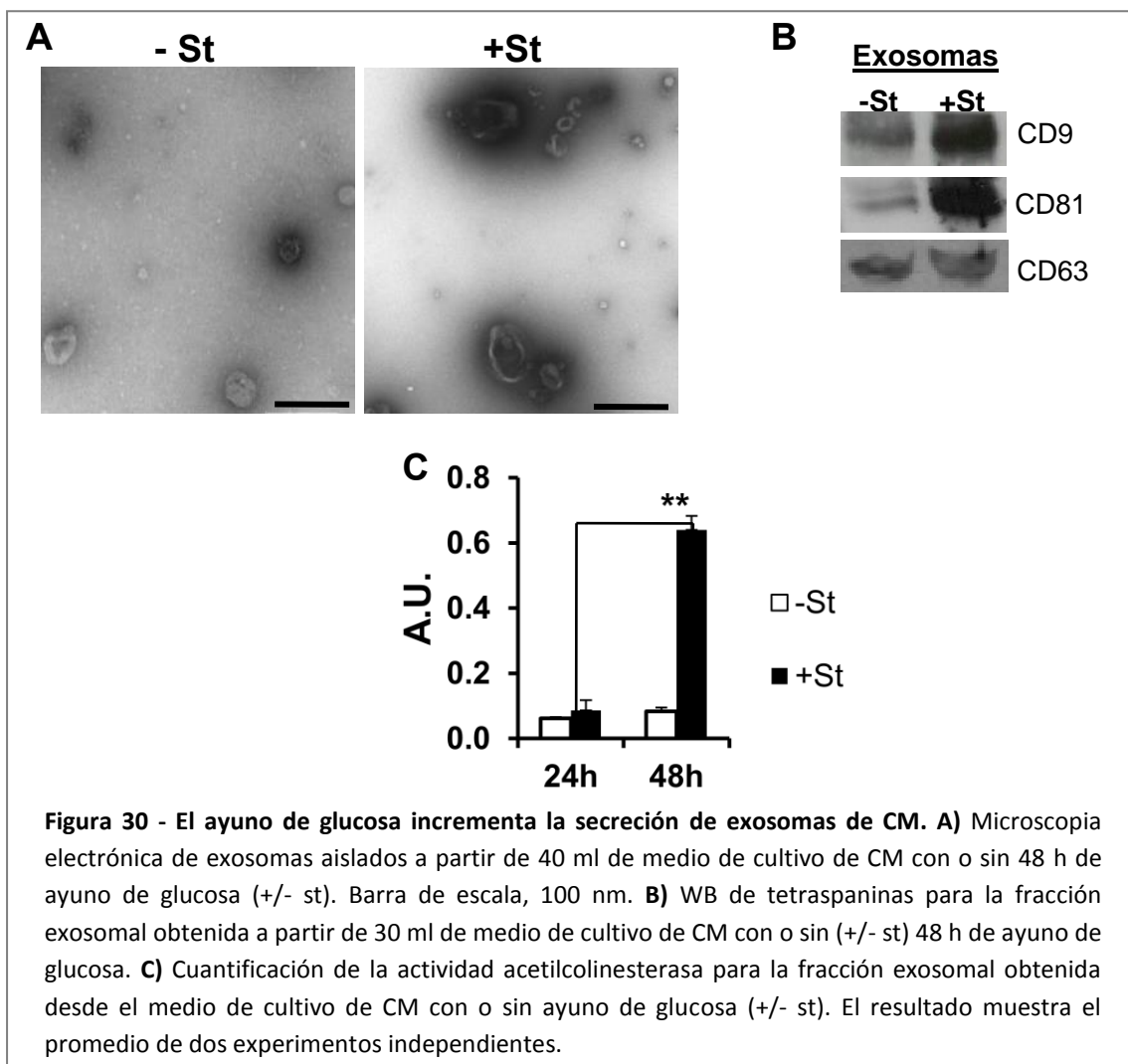
Trabajos recientes han descrito que los cardiomiocitos son capaces de producir exosomas que pueden interactuar con células diana alterando su actividad transcripcional mediante la transferencia de ácidos nucleicos (117). Así también, en relación con los mecanismos que regulan la síntesis y secreción de los exosomas, hay trabajos que vinculan el estrés celular con el incremento de la secreción de exosomas (118). Con el fin de estudiar, en un contexto metabólico, como se regula la síntesis y secreción de exosomas en células cardiacas, en el presente trabajo se sometió a ayuno de glucosa a cultivos de cardiomiocitos neonatales de rata y se estudió la síntesis y secreción de exosomas.

4.5.1. El ayuno de glucosa incrementa la secreción de exosomas de un cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata

Para analizar la abundancia relativa de exosomas liberados por células cardiacas, en el presente trabajo se analizaron por microscopia electrónica las fracciones exosomales obtenidas a partir de la misma cantidad (40 ml) de medio de cultivo de cardiomiocitos sometidos o no a ayuno de glucosa (+St y -St) (FIG. 1A). Empleando esta técnica se observó la presencia de vesículas con la apariencia y el tamaño característico de los exosomas (30-100 nm). Al comparar los extractos de exosomas obtenidos de las dos condiciones se observó mayor abundancia relativa de vesículas en las fracciones exosomales provenientes del medio de cultivo de cardiomiocitos con 48 h de ayuno de glucosa.

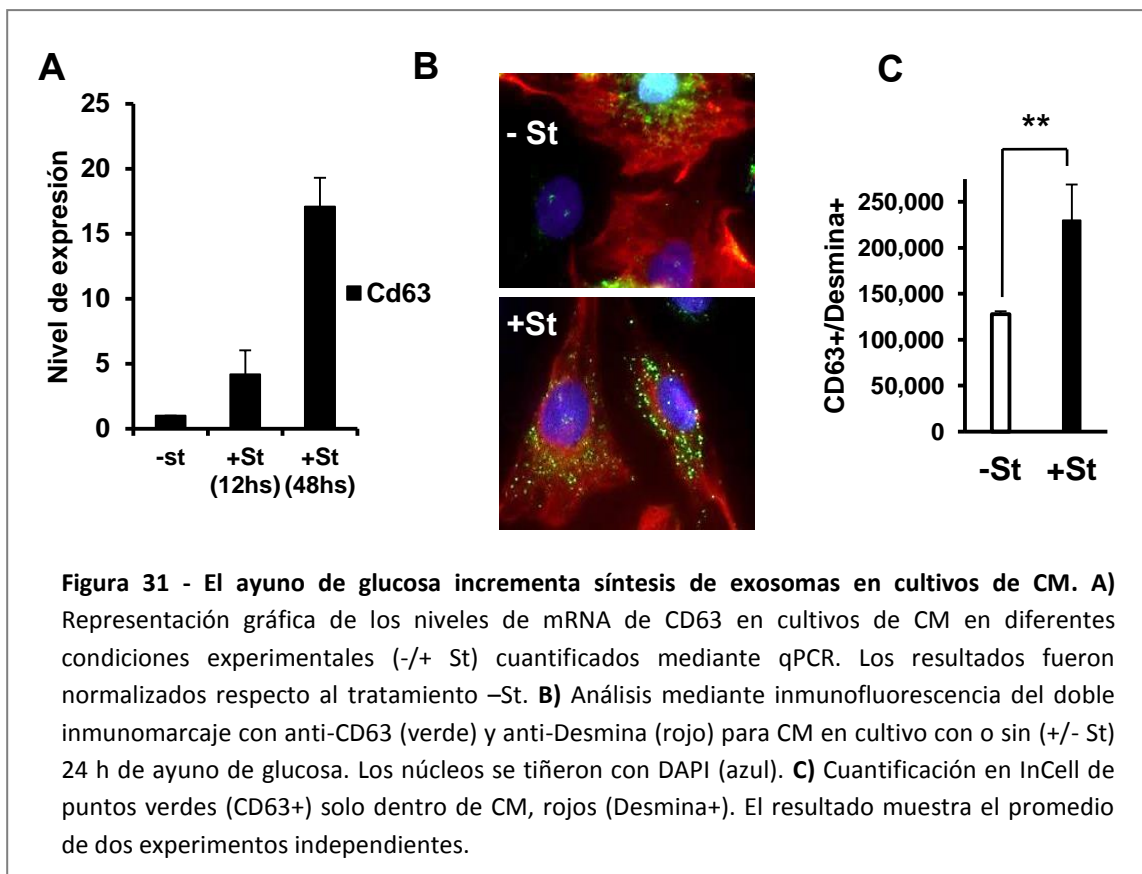
Con el fin de caracterizar y cuantificar las vesículas obtenidas desde medio de cultivo se emplearon anticuerpos contra marcadores específicos de exosomas. Los exosomas poseen abundantes cantidades de tetraspaninas y aunque estas moléculas se encuentran presentes en otras estructuras celulares, cuando son detectadas en la fracción celular secretada al medio de cultivo se asocian a los exosomas. Entre las tetraspaninas destacan las CD9, CD63 y CD81. Así, para cuantificar la cantidad de exosomas liberados al medio de cultivo en las diferentes

condiciones experimentales (-St y +St) se analizaron por Western Blot las fracciones exosomales procedentes de 30 mL de medio de cultivo de las condiciones +St y -St con anticuerpos específicos frente a dichas tetraspaninas. Se observó que tras 48 h de ayuno de glucosa se producía un incremento en la cantidad de tetraspaninas detectables por WB, lo que sugirió nuevamente un aumento en la secreción de exosomas al medio por parte de los cardiomiocitos. Otra de las formas descritas previamente para la caracterización y cuantificación de los exosomas es la medida de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (106). Esta enzima está presente en los exosomas, por lo que su actividad puede utilizarse para evaluar de manera comparativa la cantidad de exosomas presentes en extractos obtenidos en distintas condiciones de cultivo. Así pues se ensayó la actividad acetilcolinesterasa en la fracción exosomal obtenida a partir de la misma cantidad de medio de cultivo de CM con o sin (+St o -St) ayuno de glucosa (Figura 30, C). El resultado indicó un marcado incremento de la actividad enzimática para 48 h de ayuno de glucosa (0.69 ± 0.05 en +St vs 0.14 ± 0.01 en -St; $P < 0.01$, $n=6$), lo que sugirió una vez más que el ayuno de glucosa incrementa la secreción de exosomas de los cardiomiocitos.



4.5.2. El ayuno de glucosa incrementa la síntesis de exosomas de un cultivo de CM neonatales de rata

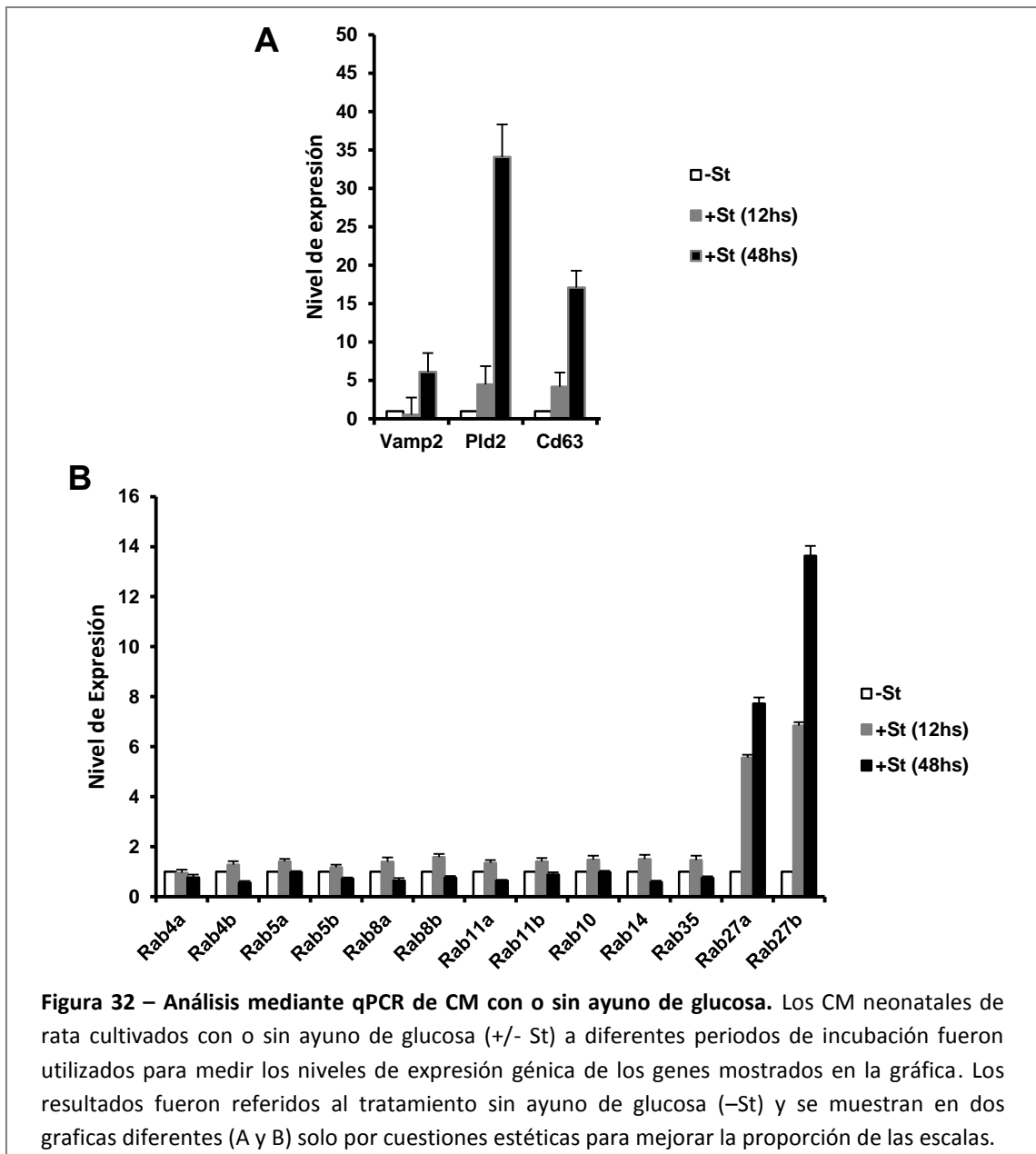
Con el objeto de profundizar en la observación de que el ayuno de glucosa aumenta la secreción en un cultivo de CM neonatales de rata, se decidió hacer una serie de experimentos para ver si este fenómeno correlacionaba con un aumento de síntesis de exosomas por parte de las células en estudio. Para evaluar la síntesis de proteínas específicas de exosomas, en primer lugar se midió el nivel de expresión del mRNA de CD63 mediante qPCR (Figura 31, A). Se observó que el ayuno de glucosa producía una sobreexpresión del mRNA de CD63. A continuación se diseñó un ensayo para medir la producción de proteínas específicas de exosomas (CD63) en CM. Se realizó un doble inmunomarcaje con anti-Desmina (rojo) y anti-CD63 (verde) a cultivos de CM en las diferentes condiciones experimentales (+/- st) (Figura 31, B) ya que la desmina es una de las proteínas de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los CM. A continuación se cuantificó utilizando en InCell Analyzer la cantidad de fluorescencia verde proveniente del marcaje para CD63, solo en las células Desmina+ (Figura 31, C). El resultado de la cuantificación mostró que CM con 24 h de ayuno de glucosa sintetizan más CD63 en comparación con CM sin ayuno de glucosa ($229,990 \pm 38,747$ en +St vs $127,661 \pm 3,234$ en -St; $P < 0.01$. $n=3$).



4.5.3. El ayuno de glucosa en CM incrementa la actividad transcripcional de genes relacionados con el tráfico vesicular y las vías secretoras

Estudios previos han relacionado la actividad transcripcional de varios genes con las rutas secretoras celulares y el tráfico vesicular intracelular (92). En el presente trabajo se analizó la actividad de estos genes en cultivos de cardiomiocitos sometidos o no a ayuno de glucosa (+/-st) (Figura 32, A-B). En relación con los resultados previos obtenidos, se observó una sobreexpresión general de estos genes cuando se sometieron los cultivos a ayuno de glucosa. La Fosfolipasa D (PLD) es una enzima que hidroliza la fosfatidilcolina para obtener colina y ácido fosfatídico (PA), el cual actúa como segundo mensajero implicado en procesos como exocitosis, endocitosis y es un activador directo de varias proteínas, como por ejemplo mTOR (119). Se ha descrito que la Fosfolipasa D2 (PLD2) está presente en exosomas y su actividad está relacionada con la cantidad de exosomas liberados por las células (120). El miembro 1 del complejo receptor Golgi SNAP (Gors1), es una proteína de tráfico de membranas encargada de transportar proteínas entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (121). Está considerada como un componente esencial del complejo receptor Golgi SNAP (SNARE). La proteína de membrana 2 asociada a vesículas (VAMP2) es una proteína del complejo SNARE involucrada en el tráfico intracelular de GLUT4 (122). El péptido natriurético auricular (NPPA), también conocido como ANF, es un péptido hormonal producido y secretado mayormente por cardiomiocitos auriculares. NPPA es fundamental para la regulación de la presión sanguínea porque promueve la natriuresis y la vasodilatación (123, 124). Se ha descrito que GLUT4 es capaz de ingresar en los gránulos de la vía secretora de NPPA a nivel del retículo del trans-Golgi (TGR) en cardiomiocitos auriculares de rata (125). Así también, estudios previos han relacionado a VAMP2 con la liberación de NPPA y el tráfico de GLUT4 (126, 127). En el presente trabajo se observó un notable incremento a nivel de expresión génica de todos estos genes en los CM cuando se trataron los cultivos con medios sin glucosa (+St).

Las Rabs GTPasas son una gran familia de pequeñas GTPasas que controlan el tráfico vesicular intercelular (1). En particular, Rab27a y Rab27b controlan diferentes etapas del proceso de secreción de exosomas (128). En este trabajo se observó un aumento de la actividad transcripcional de Rab27a y Rab27b en los CM cuando se trataron los cultivos con medios sin glucosa (+St).



4.6. Análisis de la transferencia de exosomas desde CM hacia células endoteliales

Numerosos estudios han planteado la transferencia de exosomas entre las células como un mecanismo de comunicación intercelular (92). En el presente trabajo se planteó que las señales de estrés inducidas en los cardiomiocitos por el ayuno de glucosa podrían generar una respuesta mediada por exosomas dirigida desde los CM hacia las ECs, que son las responsables de realizar el transporte de combustibles metabólicos desde la sangre hacia los cardiomiocitos. Para estudiar dicho proceso se realizaron los experimentos que se describen a continuación.

4.6.1. Caracterización de cultivos primarios de células endoteliales

En el presente estudio se realizó el aislamiento de células endoteliales a partir de explantes de aorta de rata o ratón RFP.

4.6.1.1 Caracterización de células endoteliales primarias de rata

La aorta de neonatos de rata se diseccionó en segmentos de aproximadamente 1 mm³ y se colocó sobre placas de cultivo previamente tratadas con Matrigel. Luego se agregó medio de cultivo y al cabo de 24-48 h se observó el crecimiento de tubos a partir de los explantes, característicos del crecimiento de células endoteliales (Figura 33).

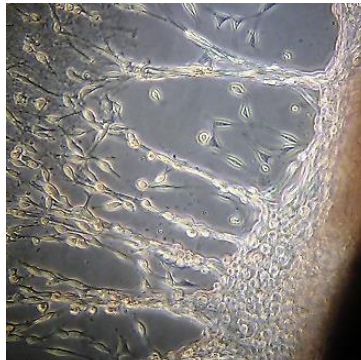


Figura 33 - Cultivo de endotelio primario de rata neonato. Formación de tubos a partir de explantes de tejido aórtico.

El RECA1 es un anticuerpo que reacciona específicamente contra antígenos de superficie de células endoteliales de rata. Para confirmar la presencia de células endoteliales en los cultivos primarios se realizó el inmunomarcaje con anti-RECA1 (rojo) de las células (Figura 34). Se observó marcaje RECA1+ de los cultivos, lo que confirmó la presencia de células endoteliales de rata.

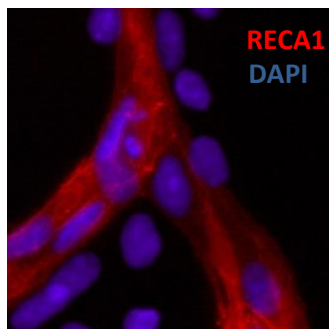


Figura 34 - Cultivo de endotelio primario de rata neonato. Inmunomarcaje con anti-RECA1 (rojo). DAPI en azul.

4.6.1.2. Caracterización de células endoteliales primarias de ratón RFP

La aorta de neonatos de ratón RFP se diseccionó en segmentos de aprox. 1 mm³ y se colocó sobre placas de cultivo previamente tratadas con Matrigel. Luego se agregó medio de cultivo y al cabo de 24-48 h se observó el crecimiento de tubos a partir de los explantes, característicos del crecimiento de células endoteliales (Figura 35).

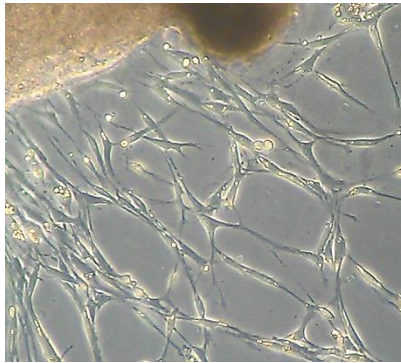


Figura 35 - Cultivo de endotelio primario de ratón RFP neonato. Formación de tubos a partir de explantos de tejido aórtico.

El antígeno CD31 (PECAM-1) es una glucoproteína transmembrana que media en la adherencia entre células endoteliales, lo que la convierte en un marcador distintivo de este tipo celular. Para confirmar la presencia de células endoteliales en los cultivos primarios se realizó el inmunomarcaje con anti-CD31 (verde) de las células (Figura 36). En los ratones transgénicos RFP, todas las células del ratón poseen fluorescencia roja, por lo que la superposición entre rojo y verde del marcaje anti-CD31 mostró células de color amarillo, lo que confirmó la presencia de células endoteliales de ratón.

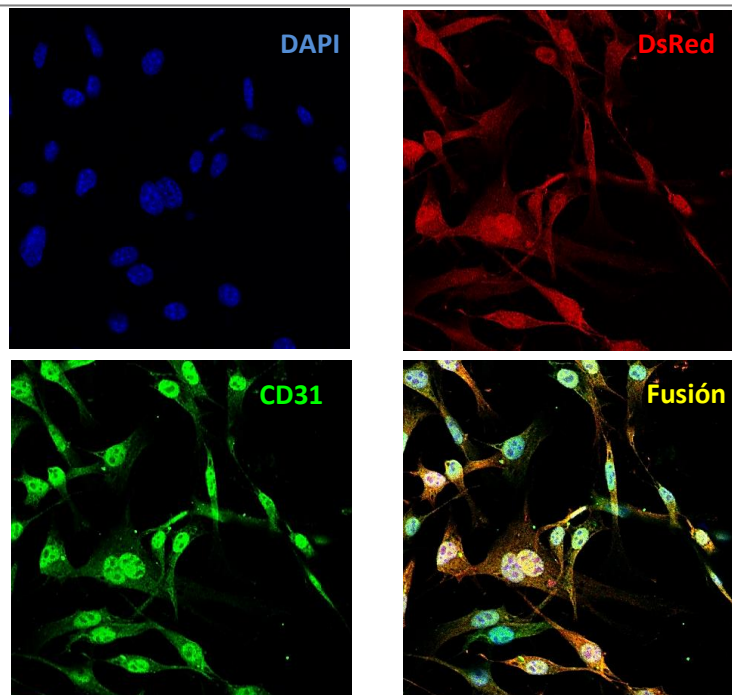
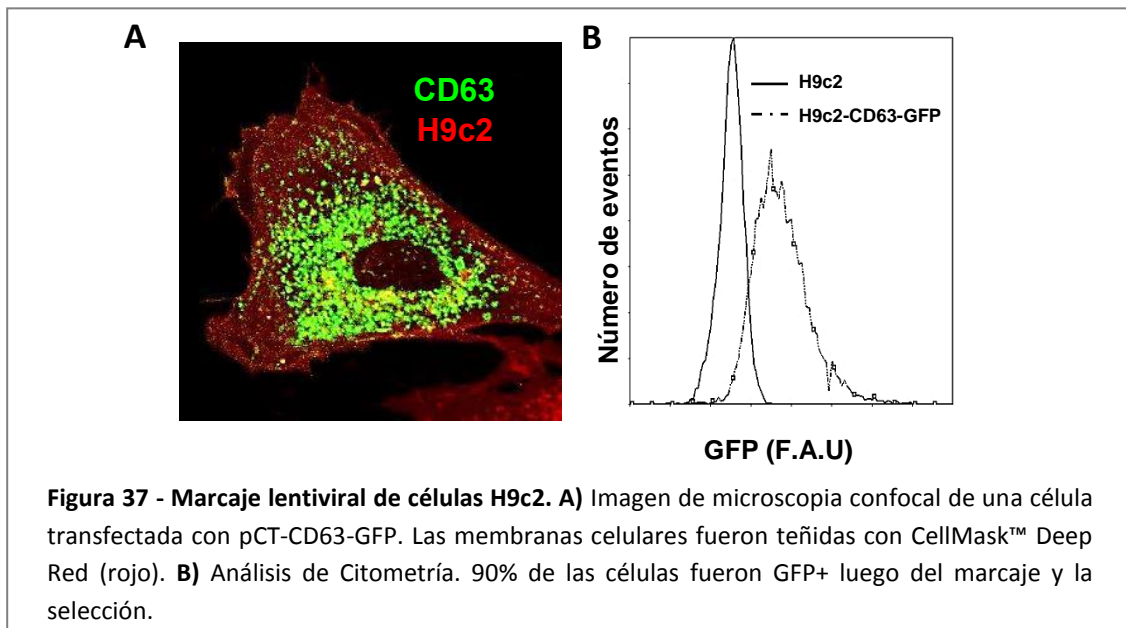


Figura 36 - Cultivo de endotelio primario de ratón RFP neonato. Inmunomarcaje con anti-CD31 (verde). DsRed (rojo). DAPI en azul.

4.6.2. Marcaje lentiviral de exosomas

Para realizar estudios de seguimiento del tráfico de exosomas en células cardíacas, se realizó el marcaje lentiviral de células H9c2, con el plásmido comercial pCT-CD63-GFP. Las células resultantes, denominadas H9c2-CD63-GFP, expresan el marcador exosomal CD63 fusionado a la proteína GFP (Figura 37, A). Tras la transfección de las células se realizó una selección con Puromicina y la eficiencia de la transfección se evaluó por citometría de flujo, lo que mostró un 90% de células GFP+ y por consiguiente CD63+ (Figura 37, B).



4.6.3. Comportamiento de células H9c2-CD63-GFP

En las células los exosomas se agrupan dentro de estructuras membranosas llamadas cuerpos multivesiculares (MVB), los cuales se desplazan por el citoplasma y se fusionan con la membrana plasmática para verter su contenido de exosomas hacia el exterior de la célula. Para visualizar el movimiento de los exosomas en las células cardíacas, se realizó un experimento de microscopia confocal de paso de tiempo (time lapse) de un cultivo de H9c2-CD63-GFP. Las células cardíacas se visualizaron mediante la tinción de sus membranas celulares con el colorante vital CellMask™ Deep Red (rojo) (Figura 38). En condiciones de ayuno de glucosa, se observó el agrupamiento de exosomas CD63-GFP dentro de estructuras lipídicas que se desplazan por el citoplasma, lo que sugirió que el modelo H9c2-CD63-GFP era adecuado para estudiar el tráfico de exosomas.

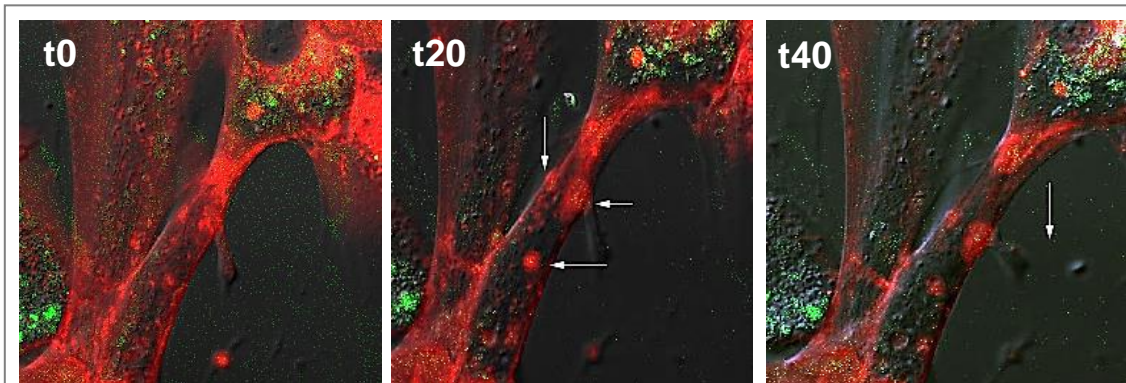


Figura 38 - Microscopia confocal “time-lapse”. Células H9c2-CD63-GFP fotografiadas en modo “time lapse” tras 24 h de ayuno de glucosa. Las membranas fueron teñidas con CellMask™ Deep Red (rojo). En el panel central las flechas indican el agrupamiento de exosomas CD63-GFP (verdes) dentro de estructuras membranosas (rojas). En el panel de la derecha la flecha indica la dirección de desplazamiento de las agrupaciones de exosomas. t, tiempo en minutos.

4.6.4. Transferencia de Exosomas desde células cardiacas hacia células endoteliales

Para estudiar el posible tráfico de exosomas desde células cardiacas hacia células endoteliales, se realizó un estudio de microscopia confocal de paso de tiempo de un co-cultivo entre H9c2-CD63-GFP y células endoteliales de ratón RPF (rojas) (Figura 39). Las imágenes mostraron que en condiciones de ayuno, células H9c2-CD63-GFP fueron capaces de enviar exosomas CD63-GFP (verdes) hacia las células endoteliales (rojas). Se observó que una vez internalizados en el endotelio, los exosomas provenientes de las H9c2 podían reagruparse, desplazarse y volver a separarse.

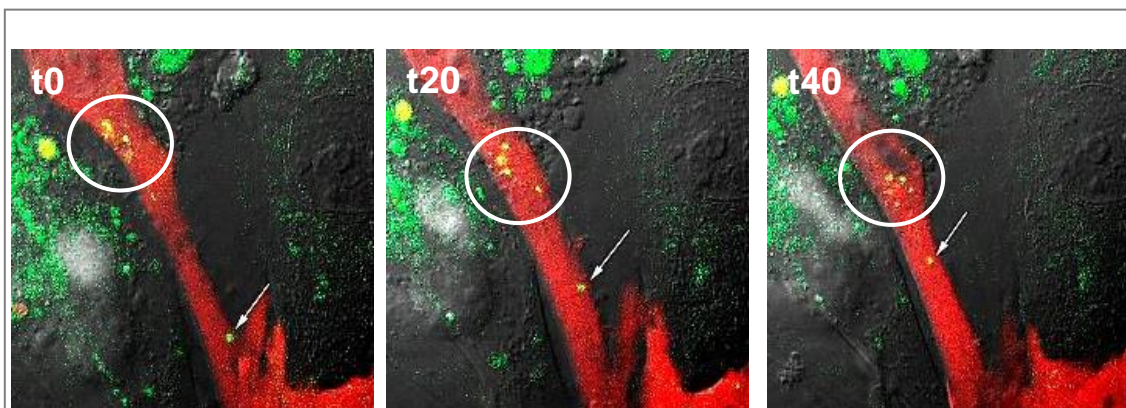
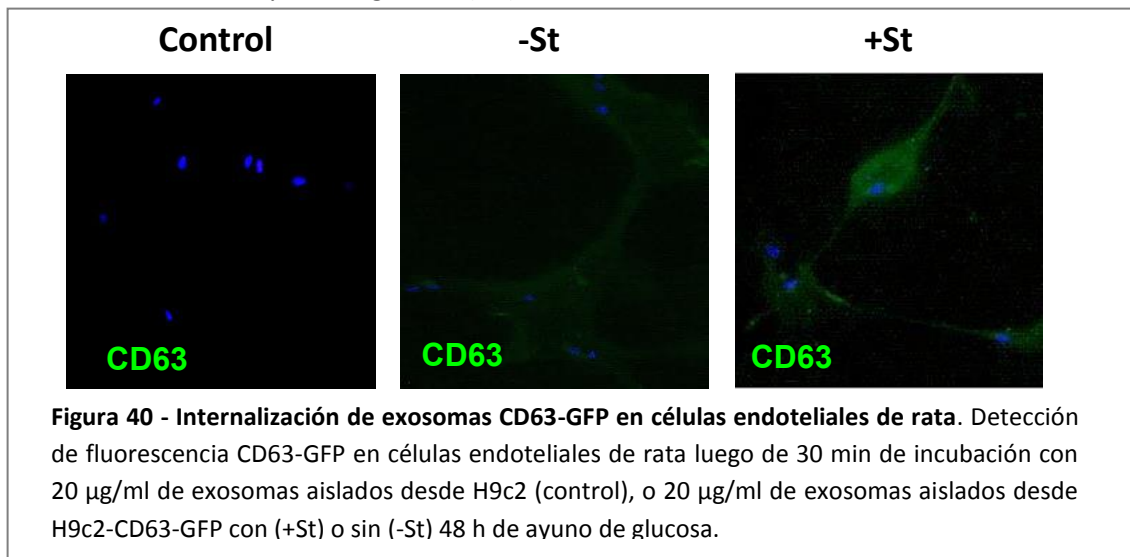


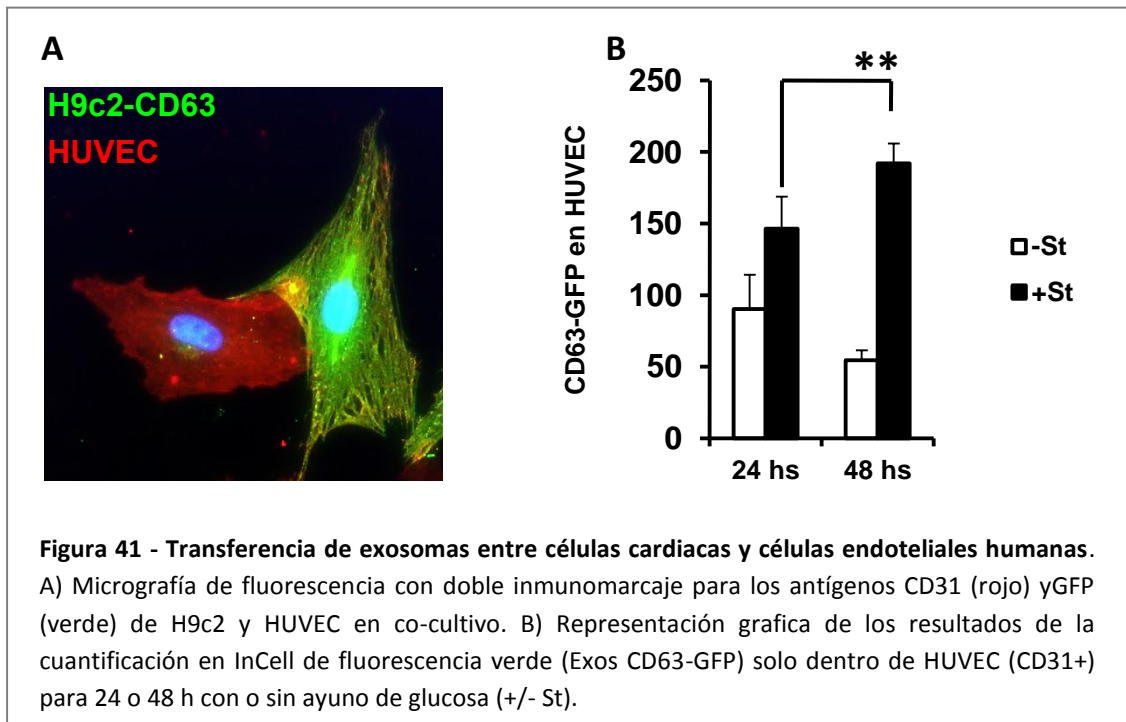
Figura 39 - Microscopia confocal “time-lapse”. Co-cultivo entre células H9c2-CD63-GFP y células endoteliales de ratón (rojas) tras 24 h de ayuno de glucosa. El círculo blanco señala la presencia de exosomas CD63-GFP provenientes de las H9c2-CD63-GFP dentro de la célula endotelial a diferentes tiempos. Las flechas indican el desplazamiento de una agrupación de exosomas CD63-GFP dentro de la célula endotelial. t, tiempo en minutos.

Alternativamente se analizó la internalización de exosomas derivados de células cardiacas en cultivos primarios de células endoteliales de rata. Para ello se agregaron 20 µg/ml de

exosomas provenientes del medio de cultivo de células H9c2-CD63-GFP con o sin 48 h de ayuno de glucosa (+/- St) a un cultivo primario de células endoteliales de rata (Figura 40). Tras 30 min de incubación se detectó la presencia de fluorescencia GFP en las células endoteliales. Es interesante destacar que, aunque se agregó la misma cantidad de exosomas, se observó mayor intensidad de fluorescencia verde cuando los exosomas provenían de H9c2-CD63-GFP cultivadas en condiciones de ayuno de glucosa (+St) que cuando los exosomas provenían de medio de cultivo sin ayuno de glucosa (-St).



En la sección 4.5 se demostró que el ayuno de glucosa en CM induce señales que provocan un incremento en la síntesis y secreción de exosomas. En consecuencia, se puso a punto un ensayo para cuantificar el tráfico de exosomas desde células cardíacas hacia células endoteliales en condiciones de ayuno o no de glucosa. Para ello, se realizó un co-cultivo entre células H9c2-CD63-GFP y células HUVEC. El co-cultivo se sometió a las diferentes condiciones experimentales durante 24 o 48 h y se realizó un doble inmunomarcado con anti-GFP (verde) y anti-CD31 (Figura 41, A). A continuación se cuantificó con un análisis mediante InCell la cantidad de estructuras verdes (Exos CD63-GFP) que se encontraban solo dentro de células HUVEC (CD31+, rojo) (Figura 41, B). El análisis mostró un incremento significativo de exosomas CD63-GFP en HUVEC tras de 48 h de ayuno de glucosa ($54,48 \pm 7,04$ en -St versus $192,07 \pm 13,82$ en +St; $P < 0,001$. n=4).

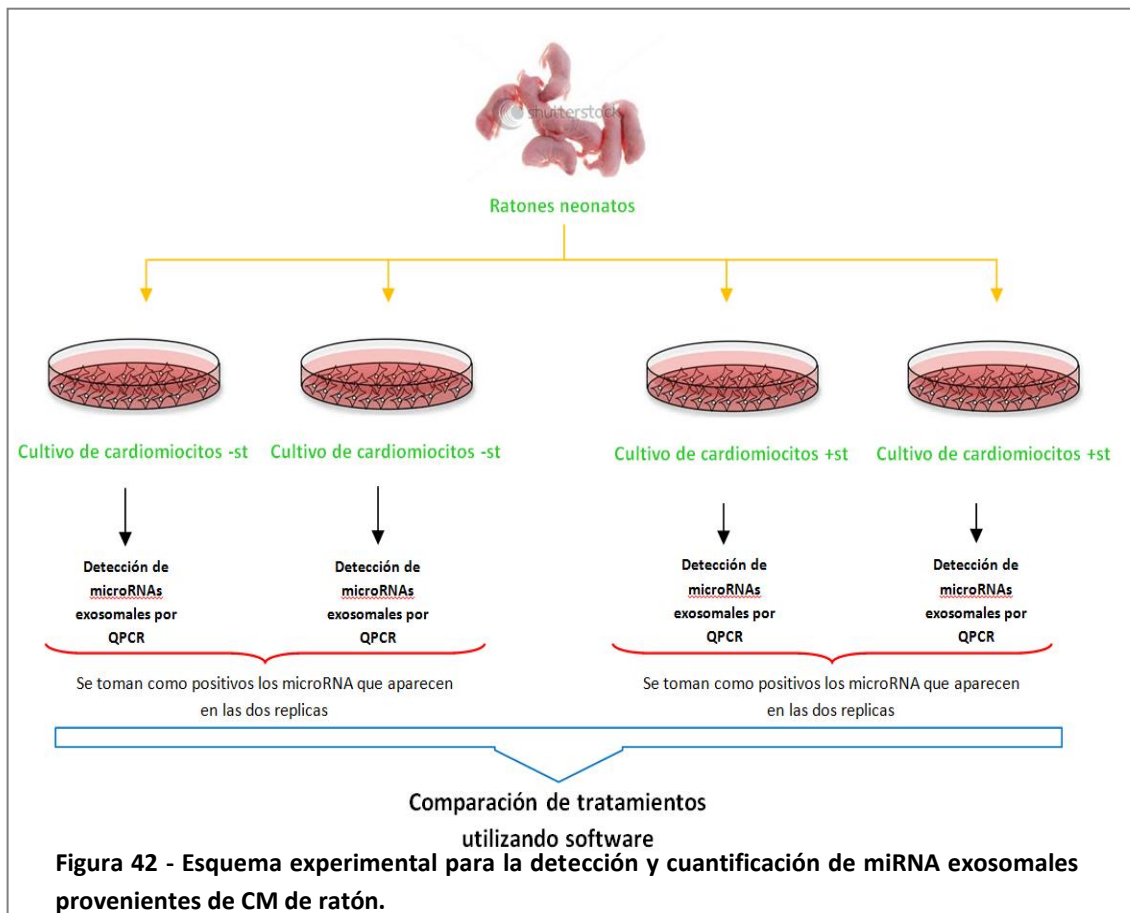


4.7. Análisis de exosomas liberados por CM

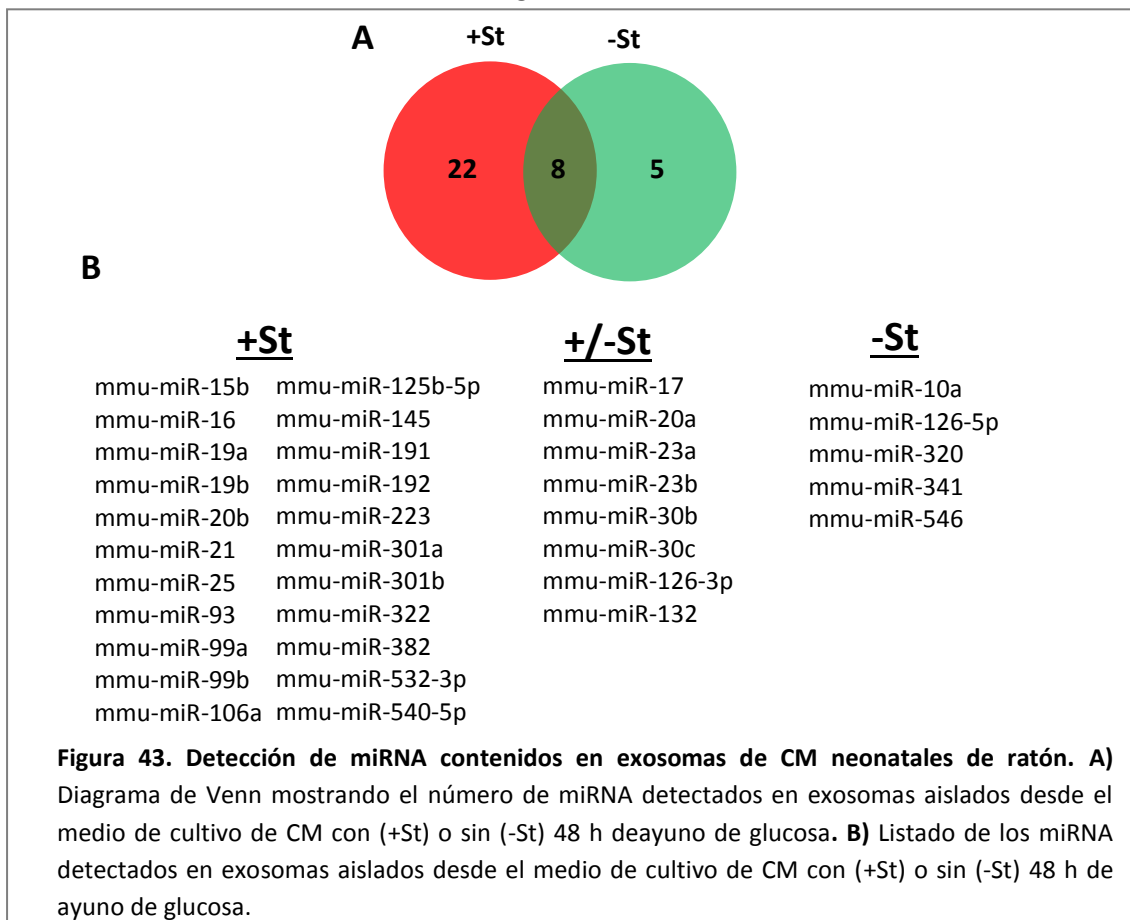
En la anterior sección se describió el hecho de que células cardiacas son capaces de transferir exosomas a las células endoteliales. Además se demostró que, en condiciones de ayuno de glucosa, se producía un aumento del tráfico de exosomas desde las células cardiacas hacia las células endoteliales. Con el fin de interpretar el mensaje enviado a través de los exosomas, en la presente sección se estudió la información, en forma de miRNA y proteínas, contenida en los exosomas liberados por los CM en las diferentes condiciones experimentales.

4.7.1. Análisis de miRNA exosomales de CM neonatales de ratón

Estudios previos han demostrado que las poblaciones de miRNA contenidas en los exosomas liberados por las células pueden variar dependiendo de las condiciones experimentales (115). En este trabajo se analizó mediante qPCR el contenido de miRNA presente en los exosomas liberados por CM al medio de cultivo con 48h de presencia (-St) o ausencia (+St) de glucosa. Los experimentos se realizaron por duplicado, haciendo réplicas biológicas de cada condición. El siguiente esquema muestra el diseño experimental:

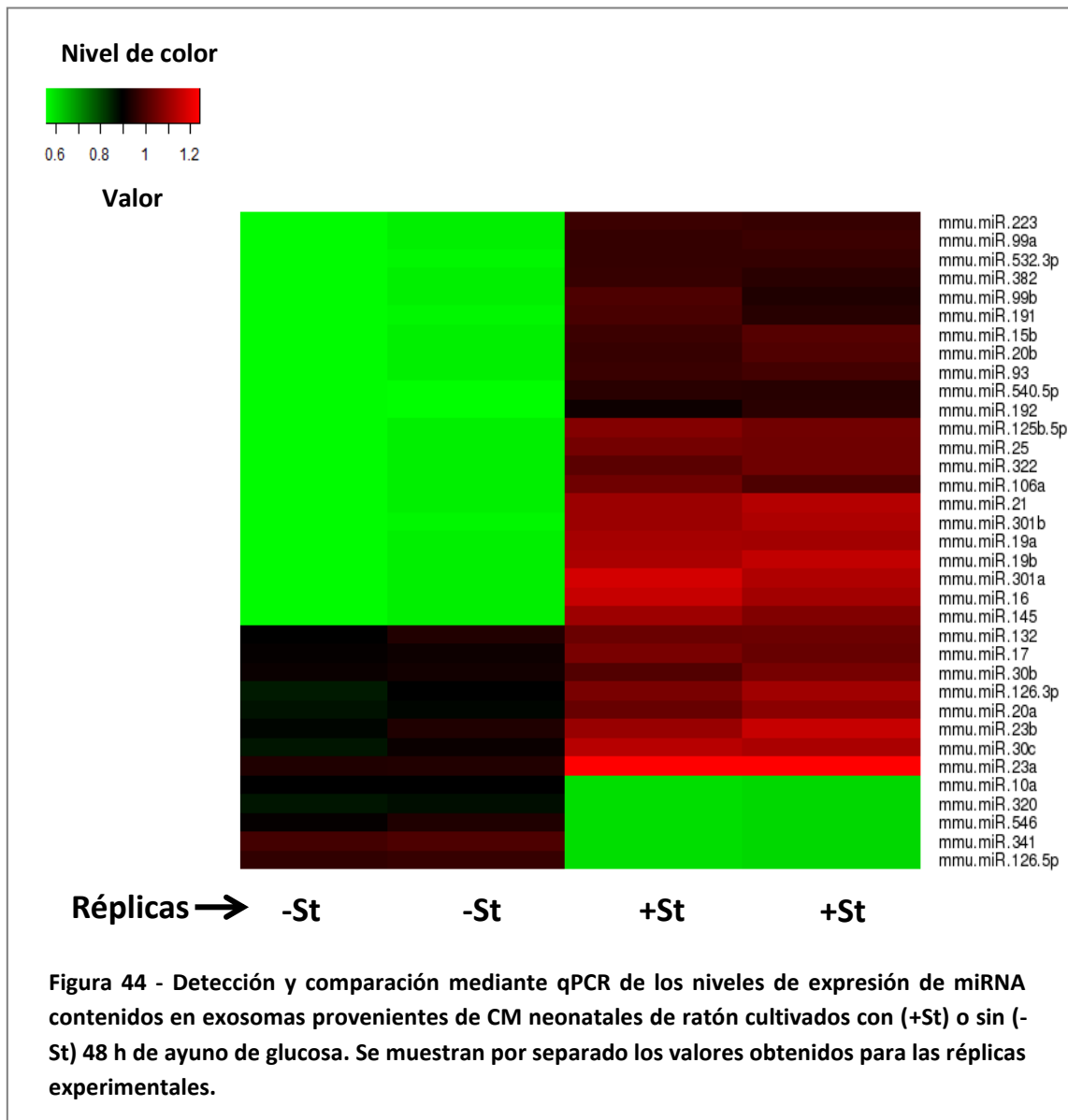


El resultado del análisis se muestra en la Figura 43.



Se observó un cambio reproducible en los patrones de miRNA contenidos en los exosomas cuando los cultivos fueron tratados con o sin ayuno de glucosa. En concreto, se identificaron 22 miRNA que solo se expresaron en exosomas de CM con ayuno de glucosa. Un total de 8 miRNA se observó para ambas condiciones experimentales y 5 miRNA fueron exclusivos para la condición sin ayuno de glucosa.

Para obtener una representación gráfica del análisis, se utilizó el programa RStudio. EL resultado se muestra en la Figura 44.



Es interesante destacar que, aunque la función final que ejerce un miRNA es dependiente del contexto celular en donde se encuentre, varios de los miRNA identificados en exosomas derivados de CM ayunados de glucosa se les han atribuido funciones regulatorias de procesos de gran importancia para la biología cardíaca. Por ejemplo, el mir-15 y el mir-16 han sido

directamente relacionados con el proceso de angiogénesis, reduciendo la misma al disminuir la actividad de VEGF [188]. Se ha descrito que el miRNA-21 se sobreexpresa en respuesta a altas concentraciones de glucosa y que protege a las células endoteliales de la apoptosis inducida por la citotoxicidad generada por las altas concentraciones de glucosa (129). El miRNA-93 ha sido relacionado con la regulación de la expresión de VEGF en altas concentraciones de glucosa [189].

4.7.2. Análisis masivo del contenido de proteínas en exosomas de CM neonatales de rata

Para obtener una aproximación general del contenido de proteínas totales presentes en los exosomas liberados por los CM se realizó un estudio de identificación de proteínas mediante espectrometría de masas. En primer lugar, los exosomas se aislaron del medio de cultivo de CM neonatales de ratas con o sin (+/- st) 48h de ayuno de glucosa y 20 µg/ml de proteína exosomal fueron sembrados en un gel de poliacrilamida. Tras la electroforesis el gel se tiñó con azul coomassie (Figura 45). A simple vista se observó un patrón de bandas distinto para las proteínas de los dos tratamientos, lo que indicó que el ayuno de glucosa alteró el contenido y la abundancia relativa de proteínas en los exosomas.

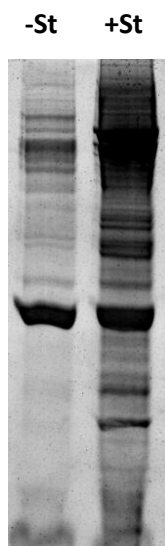


Figura 45 - Detección de proteínas exosomales de CM con o sin (+/- St) 48h de ayuno de glucosa mediante separación en gel SDS-PAGE y posterior tinción con azul Coomassie.

A continuación se realizó la identificación mediante espectrometría de masas de las proteínas exosomales. Las siguientes tablas muestran un resumen del resultado obtenido.

Proteínas Exosomales -St	
Numero de acceso	Proteína
gi 17865351	transitional endoplasmic reticulum ATPase [Rattus norvegicus]
gi 6981200	lactadherin isoform 2 precursor [Rattus norvegicus]
gi 93277126	lactadherin isoform 1 precursor [Rattus norvegicus]
gi 13242237	heat shock cognate 71 kDa protein [Rattus norvegicus]
gi 1220484	elongation factor-1 alpha [Rattus norvegicus]
gi 158303324	integrin beta-1 precursor [Rattus norvegicus]
gi 206205	M2 pyruvate kinase [Rattus norvegicus]
gi 38181543	Pkm2 protein [Rattus norvegicus]
gi 1497985	plakoglobin [Rattus norvegicus]
gi 19424254	angiopoietin-related protein 2 precursor [Rattus norvegicus]
gi 149053757	clathrin, heavy polypeptide (Hc), isoform CRA_b [Rattus norvegicus]
gi 149053756	clathrin, heavy polypeptide (Hc), isoform CRA_a [Rattus norvegicus]
gi 56611127	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Rattus norvegicus]

Proteínas Exosomales +St	
Numero de acceso	Proteína
gi 17865351	transitional endoplasmic reticulum ATPase [Rattus norvegicus]
gi 392332233	PREDICTED: heat shock cognate 71 kDa protein-like [Rattus norvegicus]
gi 404247440	peroxidasin homolog precursor [Rattus norvegicus]
gi 16758080	collagen alpha-2(I) chain precursor [Rattus norvegicus]
gi 19424254	angiopoietin-related protein 2 precursor [Rattus norvegicus]
gi 149038973	angiopoietin-like 2 [Rattus norvegicus]
gi 149061026	syndecan binding protein, isoform CRA_a [Rattus norvegicus]
gi 14010891	syntenin-1 [Rattus norvegicus]
gi 8393418	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Rattus norvegicus]
gi 6978543	sodium/potassium-transporting ATPase [Rattus norvegicus]
gi 358959	ATPase alpha1,Na/K
gi 8393706	L-lactate dehydrogenase A chain [Rattus norvegicus]
gi 6981146	L-lactate dehydrogenase B chain [Rattus norvegicus]
gi 77627994	microfibril-associated glycoprotein 4 precursor [Rattus norvegicus]
gi 8394502	polyubiquitin-C precursor [Rattus norvegicus]
gi 73695428	Ubc protein [Rattus norvegicus]
gi 158303324	integrin beta-1 precursor [Rattus norvegicus]

Tabla 4 - Listado de las proteínas identificadas en los exosomas derivados de CM neonatales de rata cultivados durante 48 h con o sin (+/- St) ayuno de glucosa.

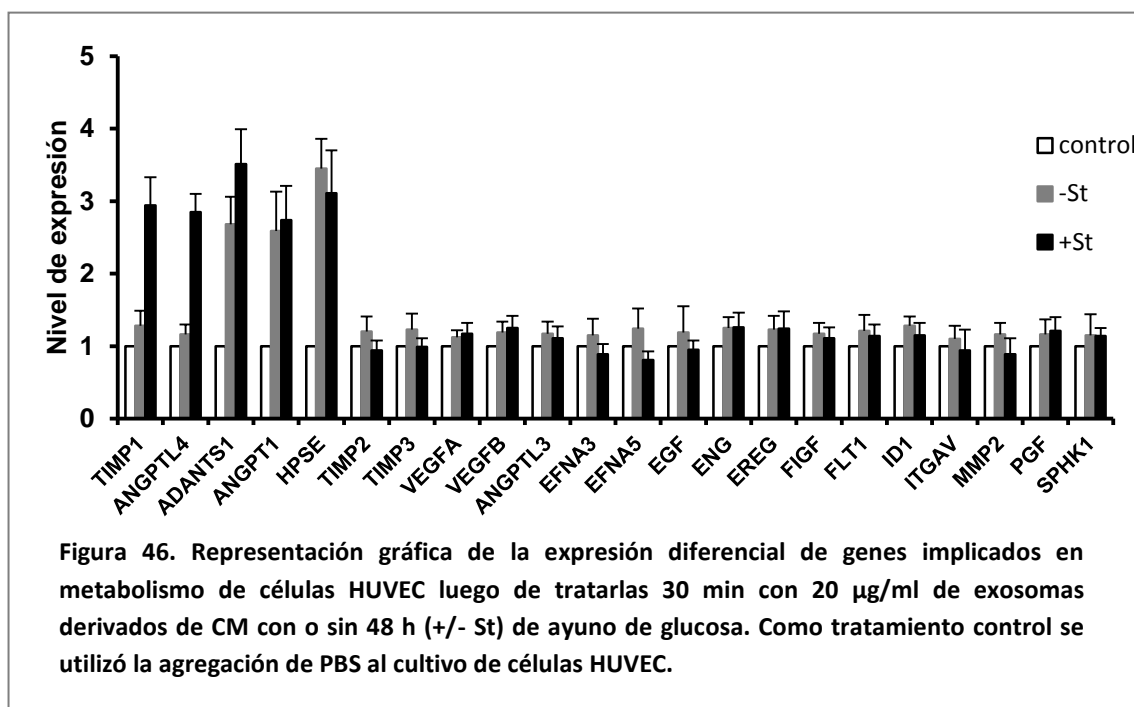
4.8. Los exosomas liberados por los CM alteran la actividad de células endoteliales

En las anteriores secciones se demostró que los CM son capaces de enviar exosomas hacia células endoteliales, llegando a evidenciarse que el ayuno de glucosa en los cardiomiocitos no solo intensifica la cantidad de exosomas enviados, sino también que modifica el mensaje contenido (al menos en forma de miRNA y proteínas) en los exosomas. En la presente sección se realizaron experimentos para estudiar cómo los exosomas derivados de los CM, afectan la actividad de células endoteliales.

4.8.1. Los exosomas derivados de CM neonatales de rata alteran la actividad transcripcional de las células HUVEC

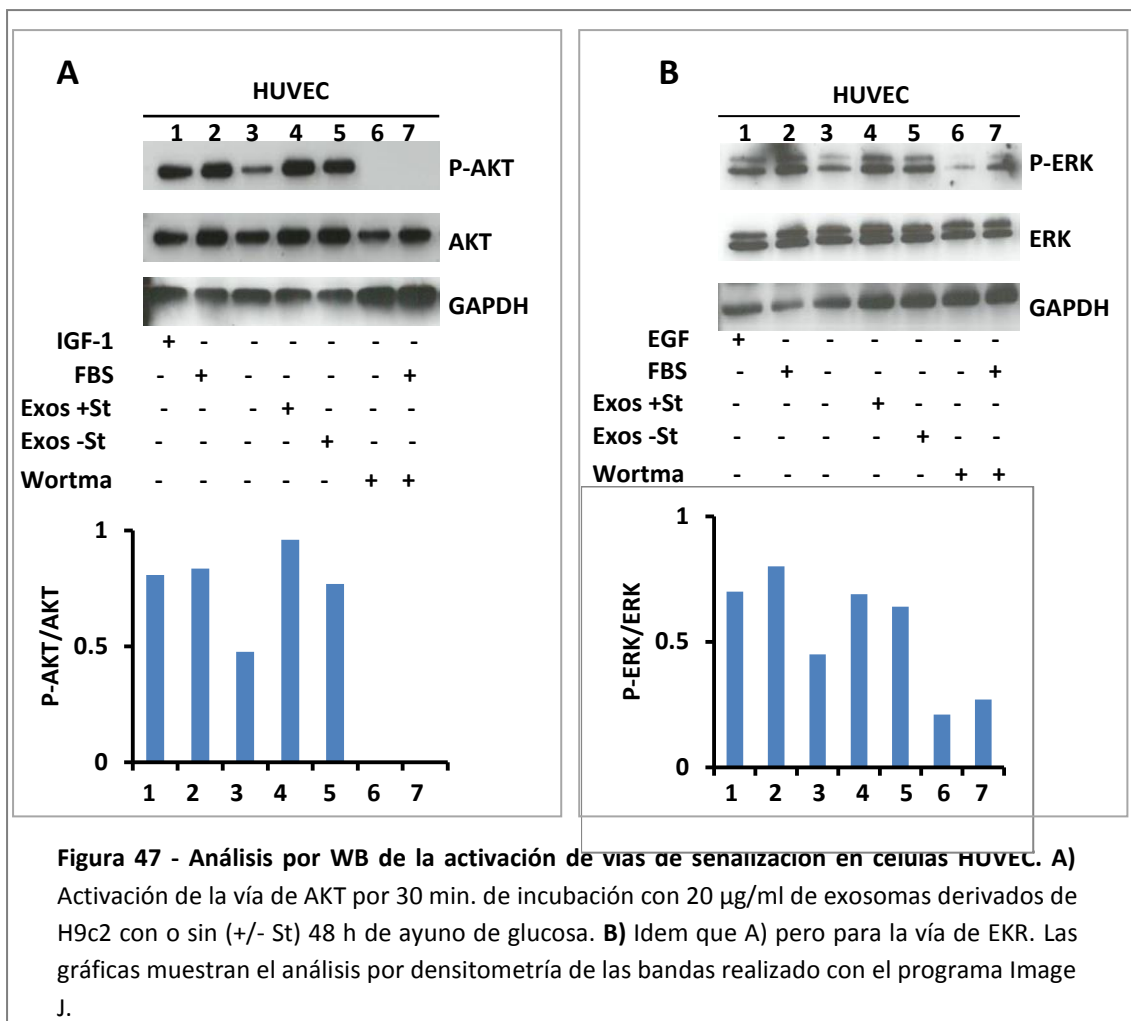
Para estudiar a nivel transcripcional el efecto de la adición de exosomas provenientes de CM en células endoteliales, se agregaron exosomas derivados de CM de rata neonatales con o sin 48 h de ayuno de glucosa (o PBS como control), directamente al medio de cultivo de células HUVEC. Tras de 30 min de incubación se analizó por qPCR la expresión de genes relacionados con diferentes funciones endoteliales (Figura 46). El análisis de ambas condiciones reveló una expresión diferencial de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa. Se ha descrito que TIMP-1 se sobreexpresa en células endoteliales humanas en respuesta a altas concentraciones de glucosa (130). La angiopoyetina tipo 4 (Angiopoyetin-like protein 4, ANGPTL4) es una adipoquina que circula en sangre (131). Los niveles plasmáticos de ANGPTL4 se han relacionado con la disminución de la glucosa en sangre y con una mejora en la tolerancia de la glucosa en ratones (132). En relación con esto se ha visto que pacientes con diabetes tipo 2 tienen niveles plasmáticos más bajos de ANGPTL4 en comparación con personas sanas (133). Recientemente se ha descrito que ANGPTL4 es inducida por altas concentraciones de glucosa en células humanas del epitelio pigmentario de retina (133). ADAMTS1, del inglés “disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1”, es un miembro de la familia de las metaloproteinasas. Se ha visto que es fuertemente inducida en el endotelio cardiaco luego de un IAM (134). Sorprendentemente esta inducción solo afecta de manera transitoria al área infartada (135), lo que apunta a un mecanismo de comunicación celular local y de corta distancia. La angiopoyetina-1 (ANG-1), codificada por el gen ANGPT1, es un factor de protección vascular, crucial para el mantenimiento de la función endotelial. Se ha visto que ANG-1 protege al corazón del daño inducido por un IAM bajo condiciones de hiperglicemia (136). Se cree que el papel protector es debido a que ANG-1 puede restaurar el daño producido en el endotelio cardiaco por altas concentraciones de glucosa (137). La

Heparanasa (HPSE), es una enzima que actúa en la superficie celular degradando moléculas de sulfato de heparan poliméricas (138). Se ha visto que HPSE es inducida en células humanas del endotelio vascular de la retina en respuesta a altas concentraciones de glucosa (139).



4.8.2. Los exosomas derivados de células cardíacas activan vías de señalización en células HUVEC

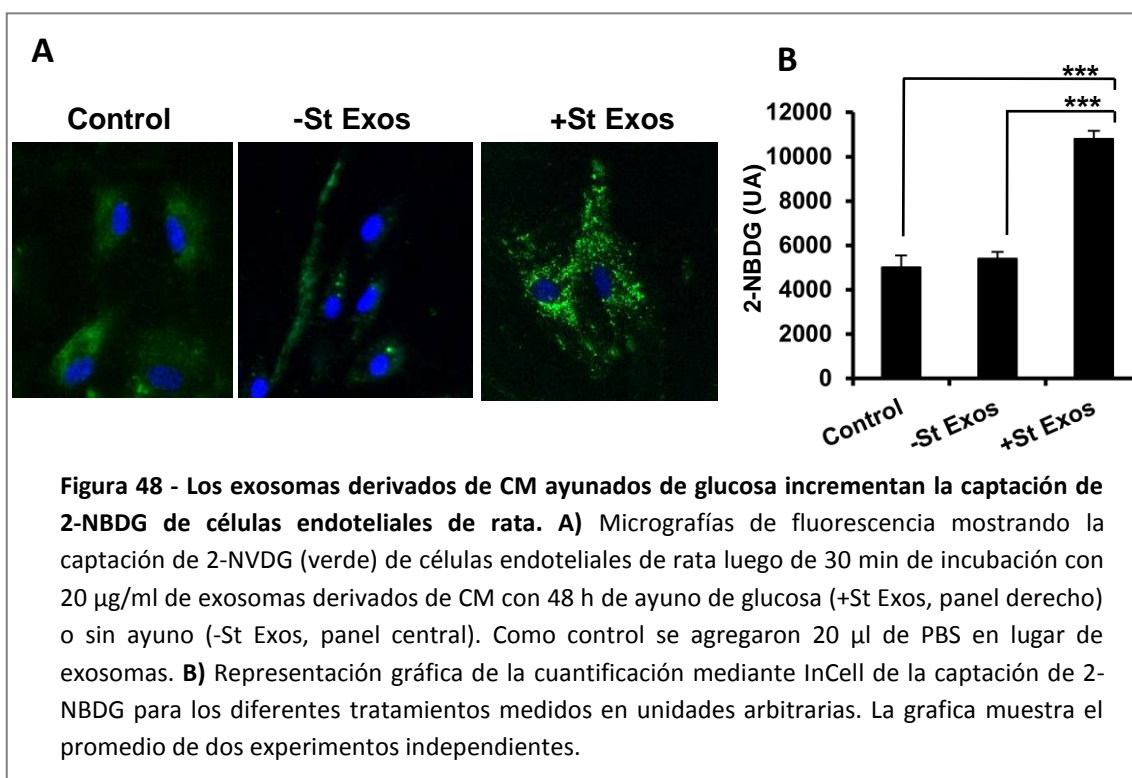
Las células interpretan su entorno respondiendo a una gran cantidad de estímulos químicos que llegan desde el exterior. Estos estímulos activan receptores en la superficie celular que dan paso a la generación de segundos mensajeros logrando así una amplificación de la señal recibida (69). De esta manera, dependiendo del estímulo externo, se activan diferentes vías de señalización celular que tendrán como objetivo final producir una respuesta biológica determinada. En el presente trabajo se estudió si los exosomas derivados de células cardíacas eran capaces de activar vías de señalización relacionadas con el metabolismo de la glucosa (AKT y ERK) en cultivos de HUVEC. Para ello se purificaron exosomas de células H9c2 con o sin 48h de ayuno de glucosa y se agregaron a una concentración de 20 µg/ml al medio de cultivo de células HUVEC. Tras de 30 min de incubación se estudió mediante WB la activación de las vías de AKT y ERK (Figura 47, A-B). Se observó que los exosomas derivados de H9c2 inducían la fosforilación tanto de AKT como de ERK. Aunque de manera cualitativa se observó además que exosomas derivados de H9c2 con ayuno de glucosa parecían producir una mayor activación de la vía de AKT.



4.8.3. Los exosomas derivados de CM neonatales de rata incrementan la captación de glucosa en células endoteliales de rata

En las anteriores secciones se observó que los CM responden al estrés inducido por el ayuno de glucosa enviando un mensaje contenido en los exosomas hacia las células endoteliales, las cuales son responsable del transporte de combustibles metabólicos desde las sangre hacia los cardiomiocitos. En la presente sección se estudió el efecto de los exosomas derivados de CM neonatales de rata en los mecanismos de transporte de glucosa en células endoteliales. Para ellos se agregaron 20 µg/ml de exosomas derivados de CM con o sin (+/- st) 48 h de ayuno de glucosa, a un cultivo primario de células endoteliales de rata. 30 min después de la adición de los exosomas se realizó un ensayo de captación de glucosa fluorescente (2-NBDG) en las células endoteliales (Figura 48, A-B). El análisis de la señal fluorescente mostró que los exosomas derivados de CM ayunados incrementaron en gran medida la captación de 2-NBDG en las células endoteliales (5.405±361 en el control frente a 4.602±305 con -St exosomas y 10.804±537 con +St exosomas, respectivamente. $P < 0,001$. n=6). Este resultado apuntaba a

una comunicación celular mediada por exosomas y dirigida a la modificación de rutas metabólicas concretas.



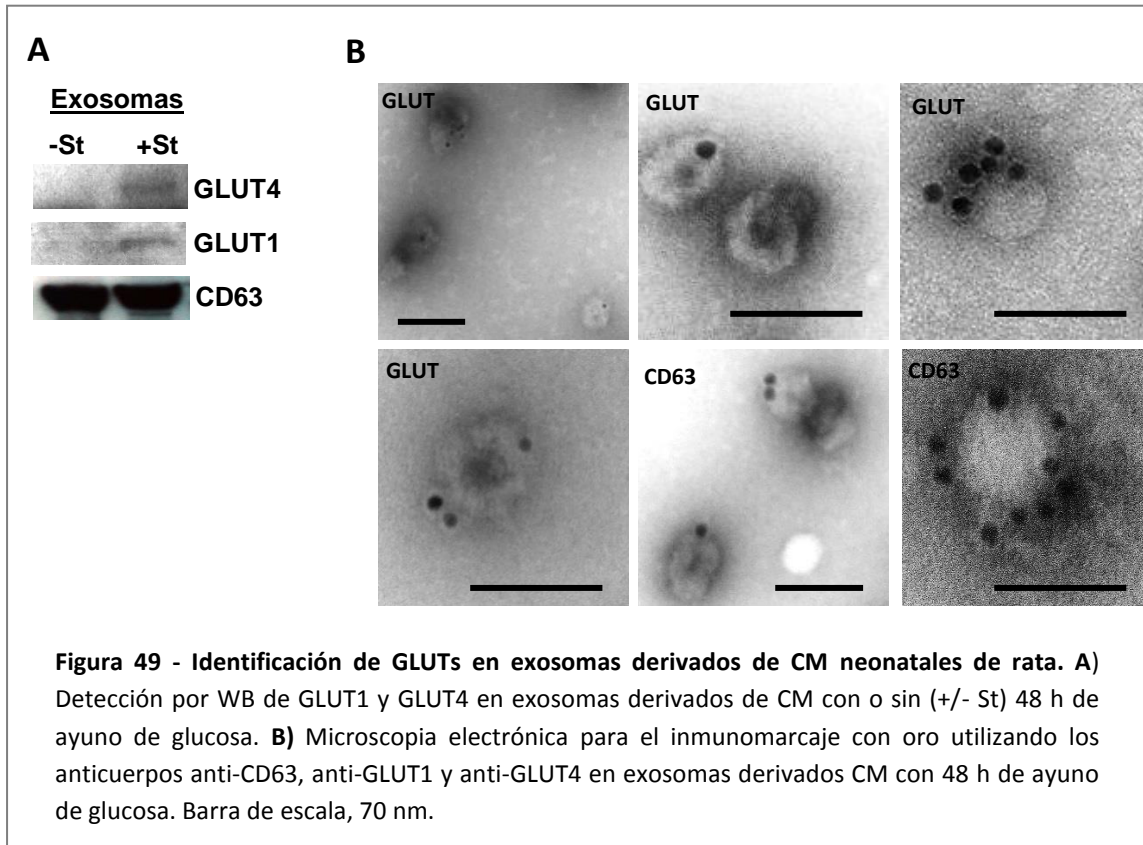
4.9. Estudio de la transferencia de GLUTs entre células cardiacas y endoteliales por mediación de exosomas

Estudios proteómicos previos (138-140) han identificado la posible presencia de transportadores de glucosa (GLUTs) en los exosomas aislados desde reticulocitos de rata y células B humanas. En la anterior sección se ha demostrado que exosomas derivados de cardiomiocitos ayunados incrementan la captación de glucosa de células endoteliales. La vía más directa para incrementar la captación de glucosa celular es aumentar en número de GLUTs disponibles para tal fin. Para continuar investigando el incremento en la captación de glucosa mediada por exosomas, en la presente sección se estudió la presencia de GLUTs en los exosomas derivados de CM y su transferencia mediante exosomas desde los CM hacia las ECs, lo que explicaría en parte el fenómeno observado en la sección 4.3.

4.9.1. Los exosomas derivados de CM ayunados de glucosa contienen GLUTs

Las fracciones exosomales obtenidas desde el medio de cultivo de CM neonatales de rata se analizaron por WB y por Microscopia Electrónica (Figura 49, A-B) con anticuerpos específicos contra GLUT-1 y GLUT4. El anticuerpo anti-CD63 se utilizó para normalizar la cantidad de

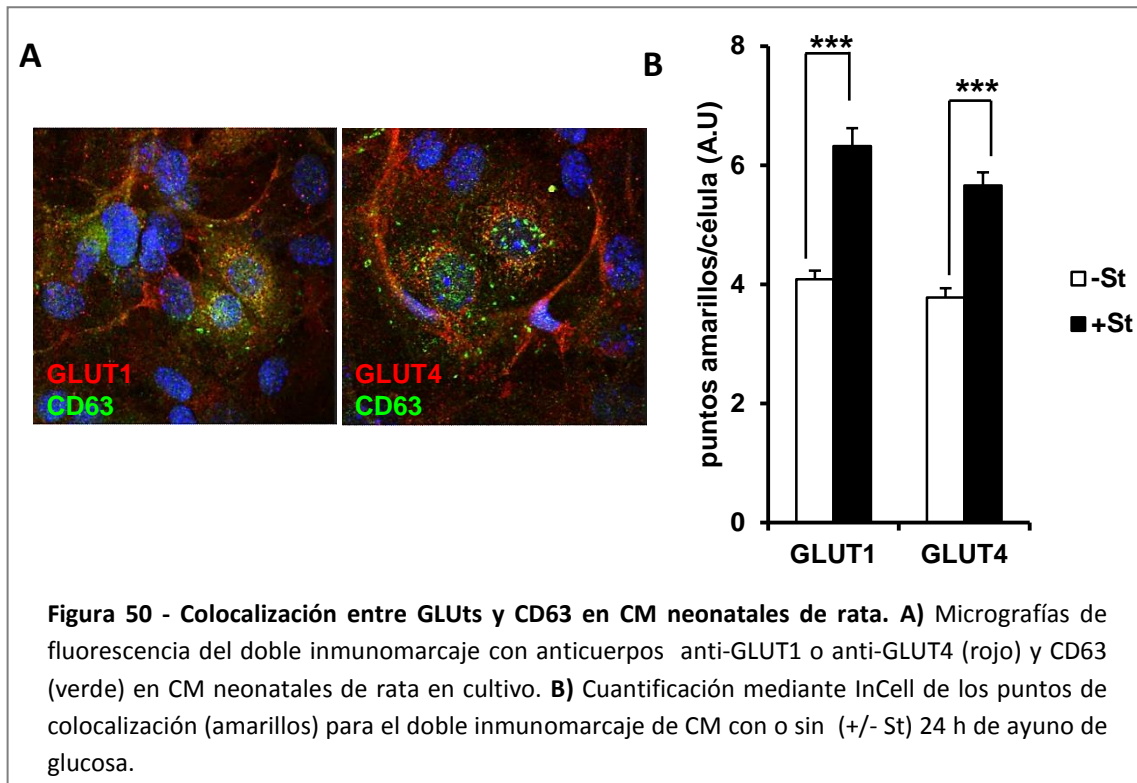
proteínas exosomales en las dos condiciones experimentales (+/- St). Con ambas técnicas se detectó la presencia de GLUT1 y GLUT4 en los exosomas provenientes de cardiomiocitos ayunados de glucosa.



4.9.2. Co-localización entre CD63 y GLUTs en CM neonatales de rata

Los transportadores GLUT1 y GLUT4 están presentes en vesículas intracelulares en cardiomiocitos. Se hipotetizó que las señales desencadenadas por la falta de glucosa en CM podrían hacer converger dos rutas de tráfico intracelular, en concreto, el tráfico intracelular de GLUTs y la ruta de secreción de exosomas, generando de esta manera exosomas cargados con GLUTs. Como consecuencia se podría observar la colocalización de GLUTs con proteínas específicas de exosomas. Para estudiar este fenómeno se realizó un doble inmunomarcaje con anti-GLUT1 o anti-GLUT4 (rojo) y anti-CD63 (verde) en un cultivo de CM con o sin 24 h ayuno de glucosa (Figura 50, A-B) y se observó la presencia de estructuras intracelulares positivas para ambos anticuerpos (puntos amarillos en Figura 50, A). Además, se llevó a cabo la cuantificación en InCell de la co-localización entre GLUTs y CD63 en CM cultivados en las diferentes condiciones experimentales (Figura 50, B). El resultado mostró que en condiciones de ayuno de glucosa se producía un incremento de estructuras GLUTs+, CD63+, lo que sugería que el ayuno de glucosa incrementaba la cantidad de exosomas cargados con GLUTs

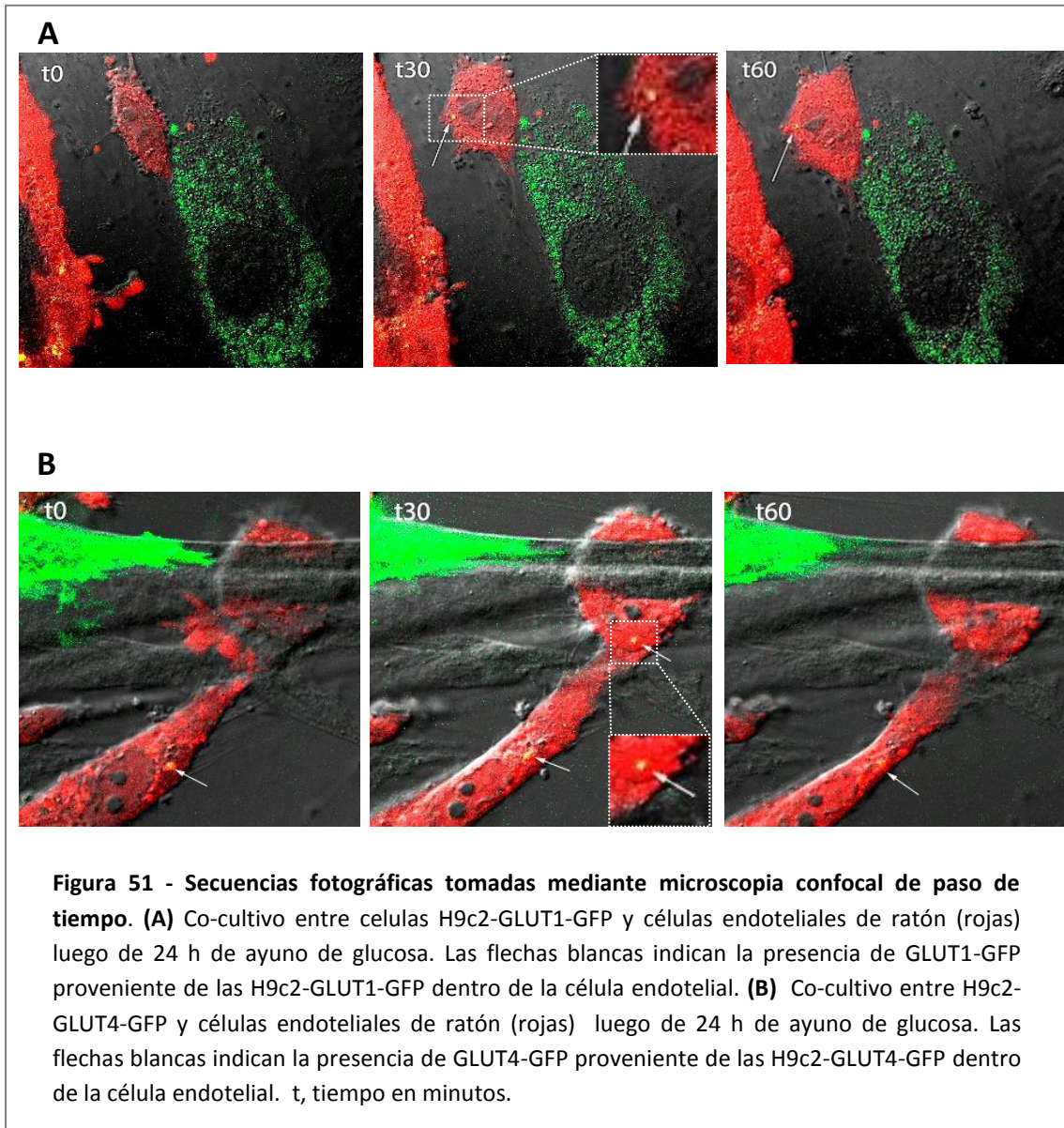
($4,082 \pm 0,97$ en $-st$ vs $6,319 \pm 1,91$ en $+St$, para la colocalización entre GLUT1 y CD63; $3,776 \pm 1,02$ en $-St$ vs $5,659 \pm 1,39$ en $+St$, para la colocalización entre GLUT4 y CD63. $P < 0,001$. $n=2$).



4.9.3. Transferencia de GLUTs entre células cardiacas y endoteliales

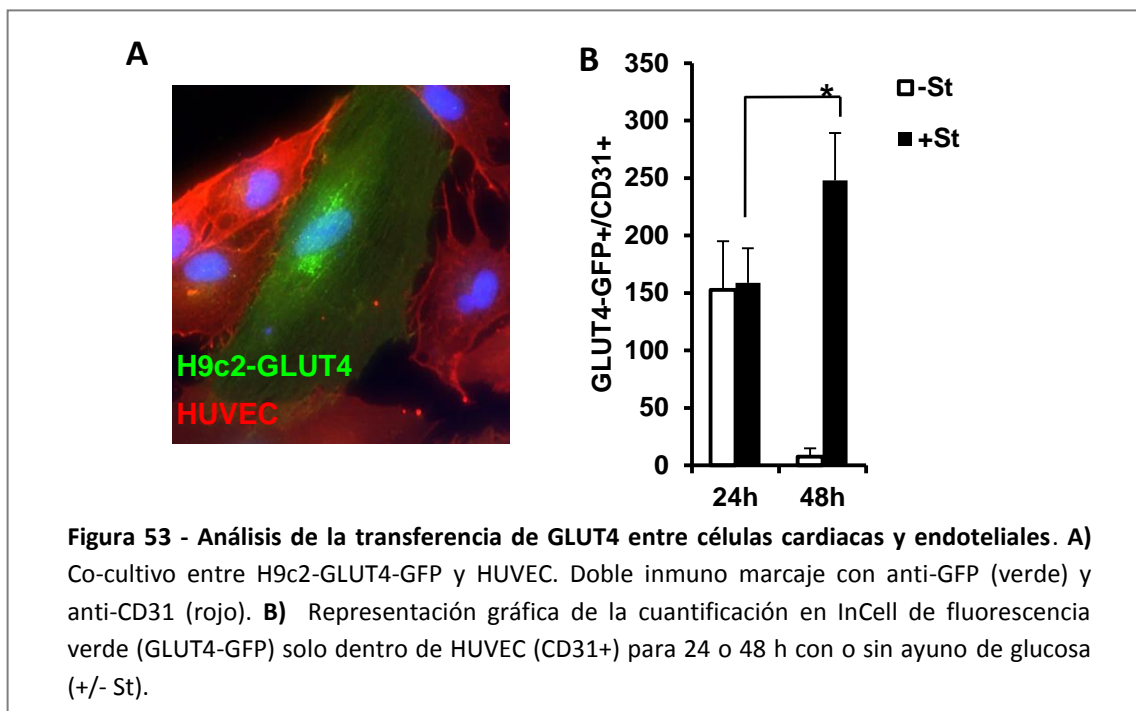
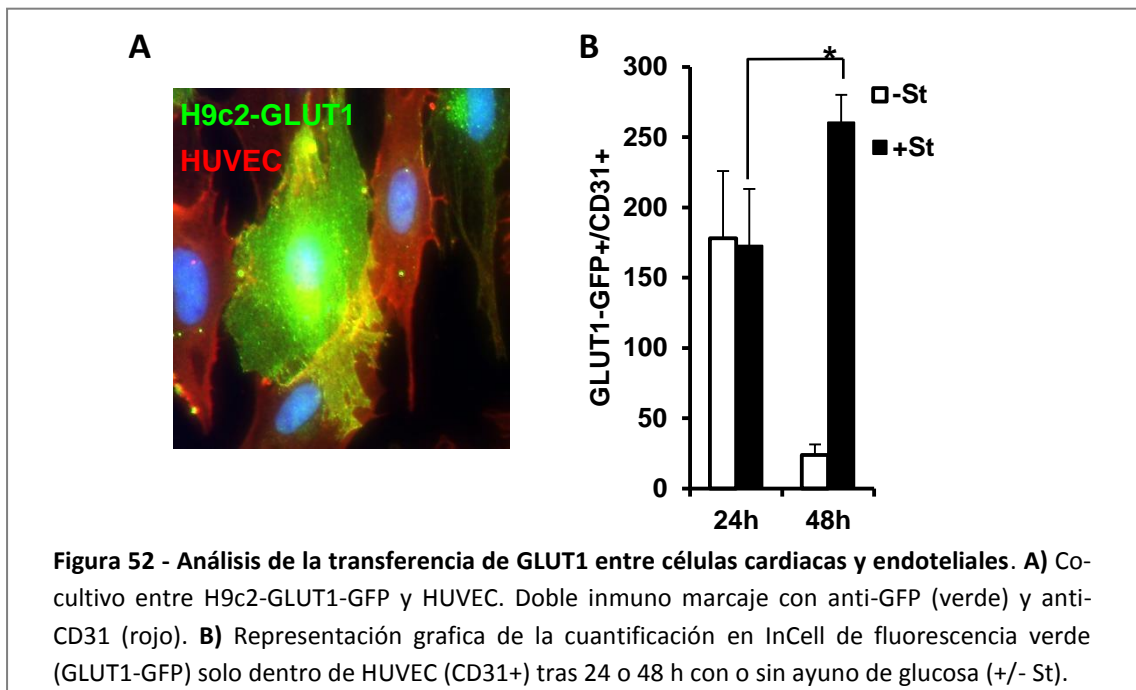
En las anteriores secciones se ha demostrado que los exosomas derivados de los cardiomiocitos pueden dirigirse hacia células endoteliales, e incluso en condiciones de ayuno esta transferencia de exosomas no solo aumentan en cantidad, sino que también los CM parecieran enviar un mensaje concreto hacia las células endoteliales al incorporar GLUTs en los exosomas. Para estudiar el posible tráfico de GLUTs desde las células cardiacas hacia las endoteliales, en la presente sección se realizaron estudios de microscopia de paso de tiempo de co-cultivos entre células cardiacas y células endoteliales. Para el trazado de los GLUTs se generaron las líneas H9c2-GLUT1-GFP y H9c2-GLUT4-GFP que expresan los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 fusionados a GFP tal como se describe en materiales y metodos. Se realizaron co-cultivos entre células H9c2-GLUTs-GFP y células de endoteliales provenientes de cultivos primarios de aorta aorta de ratones RFP. A continuación se evaluó por microscopia confocal de paso de tiempo el tráfico de GLUTs-GFP (verdes) desde las H9c2-GLUTs-GFP hacia las células endoteliales (rojas)(Figura 51, A-B). Tras 24 h de ayuno de glucosa se observó en las

células endoteliales (con fluorescencia roja) la presencia de estructuras con fluorescencia verde que solo podían provenir de la internalización de proteínas GLUTs-GFP provenientes de las H9c2. Una vez internalizados en la célula endotelial, los GLUTs-GFP sufrieron un proceso dinámico de agrupamiento y escisión vesicular que fue captado durante el estudio de “time-lapse”.



Para cuantificar la transferencia de GLUTs desde células cardíacas hacia células endoteliales se realizó un co-cultivo entre H9c2-GLUT1-GFP o H9c2-GLUT4-GFP y células HUVEC. Se sometió el co-cultivo a las diferentes condiciones experimentales (+/- st) durante 24 o 48 h y se realizó un doble inmunomarcaje con anti-GFP (verde) y anti-CD31 (rojo) (Figura 52, A y Figura 53, A). Luego con un análisis de InCell se cuantificó la cantidad de estructuras verdes (GLUTs-GFP) solo dentro de HUVEC (CD31+, rojo) (Figura 52, B y Figura 53, B). El análisis mostró un incremento

significativo de GLUT1-GFP y GLUT4-GFP en HUVEC luego de 48 h de ayuno de glucosa. La expresión GLUT1-GFP en HUVEC a 48h fue de $23,90 \pm 7,57$ en -St y $260 \pm 19,67$ en +St ($P < 0,001$, $n=4$) y para GLUT4-GFP fue de $7,43 \pm 7,40$ en -St y $247,99 \pm 41,04$ en +St ($P < 0,001$, $n=4$).



En esta sección se ha demostrado que las células cardiacas son capaces de enviar GLUTs hacia células endoteliales, inclusive, al igual que se ha observado para los exosomas, el tráfico de GLUTs se ve intensificado en condiciones de ayuno de glucosa, lo que sugiere un presumible transporte de proteínas de relevancia metabólica entre los dos tipos células mediado por

exosomas. Para continuar investigando el incremento en la captación de glucosa de células endoteliales producido por los exosomas derivados de CM, el siguiente paso fue comprobar si los GLUTs transportados en exosomas eran funcionales una vez transferidos a las células endoteliales. Para ello se realizó un ensayo que evidenciara la función de los GLUTs aportados por los exosomas de los CM a las células endoteliales. El compuesto Fasentin ha sido descrito como una molécula capaz de inhibir la actividad de los GLUTs (110). Esta molécula se utilizó para inhibir los GLUTs contenidos en los exosomas aislados desde el medio de cultivo de CM primarios de rata. Así, se dividió una fracción exosomal en dos alícuotas, una fue tratada con Fasentin y la otra no. A continuación 20 µg/ml de estos exosomas con los GLUTs inhibidos o exosomas de la misma fracción, pero sin tratar con Fasentin, se agregaron a un cultivo primario de células endoteliales de rata e incubados durante 30 min para luego llevar a cabo el ensayo de captación de 2-NBDG (Figura 54). Una vez más se observó que los exosomas derivados de CM cultivados en ausencia de glucosa incrementaron la captación de 2-NBDG con respecto al control (19.290 ± 723 en +St Exos vs 5.590 ± 997 en control. $P < 0,001$. $n=3$). Pero al tratar los mismos exosomas con Fasentin no se observó una diferencia significativa con respecto al control (7.124 ± 457 en +St Exos +fas vs 5.590 ± 997 en control. $P=0,13$. $n=3$). Para descartar la posibilidad de que la disminución en la captación de 2-NBDG observada para +St Exos +fas fuera debido a la concentración de Fasentin arrastrada con los exosomas, se trató a las células con la misma concentración de Fasentin (fas 3.22 µM) y no se observó una disminución en la captación de 2-NBDG con respecto al control (5.835 ± 1142 en fas 3,22 µM vs 5.590 ± 997 en control. $P=0,84$. $n=3$), por lo que esa concentración de Fasentin no afectó la captación de 2-NBDG. Estos resultados sugieren que el incremento en la captación de glucosa inducida por los exosomas fue mediada por el aporte extra de GLUTs contenidos en los exosomas derivados de los CM ayunados de glucosa a las células endoteliales, lo que apuntaría a un nuevo mecanismo de regulación en el aporte de nutrientes desde las ECs hacia los CM.

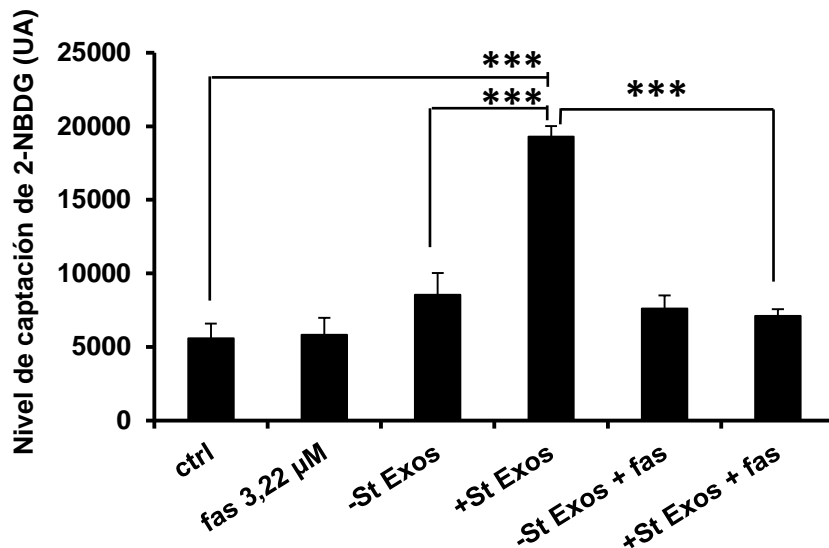


Figura 54 - Los GLUTs contenidos en los exosomas de CM son capaces de incrementar la captación de 2-NBDG de células endoteliales de rata. Cuantificación mediante InCell de la captación de 2-NBDG por células endoteliales de rata. El eje de las abscisas indica un pretratamiento de 30 min en las células endoteliales antes de realizar el ensayo de captación de 2-NBDG. Ctrl: se agregaron 20μl de PBS. fas: fasentin. +/-St Exos: se agregó 20 μg/ml de exosomas obtenidos desde el medio de cultivo de CM con o sin (+/- St) 48 h de ayuno de glucosa. +/-St Exos + fas: se agregaron 20 μg/ml de exosomas obtenidos desde el medio de cultivo de CM con o sin (+/- St) 48 h de ayuno de glucosa. Los exosomas fueron incubados 1 h con 100 μM fasentin antes de ser agregados a las células endoteliales.

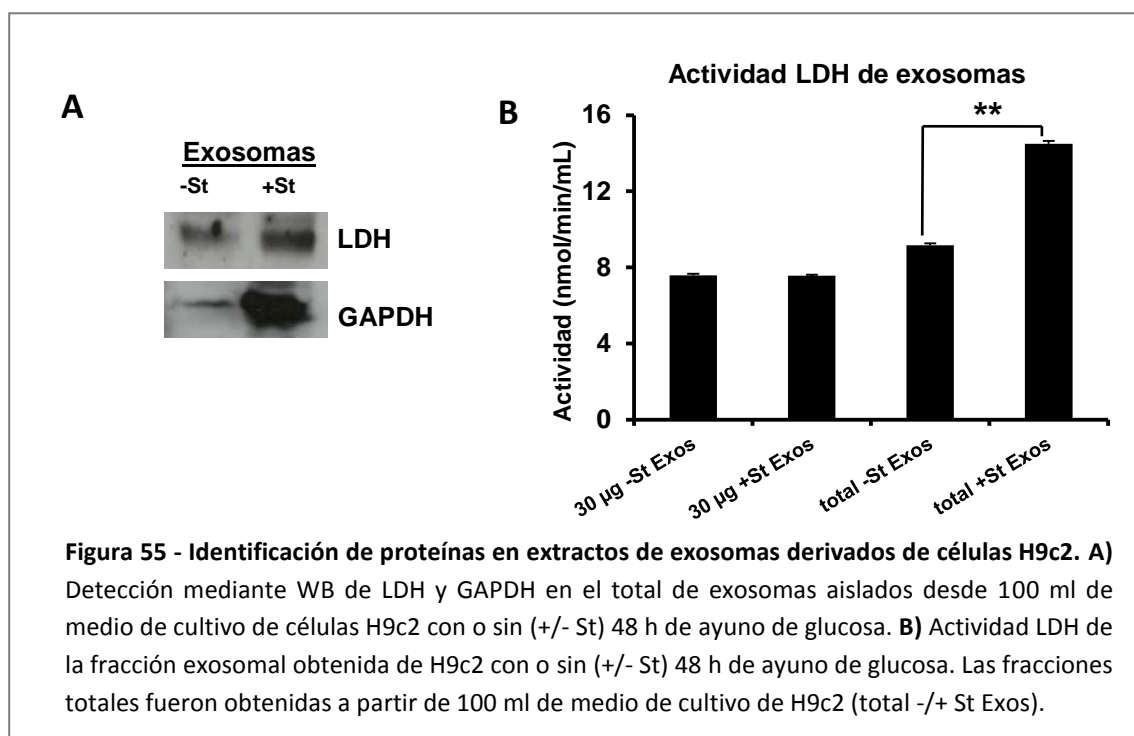
4.10. Los exosomas derivados de células H9c2 incrementan la actividad glicolítica de células HUVEC

En las anteriores secciones se ha demostrado que exosomas derivados de cardiomiocitos ayunados de glucosa incrementan la captación de glucosa de células endoteliales. Este incremento de glucosa, mediado por la transferencia de GLUTs a través de exosomas, no refleja las necesidades metabólicas propias de la célula endotelial, sino que responde a las necesidades metabólicas de los cardiomiocitos. Las células endoteliales obtienen la mayor parte de la energía necesaria realizando glicólisis aeróbica (141). En este proceso, aunque la célula disponga de cantidades suficientes de oxígeno, oxida la glucosa hasta Piruvato y rápidamente la LDH genera lactato a partir del Piruvato para mantener un flujo constante de la vía glicolítica (142). En particular, las células del endotelio microvascular coronario catabolizan el 99% de la glucosa a lactato, utilizando el oxígeno para la oxidación de sustratos endógenos en lugar de actuar como aceptor final de electrones en las mitocondrias (143), de hecho la cantidad de mitocondrias presentes en células endoteliales es sorprendentemente bajo en comparación con el resto de tipos celulares. El endotelio microvascular es el encargado de

aportar nutrientes a los CM, en la presente sección se estudió cómo los exosomas derivados de los cardiomiocitos afectaban el metabolismo de las células endoteliales.

4.10.1. Los exosomas derivados de células cardiacas contienen LDH y GAPDH

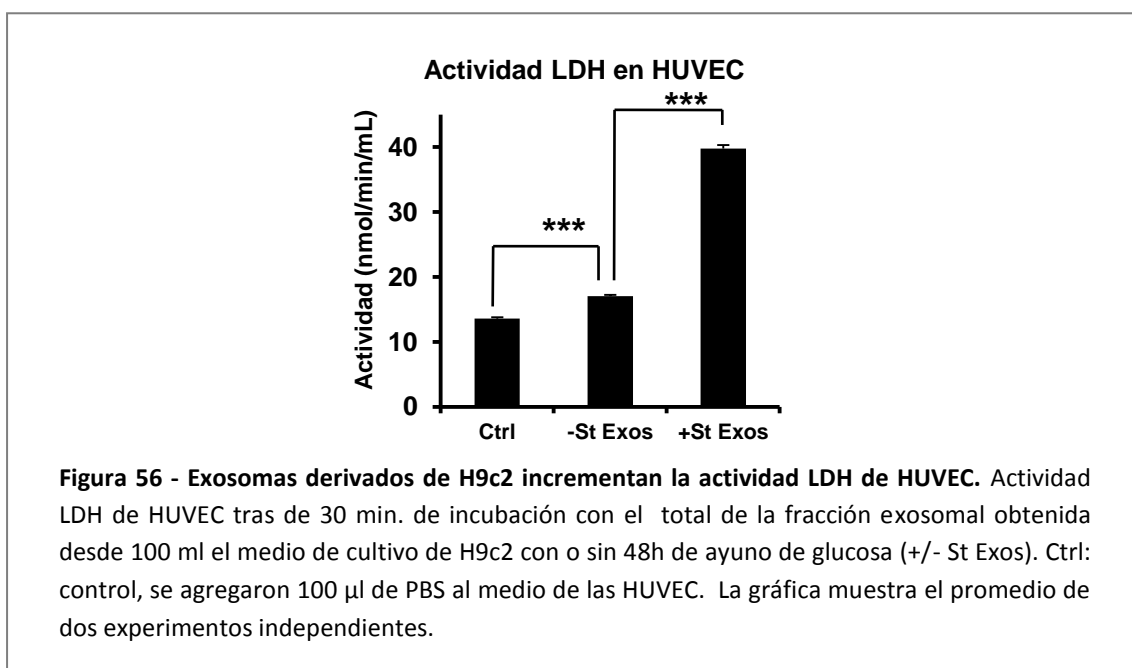
En el estudio proteómico realizado en la sección 3.2. se identificó la posible presencia de GAPDH y LDH en exosomas. Para corroborarlo se realizó la detección de esas proteínas mediante WB de la fracción exosomal total obtenida desde el medio de cultivo de H9c2 con o sin (+/- St) 48 h de ayuno de glucosa (Figura 55, A). Tras el revelado con anticuerpos específicos se observó la presencia de LDH y GAPDH lo que sugirió que los exosomas contenían las mencionadas enzimas. Además, en condiciones de ayuno de glucosa la señal era visiblemente superior.



Para estudiar presencia de la enzima LDH en los exosomas provenientes de células H9c2, se realizó un ensayo de actividad LDH de la fracción exosomal (Figura 55, B). Se observó presencia de actividad LDH en la fracción exosomal lo que reconfirmó la presencia de la enzima. También se vio que para la misma cantidad de exosomas obtenidos de H9c2 con o sin ayuno de glucosa, la actividad LDH no varía, mientras que la actividad LDH de la fracción total es mayor en H9c2 con 48 h de ayuno de glucosa ($9,17 \pm 0,09$ en total -St Exos vs $14,49 \pm 0,15$ en total +St Exos. $P < 0,01$. $n=4$). Estos datos sugieren que la mayor cantidad de exosomas secretados por las células H9c2 con ayuno de glucosa, incrementa la actividad LDH de la fracción exosomal.

4.10.2. Los exosomas derivados de células H9c2 incrementan la actividad LDH de células HUVEC

En el presente estudio se ha demostrado que los CM son capaces de enviar proteínas (GLUTs) hacia células endoteliales. La LDH juega un papel fundamental en el metabolismo endotelial (142). En la anterior sección se observó la presencia de LDH en exosomas derivados de H9c2. Para estudiar cómo los exosomas derivados de células H9c2 podrían alterar la actividad metabólica de células endoteliales, se agregó el total de la fracción exosomal obtenida desde células H9c2 con o sin (+/- St) ayuno de glucosa al medio de cultivo de células HUVEC (Figura 56) y se midió la actividad LDH de las células. Se observó un incremento en la actividad LDH de las HUVEC cuando se agregaron exosomas provenientes de H9c2 con y sin ayuno de glucosa (+/- St Exos), y este incremento fue mayor aun cuando se agregaron exosomas derivados de H9c2 ayunadas de glucosa (13,6±0,2 en control vs 39,7±0,53 en +St exos. $P<0,001$. $n=4$). Esto sugirió que la actividad LDH exosomal observada en la sección anterior estaba siendo detectada en las HUVEC tras la incorporación de los exosomas derivados de las H9c2.



4.10.3. Los exosomas derivados de células H9c2 incrementan la cantidad de Piruvato producido por células HUVEC

Como se ha mencionado, las células endoteliales obtienen energía a partir de la glicolisis anaeróbica utilizando la LDH endotelial para general lactato a partir de Piruvato y así permitir

un flujo constante de la vía glicolítica. La LDH es una oxidoreductasa que cataliza la interconversión del lactato a Piruvato (y viceversa) utilizando como cofactores NAD⁺ y NADH. La LDH es un homó o heterotetrámero compuesto por 4 subunidades H o M, dando lugar a cinco isoenzimas, cada una de las cuales se encuentra preferentemente en determinados tejidos. Por ejemplo, la LDH-1, está compuesta por 4 subunidades H (homotetramero) y es específica de tejido cardíaco (144). Se ha descrito que dependiendo de la composición de subunidades del tetrámero de LDH, la enzima es más eficiente para generar Piruvato a partir de lactato o viceversa (145). De esta manera, tejidos metabólicamente muy activos como el corazón, poseen la LDH-1 (homotetramero H) que favorece la formación de Piruvato a partir de lactato, el cual se utiliza en el ciclo de Krebs. Por otro lado, células endoteliales utilizan la LDH de manera inversa. Los resultados de las secciones anteriores sugirieron un posible tráfico de LDH desde células cardíacas hacia células endoteliales. En combinación con el incremento de glucosa por parte del endotelio, inducido por los exosomas derivados de las células cardíacas, la LDH aportada mediante exosomas desde H9c2 hacia HUVEC, produciría un incremento de la cantidad de Piruvato de las HUVEC el cual al no ser metabolizado difundiría por la membrana plasmática. Para probarlo, se agregó el total de la fracción exosomal obtenida desde H9c2 con o sin (+/- St) ayuno de glucosa al medio de cultivo de HUVEC (Figura 57) y se midió la cantidad de Piruvato en la células y el liberado al medio de cultivo. Se observó un marcado incremento en la cantidad de Piruvato tanto celular como el en medio de cultivo cuando las HUVEC fueron tratadas durante 30 min. con exosomas derivados de H9c2 con 48 h de ayuno de glucosa (+St Exos) (en células: $0,18 \pm 0,008$ en -St Exos vs $0,29 \pm 0,008$ en +St Exos, $P < 0,01$. $n=4$. En el medio: $0,24 \pm 0,007$ en -St Exos vs $0,72 \pm 0,03$ en +St Exos, $P < 0,001$. $n=4$). Estos resultados sugieren que el aporte de LDH-1 proveniente de los exosomas de las H9c2, contribuye a generar Piruvato a partir de lactato en las HUVEC.

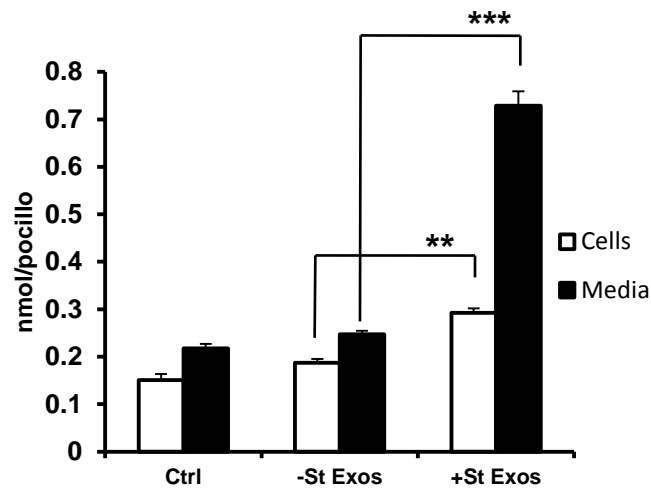


Figura 57 - Los exosomas derivados de células H9c2 con ayuno de glucosa incrementan la cantidad de Piruvato sintetizado en cultivos de HUVEC. Cuantificación de la cantidad de Piruvato para células HUVEC luego de tratarlas durante 30 min. con el total de la fracción exosomal obtenida desde 100 ml el medio de cultivo de H9c2 con o sin 48h de ayuno de glucosa (+/- St Exos). Ctrl: control, se agregó 100 μ l de PBS al medio de las HUVEC. Las barras blancas representan el Piruvato celular y las barras negras el Piruvato liberado al medio de cultivo. La gráfica muestra el promedio de dos experimentos independientes.

5. Discusión

A- Los exosomas como estrategia terapéutica en terapia celular cardíaca

Las terapias avanzadas con células madre adultas han abierto nuevas posibilidades de tratamiento de enfermedades hasta ahora incurables, como el infarto de miocardio, pero han generado muchas incógnitas sobre su eficacia y sobre las estrategias más adecuadas para poder llevarlas a cabo en el ámbito clínico. Como se comentó en el capítulo de introducción, el principal mecanismo terapéutico de las células madre adultas de tipo mesenquimatoso es el efecto paracrino, por lo que en la primera parte de este trabajo se profundizó en dichos mecanismos, estudiados desde el punto de vista de la comunicación celular. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que la sobreexpresión de HIF-1 α en células de tipo MSC es capaz de potenciar su capacidad terapéutica con respecto a las MSC nativas cuando ambos tipos celulares son trasplantados en un modelo de IAM en rata (146). Puesto que no se observaron fenómenos de transdiferenciación en las células trasplantadas pensamos que tanto las MSC como las MSC-HIF podrían estar ejerciendo su efecto terapéutico, al menos en parte y siendo consistentes con la hipótesis paracrina, a través de la liberación de exosomas. Para verificar esta hipótesis estudiamos la capacidad de las MSC y las MSC-HIF de responder a estímulos externos utilizando exosomas como mecanismo de comunicación celular. Para ello se aislaron los exosomas secretados por ambos tipos celulares en condiciones normales y de estrés (baja concentración de oxígeno), y se analizaron a nivel de contenido de miRNA. Entre los resultados de este apartado destaca el cambio reproducible en los patrones de miRNA exosomales cuando sometemos los cultivos a las diferentes condiciones experimentales (normoxia e hipoxia). Creemos que este fenómeno puede interpretarse como un mecanismo de respuesta desde las células hacia su entorno. En concreto, es interesante destacar que para las MSC 33 de los 44 miRNA compartidos en normoxia e hipoxia se encuentran up-regulados en hipoxia y ninguno de los 44 aparece down-regulado. Aparentemente algún mecanismo subyacente estaría cargando los exosomas con mayor cantidad de miRNA cuando las células están en hipoxia. De acuerdo con el análisis realizado en la sección anterior, creemos que la elevación general de los niveles de sumoilación de proteínas cuando se someten las células a hipoxia podrían incrementar la cantidad de miRNA exosomales para esta condición mediante sumoilación de hnRNPA2B1, como se explica más adelante en la sección B.

Si bien el análisis anterior también es aplicable a las MSC-HIF, es decir, al someter las MSC-HIF a normoxia o hipoxia fueron detectados cambios en los patrones de miRNA exosomales, en este caso, observamos que los patrones de expresión se parecen más entre sí que en el caso

de las MSC. Para las MSC-HIF en hipoxia solo se detectan 4 miRNA exclusivos de esa condición. Más interesante aun, es el de dato de que, de los 44 miRNA compartidos entre las dos condiciones, 33 permanecieron constantes, mientras que en las MSC de los 44 miRNA compartidos 33 fueron los que se up-regularon. Si tenemos en cuenta que HIF1a es el principal efector a la hora de responder ante una situación de hipoxia, cabe esperar que las MSC-HIF, al expresar HIF-1 α de manera constitutiva, presenten una preadaptación a la hipoxia, con lo que la respuestas adaptativa de estas células hacia el entorno será menos radical cuando se las someta a hipoxia si tomamos como punto de comparación la respuesta que generarían las MSC.

En cuanto a las características de los miRNA encontrados en los exosomas, podemos destacar que cultivar las MSC en hipoxia tuvo como consecuencia la liberación de miRNA exosomales que se regulan en hipoxia. Luego, exosomas derivados de MSC-HIF cultivadas en normoxia, pero no de MSC, contiene el miRNA-93 que ha sido descrito como pro-angiogénico (147) y el miRNA-193 que ha sido vinculado con la proliferación de las MSC (148). También hemos detectado el miRNA-106b que ha sido asociado a la regulación de HIF-1 α (149). Además, cultivar las MSC-HIF en hipoxia genero exosomas cargados con el miRNA-138, que es un regulador negativo de la apoptosis (150), el miRNA-29c, un miRNA antifibrótico que afecta directamente la expresión de genes de matriz extracelular reduciendo la fibrosis (151) y el miRNA-424 que ha sido descrito como pro-angiogénico y es inducido durante la hipoxia en células endoteliales (152). Tomados en conjunto estos resultados indican que la combinación de la sobreexpresión de HIF-1 α en MSC con el cultivo en bajas tensiones de oxígeno inducen la producción de exosomas cargados con miRNA antifibróticos y pro-angiogénicos, que siendo consistentes con la hipótesis paracrina podrían ser utilizados como estrategia terapéutica en terapias regenerativas. De esta manera, se realizó un experimento para probar el potencial terapéutico de los exosomas liberados por las MSC y las MSC-HIF en hipoxia, en el cual se inyectaron dichos exosomas de manera intramiocárdica luego de realizar un IAM experimental en rata. Contrariamente a lo esperado, no se observaron efectos terapéuticos de los exosomas derivados de las MSC y MSC-HIF luego de 15 días de realizarse el experimento posiblemente debido a que la permanencia de los exosomas en la zona de interés haya sido demasiado breve.

Trabajos recientes, tratan sobre el gran potencial de los exosomas como mecanismo paracrino en las terapias celulares. Inclusive varios de ellos proponen inyectar exosomas derivados de células utilizadas en terapia celular cardíaca (MSC, CD34+, cardioesfereas) de manera intramiocárdica luego de un IAM (153, 154). Estos trabajos concentran sus esfuerzos en intentar centrar el potencial terapéutico aparente de los exosomas en un solo tipo molécula

transportada, como por ejemplo un miRNA (154). Creemos que es poco probable que la enorme complejidad de moléculas transportadas por los exosomas pueda reducirse al potencial de solo una, justamente por definición los exosomas son estructuras diseñadas para transportar cientos de miRNA, mRNA y proteínas y entendemos que el atractivo de dicho mecanismo de comunicación reside en la direccionalidad y combinación de moléculas transportadas.

Conocer los mecanismos mediante los cuales las MSC producen sus efectos terapéuticos es esencial para poder potenciar su capacidad. Creemos que al menos en parte, los efectos terapéuticos observados por las terapias con MSC pueden deberse a los efectos paracrinos desencadenados por los exosomas que liberan las MSC. De hecho algunos trabajos apoyan esta hipótesis (116, 155).

B- Comunicación entre células cardiacas y endoteliales mediada por exosomas

Estudios de microscopia electrónica a nivel de ultraestructura cardiaca revelan una intrínseca relación anatómica entre los CM y las células endoteliales. El pequeño espacio perivascular de aproximadamente una micra que separa ambos tipos celulares en el músculo cardiaco es crucial para el constante tráfico de información en forma de metabolitos, nutrientes y oxígeno. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario del corazón, el endotelio cardiaco produce varios tipos de neuroregulinas y los cardiomiocitos expresan el receptor para la neuroregulina. Esta señal paracrina es fundamental para la formación trabecular del corazón (156). De la misma manera, se ha propuesto que el gen supresor de tumores neurofibromatoso de tipo 1 (NF1) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas PDGF-B, ambos producidos por el endotelio cardiaco, son cruciales para el normal desarrollo de los cardiomiocitos durante las etapas tempranas de formación del corazón (157, 158). Por otro lado, también durante el desarrollo, se conocen varios factores derivados de los CM que alteran la función endotelial. Por ejemplo, el factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) secretado por los cardiomiocitos es necesario para la formación de la microvasculatura cardiaca, pero no para la formación de la circulación coronaria superior, lo que sugiere mecanismos diferentes para generar dichas estructuras, siendo la formación microvascular un proceso más dependiente de la comunicación CM-EC a distancias cortas (159). En el corazón adulto, también se conocen procesos de comunicación CM-EC de importancia durante la reparación del tejido cardiaco dañado. Existen evidencias que sostienen que las células endoteliales pueden promover la supervivencia de los CM (160). De hecho se ha comprobado que la neuroregulina secretada por el endotelio microvascular es un factor de supervivencia para los CM a través de la activación de la vía de PI3K-Akt.

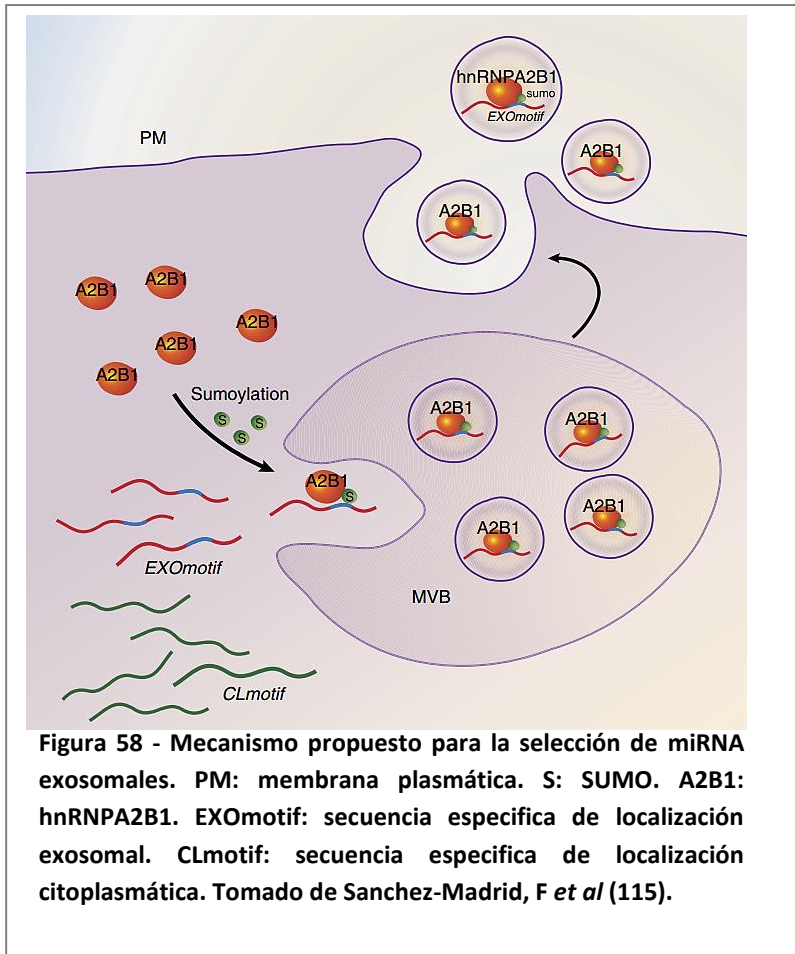
En el presente trabajo se ha estudiado la comunicación entre el CM y la célula endotelial en un contexto metabólico, proponiendo a los exosomas como mecanismo de comunicación cardio-endotelial en un modelo de regulación del transporte de nutrientes a corta distancia desde las células endoteliales hacia los CM.

En primer lugar se constató que los CM son capaces de secretar exosomas al medio de cultivo, lo que corroboró lo que estudios previos habían descrito (117, 161). Además, en otros trabajos se ha observado que los exosomas derivados de los CM contienen DNA y mRNA y son capaces de alterar la actividad transcripcional de fibroblastos.

La posible existencia de un mecanismo de regulación a corta distancia mediado por exosomas entre los CM y las ECs en un contexto metabólico, nos llevó en primera instancia a estudiar la secreción de exosomas de un cultivo de CM. En concreto encontramos que el ayuno de glucosa estimula tanto la síntesis como la secreción de exosomas por parte de los CM, en lo que creemos podría interpretarse como la intensificación de un mecanismo de comunicación intercelular. Es interesante destacar que hemos observado la activación de genes relacionados con la secreción de exosomas (Pld2, Rab27a y Rab27b) cuando los CM fueron privados de glucosa. La privación de glucosa en cultivos de CM desencadena una amplia gama de señales de entre las cuales la autofagia es una de las más importantes. La autofagia es un proceso que puede promover la muerte o la supervivencia celular dependiendo de cuál sea la situación que la induce (162). Está ampliamente estudiado que durante el estrés producido por la falta de nutrientes la inducción de la autofagia en las células es fundamental para la supervivencia. Inclusive, en cardiomiocitos adultos, se ha demostrado que la reducción de la autofagia es perjudicial para la supervivencia de las células en situaciones falta de nutrientes (163). La autofagia en si, es el reciclaje de los organulos y restos celulares, mediante su incorporación a vesículas de doble membrana y fusión de estas con lisosomas para degradación y reaprovechamiento de las moléculas obtenidas. De esta manera durante periodos prolongados de escasez de nutrientes, la autofagia puede proveer a las células de combustibles metabólicos reciclados. Es interesante destacar que la autofagia está íntimamente relacionada con la formación de MVBs (164), las mismas estructuras que se encargan de la secreción de los exosomas via Rab27a y Rab27b. Sería posible que la inducción de autofagia generada en los CM debido a la ausencia de glucosa esté relacionada con el incremento en la secreción de exosomas que observamos. Siendo consistentes con esta hipótesis, un trabajo de Gupta y Knowlton (165), ha demostrado que el estrés inducido por la hipoxia incrementa la secreción de exosomas de un cultivo de CM adultos de rata. Como primer evidencia *in vivo*, un trabajo reciente ha demostrado mediante estudios de ME la presencia de exosomas en cardiomiocitos humanos y de ratón (166).

El aporte de nutrientes al corazón debe ser continuo y regulado, y las células encargadas de transportar los nutrientes hacia los cardiomiocitos son las células que componen en endotelio microvascular coronario. Por esta razón, nos planteamos la posibilidad de que las señales de estrés inducidas en los cardiomiocitos por el ayuno de glucosa, generarían una respuesta mediada por exosomas que se dirigirían hacia las células endoteliales llevando consigo un mensaje concreto que fuera funcional a las necesidades metabólicas de los propios cardiomiocitos. Para esto, en primer lugar demostramos que células endoteliales son capaces de captar exosomas provenientes desde los CM, es más, como esperábamos, observamos una

intensificación en el tráfico de exosomas desde los CM hacia las ECs cuando los cultivos fueron privados de glucosa, posiblemente debido al incremento en la secreción de exosomas por parte de los CM. Una vez comprobada la existencia del tráfico de exosomas entre los CM y las ECs nos propusimos estudiar el mensaje contenido en los exosomas derivados de los CM. A nivel de miRNA exosomales, en primera



instancia es interesante destacar que observamos un cambio reproducible en los patrones de miRNA contenidos en los exosomas cuando los cultivos fueron privados o no de glucosa, lo cual creemos que puede interpretarse como unos mecanismos de repuesta de los CM que potencialmente podría dirigirse hacia las ECs. Varios de los miRNA que solo aparecieron en exosomas de CM ayunados de glucosa están directamente relacionados con el metabolismo de la glucosa. Por ejemplo, el miRNA-223 ha sido descrito como regulador del metabolismo de la glucosa en CM y está directamente relacionado con el incremento en la captación de glucosa por aumento de cantidad de GLUT4 (167). Se ha descrito que el miRNA-21 se sobreexpresa en respuesta a altas concentraciones de glucosa y que protege a las células endoteliales de la apoptosis inducida por la citotoxicidad generada por las altas concentraciones de glucosa (129). Nos planteamos la posibilidad que este miRNA se dirija vía exosomas hacia las células endoteliales y las proteja frente a un inminente incremento en la cantidad glucosa. El hecho de que se produzca un cambio en los patrones de miRNA exosomales en función de la disponibilidad de glucosa de los CM, deja implícito un mecanismo molecular capaz de seleccionar de manera específica diferentes miRNA y empaquetarlos o no en exosomas en función de la condición experimental. Un trabajo reciente de Sánchez-Madrid (115), propone un mecanismo para realizar dicha selección. Los miRNA exosomales tendrían secuencias

específicas que los marcarían como de localización exosomal. Estas secuencias son reconocidas de manera específica por la ribonucleoproteína nuclear heterogénea A2B1 (hnRNPA2B1) solo en su estado sumoilado. De esta manera la sumoilación juega un papel fundamental en la selección de los miRNA exosomales (Figura 58). La sumoilación es una modificación postraduccional mediante la cual algunas de las proteínas celulares son covalentemente modificadas mediante la adición de otra pequeña proteína (de peso molecular 11 kDa) llamada SUMO (small ubiquitin-related modifier). Es interesante destacar que en general observamos mayor cantidad de miRNA exosomales cuando los CM fueron privados de glucosa. Incluso para los miRNA que aparecen en las dos condiciones (+/- St) hay mayor abundancia relativa de los miRNA en +St. Creemos que este fenómeno puede relacionarse con la evidencia aportada por algunos estudios que han demostrado un incremento general de la sumoilación de las proteínas cuando se someten las células a estrés, como mecanismo de adaptación y supervivencia celular (168-170). Así, el estrés inducido en los CM por la ausencia de glucosa estimularía la sumoilación de hnRNPA2B1 lo que se reflejaría en una mayor cantidad de miRNA en los exosomas. No hay que dejar de lado que cuando ayunamos de glucosa a los CM observamos una marcada activación a nivel transcripcional para el gen *Gors1*, el cual está considerado como un componente esencial del complejo receptor Golgi SNAP (SNARE) para el tráfico vesicular intracelular.

En cuanto las proteínas identificadas en los exosomas derivados de los CM, al realizar el análisis proteómico, también encontramos un cambio aparente en la composición proteica en función de la disponibilidad de glucosa en el medio de cultivo. Al igual que para los miRNA, parece que el ayuno de glucosa incrementa la cantidad de proteínas contenidas en los exosomas (Figura 45). Es interesante destacar, que algunas de las proteínas identificadas por el estudio proteómico están relacionadas con la ruta de la glicolisis (GAPDH, LDH, PKB). Un trabajo de Agbor TA *et al.* (170), ha demostrado que el estrés inducido por la hipoxia conlleva la sumoilación de varias enzimas glicolíticas, lo que creemos que quizás podría estar relacionado con el aumento general de proteínas observado de los exosomas de los CM con estrés inducido por ayuno de glucosa.

De esta sección cabe resaltar el concepto de que una modificación postraduccional (inducida por el estrés en los CM) quizás este ejerciendo un papel importante en la selección de componentes con los cuales se cargan los exosomas. Posiblemente estos lleven determinadas proteínas de superficie que sean selectivamente incluidas para direccionar el tráfico de los exosomas una vez que han dejado su célula de origen.

Nuestros resultados parecían apuntar a que los exosomas derivados de los CM son capaces de enviar un mensaje concreto a las ECs, por lo que nos propusimos estudiar las consecuencias que estos exosomas tenían sobre la actividad de las ECs. A nivel transcripcional vimos que los exosomas derivados de los CM ayunados de glucosa inducían la expresión de genes protectores frente altas concentraciones de glucosa en las ECs. A nivel de rutas de señalización, estos exosomas activaron señales relacionadas con el metabolismo de la glucosa (Akt y Erk) en HUVEC. A grandes rasgos, existía la posibilidad que los exosomas derivados de los cardiomiocitos estuvieran informando su situación metabólica a las ECs las cuales son responsables del transporte de combustibles, por lo que fue lógico estudiar la posibilidad de que estos exosomas alteraran el transporte de nutrientes en las ECs con la finalidad de abastecer a los propios CM.

Estudios previos han evidenciado el tráfico de proteínas entre las células mediado por exosomas (171). De la misma manera, estudios previos han identificado la posible presencia de GLUTs en exosomas, por lo cual nos planteamos la posibilidad de que los CM transfirieran GLUTs via exosomas a las ECs. En primer lugar demostramos que los exosomas solo de CM ayunados de glucosa poseen GLUTs, lo que deja implícito nuevamente una selección activa y específica de las proteínas con las cuales se cargan los exosomas. Creemos que de alguna manera el estrés inducido en los CM por la falta de glucosa genera una convergencia entre la ruta de tráfico intracelular de GLUTs y la ruta de secreción de exosomas que ya de por si están relacionadas en varios aspectos. Cuando ayunamos los CM vimos sobreexpresión del gen que codifica para la proteína SNARE VAMP2 y también para ANF. Cabe destacar que VAMP2 está íntimamente relacionado con el tráfico de GLUT4 (122). Además, se ha descrito que GLUT4 es capaz de ingresar en los gránulos de la vía secretora de ANF a nivel del retículo del trans-Golgi (TGR) en cardiomiocitos auriculares de rata (125). Así también, estudios previos han relacionado a VAMP2 con la liberación de ANF y el tráfico de GLUT4 (126, 127). Por último, debemos tener en cuenta que si bien a día de hoy no se conoce por completo el mecanismo que regula el tráfico intracelular de GLUTs, se ha descrito que la sumoilación y la ubiquitinación de los GLUTs son esenciales para el correcto direccionamiento de los transportadores durante el tráfico (172-175). De esta manera, sería posible que el estrés inducido en los CM por la falta de glucosa genere señales potencialmente mediadas por sumoilación, que dirijan el tráfico de los GLUTs hacia la vía de secreción de exosomas.

En este punto, nos planteamos la posibilidad de que los CM con necesidades metabólicas generadas por la falta de glucosa alteraran la captación de glucosa de ECs, al transferir GLUTs mediante exosomas. En primer lugar demostramos la existencia de tráfico de GLUTs entre los

CM y las ECs dependiente de la disponibilidad de glucosa en el medio de cultivo. Luego uno de los resultados más relevantes de este estudio, fue el marcado incremento que observamos en la captación de glucosa de ECs cuando estas fueron tratadas con exosomas derivados de CM ayunados. Al inhibir con Fasentin los GLUTs exosomales derivados de los CM no observamos un incremento en la captación de glucosa de las ECs, lo que evidencia que en mayor medida el resultado obtenido es dependiente del tráfico de GLUTs vía exosomas entre los CM y las ECs.

Por último, nos planteamos cómo los CM podrían aprovechar este incremento de glucosa generado en las ECs. Los resultados del estudio proteómico nos llevaron a identificar la presencia de GAPDH y LDH en exosomas derivados de CM. Las células endoteliales obtienen la mayor parte de la energía necesaria realizando glicólisis aeróbica (141). En este proceso, aunque la célula disponga de cantidades suficientes de oxígeno, oxida la glucosa hasta Piruvato y rápidamente la LDH genera lactato a partir del piruvato para mantener un flujo constante de la vía glicolítica (142). Por el contrario la LDH cardiaca funciona de manera inversa, sintetizando piruvato a partir de lactato. Creemos que el aumento observado en la cantidad de Piruvato en las ECs luego de tratarlas con exosomas derivados de H9c2, es consecuencia del incremento en la captación de glucosa y del trabajo cooperativo entre la LDH propia del endotelio y la LDH cardiaca aportada vía exosomas. La LDH endotelial generaría lactato a partir del Piruvato manteniendo un intenso flujo de la vía glicolítica, al mismo tiempo que la LHD cardiaca aportada por los exosomas, quizás en una disposición espacial específica en las ECs utilizaría el lactado de la reacción anterior para generar Piruvato que al no ser utilizado por las ECs finalmente difundiría dirigiéndose hacia los CM para ser oxidado en el ciclo de Krebs.

Por todo lo anteriormente expuesto, proponemos un modelo de comunicación cardio-endotelial mediado por exosomas, en el cual el tráfico de proteínas desde los CM hacía las ECs trasladarían las necesidades metabólicas de los CM a las ECs las cuales están en contacto directo con los nutrientes presentes en el flujo coronario.

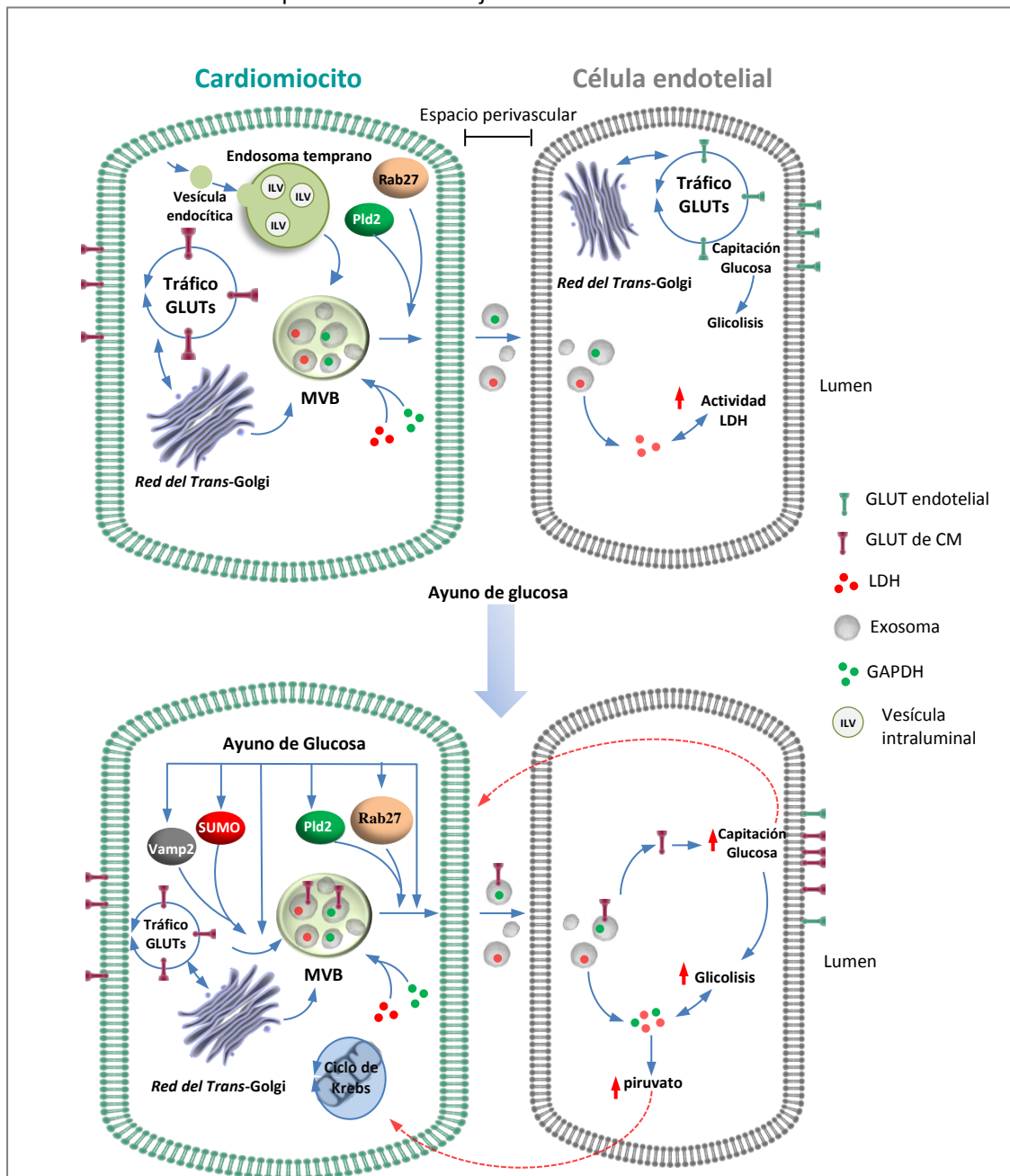


Figura 59 - Modelo de comunicación metabólica entre los CM y las ECs mediado por exosomas.

El esquema muestra el íntimo contacto entre CMs y ECs, el cual es fundamental para el acoplamiento metabólico. En la presencia de niveles apropiados de glucosa en los CMs, hay un tráfico basal de exosomas desde los CMs hacia las ECs. En estas condiciones el tráfico intracelular de GLUTs es independiente de la vía de secreción de exosomas por lo que los exosomas no contienen GLUTs. Las señales de estrés desencadenadas por el ayuno de glucosa inducen un incremento en la secreción de exosomas en los CMs y un acoplamiento entre la vía de secreción de exosomas y el tráfico vesicular de los GLUTs, potencialmente mediado por moléculas como PLD2/Rab27 y VAMP2, respectivamente. Así, los GLUTs transportados desde los CMs hacia las ECs via exosomas, son capaces de incrementar la captación de glucosa y la actividad glicolítica de las ECs.

En nuestro modelo el ayuno de glucosa de los CM desencadena señales de estrés metabólico, posiblemente mediadas por AMPK, que en conjunción con la maquinaria de secreción de exosomas (Rabs) incrementan la síntesis y secreción de exosomas de los CM. Al mismo tiempo, las señales desencadenadas por el estrés, probablemente mediante sumoilación, carguen los exosomas de manera selectiva con una batería de moléculas específicas (mRNAs, miRNA y proteínas) que aporten una identidad característica a estos exosomas, dirigiéndolos hacia un destino en concreto y con una función determinada. En este caso, los exosomas derivados de los cardiomiocitos se dirigen a su célula endotelial asociada llevando consigo transportadores de glucosa y enzimas glicolíticas que tienen como finalidad dotar al propio CM de combustible metabólico. Este novedoso mecanismo de acción a corta distancia revela una relación intrínseca entre la demanda de glucosa de los CM y el transporte de glucosa de las ECs permitiendo una rápida respuesta desde las ECs al incrementar la cantidad de transportadores de glucosa sin necesidad de síntesis de novo ni de transcripción de genes.

Es sabido que aproximadamente el 60% de la energía que consume el corazón es producto de la oxidación de ácidos grasos, dejando el 40% restante a la oxidación de glucosa, pero poco se conoce acerca de los mecanismos que regulan esta selección diferencial de combustibles metabólicos. Mantener estos porcentajes de selección de nutrientes es fundamental para lograr el normal funcionamiento del corazón. En condiciones patológicas este balance se ve afectado en un proceso llamado remodelado metabólico y actualmente no se comprende si este remodelado es perjudicial o beneficioso para el corazón (176). Hay evidencias que sostienen que el cambio de preferencia en un corazón hipertrófico desde oxidar ácidos grasos a oxidar glucosa genera una eficiencia en la cantidad de oxígeno utilizado en relación al ATP producido lo cual es beneficioso en un entorno isquémico en donde la cantidad de oxígeno se encuentra disminuida (177-179). Por esto, varias terapias actuales se basan en controlar el proceso de remodelado metabólico. Por ejemplo, medicamentos como Etomoxir, inhiben la enzima CPT1 (carnitina palmitoiltransferasa 1) que es la encargada de dirigir el transporte de ácidos grasos hacia las mitocondrias. Como consecuencia de la inhibición de CPT1 se ha observado una disminución en la utilización de ácidos grasos por parte de los CM y un incremento en la utilización de glucosa como combustible metabólico. Tratamientos a largo plazo con este tipo de drogas en corazones con sobrecarga de presión se han relacionado con una mejora en la capacidad funcional cardíaca (180). Otro medicamento similar al Etomoxir, la Perhexilina ha demostrado resultados semejantes (181). Otra estrategia es inhibir la actividad Piruvato quinasa deshidrogenasa (PDK), que tiene como consecuencia un incremento en la actividad Piruvato deshidrogenasa (PDH) lo que promueve la oxidación de la glucosa. El

dicloroacetato (DCA) tiene este efecto y se ha visto que mejora la función cardiaca en corazones hipertróficos (160, 182, 183).

Comprender los mecanismos mediante los cuales los CM mantienen sus necesidades metabólicas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas es crucial para desarrollar estrategias terapéuticas. Junto con la evidencia de que el incremento en la utilización de glucosa es beneficioso para corazones hipertróficos, la manipulación farmacológica del modelo propuesto en el presente estudio puede servir como punto de partida para futuros tratamientos. Por ejemplo, la Metformina es una droga ampliamente utilizada para el tratamiento de la Diabetes desde la década de los 50's y al día de hoy no se conoce en detalle su mecanismo de acción. La Metformina actúa principalmente reduciendo la gluconeogénesis y la glucogenolisis hepática, pero también reduce la absorción de glucosa por parte del tracto gastrointestinal a la vez que incrementa la sensibilidad a la insulina por medio del aumento en la utilización de la glucosa por parte de tejidos periféricos, al aumentar la actividad PI3k del receptor de insulina (184). Es un inductor de autofagia porque activa directamente AMPK, por lo cual creemos que parte sus efectos podrían relacionarse con el mecanismo propuesto en este trabajo. Es interesante destacar que en estudios animales de fallo cardiaco la Metformina mejora la función del ventrículo izquierdo y el remodelado mientras que reduce la acumulación miocárdica de lípidos y la fibrosis (185, 186).

6. Conclusiones

Conclusiones

- Las MSC y las MSC-HIF son capaces de producir exosomas en cultivo.
- Las poblaciones de miRNA presentes exosomas derivados de MSC y MSC-HIF cambian de manera reproducible en función de la disponibilidad de oxígeno que tienen las células en lo que interpretamos como un mecanismo respuesta celular mediada por exosomas.
- En las MSC-HIF la combinación de la sobreexpresión de HIF-1 α con las bajas tenciones de oxígeno logran que los exosomas que secretan las células se cargen con miRNA con potencial terapéutico para el tratamiento del IAM.
- En las condiciones experimentales empleadas los exosomas derivados de MSC o MSC-HIF no fueron capaces de mejorar la función cardíaca en un modelo de infarto experimental en rata.
- El ayuno de glucosa incrementa la síntesis y secreción de exosomas en cultivos de CM neonatales de rata.
- Las poblaciones de miRNA presentes exosomas derivados de CM neonatales de rata cambian de manera reproducible en función de la disponibilidad de glucosa en el medio de cultivo en lo que interpretamos como un mecanismo respuesta celular mediada por exosomas.
- Existe tráfico de exosomas desde los CM hacia las células endoteliales en cultivo, siendo la intensidad del tráfico dependiente de la disponibilidad de glucosa de las células.
- Los CM con estrés inducido por la falta de glucosa son capaces de enviar transportadores de glucosa tipo GLUT1 y GLUT4 mediante exosomas hacia las células endoteliales, en donde estos transportadores son capaces de incrementar la captación de glucosa.

- Los CM son capaces de enviar LDH y GAPDH mediante exosomas hacia células endoteliales, lo que en combinación con el incremento de glucosa generado por el tráfico de GLUTs, ocasiona un incremento en la actividad glicolítica de las células endoteliales.
- Existe una relación intrínseca entre la demanda metabólica de los CM y el transporte de glucosa de las células endoteliales, en donde los CM, en función de sus necesidades metabólicas, son capaces de alterar el transporte de nutrientes de las ECs mediante el tráfico de proteínas específicas mediado por exosomas.

7. Bibliografía

Bibliografía

1. Stenmark H (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8):513-525.
2. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, & Dzau VJ (2008) Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research* 103(11):1204-1219.
3. Predescu D, Predescu S, & Malik AB (2002) Transport of nitrated albumin across continuous vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21):13932-13937.
4. Komaru T, Kanatsuka H, & Shirato K (2000) Coronary microcirculation: physiology and pharmacology. *Pharmacology & therapeutics* 86(3):217-261.
5. Duncker DJ & Bache RJ (2008) Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiological reviews* 88(3):1009-1086.
6. Armour JA (1999) Myocardial ischaemia and the cardiac nervous system. *Cardiovascular research* 41(1):41-54.
7. Gorman MW, Tune JD, Richmond KN, & Feigl EO (2000) Quantitative analysis of feedforward sympathetic coronary vasodilation in exercising dogs. *Journal of applied physiology* 89(5):1903-1911.
8. Hsieh PC, Davis ME, Lisowski LK, & Lee RT (2006) Endothelial-cardiomyocyte interactions in cardiac development and repair. *Annu Rev Physiol* 68:51-66.
9. Doenst T, Nguyen TD, & Abel ED (2013) Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circulation research* 113(6):709-724.
10. Kolwicz SC, Jr. & Tian R (2011) Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research* 90(2):194-201.
11. Shipp JC, Opie LH, & Challoner D (1961) Fatty acid and glucose metabolism in the perfused heart.
12. Breuer E, Barta E, Zlatos L, & Pappova E (1968) Developmental changes of myocardial metabolism. II. Myocardial metabolism of fatty acids in the early postnatal period in dogs. *Biologia neonatorum. Neo-natal studies* 12(1):54-64.
13. Warsaw JB (1972) Cellular energy metabolism during fetal development. IV. Fatty acid activation, acyl transfer and fatty acid oxidation during development of the chick and rat. *Developmental biology* 28(4):537-544.
14. Wallhaus TR, *et al.* (2001) Myocardial free fatty acid and glucose use after carvedilol treatment in patients with congestive heart failure. *Circulation* 103(20):2441-2446.
15. Davila-Roman VG, *et al.* (2002) Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 40(2):271-277.
16. Nascimben L, *et al.* (2004) Mechanisms for increased glycolysis in the hypertrophied rat heart. *Hypertension* 44(5):662-667.
17. Allard MF, *et al.* (2000) Hypertrophied rat hearts are less responsive to the metabolic and functional effects of insulin. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 279(3):E487-493.
18. Wall SR & Lopaschuk GD (1989) Glucose oxidation rates in fatty acid-perfused isolated working hearts from diabetic rats. *Biochimica et biophysica acta* 1006(1):97-103.
19. Rider OJ, Cox P, Tyler D, Clarke K, & Neubauer S (2013) Myocardial substrate metabolism in obesity. *International journal of obesity* 37(7):972-979.
20. Peterson LR, *et al.* (2008) Impact of gender on the myocardial metabolic response to obesity. *JACC. Cardiovascular imaging* 1(4):424-433.

21. Viljanen AP, *et al.* (2009) Effect of caloric restriction on myocardial fatty acid uptake, left ventricular mass, and cardiac work in obese adults. *The American journal of cardiology* 103(12):1721-1726.
22. Lloyd-Jones D, *et al.* (2009) Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119(3):480-486.
23. Arnolda LF, Llewellyn-Smith IJ, & Minson JB (1999) Animal models of heart failure. *Australian and New Zealand journal of medicine* 29(3):403-409.
24. Monnet E & Chachques JC (2005) Animal models of heart failure: what is new? *The Annals of thoracic surgery* 79(4):1445-1453.
25. Libby P & Theroux P (2005) Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 111(25):3481-3488.
26. Glass CK & Witztum JL (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104(4):503-516.
27. Furie B & Furie BC (2008) Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine* 359(9):938-949.
28. Prinzmetal M, Schwartz LL, & et al. (1949) Studies on the coronary circulation; loss of myocardial contractility after coronary artery occlusion. *Annals of internal medicine* 31(3):429-449.
29. Sutton MG & Sharpe N (2000) Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 101(25):2981-2988.
30. Frantz S, Bauersachs J, & Ertl G (2009) Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovascular research* 81(3):474-481.
31. Karlstadt A, *et al.* (2012) CardioNet: a human metabolic network suited for the study of cardiomyocyte metabolism. *BMC systems biology* 6:114.
32. Rosano GM, Fini M, Caminiti G, & Barbaro G (2008) Cardiac metabolism in myocardial ischemia. *Current pharmaceutical design* 14(25):2551-2562.
33. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, & Bassand JP (2000) Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 36(3):959-969.
34. Channer K & Morris F (2002) ABC of clinical electrocardiography: Myocardial ischaemia. *Bmj* 324(7344):1023-1026.
35. Morris F & Brady WJ (2002) ABC of clinical electrocardiography: Acute myocardial infarction-Part I. *Bmj* 324(7341):831-834.
36. Babuin L & Jaffe AS (2005) Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 173(10):1191-1202.
37. Jiang BH, Nguyen QT, Tardif JC, Shi Y, & Dupuis J (2011) Single measurement of troponin T for early prediction of infarct size, congestive heart failure, and pulmonary hypertension in an animal model of myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 20(3):e85-89.
38. Gao F, *et al.* (2007) A promising strategy for the treatment of ischemic heart disease: Mesenchymal stem cell-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer in rats. *The Canadian journal of cardiology* 23(11):891-898.
39. Anderson JL, *et al.* (2011) 2011 ACCF/AHA Focused Update Incorporated Into the ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 123(18):e426-579.
40. Kjekshus JK (1986) Importance of heart rate in determining beta-blocker efficacy in acute and long-term acute myocardial infarction intervention trials. *The American journal of cardiology* 57(12):43F-49F.

41. Alhaddad IA, Tkaczewski L, Siddiqui F, Mir R, & Brown EJ, Jr. (1995) Aspirin enhances the benefits of late reperfusion on infarct shape. A possible mechanism of the beneficial effects of aspirin on survival after acute myocardial infarction. *Circulation* 91(11):2819-2823.
42. Mahmarian JJ, *et al.* (1998) Transdermal nitroglycerin patch therapy improves left ventricular function and prevents remodeling after acute myocardial infarction: results of a multicenter prospective randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 97(20):2017-2024.
43. Jeremy RW, Hackworthy RA, Bautovich G, Hutton BF, & Harris PJ (1987) Infarct artery perfusion and changes in left ventricular volume in the month after acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 9(5):989-995.
44. Sakai S, *et al.* (2003) Morphologic changes in infarct-related plaque after coronary stent placement: a serial angioscopy study. *Journal of the American College of Cardiology* 42(9):1558-1565.
45. Lindenfeld J, *et al.* (2005) Drug therapy in the heart transplant recipient: Part III: common medical problems. *Circulation* 111(1):113-117.
46. Beltrami AP, *et al.* (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114(6):763-776.
47. Bergmann O, *et al.* (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324(5923):98-102.
48. Friedenstein AJ, *et al.* (1974) Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2(2):83-92.
49. Pittenger MF, *et al.* (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143-147.
50. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, & Prockop DJ (2002) In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7):4397-4402.
51. Wagner W, *et al.* (2005) Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33(11):1402-1416.
52. Rasmusson I (2006) Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 312(12):2169-2179.
53. Arminan A, *et al.* (2010) Mesenchymal stem cells provide better results than hematopoietic precursors for the treatment of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 55(20):2244-2253.
54. Gnecci M, *et al.* (2005) Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 11(4):367-368.
55. Pillai RS (2005) MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *Rna* 11(12):1753-1761.
56. Zhao Y & Srivastava D (2007) A developmental view of microRNA function. *Trends in biochemical sciences* 32(4):189-197.
57. Eulalio A, *et al.* (2007) Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* 21(20):2558-2570.
58. Small EM & Olson EN (2011) Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 469(7330):336-342.
59. Matkovich SJ, *et al.* (2009) Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation* 119(9):1263-1271.
60. Yang B, *et al.* (2007) The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 13(4):486-491.

61. Luo X, *et al.* (2008) Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *J Biol Chem* 283(29):20045-20052.
62. Thum T, *et al.* (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456(7224):980-984.
63. Care A, *et al.* (2007) MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 13(5):613-618.
64. Olson EN (2014) MicroRNAs as Therapeutic Targets and Biomarkers of Cardiovascular Disease. *Sci Transl Med* 6(239):239ps233.
65. Lin Z & Pu WT (2014) Strategies for Cardiac Regeneration and Repair. *Sci Transl Med* 6(239):239rv231.
66. Porrello ER, *et al.* (2011) MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circulation research* 109(6):670-679.
67. Eulalio A, *et al.* (2012) Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* 492(7429):376-381.
68. Chen J, *et al.* (2013) mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circulation research* 112(12):1557-1566.
69. Hancock J (2010) *Cell signalling* (Oxford University Press).
70. Errede B & Levin DE (1993) A conserved kinase cascade for MAP kinase activation in yeast. *Current opinion in cell biology* 5(2):254-260.
71. Zhang W & Liu HT (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell research* 12(1):9-18.
72. Adjei AA & Hidalgo M (2005) Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(23):5386-5403.
73. Hayward P, Kalmar T, & Arias AM (2008) Wnt/Notch signalling and information processing during development. *Development* 135(3):411-424.
74. Zhang W, Thompson BJ, Hietakangas V, & Cohen SM (2011) MAPK/ERK signaling regulates insulin sensitivity to control glucose metabolism in Drosophila. *PLoS genetics* 7(12):e1002429.
75. Alberts B, *et al.* (2013) *Essential cell biology* (Garland Science).
76. Pickett J (2007) The building blocks of the secretory pathway. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(2):94-94.
77. Hutagalung AH & Novick PJ (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological reviews* 91(1):119-149.
78. Chen YA & Scheller RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2):98-106.
79. Grant BD & Donaldson JG (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(9):597-608.
80. Hanson PI & Cashikar A (2012) Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:337-362.
81. Echard A (2012) Connecting membrane traffic to ESCRT and the final cut. *Nat Cell Biol* 14(10):983-985.
82. Oka Y, *et al.* (1990) C-terminal truncated glucose transporter is locked into an inward-facing form without transport activity. *Nature* 345(6275):550-553.
83. Stockli J, Fazakerley DJ, & James DE (2011) GLUT4 exocytosis. *J Cell Sci* 124(Pt 24):4147-4159.
84. Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, Lienhard GE, & James DE (1991) Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J Cell Biol* 113(1):123-135.

85. Martin S, *et al.* (2000) Effects of insulin on intracellular GLUT4 vesicles in adipocytes: evidence for a secretory mode of regulation. *J Cell Sci* 113 Pt 19:3427-3438.
86. Leto D & Saltiel AR (2012) Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(6):383-396.
87. Thery C, Zitvogel L, & Amigorena S (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2(8):569-579.
88. Balaj L, *et al.* (2011) Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature communications* 2:180.
89. Aliotta JM, *et al.* (2010) Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Exp Hematol* 38(3):233-245.
90. Castellana D, *et al.* (2009) Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res* 69(3):785-793.
91. Tetta C, Bruno S, Fonsato V, Deregibus MC, & Camussi G (2011) The role of microvesicles in tissue repair. *Organogenesis* 7(2):105-115.
92. Mittelbrunn M & Sanchez-Madrid F (2012) Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(5):328-335.
93. Simons M & Raposo G (2009) Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology* 21(4):575-581.
94. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, & Thery C (2011) Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic* 12(12):1659-1668.
95. Cocucci E, Racchetti G, & Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in cell biology* 19(2):43-51.
96. Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, & Boutros M (2012) Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol* 14(10):1036-1045.
97. Sharghi-Namini S, Tan E, Ong LL, Ge R, & Asada HH (2014) Dll4-containing exosomes induce capillary sprout retraction in a 3D microenvironment. *Sci Rep* 4:4031.
98. Sheldon H, *et al.* (2010) New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood* 116(13):2385-2394.
99. Andre F, *et al.* (2004) Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *J Immunol* 172(4):2126-2136.
100. Baker M, *et al.* (2012) Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat Protoc* 7(1):89-104.
101. Zhao P, *et al.* (2009) Variations in the requirement for v-SNAREs in GLUT4 trafficking in adipocytes. *J Cell Sci* 122(Pt 19):3472-3480.
102. Hemler ME (2005) Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(10):801-811.
103. Pols MS & Klumperman J (2009) Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res* 315(9):1584-1592.
104. Mittelbrunn M, *et al.* (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications* 2:282.
105. Thery C, Amigorena S, Raposo G, & Clayton A (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3:Unit 3 22.
106. Soreq H & Seidman S (2001) Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nature reviews. Neuroscience* 2(4):294-302.
107. Savina A, Vidal M, & Colombo MI (2002) The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci* 115(Pt 12):2505-2515.
108. Lancaster GI & Febbraio MA (2005) Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem* 280(24):23349-23355.

109. Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, & Tanaka N (2008) p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol* 10(5):611-618.
110. Wood TE, *et al.* (2008) A novel inhibitor of glucose uptake sensitizes cells to FAS-induced cell death. *Mol Cancer Ther* 7(11):3546-3555.
111. Rosova I, Dao M, Capoccia B, Link D, & Nolte JA (2008) Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26(8):2173-2182.
112. Lisy K & Peet DJ (2008) Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ* 15(4):642-649.
113. Pichiule P, Chavez JC, & LaManna JC (2004) Hypoxic regulation of angiopoietin-2 expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 279(13):12171-12180.
114. Kordelas L, *et al.* (2014) MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia* 28(4):970-973.
115. Villarroya-Beltri C, *et al.* (2013) Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature communications* 4:2980.
116. Lai RC, *et al.* (2010) Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 4(3):214-222.
117. Waldenstrom A, Genneback N, Hellman U, & Ronquist G (2012) Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One* 7(4):e34653.
118. King HW, Michael MZ, & Gleadle JM (2012) Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* 12:421.
119. Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, & Chen J (2001) Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294(5548):1942-1945.
120. Laulagnier K, *et al.* (2004) PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS Lett* 572(1-3):11-14.
121. Subramaniam VN, Peter F, Philp R, Wong SH, & Hong W (1996) GS28, a 28-kilodalton Golgi SNARE that participates in ER-Golgi transport. *Science* 272(5265):1161-1163.
122. Foster LJ, *et al.* (2000) A functional role for VAP-33 in insulin-stimulated GLUT4 traffic. *Traffic* 1(6):512-521.
123. de Bold AJ (1982) Atrial natriuretic factor of the rat heart. Studies on isolation and properties. *Proc Soc Exp Biol Med* 170(2):133-138.
124. Steinhilber ME, Cochrane KL, & Field LJ (1990) Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes. *Hypertension* 16(3):301-307.
125. Slot JW, *et al.* (1997) Glucose transporter (GLUT-4) is targeted to secretory granules in rat atrial cardiomyocytes. *J Cell Biol* 137(6):1243-1254.
126. Ferlito M, *et al.* (2010) VAMP-1, VAMP-2, and syntaxin-4 regulate ANP release from cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 49(5):791-800.
127. Martin LB, Shewan A, Millar CA, Gould GW, & James DE (1998) Vesicle-associated membrane protein 2 plays a specific role in the insulin-dependent trafficking of the facilitative glucose transporter GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 273(3):1444-1452.
128. Ostrowski M, *et al.* (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 12(1):19-30; sup pp 11-13.
129. Zeng J, *et al.* (2013) MiR-21 is overexpressed in response to high glucose and protects endothelial cells from apoptosis. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 121(7):425-430.
130. McGinn S, Poronnik P, Gallery ED, & Pollock CA (2004) The effects of high glucose and atorvastatin on endothelial cell matrix production. *Diabet Med* 21(10):1102-1107.

131. Yoon JC, *et al.* (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Mol Cell Biol* 20(14):5343-5349.
132. Xu A, *et al.* (2005) Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(17):6086-6091.
133. Yokouchi H, *et al.* (2013) Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) is induced by high glucose in retinal pigment epithelial cells and exhibits potent angiogenic activity on retinal endothelial cells. *Acta Ophthalmol* 91(4):e289-297.
134. Nakamura K, *et al.* (2004) Dynamic induction of ADAMTS1 gene in the early phase of acute myocardial infarction. *J Biochem* 136(4):439-446.
135. Hatipoglu OF, *et al.* (2009) ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* 284(24):16325-16333.
136. Tuo QH, *et al.* (2008) Critical role of angiopoietins/Tie-2 in hyperglycemic exacerbation of myocardial infarction and impaired angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(6):H2547-2557.
137. Tuo QH, *et al.* (2011) Angiopoietin-1 protects myocardial endothelial cell function blunted by angiopoietin-2 and high glucose condition. *Acta Pharmacol Sin* 32(1):45-51.
138. Carayon K, *et al.* (2011) Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation. *J Biol Chem* 286(39):34426-34439.
139. Buschow SI, *et al.* (2010) MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes and potential functional implications for exosome biogenesis. *Immunol Cell Biol* 88(8):851-856.
140. Conde-Vancells J, *et al.* (2008) Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res* 7(12):5157-5166.
141. Culic O, Gruwel ML, & Schrader J (1997) Energy turnover of vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 273(1 Pt 1):C205-213.
142. Parra-Bonilla G, Alvarez DF, Al-Mehdi AB, Alexeyev M, & Stevens T (2010) Critical role for lactate dehydrogenase A in aerobic glycolysis that sustains pulmonary microvascular endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299(4):L513-522.
143. Spahr R, Krutzfeldt A, Mertens S, Siegmund B, & Piper HM (1989) Fatty acids are not an important fuel for coronary microvascular endothelial cells. *Molecular and cellular biochemistry* 88(1-2):59-64.
144. Summermatter S, Santos G, Perez-Schindler J, & Handschin C (2013) Skeletal muscle PGC-1alpha controls whole-body lactate homeostasis through estrogen-related receptor alpha-dependent activation of LDH B and repression of LDH A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(21):8738-8743.
145. Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, & Magistretti PJ (1996) Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(6):1079-1089.
146. Cerrada I, *et al.* (2012) Hypoxia-inducible factor 1 alpha contributes to cardiac healing in mesenchymal stem cells-mediated cardiac repair. *Stem cells and development* 22(3):501-511.
147. Fang L, *et al.* (2012) MiR-93 enhances angiogenesis and metastasis by targeting LATS2. *Cell Cycle* 11(23):4352-4365.
148. Wang J, *et al.* (2012) MicroRNA-193 pro-proliferation effects for bone mesenchymal stem cells after low-level laser irradiation treatment through inhibitor of growth family, member 5. *Stem Cells Dev* 21(13):2508-2519.
149. Maistrovski Y, Biggar KK, & Storey KB (2012) HIF-1alpha regulation in mammalian hibernators: role of non-coding RNA in HIF-1alpha control during torpor in ground

- squirrels and bats. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 182(6):849-859.
150. Li S, *et al.* (2013) MicroRNA-138 plays a role in hypoxic pulmonary vascular remodelling by targeting Mst1. *Biochem J* 452(2):281-291.
 151. Fang Y, *et al.* (2013) miR-29c is downregulated in renal interstitial fibrosis in humans and rats and restored by HIF- α activation. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 304(10):F1274-F1282.
 152. Ghosh G, *et al.* (2010) Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-alpha isoforms and promotes angiogenesis. *J Clin Invest* 120(11):4141-4154.
 153. Sahoo S, *et al.* (2011) Exosomes from human CD34(+) stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circulation research* 109(7):724-728.
 154. Ibrahim AG, Cheng K, & Marban E (2014) Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem cell reports* 2(5):606-619.
 155. Lai RC, Chen TS, & Lim SK (2011) Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regenerative medicine* 6(4):481-492.
 156. Marchionni MA (1995) Cell-cell signalling. neu tack on neuregulin. *Nature* 378(6555):334-335.
 157. Gitler AD, *et al.* (2003) Nf1 has an essential role in endothelial cells. *Nature genetics* 33(1):75-79.
 158. Hoch RV & Soriano P (2003) Roles of PDGF in animal development. *Development* 130(20):4769-4784.
 159. Giordano FJ, *et al.* (2001) A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(10):5780-5785.
 160. Kuramochi Y, *et al.* (2004) Cardiac endothelial cells regulate reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis through neuregulin-1beta/erbB4 signaling. *J Biol Chem* 279(49):51141-51147.
 161. Yu X, *et al.* (2012) Mechanism of TNF-alpha autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: initiated by hypoxia inducible factor 1alpha, presented by exosomes. *J Mol Cell Cardiol* 53(6):848-857.
 162. Levine B & Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6(4):463-477.
 163. Maruyama R, *et al.* (2008) Morphological and biochemical characterization of basal and starvation-induced autophagy in isolated adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(4):H1599-1607.
 164. Fader CM & Colombo MI (2009) Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ* 16(1):70-78.
 165. Gupta S & Knowlton AA (2007) HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(6):H3052-3056.
 166. Sahoo S & Losordo DW (2014) Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. *Circulation research* 114(2):333-344.
 167. Lu H, Buchan RJ, & Cook SA (2010) MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. *Cardiovascular research* 86(3):410-420.
 168. Schuldt A (2013) Post-translational modification: A SUMO protease for stress protection. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(5):263.
 169. Guo C, *et al.* (2013) SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia. *EMBO J* 32(11):1514-1528.
 170. Agbor TA, *et al.* (2011) Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-1 promotes glycolysis in hypoxia. *J Biol Chem* 286(6):4718-4726.
 171. Gabriel K, *et al.* (2013) Regulation of the tumor suppressor PTEN through exosomes: a diagnostic potential for prostate cancer. *PLoS One* 8(7):e70047.

172. Giorgino F, *et al.* (2000) The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3):1125-1130.
173. Lalioti VS, Vergarajauregui S, Pulido D, & Sandoval IV (2002) The insulin-sensitive glucose transporter, GLUT4, interacts physically with Daxx. Two proteins with capacity to bind Ubc9 and conjugated to SUMO1. *J Biol Chem* 277(22):19783-19791.
174. Bogan JS, Hendon N, McKee AE, Tsao TS, & Lodish HF (2003) Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT4 glucose transporter trafficking. *Nature* 425(6959):727-733.
175. Lamb CA, McCann RK, Stöckli J, James DE, & Bryant NJ (2010) Insulin-Regulated Trafficking of GLUT4 Requires Ubiquitination. *Traffic* 11(11):1445-1454.
176. Kolwicz SC, Jr., Purohit S, & Tian R (2013) Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circulation research* 113(5):603-616.
177. Burkhoff D, *et al.* (1991) Influence of metabolic substrate on rat heart function and metabolism at different coronary flows. *Am J Physiol* 261(3 Pt 2):H741-750.
178. Korvald C, Elvenes OP, & Myrnes T (2000) Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(4):H1345-1351.
179. Allard MF, Schonekess BO, Henning SL, English DR, & Lopaschuk GD (1994) Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol* 267(2 Pt 2):H742-750.
180. Schmidt-Schweda S & Holubarsch C (2000) First clinical trial with etomoxir in patients with chronic congestive heart failure. *Clinical science* 99(1):27-35.
181. Abozguia K, *et al.* (2010) Metabolic modulator perhexiline corrects energy deficiency and improves exercise capacity in symptomatic hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 122(16):1562-1569.
182. Piao L, *et al.* (2010) The inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves impaired cardiac function and electrical remodeling in two models of right ventricular hypertrophy: resuscitating the hibernating right ventricle. *Journal of molecular medicine* 88(1):47-60.
183. Atherton HJ, *et al.* (2011) Role of pyruvate dehydrogenase inhibition in the development of hypertrophy in the hyperthyroid rat heart: a combined magnetic resonance imaging and hyperpolarized magnetic resonance spectroscopy study. *Circulation* 123(22):2552-2561.
184. Pernicova I & Korbonits M (2014) Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature reviews. Endocrinology* 10(3):143-156.
185. Wang XF, *et al.* (2011) Metformin improves cardiac function in rats via activation of AMP-activated protein kinase. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 38(2):94-101.
186. Cittadini A, *et al.* (2012) Metformin prevents the development of chronic heart failure in the SHHF rat model. *Diabetes* 61(4):944-953.
187. Mukhopadhyay D, Riezman H. (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 2;315(5809):201-5.
188. Mackenzie TC, Flake AW. (2001) Multilineage differentiation of human MSC after in utero transplantation. *Cytotherapy*. 3(5):403-5.