



ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA, MEDICINA Y CIENCIAS BIOSANITARIAS

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS IMPLICADAS
EN LA CARDIOPROTECCIÓN FRENTE AL INFARTO AGUDO DE
MIOCARDIO A PARTIR DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES
DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE PLACENTA HUMANA**

NUNZIO A. ALCHARANI DE SIMONE

DIRECTORES

DR. CARLOS ZARAGOZA SÁNCHEZ

DRA. MAITE IGLESIAS BADIOLA

Madrid, 2026

*“El investigador es ministro del progreso, sacerdote de la verdad y
confidente del Creador... llamado a descifrar el lenguaje que Dios ha
escrito en la Naturaleza y a conocerle, admirarle y reverenciarle a
través de sus obras.”*

Santiago Ramón y Cajal

Reglas y consejos sobre investigación científica (1897).

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Todo aquel que me conoce sabe que siempre he sabido expresarme mejor hablando que escribiendo. Aun así, me gustaría intentar transmitir en este pequeño apartado una parte de todo lo que siento. Me resultaría muy sencillo limitarme a escribir las palabras “gracias por tanto”, porque ese “tanto” alcanza niveles que ni siquiera sé describir, únicamente sentir.

A mis directores, gracias. Cuando se dice que la paciencia es la madre de la ciencia, no encuentro mejor manera de describirlo que a través de vuestros actos. Habéis sido mis referentes durante estos cinco años, y no puedo sentirme más afortunado por ello.

Al Dr. Carlos Zaragoza, gracias. La pregunta “¿podremos hacerlo?” contigo nunca ha existido; siempre ha sido “¿cómo lo hacemos?”. Me has guiado durante todos estos años, me has impulsado, me has enviado a aprender a los mejores lugares, me has llevado a congresos extraordinarios, me has brindado todas las ayudas posibles y me has involucrado en incontables proyectos. No me alcanza ni el espacio ni la memoria para recoger todo lo que has hecho por mí, así que permíteme resumirlo en una sola frase: gracias por confiar en mí. Esta tesis no existiría sin ti. Gracias, Carlos.

A la Dra. Maite Iglesias, gracias. Aún recuerdo aquel verano de 2020, cuando trabajaba en un restaurante y me dijiste que querías hablar conmigo. Pensé: “¿La decana de mi universidad quiere hablar conmigo? ¿Qué habré hecho?”. Con el tiempo comprendí que no era “qué he hecho”, sino “qué vamos a hacer”. Llevo diez años conociéndote y mi percepción hacia ti no ha cambiado nunca: admiración. Apostaste por un alumno de la primera promoción de Biomedicina y me has guiado hasta el día de hoy. Ojalá algún día pueda devolverte una pequeña parte de toda la ayuda que me has dado. Gracias, Maite.

A la Dra. Marta Saura, gracias. No sabría decir cuántas tardes pasé en la Universidad de Alcalá, pero sí sé que son tantas como las veces que me habéis guiado y me habéis hecho sentir como en casa allí. Has sido una parte fundamental de esta tesis. Gracias, Marta.

A mis compañeros de laboratorio, gracias. Entre experimentos, frustraciones y alegrías, habéis terminado convirtiéndoos en mis hermanos científicos.

Laura, gracias por sentarte conmigo todas las veces que hicieron falta hasta que lograra entender las cosas, por acompañarme y guiarme siempre. Gracias, Laura.

Agradecimientos

Javi, pocas cosas alegran tanto como dejar de llamar a alguien “compañero de trabajo” para empezar a llamarlo “amigo”. Gracias por haber sido ambas cosas durante todos estos años. Gracias, Javi.

Nacho, existen personas que hacen reír, y luego están las que consiguen que los días sean divertidos. Tú perteneces a la segunda categoría. Conseguir eso en un trabajo que tantas veces puede resultar frustrante no es nada fácil. Gracias, Nachete.

Claudia, has sido una de las personas con las que más horas he compartido durante esta etapa, y me cuesta recordar un solo momento trabajando juntos en el que no me sintiera a gusto. Mi compañera de conversaciones intensas, la “*pior*”. Gracias, Claudia.

A Bea, Pablo y Lola, gracias por formar parte de esta etapa y por contribuir a que tantos días en el laboratorio fueran más amenos.

A quienes fueron mis compañeros durante gran parte de este periodo, gracias por tantas horas de alegría. Gracias, Rafa, Laura y Carlitos (“*Caballo*”).

A todas las personas que conforman la Universidad Francisco de Vitoria. La que ha sido mi casa durante estos últimos diez años, por brindarme un lugar donde crecer como estudiante, investigador y docente. De manera especial, a las personas que forman parte de la Escuela Internacional de Doctorado de la UFV. Gracias al Dr. Cruz Santos, a María y a Jessica, por toda vuestra ayuda, cercanía y dedicación durante este periodo. También a Dra. Marian Mellén, Dr. Ismael Santa Maria, Dr. Javier Galán, Dra. Elvira Herrero, Dra. Olga Zafra, y a Chus y Elena.

A todas las personas del IRYCIS que hicieron que estos años fueran tan amenos. A la directora, Dra. Laura García Bermejo, por su acompañamiento durante este periodo. Al Dr. José Luis Zamorano, por toda su colaboración a lo largo de esta tesis. A la Dra. Rebeca Busto, por toda su ayuda. Y, de manera especial, a mis compañeros de la -1, Manu, Raquel, Laura y Alberto. Gracias por vuestra amistad, vuestro apoyo y por hacerme sentir siempre arropado.

A todos los equipos de animalario que me hicieron sentir siempre bienvenido. A Carlota, gracias por recibirme con los brazos abiertos y hacerme sentir uno más en el IdiPAZ. Junto a Mar, Irene, Rubén, Paloma, Isa, Fernando, Esther y Lorena, hicisteis que mi estancia allí fuese enormemente grata. Del mismo modo, gracias a Federico, Beatriz y Ana por estos últimos meses en el Ramón y Cajal.

Agradecimientos

A Alberto y María, compañeros predoctorales desde la Universidad de Alcalá y ahora doctores, gracias por todo lo que me habéis enseñado, tanto a nivel profesional como personal.

A mis compañeros de Johns Hopkins University, que me recibisteis y me arropasteis como una familia. Al Dr. Charles Lowenstein, por darme la oportunidad de trabajar en uno de los mejores centros del mundo y hacer que me enamorara todavía más de la ciencia. Gracias, Charlie. Al Dr. Marios Arvanitis, por mostrarme con hechos cómo se vive la pasión por la investigación y por motivarme constantemente a ser mejor. Gracias, Marios. A la Dra. Paula Reventun, por ser una de las mejores personas que he tenido la suerte de encontrarme, por guiarme, enseñarme y apostar por mí. Gracias, Paulita. Y a Pablo, por enseñarme la importancia de adaptarse al entorno y dar siempre lo mejor de uno mismo, incluso fuera de la zona de confort. Gracias, Pablito.

A mis alumnos, por hacerme crecer como docente y como persona. Gracias por recordarme cada día que enseñar también es una forma de aprender.

A mis amigos, gracias. Aunque soy un desastre manteniendo el contacto, siempre habéis sabido permanecer cerca de mí y hacer que estos años hayan sido tan enriquecedores a nivel personal.

De la carrera me vienen muchas personas a la mente. Francisco, mi hermano de otra madre; qué fortuna la mía haberte encontrado. Desde que llegué a España en 2016 has estado a mi lado. Después de diez años de amistad, sigues presente en cada etapa importante de mi vida. Me has escuchado reír, quejarme, llorar y, sobre todo, crecer. Gracias, Fran. Juan, desde primero de carrera hemos hecho todo lo posible por seguir viéndonos, aunque solo sea un par de veces al año. Eres de esos amigos con los que el tiempo nunca pasa, y que me recuerdan la ilusión que a veces se pierde con la edad. Gracias, Juan. Dani e Itziar, mi pareja favorita. No sabéis lo feliz que me han hecho estos años compartiendo tiempo con vosotros, ya fuese haciendo deporte o simplemente hablando. Gracias, chicos.

Luis y Virginia, mis amigos del máster; no sé ni qué escribir sobre vosotros. Habéis sido, probablemente, los mejores amigos fugaces que he tenido. Los tres hemos formado el trío más desastroso, productivo y feliz que se haya visto jamás. Gracias, *Optimis Team*. También a Ale, por tu amistad, tu apoyo y por acompañarme durante este camino.

Agradecimientos

Y, por supuesto, a Marcos y Nemer, mis amigos desde la infancia. No existen palabras suficientes para describir lo feliz que he sido junto a vosotros. Qué suerte la mía poder llamaros amigos. Gracias, Marquitos y Micho.

A la Dra. Beatriz Mora, gracias por motivarme durante estos últimos meses y por enseñarme que también hay que apostar por uno mismo. Gracias, Bea.

A la familia Calle-Zaccagnini, por haber formado parte de una etapa tan importante de mi vida y por recibirme y tratarme siempre como a uno más de la familia. Nunca olvidaré cómo me acogisteis durante todos estos años.

Y, cómo no, a las personas más importantes que me ha dado la vida: mi familia. Gracias a mis abuelos, tíos y primos; y, en especial, a mis dos hermanos no hermanos, Mariannita y Nunziante; y a mi ahijado Fabri. Gracias por existir.

A mis hermanas, gracias. Ser el hermano de en medio me ha enseñado algo muy importante: no soy nada sin vuestra compañía. Soy hijo y hermano, y eso me hace profundamente feliz. Gracias, Hanin, por la complicidad. Gracias, Hana, por la comprensión. Os quiero.

Papá, gracias. Si algún día llego a ser la mitad de la persona que eres tú, podré sentirme tranquilo. Eres mi roble, mi ejemplo a seguir. Con 27 años todavía me siento un niño cuando estoy a tu lado, porque me haces sentir seguro y me haces creer que todo estará bien. Eres mi mejor amigo, y le pido a Dios poder compartir contigo todo el tiempo posible. Gracias por moldearme en la persona que soy.

Mamá, gracias. Cuando era pequeño te pregunté si existía la reencarnación porque, si así fuera, jamás querría reencarnarme si no pudiera volver a tenerte como madre. Si alguna vez me he quejado de la vida, puedo asegurarte de que ha sido desde la ignorancia, porque la suerte que he tenido de tenerte es incalculable. Gracias por acompañarme, por luchar, por sonreír en la salud y en la enfermedad, y por hacerme sentir siempre que todo estaría bien. Eres la persona más maravillosa que he conocido.

Esta tesis es para ustedes.

Para terminar, me gustaría darle las gracias a Dios, por acompañarme durante todo este camino y concederme la fortaleza, la esperanza y las personas necesarias para llegar hasta aquí. Gracias.

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	19
RESUMEN	27
SUMMARY.....	35
INTRODUCCIÓN	41
 BLOQUE I. BASES GENERALES DE LAS ENFERMEDADES	
CARDIOVASCULARES	43
1.1 Enfermedad Cardiovascular, un enfoque epidemiológico	43
1.2 Perspectiva global de las enfermedades cardiovasculares	44
1.3 Desde la inflamación hasta la fibrosis	50
 BLOQUE II: CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE PLACENTA COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA PARA	
TRATAR EL IAM	52
2.1 ¿Qué son las células madre?	52
2.2 ¿Qué son las MSC?	54
2.3 MSC Derivadas de Placenta.....	57
2.4 hAMSC miRNAs y EVs en el contexto del IAM	58
 BLOQUE III: ARNs NO CODIFICANTES Y SU IMPLICACIÓN EN EL INFARTO	
AGUDO DE MIOCARDIO.....	61
3.1 ¿Qué son los lncRNAs?	61
3.2. ¿Qué son los miRNAs?	67
3.3 Eje MIAT/miR-150/HOXA-4	72
 BLOQUE IV: NANOTECNOLOGÍA COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA PARA	
TRATAR EL IAM	74
4.1 ¿Qué es la Nanotecnología?	74
4.2 Potencial de las Nanopartículas en Biomedicina.....	74
4.3 Aplicaciones en Patologías Cardiovasculares.....	74
4.4 NIL10 como herramienta para tratar el IAM	75
4.5 NMC-150 como herramienta de doble acción frente al IAM.....	76
 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	77
1. Hipótesis.....	79
2. Objetivos.....	80

MATERIALES Y MÉTODOS.....	85
1. REACTIVOS Y MATERIALES EMPLEADOS.....	87
2. MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN EN LA ARTERIA CORONARIA.....	89
2.1 Selección del Modelo y Condiciones Experimentales	89
2.2 Manejo Prequirúrgico y Procedimiento Anestésico	89
2.3 Inducción de Isquemia y Reperfusión.....	90
2.4 Cierre Quirúrgico y Recuperación Postoperatoria	91
2.5 Extracción y Procesamiento de Muestras Biológicas	91
2.6 Bienestar Animal y Consideraciones Éticas	92
3. CULTIVO CELULAR.....	93
3.1 Líneas celulares empleadas	93
4. ADMINISTRACIÓN CELULAR EN MODELOS EXPERIMENTALES	95
5. EVALUACIÓN ECOCARDIOGRÁFICA DE LA FUNCIÓN CARDÍACA.....	96
6. ANÁLISIS HISTOLÓGICO, INMUNOHISTOQUÍMICO E IMUNOFLUORESCENCIA.....	98
6.1 Procesamiento y Tinción de Tejidos	98
6.2 Inmunohistoquímica en Secciones de Tejido Cardíaco Infartado	99
6.3 Evans Blue-TTC para la Determinación del Área en Riesgo y del Tamaño del Infarto.....	99
6.4 Transducción lentiviral para la expresión de GFP	100
7. EDICIÓN GÉNICA EN hAMSC	102
7.1 Selección del Gen diana.....	102
7.2 Edición Génica mediante CRISPR/Cas9.....	102
7.3 Amplificación y Transfección Plasmídica en hAMSC	103
8. DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS CON miR-150-5p COMO CARGO ..	105
8.1 Diseño y Funcionalización de NMC-150.....	105
8.2 Composición de NMC-150.....	105
8.3 Síntesis y Caracterización de la Nanopartícula	105
9. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y ANÁLISIS MOLECULARES	107
9.1 Extracción de ARN	107
9.2 Síntesis de cDNA.....	107
9.3 Sondas y Genes Analizados.....	109
9.4 Cuantificación y Validación por qPCR	109

10. EXTRACCIÓN DE EXOSOMAS DE CULTIVO CELULAR Y PLASMA	111
10.1 Aislamiento de Exosomas a partir de hAMSC	111
10.2 Aislamiento de Exosomas a partir de Plasma de Ratón.....	111
10.3 Validación y Caracterización de Exosomas.....	112
10.4 Análisis Proteico	112
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	115
RESULTADOS.....	117
1. LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE PLACENTA HUMANA INDUCEN PROTECCIÓN CARDÍACA EN RATONES SOMETIDOS A ISQUEMIA/REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA	119
1.1 Modelo murino de isquemia/reperfusión miocárdica como modelo de infarto agudo de miocardio	119
1.2 Efecto del tratamiento con hAMSC en la función cardíaca tras isquemia/reperfusión en ratón	120
2. LA CARDIOPROTECCIÓN INDUCIDA POR LAS hAMSC ES INDEPENDIENTE DE SU ANIDAMIENTO MIOCÁRDICO	130
2.1 Las hAMSC no muestran un patrón de anidamiento en el miocardio mediante tinción inmunohistoquímica con marcadores celulares específicos	130
2.2 Las hAMSC no muestran un patrón de anidamiento en el miocardio mediante detección inmunofluorescente	130
3. LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE hAMSC CONFIEREN PROTECCIÓN CARDÍACA TRAS LA I/R.....	132
3.1 Aislamiento y validación de las EVs derivadas de hAMSC, NIH/3T3 y plasma de ratón.....	132
3.2 Las EVs derivadas de las hAMSC reproducen los efectos cardioprotectores de las hAMSC tras la I/R	135
4. LAS hAMSC LIBERAN EVs QUE CONTIENEN miR-150	136
4.1 Las hAMSC expresan miR-150-5p	138
4.2 Las hAMSC liberan EVs con miR-150-5p como cargo en condiciones que simulan el contexto de IAM <i>in vitro</i>	138
4.3 El tratamiento con EVs-hAMSC incrementa los niveles circulantes de EVs plasmáticas cargadas con miR-150-5p	138
4.4 Las EVs-hAMSC median la transferencia funcional de miR-150-5p a cardiomioblastos	140

5. LA PROTECCIÓN CARDÍACA INDUCIDA POR LAS hAMSC ESTÁ MEDIADA POR LA MODULACIÓN DEL EJE MIAT/miR-150/HOXA-4	142
5.1 Las hAMSC modulan el eje MIAT/miR-150/HOXA-4 en el miocardio post isquemia/reperfusión	142
5.2 La disminución de HOXA-4 se acompaña de cambios funcionales en el eje HOXA-4–GSK3β/Wnt.....	143
5.3 Contribución de las hAMSC sobre el eje MIAT/miR-150/HOXA-4 en ausencia de I/R miocárdica.....	145
5.4 Las EVs-hAMSC modulan el eje MIAT/miR-150/HOXA-4.....	146
6. CONFIRMACIÓN DEL PAPEL DE miR-150 EN LA RESPUESTA CARDIOPROTECTORA Y EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL MIOCARDIO TRAS UN INFARTO	148
6.1 La pérdida de miR-150-5p en las hAMSC reduce la respuesta cardioprotectora tras I/R miocárdica <i>in vivo</i>	149
6.2 La pérdida de miR-150-5p en las hAMSC compromete la modulación del eje miR-150-5p/HOXA-4 en el miocardio post-isquémico <i>in vivo</i>	149
6.3 El poder antifibrótico de las hAMSC se pierde en ausencia de miR-150-5p en el miocardio post-isquémico	150
7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON miR-150 EN LA FUNCIÓN CARDÍACA Y EL REMODELADO TRAS I/R	152
7.1 La administración temprana de NMC-150 mejora la función cardíaca tras isquemia/reperfusión	153
7.2 Las NMC-150 incrementan los niveles sistémicos y tisulares de miR-150-5p	153
7.3 La administración de NMC-150 modula selectivamente el eje HOXA-4	154
7.4 Las NMC-150 reducen el remodelado fibrótico del miocardio post-I/R	155
RESULTADOS SUPLEMENTARIOS.....	159
S1. Efecto de la dosis de las hAMSC sobre la mejora cardíaca tras el infarto.....	159
S2. Las hAMSC modulan otros microRNAs con potencial cardioprotector asociados a la vía de MIAT.....	160
DISCUSIÓN.....	161
CONCLUSIONES.....	179
CONCLUSIONS.....	183
BIBLIOGRAFÍA.....	187
ANEXOS	223

Índice

Producción científica durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral	225
Premios y reconocimientos obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.....	228

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Abreviaturas

ACTA2: Actina alfa 2 del músculo liso (gen de referencia) (del inglés *Actin Alpha 2, Smooth Muscle*)

ADN: Ácido desoxirribonucleico (del inglés *Deoxyribonucleic Acid*)

ANRIL: ARN largo no codificante antisentido localizado en el locus INK4 del cromosoma 9p21.3 (del inglés *Antisense Non-coding RNA in the INK4 Locus*)

ARN: Ácido ribonucleico (del inglés *Ribonucleic Acid*)

ARNs: Ácidos ribonucleicos (del inglés *Ribonucleic Acids*)

ATP: Adenosín trifosfato (del inglés *Adenosine Triphosphate*)

Bax: Proteína X asociada a Bcl-2 (del inglés *Bcl-2-associated X Protein*)

BCA: Ensayo del ácido bicinconínico (del inglés *Bicinchoninic Acid Assay*)

Bcl-2: Proteína 2 asociada al linfoma de células B, con función antiapoptótica (del inglés *B-cell lymphoma 2*)

bFGF: Factor de crecimiento básico de fibroblastos (del inglés *basic Fibroblast Growth Factor*)

BSA: Albúmina sérica bovina (del inglés *Bovine Serum Albumin*)

BSL-2: Nivel de bioseguridad 2 (del inglés *Biosafety Level 2*)

CAIF: Factor inhibidor de la autofagia cardíaca (ARN largo no codificante) (del inglés *Cardiac Autophagy Inhibitory Factor*)

CARMN: ARN largo no codificante asociado al potenciador del mesodermo cardíaco (del inglés *Cardiac Mesoderm Enhancer-associated Non-coding RNA*)

CD9: Antígeno de diferenciación celular 9 (del inglés *Cluster of Differentiation 9*)

CD63: Antígeno de diferenciación celular 63 (del inglés *Cluster of Differentiation 63*)

CD81: Antígeno de diferenciación celular 81 (del inglés *Cluster of Differentiation 81*)

ceRNA: ARN endógeno competitivo (del inglés *competing endogenous RNA*)

circRNAs: ARNs circulares (del inglés *circular RNAs*)

CO: Gasto cardíaco (del inglés *Cardiac Output*)

CO₂: Dióxido de carbono (del inglés *Carbon Dioxide*)

CRISPOR: Herramienta bioinformática para diseño de guías CRISPR (del inglés *CRISPOR*)

CRISPR/Cas9: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas / proteína 9 asociada a CRISPR (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated protein 9*)

CXCR4: Receptor de quimiocina tipo 4 (del inglés *C-X-C Chemokine Receptor Type 4*)

DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño (del inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*)

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol (del inglés *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

Abreviaturas

DGCR8: Gen de la región crítica del síndrome de DiGeorge 8 (del inglés *DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8*)

DMEM: Medio de cultivo celular (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

EAC: Enfermedad arterial coronaria

EB: Azul de Evans (del inglés *Evans Blue*)

ECl: Enfermedad cardíaca isquémica

ECL: Quimioluminiscencia mejorada (del inglés *Enhanced Chemiluminescence*)

ECV: Enfermedades cardiovasculares

EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético (del inglés *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

ESC: Sociedad Europea de Cardiología (del inglés *European Society of Cardiology*)

EVs: Vesículas extracelulares (del inglés *Extracellular Vesicles*)

EVs-hAMSC: Vesículas extracelulares derivadas de hAMSC (del inglés *Extracellular Vesicles derived from human Amniotic Mesenchymal Stem Cells*)

FA: Fibrilación auricular

FBS: Suero fetal bovino (del inglés *Fetal Bovine Serum*)

FEVI: Fracción de eyección de ventrículo izquierdo

FS: Fracción de acortamiento (del inglés *Fractional Shortening*)

FV: Fibrilación ventricular

GAS5: ARN largo no codificante asociado a la detención del crecimiento 5 (del inglés *Growth Arrest Specific 5*)

GENCODE: Consorcio de anotación génica (del inglés *Gene Annotation Project*)

GFP: Proteína verde fluorescente (del inglés *Green Fluorescent Protein*)

GSK3 β : Glucógeno sintasa quinasa 3 beta (del inglés *Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*)

GW4869: Inhibidor de la biogénesis de exosomas

GWAS: Estudios de asociación del genoma completo (del inglés *Genome-Wide Association Studies*)

H9C2: Línea celular de cardiomioblastos de rata

hAMSC: Células madre mesenquimales humanas derivadas de membrana amniótica de placenta (del inglés *human Amniotic Mesenchymal Stem Cells*)

hAMSC-GFP: hAMSC transducidas con GFP

hAMSC-KO: hAMSC knockout para miR-150-5p

hFGF-b: Factor de crecimiento fibroblástico básico humano (del inglés *human basic Fibroblast Growth Factor*)

HOXA-4: Proteína homeobox A4 (del inglés *Homeobox A4*)

HR: Frecuencia cardíaca (del inglés *Heart Rate*)

HRP: Peroxidasa de rábano picante (del inglés *Horseradish Peroxidase*)

Abreviaturas

HSP70: Proteína de choque térmico de 70 kDa (del inglés *Heat Shock Protein 70*)

IAM: Infarto agudo de miocardio

IC: Insuficiencia cardíaca

ICC: Insuficiencia cardíaca congestiva

ICPP: Intervención coronaria percutánea primaria

IF: Inmunofluorescencia

IgG: Inmunoglobulina G (del inglés *Immunoglobulin G*)

IHC: Inmunohistoquímica

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IT9302: Péptido sintético análogo de IL-10

IV: Intravenosa / intravenoso

IVSd: Espesor del septo interventricular en diástole

IVSs: Espesor del septo interventricular en sístole

I/R: Isquemia/reperfusión miocárdica

KO: Modelo knockout o de inactivación génica (del inglés *Knockout*)

LAD: Arteria coronaria descendente anterior (del inglés *Left Anterior Descending*)

LDLR: Receptor de lipoproteínas de baja densidad (del inglés *Low-Density Lipoprotein Receptor*)

LM10: Sistema NanoSight LM10 (del inglés *NanoSight LM10*)

lncRNA: ARN largo no codificante (del inglés *Long Non-coding RNA*)

LPS: Lipopolisacárido (del inglés *Lipopolysaccharide*)

LVEF: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (del inglés *Left Ventricular Ejection Fraction*)

LVIDd: Diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole

LVIDs: Diámetro interno del ventrículo izquierdo en sístole

LVPWd: Espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole

LVPWs: Espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en sístole

M1: Macrófagos de fenotipo proinflamatorio

M2: Macrófagos de fenotipo resolutivo/antiinflamatorio

MALAT1: ARN largo no codificante asociado a metástasis de adenocarcinoma pulmonar 1 (del inglés *Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*)

MEC: Matriz extracelular (del inglés *Extracellular Matrix*)

MHC-II: Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (del inglés *Major Histocompatibility Complex Class II*)

Abreviaturas

MIAT: Transcripto asociado al infarto de miocardio (del inglés *Myocardial Infarction-Associated Transcript*)

Mimic: Miméticos sintéticos de microRNA (del inglés *microRNA miméticos*)

miR-: microRNA seguido de su número identificativo (del inglés *microRNA*)

miRBase: Base de datos de microARN (del inglés *microRNA database*)

miRNA: microRNA (del inglés *microRNA*)

MMP-2: Metaloproteínasa de matriz 2

MMP-9: Metaloproteínasa de matriz 9

mPTP: Poro de permeabilidad mitocondrial transitorio (del inglés *Mitochondrial Permeability Transition Pore*)

MSC: Células madre mesenquimales (del inglés *Mesenchymal Stem Cells*)

NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (del inglés *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NGG: Motivo NGG asociado a PAM (del inglés *Protospacer Adjacent Motif NGG*)

NIH/3T3: Línea celular fibroblástica murina NIH/3T3

NIL-10: Nanopartícula lipídica dirigida al receptor de IL-10

NMC-150: Nanotransportador de microARN para miR-150 (del inglés *Nano MicroRNA Carrier for miR-150*)

NP: Nanopartícula

NPs: Nanopartículas

NTA: Análisis de seguimiento de nanopartículas (del inglés *Nanoparticle Tracking Analysis*)

O₂: Oxígeno

OIP5-AS1: ARN antisentido OIP5 1 (del inglés *OIP5 Antisense RNA 1*)

OMS: Organización Mundial de la Salud (del inglés *World Health Organization*)

P300: Coactivador transcripcional p300 (del inglés *E1A Binding Protein P300*)

PAM: Motivo adyacente al protoespaciador (del inglés *Protospacer Adjacent Motif*)

PBS: Solución salina tamponada con fosfato (del inglés *Phosphate Buffered Saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)

PCSK9: Proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (del inglés *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9*)

PGE2: Prostaglandina E2

PUMA: Modulador de apoptosis regulado al alza por p53 (del inglés *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*)

PVDF: Difluoruro de polivinilideno (del inglés *Polyvinylidene Fluoride*)

QIAzol: Reactivo para extracción de ARN QIAzol (del inglés *QIAzol Reagent*)

Abreviaturas

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real (del inglés *Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

RIPA: Tampón RIPA (del inglés *Radioimmunoprecipitation Assay Buffer*)

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por ARN (del inglés *RNA-induced Silencing Complex*)

RT: Transcripción reversa (del inglés *Reverse Transcription*)

SDF-1: Factor derivado del estroma 1 (del inglés *Stromal Cell-Derived Factor 1*)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SENCr: ARN largo no codificante enriquecido en células endoteliales y de músculo liso asociado a migración/diferenciación (del inglés *Smooth Muscle and Endothelial Cell-enriched Migration/Differentiation-associated Long Non-coding RNA*)

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*)

snRNA: ARN nuclear pequeño (del inglés *small nuclear RNA*)

SPSS: Paquete estadístico para las ciencias sociales (del inglés *Statistical Package for the Social Sciences*)

SSEA-4: Antígeno embrionario específico de etapa 4 (del inglés *Stage-Specific Embryonic Antigen-4*)

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3 (del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*)

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta (del inglés *Transforming Growth Factor Beta*)

TLR: Receptor tipo Toll (del inglés *Toll-like Receptor*)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés *Tumor Necrosis Factor Alpha*)

T-TBS: TBS con Tween-20 (del inglés *Tris-Buffered Saline with Tween-20*)

TRAF6: Factor 6 asociado al receptor de TNF (del inglés *TNF Receptor Associated Factor 6*)

TSG101: Proteína 101 de susceptibilidad tumoral (del inglés *Tumor Susceptibility Gene 101*)

TSPO: Proteína translocadora (del inglés *Translocator Protein*)

TTC: 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (del inglés *Triphenyltetrazolium Chloride*)

U6: ARN nuclear pequeño U6 (del inglés *Small Nuclear RNA U6*)

UNG: Uracil-N-glicosilasa (del inglés *Uracil-N-glycosylase*)

UTR: Región no traducida (del inglés *Untranslated Region*)

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*)

Abreviaturas

Wnt/ β -catenina: Vía Wnt/beta-catenina (del inglés *Wnt/Beta-catenin Pathway*)

ZNF593-AS: ARN antisentido ZNF593 (del inglés *ZNF593 Antisense RNA*)

RESUMEN

Resumen

El infarto agudo de miocardio constituye una de las principales causas de morbimortalidad a nivel mundial y representa la consecuencia más grave de la enfermedad cardiovascular de origen isquémico. Este evento se desencadena como resultado de la obstrucción súbita de una arteria coronaria, lo que da lugar a un período de isquemia miocárdica seguido, en el mejor de los casos, por una fase de reperfusión terapéutica. Aunque la reperfusión temprana resulta esencial para limitar el tamaño del infarto y preservar la viabilidad del tejido cardíaco, este proceso, en ocasiones, puede inducir una compleja cascada de eventos moleculares y celulares que pueden exacerbar el daño inicial.

En respuesta a la necrosis asociada al proceso isquémico, las células miocárdicas desarrollan una intensa respuesta inflamatoria caracterizada por el reclutamiento de células inmunitarias y la liberación de moléculas proinflamatorias, cuyo objetivo inicial es eliminar el tejido dañado y facilitar la reparación. Sin embargo, la no resolución adecuada del proceso inflamatorio resulta en un fenómeno conocido como remodelado cardíaco adverso, caracterizado por el mantenimiento de la actividad de macrófagos inflamatorios, la activación de fibroblastos cardíacos y la deposición excesiva de matriz extracelular. Este remodelado estructural altera la arquitectura y la función del miocardio, comprometiendo de forma irreversible la capacidad contráctil del corazón. En este contexto, la identificación de mecanismos moleculares que regulen de manera precisa el equilibrio entre inflamación y reparación resulta clave para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas frente al infarto de miocardio.

En este escenario, las células madre mesenquimales (MSC) han emergido como una estrategia terapéutica prometedora en el tratamiento del infarto agudo de miocardio, debido a su capacidad para modular la respuesta inflamatoria y favorecer los procesos de reparación tisular. Más allá de su potencial de diferenciación, las MSC ejercen principalmente efectos paracrinós mediante la secreción de factores

Resumen

inmunomoduladores, proangiogénicos y antifibróticos, contribuyendo posiblemente a la resolución de la inflamación postisquémica, la preservación del tejido viable y la atenuación del remodelado cardíaco adverso. Diversos estudios han demostrado que la administración de MSC tras un evento isquémico puede mejorar la función ventricular y limitar la severidad de la insuficiencia cardíaca post-infarto, posicionando a estas células como una herramienta clave en el desarrollo de terapias avanzadas para la protección cardíaca. Sin embargo, no disponemos de datos acerca del posible papel de un grupo concreto de MSC, como son las células mesenquimales humanas derivadas de membrana amniótica de placenta (hAMSC).

En este marco, la presente Tesis Doctoral se ha centrado en evaluar el potencial cardioprotector de las hAMSC en un modelo murino de isquemia/reperfusión miocárdica, que reproduce los cambios funcionales, estructurales y moleculares observados en el infarto humano. Para ello, se ha empleado un abordaje experimental integral que combina técnicas de biología molecular, histología, ecocardiografía y biología celular. Los resultados obtenidos demuestran que la administración de hAMSC tras un episodio de isquemia/reperfusión confiere una protección cardíaca significativa, evidenciada por la preservación de la función ventricular y la reducción del remodelado fibrótico. De manera relevante, estos efectos se producen independientemente del anidamiento prolongado de las hAMSC en el miocardio lesionado, lo que sugiere que su acción cardioprotectora se ejerce fundamentalmente a través de mecanismos de tipo paracrino.

En los últimos años se ha producido un avance significativo en el estudio de las enfermedades cardiovasculares, en relación con el hallazgo de nuevas dianas con capacidad terapéutica, entre las que los ácidos nucleicos y, en particular, las moléculas de ácido ribonucleico (ARN) no codificantes han emergido como reguladores fundamentales de la expresión génica en condiciones tanto fisiológicas como

Resumen

patológicas. Entre ellos, los ARN largos no codificantes (lncRNAs, del inglés *long non coding RNA*) y los microRNAs (miRNAs) desempeñan un papel central en la modulación de rutas moleculares implicadas en la inflamación, la apoptosis y la fibrosis cardíaca. De especial relevancia en el contexto del infarto agudo de miocardio es el lncRNA MIAT (del inglés *Myocardial Infarction-Associated Transcript*), inicialmente identificado como un factor de riesgo genético para el infarto y posteriormente caracterizado como un regulador clave del remodelado cardíaco. MIAT actúa como un ARN endógeno competitivo, secuestrando miRNAs “cardioprotectores”, entre los que cabe destacar especialmente la participación del miRNA miR-150-5p, y cuya implicación en el proceso revierte la represión de genes profibróticos, destacando el gen HOXA-4 (del inglés *Homeobox A4*) y la activación de vías de señalización asociadas al deterioro funcional del miocardio.

En relación con lo anterior, nosotros hemos demostrado cómo las hAMSC liberan vesículas extracelulares enriquecidas en miR-150-5p, especialmente bajo condiciones de hipoxia e inflamación, similares a las que se producen en el microambiente generado tras el infarto. Estas vesículas extracelulares son capaces de transferir funcionalmente miR-150-5p a las células del miocardio lesionado, incrementando sus niveles tisulares y modulando de manera específica el eje MIAT/miR-150/HOXA-4. Como consecuencia, nuestro trabajo ha desvelado por vez primera la disminución de la expresión de HOXA-4 y una atenuación de la activación de vías profibróticas asociadas, lo que se tradujo en una reducción del remodelado adverso y una mejora significativa de la función cardíaca.

En esta línea, y con el objetivo de discriminar con mayor precisión los mecanismos responsables del efecto cardioprotector de las hAMSC, evaluamos específicamente el impacto terapéutico de sus vesículas extracelulares (EVs) en el modelo murino de ischemia/reperfusión miocárdica. La administración de EVs derivadas de hAMSC reprodujo de forma significativa los efectos beneficiosos observados tras la

Resumen

administración celular, evidenciando una mejora de la función ventricular y una atenuación del remodelado fibrótico postisquémico. Estos resultados confirman que las EVs constituyen un mediador clave de la acción paracrina de las hAMSC y refuerzan su papel como herramienta terapéutica con potencial traslacional, al permitir una intervención libre de células y, por tanto, más controlable.

Ante la necesidad de explorar la base molecular del efecto cardioprotector de las hAMSC frente a la isquemia miocárdica, y teniendo en cuenta, como ya hemos mencionado, los recientes hallazgos de los ARN no codificantes como dianas terapéuticas, incluyendo las enfermedades cardiovasculares, decidimos explorar la relevancia funcional de miR-150-5p en la cardioprotección mediada por hAMSC a través de la tecnología de la edición génica basada en CRISPR/Cas9. La eliminación específica de miR-150-5p en las hAMSC, generando de esta forma una nueva línea celular, abolió completamente sus efectos beneficiosos, resultando en la pérdida de la preservación funcional y un incremento del remodelado fibrótico post-isquémico, aportando de esta forma, por vez primera, la contribución de un ARN no codificante como es miR-150-5p, como mediador esencial de la acción cardioprotectora de las hAMSC y refuerzan así, el papel central del eje MIAT/miR-150/HOXA-4 en la fisiopatología del infarto de miocardio. La trascendencia de este hallazgo abre una nueva ventana de investigación en donde analizar el efecto de este microRNA en otras estrategias terapéuticas, que puedan suponer un avance muy significativo, más allá de su administración celular.

Con el objetivo de avanzar hacia estrategias terapéuticas más controlables, si cabe, y con mayor potencial traslacional, hemos explorado en esta tesis el uso de nanopartículas funcionalizadas, al incorporar en su estructura la diana terapéutica que nosotros proponemos: el microRNA miR-150-5p (denominada por nosotros NMC-150). La administración temprana de NMC-150 tras la isquemia/reperfusión reprodujo los

Resumen

efectos cardioprotectores observados con las hAMSC y sus EVs, mejorando la función ventricular, incrementando los niveles de miR-150-5p y reduciendo el remodelado fibrótico. De forma destacable, NMC-150 actuó de manera selectiva sobre el eje HOXA-4, sin alterar los niveles de MIAT, lo que sugiere una intervención más precisa sobre los mecanismos efectores del daño miocárdico, constituyendo de esta forma una estrategia prometedora para el tratamiento del infarto y lo que es importante: libre de células.

En conjunto, y gracias a nuestra investigación sobre el papel terapéutico de las hAMSC, los resultados de esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto que la modulación del eje MIAT/miR-150/HOXA-4 representa una estrategia eficaz para atenuar el daño cardíaco y el remodelado adverso tras un episodio de isquemia/reperfusión miocárdica. Asimismo, nuestro trabajo, además de validar el papel cardioprotector de las hAMSC, también lo hacen sus vesículas extracelulares y las aproximaciones nanotecnológicas basadas en miRNAs como herramientas terapéuticas prometedoras en el tratamiento del infarto agudo de miocardio. Este trabajo contribuye, por tanto, a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la fibrosis post-infarto y abre nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias avanzadas dirigidas a mejorar el pronóstico de los pacientes con enfermedad cardiovascular isquémica.

Palabras clave: Infarto agudo de miocardio (IAM), Células madre mesenquimales humanas derivadas de placenta (hAMSC), MIAT (ARN largo no codificante, Myocardial Infarction-Associated Transcript), miR-150-5p, Remodelado cardíaco y fibrosis, Nanotecnología.

SUMMARY

Summary

Acute myocardial infarction is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide and represents the most severe consequence of ischemic cardiovascular disease. This event is triggered by the sudden obstruction of a coronary artery, resulting in a period of myocardial ischemia followed, in the best-case scenario, by a phase of therapeutic reperfusion. Although early reperfusion is essential to limit infarct size and preserve the viability of cardiac tissue, this process can, in some cases, induce a complex cascade of molecular and cellular events that may exacerbate the initial damage.

In response to necrosis associated with the ischemic process, myocardial cells develop an intense inflammatory response characterized by the recruitment of immune cells and the release of pro-inflammatory molecules, whose initial aim is to remove damaged tissue and facilitate repair. However, the inadequate resolution of the inflammatory process results in a phenomenon known as adverse cardiac remodeling, characterized by the persistence of inflammatory macrophage activity, activation of cardiac fibroblasts, and excessive extracellular matrix deposition. This structural remodeling alters the architecture and function of the myocardium, irreversibly compromising the contractile capacity of the heart. In this context, the identification of molecular mechanisms that precisely regulate the balance between inflammation and repair is key for the development of new therapeutic strategies for myocardial infarction.

In this setting, mesenchymal stem cells (MSC) have emerged as a promising therapeutic strategy for the treatment of acute myocardial infarction due to their ability to modulate the inflammatory response and promote tissue repair. Beyond their differentiation potential, MSCs primarily exert paracrine effects by secreting immunomodulatory, proangiogenic, and antifibrotic factors, potentially contributing to the resolution of post-ischemic inflammation, the preservation of viable tissue, and the attenuation of adverse cardiac remodeling. Several studies have shown that MSC administration after an ischemic event can improve ventricular function and limit progression to heart failure, positioning these cells as a key tool in the development of advanced therapies for cardiac protection. However, data remain limited on the potential role of a specific MSC subset, particularly human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells (hAMSC).

Within this framework, the present doctoral thesis has focused on evaluating the cardioprotective potential of hAMSC in a murine model of myocardial ischemia/reperfusion, which reliably reproduces the functional, structural, and molecular changes observed in human myocardial infarction. To this end, a comprehensive

Summary

experimental approach has been employed, combining molecular biology, histology, echocardiography, and cell biology techniques. The results demonstrate that the administration of hAMSC following an ischemia/reperfusion episode confers significant cardiac protection, as evidenced by preserved ventricular function and reduced fibrotic remodeling. Notably, these effects occur independently of the prolonged engraftment of hAMSC in the injured myocardium, suggesting that their cardioprotective action is primarily exerted through paracrine mechanisms.

In recent years, significant advances have been made in the study of cardiovascular diseases, particularly in identifying new therapeutic targets, among which nucleic acids, and notably non-coding ribonucleic acid (RNA) molecules, have emerged as fundamental regulators of gene expression under both physiological and pathological conditions. Among these, long non-coding RNAs (lncRNAs) and microRNAs (miRNAs) play a central role in modulating molecular pathways involved in inflammation, apoptosis, and cardiac fibrosis. Of particular relevance in the context of acute myocardial infarction is the lncRNA MIAT (Myocardial Infarction-Associated Transcript), initially identified as a genetic risk factor for myocardial infarction and later characterized as a key regulator of cardiac remodeling. MIAT acts as a competing endogenous RNA, sequestering “cardioprotective” miRNAs, among which miR-150-5p is especially noteworthy, and whose involvement in this process leads to the de-repression of profibrotic genes, particularly the HOXA-4 gene (Homeobox A4), and the activation of signaling pathways linked to worsening myocardial function.

In this context, we have discovered how hAMSC release extracellular vesicles enriched in miR-150-5p, particularly under hypoxic and inflammatory conditions similar to those present in the microenvironment generated after myocardial infarction. These extracellular vesicles can functionally transfer miR-150-5p to cells within the injured myocardium, increasing its tissue levels and specifically modulating the MIAT/miR-150/HOXA-4 axis. As a result, our work has revealed, for the first time, a decrease in HOXA-4 expression and an attenuation of the activation of associated profibrotic pathways, resulting in reduced adverse remodeling and a significant improvement in cardiac function.

To further investigate this and more precisely discriminate the mechanisms underlying the cardioprotective effect of hAMSC, we specifically evaluated the therapeutic impact of their extracellular vesicles (EVs) in a murine model of myocardial ischemia/reperfusion. The administration of hAMSC-derived EVs significantly

Summary

reproduced the beneficial effects observed following cellular administration, demonstrating an improvement in ventricular function and an attenuation of post-ischemic fibrotic remodeling. These results confirm that EVs constitute a key mediator of the paracrine action of hAMSC and reinforce their role as a therapeutic tool with translational potential, as they allow for a cell-free and therefore more controllable intervention.

Given the need to explore the molecular basis of the cardioprotective effect of hAMSC against myocardial ischemia, and taking into account, as previously mentioned, the recent identification of non-coding RNAs as therapeutic targets, including in cardiovascular diseases, we decided to investigate the functional relevance of miR-150-5p in hAMSC-mediated cardioprotection using CRISPR/Cas9-based gene editing technology. The specific deletion of miR-150-5p in hAMSC, thereby generating a new cell line, completely abolished their beneficial effects, resulting in the loss of functional preservation and an increase in post-ischemic fibrotic remodeling. This finding provides, for the first time, evidence of the contribution of a non-coding RNA such as miR-150-5p as an essential mediator of the cardioprotective action of hAMSC and further reinforces the central role of the MIAT/miR-150/HOXA-4 axis in the pathophysiology of myocardial infarction. These findings open a new avenue of research to explore the effect of this microRNA in other therapeutic strategies that may represent a substantial advance beyond its cellular administration.

With the aim of advancing toward more controllable therapeutic strategies with greater translational potential, this thesis has explored the use of functionalized nanoparticles that incorporate the therapeutic target we propose: the microRNA miR-150-5p (referred to hereafter as NMC-150). Early administration of NMC-150 following ischemia/reperfusion reproduced the cardioprotective effects observed with hAMSC and their EVs, improving ventricular function, increasing miR-150-5p levels, and reducing fibrotic remodeling. Notably, NMC-150 selectively acted on the HOXA-4 axis without altering MIAT levels, suggesting a more precise intervention on the effector mechanisms of myocardial damage, thereby constituting a promising cell-free strategy for the treatment of myocardial infarction.

Overall, and based on our investigation into the therapeutic role of hAMSC, the results of this doctoral thesis demonstrate that modulation of the MIAT/miR-150/HOXA-4 axis represents an effective strategy to attenuate cardiac damage and adverse remodeling following myocardial ischemia/reperfusion. Furthermore, our work not only validates the

Summary

cardioprotective role of hAMSC, but also highlights their extracellular vesicles and miRNA-based nanotechnological approaches as promising therapeutic tools for the treatment of acute myocardial infarction. This study therefore contributes to a better understanding of the molecular mechanisms involved in post-infarction fibrosis and opens new perspectives for the development of advanced therapies aimed at improving the prognosis of patients with ischemic cardiovascular disease.

Keywords: Acute myocardial infarction (AMI), human amniotic membrane mesenchymal stem cells, MIAT (long non-coding RNA, Myocardial Infarction-Associated Transcript), miR-150-5p, cardiac remodeling and fibrosis, nanotechnology.

INTRODUCCIÓN

BLOQUE I. BASES GENERALES DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

1.1 Enfermedad Cardiovascular, un enfoque epidemiológico

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de mortalidad mundial, representando aproximadamente 18 millones del total de fallecimientos anuales, lo que equivale al 32% de todas las muertes globales (World Health Organization, 2021), y, según los datos de la Sociedad Europea de Cardiología, las enfermedades cardiovasculares representan el 46 % y el 39 % **de las muertes en mujeres y hombres, respectivamente**, en los países de la Unión Europea (**Figura 1**). De entre todas ellas, el infarto agudo de miocardio (IAM) es una de las manifestaciones más críticas y con mayor mortalidad, resultante de la isquemia a la que el tejido cardíaco ha de verse sometido tras la oclusión de una o varias arterias coronarias. Lo que provoca un déficit significativo en la perfusión y la subsecuente muerte celular (Mechanic et al., 2025). A pesar de los avances significativos en tratamientos médicos e intervenciones, el IAM sigue siendo un gran desafío para la salud global, lo que enfatiza la necesidad urgente de estrategias terapéuticas innovadoras y una comprensión integral de su fisiopatología.

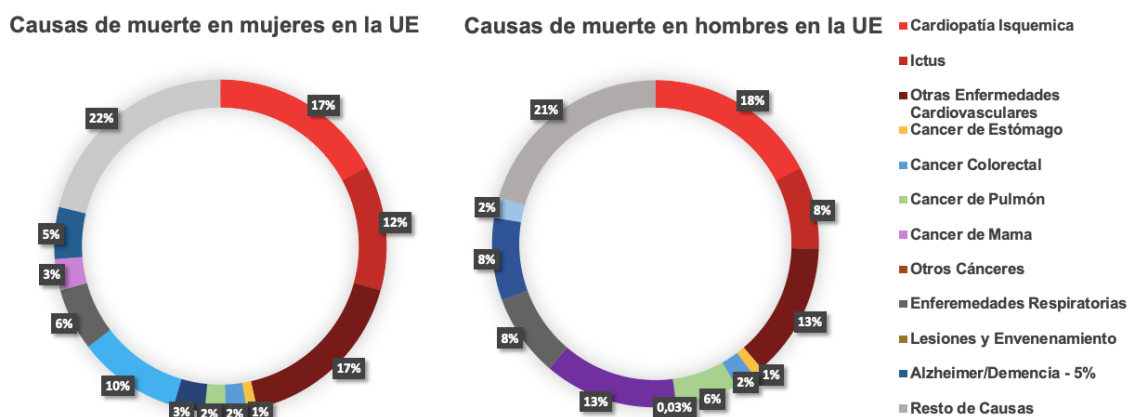


Figura 1. Principales causas de muerte a nivel europeo. Datos obtenidos de European Society of Cardiology. (2022). ESC Atlas of Cardiology Realities. Elaboración propia.

1.2 Perspectiva global de las enfermedades cardiovasculares

Las ECV abarcan un espectro de trastornos que afectan al corazón y los vasos sanguíneos, incluyendo la enfermedad arterial coronaria (EAC), el accidente cerebrovascular, la enfermedad arterial periférica y la insuficiencia cardíaca. La carga económica y social que generan las ECV es inmensa, con los sistemas de salud en todo el mundo asignando recursos sustanciales a la prevención, el diagnóstico y el tratamiento. Solo en Europa, el coste económico anual de las ECV supera los 210 mil millones de euros (European Heart Network, 2017), mientras que en los países subdesarrollados y en vías de desarrollo, la situación es aún más dramática, debido al hecho de que este grupo de enfermedades contribuyen, por regla general, al desarrollo de otras comorbilidades asociadas, lo que plantea desafíos complejos para sus sistemas de atención sanitaria (Roth et al., 2020).

1.2.1 Enfermedad cardíaca isquémica e infarto agudo de miocardio

La etiología de la enfermedad cardíaca de origen isquémico (ECI) reside en la reducción de la perfusión miocárdica debido a la oclusión de las arterias coronarias (Institute of Medicine, 2010; Ramirez-Carracedo et al., 2020). El infarto agudo de miocardio (IAM) representa la manifestación aguda de la enfermedad cardíaca isquémica (ECI) y es una emergencia médica que requiere intervención inmediata (Mechanic et al., 2025).

La fisiopatología del IAM involucra una compleja interacción de procesos hemodinámicos, celulares y moleculares que se desencadenan tras la interrupción del flujo coronario. La isquemia conduce a la muerte de cardiomiocitos, activando una respuesta inflamatoria destinada a eliminar el tejido necrótico y culminando con la formación de una cicatriz fibrosa que, si bien preserva la integridad estructural del ventrículo, carece de capacidad contráctil (Frangogiannis, 2015). Estos procesos complejos pueden conllevar una resolución post-isquémica inadecuada, instaurando un remodelado cardíaco adverso, caracterizado por dilatación ventricular, hipertrofia compensatoria y deposición excesiva de matriz extracelular, comprometiendo la función cardíaca y la capacidad del corazón para mantener una perfusión sanguínea adecuada, lo que puede derivar en insuficiencia cardíaca (Ramírez et al., 2019).

La magnitud del remodelado adverso post-infarto se asocia directamente a la aparición y gravedad de la insuficiencia cardíaca y constituye un determinante clave del pronóstico a largo plazo (Marcos-Garcés et al., 2025). A nivel molecular, estos procesos están regulados por redes de señalización que incluyen proteínas, microARNs (denominados

en adelante microRNAs, por sus siglas en inglés) y otros ARN no codificantes, los cuales modulan de forma precisa la inflamación, la apoptosis y la fibrosis miocárdica (Boon & Dimmeler, 2015; Sygitowicz et al., 2020; Xie et al., 2021).

La presentación clínica del IAM puede variar entre pacientes, aunque generalmente comprende un dolor anginoso precordial intenso y punzante, acompañado de disnea, diaforesis, irradiación dolorosa hacia el brazo izquierdo, el cuello y la mandíbula, junto con un descenso abrupto de la presión arterial. No obstante, como observaremos posteriormente, en determinadas situaciones, en pacientes con un proceso coronario obstructivo, aunque no de forma asintomática, el fenotipo puede resultar difícilmente asociable a un proceso de oclusión total (Thygesen et al., 2019). Una de las herramientas clásicas para estratificar la gravedad de los pacientes con IAM es la clasificación de Killip y Kimball, publicada en 1967, y basada en la presencia de signos clínicos asociados con la insuficiencia cardíaca y el shock cardiogénico. Esta clasificación permite predecir el pronóstico a corto plazo y guiar las estrategias terapéuticas idóneas para el paciente en cuestión (Killip & Kimball, 1967).

Clasificación de Killip y Kimball

1. **Clase I:** pacientes sin signos clínicos de insuficiencia cardíaca, que representan el grupo de mejor pronóstico.
2. **Clase II:** presencia de insuficiencia cardíaca de leve a moderada, caracterizada por estertores pulmonares, un tercer ruido cardíaco (galope) y posible congestión venosa pulmonar.
3. **Clase III:** edema agudo de pulmón, manifestándose con disnea severa, estertores difusos y marcada hipoxemia, lo que indica una disfunción ventricular izquierda significativa.
4. **Clase IV:** shock cardiogénico, definido por hipotensión persistente (presión arterial sistólica <90 mmHg) acompañada de hipoperfusión tisular, oliguria y frialdad cutánea. Este grupo presenta la mayor mortalidad intrahospitalaria.

La clasificación de Killip y Kimball sigue siendo, a día de hoy, relevante en la práctica clínica, ya que permite una rápida evaluación del estado clínico del paciente en el momento de la presentación. Estudios contemporáneos han confirmado su utilidad como herramienta pronóstica, demostrando una relación directa entre la clase funcional Killip y la mortalidad a corto y largo plazo (DeGeare et al., 2001; Mello et al., 2014).

Introducción

Además de la sintomatología anteriormente mencionada, el diagnóstico se completa con la detección de cambios electrocardiográficos y la elevación de marcadores bioquímicos cardíacos, incluyendo las distintas formas de troponinas cardíacas, la presencia de proteína C reactiva, la creatina quinasa MB, y los péptidos natriuréticos tipo B y su precursor proBNP (Basit et al., 2023). A pesar de los avances en el tratamiento, que incluyen la intervención coronaria percutánea primaria (ICPP) y la trombólisis (Ibáñez et al., 2018; Keeley et al., 2003), la carga global del IAM sigue siendo sustancial, lo que requiere una investigación continua sobre enfoques diagnósticos y terapéuticos novedosos (Roth et al., 2020).

1.2.2 Disfunción cardíaca en el IAM

La función cardíaca depende de la perfusión miocárdica continua, que garantiza la entrega de oxígeno y nutrientes a los cardiomiocitos. Durante un IAM, la interrupción del flujo sanguíneo produce un desequilibrio entre la oferta y la demanda de oxígeno, lo que desencadena la isquemia y la posterior necrosis del conjunto de células que conforman el tejido miocárdico (Heusch, 2019). Como consecuencia del evento isquémico se producen cambios metabólicos y estructurales, destacando de manera significativa los referidos a la alteración de los niveles de ATP, debido a un descenso brusco de la fosforilación oxidativa, fenómeno directamente asociado al aumento del metabolismo anaeróbico y la acumulación de lactato (Heusch, 2019), lo cual provoca una caída del pH intracelular, generando una acidosis metabólica acompañada de alteraciones en las funciones enzimáticas y de las proteínas estructurales, agravando el daño celular (Buja, 2023). A partir de este hecho, se producirá una cascada orquestada de acontecimientos que culminará en la necrosis tisular, tal y como desarrollaremos a continuación.

La acidosis metabólica a la que se ve sometido el miocardio se agrava de manera exponencial al generar por este motivo la disfunción de canales iónicos tan relevantes como la bomba de Na^+/K^+ , clave para la restitución de las concentraciones iónicas en cada ciclo cardíaco. Ello, además, supone la entrada masiva de agua intracelular, originando edema celular y una marcada insuficiencia de la actividad mitocondrial y, por tanto, de la capacidad para producir ATP, junto con la sobrecarga de calcio, clave para la sobreactividad de enzimas proteolíticas de tipo proteasas, fosfolipasas y endonucleasas (Kjeldsen, 2003; Pirahanchi et al., 2023). La acumulación de lactato, junto con la acidosis y el estrés osmótico, sumada a la acción de las enzimas degradativas, conduce finalmente a la disrupción de las membranas celulares y

Introducción

organelares (incluyendo la actividad lisosomal), liberando enzimas hidrolíticas y causando finalmente la necrosis masiva tisular (Kalogeris et al., 2012).

El resultado final que conduce a la necrosis miocárdica, evidentemente tiene como consecuencia el descenso significativo de la contractilidad, impidiendo el funcionamiento adecuado del ciclo de contracción-relajación del miocardio, lo que resulta en disfunción contráctil y la pérdida de la contractilidad regional del corazón, donde, si la isquemia persiste, el daño se vuelve irreversible, resultando en necrosis, apoptosis y necroptosis de los cardiomiocitos. Todo finalmente culmina en la formación de tejido necrótico y en la eventual remodelación fibrótica, donde los miocitos son reemplazados por tejido cicatricial no contráctil (**Figura 2**) (Ojha & Dhamoon, 2023; Talman & Ruskoaho, 2016).



Figura 2. Cambios metabólicos y estructurales implicados en la disfunción cardíaca tras un evento de isquemia miocárdica. Elaboración propia.

1.2.3 Repercusión hemodinámica

Tras un IAM se producen cambios hemodinámicos y funcionales provocados de la necrosis secundaria a la isquemia (Buja, 2023). La magnitud de la repercusión hemodinámica tras un infarto depende de factores como la extensión del área infartada, la localización de la lesión, el tiempo de evolución y la presencia de colateralización coronaria (Richardson et al., 2015). La repercusión hemodinámica responde a los siguientes factores:

1. **Pérdida de la contractilidad miocárdica:** La necrosis de los cardiomiocitos genera una disminución de la capacidad contráctil de la región afectada, alterando, por consiguiente, la función sistólica. Como consecuencia, se produce un incremento de la poscarga, con la consiguiente disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) (Sutton & Sharpe, 2000).
2. **Disminución del gasto cardíaco:** El descenso significativo de la FEVI tiene como consecuencia el déficit del gasto cardíaco (CO, del inglés *Cardiac Output*), entendido como el volumen de sangre eyectado por minuto (Chahine & Alvey, 2023; King & Lowery, 2023). Si el gasto cardíaco no es suficiente para satisfacer las demandas metabólicas del organismo, se desarrolla hipoperfusión tisular y, en casos graves, puede progresar hacia shock cardiogénico (Kosaraju et al., 2023), cursando con hipotensión sistémica sostenida y la hipoperfusión de órganos vitales (Reynolds & Hochman, 2008; van Diepen et al., 2017).
3. **Aumento de la presión de llenado ventricular:** La disfunción miocárdica secundaria al IAM también afecta la función diastólica, al perder su capacidad de relajarse adecuadamente, fenómeno conocido como *compliance* diastólica. La pérdida de la *compliance* (distensibilidad) supone un incremento progresivo de la disfunción diastólica, lo que tiene como consecuencia el aumento de la presión de llenado en la aurícula izquierda (Zaaqoq et al., 2025), y consecuentemente, un incremento de las presiones en el circuito venoso pulmonar, favoreciendo el desarrollo del fenómeno congestivo y por consiguiente edematoso, contribuyendo al fenómeno de disnea y por ello, la ocurrencia de insuficiencia cardíaca (IC) aguda y congestiva.
4. **Desarrollo de insuficiencia cardíaca:** Como acabamos de mencionar, la severidad de la IC tras el remodelado cardíaco dependerá de la severidad del mismo, con el riesgo progresivo hacia la IC congestiva (ICC) y el deterioro consiguiente en la función respiratoria y el edema (Cohn et al., 2000; Mann & Felker, 2021; Packer & McMurray, 2021).

5. **Otras complicaciones:** el IAM, además, puede dar lugar a diversas complicaciones tanto estructurales como de la conducción eléctrica. Un claro ejemplo lo constituye el comportamiento arritmogénico que surge frecuentemente tras el infarto, en cuyo caso, y dependiendo del área de afectación, pueden presentarse taquiarritmias, bradiarritmias, fibrilaciones tanto auriculares (FA) como ventriculares (FV), y, en el peor de los casos, la FV polimórfica no sostenida puede finalizar en el exitus del paciente (Ibáñez et al., 2018). En otros casos, aun no siendo de carácter mortal, se puede observar **necrosis transmural extensa**, especialmente en las primeras 48 a 72 horas post-infarto, donde puede producirse una **ruptura miocárdica**, con riesgo de hemopericardio y taponamiento cardíaco, complicaciones potencialmente fatales (McDonagh et al., 2021). Aunque menos frecuente, el remodelado cardíaco adverso post-infarto puede, en determinados casos, desembocar en la formación de aneurismas ventriculares, caracterizados por una dilatación localizada y adelgazamiento de la pared cardíaca (**Figura 3**) (Kehat & Molkentin, 2010; Mann & Felker, 2021; Pepper & Lee, 1999; van Berlo et al., 2013; Xanthopoulos et al., 2023).

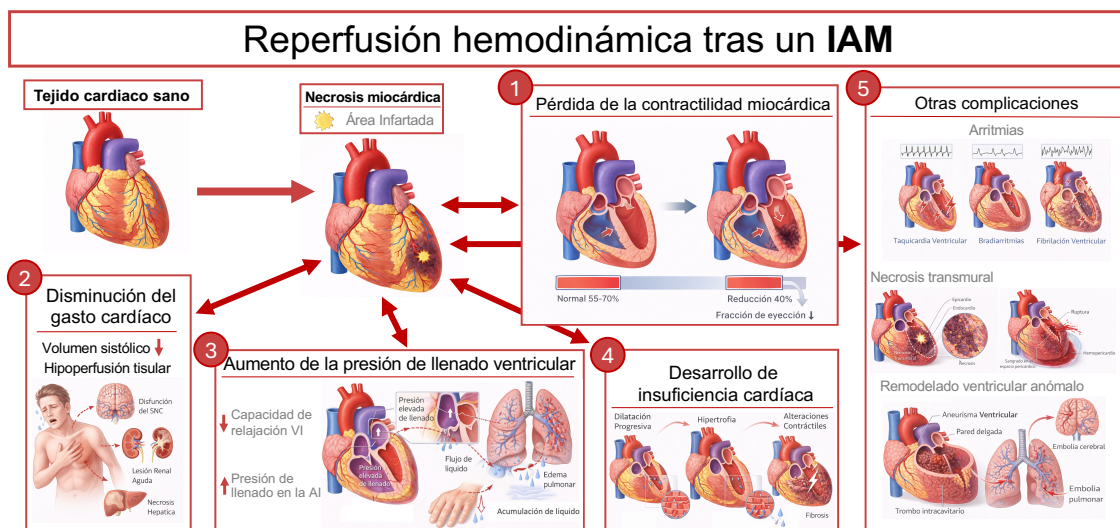


Figura 3. Esquema de los principales cambios hemodinámicos y complicaciones derivadas de la reperusión tras un IAM. Elaboración propia.

Debido a todas las alteraciones sufridas, el organismo pone en marcha diversos mecanismos de adaptación compensatoria con el fin de contrarrestar la repercusión hemodinámica. Entre los más relevantes se encuentra la **respuesta neurohormonal**, mediada por el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA) y el sistema nervioso simpático, los cuales se activan para aumentar la precarga, la poscarga y la

contractilidad cardíaca, con el objetivo de mantener el gasto cardíaco, a expensas de incrementar la presión auricular 4 veces más de lo normal. Sin embargo, la activación sostenida de estos sistemas resulta perjudicial, ya que contribuye a la progresión de la disfunción ventricular y favorece procesos de remodelación cardíaca adversa (Pepper & Lee, 1999; Xanthopoulos et al., 2023), en donde la ocurrencia de **hipertrofia ventricular** es la principal respuesta compensatoria, mediante la cual el corazón intenta suplir la disfunción aumentando el grosor de las paredes ventriculares. No obstante, la hipertrofia, inicialmente adaptativa, evoluciona hacia un fenotipo patológico, asociado a alteraciones estructurales y funcionales del miocardio (Kehat & Molkentin, 2010; van Berlo et al., 2013).

1.3 Desde la inflamación hasta la fibrosis

La progresión desde la inflamación inicial hasta el desarrollo de fibrosis es un mecanismo esencial en la remodelación del tejido cardíaco después de un IAM (Yin et al., 2023). Durante la fase aguda, mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleucina-6 (IL-6) y la interleucina-1 β (IL-1 β) son fundamentales para orquestar esta respuesta, pero su persistencia o desregulación puede exacerbar el daño miocárdico y promover su remodelación adversa (Frangogiannis, 2014, 2015).

Tras el IAM suceden tres fases clave hasta la resolución: **inflamación, reparación y maduración** (Prabhu & Frangogiannis, 2016). Los cardiomiocitos necróticos liberan los denominados patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), los cuales son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones en las células inmunes innatas, principalmente macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, desencadenando una intensa respuesta inflamatoria caracterizada por la infiltración de neutrófilos y monocitos que liberan citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) y enzimas proteolíticas (Frangogiannis, 2014; Nian et al., 2004). Estas últimas, como las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9), degradan componentes de la MEC, lo que facilita la eliminación de células muertas y residuos intersticiales. En este punto, la falta de contrapesos hacia la reparación contribuye al remodelado ventricular adverso (Cuadrado, Castejon, et al., 2016).

Tras el proceso inflamatorio, durante la fase reparativa, los macrófagos proinflamatorios (M1) sufren el proceso denominado polarización, transitando desde un fenotipo proinflamatorio (M1) a uno resolutivo (M2), secretando mediadores como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), IL-4 e IL-10, claves para el freno del proceso inflamatorio (O'Rourke et al., 2019; Tesoro et al., 2022). Ello condiciona la síntesis de

Introducción

un elevado número de citocinas antiinflamatorias, cuya misión final pasa por la síntesis de un elevado número de proteínas de matriz, en donde la presencia de colágenos tipo I y III es fundamental para la posterior cicatrización (Psarras et al., 2019; Levick et al., 2011). Una vez concluida esta fase, dará comienzo la fase de maduración.

Todo lo anteriormente descrito ocurre como consecuencia de la activación de múltiples cascadas de señalización molecular, orientadas a mitigar, en la medida de lo posible, el daño miocárdico asociado a la isquemia que se produce tras el IAM. De entre todas ellas, las más significativas son las vías del TGF- β (Hanna & Frangogiannis, 2019; C. Li et al., 2023), angiotensina II (Murphy et al., 2015; Campbell & Katwa, 1997), Wnt/ β -catenina (Yousefi et al., 2020; Fu et al., 2019), la activación de receptores Toll-like (TLR) (Ramirez-Carracedo et al., 2020) y haremos mención especial a la expresión de **ácidos nucleicos no codificantes**, objeto principal de la presente Tesis Doctoral.

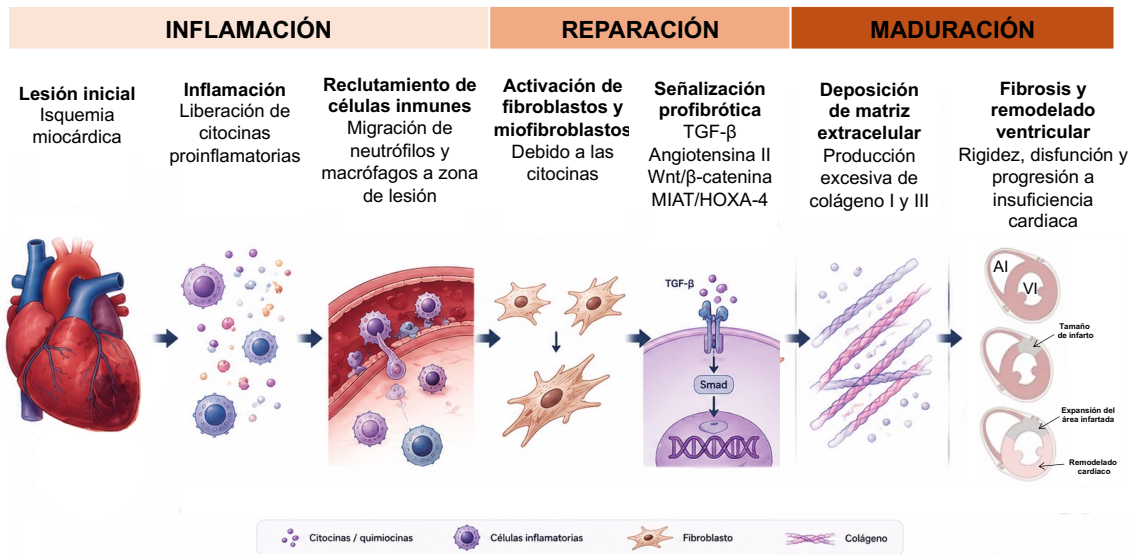


Figura 4. Representación esquemática de los principales mecanismos celulares y moleculares implicados en el remodelado cardíaco tras un infarto agudo de miocardio. Elaboración propia.

BLOQUE II: CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE PLACENTA COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA PARA TRATAR EL IAM

Como se ha desarrollado en el Bloque I, el infarto agudo de miocardio se asocia a un daño miocárdico irreversible y a un remodelado cardíaco adverso que condiciona de forma determinante la evolución clínica de los pacientes. A pesar de los avances en las estrategias de reperfusión y el tratamiento farmacológico, las terapias actuales no abordan de manera directa los mecanismos de reparación y preservación funcional del tejido cardíaco dañado.

En este contexto, resulta necesario explorar nuevas aproximaciones terapéuticas con el objetivo de preservar la función ventricular y mejorar el pronóstico tras el evento isquémico. Dentro de este marco, las células madre mesenquimales (MSC) han sido ampliamente estudiadas por sus propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y paracrinas (N. Song et al., 2020).

2.1 ¿Qué son las células madre?

Las células madre (*Stem Cells* en inglés) son precursoras celulares no especializadas que poseen la capacidad de auto-renovación y diferenciarse en uno o más tipos celulares (Bianco & Robey, 2001; Chagastelles & Nardi, 2011; National Institutes of Health, 2016; Pardal et al., 2003). Estas propiedades confieren a las células madre un papel esencial en el desarrollo embrionario, el mantenimiento de la homeostasis tisular y los procesos de reparación y regeneración en el organismo adulto (Pekovic & Hutchison, 2008). La clasificación de las células madre se basa en su potencial de diferenciación, el cual determina su nivel de plasticidad y su grado de especialización dentro de la jerarquía del desarrollo celular. De esa forma, las células madre las podemos clasificar de la siguiente forma:

Células madre totipotentes: representan el mayor grado de plasticidad celular. Son capaces de generar la totalidad de los tipos celulares que componen un organismo, así como los tejidos extraembrionarios necesarios para su desarrollo, como la placenta. En los mamíferos, este potencial se restringe a las primeras divisiones del cigoto,

Introducción

desapareciendo rápidamente conforme avanza el desarrollo embrionario (Condic, 2014).

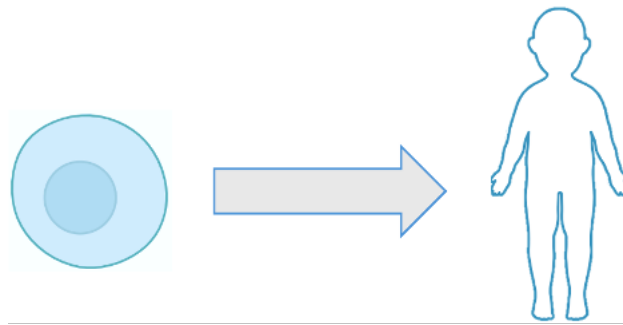


Figura 5. imagen representativa de célula madre totipotente y su capacidad de diferenciación. Elaboración propia.

Células madre pluripotentes: poseen la capacidad de diferenciarse en células derivadas de las tres capas germinales embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo; pero carecen de la capacidad para formar tejidos extraembrionarios. Este grupo incluye a las células madre embrionarias y a las células pluripotentes inducidas, que han sido ampliamente estudiadas por su elevado potencial diferenciador y su interés en investigación básica y medicina regenerativa (G. Liu et al., 2020)

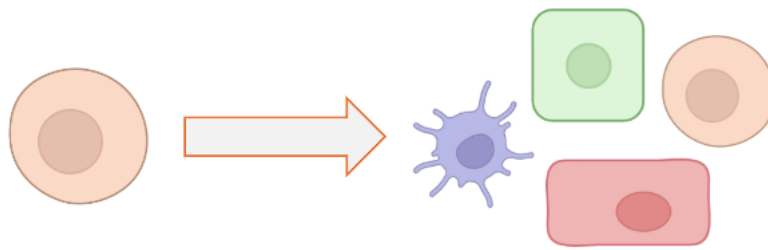


Figura 6. imagen representativa de célula madre pluripotente y su capacidad de diferenciación. Elaboración propia.

Células madre multipotentes: células que surgen a medida que avanza el desarrollo, en las que el potencial de diferenciación se va restringiendo, dando lugar a un número limitado de linajes celulares relacionados entre sí. Este tipo de células se encuentra principalmente en tejidos adultos, donde desempeñan un papel clave en el mantenimiento y la regeneración tisulares (Clevers, 2015). Un ejemplo clásico lo constituyen las células madre hematopoyéticas, capaces de originar las distintas poblaciones celulares de la sangre. En este grupo de células se encuentran las de mayor relevancia para esta Tesis Doctoral: las **células madre mesenquimales (MSC, del inglés *mesenchymal stem cells*)**.

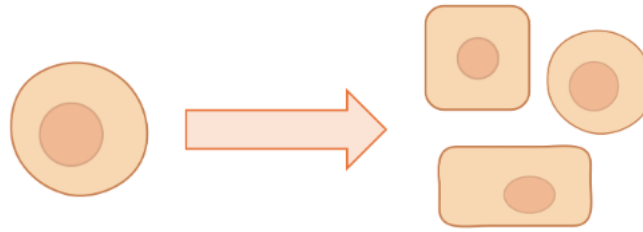


Figura 7. imagen representativa de célula madre multipotente y su capacidad de diferenciación. Elaboración propia

Cabe mencionar, además, la existencia de células madre unipotentes, que conservan la capacidad de autorrenovación, pero su potencial de diferenciación se limita a un único tipo celular. Aunque su plasticidad es menor, resultan esenciales para la renovación continua de tejidos con alta tasa de recambio celular (Blanpain & Fuchs, 2014).

2.2 ¿Qué son las MSC?

Las células madre mesenquimales (MSC) fueron descritas por primera vez en la década de 1960 por Friedenstein y colaboradores como una subpoblación de células estromales derivadas de la médula ósea, caracterizadas por su capacidad clonogénica, su adhesión al plástico y su potencial regenerativo (Friedenstein et al., 1968; M. B. Murphy et al., 2013). Desde entonces, su potencial regenerativo, independientemente de su origen tisular, ha sido ampliamente estudiado y contrastado por numerosos grupos de investigación (de Laorden et al., 2023; W. Du et al., 2016; Hass et al., 2011; Hwangbo et al., 2010; Kadam et al., 2010; E. J. Lee et al., 2012; Namiot et al., 2022; Y.-S. Song et al., 2017; W. Zhang et al., 2013).

Las MSC constituyen una población heterogénea de células estromales multipotentes con capacidad para diferenciarse en múltiples tipos celulares del linaje mesodérmico, como osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Caplan, 1991; de Laorden et al., 2025; Dominici et al., 2006; Soliman et al., 2021). Además de su potencial de diferenciación, estas células desempeñan un papel clave en la orquestación del desarrollo, el mantenimiento y la reparación tisular mediante mecanismos paracrinos y de interacción celular (Samsonraj et al., 2015; Shammaa et al., 2020; Q. Yuan et al., 2020). Debido a estas propiedades, las MSC han sido ampliamente investigadas en el ámbito de la medicina regenerativa, destacando por su capacidad inmunomoduladora, su migración hacia sitios de lesión y la secreción de moléculas bioactivas con efectos terapéuticos (**Figura 8**) (Pittenger et al., 1999).

Introducción

Las MSC pueden aislarse a partir de diversas fuentes tisulares, incluyendo la médula ósea, el tejido adiposo, la sangre periférica y tejidos neonatales como el cordón umbilical, el líquido amniótico y la membrana amniótica (Mishra et al., 2020). No obstante, la médula ósea ha sido históricamente la fuente más utilizada para su aislamiento y caracterización.

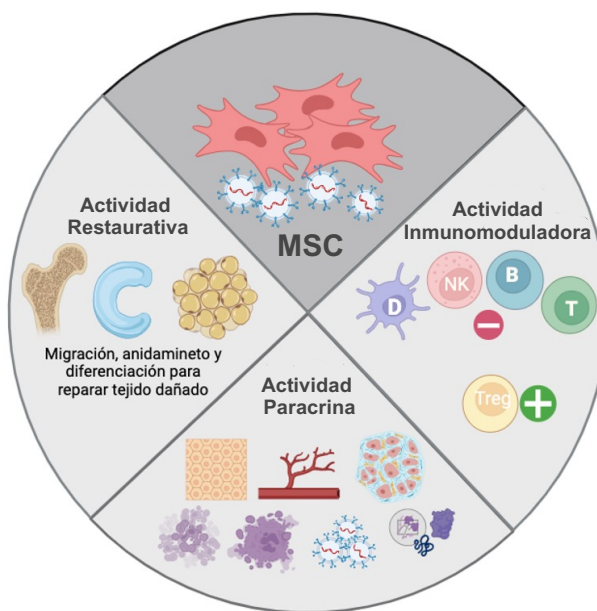


Figura 8. Ilustración de las distintas actividades de las hAMSC como potenciales terapéuticos. Elaboración propia.

Entre las propiedades de las MSC, es muy significativa la capacidad de secreción de una amplia gama de moléculas bioactivas, entre las que se incluyen citocinas, factores de crecimiento (factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF; factor de crecimiento básico de fibroblastos, bFGF) y exosomas que contienen **microRNAs**, que **contribuyen a su gran capacidad angiogénica, antiapoptótica y de síntesis de matriz extracelular** (Vizoso et al., 2017). Además, es importante destacar que las MSC presentan las siguientes capacidades:

Multipotencia. Las MSC son capaces de diferenciarse en células de origen mesodérmico, incluidos adipocitos, condrocitos y osteoblastos, así como células de linajes ectodérmico y endodérmico en condiciones específicas (Dominici et al., 2006).

Capacidad inmunomoduladora. Las MSC presentan propiedades inmunosupresoras al modular la actividad de las células inmunitarias, incluidos los linfocitos T, los linfocitos B y las células NK (por sus siglas en inglés, *Natural Killer*). Esto lo logran a través de

interacciones entre células y la secreción de factores solubles como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la interleucina-10 (IL-10), la prostaglandina E2 (PGE2), entre otros (Le Blanc & Mougiakakos, 2012).

Homing (anidamiento). Las MSC poseen la capacidad de alojarse en sitios de lesión, inflamación o tumorales, guiadas por quimiocinas como el factor derivado del estroma 1 (SDF-1) y su receptor CXCR4 (Marquez-Curtis & Janowska-Wieczorek, 2013).

Además de las propiedades mencionadas, un reciente metaanálisis que incluyó 13 ensayos clínicos aleatorizados con un total de 956 pacientes, reveló que la terapia con MSC en pacientes con enfermedad cardíaca isquémica, aumentó significativamente la FEVI, en comparación con el valor basal tras el infarto sin tratamiento posterior, resultando ser más pronunciado cuando la administración de las células fue realizada dentro de la primera semana posterior al IAM (Attar et al., 2021), lo que hace especialmente interesante a este tipo de células como herramienta terapéutica frente al IAM (**Figura 9**). Sin embargo, en ninguna publicación, base de datos o registro de ensayos clínicos, figuran datos sobre el posible efecto de las células mesenquimales humanas de membrana amniótica sobre la capacidad terapéutica frente a enfermedades cardiovasculares y menos aún frente al IAM, lo que hace especialmente interesante profundizar en este campo, como así es el **objetivo principal de la presente Tesis Doctoral**.

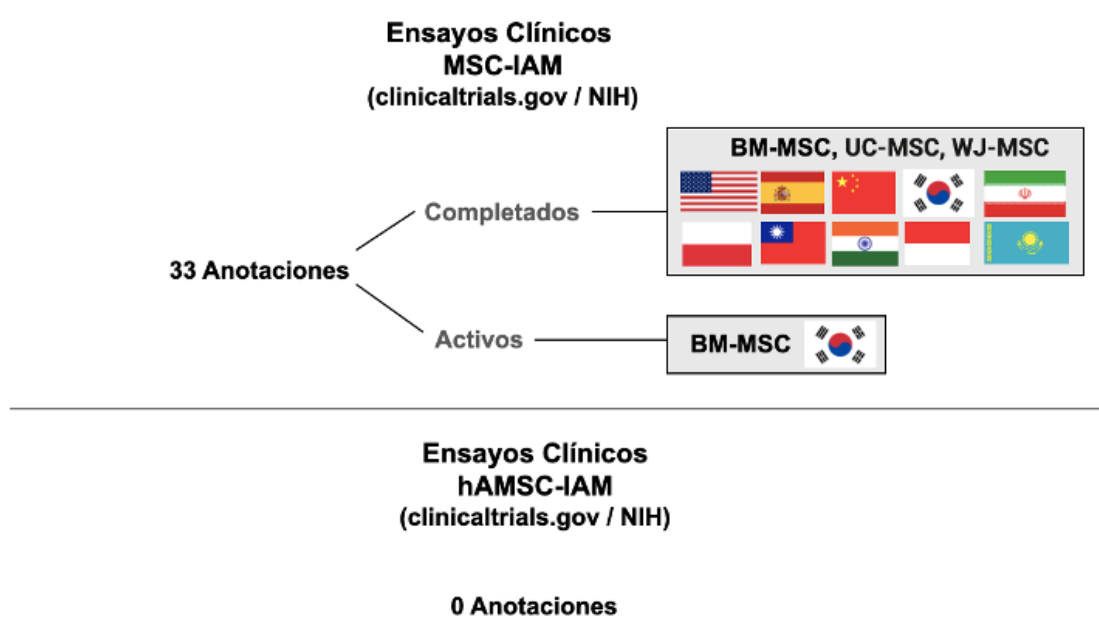


Figura 9. Ensayos clínicos registrados en ClinicalTrials.gov sobre el tratamiento del IAM con MSC, indicando la fuente tisular de las MSC y los

países donde se han realizado, en comparación con ensayos que emplean hAMSC. Elaboración propia.

2.3 MSC Derivadas de Placenta

La placenta humana es un órgano que desempeña un papel crítico durante el embarazo, facilitando el intercambio de nutrientes, oxígeno, hormonas y factores de crecimiento entre la madre y el feto (Mayo Clinic, 2024). Estructuralmente, la placenta está compuesta por la placa coriónica, las vellosidades coriónicas, la decidua basal y la membrana amniótica (**Figura 10**), constituyendo cada una de ellas una fuente potencial de MSC.

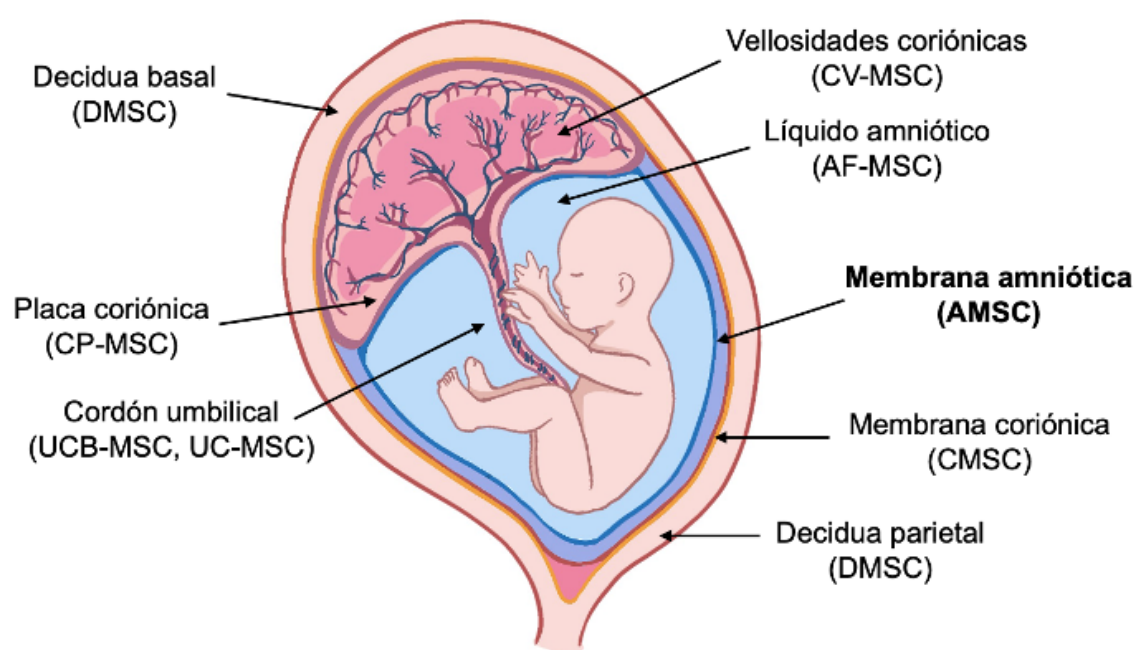


Figura 10. Estructura de la placenta y el conjunto de MSC extraídas de esta. Elaboración propia.

La membrana amniótica se compone de una capa epitelial, una membrana basal y una capa estromal mesenquimal, rodeando al feto. Las células madre mesenquimales derivadas de la membrana amniótica de la placenta (AMSC/hAMSC) han surgido como foco de interés en la medicina reparativa y regenerativa debido a sus propiedades únicas y potencial aplicación terapéutica (de Laorden et al., 2023). Más allá de su plasticidad, las hAMSC se caracterizan por su baja inmunogenicidad y por la secreción de factores bioactivos contenidos en microvesículas y exosomas, lo que las convierte en candidatas prometedoras de terapias celulares (Parolini et al., 2008; Shin et al., 2021; L. Yang et al., 2022).

La placenta ofrece una fuente abundante, de fácil aislamiento, no invasiva y éticamente aceptable de MSC (Choi et al., 2017). En comparación con otras fuentes, como la médula ósea y el tejido adiposo, las hAMSC demuestran una capacidad proliferativa superior y amplias propiedades inmunomoduladoras (Dizaji Asl et al., 2017; Kitale et al., 2019). De hecho, su capacidad para modular las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas, junto con la baja expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), reducen el riesgo de rechazo inmunológico y facilitan su uso en trasplantes alogénicos (J. Li et al., 2020; Parolini et al., 2008). Por otra parte, la versatilidad de las hAMSC resalta por sus aplicaciones en una gran variedad de enfermedades, entre ellas, enfermedades autoinmunes, enfermedades degenerativas y lesiones tisulares (Abbasi-Kangevari et al., 2019), en donde el principal mecanismo de acción terapéutico se apoya fundamentalmente en la señalización paracrina y la secreción de vesículas extracelulares, a través de su secretoma (Ragni et al., 2021).

Todas las propiedades que exhibe este tipo celular ha puesto sobre él el foco como potencial herramienta terapéutica, desde procesos relacionados con la regeneración axonal (de Laorden et al., 2023), pasando por enfermedades respiratorias, Diabetes Tipo 2, Úlcera del Pie Diabético, Pioderma Gangrenoso, Fístula Perianal, Osteoartritis, Artritis, Enfermedad Articular, Osteoartritis de Rodilla, Dolor Crónico de Rodilla, Enfermedad Degenerativa del Disco, Espondilitis Anquilosante, Anemia Aplásica, Síndromes Mielodisplásicos e insuficiencia ovárica (U.S. National Library of Medicine, 2025). A pesar de la diversidad y variabilidad que caracteriza a estas patologías, muchas comparten procesos fisiopatológicos comunes, entre los que se incluyen la inflamación crónica, la degeneración tisular, la fibrosis y la desregulación del sistema inmunológico, y en este contexto, las propiedades inmunomoduladoras, regenerativas, efectos paracrinicos y capacidades antifibróticas de las hAMSC se perfilan como estrategias terapéuticas prometedoras para abordar este amplio espectro de enfermedades, aunque su efecto sobre el IAM hasta el momento de la presente Tesis Doctoral sea desconocido.

2.4 hAMSC miRNAs y EVs en el contexto del IAM

Las hAMSC, han ganado mucha relevancia en los últimos años debido a su potencial terapéutico en medicina regenerativa y reparativa. Uno de los mecanismos principales por los que las hAMSC ejercen estos efectos se debe a su capacidad de secreción de

Introducción

miRNAs encapsulados en EVs, especialmente en exosomas (Costa et al., 2022; Valadi et al., 2007; L. Yang et al., 2022). De entre todos ellos, es especialmente relevante para el desarrollo de nuestro trabajo el **miR-150**, en el que otros han evaluado su contribución tras un evento isquémico (Deng et al., 2016; Kawaguchi et al., 2023; Ou et al., 2020).

El creciente conocimiento sobre los mecanismos paracrinós responsables de los efectos cardioprotectores de las MSC ha impulsado el desarrollo de estrategias terapéuticas libres de células, centradas en la administración de vesículas extracelulares derivadas de distintos tipos celulares, incluidas las MSC (Bhat et al., 2024; Mirotsoú et al., 2011). Este enfoque se basa en la evidencia de que una proporción sustancial de los beneficios observados tras la terapia celular está mediada por señales moleculares transferidas al tejido lesionado.

En el contexto del infarto agudo de miocardio, la administración de EVs derivadas de MSC ha demostrado reproducir de forma significativa los efectos beneficiosos asociados a la administración celular, incluyendo la mejora de la función ventricular y la atenuación del remodelado fibrótico postisquémico (Lai et al., 2010; Monguió-Tortajada et al., 2022; S.-J. Sun et al., 2021), y que se explican, en gran medida, por la transferencia funcional de microRNAs con potencial cardioprotector hacia las células del miocardio dañado, en donde presentan la capacidad de modular rutas moleculares implicadas en la respuesta inflamatoria y el remodelado cardíaco (Akbar et al., 2024).

Desde el punto de vista terapéutico, las estrategias basadas en vesículas extracelulares presentan ventajas relevantes frente a la administración de células completas, al reducir riesgos asociados a la supervivencia, el anidamiento celular o posibles efectos adversos de tipo inmunológico (Ala, 2023). Asimismo, su naturaleza acelular permite una mayor estandarización, control de dosis y reproducibilidad, aspectos clave para su futura aplicación clínica. En conjunto, la utilización de EVs derivadas de células madre mesenquimales representa una aproximación innovadora y prometedora para el tratamiento del infarto agudo de miocardio, al constituir una alternativa libre de células capaz de vehiculizar de forma eficaz señales cardioprotectoras hacia el tejido cardíaco lesionado. Sin embargo, hasta el momento se carece de datos concluyentes a este respecto mediante el uso de las hAMSC.

Por consiguiente, en la presente Tesis Doctoral se investiga la capacidad de las hAMSC para liberar exosomas en forma de vesículas extracelulares (EVs) enriquecidas en microRNAs implicados en el remodelado cardíaco fisiológico tras un infarto agudo de

Introducción

miocardio (IAM). Asimismo, se pretende evaluar si las mejoras observadas en el tejido cardíaco post-infarto derivadas de este mecanismo representan una aproximación terapéutica novedosa para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Este enfoque permitiría, además, profundizar en los mecanismos de acción de las hAMSC, estableciendo su potencial como estrategia de terapia celular con posible aplicación clínica y relevancia traslacional.

BLOQUE III: ARNs NO CODIFICANTES Y SU IMPLICACIÓN EN EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

3.1 ¿Qué son los lncRNAs?

El avance de las técnicas de secuenciación de ARN ha demostrado que en el genoma de mamíferos se transcribe una gran cantidad de ARNs no codificantes, tanto largos como cortos, lo que ha permitido el replanteamiento de nuestro entendimiento del funcionamiento genético.

Los lncRNAs (del inglés *long non-coding RNAs* o ARN largos no codificantes) son un tipo de ARN que, a diferencia de los mRNAs, no codifican para proteínas. Al igual que los mRNAs, los lncRNAs son transcritos por la ARN polimerasa II, en su mayoría con un casquete 5', poliadenilados y empalmados, y generalmente contienen un menor número de exones que los mRNAs, una longitud mayor de 200 nucleótidos (Lin et al., 2024) y un menor nivel de expresión (Derrien et al., 2012).

Si un transcripto de ARN contiene un marco de lectura abierto no conservado menor de 100 nucleótidos, no tiene homología con secuencias de péptidos conocidos y no coincide con péptidos identificados en espectrometría de masas, se considera por consiguiente un ARN no codificante (Harrow et al., 2012). En mayor medida, si un ARN es o no codificante suele ser determinado mediante algoritmos que calculan la probabilidad de su codificación (G. Wang et al., 2019).

Respecto a la epigenética de los lncRNAs, generalmente, su sitio de inicio de transcripción está marcado por la modificación de histonas H3K4me3, y la región transcrita por H3K36me3, independientemente de si su origen se encuentra en el promotor o el “enhancer”, de forma similar a los mRNAs. No obstante, estas marcas son menos frecuentes en lncRNA en comparación con H3K4me1, que suele estar más presente en los enhancers de estos últimos (Guttman et al., 2009).

Los lncRNA suelen clasificarse según su posición en el genoma en relación con los genes codificantes de proteínas. Estos pueden ser intergénicos (lincRNAs), transcritos divergentes desde el mismo promotor del gen codificante de proteínas (pncRNAs), desde un promotor (plncRNAs), desde un enhancer (elncRNAs). Como también pueden ser intragénicos, o superponerse con otros transcriptos en orientación sentido o antisentido, y aquellos originados desde intrones de mRNAs u otros lncRNA mediante

“backsplicing”, también pueden generar lncRNAs circulares (circRNAs) (Schmitz et al., 2016). Los circRNA pueden ser clasificados según su función, ya que pueden dirigir complejos modificadores de cromatina a loci genómicos específicos, proporcionar andamios moleculares, modular programas de transcripción y regular la expresión génica (Moran et al., 2012).

Por todo lo anteriormente citado, estas moléculas de ARN se calificarían como: lncRNAs señuelo (*decoy lncRNAs*), que regulan la transcripción al unirse y secuestrar una proteína; lncRNAs señal (*signal lncRNAs*), que regulan la actividad transcripcional o las vías en respuesta a señales o estímulos específicos (Harrow et al., 2012); lncRNAs andamio (*scaffold lncRNAs*), que actúan como plataformas para permitir la formación de complejos moleculares; y lncRNAs guía (*guide lncRNAs*), que se unen a proteínas y las dirigen a loci genómicos específicos (Guttman et al., 2009). En cuanto a su funcionalidad, estudios recientes han revelado una vasta diversidad de funciones celulares y su implicación en distintos niveles de control génico, como los mecanismos epigenéticos, la organización nuclear y el procesamiento del ARN (Schmitz et al., 2016).

En 2006, el consorcio FANTOM (del inglés *Functional Annotation of the Mammalian Genome*), dedicado a la caracterización funcional del genoma de mamíferos, fue pionero en la identificación de lncRNA en ratones (Maeda et al., 2006). No fue hasta años más recientes que catálogos exhaustivos de lncRNA fueron realizados (Cabili et al., 2011; H. Jia et al., 2010), permitiendo estudios de las potenciales funciones de estos transcriptos. En 2012, el consorcio GENCODE (del inglés *Genome Reference Consortium ENCyclopedia Of DNA Elements*), enfocado en la caracterización detallada del genoma humano, publicó una anotación exhaustiva y curada de un conjunto bien definido de lncRNAs, demostrando que estos ARN poseen estructuras génicas comunes, así como modificaciones en las histonas, similares a las de los genes codificantes de proteínas, pero con niveles de expresión más bajos en comparación con mRNAs (Derrien et al., 2012).

3.1.1 lncRNAs y enfermedad

En comparación con los mRNAs, los lncRNAs desempeñan funciones principales en la regulación de la expresión génica, el control epigenético, la organización nuclear y el splicing alternativo, interactuando con ADN, ARN y proteínas (DiStefano, 2018), y mostrando además patrones de expresión específicos de tejidos (Ward et al., 2015). Por lo tanto, dado que los lncRNAs desempeñan funciones regulatorias clave en diversos

Introducción

procesos celulares, su desregulación se ha asociado con el desarrollo de múltiples alteraciones fisiopatológicas (Statello et al., 2021).

Actualmente, la base de datos LncRNADisease v3.0 (Lin et al., 2024), correlaciona de forma general o causal el desarrollo y progresión de patologías: 6066 lncRNA, y 10732 circRNAs, con 484 y 262 enfermedades respectivamente (Lin et al., 2024). Entre estas patologías, destacan distintos tipos de enfermedades oncológicas, enfermedades hereditarias, trastornos neuropsiquiátricos, enfermedades metabólicas, o enfermedades cardiovasculares, entre otras (Mattick et al., 2023).

3.1.2 lncRNAs en enfermedades cardiovasculares

La aparición de los lncRNAs ha sido crucial para la comprensión de las enfermedades cardiovasculares, particularmente del infarto agudo de miocardio (IAM), debido a su capacidad de regular la expresión génica y los mecanismos celulares implicados en la respuesta al daño cardíaco. Los lncRNAs actúan como reguladores epigenéticos y transcripcionales en diversos tipos celulares, incluyendo cardiomiocitos y células musculares lisas vasculares, afectando procesos clave como la apoptosis, la inflamación y la remodelación del tejido cardíaco (DiStefano, 2018).

Gran número de investigaciones han demostrado como distintos lncRNA se relacionan con diversas patologías cardiovasculares, incluyendo la aterosclerosis (ANRIL, MIAT, CARMN, RP11-728F11.4, HOTAIR, TPRG1-AS1), la insuficiencia cardíaca (Caren, OIP5-AS1, CARMN, H19), el infarto agudo de miocardio y el daño por isquemia/reperfusión (Cphar, CIRKIL, lncExACT1, MIAT), Miocardiopatía dilatada (ZNF593-AS), hipertrofia cardíaca (Cphar, lncExACT1, H19), arritmias cardíacas (Trdn-as) y enfermedades vasculares (SENCR, SMILR, CARMN, H19, Veal2) (Kohlmaier et al., 2023).

Actualmente, la base de datos LncRNADiseases v3.0 reconoce un total de 75 lncRNAs y circRNAs asociados con infarto agudo de miocardio (**Figura 11**).

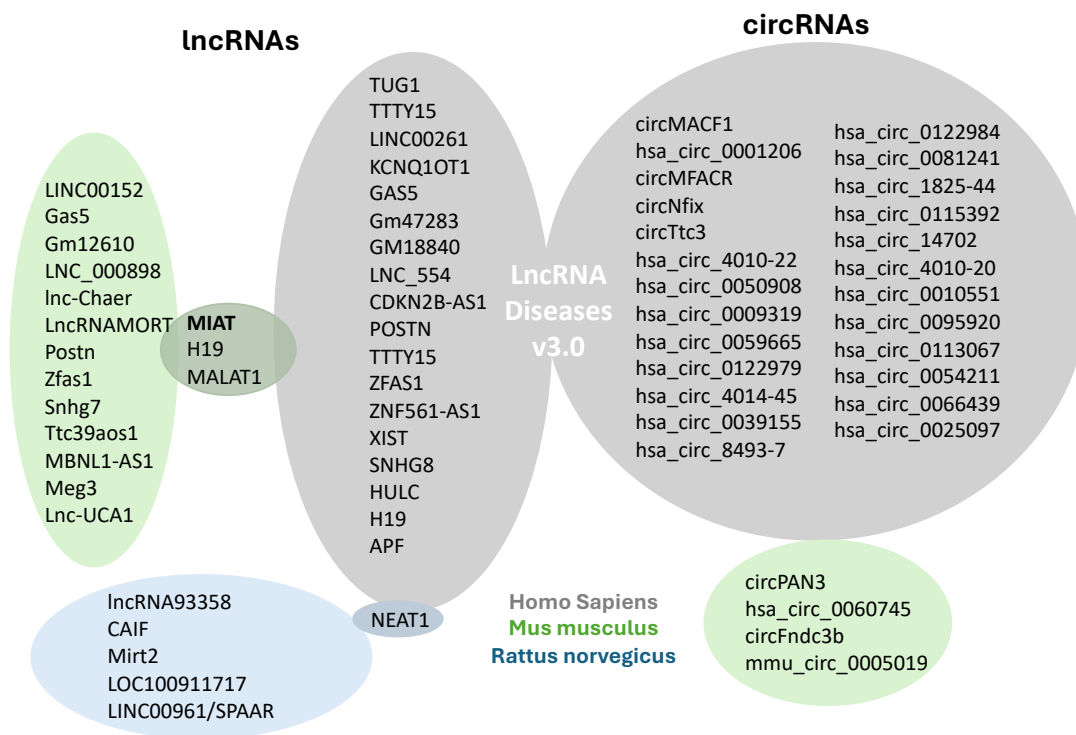


Figura 11. Esquema ilustrativo de lncRNAs y circRNAs relacionados con Infarto Agudo de Miocardio en distintas especies. Elaboración propia.

3.1.2.1. MIAT como diana para el tratamiento del IAM

En el año 2006, en la revista *Nature*, se habla por primera vez de una molécula de ARN no codificante que representa un factor de riesgo significativo para el infarto de miocardio, y se le bautiza como MIAT (del inglés *MI-associated transcript*). A través de un estudio a gran escala basado en haplotipos y análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), los autores identificaron un locus en el cromosoma 22q12.1 estrechamente vinculado al MI. Se identificaron seis SNPs en este locus que muestran una asociación significativa con el MI, lo que sugiere que alteraciones en este locus pueden influir en la expresión de MIAT, afectando su nivel transcripcional, y que, al no codificar ninguna proteína, su implicación en el desarrollo del IAM reside en su actividad como ARN no codificante (Ishii et al., 2006). Este es el primer estudio en identificar un ARN no codificante que contribuye directamente a la susceptibilidad al infarto de miocardio, destacando su potencial como marcador de riesgo genético y abriendo nuevas vías de investigación sobre el papel de los lncRNAs en enfermedades cardiovasculares (Ishii et al., 2006). En la actualidad, el lncRNA MIAT ha emergido como

Introducción

un importante regulador en el contexto de otras enfermedades cardiovasculares (**Tabla 1**).

Tabla 1. Papel del MIAT en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

ECV	Acción de MIAT
Infarto de Miocardio	MIAT se asocia con la apoptosis de cardiomiocitos y la fibrosis cardíaca post-infarto, promoviendo el deterioro del tejido cardíaco y exacerbando el tamaño del infarto
Cardiomiopatía diabética	MIAT está implicado en la disfunción diastólica y el remodelado cardíaco en pacientes con diabetes tipo 2. Su sobreexpresión induce apoptosis de cardiomiocitos mediante la inhibición de miR-22-3p
Hipertrofia cardíaca	En modelos de hipertrofia inducida por AngII, MIAT regula negativamente la expresión de miR-150, lo que agrava la hipertrofia al promover el aumento de biomarcadores hipertróficos
Fibrilación auricular	MIAT promueve la remodelación estructural auricular, facilitando la fibrosis auricular mediante la regulación de miR-133a-3p, lo que contribuye al desarrollo y mantenimiento de la fibrilación auricular
Miocardopatía dilatada	MIAT se sobreexpresa en corazones con miocardopatía dilatada, específicamente en el contexto de la enfermedad de Chagas, asociándose con disfunción endotelial y daño miocárdico
Ateroesclerosis	Promueve la proliferación de células musculares lisas vasculares y contribuye al crecimiento y la inestabilidad de las placas ateroscleróticas.

(Kohlmaier et al., 2023)

En relación con su forma de actuar, MIAT participa activamente a través de los siguientes mecanismos:

- **Competencia Endógena de ARN (ceRNA)**

MIAT actúa como un ARN endógeno competitivo (ceRNA), secuestrando varios microRNAs (miRNAs) mediante interacciones con sitios de unión complementarios. Este secuestro impide que los miRNAs regulen sus ARN mensajeros diana, permitiendo la sobreexpresión de genes clave implicados en

procesos patológicos (C. Yang et al., 2022). Entre los principales miRNAs con los que MIAT interactúa se encuentran:

- miR-150: MIAT inhibe la actividad de miR-150, un regulador negativo de la hipertrofia cardíaca, lo que resulta en la activación de genes que promueven el crecimiento excesivo del corazón en modelos de hipertrofia cardíaca (Aonuma et al., 2022).

- miR-24: MIAT actúa como una “esponja molecular” de miR-24, que regula factores pro-fibróticos como Furin y TGF- β 1. Al inhibir miR-24, MIAT facilita la fibrosis cardíaca, promoviendo la acumulación de colágeno en el miocardio post-infarto (Qu et al., 2017).

- miR-330-5p: En el contexto de la cardiomiopatía séptica, MIAT interactúa con miR-330-5p, lo que activa el eje de señalización TRAF6/NF- κ B, lo que exacerba la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo (Xing et al., 2020).

- **Interacciones ARN/Proteína**

MIAT se asocia directamente con proteínas, regulando su función de manera dependiente del contexto patológico (C. Yang et al., 2022). Entre las distintas proteínas reguladas por MIAT, podemos destacar:

- TSPO (Proteína Translocadora): MIAT interactúa directamente sobre TSPO, una proteína clave en la regulación de la función mitocondrial. Esta interacción induce la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial transitorio (mPTP), lo que conduce a la disminución del potencial de membrana mitocondrial y, en última instancia, a la apoptosis de los cardiomiocitos (Bai et al., 2021). Este mecanismo es crítico en el contexto de daño isquémico durante el infarto de miocardio.

- P300: MIAT regula negativamente a miR-150, lo que eleva la expresión de P300, una acetiltransferasa y coactivadora transcripcional que promueve el crecimiento celular y la hipertrofia cardíaca (Z. Li et al., 2018).

- **Regulación de la Apoptosis**

MIAT ha sido identificado como un promotor pro-apoptótico en varias enfermedades cardiovasculares (Hayasaka et al., 2025), en donde en modelos de isquemia/reperfusión y daño hipóxico, MIAT incrementa la actividad proinflamatoria de NF- κ B, incrementando la expresión de las proteínas pro-Bax y PUMA (L. Chen et al., 2019), mientras que inhibe la actividad de la proteína anti-apoptótica de Bcl-2, agravando así el daño post-infarto (L. Chen et al., 2019).

- Regulación de la Fibrosis Cardíaca

MIAT desempeña un papel clave en la fibrosis cardíaca, mediante la inhibición de dos miRNAs: miR-150 y miR-24, lo que da lugar a la desinhibición de HOXA-4 y Furin, respectivamente, factores pro-fibróticos esenciales que favorecen la producción excesiva de colágeno y el crecimiento descontrolado de fibroblastos cardíacos, agravando de esta manera la remodelación patológica del tejido cardíaco post IAM (Aonuma et al., 2022; Qu et al., 2017).

3.2. ¿Qué son los miRNAs?

Los microRNAs (miRNAs) son una clase abundante de ARNs no codificantes, de entre 19 y 25 nucleótidos de longitud (Bhaskaran & Mohan, 2014), que desempeñan un papel fundamental en la regulación post-transcripcional de la expresión génica (Komatsu et al., 2023). Descubiertos por vez primera en el nematodo *Caenorhabditis elegans* en 1993 (denominado lin-4), los miRNAs se han consolidado como elementos clave en una amplia gama de procesos biológicos y patológicos, incluyendo el desarrollo, la diferenciación celular, la apoptosis y la homeostasis celular (R. C. Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993).

Los miRNAs son transcritos por la ARN polimerasa II o III, generando sus precursores primarios con una estructura en forma de horquilla (CAI et al., 2004). La enzima Drosha (junto con su cofactor DGCR8) se encarga de formar los precursores de miRNAs (pre-miRNAs) a partir de los precursores primarios. Estos pre-miRNAs poseen una estructura de unos 70 nucleótidos (Y. Lee et al., 2003), que posteriormente son exportados al citoplasma por la Exportina-5 (Yi et al., 2003) para su completa maduración tras la acción de la enzima Dicer, dando lugar a miRNAs maduros de doble cadena, obteniendo una hebra funcional que se incorpora al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (Bernstein et al., 2001), uniéndose a la secuencia complementaria dentro de la región 3'-UTR de los mRNA promoviendo su degradación, mediante nucleasas asociadas a RISC (Filipowicz et al., 2008) o inhibiendo su traducción (Valencia-Sanchez et al., 2006), dependiendo del grado de complementariedad (Figura 12) (Bartel, 2004). Por consiguiente, la acción primordial de los miRNAs es la regulación negativa de la expresión génica (Bartel, 2004, Olena & Patton, 2010).

Introducción

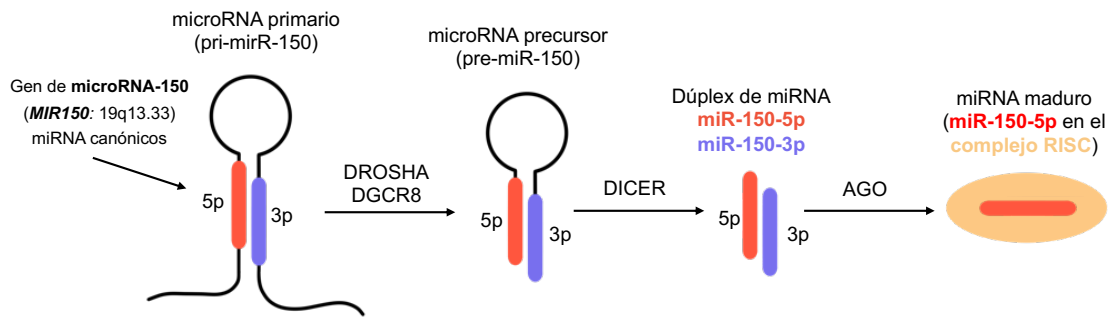


Figura 12. biogénesis y maduración del microRNA-150-5p. Esquema representativo del procesamiento del miR-150 desde el transcrito primario (*pri-miR-150*) hasta la formación del miRNA maduro miR-150-5p incorporado al complejo RISC, mediante la acción secuencial de DROSHA/DGCR8, DICER y proteínas AGO. Elaboración propia.

Los miRNAs se pueden clasificar según su ubicación genómica (intragenéticos, 50–60%, o intergénicos, 40–50%) (Chien et al., 2011; França et al., 2016; Godnic et al., 2013), su organización transcripcional (monocistrónicos o policistrónicos) (Olena & Patton, 2010) o por su función biológica [oncomiRNAs (progresión de tumorigénesis), supresores tumorales (prevención de tumorigénesis) y reguladores de procesos fisiológicos] (Smolarz et al., 2022). Actualmente, la base de datos de registro de miRNA (miRBase) (Griffiths-Jones, n.d.), cuenta con un total de 1.917 y 1.234 miRNAs, en humano y ratón, respectivamente.

3.2.1. miRNAs y enfermedad

En las últimas décadas, los desequilibrios en la expresión de determinados miRNAs, ya sea por su sobreexpresión o por su deficiencia, se han relacionado con infecciones víricas, enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, trastornos metabólicos y diversos tipos de cáncer (Rupaimoole & Slack, 2017), y por supuesto, patologías cardiovasculares. Por estos motivos, los miRNAs han despertado un gran interés como posibles biomarcadores y dianas terapéuticas. Su estabilidad en fluidos biológicos y su especificidad para determinados estados patológicos los hacen ideales como herramientas diagnósticas. Además, las estrategias terapéuticas basadas en miRNAs, como los antimicroRNAs (inhibidores de miRNAs) y los miRNAs sintéticos (miméticos, o *mimics* del inglés), ofrecen un enfoque novedoso para corregir alteraciones en redes génicas desreguladas.

3.2.2. miRNAs en enfermedades cardiovasculares

Actualmente, múltiples estudios han demostrado la intervención directa de diversos miRNAs en el desarrollo y progreso de patologías cardiovasculares. Entre ellas se incluyen la **insuficiencia cardíaca** (miR-21, miR-1, miR-208b, miR-499, miR-1306, miR-126, miR-423), el **infarto agudo de miocardio** (miR-1, miR-133, miR-21, miR-29b, miR-150, miR-208a, miR-499), las **arritmias cardíacas** (miR-29, miR-208b, miR-23a, miR-26a, miR-328), la **hipertensión pulmonar** (miR-22, miR-99a, miR-204, miR-210, miR-126, miR-145, miR-206, miR-328, miR-21), la **fibrilación auricular** (miR-1, miR-26, miR-30d, miR-499, miR-192, miR-21, miR-29, miR-208, miR-328, miR-106b-25, miR-206, miR-23b, miR-27b, miR-30a/c, miR-133, miR-122, miR-520d), el **fallo cardíaco y la fibrosis** (miR-18a, miR-19a, miR-21, miR-22, miR-25, miR-26a, miR-29, miR-29a, miR-30, miR-33a/b, miR-103, miR-107, miR-125^a, miR-126, miR-133, miR-138, miR-140, miR-146a, miR-155, miR-181a/c, miR-199a, miR-210, miR-212, miR-223, miR-351, miR-370, miR-378, miR-4429a) y la cardiopatía coronaria (miR-126, miR-21, miR-155) (Lozano-Velasco et al., 2024; Zaragoza et al., 2019; S. Zhou et al., 2018).

Además de esto, la base de datos miRNet v2.0 (anteriormente mencionada), de especial interés para el estudio de redes de interacción de miRNAs, funciona bajo la integración de miRTarBase, TargetScan, y HMDD, y permite observar un análisis funcional de los miRNAs en contextos fisiológicos/patológicos. Actualmente, miRNet v2.0 cuenta con 46 anotaciones de miRNAs asociados con el proceso de infarto agudo de miocardio en humanos (Figura 13).

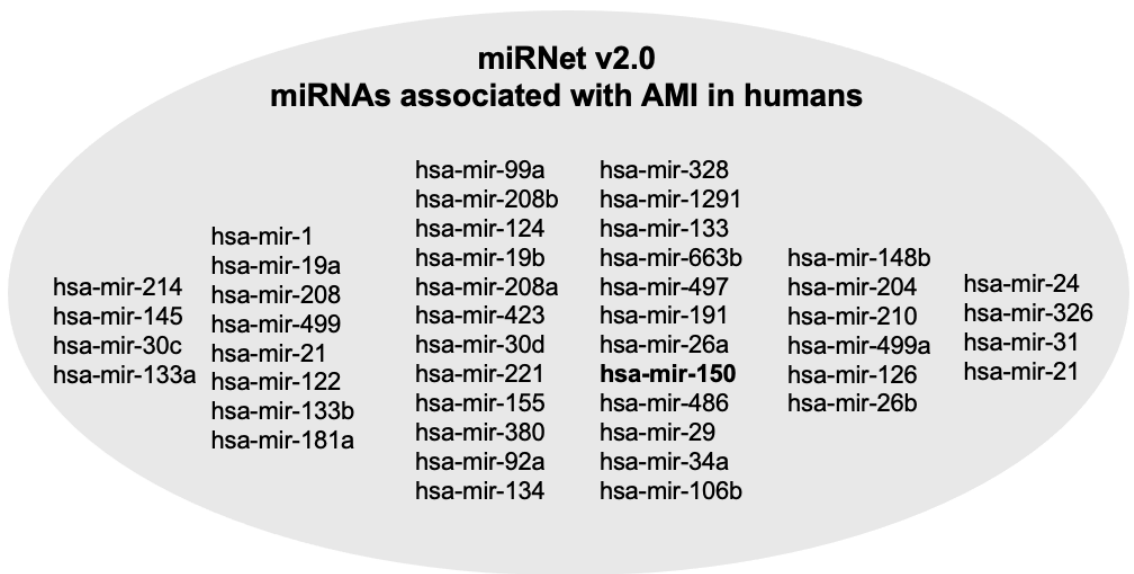


Figura 13. miRNAs asociados a Infarto Agudo de Miocardio en humanos. Datos adaptados de miRNet v2.0, en enero de 2025. Elaboración propia.

Introducción

De las interacciones observadas en la base de datos miRNet, se observa que dos miRNAs relacionados con IAM, también muestran interacción con MIAT, concretamente miR-150-5p y miR-181a-5p (Figura 14).

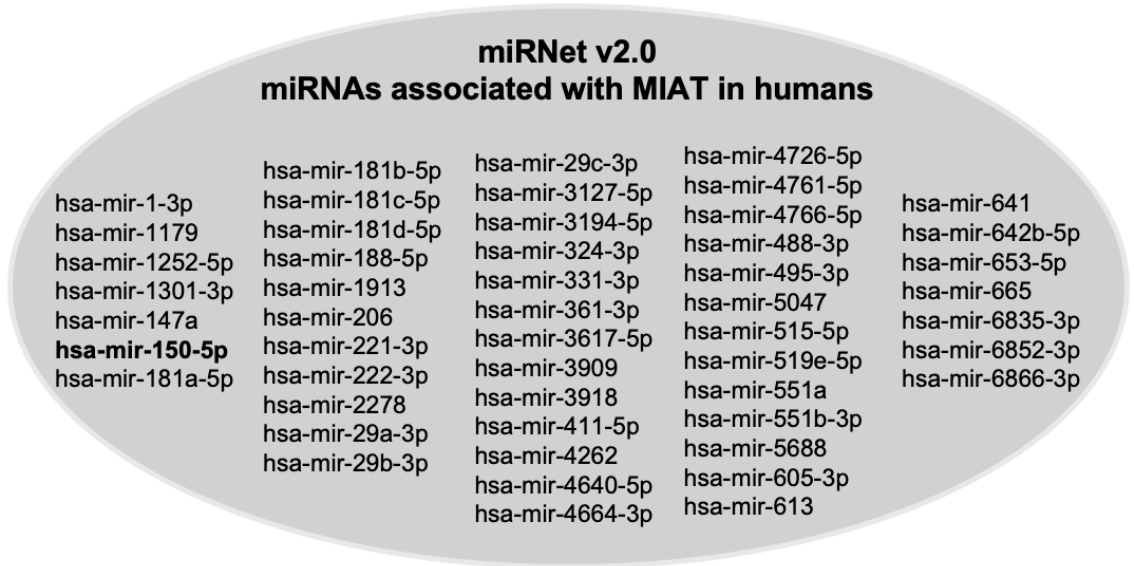


Figura 14. miRNAs asociados a MIAT en humanos. Datos adaptados de miRNet v2.0, en enero de 2025. Elaboración propia.

La búsqueda bibliográfica de estos dos miRNAs y el LncRNA MIAT, pone de manifiesto en múltiples estudios la relación causal entre el aumento de MIAT y la disminución de miR-150-5p, con una peor progresión en procesos de IAM, y peor remodelado cardíaco (Aonuma et al., 2021, 2022; Z. Li et al., 2018). Por consiguiente, la profundización en esta interacción resulta de interés para la determinación de un mecanismo molecular por el cual las hAMSC podrían estar realizando un efecto cardioprotector, objetivo fundamental de la presente Tesis Doctoral.

3.2.3. *miR-150-5p como diana para el tratamiento del IAM*

miR-150 es un microRNA que desempeña un papel fundamental en la regulación de procesos celulares en diversos contextos biológicos, fisiológicos y patológicos. Sus acciones moleculares se llevan a cabo mediante su capacidad para unirse a secuencias complementarias en las regiones 3' no traducidas (3'-UTR) de los ARN mensajeros, lo que provoca la represión de la traducción o la degradación del mRNA. Su biogénesis es similar a la del resto de miRNAs (Griffiths-Jones, n.d.) (véase el apartado 3.2.1), y su acción es condicionada por el reconocimiento de secuencias diana a través de su complementariedad con regiones semilla (*seed*) de 2-8 nucleótidos y las secuencias 3'-UTR del mRNAs, permitiendo su actividad de forma simultánea sobre distintos genes,

Introducción

junto con RISC. Este, al igual que otros miRNAs, puede generar la degradación de mRNAs, la represión traduccional, y desadenilación e inestabilización del mRNA (Y.-Z. Hu et al., 2023; Shang et al., 2023; Wilczynska & Bushell, 2015).

En este trabajo resulta fundamental destacar que miR-150 no actúa de forma aislada sobre genes concretos, sino que participa en redes regulatorias más complejas. Entre ellas, se incluyen dianas como factores de transcripción que, a su vez, pueden influir en la propia expresión de miR-150, estableciendo un equilibrio dinámico en la regulación génica. Asimismo, su actividad se ve modulada por la interacción con lncRNAs y circRNAs que funcionan como “esponjas moleculares”, reteniéndolo y limitando su disponibilidad para unirse a sus mRNAs diana. En su conjunto, podemos afirmar que miR-150-5p ejerce un efecto primordial en la salud cardiovascular a dos niveles: sobre el sistema inmune y sobre el freno que ejerce en la activación de determinantes patológicos, como veremos a continuación.

miR-150 se expresa de forma destacada en diversas células del sistema inmune y participa en la regulación de procesos clave para su diferenciación y función. En el caso de los linfocitos B, ejerce su acción principalmente sobre el factor de transcripción Myb, esencial para la transición de células precursoras a linfocitos B maduros (Fernando et al., 2012), mientras que en los linfocitos T, modula la vía de señalización mediada por Notch3, un regulador crítico en su diferenciación y en la producción de citocinas (Ghisi et al., 2011). Además, influye en la polarización de macrófagos, favoreciendo la polarización de un fenotipo inflamatorio (M1) a uno antiinflamatorio y reparador (M2), contribuyendo así a la resolución de la respuesta inflamatoria (Shakerian et al., 2018).

Como hemos mencionado, miR-150 ha surgido, en los últimos años, como un regulador clave de la respuesta celular tras un infarto agudo de miocardio, desempeñando un papel positivo en el mantenimiento de la arquitectura, la función y el remodelado cardíaco (Makkos et al., 2021). En condiciones de isquemia cardíaca, ejerce un efecto cardioprotector al promover la supervivencia de los cardiomiocitos, reducir su apoptosis y modular la función endotelial (Y. Tang et al., 2015). Asimismo, presenta actividad antifibrótica al inhibir la proliferación de fibroblastos cardíacos y, en consecuencia, la producción de matriz extracelular post-infarto, lo que contribuye a mitigar la remodelación adversa del miocardio (Aonuma et al., 2022). No obstante, estos efectos favorables en el tejido cardíaco se encuentran mermados debido a su disminución de expresión tras un evento isquémico, por lo cual, aumentar los niveles de miR-150 tras

un IAM puede tener efectos prometedores en la reparación y protección del tejido cardíaco.

3.3 Eje MIAT/miR-150/HOXA-4

Como se ha comentado con anterioridad (véase el apartado 3.1.2.1), MIAT puede actuar como un ARN “esponja”, secuestrando e inhibiendo la función de miRNAs a través de un mecanismo de competencia endógena (ceRNA).

Los ARN “esponja” compiten con los mRNA diana de los miRNAs, impidiendo que los miRNAs puedan unirse a sus objetivos, dando por consiguiente la expresión de mRNA. Esto es un mecanismo de regulación post-transcripcional que afecta la expresión génica, y tiene un impacto significativo en diversas rutas celulares y procesos biológicos, como el desarrollo, la respuesta al estrés y, en el contexto de MIAT, la remodelación cardíaca post-infarto (Devaux et al., 2015; Salmena et al., 2011; R.-S. Zhou et al., 2019).

En el 2022, Aonuma y colaboradores reiteran la correlación existente entre el aumento de MIAT y una mayor susceptibilidad a la insuficiencia cardíaca. Además, como ya se ha comentado, miR-150 es conocido por su papel cardioprotector, particularmente en la prevención de la fibrosis y la apoptosis cardíaca, procesos que son críticos en la remodelación maladaptativa del miocardio tras un IAM (Aonuma et al., 2021, 2022; Kawaguchi et al., 2023, 2024), revelando los bajos niveles de expresión del microRNA en los corazones que sufren un proceso de insuficiencia cardíaca, en parte debido a su secuestro por MIAT. Estos investigadores demostraron además que, en este sistema, un factor de transcripción involucrado en el desarrollo embrionario, y que, además, está implicado en el desarrollo de fibrosis, denominado Homeobox A4 (HOXA-4), participa activamente en este eje.

HOXA-4 es un miembro de la familia de genes HOX, cuyo papel es fundamental en el desarrollo embrionario, la diferenciación celular y la organización de patrones tisulares (L. Wang et al., 2024) y aparece como una diana directa entre la interacción de MIAT con miR-150, en donde los autores del trabajo fueron capaces de hallar cómo la sobreexpresión de MIAT conduce a un aumento significativo en los niveles de HOXA-4, mientras que la sobreexpresión de miR-150 reprime directamente a HOXA-4, previniendo su efecto pro-fibrótico (Figura 15). Además de esto, extrapolaron este sistema a muestras de pacientes con insuficiencia cardíaca, observando que los niveles

Introducción

de HOXA-4 están significativamente elevados, lo que respalda la relevancia clínica de este hallazgo.

Todos estos resultados en conjunto sugieren que la manipulación de estos ARN no codificantes, y la inhibición de HOXA-4 a través de la restauración de los niveles de miR-150, podría ofrecer nuevas vías terapéuticas para la reducción de la fibrosis y la insuficiencia cardíaca, de origen isquémico, como es relevante en el desarrollo de este Tesis Doctoral.

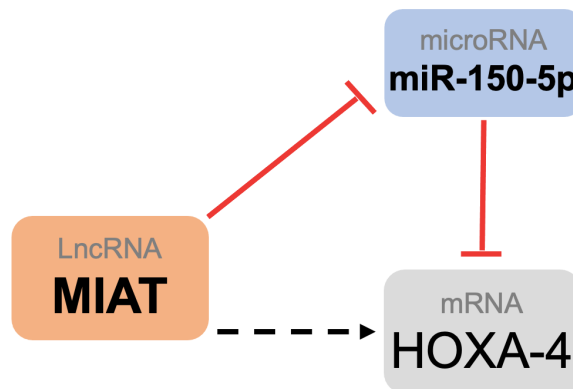


Figura 15. Representación gráfica del eje de acción MIAT/miR-150/HOXA-4.
Elaboración propia.

BLOQUE IV: NANOTECNOLOGÍA COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA PARA TRATAR EL IAM

4.1 ¿Qué es la Nanotecnología?

La nanotecnología se refiere al estudio y manipulación de estructuras y moléculas en escala nanométrica (1 a 100 nm) (Suri et al., 2007). Representa un campo en rápida evolución con aplicaciones prometedoras en diversas áreas, incluida la biomedicina (Whitesides, 2003). En este contexto, se ha destacado su potencial para mejorar tanto los procedimientos diagnósticos como el tratamiento de enfermedades, gracias a sus propiedades únicas que aumentan la precisión y la eficacia terapéutica (Ramos et al., 2017). A pesar de estos avances, su aplicación en patologías cardiovasculares aún se encuentra en etapas tempranas, aunque su capacidad para ofrecer alternativas menos invasivas que los enfoques quirúrgicos tradicionales resulta especialmente atractiva (Elsaygh et al., 2024; Farokhzad & Langer, 2009).

4.2 Potencial de las Nanopartículas en Biomedicina

Los tratamientos farmacológicos convencionales suelen presentar limitaciones significativas relacionadas con su biodistribución inespecífica, lo que puede provocar efectos secundarios en tejidos no diana (Mitchell et al., 2021). Además, los principios activos pueden ser susceptibles a la degradación antes de alcanzar su objetivo terapéutico, lo que reduce su eficacia (Mitchell et al., 2021). Estos desafíos subrayan la necesidad de estrategias innovadoras que garanticen una administración más dirigida y eficiente de los medicamentos.

Las nanopartículas (NPs) han emergido como una solución efectiva a las limitaciones mencionadas. Su pequeño tamaño y alta biocompatibilidad permiten una distribución precisa en tejidos específicos, mejorando la eficacia terapéutica al tiempo que reducen la dosis necesaria y los efectos secundarios asociados (Parveen et al., 2012). Además, las NPs protegen los fármacos encapsulados contra la degradación enzimática y otras formas de inestabilidad, aumentando su vida útil y potencia (Shi et al., 2017).

4.3 Aplicaciones en Patologías Cardiovasculares

En el campo de las enfermedades cardiovasculares, las NPs presentan ventajas únicas. Su capacidad para circular libremente por el árbol vascular supera las limitaciones de

otras terapias, como los anticuerpos, que pueden ser menos estables y propensos al rechazo inmunológico (Parveen et al., 2012). Las formulaciones basadas en NPs también han demostrado baja toxicidad y alta compatibilidad, lo que las convierte en una opción prometedora para tratamientos modernos y personalizados (A. Z. Wang et al., 2012).

Actualmente, se han comercializado alrededor de 90 nanomedicinas aprobadas por agencias regulatorias, lo que refleja el reconocimiento creciente de las nanopartículas como herramientas clave en la medicina moderna, tanto en terapias dirigidas como en diagnóstico avanzado (Y. Jia et al., 2023).

4.4 NIL10 como herramienta para tratar el IAM

En el marco de la investigación cardiovascular, el desarrollo de estrategias nanotecnológicas ha permitido avances significativos en la vehiculización de compuestos terapéuticos. En este contexto, el grupo de investigación del Dr. Carlos Zaragoza diseñó NIL10, una nanopartícula basada en una estructura lipídica capaz de integrar múltiples componentes funcionales. Esta plataforma se concibió específicamente para abordar la inflamación prolongada, un factor determinante en el remodelado adverso post-infarto.

La inflamación sostenida en el tiempo es conocida por ser la principal causa del deterioro estructural y funcional del miocardio tras un IAM (ver apartado 2.2). NIL10 se diseñó para activar de manera eficaz la vía de señalización de la interleucina-10 (IL-10) en los monocitos y macrófagos del tejido necrótico, promoviendo así la resolución del proceso inflamatorio en el momento crítico (Tesoro et al., 2022). Además, esta nanopartícula incluye la posibilidad de ser visualizada mediante técnicas de imagen molecular no invasivas como la resonancia magnética (RM), gracias a la conjugación con gadolinio, permitiendo una evaluación precisa del área de infarto y su extensión en el miocardio.

NIL10 incorpora un péptido sintético análogo a IL-10 denominado IT9302, diseñado con homología completa con la porción carboxilo terminal de la IL-10 humana. Este diseño dota a NIL10 de propiedades antiinflamatorias y terapéuticas previamente descritas en diversas patologías inflamatorias. Por consiguiente, NIL10 actúa modulando la respuesta inflamatoria en el miocardio al estimular específicamente la señalización de IL-10, conocida por inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e

IL-6, al tiempo que fomenta la actividad reparadora de los macrófagos M2 (Tesoro et al., 2022).

4.5 NMC-150 como herramienta de doble acción frente al IAM

El desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras para abordar el infarto agudo de miocardio (IAM) ha llevado a la integración de enfoques nanotecnológicos que combinan terapias dirigidas con propiedades moleculares avanzadas. En este contexto, hemos diseñado una nueva nanopartícula basada en NIL10, a la que se ha incorporado un *mimético* de miR-150, creando así una herramienta terapéutica de doble acción denominada **NMC-150** (*Nano MicroRNA Carrier for miR-150*).

La adición de este *mimético* amplifica y complementa los efectos ya conocidos de NIL10, actuando sobre procesos clave como la apoptosis, la fibrosis y la modulación de la respuesta inflamatoria (Aonuma et al., 2022; L. Chen et al., 2019; S. Zhou et al., 2018). El *mimético* de miR-150, encapsulado en la nanopartícula, es liberado de manera controlada en el tejido cardíaco, donde regula negativamente genes proapoptóticos y profibróticos, como *HOXA4*, favoreciendo un remodelado más adecuado tras el IAM.

Por lo tanto, la combinación de NIL10 con un *mimético* de miR-150 representa una aproximación pionera en la medicina cardiovascular. Este diseño multifuncional posiciona a NMC-150 como una herramienta de gran potencial en el tratamiento del IAM, destacando por su capacidad para intervenir simultáneamente en varios aspectos de la patología.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

El infarto agudo de miocardio desencadena una cascada de eventos encaminados a preservar la funcionalidad cardíaca de manera transitoria. Sin embargo, y aun tomando las medidas adecuadas, la extensión del remodelado cardíaco encaminado a tal fin, limita en mayor o menor medida la vida del paciente que lo sufre (Cuadrado et al., 2016; Ramírez-Carracedo et al., 2022; Tarín et al., 2011). En este contexto, las terapias avanzadas basadas en células madre mesenquimales han emergido como una aproximación prometedora para limitar el daño miocárdico, atenuar el remodelado ventricular adverso y de esta manera, preservar la función cardíaca (Boyle et al., 2010; Mabotuwana et al., 2022). No obstante, resulta necesario esclarecer con precisión los mecanismos responsables de sus efectos cardioprotectores para el desarrollo de estrategias con mayor potencial traslacional.

Las células madre mesenquimales (MSC), y en particular las derivadas de membrana amniótica de placenta humana (hAMSC), han demostrado efectos beneficiosos en diversos modelos preclínicos de lesión tisular, donde se ha descrito tanto su posible interacción directa con el tejido diana como su influencia moduladora sobre el microambiente celular (de Laorden et al., 2023, 2025; Dizaji Asl et al., 2017; Ragni et al., 2021; Tsuji et al., 2010). En el ámbito cardiovascular, la evidencia acumulada sugiere que sus efectos cardioprotectores podrían depender predominantemente de mecanismos paracrinos, destacando el papel de las vesículas extracelulares (EVs) como vehículos de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos con el potencial de reprogramar el entorno molecular del miocardio lesionado (Ragni et al., 2021).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, la hipótesis de la presente Tesis Doctoral, plantea que las hAMSC desempeñarían un papel cardioprotector tras la isquemia y posterior perfusión miocárdica, a través de mecanismos relacionados con la activación paracrina de señales relacionadas con la reducción de la fibrosis miocárdica adversa, sin excluir en ningún caso, en virtud de la novedad de su implicación en esta patología, el efecto que puedan desarrollar durante el posible anidado en el tejido lesionado. En base al conocimiento generado previamente con otros tipos celulares, sugerimos que el efecto liberador de vesículas extracelulares con un contenido específico, podría constituir al menos, uno de los mecanismos moleculares de cardioprotección ejercido por este tipo celular frente al infarto.

2. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el potencial cardioprotector de las hAMSC en un modelo murino de lesión por I/R miocárdica y, en caso afirmativo, profundizar en los mecanismos subyacentes implicados a tal efecto. Para ello, pretendemos llevar a cabo los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Evaluar la capacidad de cardioprotección frente al infarto agudo de miocardio, ejercida por la administración de las hAMSC en un modelo murino de I/R miocárdica.

Determinaremos si la administración intravenosa de las hAMSC tras un proceso de I/R miocárdica mejora la función cardíaca, reduce el daño estructural y el remodelado adverso, prestando especial atención a su mayor o menor impacto, en función de la ventana temporal de administración tras el infarto. Para ello, realizaremos un estudio ecocardiográfico de la funcionalidad cardíaca, cuantificando *post mortem* el daño tisular mediante el análisis histológico de los corazones infartados, evaluando tanto el área cardíaca necrosada como el área de riesgo de necrosis mantenida tras la administración de células, incluyendo tanto las hAMSC como células sin capacidad terapéutica previamente descrita.

Objetivo 2. Estudiar la capacidad de las hAMSC para anidar en el tejido miocárdico tras su administración en los animales infartados.

Determinaremos si la cardioprotección inducida por la administración de las hAMSC puede depender de su integración/anidamiento en el tejido miocárdico lesionado, para lo cual estudiaremos la presencia de las hAMSC en los corazones de los animales infartados *post mortem* mediante:

- Análisis inmunohistoquímico, dirigido a la detección de proteínas específicamente expresadas en las hAMSC.
- De igual forma, y con el objetivo de la confirmación de los hallazgos obtenidos, procederemos con la transfección de las hAMSC con plásmidos eucarióticos de expresión constitutiva de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*), y su posterior administración en los animales infartados, para su seguimiento histofluorescente en el tejido miocárdico.

Objetivo 3. Analizar el posible efecto cardioprotector de las hAMSC a través de su capacidad secretora de vesículas extracelulares.

Determinaremos la capacidad de secreción de vesículas extracelulares (EVs, del inglés *Extracellular Vesicles*) de las hAMSC y evaluaremos su contribución específica al efecto cardioprotector observado en el modelo animal de infarto. Para ello, la primera aproximación consistirá en:

- Estudiar *in vitro* el efecto secretor de las hAMSC en cultivos celulares en condiciones de normoxia e hipoxia, con el objetivo de mimetizar el microambiente hipóxico al que se ven sometidas las células tras su administración en los animales infartados. Procederemos al aislamiento y a la posterior validación de las EVs mediante técnicas de caracterización físico-química, así como a la determinación de la presencia de marcadores específicos exosomales, indicativos del efecto secretor de las EVs por parte de las hAMSC.
- En caso afirmativo, realizaremos un análisis de la presencia de marcadores moleculares de infarto agudo de miocardio identificados previamente en el estudio de GWAS (del inglés *Genome Wide Association Studies*).

Objetivo 4. Evaluación in vivo del efecto cardioprotector de las EVs derivadas de hAMSC

Determinaremos si la administración de las EVs derivadas de hAMSC es capaz de reproducir los efectos funcionales y antifibróticos observados con la terapia celular. Así, procederemos con la administración de EVs derivadas de hAMSC, libres de células, en ratones sometidos a I/R, analizando como en el Objetivo 1:

- La contribución de las EVs sobre la función cardíaca, la extensión del área necrosada, el área de riesgo y su efecto sobre la fibrosis cardíaca post-infarto.
- Análisis del efecto de las EVs sobre los niveles circulantes del miR-150-5p aislados de la sangre periférica de los animales infartados.
- Contribución de las EVs sobre los marcadores seleccionados en el Objetivo 3, con especial relevancia a aquellos implicados en el proceso necrótico y fibrótico del miocardio.

Objetivo 5. Identificación y validación de marcadores moleculares responsables del efecto cardioprotector de las hAMSC.

Con el objetivo principal de aproximarnos a la base molecular del efecto cardioprotector de las hAMSC, realizaremos:

Hipótesis y objetivos

- Estudio preliminar *in silico* orientado a la búsqueda de marcadores moleculares de infarto agudo de miocardio previamente descritos en estudios GWAS.
- Del total de marcadores moleculares, continuaremos con un estudio cruzado entre éstos y ARNs no codificantes por su reciente implicación en el infarto agudo de miocardio, con especial mención al microRNA, miR-150-5p, recientemente descrito con un efecto cardioprotector, por su papel modulador de genes diana implicados en el infarto agudo de miocardio, en relación con la administración de otras células de origen mesenquimal, en el mismo modelo experimental utilizado en la presente Tesis Doctoral. Asimismo, estudiaremos el efecto ejercido por las condiciones de hipoxia en la secreción de EVs enriquecidas con este microRNA no codificante.
- Cuantificar y seleccionar aquellos marcadores moleculares relacionados con miR-150-5p que muestren cambios en la expresión tras el infarto, y analizar sus niveles tras la administración de las hAMSC en los ratones infartados.

Objetivo 6. Validación causal del efecto cardioprotector del microRNA no codificante miR-150-5p, a través de su edición génica en las hAMSC

Como hemos mencionado, el miR-150-5p ha sido descrito con un efecto cardioprotector frente al infarto agudo de miocardio, incluyendo estudios realizados tanto por nosotros en la presente Tesis Doctoral, como por otros investigadores en relación con otras células de origen mesenquimal. Sin embargo, en ningún caso ha sido evidenciado de forma causal y definitiva su contribución en esta patología. Por este motivo, nosotros deseamos confirmar su contribución mediante la generación y evaluación de hAMSC deficientes en miR-150-5p. Concretamente, pretendemos:

- Generar una línea de hAMSC deficiente en miR-150-5p, a la que denominaremos hAMSC-KO, editada genéticamente mediante la tecnología CRISPR-CAS9, y utilizarla como herramienta tanto en la presente Tesis Doctoral, como en otras investigaciones, para poder estudiar el efecto de la pérdida funcional de este microRNA.
- Determinar si la administración de hAMSC-KO tiene un efecto distinto al de los ratones a los que se les administraron hAMSC sobre la funcionalidad, la necrosis y la fibrosis cardíacas.
- Evaluar si la pérdida de miR-150-5p afecta la modulación de los marcadores seleccionados previamente mediante GWAS en relación con el miR-150-5p, en los ratones infartados con hAMSC-KO.

Objetivo 7. Nanotecnología basada en miR-150-5p: evaluación de NMC-150 como terapia alternativa eficaz frente al infarto agudo de miocardio

Con el objetivo de profundizar en tratamientos efectivos capaces de frenar el remodelado adverso que tiene lugar tras un infarto de miocardio, los sistemas terapéuticos libres de células, entre los que se incluye la administración de EVs descrita en el Objetivo 4 de la presente Tesis Doctoral, pueden representar una ventaja significativa frente a la administración de células con potencial terapéutico, como las hAMSC. Además de su efecto terapéutico, este enfoque podría contribuir a la prevención de efectos secundarios asociados a la terapia celular, entre ellos la posible activación del sistema inmune derivada de procedimientos de xenotrasplante. Por este motivo, y en base a la experiencia de nuestro laboratorio en nanotecnología pretendemos:

- Desarrollar una nanopartícula capaz de alcanzar el tejido cardíaco tras el infarto, que contenga miR-150-5p, a la que llamaremos NMC-150.
- Evaluar si la administración de NMC-150 mejora la función cardíaca, limita la necrosis y la fibrosis post-infarto, en comparación con la administración de EVs o de hAMSC.
- Estudiar el posible efecto cardioprotector de NMC-150, a través de los biomarcadores seleccionados anteriormente en relación con el miR-150-5p, o incluso pudiera ejercer un efecto sobre rutas moleculares no exploradas hasta el momento.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS Y MATERIALES EMPLEADOS

En la siguiente tabla se recogen los principales reactivos, materiales y kits comerciales utilizados en el presente estudio, indicando su referencia y casa comercial.

Tabla 2. Listado en orden alfabético de reactivos, materiales y kits empleados en los procedimientos experimentales.

Nombre	Referencia	Casa comercial
Azul de Evans	E2129	Sigma-Aldrich (Merck)
Células competentes DH5α	EC0112	Thermo Fisher
DSPE-PEG2000	880135P	Sigma-Aldrich (Merck)
DSPE-PEG2000-Maleimida	880126P	Sigma-Aldrich (Merck)
DMEM (1 g/L glucosa, sin L-glutamina)	L0101	Biowest
Ensayo BCA	23227	Thermo Fisher
Eosina amarillenta alcohólica 1%	256879.1210	Merck Millipore
Goat anti-rabbit IgG (HRP)	AB97051	Abcam
GW4869	D1692	Sigma-Aldrich (Merck)
hAMSC	HMSC.AM-100	Cellular Engineering Technologies
Hematoxilina de Harris	253949.1211	Merck Millipore
HiSpeed Plasmid Midi Kit	12643	Qiagen
H9C2	CRL-1446	ATCC
hFGF-b	PHG0026	Gibco
Lipofectamine™ RNAiMAX	13778075	Thermo Fisher
L-glutamina	G7513	Sigma-Aldrich (Merck)
Maxima First Strand cDNA Kit	K1641	Thermo Fisher
miRNeasy Kit	217084	Qiagen
miRNeasy Serum/Plasma	217184	Qiagen
miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit	217204	Qiagen
NIH/3T3	CRL-1658	ATCC
Opti-MEM	31985047	Life Technologies
Panel de Exosomas (Exosome Panel)	ab275018	Abcam
Partículas lentivirales CMV-GFP	LPP-CMV-GFP-LV100-200	OriGene Technologies
PBS	14190-086	Gibco
Penicilina/estreptomicina/anfotericina B	H317-745E	Lonza
Péptidos IL-10	IT9302	Biomedal
PhosSTOP EASYpack	4906845001	Roche

Nombre	Referencia	Casa comercial
Plásmido px459	62988	Addgene (obtenido vía GenScript)
Polibreno (hexadimetrina bromuro)	H9268	Sigma-Aldrich (Merck)
Puromicina	P8833	Sigma-Aldrich (Merck)
QIAzol	79306	Qiagen
RIPA buffer	89900	Thermo Fisher
RNeasy Mini Kit	74104	Qiagen
Secuencia miR-150-5p sintética	—	Sigma-Aldrich (Merck)
Sevoflurano (Sevorane®)	—	AbbVie
SSEA-4 (anticuerpo)	MC81370	Thermo Fisher
Suero fetal bovino (FBS)	S181B	Biowest
Sustrato ECL	32106	Thermo Fisher
TaqMan ACTA2	4331182	Thermo Fisher
TaqMan GSK3β	4331182	Thermo Fisher
TaqMan HOXA-4	4331182	Thermo Fisher
TaqMan MIAT	4351372	Thermo Fisher
TaqMan miR-150-5p (ID 000473)	4427975	Thermo Fisher
TaqMan miR-93-3p (ID 002139)	4427975	Thermo Fisher
TaqMan U6 snRNA (ID 001973)	4427975	Thermo Fisher
TaqMan MicroRNA RT Kit	4366597	Thermo Fisher
TaqMan Universal Master Mix II	4440047	Thermo Fisher
Tripsina-EDTA	T4174	Sigma-Aldrich (Merck)
TTC (2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro)	T8877	Sigma-Aldrich (Merck)
Tubos de citrato de sodio	363086	BD Vacutainer

2. MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN EN LA ARTERIA CORONARIA

La experimentación animal se llevó a cabo en el Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz (Madrid, España), dirigido por la Dra. Carlota Largo Aramburu. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH Publication No. 85-23, revisada en 1985), así como con las directrices del Comité Ético de Bienestar Animal, la normativa europea sobre animales de experimentación (Directiva 63/2010 UE) y la legislación española vigente (RD 53/2013). El protocolo experimental fue aprobado bajo el código PROEX 174.7/24.

2.1 Selección del Modelo y Condiciones Experimentales

Para el establecimiento del modelo murino de infarto agudo de miocardio (IAM) por isquemia/reperfusión, se utilizaron ratones C57BL/6 de 12 semanas de edad (etapa adulta), Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia). Se emplearon preferentemente machos con el fin de reducir la variabilidad biológica asociada al ciclo hormonal y favorecer la reproducibilidad del modelo experimental. La elección de ratones C57BL/6 adultos se basó en su amplio uso en investigación cardiovascular, especialmente en modelos experimentales de infarto agudo de miocardio, permitiendo obtener un daño cardíaco reproducible y cuantificable, facilitando así el análisis de parámetros funcionales, histológicos y moleculares (Salto-Tellez et al., 2004).

La isquemia se indujo mediante la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior (LAD) en animales previamente anestesiados con sevoflurano inhalado a una concentración del 2% (Sevorane®, AbbVie, North Chicago, IL, EE. UU.).

2.2 Manejo Prequirúrgico y Procedimiento Anestésico

Los animales fueron anestesiados con sevoflurano (Sevorane®, AbbVie, North Chicago, IL, EE. UU.) administrado por vía inhalatoria a una concentración del 2%.

Se administró buprenorfina (0,05 mg/kg) subcutánea como analgesia preoperatoria, con una dosis de refuerzo a las 24 horas postcirugía según evaluaciones diarias. Para profilaxis antibiótica, se administró ceftriaxona (60–70 mg/kg, i.p.) durante cinco días post-toracotomía.

Materiales y métodos

Durante la cirugía, los animales se colocaron sobre una mesa quirúrgica calefactada para mantener la temperatura corporal. Se realizó un afeitado y desinfección del tórax antes de la incisión.

La anestesia fue seguida de intubación endotraqueal para garantizar ventilación mecánica adecuada (30 ciclos/min, 225 μ L/ciclo), utilizando un ventilador Harvard HSE Mouse Ventilator MiniVent Type 845 (Harvard Bioscience, Holliston, MA, EE. UU.). Para la intubación, se realizó una pequeña incisión en la piel del cuello, exponiendo la tráquea y facilitando la inserción de una cánula metálica de 1 mm acoplada a un adaptador en Y.

2.3 Inducción de Isquemia y Reperfusión

El corazón se expuso a través de una toracotomía en el cuarto espacio intercostal izquierdo (entre la cuarta y la quinta costilla de la región torácica izquierda), obtenido mediante la separación de las capas musculares evitando cortes en el tejido subdérmico. Para mantener el acceso quirúrgico, se utilizaron separadores costales.

Identificación y oclusión de la arteria LAD: se ligó la LAD con sutura 9-0, mediante la transfixión (atravesamiento controlado) del tejido miocárdico ventricular izquierdo evitando el desgarro del mismo, y la colocación de un tubo de 1 mm entre la sutura y el tejido, aplicando presión suficiente para interrumpir el flujo sanguíneo.

Período de isquemia: se mantuvo la oclusión durante 30 minutos, minimizando el daño tisular mediante hidratación constante de la cavidad torácica con gasas estériles humedecidas en solución salina a temperatura fisiológica (similar a la corporal).

Reperfusión: la ligadura fue liberada mediante la realización de un único corte sobre la sutura para restablecer el flujo sanguíneo, permitiendo la recuperación tisular post-isquemia.

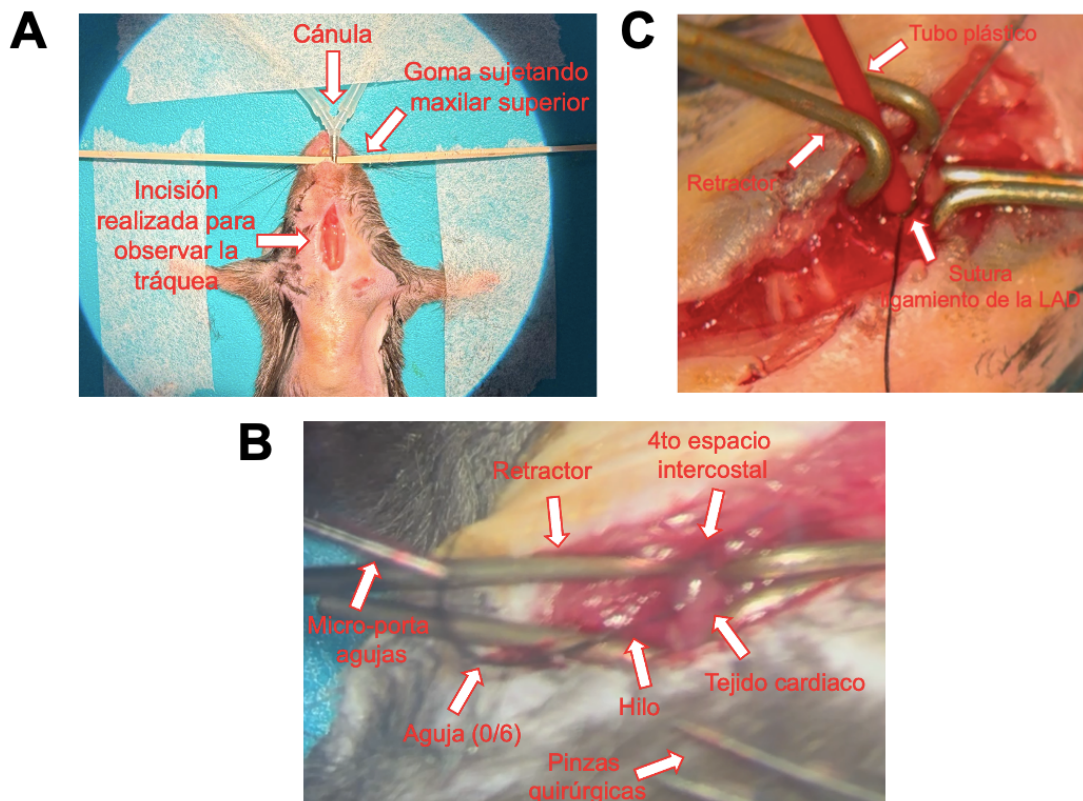


Figura 16. Imágenes representativas del proceso de intubación (A), transfixión/paso de la aguja (B) e isquemia por ligadura temporal de la LAD (C).

2.4 Cierre Quirúrgico y Recuperación Postoperatoria

Tras la reperfusión, los retractores fueron retirados y la cavidad torácica fue cerrada suturando de forma continua entre la parte superior de la cuarta costilla y la parte inferior de la quinta costilla con sutura de seda 6-0, evitando dar más de dos puntadas en este tejido, aplicando una presión controlada y paulatina para garantizar el cierre adecuado y evitar desgarros que inhabilitarían la recuperación de la respiración autónoma del animal. La piel se suturó con seda 4-0 y, posteriormente, la zona quirúrgica fue desinfectada con *Betadine*. Los animales fueron extubados y colocados en una cama de recuperación a 37°C, donde recibieron oxígeno clínico hasta la restauración completa de la conciencia.

2.5 Extracción y Procesamiento de Muestras Biológicas

- Muestras sanguíneas: Se extrajeron aproximadamente 500 μL de sangre periférica por animal mediante punción del plexo submandibular, recolectándose

en tubos de citrato de sodio (Cat. # 363086) (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.).

- Separación de componentes: La sangre se centrifugó a 400 g durante 10 minutos, y el plasma obtenido fue almacenado a -80 °C hasta su posterior análisis.
- Confirmación del procedimiento: El éxito de la cirugía se verificó mediante electrocardiografía (ECG) no invasiva mediante el sistema PowerLab (ADInstruments, Dunedin, Nueva Zelanda) durante la fase de optimización del modelo, para detectar elevación del segmento ST, así como mediante ecocardiografía de alta frecuencia (apartado 5).

2.6 Bienestar Animal y Consideraciones Éticas

El manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo con las normativas internacionales de bienestar animal, siguiendo las directrices de la Directiva Europea 2010/63/EU y los principios de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento).

- Se establecieron criterios de exclusión para animales que mostraran signos de angustia extrema, infecciones postquirúrgicas o complicaciones graves.
- Los animales fueron monitoreados diariamente para evaluar su estado general, controlando peso, movilidad, temperatura y signos de dolor.
- La eutanasia humanitaria se llevó a cabo mediante sobredosis anestésica seguida de dislocación cervical, minimizando el sufrimiento.
- Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité de ética institucional, asegurando su cumplimiento con las normativas vigentes en investigación preclínica.

3. CULTIVO CELULAR

3.1 Líneas celulares empleadas:

3.1.1 hAMSC:

Las células madre mesenquimales derivadas de membrana amniótica de placenta humana (hAMSC) (Cellular Engineering Technologies, Coralville, EE. UU., Cat. # HMSC.AM-100) fueron sembradas en diferentes superficies de cultivo a una densidad inicial de 10^4 células/cm². Las células se cultivaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 1 g/L de glucosa, privado de L-glutamina (Biowest, Nuaillé, Francia, Cat. # L0101), y suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Biowest, Nuaillé, Francia, Cat. # S181B), penicilina/estreptomicina/fungizona (10k/10k/25 µg) (Lonza, Basilea, Suiza, Cat. # H317-745E), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU., Cat. # G7513) y factor de crecimiento fibroblástico básico humano (hFGF-b) (Gibco, Cat. # PHG0026).

Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera controlada de 5 % de CO₂ y 20 % de O₂ (condiciones normóxicas) en un incubador SafeGrow Pro (EuroClone, Italia) o de 5 % de CO₂ y 1 % de O₂ (condiciones hipóxicas) en un incubador GALAXY 48 R de New Brunswick (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), renovando el medio de cultivo cada 2–3 días. Las condiciones de hipoxia se establecieron durante un periodo de 20–24 horas (hipoxia aguda), cuya efectividad fue confirmada mediante el análisis de la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF), tal como se ha descrito previamente por nuestros colaboradores (de Laorden et al., 2023). La viabilidad celular, previamente evaluada (de Laorden et al., 2023), se realizó en función de la morfología y el grado de confluencia, no observándose diferencias fenotípicas respecto a las condiciones normóxicas, en concordancia con estudios previos.

Una vez alcanzado aproximadamente el 90% de confluencia, los cultivos celulares se lavaron con PBS (del inglés *Phosphate-Buffer Saline*) (Gibco, Grand Island, Nueva York, EE. UU., Cat. # 14190-086), tripsinizados con tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU., Cat. # T4174), y las células fueron resuspendidas y resembradas a la densidad indicada según el protocolo experimental.

3.1.2 NIH/3T3

Como control celular, se emplearon fibroblastos derivados de embriones de ratón NIH/3T3 (ATCC, Manassas, EE. UU., Cat. # CRL-1658), sembrados en condiciones de normoxia y procesadas de manera semejante a las hAMSC.

3.1.3 H9C2

Los experimentos de captación de vesículas extracelulares (EVs) se realizaron en la línea celular derivada de los mioblastos ventriculares de corazones embrionarios de rata BD1X H9C2 (ATCC, Manassas, EE. UU., Cat. # CRL-1446). Estas células fueron cultivadas en condiciones de normoxia y procesadas bajo condiciones similares a las de las anteriores. Para bloquear la liberación de EVs por parte de las hAMSC, las células fueron pretratadas con 10 μ M de GW4869 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU., Cat. # D1692) durante 24 horas antes de la exposición al secretoma y del cocultivo con células H9C2 (Ko et al., 2020).

4. ADMINISTRACIÓN CELULAR EN MODELOS EXPERIMENTALES

Las hAMSC fueron administradas a los animales mediante inyección intravenosa a través de la vena caudal. Para ello, las células se cultivaron bajo las condiciones previamente descritas y se expandieron en frascos de cultivo de 500 mL, obteniéndose un rendimiento aproximado de 1×10^6 células por frasco. Tras alcanzar la confluencia, las células fueron tripsinizadas, lavadas tres veces con PBS estéril, y resuspendidas nuevamente en este PBS estéril y administradas a una dosis de 2×10^5 células por animal.

La administración celular se realizó a los 2 días tras la isquemia/reperfusión (I/R), una dosis y vía de administración consistentes con estudios murinos previos que emplean números similares de células por vía intravenosa (Dong et al., 2012; Liang et al., 2023). Adicionalmente, en otros grupos experimentales, se administraron 2×10^5 hAMSC por vía intravenosa en los puntos temporales de 7 o 14 días tras la reperfusión.

Los animales tratados con NIH/3T3, como control celular, recibieron la misma dosis celular por vía intravenosa (2×10^5 células).

5. EVALUACIÓN ECOCARDIOGRÁFICA DE LA FUNCIÓN CARDÍACA

Para evaluar la funcionalidad miocárdica a lo largo del tiempo, se realizaron análisis ecocardiográficos utilizando un sistema de ultrasonido portátil Vivid Q (GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.) equipado con un transductor de 14.5 MHz. Se siguieron los protocolos estandarizados para la adquisición de mediciones lineales internas del corazón. Inicialmente, se procedió a la adquisición de imágenes en modo bidimensional (B) para la correcta localización del ventrículo izquierdo, tras lo cual pasamos a utilizar un modo monodimensional (M) para la adquisición de los siguientes parámetros de funcionalidad cardíaca: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), Grosor del septo interventricular al final de la diástole y la sístole (IVSd, IVSs), Diámetro interno del ventrículo izquierdo al final de la diástole y la sístole (LVIDd, LVIDs), Grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo al final de la diástole y la sístole (LVPWd, LVPWs), Fracción de acortamiento (FS), Frecuencia cardíaca (HR) y Gasto cardíaco (CO). Para minimizar el sesgo interobservador, todas las adquisiciones de datos y análisis fueron realizados por el mismo operador.

Tabla 3. Acrónimos ecocardiográficos y sus unidades de medida junto a su significado.

Acrónimo	Significado de los acrónimos ecocardiográficos
IVSd (mm)	Grosor del septo interventricular al final de la diástole
LVIDd (mm)	Diámetro interno del ventrículo izquierdo al final de la diástole
LVPWd (mm)	Grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo al final de la diástole
IVSs (mm)	Grosor del septo interventricular al final de la sístole
LVIDs (mm)	Diámetro interno del ventrículo izquierdo al final de la sístole
LVPWs (mm)	Grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo al final de la sístole
LVEF / FEVI (%)	Fracción de eyección del Ventrículo Izquierdo
FS (%)	Fracción de acortamiento
HR (bpm)	Frecuencia cardíaca (latidos por minuto)
CO (mL/sec)	Gasto cardíaco

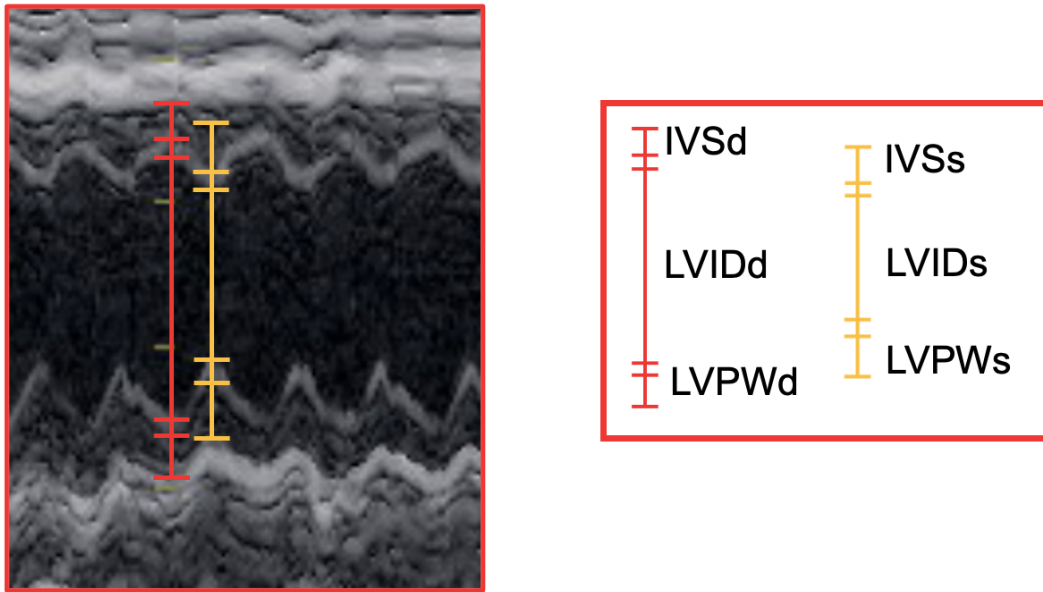


Figura 17. Imagen ecocardiográfica representativa en modo M que muestran el septo interventricular (IVS), el diámetro interno del ventrículo izquierdo (LVID) y el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (LVPW) en telediástole (rojo) y telesístole (amarillo).

6. ANÁLISIS HISTOLÓGICO, INMUNOHISTOQUÍMICO E INMUNOFLUORESCENCIA

6.1 Procesamiento y Tinción de Tejidos

En puntos de tiempo específicos, los corazones fueron extraídos y procesados para su evaluación histológica. Tras el sacrificio de los animales, los tejidos cardíacos fueron aislados y fijados, procediendo posteriormente a su deshidratación gradual mediante concentraciones crecientes de etanol hasta alcanzar el 100%. A continuación, las muestras fueron incubadas en xilol para favorecer su inclusión en parafina utilizando moldes metálicos.

A partir de los bloques de parafina se obtuvieron secciones histológicas de 5 µm de grosor mediante un micrótopo (Thermo Fisher Scientific). Los cortes fueron depositados en agua a 37 °C y montados sobre portaobjetos recubiertos de polilisina para mejorar la adhesión del tejido. Posteriormente, las muestras fueron desparafinadas mediante incubación a 60 °C y sucesivos lavados con xilol, seguidos de un proceso de rehidratación utilizando concentraciones decrecientes de etanol hasta agua destilada.

Finalmente, las secciones histológicas de las diferentes regiones cardíacas fueron empleadas para la realización de tinciones histológicas para el análisis estructural del tejido cardíaco:

- Hematoxilina/Eosina (HE): Permite la visualización de áreas de necrosis miocárdica y focos inflamatorios.
- Tricómico de Masson (MT): Utilizado para la cuantificación del grado de fibrosis post-infarto.

Las regiones necróticas y/o fibróticas se evaluaron a partir de imágenes histológicas digitalizadas empleando el software **ImageJ** (ImageJ 1.53t, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Para el análisis, las imágenes fueron previamente calibradas y segmentadas, aplicando umbrales de color específicos que permitieron cuantificar de manera objetiva la extensión de las áreas lesionadas en relación con el tejido total.

6.2 Inmunohistoquímica en Secciones de Tejido Cardíaco Infartado

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de inmunohistoquímica sobre las mismas secciones de tejido cardíaco infartado con el objetivo de detectar la presencia de hAMSC mediante el marcador específico SSEA-4 (Stage-Specific Embryonic Antigen 4), no expresado en células cardíacas. Para ello, las muestras fueron desparafinadas, rehidratadas y sometidas a un proceso de desenmascaramiento antigénico utilizando tampón citrato a pH 6. Posteriormente, se bloqueó la peroxidasa endógena y, dado el empleo de un anticuerpo monoclonal murino sobre tejido cardíaco de ratón, se utilizó un protocolo *mouse-on-mouse* para reducir el marcaje inespecífico, bloqueando las secciones con fragmentos Fab de IgG anti-ratón de cabra no conjugados diluidos en PBS/BSA durante 60 minutos.

Las muestras se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo monoclonal SSEA-4 (Cat. # MC81370, Thermo Fisher, Pittsburgh, EE. UU.) en dilución 1:50. Se realizaron lavados con PBS seguido de la incubación con el correspondiente anticuerpo secundario (anti-mouse) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Finalmente, la señal se reveló mediante el cromógeno diaminobencidina (DAB), obteniéndose una coloración marrón-rosácea visible en las zonas positivas. Los núcleos celulares fueron contrastados mediante hematoxilina y las preparaciones visualizadas mediante microscopía de campo claro en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Este análisis permitió evaluar la localización de las hAMSC en el tejido infartado tras la lesión por isquemia/reperfusión miocárdica.

6.3 Evans Blue-TTC para la Determinación del Área en Riesgo y del Tamaño del Infarto

El área en riesgo se delimitó mediante la administración intravenosa del colorante azul de Evans, el cual perfunde en todas las células vivas, dejando sin teñir el territorio isquémico distal a la ligadura de la arteria descendente anterior izquierda (LAD). Tras la extracción del corazón, los ventrículos se seccionaron en cortes transversales de 1 mm de grosor y se incubaron en una solución al 1% de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) a 37 °C, el cual detecta la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial emitiendo una señal en el rojo visible, indicativa de célula viable. Gracias a esta aproximación, podemos diferenciar el miocardio sano de color azul (Evans Blue) por encima de la ligadura, el área de riesgo necrótico: tejido vivo bajo la ligadura de color rojo (TTC+), y el área

necrótica: tejido necrosado no teñido con TTC (TTC-) por carecer de actividad mitocondrial, identificado de color blanquecino.

6.4 Transducción lentiviral para la expresión de GFP

Las hAMSC fueron transducidas con partículas lentivirales preempaquetadas que contenían el gen de la proteína verde fluorescente (GFP). Para este fin, se emplearon partículas lentivirales generosamente donadas por la Dra. Esther Martín-Villar (Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, España).

Las hAMSC se cultivaron en condiciones estándar en medio completo DMEM hasta alcanzar aproximadamente un 70% de confluencia. La transducción se llevó a cabo siguiendo un protocolo facilitado por la Dra. Martín-Villar, basado en procedimientos de referencia para la infección lentiviral. Brevemente, las células se incubaron durante 24 horas con el sobrenadante viral suplementado con polibreno (4–8 µg/mL; hexadimetrina bromuro, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.; Cat. # H9268), empleando una multiplicidad de infección (MOI) de 2.

Finalizado el periodo de incubación inicial, las células se sometieron a lavados con PBS estéril. Posteriormente, se procedió al reemplazo del medio de cultivo (DMEM suplementado) y se mantuvieron las células en cultivo durante un intervalo adicional de 72 horas. La eficiencia de la transducción se cuantificó mediante la detección de la proteína GFP empleando microscopía de fluorescencia. Toda la manipulación de vectores lentivirales y procedimientos se realizaron atendiendo estrictamente a los protocolos de Nivel de Bioseguridad 2 (BSL-2).

Las hAMSC transducidas con GFP (hAMSC-GFP) fueron administradas por vía intravenosa a los ratones a los dos días tras la reperusión. En el día 7 post-I/R, los corazones fueron extraídos, fijados y procesados para su análisis histológico, evaluándose la expresión de GFP mediante microscopía de fluorescencia, donde los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst (DAPI) y las preparaciones visualizadas mediante microscopía confocal utilizando el sistema LEICA TCS-SP5 en el servicio de microscopía del Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

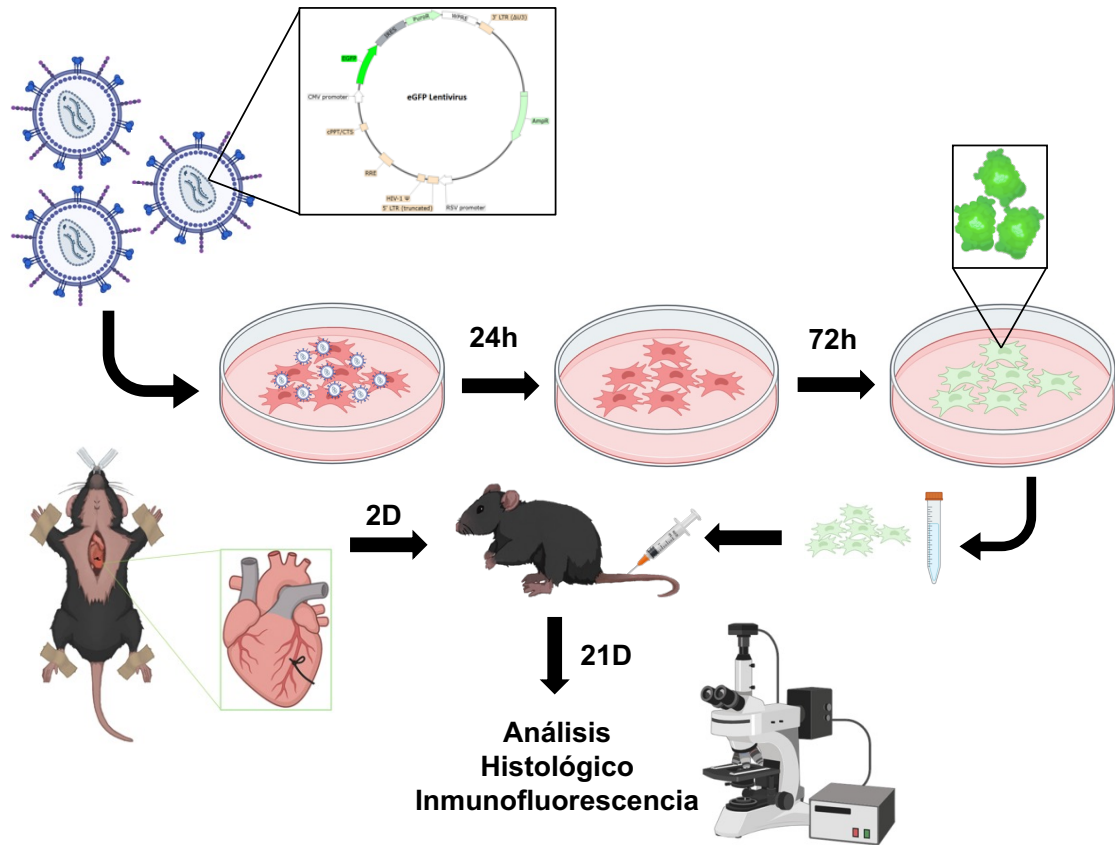


Figura 18. Esquema representativo del procedimiento de transducción lentiviral para GFP y la posterior administración de las hAMSC-GFP en el modelo animal de IR miocárdica. Elaboración propia.

7. EDICIÓN GÉNICA EN hAMSC

7.1 Selección del Gen diana

El estudio sistemático de genes asociados al infarto agudo de miocardio (IAM) se realizó inicialmente mediante análisis de estudios de asociación del genoma completo (GWAS), (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/search?query=myocardial%20infarction>).

A partir de los genes identificados tras la búsqueda, se priorizaron aquellos con una presencia predominante en múltiples estudios de GWAS, seleccionando el Myocardial Infarction Associated Transcript (MIAT) como el objetivo principal del estudio, dado su papel regulador en la fisiopatología del IAM y su interacción con diversos microRNAs, incluido miR-150-5p.

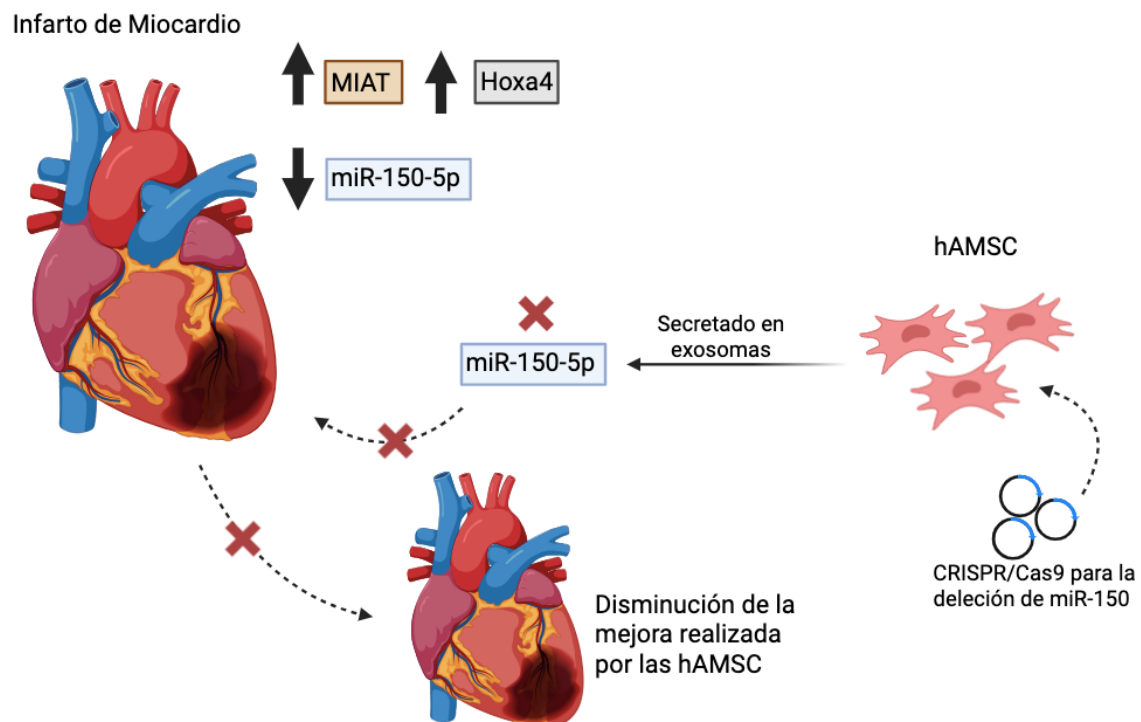
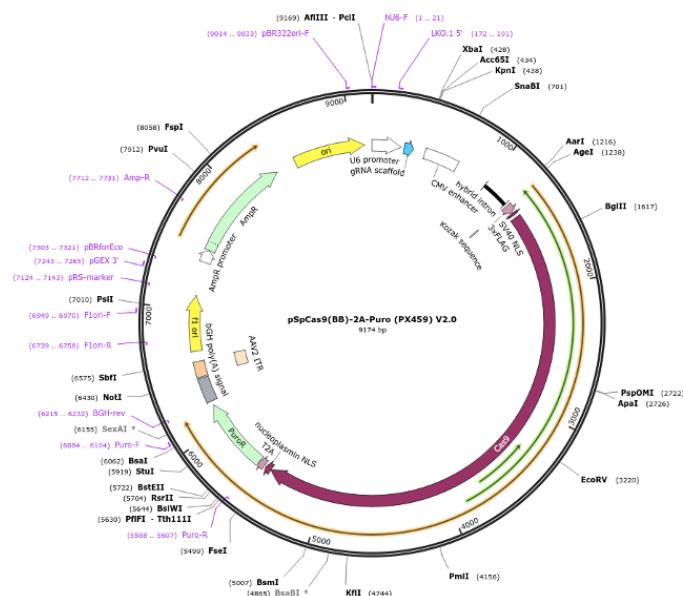


Figura 19. Esquema representativo del proceso para la obtención de la línea hAMSC para el *knockout* de miR-150, y su posterior análisis *in vivo* en modelos murinos de IAM. Elaboración propia.

7.2 Edición Génica mediante CRISPR/Cas9

Para la edición génica de miR-150-5p, se empleó el sistema CRISPR/Cas9, utilizando el plásmido px459 (GenScript, NJ, EE. UU.), el cual incorpora un gen de resistencia a puomicina para la selección de clones transformados.

Se diseñaron dos plásmidos con características idénticas, diferenciándose únicamente en la secuencia de ARN guía (sgRNA), con el objetivo de mejorar la eficiencia de delección del locus de miR-150 (Chirichella et al., 2022).



CCCAACCTTGTACCAGTGC

Figura 20. Diseño del sistema CRISPR/Cas9 utilizando el Plásmido PX459, con las guías para la delección de miR-150. Imagen adaptada de Addgene.

Para la transfección en hAMSC, se utilizó el reactivo Lipofectamine RNAiMax (Cat. # 13778075, Thermo Fisher, Pittsburgh, EE.UU). Tras alcanzar la confluencia celular, las células fueron incubadas frente

Materiales y métodos

Ambos plásmidos PX459 con las guías para la delección de miR-150 fueron diluidos junto al reactivo Lipofectamine RNAiMAX en Opti-MEM (Cat. # 31985047 Thermo Fisher, Pittsburgh, EE. UU.) durante 20 min a temperatura ambiente favoreciendo la incorporación de los plásmidos a los liposomas catiónicos de la Lipofectamine RNAiMAX. Tras alcanzar la confluencia celular, las hAMSC fueron cultivadas en Opti-MEM, e incubadas con los liposomas con el material plasmídico, el cual fue añadido gota a gota sobre el cultivo celular. Tras 48 horas de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, se procedió a la selección de las células positivamente transfectadas mediante la adición mediante la adición de puromicina al medio de cultivo, dado que el plásmido empleado confería resistencia a este antibiótico. La selección se mantuvo durante 5 días, renovando el medio con puromicina según las necesidades del cultivo.

Las células resistentes fueron diluidas y sembradas individualmente en placas de 96 pocillos (1 célula/pocillo), mediante clonación por dilución límite, manteniéndose en cultivo durante dos semanas. Posteriormente, se aislaron los clones positivos y se confirmó la delección de miR-150-5p mediante qPCR con sondas TaqMan, específicas para la detección de miR-150-5p.

8. DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS CON miR-150-5p COMO CARGO

8.1 Diseño y Funcionalización de NMC-150

NIL10 es una nanopartícula tipo micela dirigida al receptor de IL-10, desarrollada y patentada por el laboratorio del Dr. Carlos Zaragoza. Esta nanopartícula ha demostrado efectos cardioprotectores en modelos de ratón y cerdo con infarto agudo de miocardio (IAM), debido a su capacidad para modular la respuesta inflamatoria en el tejido cardíaco post-infarto (Tesoro et al., 2022).

En colaboración con el Dr. Marco Filice de la Universidad Complutense de Madrid, se diseñó y sintetizó NMC-150 para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. La incorporación de miR-150-5p en NIL10 es de particular interés debido a su capacidad de modular la inflamación y mejorar la remodelación post-IAM, proporcionando un enfoque terapéutico dual.

8.2 Composición de NMC-150

La nanopartícula se compone de una combinación de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenglicol)-2000] y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[maleimida (polietilenglicol)-2000], ambos adquiridos de Merck, Sigma-Aldrich.

- Péptidos agonistas para IL-10: IT9302 CAYMTMKIRN (Biomedal).
- Secuencia de miR-150-5p: Sintetizada por Merck, Sigma-Aldrich, con la siguiente estructura:
 - hsa-miR-150_S [AmC6]CACUGGUACAAGGGUUGGGUAGA[dT][dT] / UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG

8.3 Síntesis y Caracterización de la Nanopartícula

Las nanopartículas paramagnéticas se prepararon utilizando el método de hidratación de película lipídica, que consistió en los siguientes pasos:

1. Disolución de los componentes en una mezcla de cloroformo/metanol.
2. Evaporación del disolvente para formar una película lipídica.
3. Hidratación con tampón HEPES para obtener liposomas.

Materiales y métodos

4. Conjugación de péptidos modificados a los liposomas y eliminación de péptidos no conjugados.
5. Los miméticos para miR-150 fueron incorporados mediante interacciones electrostáticas con lípidos catiónicos.

Finalmente, se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas mediante dispersión dinámica de luz, evaluando los siguientes parámetros: tamaño hidrodinámico medio (Z-average) e índice de polidispersidad (PDI), utilizado para determinar la homogeneidad de la suspensión nanoparticulada, así como la morfología y su carga superficial.

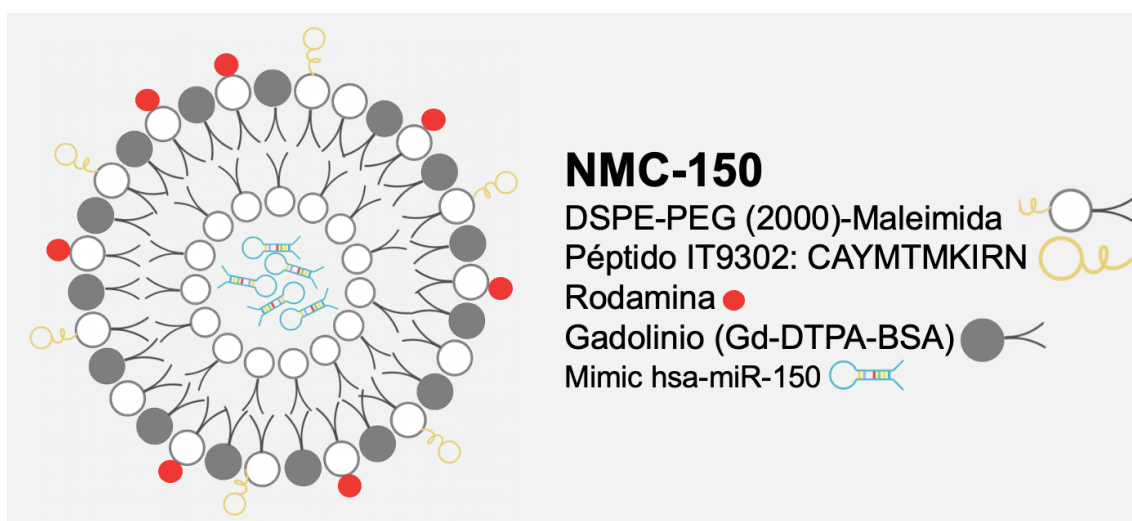


Figura 21. Esquema representativo de la Nanopartícula NIL10 cargada de miR-150 (NMC-150). Elaboración propia.

9. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y ANÁLISIS MOLECULARES

9.1 Extracción de ARN

Las muestras de sangre y tejido cardíaco fueron sometidas a extracción de ARN total utilizando los siguientes reactivos y kits comerciales:

- Sangre: Kit MIRNEASY (Cat. # 217084, Qiagen, Hilden, Alemania).
- Plasma/Suero: miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Cat. # 217204, Qiagen, Hilden, Alemania).
- Tejido cardíaco y cultivo celular: Reactivo de lisis QIAzol (Cat. # 79306, Qiagen, Hilden, Alemania).

El aislamiento de ARN total y microRNA se realizó utilizando kits comerciales de Qiagen indicados siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron lisadas y homogenizadas (en el caso de aquellas procedentes de tejido cardíaco y cultivo celular mediante disgregación mecánica) utilizando el reactivo de lisis propio de la casa comercial (tampón QIAzol Lysis Reagent), favoreciendo la desnaturalización proteica y preservando la integridad del ARN. Posteriormente, tras la adición de cloroformo y centrifugación, la fase acuosa fue recuperada y mezclada con etanol para favorecer la unión del RNA a las columnas de sílice. Las muestras fueron sometidas a sucesivos pasos de lavado utilizando los tampones RWT y RPE para eliminar contaminantes y restos proteicos. Finalmente, el RNA purificado, fue aislado mediante la adición de agua libre de nucleasas a las columnas y almacenado a -80°C hasta su utilización.

La cuantificación del ARN fue cuantificada mediante espectrofotometría (NanoDrop), y la calidad del ARN extraído se verificó mediante el sistema de electroforesis capilar automatizada TapeStation, que separa el ARN por tamaño, indicando el estado de integridad de la muestra.

9.2 Síntesis de cDNA

La retrotranscripción para la síntesis del cDNA se llevó a cabo utilizando los protocolos indicados por los fabricantes de los kits comerciales empleados en cada caso específico.

Materiales y métodos

Previo al análisis mediante PCR cuantitativa, las muestras de las que proceden las moléculas de ARN mensajero y ARN largos no codificantes fueron sometidas a la retrotranscripción (RT) para la síntesis de cDNA total utilizando el kit comercial Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Cat. # K1641, Thermo Fisher, Pittsburgh, EE. UU.). Tras la purificación del ARN, se utilizaron 500 ng de cada muestra para las reacciones de RT de forma independiente, añadiendo posteriormente el 5X *Reaction Mix*, que incluye dNTPs, oligo(dT), cebadores hexámeros aleatorios y componentes estabilizadores de la reacción, junto con la enzima *Maxima Reverse Transcriptase* y su tampón de reacción correspondiente, que contiene sales y cofactores necesarios para la actividad enzimática.

La reacción de retrotranscripción se realizó en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.) bajo las siguientes condiciones: una primera incubación a 25 °C durante 10 minutos para favorecer el anillamiento de los cebadores, seguida de una incubación a 50 °C durante 15 minutos para permitir la síntesis de cDNA mediante la acción de la transcriptasa reversa. Finalmente, se llevó a cabo una incubación a 85 °C durante 5 minutos para inactivar la enzima, manteniéndose posteriormente las muestras a 4 °C hasta su utilización inmediata, o su almacenamiento a -80 °C para su posterior uso.

Por otra parte, para el estudio de miRNAs maduros, se empleó el kit de TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Cat. # 4366597, Thermo Fisher, Pittsburgh, EE. UU.). De forma similar, se emplearon 500 ng de cada muestra de ARN (muestras de tejido y cultivo celular) para las reacciones de RT para los microRNAs. No obstante, para aquellos procedentes de EVs, se emplearon únicamente 10 ng siguiendo las recomendaciones del fabricante. A diferencia de la síntesis de cDNA anteriormente mencionada, debido al tamaño reducido de los microRNAs maduros, la retrotranscripción se realizó utilizando cebadores específicos incluidos en los ensayos TaqMan™ MicroRNA Assays de forma independiente para cada uno de los miRNAs a analizar (miR-150-5p, miR-93-3p y U6), añadiendo por consiguiente un paso previo para de hibridación (85 °C por 5 minutos seguido de 60 °C por 5min). Esta adición de cebadores específicos permite aumentar la especificidad de detección mediante un proceso previo de hibridación selectiva con el microRNA diana. Tras el proceso de hibridación, se realizó la RT mediante la adición de tampón de reacción 10X RT Buffer, agua libre de nucleasas, mezcla de dNTPs, inhibidor de RNasas, enzima MultiScribe™ y la transcriptasa reversa.

Materiales y métodos

La reacción de retrotranscripción se realizó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: una incubación inicial a 16 °C durante 30 minutos para favorecer la hibridación de los cebadores *stem-loop* con los microRNAs maduros, seguida de una incubación a 42 °C durante 30 minutos para permitir la síntesis de cDNA mediante la acción de la transcriptasa reversa. Finalmente, las muestras fueron incubadas a 85 °C durante 5 minutos para inactivar la enzima, manteniéndose posteriormente a 4 °C hasta su utilización inmediata o almacenamiento a -80 °

9.3 Sondas y Genes Analizados

Para la cuantificación de los genes y los miRNAs utilizamos sondas específicas (Thermo Fisher (Pittsburgh, EE. UU.), concretamente utilizamos las siguientes. **miR-150-5p** (hsa-miR-150, Cat. # 4427975; ID: 000473), **miR-93-3p** (hsa-miR-93, Cat. # 4427975; ID: 002139), **U6** (U6 snRNA, Cat. # 4427975, ID: 001973), **MIAT** (Mm01196418_g1, Cat. #: 4351372), **HOXA-4** (Mm01335255_g1, Cat. # 4331182), **GSK3β** (Mm00444911_m1, Cat. # 4331182) y **ACTA2** (Hs00426835_g1, Cat. # 4331182).

9.4 Cuantificación y Validación por qPCR

Para la validación de los microRNAs de interés se empleó PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando ensayos TaqMan™ específicos para cada ARN analizado. La amplificación se realizó con el TaqMan™ Universal Master Mix II, sin UNG (Cat. # 4440047, Thermo Fisher, Pittsburgh, EE. UU.). siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Cada reacción se preparó en un volumen final de 10 µL, incluyendo 1,5 µL de cDNA procedente de la retrotranscripción y 8,5 µL de mezcla de reacción compuesta por TaqMan™ Universal Master Mix II, agua libre de nucleasas y el correspondiente TaqMan™ RNA Assay específico para cada ARN, el cual contiene cebadores específicos y una sonda flurogenica marcada que permite la detección específica de los productos de aplicación durante cada ciclo de la PCR.

Las reacciones se realizaron utilizando el sistema QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) del servicio de genética de la Universidad de Alcalá de Henares, empleando las siguientes condiciones de amplificación: una etapa inicial a 50 °C durante 2 minutos para favorecer la activación de los componentes de la reacción, seguida de una desnaturalización inicial a 95 °C

Materiales y métodos

durante 10 minutos para activar la ADN polimerasa y desnaturalizar el cDNA. Posteriormente, se realizaron 40 ciclos de amplificación consistentes en una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y una etapa de alineamiento/extensión a 60 °C durante 1 minuto, registrándose la señal fluorescente en cada ciclo.

La expresión relativa de los ARNs se calculó mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando el correspondiente control de endógeno como referencia para cada condición (U6 para miR-150-5p y miR-93-3p; y ACTA2 para MIAT, HOXA-4 y GSK3 β).

10. EXTRACCIÓN DE EXOSOMAS DE CULTIVO CELULAR Y PLASMA

10.1 Aislamiento de Exosomas a partir de hAMSC

Para analizar los niveles de miRNAs liberados por las hAMSC en distintos contextos experimentales, se procedió al aislamiento de exosomas derivados de cultivos celulares. Los exosomas derivados de hAMSC se aislaron siguiendo un protocolo similar al descrito por Wang y colaboradores en 2021 (X.-Y. Wang et al., 2021):

1. Se cultivaron hAMSC hasta alcanzar un 90% de confluencia.
2. El medio de cultivo fue reemplazado por medio libre de suero (FBS-free DMEM) 24 horas antes del procesamiento.
3. Los exosomas fueron obtenidos del medio condicionado mediante una serie de pasos de centrifugación secuencial:
 - 3.000g durante 10 minutos (Hitachi Centrifuge, Rotor R22A6) para eliminar células en suspensión.
 - 10.000g durante 30 minutos (Hitachi Centrifuge, Rotor R22A6) para descartar residuos celulares y otras vesículas extracelulares.
 - Ultracentrifugación a 100.000g durante 2 horas (Beckman Ultracentrifuge, Rotor 70.1Ti) para la obtención del pellet de exosomas.

Procesamiento de Exosomas para Aplicaciones Posteriores:

Tras la ultracentrifugación, los exosomas fueron resuspendidos en distintas soluciones en función del análisis posterior:

- Medio completo DMEMhg para aplicaciones en cultivo celular.
- QIAzol para extracción de ARN y análisis molecular.
- Buffer RIPA para aislamiento y análisis de proteínas.
- PBS para caracterización por NanoSight LM10 y administración *in vivo*.

Como control celular, se aislaron exosomas a partir de células NIH/3T3 empleando el mismo protocolo.

10.2 Aislamiento de Exosomas a partir de Plasma de Ratón

El procedimiento para la obtención de exosomas a partir de muestras de plasma murino se basó en el protocolo de ultracentrifugación diferencial descrito anteriormente, incorporando una fase de filtración clarificadora intermedia previa al ciclo de

ultracentrifugación final. Para ello, se emplearon membranas de polietersulfona de 0,22 μm (Millipore Express®) con el objetivo de excluir selectivamente microvesículas de gran tamaño y detritos celulares, incrementando así la pureza de la fracción exosomal.

10.3 Validación y Caracterización de Exosomas

La validación de los exosomas aislados se realizó utilizando el sistema NanoSight LM10 (Malvern Panalytical) de análisis de nanopartículas a partir de su movimiento browniano, en la Unidad de Imagen Molecular e Inmunohistoquímica del Instituto para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz, el cual permitió determinar el tamaño, concentración y distribución de partículas en suspensión, además de la realización de inmunoblot de un panel de marcadores exosomas (calnexina, CD9, CD63, CD81, HSP70 y TSG101) (Cat. # ab275018, Abcam, Cambridge, Reino Unido; Cat. # ab275018) (ver apartado 10.4.2).

10.4 Análisis Proteico

10.4.1 Obtención, cuantificación y preparación de extractos proteicos

Los lisados proteicos se obtuvieron a partir de células en cultivo, muestras tisulares y exosomas mediante lisis con tampón Pierce® RIPA (Thermo Fisher Scientific), cuya composición incluía NaCl (1,5 M), ácido desoxicolico (2,5%), Nonidet P40 (10%), Tris-HCl (0,5 M) y EDTA (10 mM). El tampón se suplementó con inhibidores de proteasas (complete Mini, Roche) y de fosfatasa (PhosSTOP EASYpack, Roche).

Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en agitación y posteriormente se centrifugaron a 1000×g durante 10 minutos. El sobrenadante, que contenía las proteínas solubles, se recuperó y la concentración proteica se determinó mediante Nanodrop utilizando el ensayo colorimétrico BCA (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

10.4.2 Detección y análisis de proteínas por inmunoblot

La detección y caracterización de proteínas se realizó mediante inmunoblot (Western blot). Para la caracterización de exosomas se empleó el Panel de exosomas (*Exosome Panel* en inglés) que contiene anticuerpos para las proteínas calnexina, CD9, CD63, CD81, HSP70 y TSG101 (Abcam, Cambridge, Reino Unido; Cat. # ab275018), siguiendo las recomendaciones de uso del fabricante. Se prepararon 20 μg de extracto

Materiales y métodos

proteico total mezclados con tampón de carga Laemmli 1x y β -mercaptoetanol, incubándose posteriormente durante 5 minutos a 95 °C para favorecer la desnaturalización y reducción de las proteínas. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, de concentración variable de acrilamida en función del tamaño de las proteínas a detectar) utilizando un tampón Tris Glicina 1x y SDS 20 %. Estas se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF), mediante un sistema de transferencia semiseca utilizando el equipo Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad), empleando tampón de transferencia Tris-Glicina (1x) con metanol (20%). Posteriormente, las membranas se bloquearon con BSA al 3 % en tampón T-TBS (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,4) durante una hora a temperatura ambiente, y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (calnexina, CD9, CD63, CD81, HSP70 y TSG101), diluidos 1:500, durante 16 horas a 4 °C, en agitación.

Tras lavar las membranas tres veces con tampón con T-TBS para eliminar el exceso de anticuerpo no unido, las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y agitación con los correspondientes anticuerpos secundarios (Goat anti-rabbit IgG) conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés *Horse Radish Peroxidase*), diluidos a una concentración 1:3000 en BSA al 1,5 %. Finalizado el periodo de incubación con los anticuerpos secundarios, se realizaron tres lavados con T-TBS, seguido de la eliminación de humedad de las membranas para su consiguiente revelado. La detección de la señal quimioluminiscente de las proteínas se realizó utilizando un sistema de imagen *Fusion Solo S* (Vilber Lourmat, Collégien, Francia), tras incubación con sustrato de quimioluminiscencia (ECL, del inglés *Enhanced Chemiluminescence*) (Thermo Fisher Scientific). Las imágenes obtenidas mediante el software Fusion-Capt fueron analizadas mediante el software ImageJ.

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la detección de marcadores exosomales.

ANTICUERPO	REACTIVIDAD	ORIGEN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILU-CIÓN
CD9	Proteína de membrana (tetraspanina, exosomas)	Conejo (Rabbit) (monoclonal recombinante)	Abcam	ab275018 (panel)	1:500
CD63	Proteína endosomal/lisosomal (exosomas)	Conejo (Rabbit) (monoclonal recombinante)	Abcam	ab275018 (panel)	1:500
CD81	Proteína de membrana (tetraspanina, exosomas)	Conejo (Rabbit) (monoclonal recombinante)	Abcam	ab275018 (panel)	1:500
HSP70	Proteína chaperona (carga exosomal)	Conejo (Rabbit) (monoclonal recombinante)	Abcam	ab275018 (panel)	1:500
TSG101	Proteína del sistema ESCRT (biogénesis exosomal)	Conejo (Rabbit) (monoclonal recombinante)	Abcam	ab275018 (panel)	1:500
Calnexina	Proteína del retículo endoplasmático (control negativo)	Conejo (Rabbit) (monoclonal recombinante)	Abcam	ab275018 (panel)	1:500
Goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP	Anticuerpo secundario (detección quimioluminiscente)	Cabra (Goat) (policlonal)	Abcam	ab97051	1:3000

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico SPSS v22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Los resultados se expresaron como media $\pm$ desviación estándar de las muestras. La n correspondió a réplicas biológicas independientes (animales individuales en los estudios *in vivo* o cultivos celulares independientes en los experimentos *in vitro*). Las réplicas técnicas se emplearon únicamente para validar las determinaciones analíticas y no se consideraron observaciones independientes en el análisis estadístico. El nivel de significación estadística se estableció en un 5 % ($p < 0,05$).

Para las comparaciones frente a un control común se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba t de Dunnett como comparación post hoc. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con un valor de $p < 0,05$ en todos los análisis realizados.

RESULTADOS

1. LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE PLACENTA HUMANA INDUCEN PROTECCIÓN CARDÍACA EN RATONES SOMETIDOS A ISQUEMIA/REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA

Resumen:

1. En un modelo murino de isquemia/reperfusión (I/R) miocárdica, el tratamiento con células madre mesenquimales derivadas de la membrana amniótica de placenta humana (hAMSC) administrado a los 2, 7 y 14 días post-I/R mejora significativamente la función sistólica cardíaca, evidenciada por un aumento de la fracción de eyección y de la fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo, en comparación con los grupos tratados con PBS o con células NIH/3T3.
2. En este mismo modelo murino de I/R miocárdica, la administración de hAMSC reduce de forma significativa el daño tisular cardíaco, disminuyendo tanto la necrosis como la fibrosis miocárdica, en comparación con los tratamientos control con PBS o células NIH/3T3.
3. La administración temprana de hAMSC en ratones sometidos a I/R miocárdica (día 2 post-I/R) muestra una mayor eficacia funcional y estructural del miocardio en comparación con su administración en fases más tardías del proceso de remodelado cardíaco (días 7 y 14 post-I/R).

1.1 Modelo murino de isquemia/reperfusión miocárdica como modelo de infarto agudo de miocardio

El modelo de isquemia/reperfusión (I/R) en ratón constituye una herramienta experimental ampliamente validada para el estudio de estrategias terapéuticas y mecanismos moleculares en un proceso de infarto agudo de miocardio (IAM) (Cuadrado et al, 2016). El modelo de IAM se induce mediante la oclusión transitoria de la arteria coronaria descendente anterior seguida de su posterior reperfusión, lo que permite evaluar tanto el daño agudo como los procesos de remodelado ventricular descritos previamente en la introducción (apartado 1.3).

Resultados

En la presente Tesis Doctoral se llevaron a cabo los procedimientos quirúrgicos descritos en el apartado 2 de Materiales y Métodos, estableciendo un modelo experimental representativo de I/R miocárdica. Dicho modelo fue empleado para evaluar el efecto de las células madre mesenquimales derivadas de la membrana amniótica humana (hAMSC) en la cardioprotección.

1.2 Efecto del tratamiento con hAMSC en la función cardíaca tras isquemia/reperfusión en ratón

1.2.1 Las hAMSC mejoran la función cardíaca postinfarto en el modelo de I/R

El primer objetivo fue analizar el efecto de las hAMSC en la evolución funcional y estructural del miocardio tras un episodio de I/R. Para ello, los animales se distribuyeron en cinco grupos experimentales según el tratamiento recibido. Los animales tratados con hAMSC se subdividieron en tres cohortes independientes en función del momento de administración intravenosa de una única dosis de 2×10^5 células, a los 2 días (hAMSC 2D), 7 días (hAMSC 7D) y 14 días (hAMSC 14D) post-I/R. Como controles se emplearon ratones sometidos a I/R tratados con PBS, utilizado como vehículo de resuspensión, o células NIH/3T3, control celular no terapéutico (Figura 22A).

Los tiempos de administración (2, 7 y 14 días post-I/R) se seleccionaron para intervenir en fases diferenciadas del proceso de remodelado postisquémico, previamente descrito (véase apartado 1.3, Introducción). El día 2 se corresponde con la fase inflamatoria aguda; en el día 7 comienza la fase reparativa, mientras que el día 14 se corresponde con una etapa más avanzada de maduración de la cicatriz. Este diseño permitió evaluar la eficacia de las hAMSC en distintos contextos de la fisiopatología del IAM.

Tras la intervención y posterior administración intravenosa con las hAMSC en ratones sometidos a I/R se evaluaron 10 parámetros de función cardíaca (véase apartado 5, *Materiales y Métodos*). El análisis comparativo de estos indicadores evidenció que dos de ellos, la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) y la fracción de acortamiento (FS, por sus siglas en inglés, *Fractional Shortening*), presentaron una recuperación significativa al comparar los animales I/R tratados con hAMSC con los controles (Figuras 21B-C y Tabla 5).

Resultados

La FEVI corresponde con el porcentaje de volumen de sangre eyectado por el ventrículo izquierdo en cada contracción, y constituye un marcador fundamental de la función sistólica (Mayo Clinic & Mayo Foundation for Medical Education and Research, 2025).

La FS, se calcula como el porcentaje de acortamiento de la cavidad ventricular en sístole respecto a su dimensión en diástole, siendo un indicador clave de la contractilidad miocárdica (Maurer & Packer, 2020).

En particular, el tratamiento con hAMSC 2D (punto de tiempo correspondiente a la inyección intravenosa de las células tras dos días de reperfusión) indujo aumentos significativos en la FEVI a los 7, 14 y 21 días post-I/R. De manera similar, el tratamiento con hAMSC 7D mostró incrementos significativos en la FEVI a los 14 y 21 días post-I/R. Por su parte, el grupo tratado con hAMSC 14D presentó igualmente un aumento significativo en la FEVI a los 21 días post-I/R (Figura 22B, Tabla 5).

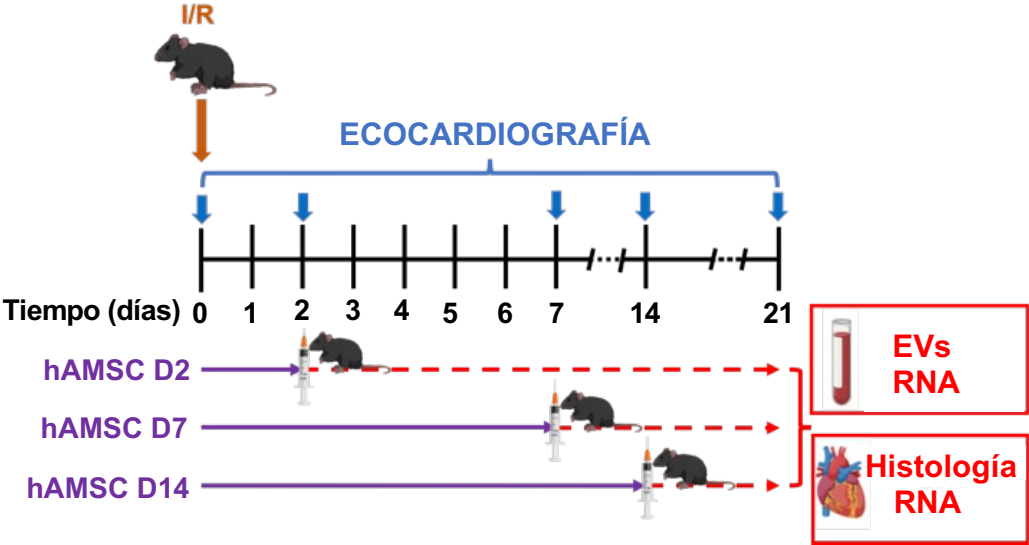
En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto un marcado efecto cardioprotector del tratamiento con hAMSC, capaz no solo de revertir el deterioro funcional inducido por la isquemia-y posterior reperfusión miocárdica, sino también de restaurar la función ventricular izquierda hasta valores próximos similares a los animales sin infartar. En este sentido, la recuperación de la fracción de eyección observada tras el tratamiento con hAMSC adquiere especial relevancia si se considera que, en condiciones fisiológicas, la FEVI en ratón se sitúa en el rango del 60–80 % (Lindsey et al., 2018).

De la misma manera, los resultados obtenidos mostraron de manera consistente una mejora significativa de la FS tras la administración de hAMSC en comparación con los valores registrados en los animales de los grupos control (Figura 22C). En el caso de los tratamientos hAMSC 2D y hAMSC 7D, el seguimiento extendido reveló no solo el mantenimiento del efecto terapéutico, sino una mejora progresiva a lo largo del tiempo (Figura 22C, Tabla 5). Así, el tratamiento con hAMSC 2D se asoció con incrementos significativos de la FS a los 7, 14 y 21 días post-I/R. De manera análoga, el tratamiento con hAMSC 7D indujo aumentos significativos de la FS a los 14 y 21 días tras la I/R. Finalmente, en el grupo tratado con hAMSC 14D también se observaron diferencias significativas en la FS a los 21 días post-I/R (Figura 22C, Tabla 5). Al igual que la FEVI, la mejora de la FS observada tras el tratamiento con hAMSC resulta especialmente significativa al considerar que, en condiciones fisiológicas, la FS en modelos murinos se sitúa en torno al 30 % (Vinhas et al., 2013). Es importante destacar que los animales tratados con PBS o NIH/3T3 no mostraron ninguna mejora significativa en ninguno de los parámetros estudiados (Figura 22, Tabla 5).

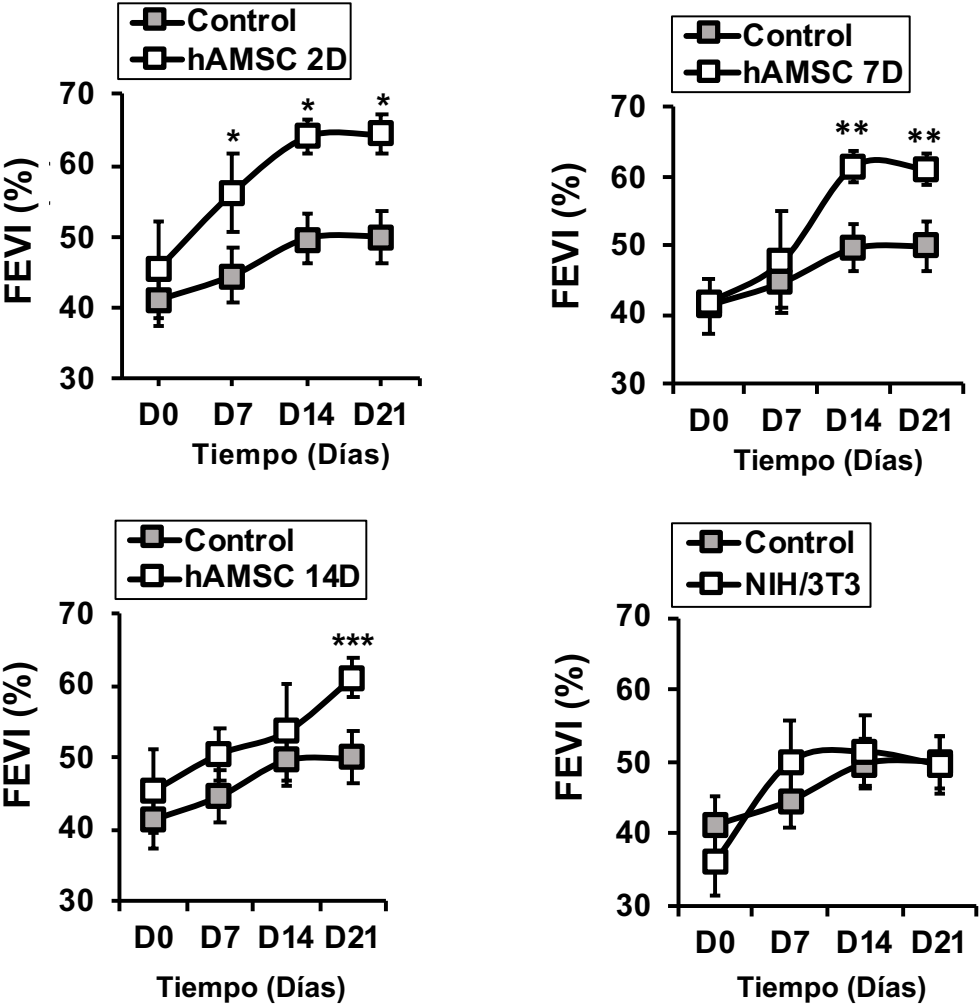
Resultados

En conclusión, el tratamiento intravenoso con hAMSC induce una recuperación funcional significativa y sostenida del ventrículo izquierdo en un modelo murino de I/R miocárdica. La mejora consistente de la FEVI y FS frente a los controles confirma un efecto cardioprotector específico de las hAMSC. Este beneficio se observa en distintos momentos del remodelado postisquémico, si bien la administración temprana tras el daño isquémico se asocia con una mayor magnitud del efecto, lo que podría sugerir la existencia de una ventana terapéutica óptima.

A



B



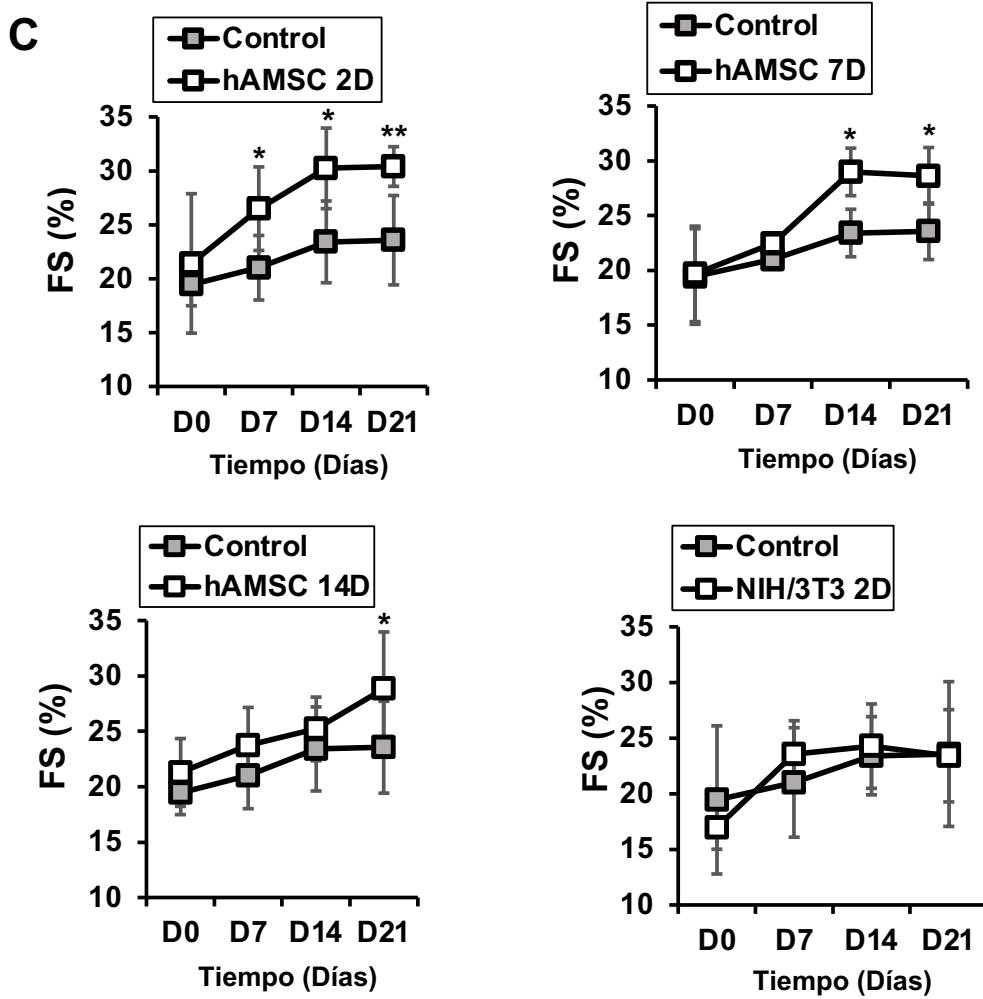


Figura 22. Las hAMSC inducen protección cardíaca en ratones sometidos a I/R.

Representación esquemática del procedimiento experimental (A). Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) a los 0, 7, 14 y 21 días tras I/R en ratones tratados con 2×10^5 hAMSC administradas en los días 2 (panel superior izquierdo), 7 (panel superior derecho) y 14 (panel inferior izquierdo) post-infarto, y en ratones inyectados con fibroblastos NIH/3T3 como control negativo (panel inferior derecho). N=10 ratones/punto temporal. Media $\pm$ DE. Ratones inyectados en D2 post-I/R: * $p < 0,001$ D0 vs D7, D14, D21. Ratones inyectados en D7 post-I/R: ** $p < 0,01$ D0 vs D14, D21. Ratones inyectados en D14 post-I/R: ** $p < 0,01$ D0 vs D21 (B). Fracción de acortamiento (FS) en los mismos grupos. Ratones inyectados en D2 post-I/R: * $p < 0,01$ D0 vs D7, D14; ** $p < 0,02$ D0 vs D21. Ratones inyectados en D7 post-I/R: * $p < 0,01$ D0 vs D14, D21. Ratones inyectados en D14 post-I/R: * $p < 0,01$ D0 vs D21 (C).

Resultados

Tabla 5. Parámetros ecocardiográficos de la estructura y función del ventrículo izquierdo (dimensiones ventriculares [LVIDD, LVIDS, LVPWD, LVPWDS, IVSD y IVSS], función sistólica [FEVI] y fracción de acortamiento [FS], parámetros hemodinámicos [HR y CO]) en los distintos grupos experimentales a diferentes tiempos tras isquemia/reperfusión miocárdica.

PANEL 1

D0 POST I/R

PARÁMETROS	CONTROL	NIH/3T3	hAMSC 2D	hAMSC 7D	hAMSC 14D	EVs-hAMSC 2D	PARÁMETROS
IVSD (mm)	0.748 ± 0.150	0.834 ± 0.109	0.770 ± 0.292	0.737 ± 0.074	0.800 ± 0.148	0.792 ± 0.138	IVSD (mm)
LVIDD (mm)	4.135 ± 0.642	3.957 ± 0.367	3.906 ± 0.742	4.090 ± 0.115	4.233 ± 0.355	3.944 ± 0.476	LVIDD (mm)
LVPWD (mm)	1.043 ± 0.381	1.030 ± 0.236	1.169 ± 0.393	0.888 ± 0.135	0.944 ± 0.206	1.152 ± 0.358	LVPWD (mm)
IVSS (mm)	0.970 ± 0.187	1.097 ± 0.159	0.934 ± 0.332	0.853 ± 0.135	1.040 ± 0.137	1.015 ± 0.171	IVSS (mm)
LVIDS (mm)	3.367 ± 0.776	2.900 ± 0.358	2.769 ± 0.999	3.146 ± 0.392	3.298 ± 0.366	3.211 ± 0.609	LVIDS (mm)
LVPWS (mm)	1.105 ± 0.531	1.270 ± 0.175	1.372 ± 0.588	1.064 ± 0.208	1.111 ± 0.205	1.221 ± 0.276	LVPWS (mm)
FEVI (%)	41.250 ± 3.955	36.000 ± 4.583	45.430 ± 6.800	41.750 ± 1.500	45.167 ± 5.845	41.75 ± 1.500	FEVI (%)
FS (%)	19.442 ± 1.959	16.967 ± 6.658	21.412 ± 6.468	19.678 ± 4.359	21.288 ± 3.061	20.337 ± 2.484	FS (%)
HR (bpm)	370.667 ± 54.375	425.333 ± 22.501	364.625 ± 110.916	386.000 ± 128.693	378.833 ± 70.884	392.114 ± 67.820	HR (bpm)
CO (mL/sec)	53.328 ± 25.200	69.774 ± 20.672	66.140 ± 21.005	61.194 ± 16.567	74.269 ± 30.658	64.829 ± 19.744	CO (mL/sec)

PANEL 2

D7 POST I/R

PARÁMETROS	CONTROL	NIH/3T3	hAMSC 2D	hAMSC 7D	hAMSC 14D	EVs-hAMSC 2D	PARÁMETROS
IVSD (mm)	0.797 ± 0.293	0.850 ± 0.219	0.819 ± 0.236	0.685 ± 0.174	0.850 ± 0.035	0.973 ± 0.429	IVSD (mm)
LVIDD (mm)	4.422 ± 0.984	4.193 ± 0.738	3.855 ± 1.253	4.436 ± 0.516	4.310 ± 0.315	3.913 ± 1.155	LVIDD (mm)
LVPWD (mm)	0.863 ± 0.249	0.990 ± 0.148	0.979 ± 0.257	0.857 ± 0.171	0.883 ± 0.189	1.007 ± 0.394	LVPWD (mm)
IVSS (mm)	1.235 ± 0.554	1.134 ± 0.070	1.171 ± 0.297	0.923 ± 0.070	1.065 ± 0.298	1.210 ± 0.096	IVSS (mm)
LVIDS (mm)	3.575 ± 0.431	3.956 ± 0.870	3.178 ± 0.387	3.800 ± 0.640	3.640 ± 0.568	3.383 ± 0.372	LVIDS (mm)
LVPWS (mm)	0.918 ± 0.356	1.087 ± 0.233	1.094 ± 0.366	0.942 ± 0.170	0.937 ± 0.179	1.033 ± 0.337	LVPWS (mm)
FEVI (%)	44.580 ± 3.730	50.0 ± 5.657	56.200 ± 5.650 ****	47.667 ± 7.371	50.400 ± 3.650	51.000 ± 6.083	FEVI (%)
FS (%)	21.011 ± 2.994	23.566 ± 4.919	26.488 ± 3.875 **	22.466 ± 0.816	23.754 ± 3.403	22.000 ± 2.646	FS (%)
HR (bpm)	396.750 ± 71.386	440.333 ± 18.475	382.375 ± 119.378	392.000 ± 58.988	450.250 ± 25.966	332.333 ± 56.722	HR (bpm)
CO (mL/sec)	47.915 ± 26.699	44.847 ± 17.624	42.951 ± 13.389	61.090 ± 14.208	63.935 ± 26.918	46.877 ± 23.118	CO (mL/sec)

****P<0,001 FEVI Control vs hAMSC 2D, **p<0,01 FS Control vs hAMSC

Resultados

PANEL 3

D14 POST I/R

PARAMETER	CONTROL	NIH/3T3	hAMSC 2D	hAMSC 7D	hAMSC 14D	EVs-hAMSC 2D	PARAMETER
IVSD (mm)	0.915 ± 0.274	0.890 ± 0.062	0.913 ± 0.336	0.852 ± 0.121	0.867 ± 0.196	0.967 ± 0.351	IVSD (mm)
LVIDD (mm)	4.520 ± 0.536	4.230 ± 0.759	4.233 ± 0.555	4.590 ± 0.772	4.700 ± 0.709	4.137 ± 0.423	LVIDD (mm)
LVPWD (mm)	0.830 ± 0.400	0.892 ± 0.250	0.895 ± 0.254	0.798 ± 0.151	0.850 ± 0.092	0.867 ± 0.134	LVPWD (mm)
IVSS (mm)	1.253 ± 0.330	1.280 ± 0.248	1.328 ± 0.289	1.162 ± 0.195	1.190 ± 0.323	1.333 ± 0.438	IVSS (mm)
LVIDS (mm)	3.438 ± 0.578	3.217 ± 0.709	3.145 ± 0.716	3.257 ± 0.236	3.387 ± 0.387	3.070 ± 1.007	LVIDS (mm)
LVPWS (mm)	0.888 ± 0.240	0.970 ± 0.246	0.917 ± 0.312	0.843 ± 0.064	0.905 ± 0.304	0.927 ± 0.107	LVPWS (mm)
FEVI (%)	49.670 ± 3.500	51.500 ± 4.949	64.140 ± 2.270 ****	61.500 ± 2.380 ****	53.500 ± 6.661	57.333 ± 2.517 *	FEVI (%)
FS (%)	23.410 ± 3.794	24.273 ± 3.512	30.230 ± 3.739 **	28.986 ± 2.168 *	25.216 ± 2.876	25.667 ± 2.082	FS (%)
HR (bpm)	401.167 ± 95.315	444.333 ± 84.311	396.900 ± 64.518	452.200 ± 62.271	468.333 ± 100.580	349.667 ± 58.0718	HR (bpm)
CO (mL/sec)	44.942 ± 25.056	40.560 ± 14.105	38.323 ± 24.724	48.250 ± 18.439	47.605 ± 7.146	41.897 ± 14.143	CO (mL/sec)

****P<0,001 FEVI Control vs hAMSC 2D, hAMSC 7D; *p<0,03 FEVI Control vs hAMSC 7D **p<0,01 FS Control vs hAMSC 2D; *p<0,03 FS Control vs hAMSC 7D.

PANEL 4

D21 POST I/R

PARAMETER	CONTROL	NIH/3T3	hAMSC 2D	hAMSC 7D	hAMSC 14D	EVs-hAMSC 2D	PARAMETER
IVSD (mm)	0.923 ± 0.206	0.900 ± 0.165	0.976 ± 0.202	0.857 ± 0.140	0.921 ± 0.161	0.793 ± 0.216	IVSD (mm)
LVIDD (mm)	4.638 ± 0.757	4.922 ± 0.788	4.538 ± 0.580	4.782 ± 0.367	4.669 ± 0.586	4.567 ± 0.576	LVIDD (mm)
LVPWD (mm)	0.703 ± 0.276	0.797 ± 0.133	0.720 ± 0.177	0.685 ± 0.192	0.822 ± 0.178	0.770 ± 0.110	LVPWD (mm)
IVSS (mm)	1.278 ± 0.447	1.320 ± 0.209	1.641 ± 0.347	1.264 ± 0.224	1.333 ± 0.388	1.353 ± 0.649	IVSS (mm)
LVIDS (mm)	3.367 ± 0.776	2.900 ± 0.358	2.769 ± 0.999	3.146 ± 0.392	3.298 ± 0.366	3.023 ± 0.260	LVIDS (mm)
LVPWS (mm)	0.783 ± 0.192	0.880 ± 0.252	0.724 ± 0.176	0.730 ± 0.082	0.825 ± 0.110	0.877 ± 0.215	LVPWS (mm)
FEVI (%)	50.000 ± 3.560	49.667 ± 4.041	64.500 ± 2.718 ****	60.750 ± 7.371 ****	61.200 ± 3.421 ****	58.667 ± 6.351 **	FEVI (%)
FS (%)	23.566 ± 4.147	23.409 ± 6.506	30.400 ± 1.838 ***	28.633 ± 2.582 *	28.845 ± 5.127	26.667 ± 4.619	FS (%)
HR (bpm)	432.000 ± 69.120	502.800 ± 68.064	431.273 ± 44.439	469.750 ± 21.329	477.000 ± 31.943	394.667 ± 33.828	HR (bpm)
CO (mL/sec)	31.499 ± 10.813	34.927 ± 5.372	27.276 ± 16.430	31.010 ± 6.774	33.267 ± 12.083	27.070 ± 14.142	CO (mL/sec)

****P<0,001 FEVI Control vs hAMSC 2D, hAMSC 7D, hAMSC 14D; **p<0,01 FEVI Control vs hAMSC 2D EVs-hAMSC 2D; ***p<0,01 FS Control vs hAMSC 2D; *p<0,03 FS Control vs hAMSC 7D, hAMSC 14D

1.2.2 El tratamiento con hAMSC promueve la recuperación estructural del miocardio tras isquemia/reperfusión

El análisis histológico confirmó que la mejora funcional observada tras el tratamiento con hAMSC se acompañó de una recuperación estructural del tejido cardíaco post-I/R, evaluada mediante tinción con hematoxilina-eosina (H&E) tras los 21 posteriores al procedimiento de I/R (Figura 23A). En concreto, el análisis de las secciones histológicas reveló una reducción significativa del tejido dañado en los grupos tratados con hAMSC,

Resultados

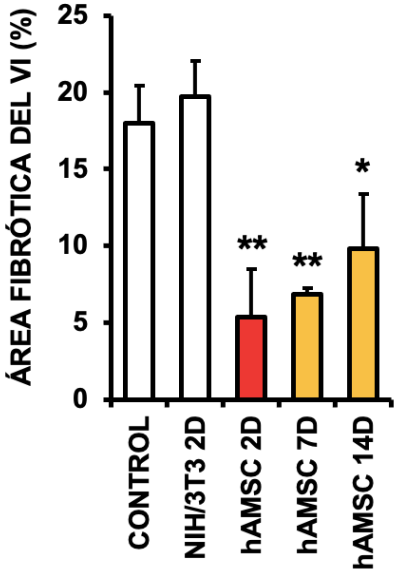
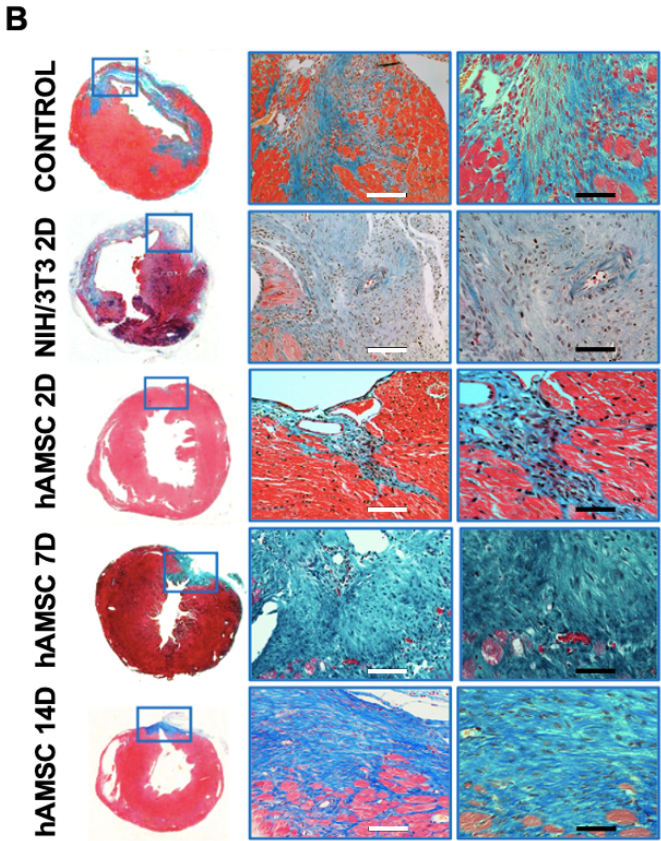
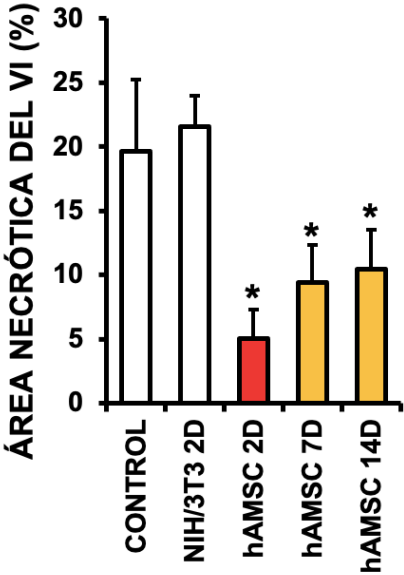
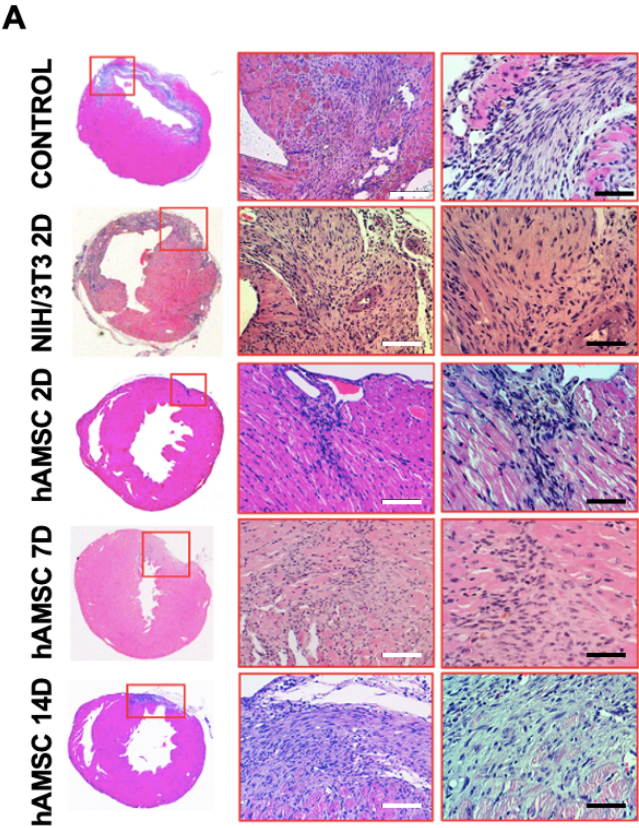
para los tratamientos hAMSC 2D, hAMSC 7D y hAMSC 14D, en comparación con el grupo control ($19,621 \pm 5,657$ %) y el grupo NIH/3T3 ($21,581 \pm 2,412$ %) (Figura 23A, panel inferior).

De la misma manera, se empleó la tinción con Tricrómico de Masson (TM), para identificar y cuantificar áreas fibróticas (véase apartado 6.1, *Materiales y Métodos*), visualizadas como áreas teñidas en azul correspondientes a la deposición de fibras de colágeno. La cuantificación de estas áreas mostró una reducción significativa del tejido fibrótico en los tres tiempos de tratamiento con hAMSC, en los grupos hAMSC 2D, hAMSC 7D y hAMSC 14D, respectivamente, en comparación con el grupo control tratado con PBS y el grupo NIH/3T3 (Figura 23B, panel inferior).

1.2.3 Las hAMSC limitan la extensión del daño necrótico en fases tempranas tras I/R miocárdica

Con el objetivo de evaluar si el tratamiento con las hAMSC es capaz de limitar la extensión del daño necrótico en fases tempranas tras la I/R miocárdica, se determinó el área de riesgo y el tamaño del infarto mediante una tinción combinada con azul de Evans y cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) en secciones transversales cardíacas, analizadas a los 5 días post-I/R. Este punto temporal permite una delimitación precisa del tejido necrótico irreversible, minimizando la interferencia de procesos de remodelado tardío. Para este análisis, se utilizó un grupo independiente de animales que recibió el tratamiento temprano con hAMSC a los dos días post reperusión (hAMSC 2D). Los resultados evidenciaron una reducción significativa del tamaño del infarto, definido como el área TTC negativa (región blanquecina), en comparación con el grupo control, lo que indica que la administración temprana de hAMSC limita de forma eficaz la extensión del daño necrótico inducido por la I/R (Figura 23C-D).

En conjunto, el análisis de los resultados obtenidos indica que la intervención con las hAMSC resultó eficaz en los tres tiempos analizados, promoviendo la preservación de la integridad tisular y una evolución favorable del remodelado fibrótico post infarto. Adicionalmente, cabe destacar que la administración temprana de hAMSC, a los dos días tras la reperusión resultó ser la que mostró una mayor eficacia en la conservación de la arquitectura miocárdica evidenciándose además una limitación de la extensión del daño necrótico en fases tempranas.



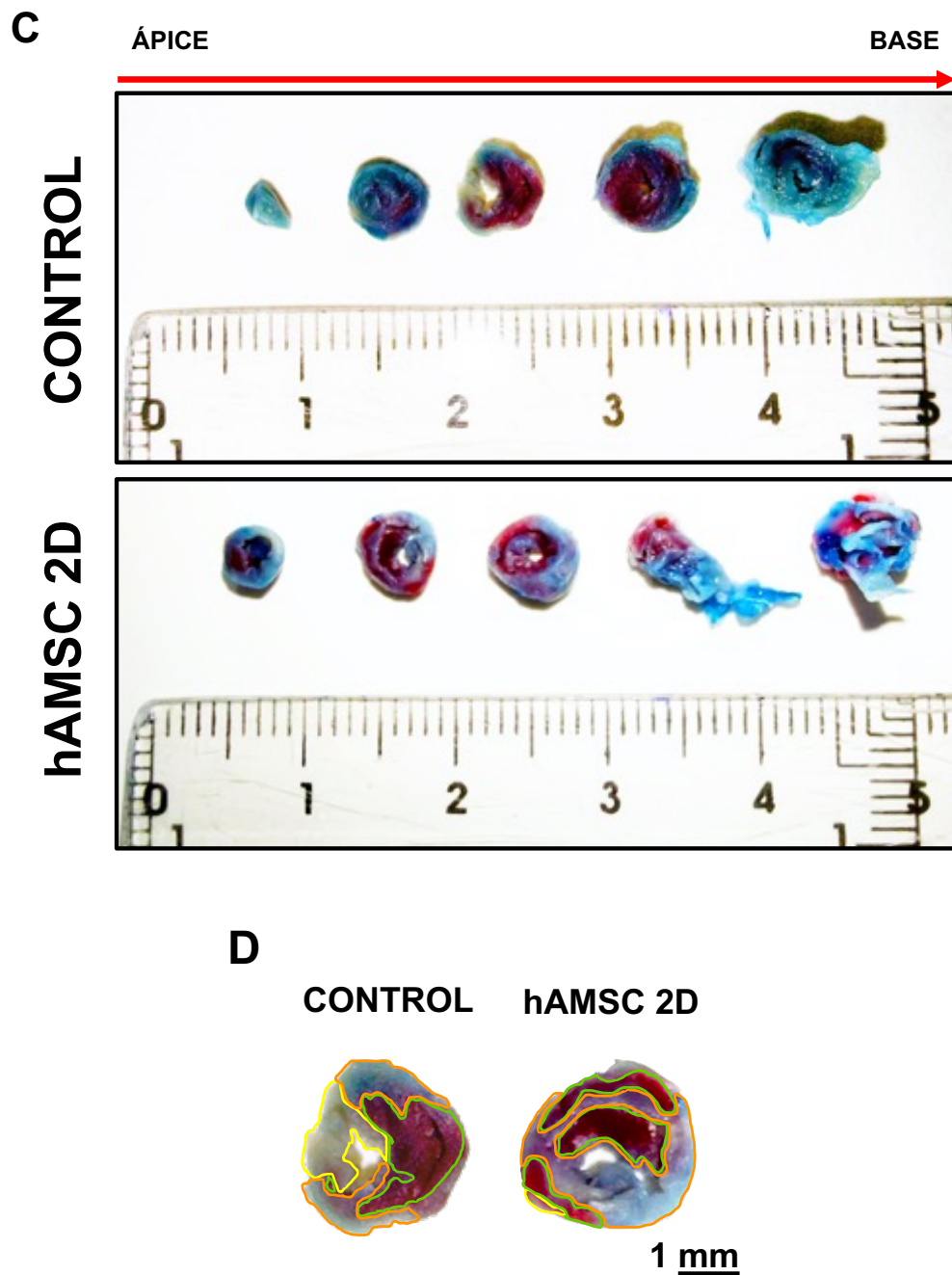


Figura 23. Las hAMSC reducen la necrosis y fibrosis cardíaca en corazones de ratones sometidos a I/R a los 21 días. Imágenes de microscopía de campo claro de secciones cardíacas obtenidas 21 días tras I/R, en ratones inyectados con NIH/3T3 o hAMSC en los tiempos indicados tras la reperfusión, teñidas con Hematoxilina/Eosina (A) y Tricrómico de Masson (B). N=5 ratones/grupo. Media $\pm$ DE. * $p < 0,001$ Control vs hAMSC 2D, ** $p < 0,02$, hAMSC 7D, hAMSC 14D. Barras de escala = 200 μ m (línea blanca), 100 μ m (línea negra). Tinción con azul de Evans/TTC de secciones de corazón de ratón (desde el ápice hasta la base) tras 5 días de I/R, tejido sano (azul), área en riesgo (rojo) y área necrótica (blanquecino) (C, D). Áreas delimitadas de infarto (líneas amarillas), riesgo (líneas verdes) y sanas (líneas naranjas) (D).

2. LA CARDIOPROTECCIÓN INDUCIDA POR LAS hAMSC ES INDEPENDIENTE DE SU ANIDAMIENTO MIOCÁRDICO

Resumen:

El análisis mediante el marcador SSEA-4, específico de células humanas, así como el rastreo de una línea celular hAMSC-GFP, no evidenciaron ni la presencia ni el anidamiento de estas células en el tejido cardíaco tras el tratamiento.

Con el fin de determinar si las hAMSC ejercen sus efectos cardioprotectores mediante su anidamiento en el tejido cardíaco, se analizaron los corazones de ratones sometidos a I/R y posteriormente tratados con hAMSC a los dos días post-I/R, mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHC) e inmunofluorescencia (IF).

2.1 Las hAMSC no muestran un patrón de anidamiento en el miocardio mediante tinción inmunohistoquímica con marcadores celulares específicos

Con el propósito de evaluar el anidamiento de las células hAMSC en el tejido cardíaco se procedió al análisis de la presencia del marcador SSEA-4, específico de células humanas (ver Métodos para los detalles), mediante técnicas de inmunohistoquímica. Las secciones cardíacas de los corazones, obtenidas tras los 21 días post-I/R, mostraron una detección residual de células positivas para SSEA-4, (1–2 células SSEA-4⁺ en todo el corte transversal del tejido cardíaco), lo que sugiere la ausencia de anidamiento relevante en el tejido miocárdico (Figura 24A).

2.2 Las hAMSC no muestran un patrón de anidamiento en el miocardio mediante detección inmunofluorescente

Con el objetivo de descartar la posibilidad de que las hAMSC hubiesen perdido la expresión de SSEA-4 tras diferenciarse en el tejido receptor, se generó una línea celular estable de hAMSC transducidas con un vector lentiviral que expresa de manera constitutiva la proteína verde fluorescente (GFP) (denominadas hAMSC-GFP), (véase apartado 6.4, *Materiales y Métodos*).

Resultados

Este sistema permitió el rastreo *in vivo* de las células administradas, independientemente de cambios en su fenotipo o pérdida de marcadores de multipotencia. Las hAMSC-GFP fueron administradas por vía intravenosa en ratones sometidos a I/R a los dos días de la reperusión y los corazones se analizaron mediante inmunofluorescencia tras los 21 días posteriores al procedimiento, no detectando señales positivas de GFP en ninguna de las secciones de los corazones estudiados (Figura 24B-C), lo que confirma la ausencia de un anidamiento significativo de las hAMSC en el miocardio.

En conjunto, estos resultados sugieren que la mejora funcional y estructural observada tras la administración de hAMSC no depende de su anidamiento en el tejido cardíaco, sino que probablemente se deba a mecanismos de acción paracrina, como es la secreción de vesículas extracelulares y factores bioactivos que modulan la inflamación y el remodelado, tal como se discute en la literatura.

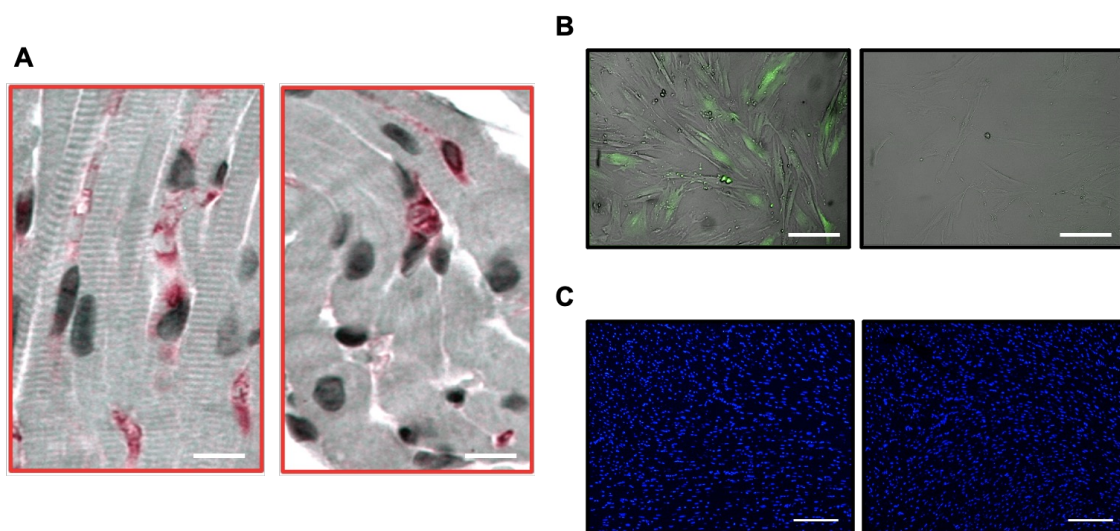


Figura 24. No se detecta anidamiento de las hAMSC en corazones de ratón tras I/R. Detección inmunohistoquímica de SSEA-4, marcador específico de hAMSC, en corazones de ratones 21 días después de I/R (A). Detección por inmunofluorescencia de hAMSC transducidas con vector lentiviral para expresión de GFP (izquierda) o con vector vacío como control (derecha) (B). Detección por inmunofluorescencia de hAMSC-GFP (izquierda) y control (derecha) en cortes transversales de corazones de ratón 21 días tras I/R. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (DAPI) (C). Barras de escala = 100 μ m.

3. LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE hAMSC CONFIEREN PROTECCIÓN CARDÍACA TRAS LA I/R

Resumen:

El tratamiento con EVs aisladas de hAMSC replica los efectos de las hAMSC sobre la FEVI en el modelo murino de I/R miocárdica.

Con el propósito de determinar si los efectos beneficiosos observados tras la administración de las hAMSC en el modelo murino de I/R miocárdica podían ser mediados por mecanismos paracrin, se evaluó el papel de las vesículas extracelulares (EVs) secretadas por estas células, sobre los parámetros funcionales de los corazones infartados.

3.1 Aislamiento y validación de las EVs derivadas de hAMSC, NIH/3T3 y plasma de ratón

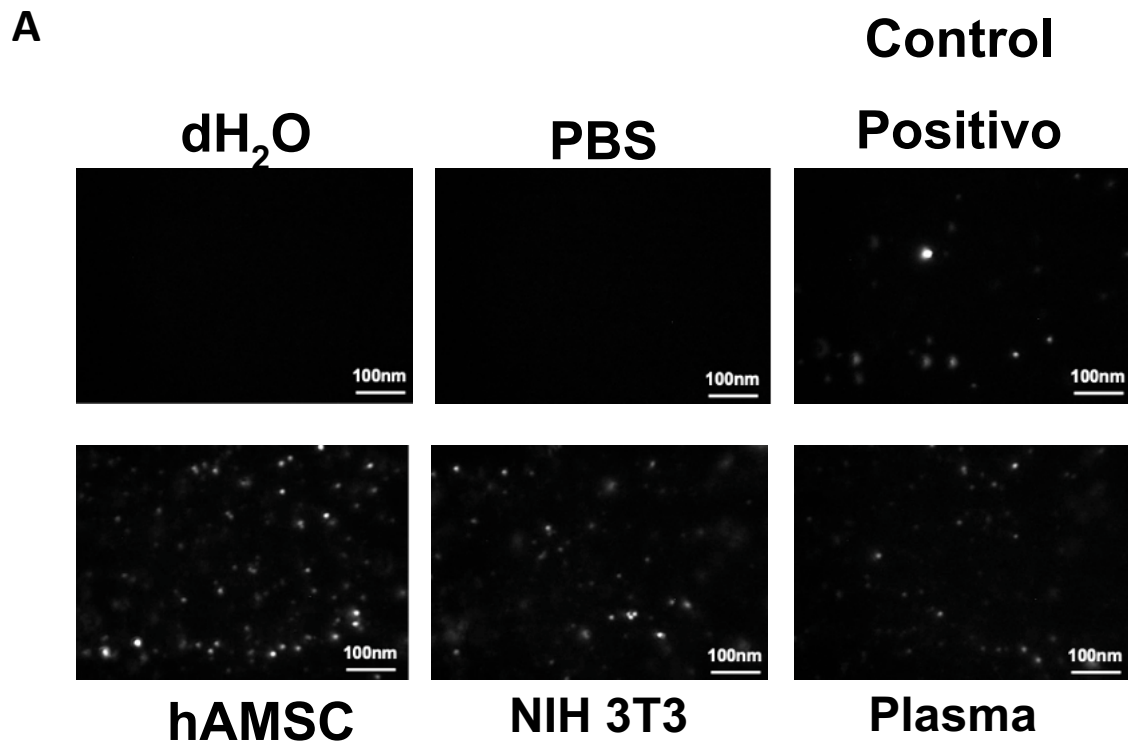
Las EVs procedentes del medio condicionado de cultivo de hAMSC y fibroblastos NIH/3T3, así como de plasma murino, se aislaron y caracterizaron empleando un protocolo de centrifugación diferencial y ultracentrifugación (véase apartado 10, *Materiales y Métodos*).

Las características físico-químicas de las EVs aisladas se evaluaron mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés, *Nanoparticle Tracking Analysis*) utilizando el sistema NanoSight LM10. Este análisis permitió evaluar la distribución de tamaño y la concentración de las partículas aisladas. Como control positivo del sistema, se emplearon microesferas de poliestireno monodispersas de 100 nm (estándar de calibración para NTA) utilizando como controles negativos tanto solución PBS, utilizada como vehículo de resuspensión celular, y una muestra de agua destilada (dH₂O). Como resultado del análisis, las muestras procedentes de cultivos de hAMSC, de fibroblastos NIH/3T3 y de plasma de ratón mostraron poblaciones de vesículas con un tamaño medio del rango descrito para vesículas enriquecidas en exosomas (≈100 nm) (Figura 25A-B).

Resultados

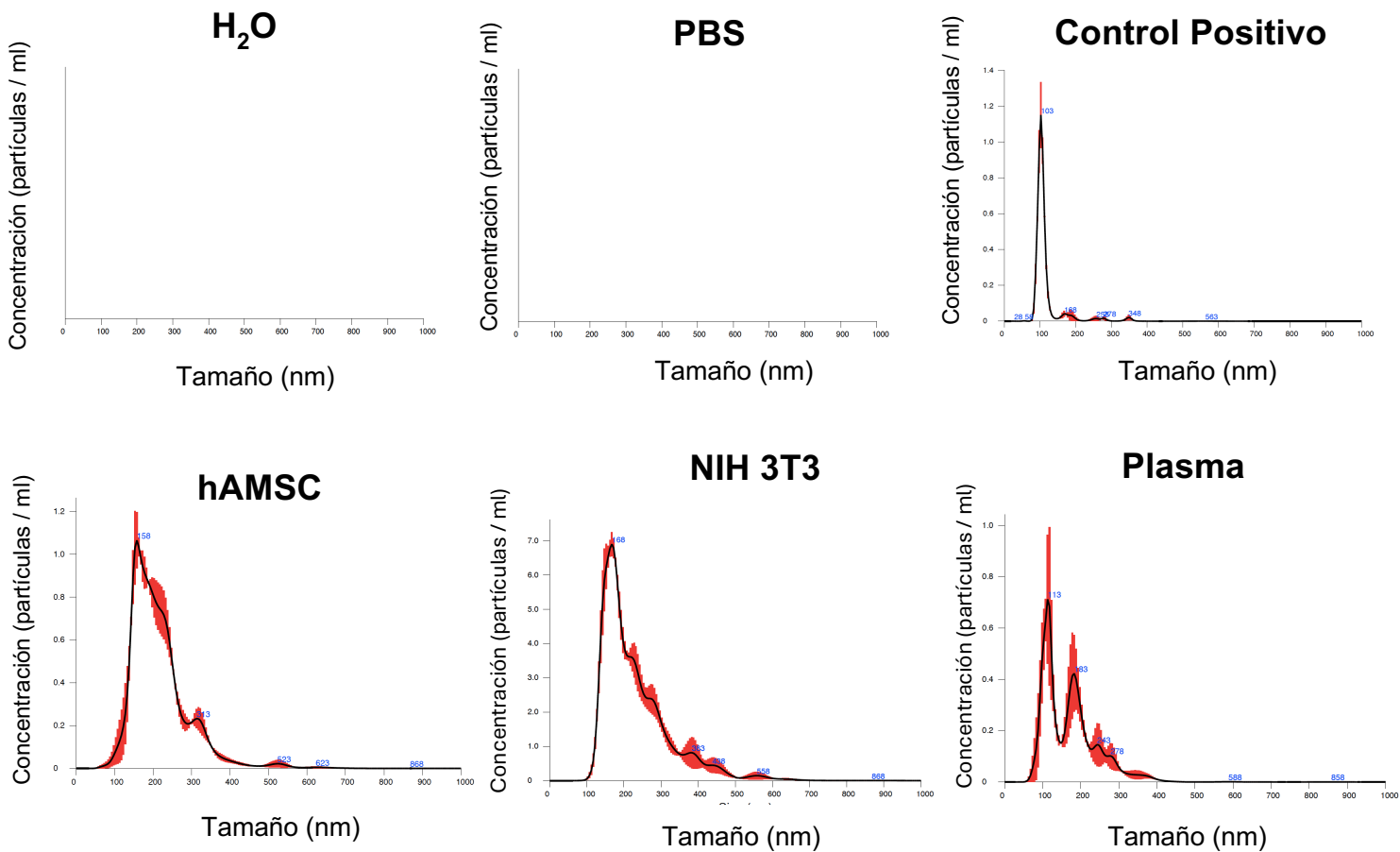
La presencia de marcadores característicos de exosomas se evaluó mediante análisis por inmunoblot. Las EVs derivadas de hAMSC (EVs-hAMSC) mostraron la expresión de marcadores clásicos de exosomas, incluyendo TSG101, CD81, CD9, CD63 y HSP70 como marcadores positivos, mientras que únicamente se detectó una señal residual de calnexina, utilizada como marcador negativo de contaminación por retículo endoplásmico (Figura 25C), patrón de expresión que, en conjunto, es consistente con una población enriquecida en exosomas.

En su conjunto, los resultados obtenidos confirman que el protocolo empleado permite el aislamiento de EVs con características compatibles con exosomas a partir de distintas fuentes biológicas, incluyendo cultivos celulares y plasma de ratón.



Resultados

B



C

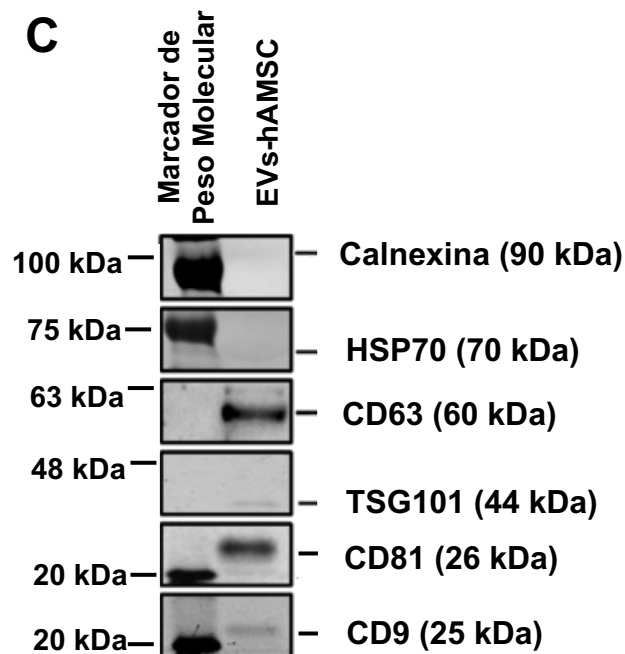


Figura 25. Validación y análisis de exosomas aislados. Imágenes de muestras obtenidas a partir de exosomas derivados de hAMSC, de células NIH/3T3 y de plasma de ratón; de dH₂O y PBS como controles negativos, y microesferas de poliestireno monodispersas de 100 nm como control positivo (A). Cuantificación automatizada de las muestras extraídas del sistema NTA, expresadas en promedio

Resultados

del ajuste de longitud de seguimiento finita (*Finite Track Length Adjustment*, FTLA) en términos de concentración/tamaño (B). Análisis por inmunoblot de la expresión de los marcadores positivos HSP70, CD63, TSG101, CD81, CD9 y Calnexina como control negativo en exosomas derivados de hAMSC (C).

3.2 Las EVs derivadas de las hAMSC reproducen los efectos cardioprotectores de las hAMSC tras la I/R

Con el fin de confirmar si la acción protectora de las hAMSC podía estar mediada por mecanismos paracrinos, se evaluó el efecto de EVs-hAMSC mediante su administración intravenosa en ratones sometidos a I/R, empleando como control animales sometidos a las mismas condiciones y tratados con PBS (Figura 26A).

La administración del tratamiento a los dos días post-intervención dio lugar a una mejora sostenida de la FEVI durante todo el curso del tratamiento (Figura 26B, Tabla 5), demostrando que las EVs-hAMSC son capaces de reproducir de manera eficaz los efectos cardioprotectores observados tras la administración celular en el modelo murino de I/R. Esta mejora sostenida de la FEVI a lo largo del seguimiento post-tratamiento respalda de forma sólida que los beneficios funcionales inducidos por las hAMSC están mediados, al menos en parte, por mecanismos paracrinos dependientes de EVs, posicionando a estas vesículas como mediadores clave de la recuperación funcional cardíaca tras el daño isquémico.

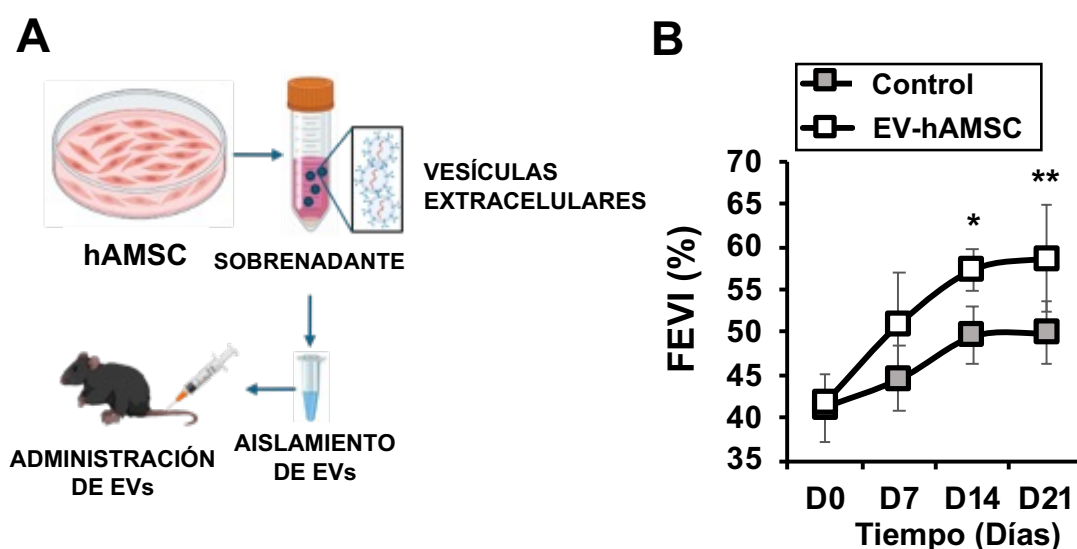


Figura 26. La inyección de EVs induce protección cardíaca en ratones tras I/R. Representación esquemática del diseño experimental (A). Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) en ratones sometidos a I/R e inyectados con EVs-hAMSC el día 2 post-reperusión, evaluada a los 7, 14 y 21 días (* $p < 0,033$ y ** $p < 0,062$, Control vs EV-hAMSC) (B).

4. LAS hAMSC LIBERAN EVs QUE CONTIENEN miR-150

Resumen:

1. Las hAMSC expresan y liberan miR-150-5p, identificado mediante análisis de estudios de GWAS como diana molecular de interés.
2. La exposición de las hAMSC a condiciones de hipoxia, y a estímulos inflamatorios modula su perfil secretor, favoreciendo la liberación de vesículas extracelulares enriquecidas en miR-150-5p
3. Las EVs-hAMSC median la transferencia funcional de miR-150-5p a las células cardíacas.

Con el fin de esclarecer los mecanismos moleculares implicados en los efectos observados, se llevaron a cabo análisis bioinformáticos integrados con estudios de asociación genómica (GWAS), que permitieron identificar candidatos potencialmente relevantes en la regulación del remodelado cardíaco post-I/R. Los resultados de dichos análisis señalaron al ARN largo no codificante MIAT (lncRNA MIAT) como un posible modulador clave del remodelado profibrótico asociado a la I/R.

Diversos estudios han descrito que el lncRNA MIAT actúa como un ARN endógeno competitivo (ceRNA), secuestrando al microRNA miR-150 y limitando así su capacidad reguladora sobre HOXA-4, un factor de transcripción con reconocido papel profibrótico implicado en el remodelado miocárdico adverso tras el infarto (véase apartado 3.3 de la Introducción).

En este contexto, la desregulación del eje MIAT/miR-150/HOXA-4 emerge como un mecanismo clave en la progresión del daño estructural y funcional post-isquémico. El análisis bibliográfico realizado confirma la implicación funcional de este eje en el infarto de miocardio, destacando a miR-150 como un regulador central de múltiples procesos críticos en la respuesta cardíaca frente a la I/R, incluyendo la modulación del remodelado ventricular, la deposición fibrótica y la preservación de la función miocárdica.

En conjunto, estos antecedentes proporcionan un marco mecanístico plausible que permitiría interpretar los efectos beneficiosos observados tras el tratamiento, sugiriendo que la modulación del eje MIAT/miR-150/HOXA-4 podría contribuir de manera relevante

Resultados

a la atenuación del remodelado patológico y a la mejora funcional del miocardio lesionado.

Dado que los efectos terapéuticos de las hAMSC se atribuyen mayoritariamente a mecanismos paracrin, y a la luz de la implicación de este eje molecular en el remodelado profibrótico post-I/R, los experimentos posteriores se orientaron a analizar de manera específica la expresión y el transporte de miR-150-5p en las EVs-hAMSC, con el objetivo de explorar su posible contribución a los efectos cardioprotectores observados tras el tratamiento.

En este contexto, se evaluó inicialmente la expresión de miR-150-5p en hAMSC sometidas a distintas condiciones de cultivo, incluyendo normoxia, hipoxia y un entorno proinflamatorio inducido mediante lipopolisacárido bacteriano (LPS), con el objetivo de modelizar el microambiente característico del infarto agudo de miocardio. Estas condiciones reproducen la desoxigenación tisular y la respuesta inflamatoria aguda propias del miocardio tras un episodio de isquemia/reperfusión.

Por otra parte, con el objetivo de integrar la caracterización mecanística celular con una aproximación *in vivo*, se estudió la presencia de miR-150 en plasma en el modelo murino. Este análisis respaldaría la relevancia biológica de la secreción vesicular de las hAMSC reforzando su posible implicación en la respuesta cardíaca tras la I/R.

Asimismo, se analizó la eficiencia del proceso de transferencia de miR-150-5p mediado por EVs mediante ensayos de captación de vesículas (EV *uptake*) en cardiomioblastos H9C2 incubados con el secretoma derivado de las hAMSC.

De manera adicional, los análisis bioinformáticos integrados y los estudios GWAS identificaron al microRNA miR-93-3p como un posible modulador adicional implicado en la respuesta cardíaca tras la I/R. En concreto, estos análisis sugieren una potencial interacción reguladora de miR-93-3p sobre MIAT, lo que lo sitúa como un candidato de interés dentro de la red de regulación por ARN no codificante asociada al remodelado miocárdico post-isquémico. No obstante, dado que la evidencia disponible es limitada y fundamentalmente predictiva, y que su papel funcional en este contexto no ha sido establecido de manera concluyente, el análisis de miR-93-3p se planteó en el presente estudio de forma estrictamente exploratoria (Figura suplementaria 2).

4.1 Las hAMSC expresan miR-150-5p

En primer lugar, se confirmó mediante ensayos de PCR cuantitativa (qPCR), que las hAMSC expresan miR-150-5p tanto en condiciones normóxicas como hipóxicas. En concreto, la expresión relativa normalizada de miR-150-5p alcanzó valores de $1,133 \pm 0,230$ en normoxia, mientras que en condiciones hipóxicas se redujo a $0,755 \pm 0,182$, lo que corresponde a una disminución de aproximadamente 0,67 veces en los niveles intracelulares respecto a la normoxia (Figura 27A).

4.2 Las hAMSC liberan EVs con miR-150-5p como cargo en condiciones que simulan el contexto de IAM *in vitro*

Se analizó el contenido de miR-150-5p en EVs aisladas del medio condicionado de hAMSC. Bajo condiciones hipóxicas, las EVs mostraron niveles significativamente mayores de miR-150-5p, incrementando 2,3 veces su expresión en comparación con las hAMSC mantenidas en normoxia (Figura 27B), mientras que, de forma destacable, la estimulación inflamatoria mediada por la incubación con LPS indujo un marcado aumento en la liberación de miR-150-5p, alcanzando niveles 40 veces superiores a los de las hAMSC no estimuladas (Figura 27C).

Con el objetivo de reforzar los resultados obtenidos que apuntan a que los efectos observados tras el tratamiento con hAMSC podrían estar mediados, al menos en parte, por la elevada expresión y secreción de miR-150 a través de EVs, se compararon los niveles de este microRNA en las EVs-hAMSC y en aquellas procedentes de fibroblastos NIH/3T3 (Evs-NIH/3T3), línea celular cuyo tratamiento no mostró efectos cardioprotectores ni antifibróticos asociados, como ha sido citado con anterioridad. En efecto, las EVs-hAMSC presentaron niveles de miR-150-5p 3,6 veces superiores a los detectados en las EVs-NIH/3T3 (Figura 27D).

4.3 El tratamiento con EVs-hAMSC incrementa los niveles circulantes de EVs plasmáticas cargadas con miR-150-5p

Una vez establecido mediante experimentos *in vitro* que las hAMSC expresan niveles elevados de miR-150 y que lo secretan de forma preferente a través de EVs, se planteó la necesidad de evaluar si este microRNA podía ser detectado a nivel sistémico *in vivo*, en ratones infartados y tratados con hAMSC, lo que

Resultados

permitiría averiguar si la señal molecular identificada *in vitro* se traduce en una modificación medible en el entorno circulante tras el tratamiento, como así resultó, confirmando que, a los 21 días post-I/R, los ratones tratados con hAMSC presentaban niveles plasmáticos de EVs portadoras de miR-150-5p, 13 veces superiores a los del grupo control tratado con PBS ($12,643 \pm 2,734$ vs $0,963 \pm 0,043$) (Figura 27E).

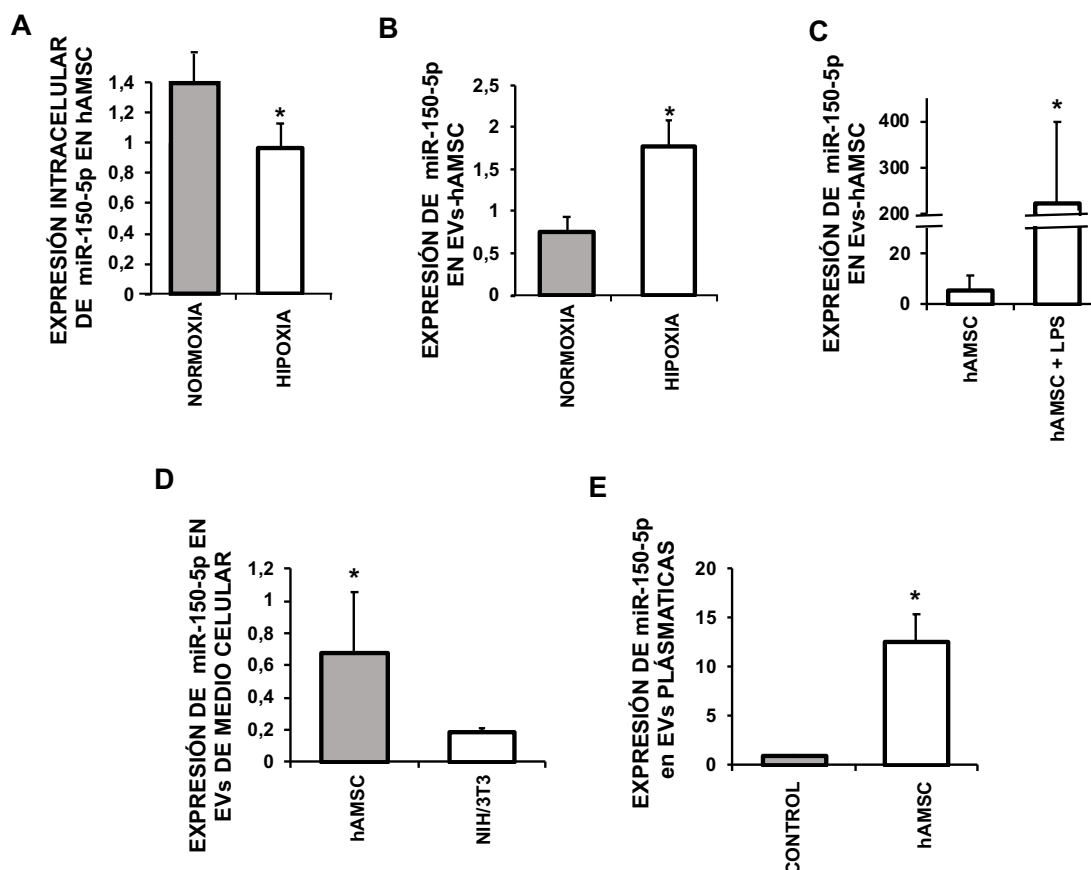


Figura 27. Las hAMSC liberan EVs que contienen miR-150-5p bajo condiciones de cultivo normóxicas, hipóxicas e inflamatorias. Expresión de miR-150-5p en hAMSC en cultivo ($p < 0,02$) (A), en EVs-hAMSC procedentes del medio de cultivo en condiciones normóxicas e hipóxicas ($p < 0,001$) (B), en EVs del medio de cultivo de hAMSC tratadas con $500 \mu\text{M}$ de LPS ($p < 0,03$) (C), en EVs del medio de cultivo de hAMSC y NIH/3T3 ($p < 0,003$) (D). $N=10/\text{grupo}$. Media $\pm$ DE. Expresión de miR-150-5p en EVs aisladas de plasma de ratones a los 21 días post-I/R tras la inyección de 2×10^5 hAMSC en el día 2 post-reperfusión ($*p < 0,0001$) (E). $N=3/\text{grupo}$. Media $\pm$ DE.

En conjunto, los resultados derivados de este bloque indican que tanto la hipoxia como las condiciones inflamatorias, que reproducen el microambiente característico del infarto de miocardio, favorecen activamente la secreción de EVs enriquecidas en miR-150-5p.

Resultados

Asimismo, la expresión de este microRNA fue significativamente mayor en las EVs-hAMSC en comparación con las procedentes de fibroblastos y, en línea con estos hallazgos, en ratones sometidos a I/R, el tratamiento con hAMSC se asoció con un incremento de los niveles de miR-150-5p en vesículas circulantes a los 21 días post-I/R.

4.4 Las EVs-hAMSC median la transferencia funcional de miR-150-5p a cardiomioblastos

Con el fin de evaluar la eficiencia del proceso de transferencia de miR-150-5p mediado por la secreción de EVs, se analizó si el miR-150-5p transportado por dichas vesículas era efectivamente transferido a las células cardíacas receptoras. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de captación en cardiomioblastos H9C2 incubados con el secretoma derivado de hAMSC y se analizaron los niveles de miR-150-5p mediante qPCR (Figura 28A).

En este contexto, la exposición de cardiomioblastos H9C2 al secretoma procedente de 1×10^6 hAMSC durante 24 horas, dio lugar a un incremento de 2,6 veces en los niveles intracelulares de miR-150-5p en comparación con las células H9C2 control mantenidas en su medio de cultivo basal ($2,656 \pm 0,794$ vs $1,033 \pm 0,107$) (Figura 28B).

Adicionalmente, se evaluó la posible contribución del contacto directo célula-célula en la transferencia de miR-150-5p mediante un sistema de co-cultivo directo H9C2:hAMSC en una proporción 10:1. Esta relación fue seleccionada con el objetivo de minimizar la contribución directa del contenido intracelular de miR-150-5p procedente de las hAMSC y evitar posibles sesgos en la interpretación de los resultados. Bajo estas condiciones experimentales, el co-cultivo indujo un aumento de 1,5 veces en los niveles intracelulares de miR-150-5p en comparación con su control ($1,565 \pm 0,195$ vs $1,033 \pm 0,107$).

Tras este resultado, para poder discriminar la contribución relativa de la fracción exosomal frente a otros componentes solubles del secretoma, los cultivos de hAMSC fue previamente tratados con GW4869 (inhibidor farmacológico de la biogénesis de exosomas dependiente de la esfingomielinasa neutra 2) a una concentración de $10 \mu\text{M}$. El secretoma resultante, libre de exosomas, se empleó posteriormente para tratar cultivos de cardiomioblastos H9C2. En estas condiciones, los niveles de expresión intracelular de miR-150-5p en las células H9C2 fueron comparables a los observados

Resultados

en el grupo control ($1,124 \pm 0,225$), manteniéndose en valores similares a los basales (Figura 28B), lo que claramente apunta a que la fracción exosomal del secretoma podría desempeñar un papel determinante en la transferencia de miR-150-5p a los cardiomioblastos.

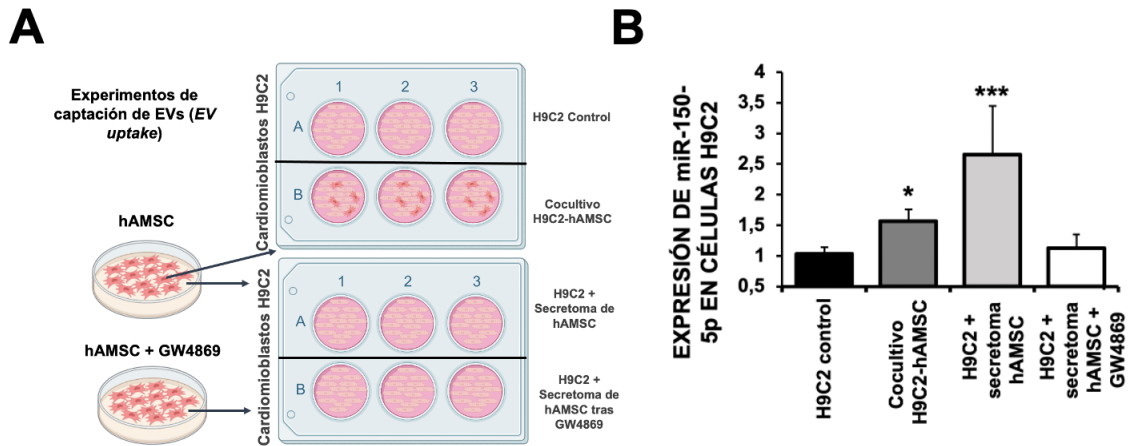


Figura 28. Las EVs de hAMSC median la transferencia de miR-150-5p a cardiomioblastos. Diseño experimental del estudio de captación de EVs (A). Niveles de miR-150-5p en células H9C2 en condiciones control, en cocultivo H9C2:hAMSC (10:1) (* $p<0,003$), y experimento de captación de EVs con y sin tratamiento con 10 μ M de GW4869 (***) $p<0,001$)(B). N=10/grupo. Media $\pm$ DE.

5. LA PROTECCIÓN CARDÍACA INDUCIDA POR LAS hAMSC ESTÁ MEDIADA POR LA MODULACIÓN DEL EJE MIAT/miR-150/HOXA-4

Resumen:

1. El tratamiento con hAMSC aumenta los niveles de miR-150-5p en zonas sanas y necróticas del tejido cardíaco tras 21 días post-I/R
2. El tratamiento con hAMSC disminuye los niveles de MIAT en zonas sanas del tejido cardíaco tras 21 días post-I/R
3. El tratamiento con hAMSC disminuye los niveles de HOXA-4 en zonas necróticas del tejido cardíaco tras 21 días post-I/R.
4. La administración de hAMSC no induce efectos adversos y modula selectivamente la expresión de miR-150-5p en tejido cardíaco sano
5. El tratamiento con EVs-hAMSC aumenta los niveles de miR-150-5p y disminuye la expresión de HOXA-4 en las zonas infartadas del tejido cardíaco tras 21 días post-I/R.

5.1 Las hAMSC modulan el eje MIAT/miR-150/HOXA-4 en el miocardio post isquemia/reperfusión

Con el propósito de investigar los mecanismos moleculares implicados en la cardioprotección ejercida por las hAMSC, se analizó la regulación del eje MIAT/miR-150/HOXA-4 en los corazones de ratones sometidos a I/R (Figura 29A). Concretamente, tras 21 días post-I/R, los animales control (tratados con PBS) o a los que se les administraron las hAMSC, fueron sacrificados, procediéndose a la extracción de los corazones para el análisis mediante qPCR del eje MIAT/miR-150/HOXA-4. En cada caso, el ventrículo izquierdo se separó en regiones sanas, alejadas del área de infarto (a las que nos referiremos como control/sano o hAMSC/sano), y regiones correspondientes a la zona infartada (a las que nos referiremos como control/infartado o hAMSC/infartado).

Los resultados obtenidos mostraron que la administración intravenosa de hAMSC a los dos días post-I/R se asoció con un aumento significativo de los niveles de miR-150-5p en el tejido cardíaco. Este incremento se observó tanto en las áreas sanas, como en las regiones afectadas por el daño isquémico.

Resultados

En las zonas sanas, la expresión relativa de miR-150-5p fue 1,75 veces mayor en los corazones de los animales tratados con hAMSC en comparación con los del grupo control ($1,437 \pm 0,396$ vs $0,821 \pm 0,161$), mientras que en las áreas infartadas, el incremento fue aún más acusado, alcanzando niveles 2,1 veces superiores a los observados en las áreas control ($1,423 \pm 0,446$ vs $0,676 \pm 0,059$) (Figura 29B).

De forma concomitante, tras el tratamiento con hAMSC también se pudo observar una disminución de la expresión de MIAT, en las áreas sanas en comparación con el grupo control ($0,684 \pm 0,419$ vs $1,303 \pm 0,342$), mientras que en las áreas infartadas, sin embargo, las diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas ($1,646 \pm 0,544$ vs $1,890 \pm 0,310$) (Figura 29C).

En lo referente la expresión de HOXA-4 en el tejido cardíaco (Figura 29D), únicamente se observaron diferencias significativas en las áreas infartadas, disminuyendo su expresión 0,64 veces en los animales tratados, respecto al grupo control ($1,160 \pm 0,276$ vs $1,811 \pm 0,458$).

Por último, se analizaron los niveles de expresión de miR-93-3p, observándose un incremento tras la administración de hAMSC tanto en áreas sanas como infartadas respecto al grupo control (Figura suplementaria 2).

5.2 La disminución de HOXA-4 se acompaña de cambios funcionales en el eje HOXA-4–GSK3 β /Wnt

Para analizar con mas detalle la contribución de HOXA4, Se llevó a cabo un análisis funcional de su actividad génica, y así verificar que la disminución observada en su expresión se traducía también en una reducción de su actividad funcional. Para ello se evaluó la expresión de glicógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 β), gen diana regulado transcripcionalmente por HOXA-4 en la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Lei et al., 2021).

Se cuantificaron los niveles de expresión de GSK3 β en tejido cardíaco post-I/R, tanto en regiones sanas como en las necrosadas, observando que en las no infartadas, los animales sometidos al tratamiento mostraron una reducción aproximada de 1,5 veces los niveles de GSK3 β en comparación con el grupo control ($0,597 \pm 0,092$ frente a $0,901 \pm 0,132$), el cual resultó aún mas pronunciado en las regiones infartadas, donde la

Resultados

administración de hAMSC se asoció con una disminución significativa de 5,6 veces respecto a los controles ($0,229 \pm 0,187$ frente a $1,292 \pm 0,297$) (Figura 29E), confirmando así que la modulación del eje MIAT/miR-150/HOXA-4 constituye un mecanismo central en la cardioprotección inducida por las hAMSC.

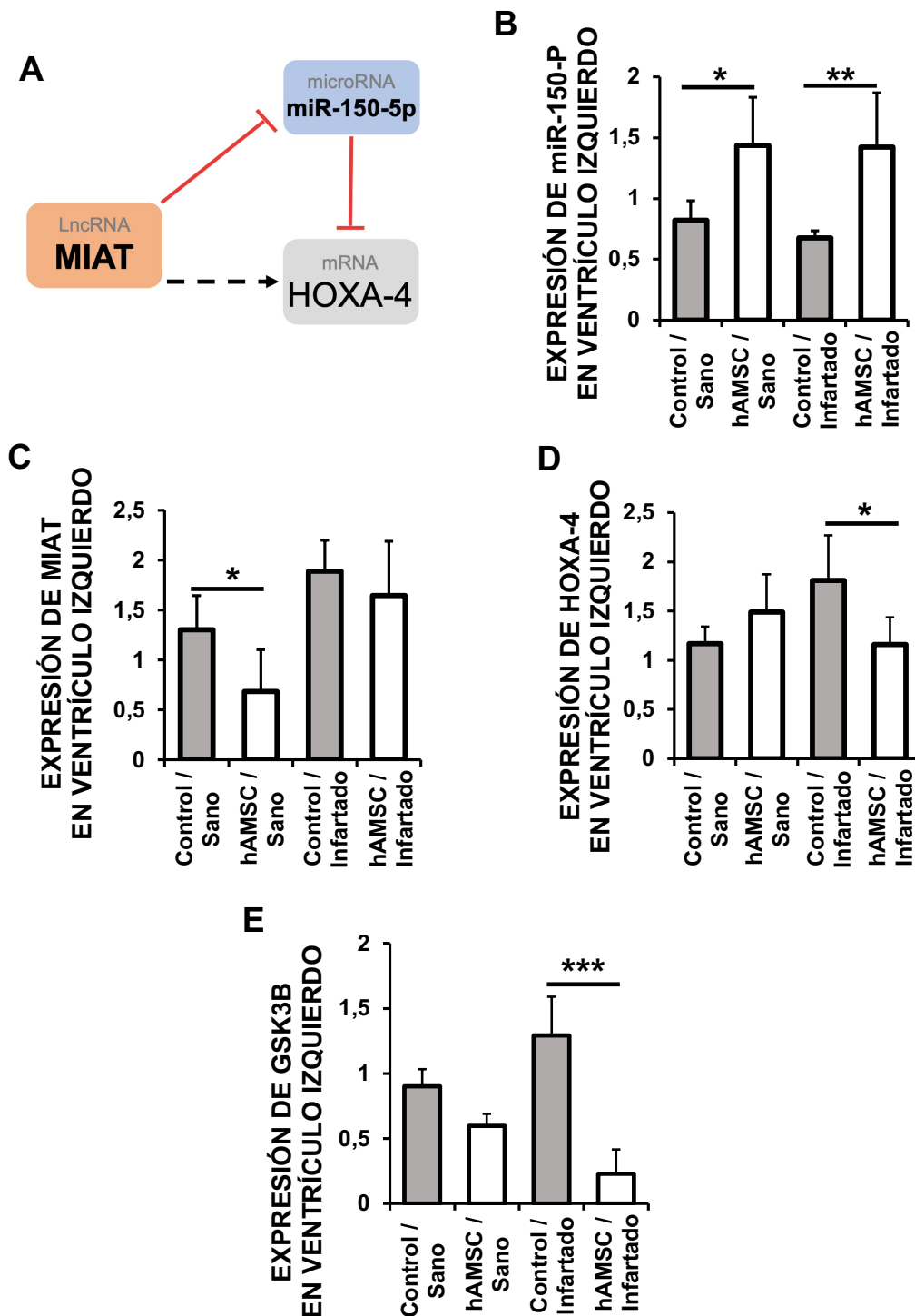


Figura 29. Las hAMSC regulan el eje MIAT/miR-150-5p/HOXA-4 en corazones de ratones sometidos a I/R. Representación esquemática del eje MIAT/miR-150-5p/HOXA-4 (A). Expresión de miR-150-5p (* $p=0,005$; ** $p=0,003$) (B), MIAT (* $p=0,0293$) (C), HOXA-4 (* $p=0,0338$) (D) y GSK3B (diana de HOXA-4) (** $p<0,001$)

Resultados

(E), en áreas sanas e infartadas del ventrículo izquierdo a los 21 días post-I/R, en ratones sometidos a I/R y tratados con PBS (control) o 2×10^5 hAMSC administradas a los 2 días post-I/R. N=10/grupo. Media $\pm$ DE.

5.3 Contribución de las hAMSC sobre el eje MIAT/miR-150/HOXA-4 en ausencia de I/R miocárdica.

Con el fin de discriminar posibles efectos derivados del abordaje experimental sobre el eje MIAT/miR-150/HOXA-4, e independientes del contexto patológico, se procedió a inyectar la misma dosis de hAMSC en ratones sanos, analizando los niveles de expresión de miR-150-5p, MIAT y HOXA-4 en tejido cardíaco en el momento basal (día 0, control) y a los 1, 7, 14 y 21 días post-tratamiento mediante qPCR.

Los resultados mostraron un incremento significativo de los niveles de miR-150-5p en el tejido cardíaco a los 14 días tras la administración de las hAMSC, alcanzando valores 7,1 veces superiores a los observados en el día 1 post-tratamiento. De forma paralela, se detectó una marcada disminución en la expresión de MIAT, siendo significativa a los 21 días post-tratamiento en comparación con los controles, con niveles 18,9 veces inferiores ($1,802 \pm 1,201$ frente a $0,095 \pm 0,014$). Asimismo, la expresión de HOXA-4 fue consistentemente menor en los animales tratados respecto al grupo control, observándose una reducción de 3,45 veces en el primer día ($0,379 \pm 0,179$ frente a $1,309 \pm 0,343$) y de aproximadamente 4 veces a la tercera semana ($0,327 \pm 0,130$ frente a $1,309 \pm 0,343$) (Figura 30A–C).

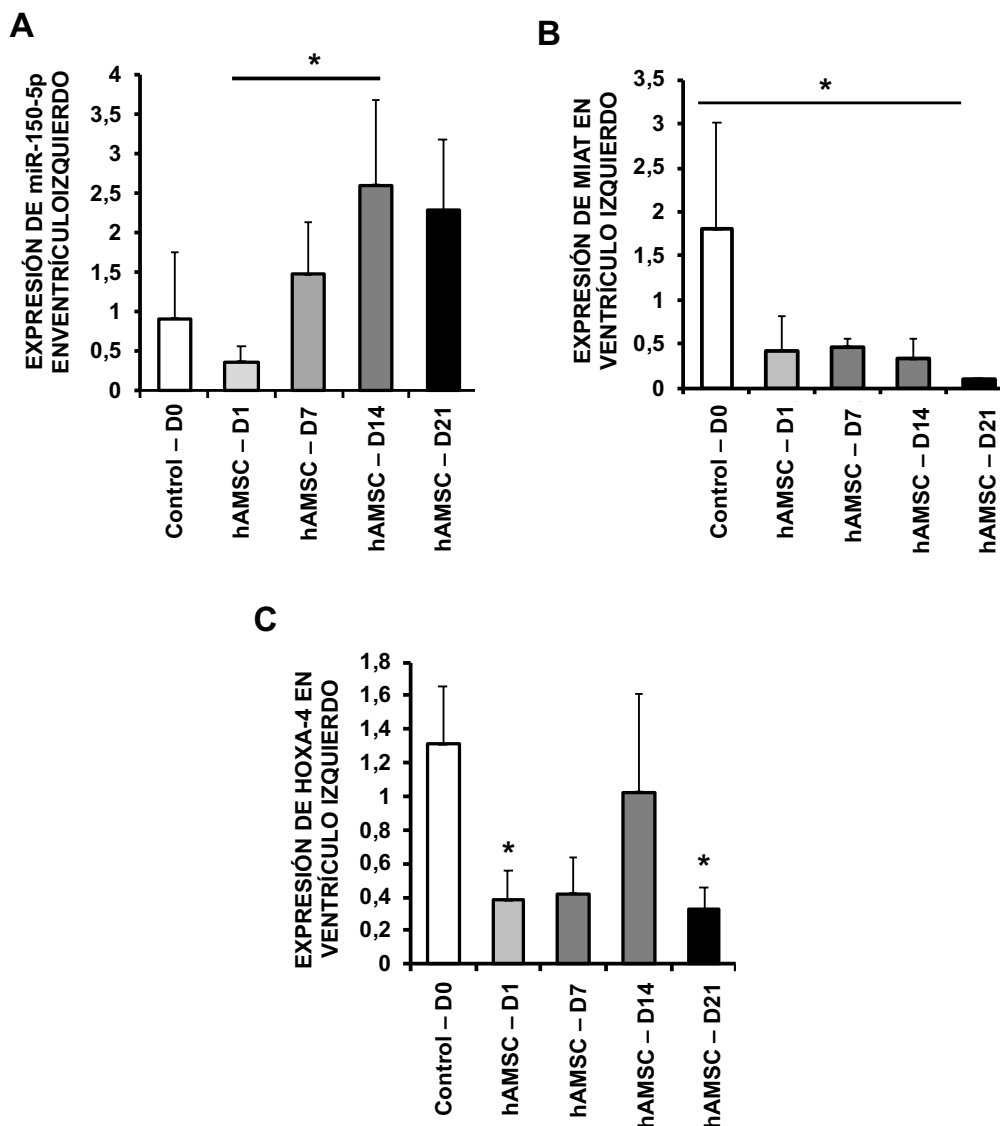


Figura 30. Evaluación de los niveles de expresión de miR-150, MIAT y HOXA-4 en ventrículo izquierdo de ratones sanos no tratados y tratados con hAMSC a los días 1, 7, 14 y 21 post-administración. Cuantificación de miR-150-5p (A) (* $p < 0,039$), MIAT (* $p < 0,029$) (B) y HOXA-4 (* $p < 0,042$; * $p < 0,031$) (C). N = 3 ratones/grupo. Media $\pm$ DE.

5.4 Las EVs-hAMSC modulan el eje MIAT/miR-150/HOXA-4

Los resultados obtenidos sugieren que las EVs-hAMSC son capaces de reproducir de manera eficaz los efectos cardioprotectores observados tras la administración celular en el modelo murino de I/R. Además, respaldan de forma sólida que los beneficios funcionales inducidos por las hAMSC están mediados, al menos en parte, por mecanismos paracrinós dependientes de la secreción de EVs. Sobre esta base, y considerando el papel previamente identificado del eje MIAT/miR-150/HOXA-4 en el

Resultados

remodelado cardíaco post-isquémico, resta conocer si las EVs-hAMSC ejercen su acción cardioprotectora mediante la modulación de dicho eje molecular.

Tras la administración de las EVs-hAMSC, las áreas infartadas, mostraron un incremento de 1,81 veces sobre la expresión de miR-150-5p ($1,540 \pm 0,292$ vs $0,853 \pm 0,294$) y una reducción de 1,8 veces en los niveles de HOXA-4 ($0,750 \pm 0,121$ vs $1,355 \pm 0,851$) en comparación con el grupo control, mientras que no se observaron diferencias significativas en la expresión de MIAT pese a mostrar una tendencia descendente ($0,247 \pm 0,233$ vs $0,693 \pm 0,367$). Por su parte, en las áreas sanas tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos para ninguna de las dianas analizadas (Figura 31A–C).

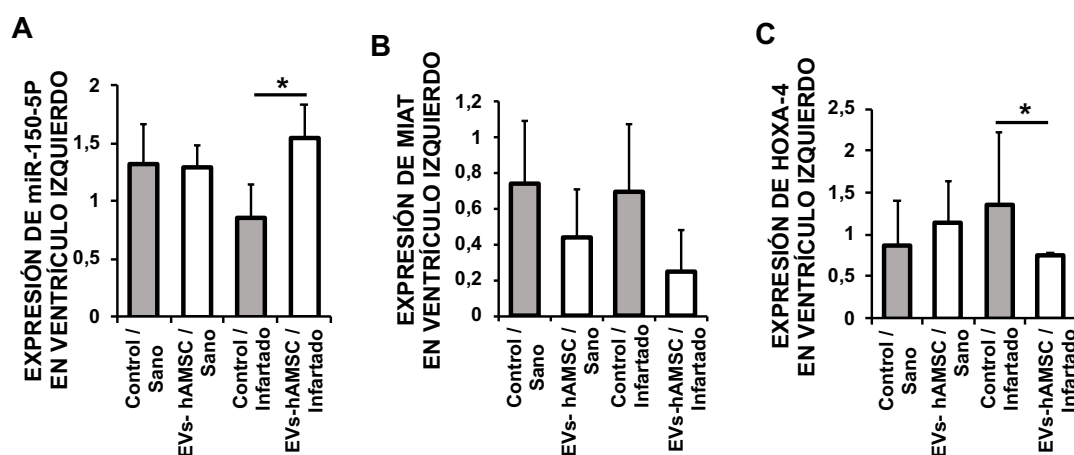


Figura 31. Las EVs-hAMSC modulan el eje MIAT/miR-150/HOXA-4 en ratones sometidos a I/R miocárdica. Expresión tisular de miR-150-5p (* $p < 0,027$) (A), MIAT (B) y HOXA-4 (* $p < 0,01$) (C) en zonas sanas e infartadas del miocardio a los 21 días post-I/R tras la administración de EVs con miR-150-5p. N = 5 ratones por grupo. Media $\pm$ DE.

En conjunto, estos resultados indican que la administración de EVs-hAMSC modula de manera específica el eje miR-150-5p/HOXA-4 en el tejido cardíaco infartado, reproduciendo los efectos moleculares previamente observados con la terapia celular. El incremento de miR-150-5p y la concomitante reducción de HOXA-4 en la zona infartada, en ausencia de cambios significativos en regiones sanas, sugerirían una acción localizada y dependiente del contexto patológico. La falta de modificaciones significativas en los niveles de MIAT, pese a una tendencia descendente, apunta a que las EVs-hAMSC actúan predominantemente modulando la disponibilidad funcional de miR-150-5p más que regulando directamente la expresión de su lncRNA regulador, y en su conjunto, todos estos hallazgos refuerzan el papel de las EVs-hAMSC como mediadores paracrinicos clave de los efectos cardioprotectores inducidos por las hAMSC.

6. CONFIRMACIÓN DEL PAPEL DE miR-150 EN LA RESPUESTA CARDIOPROTECTORA Y EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL MIOCARDIO TRAS UN INFARTO

Resumen:

1. La edición génica con CRISPR/Cas9 permitió generar hAMSC deficientes en miR-150-5p (hAMSC-KO).
2. El tratamiento con las hAMSC-KO no preservó la función cardíaca, observándose una reducción significativa de la FEVI frente al tratamiento con hAMSC.
3. Tras el tratamiento con las hAMSC-KO se detectó una disminución de los niveles de expresión de miR-150 en plasma y tejido, asociada a una sobreexpresión de HOXA-4.
4. Los animales tratados con las hAMSC-KO mostraron mayor fibrosis miocárdica, confirmando el papel esencial de miR-150 como mediador antifibrótico y cardioprotector.

Con el objetivo de validar funcionalmente el papel de miR-150-5p en los efectos observados tras el tratamiento con las hAMSC, se generó una línea celular mediante edición génica con CRISPR/Cas9 (hAMSC-KO; véase apartado 7, *Materiales y Métodos*). La expresión de miR-150-5p en esta línea celular fue 33 veces inferior a la observada en las hAMSC no editadas ($0,031 \pm 0,007$ vs $1,014 \pm 0,151$) (Figura 32A).

Tras este destacado hallazgo, se procedió a analizar su posible efecto cardioprotector en comparación con el que ya se obtuvo previamente con las hAMSC originales (no editadas), en los mismos ensayos de I/R miocárdica realizados con anterioridad, gracias a lo cual se evaluó tanto la función cardíaca, como la modulación del eje MIAT/miR-150/HOXA-4 y el grado de remodelado fibrótico de los corazones infartados.

6.1 La pérdida de miR-150-5p en las hAMSC reduce la respuesta cardioprotectora tras I/R miocárdica *in vivo*

La administración intravenosa de hAMSC-KO en ratones sometidos a I/R se asoció con una menor capacidad de recuperación de la función cardíaca, tal y como se desprende de los resultados obtenidos a los 7 días post-I/R, con valores de FEVI un 12,54 % inferiores a los observados en los animales inyectados con hAMSC no editadas ($44,000 \pm 5,292\%$ vs $56,538 \pm 4,943\%$) (Figura 32B).

6.2 La pérdida de miR-150-5p en las hAMSC compromete la modulación del eje miR-150-5p/HOXA-4 en el miocardio post-isquémico *in vivo*

El tratamiento con hAMSC-KO en ratones sometidos a I/R alteró significativamente el eje miR-150-5p/HOXA-4 *in vivo*, detectando niveles de expresión de miR-150-5p 2,02 veces inferiores en las EVs circulantes de los animales tratados con hAMSC-KO en comparación con las hAMSC no editadas ($1,807 \pm 0,851$ frente a $3,650 \pm 0,948$), más semejantes a los valores de los animales control ($1,352 \pm 0,320$) (Figura 32C).

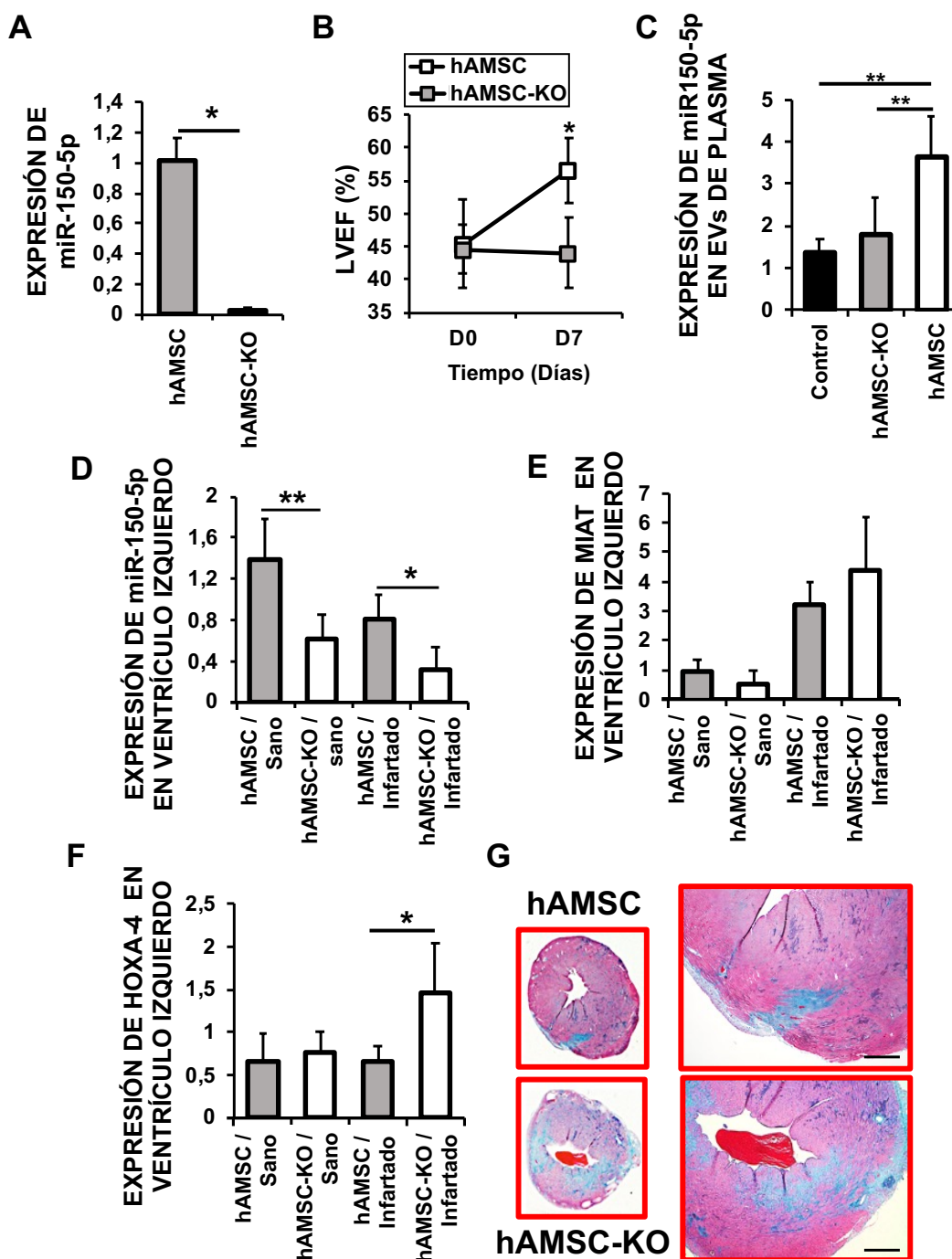
De forma paralela, el tratamiento con hAMSC-KO se asoció con una reducción significativa de los niveles de miR-150-5p en el tejido cardíaco en comparación con el tratamiento con hAMSC, tanto en regiones sanas como infartadas. En concreto, se observaron niveles 2,26 veces inferiores en las áreas sanas ($0,613 \pm 0,238$ frente a $1,386 \pm 0,391$) y 2,51 veces inferiores en las áreas infartadas ($0,326 \pm 0,206$ frente a $0,817 \pm 0,234$) (Figura 32D).

Consistentemente, el déficit de miR-150-5p se acompañó de un aumento significativo en la expresión de HOXA-4 en el miocardio infartado. Así, en las áreas infartadas, los animales tratados con las hAMSC-KO presentaron niveles de HOXA-4 2,2 veces superiores a los observados en el grupo tratado con las hAMSC ($1,473 \pm 0,577$ frente a $0,668 \pm 0,192$), mientras que no se detectaron diferencias significativas en las regiones sanas ($0,763 \pm 0,265$ frente a $0,669 \pm 0,330$) (Figura 32E).

Respecto a los niveles de MIAT, no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con hAMSC-KO o hAMSC, ni en las áreas sanas ($0,527 \pm 0,439$ frente a $0,969 \pm 0,400$) ni en las infartadas ($4,378 \pm 1,774$ frente a $3,241 \pm 0,766$) (Figura 32F).

6.3 El poder antifibrótico de las hAMSC se pierde en ausencia de miR-150-5p en el miocardio post-isquémico

El tratamiento con hAMSC-KO se asoció con un incremento significativo de la fibrosis a los 7 días post-I/R, tal como se evidenció mediante la tinción con Tricrómico de Masson, mostrando un aumento del depósito de colágeno (marcaje en azul) en el tejido miocárdico (Figura 32G), resultado que sugiere de manera inequívoca que miR-150-5p es al menos uno de los mecanismos principales de acción de las células hAMSC en la prevención de la fibrosis miocárdica tras el infarto.



Resultados

Figura 32. Animales tratados con hAMSC-KO muestran menor FEVI tras I/R, niveles de expresión reducidos de miR-150-5p cardíaco, aumento de expresión de HOXA-4 e incremento de fibrosis cardíaca a los 7 días. Expresión de miR-150-5p en hAMSC y hAMSC-KO en cultivo ($p < 0,0001$) (A). FEVI a los 7 días post-I/R en ratones tratados con 2×10^5 hAMSC o hAMSC-KO (día 2 post-reperfusión) ($*p < 0,002$ D7) (B). Niveles de miR-150-5p tras 21 días de I/R en EVs plasmáticas de ratones inyectados con hAMSC o hAMSC-KO ($*p < 0,03$ hAMSC vs Control y hAMSC vs hAMSC-KO) (C). Niveles de miR-150-5p ($*p < 0,012$, $**p < 0,001$) (D), MIAT (E) y HOXA-4 ($*p < 0,001$) (F) en tejido cardíaco tras I/R e inyección de hAMSC o hAMSC-KO. Tinción Tricrómica de Masson de secciones cardíacas a los 21 días post-I/R e inyección (día 2 post-reperfusión) con hAMSC o hAMSC-KO (G). N=10 ratones/grupo. Media $\pm$ DE.

7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON miR-150 EN LA FUNCIÓN CARDÍACA Y EL REMODELADO TRAS I/R

Resumen:

1. La administración intravenosa de NMC-150 a los 2 días post-I/R mejoró significativamente la FEVI.
2. El tratamiento con NMC-150 aumentó los niveles de miR-150-5p en plasma y en el tejido cardíaco de los animales tratados.
3. Aunque los niveles de MIAT no mostraron cambios significativos, se observó una disminución en la expresión de HOXA-4 en tejido necrótico en los animales tratados con NMC-150, a diferencia sus respectivos controles.
4. El análisis histológico mediante tinción de Tricrómico de Masson, evidenció una reducción del área de fibrosis a los 21 días post-I/R en los animales tratados con NMC-150, indicando un efecto antifibrótico y cardioprotector mediado por la transferencia de miR-150.
5. La NMC-150 realiza una entrega eficiente de miR-150-5p al miocardio en el modelo de I/R.

Tras la identificación del potencial cardioprotector de miR-150 en el contexto del infarto, se procedió a explorar estrategias avanzadas de administración que pudieran optimizar su biodisponibilidad y especificidad tisular. En este sentido, se propuso evaluar el empleo de nanopartículas como sistemas de liberación dirigida, con el objetivo de vehiculizar dicha molécula hacia el tejido miocárdico dañado y potenciar así su potencial eficacia terapéutica, minimizando efectos sistémicos no deseados.

Se evaluó la eficacia de nanopartículas cargadas con un *mimético* de miR-150-5p (NMC-150) (véase apartado 4.5, *Introducción*; y 8, *Materiales y Métodos*) en el modelo murino de I/R miocárdica.

Para ello se emplearon nanopartículas NIL10, que contienen un péptido análogo a IL-10 y cuya actividad terapéutica ha sido previamente demostrada en el infarto agudo de miocardio, mediada por la activación de la vía STAT3/NF- κ B y asociada a una reducción de la inflamación, la fibrosis y el daño miocárdico (Tesoro et al., 2022). El uso de estas nanopartículas tuvo como objetivo facilitar la entrega del *mimético* de miR-150 y evaluar

Resultados

la posible existencia de un efecto terapéutico sinérgico. Las nanopartículas NIL10 sin miR-150 se emplearon como control (NP Control).

7.1 La administración temprana de NMC-150 mejora la función cardíaca tras isquemia/reperfusión

Las NMC-150 se administraron por vía intravenosa (10 mg/kg) (Tesoro et al., 2022) a los dos días post-I/R, siguiendo el esquema de intervención temprana previamente establecido en los modelos tratados con hAMSC.

El estudio de biodistribución, realizado gracias al marcaje con rodamina de la nanopartícula, demostró su llegada al tejido cardíaco tras la I/R, observándose asimismo una distribución en menor medida en otros tejidos, como hígado, páncreas, bazo, pulmones y riñón (Figura 33).

A los 7 días post-I/R, la FEVI fue comparable entre los animales tratados con la nanopartícula control NIL10 y aquellos tratados con NMC-150, sin observarse una mejora funcional adicional asociada a esta última en este punto temporal (Figura 34A). Este hallazgo podría explicarse, al menos en parte, por los efectos terapéuticos intrínsecos previamente descritos de la nanopartícula *per se*, lo que sugiere que, en fases tempranas post-I/R, el beneficio funcional alcanzado podría estar mayoritariamente impulsado por la propia nanopartícula, limitando la detección de un efecto adicional atribuible al cargo miR-150-5p.

7.2 Las NMC-150 incrementan los niveles sistémicos y tisulares de miR-150-5p

En este contexto, aunque a los 7 días post-I/R no se detectaron diferencias funcionales adicionales en la FEVI entre los animales tratados con la nanopartícula control respecto a los tratados con NMC-150 (Figura 34B), resultó especialmente relevante complementar el análisis funcional con una caracterización molecular dirigida, lo que permitiría sentar las bases para analizar si dicho aumento de miR-150-5p se traduce en la modulación funcional del eje MIAT/miR-150/HOXA-4, previamente implicado en el remodelado cardíaco post-isquémico, y así, poder detectar cambios moleculares tempranos potencialmente relevantes que podrían preceder a efectos funcionales más tardíos.

Resultados

Con este objetivo, se evaluaron los niveles de miR-150-5p en plasma, así como en regiones sanas e infartadas del ventrículo izquierdo de ratones sometidos a I/R, revelando un incremento de los niveles de miR-150-5p tanto a nivel sistémico como tisular en los animales tratados con NMC-150, resultado que refuerza el uso de esta tecnología para obtener un mejor rendimiento cardioprotector. En las EVs aisladas de plasma, los niveles de miR-150-5p fueron 3,9 veces superiores en el grupo tratado con NMC-150 en comparación con el grupo control ($3,332 \pm 1,567$ vs $0,859 \pm 0,294$) (Figura 34C).

En el tejido cardíaco, el tratamiento con NMC-150 se asoció igualmente con un incremento de miR-150-5p. En las áreas sanas, los niveles fueron 1,6 veces superiores a los del grupo NP control ($1,616 \pm 0,348$ vs $1,039 \pm 0,633$), mientras que en las áreas infartadas el aumento alcanzó 2,4 veces los valores observados en los controles ($1,214 \pm 0,416$ vs $0,513 \pm 0,190$) (Figura 34D).

7.3 La administración de NMC-150 modula selectivamente el eje HOXA-4

A partir de la constatación de un incremento de los niveles sistémicos y tisulares de miR-150-5p tras el tratamiento con NMC-150, tanto en regiones sanas como infartadas del ventrículo izquierdo, se procedió a analizar el impacto de este aumento sobre los componentes del eje molecular previamente identificado. En este contexto, la evaluación de la expresión de MIAT y HOXA-4 permitió determinar si la mayor biodisponibilidad de miR-150-5p inducida por NMC-150 se traducía en una modulación funcional de esta vía reguladora en el tejido cardíaco post-isquémico.

En cuanto al ARN no codificante MIAT, no se observaron diferencias significativas tras la administración de NMC-150 (Figura 34E), pese a una tendencia al aumento en el tejido infartado. Por el contrario, los niveles de HOXA-4 en el tejido cardíaco fueron inferiores en los animales tratados con NMC-150 en comparación con sus respectivos controles, en donde en las áreas sanas, la expresión fue 1,3 veces inferior respecto al grupo control ($1,155 \pm 0,385$ vs $1,538 \pm 0,750$), mientras que en las áreas infartadas reducción fue de 1,2 veces ($2,303 \pm 0,854$ vs $2,845 \pm 0,627$) (Figura 34F).

7.4 Las NMC-150 reducen el remodelado fibrótico del miocardio post-I/R

La modulación del eje molecular observada tras el tratamiento con NMC-150 tuvo una clara traducción a nivel estructural. En concreto, la reducción de los niveles de HOXA-4 en el tejido cardíaco, tanto en regiones sanas como infartadas, en ausencia de cambios significativos en la expresión de MIAT, sugiere una regulación preferentemente mediada por el incremento de miR-150-5p. Dado el papel profibrótico descrito de HOXA-4 en el remodelado adverso post-isquémico, estos cambios moleculares podrían apuntar a un impacto sobre la deposición de matriz extracelular y la progresión de la fibrosis miocárdica, lo que motivó la evaluación histológica del tejido cardíaco en fases más avanzadas post-I/R. En efecto, el análisis histológico mediante tinción con Tricrómico de Masson, demostró que los ratones tratados con NMC-150 presentaban una reducción del área de fibrosis a los 21 días post-I/R en comparación con los tratados con la nanopartícula (Figura 34G).

En conjunto, estos resultados demuestran que el tratamiento con NMC-150 no solo incrementa de manera eficaz los niveles sistémicos y tisulares de miR-150-5p, sino que se asocia con la modulación funcional del eje miR-150-5p/HOXA-4 en el tejido cardíaco post-isquémico. La reducción de la expresión de HOXA-4, junto con la disminución de la fibrosis miocárdica observada en fases tardías tras la I/R, respalda la relevancia biológica de este eje en el control del remodelado profibrótico. Estos hallazgos sugieren que la entrega dirigida de miR-150-5p mediante NMC-150 puede constituir una estrategia eficaz para modular de forma específica procesos moleculares y estructurales implicados en el remodelado cardíaco adverso tras el infarto de miocardio, incluso en ausencia de mejoras funcionales tempranas adicionales.

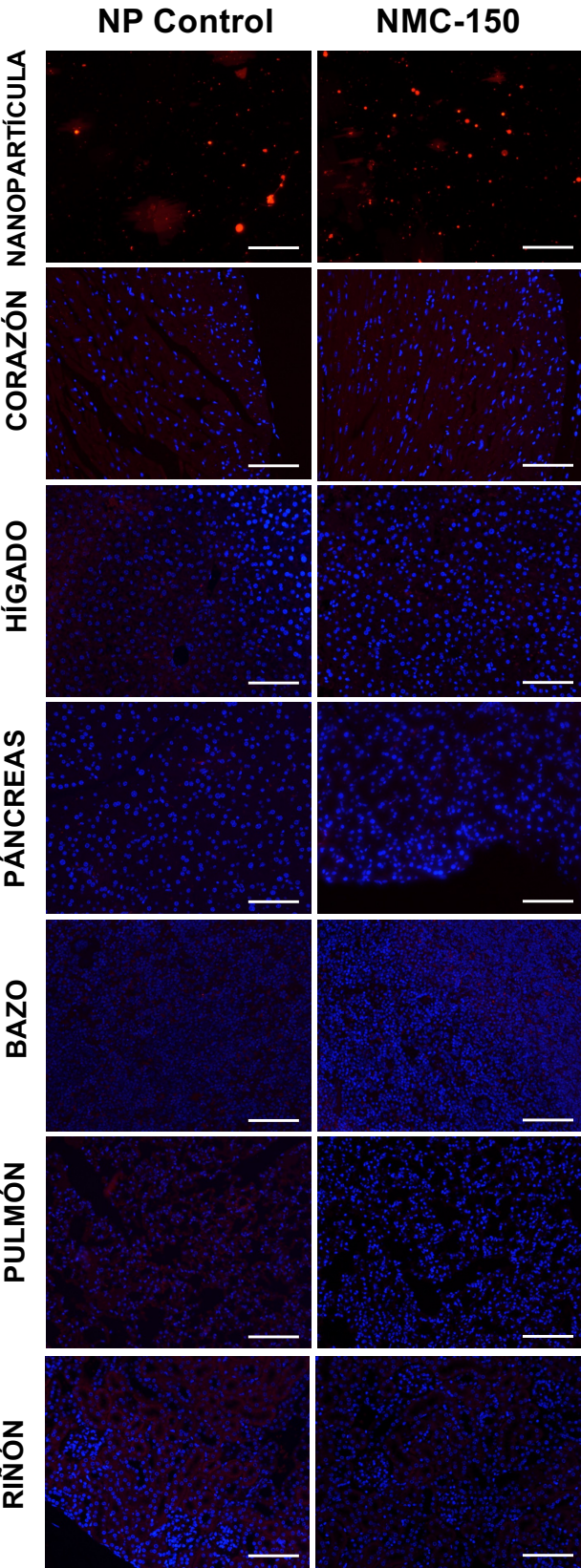


Figura 33. Microscopía de inmunofluorescencia de secciones tratadas con Nanopartículas Control y NMC-150. La biodistribución de las nanopartículas se evaluó en diferentes tejidos mediante la detección de la fluorescencia de rodamina

Resultados

(rojo), incorporada como marcador en su estructura, en corazón, hígado, páncreas, bazo, pulmón y riñón. Los núcleos celulares se visualizaron mediante tinción con DAPI (azul). Barra de escala: 50 μ m.

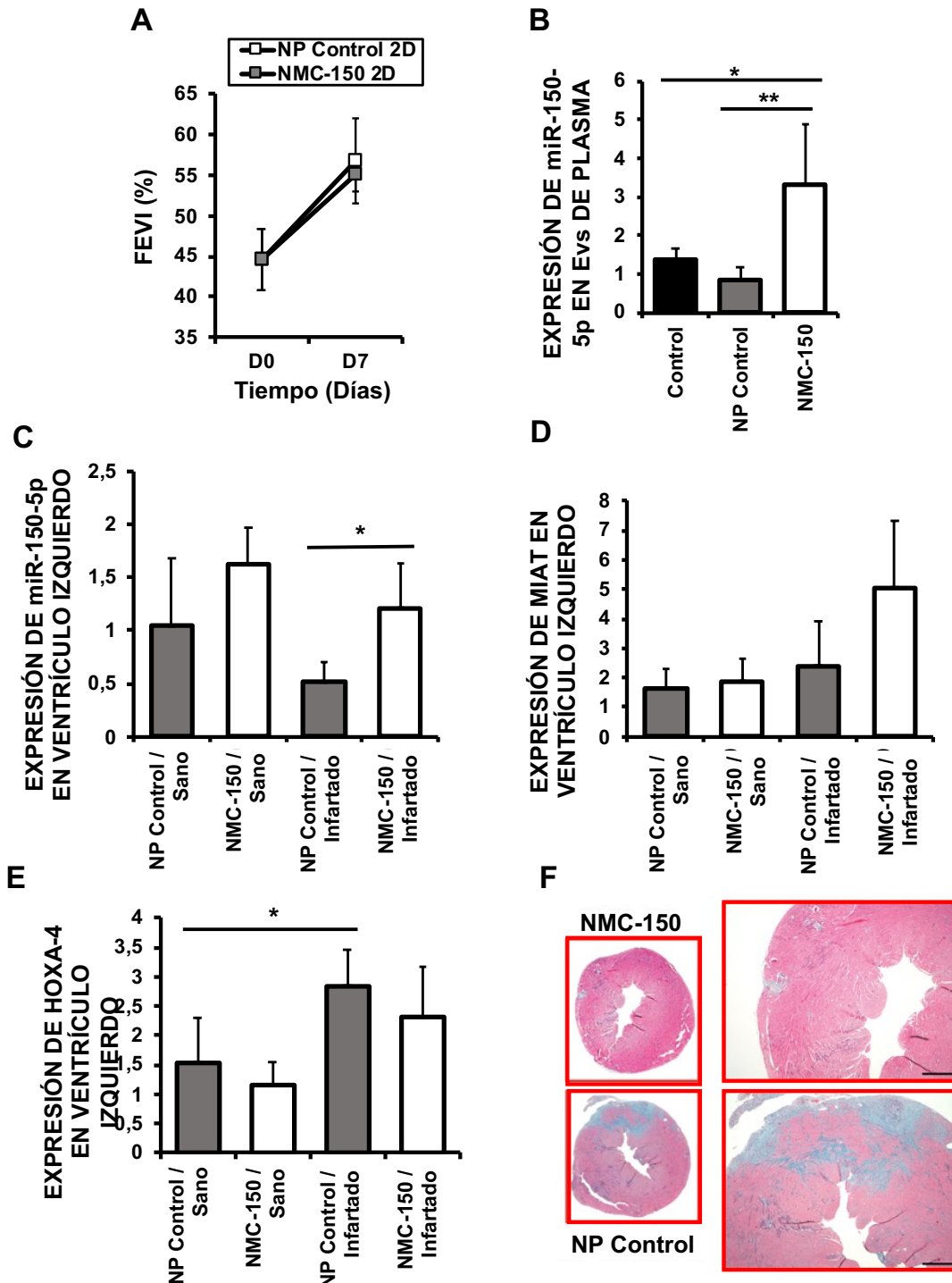


Figura 34. Las nanopartículas cargadas con miR-150 (NMC-150) inducen cambios moleculares favorables en el eje MIAT/miR-150/HOXA-4 en un modelo murino de I/R. FEVI a los 7 días post-I/R en ratones tratados con NMC-150 o NP Control (día 2 post-reperusión) (A). Niveles de miR-150-5p tras 21 días de I/R en EVs plasmáticas de ratones inyectados con NMC-150, NP Control o Salino (* $p < 0,03$ NMC-150 vs Control y NMC-150 vs NP Control) (B). Niveles de miR-150-5p

Resultados

(* $p < 0,045$) (C), MIAT (D) y HOXA-4 (* $p < 0,035$) (E) en tejido cardíaco tras I/R e inyección de NMC-150 o NP Control. N = 5 ratones/grupo. Media $\pm$ DE. Tinción Tricrómica de Masson de secciones cardíacas obtenidas a los 21 días post-I/R e inyectadas con NMC-150 o nanopartículas Control el día 2 tras la reperfusión (F). Barras de escala = 4500 μm . N = 3 ratones/grupo. Media $\pm$ DE.

RESULTADOS SUPLEMENTARIOS

S1. Efecto de la dosis de las hAMSC sobre la mejora cardíaca tras el infarto

Con el fin de optimizar la dosis terapéutica, se evaluaron dos dosis de hAMSC (1×10^5 y 2×10^5 células), administradas por vía intravenosa a los 2 días post-I/R, con monitorización ecocardiográfica de la función cardíaca hasta los 21 días post-I/R.

Ambas dosis indujeron una mejora de la FEVI a los días 7 y 14 post-I/R. En el grupo tratado con 1×10^5 células, la FEVI alcanzó valores de $49,0 \pm 2,83$ en D7 y $56,0 \pm 11,31$ en D14. Sin embargo, a los 21 días se observó una marcada variabilidad interindividual ($48,33 \pm 17,50$), lo que se tradujo en una reducción del valor medio. Por el contrario, la dosis de 2×10^5 células mostró una evolución más consistente, con valores de $56,2 \pm 5,65$ en D7, $64,14 \pm 2,27$ en D14 y $64,5 \pm 2,72$ en D21 (Figura suplementaria 1).

En conjunto, estos resultados respaldan la selección de la dosis de 2×10^5 hAMSC para los experimentos posteriores, debido a su mayor estabilidad y reproducibilidad en la mejora funcional cardíaca.

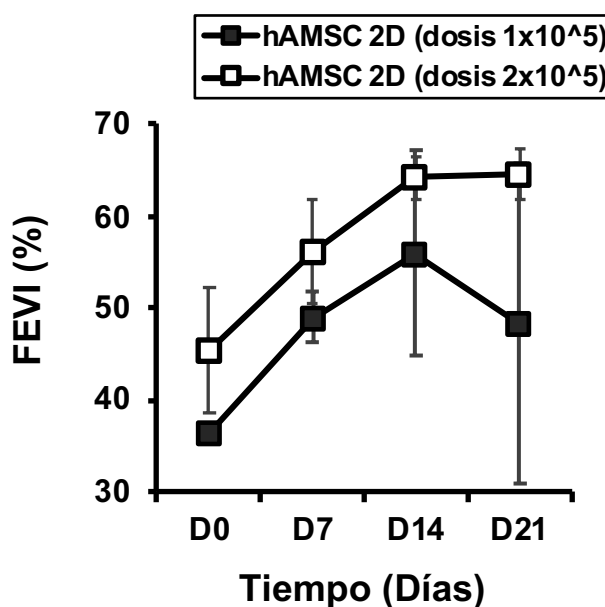


Figura suplementaria 1. Evaluación de dos dosis de hAMSC en la función cardíaca tras I/R. FEVI a los 0, 7, 14 y 21 días tras I/R en ratones tratados con hAMSC administradas en el día 2 post-infarto a dosis de 1×10^5 y 2×10^5 células. N=3 ratones/grupo. Media $\pm$ DE.

S2. Las hAMSC modulan otros microRNAs con potencial cardioprotector asociados a la vía de MIAT

Además de miR-150-5p, se analizaron otros microRNAs relacionados con la cardioprotección. Según la base de datos miRBase, miR-93-3p ha sido señalado como un posible microRNA implicado en la vía patológica orquestada por MIAT tras un infarto agudo de miocardio. En cultivo celular, se confirmó que las hAMSC expresan miR-93-3p en condiciones basales, observándose un incremento en condiciones de hipoxia de 1,7 veces respecto a normoxia ($1,622 \pm 0,099$ vs $0,950 \pm 0,043$) (Figura suplementaria 2A).

En contraste, el contenido de miR-93-3p en las EVs derivadas de hAMSC fue 4,5 veces inferior en condiciones hipóxicas en comparación con normoxia ($0,258 \pm 0,076$ vs $1,170 \pm 0,129$) (Figura suplementaria 2B).

Finalmente, en el modelo in vivo de I/R miocárdica, la administración de hAMSC se asoció con un aumento de miR-93-3p en el tejido cardíaco. En las áreas sanas, los niveles fueron 1,3 veces superiores a los controles ($1,236 \pm 0,460$ vs $0,936 \pm 0,055$), mientras que en las regiones infartadas el incremento alcanzó 1,6 veces los valores del grupo control ($1,579 \pm 0,248$ vs $0,972 \pm 0,060$) (Figura suplementaria 2C).

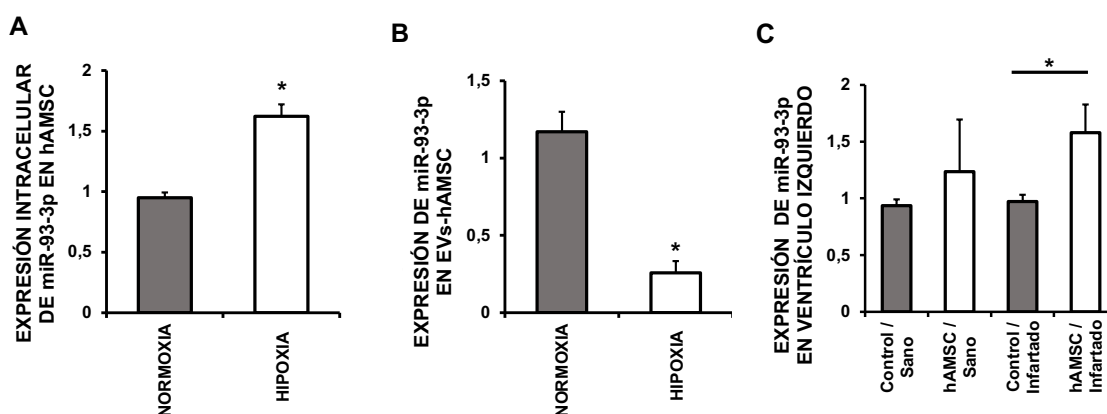


Figura suplementaria 2. Las hAMSC expresan y liberan en EVs miR-93-3p, y aumentan la expresión de miR-93-3p en tejido cardíaco tras un proceso de I/R miocárdica. Expresión intracelular de miR-93-3p en células cultivadas en condiciones de normoxia e hipoxia ($p < 0,02$) (A), en EVs derivadas de hAMSC mantenidas en condiciones de normoxia e hipoxia ($p < 0,001$) (B), expresión de miR-93-3p en zonas infartadas del ventrículo izquierdo 21 días después del proceso de I/R (C). N=5/grupo. Media $\pm$ DE.

DISCUSIÓN

Discusión

El infarto agudo de miocardio (IAM) continúa siendo una de las principales causas de morbimortalidad a nivel mundial, incluso en la era de la reperfusión temprana y de los avances farmacológicos dirigidos a limitar el daño isquémico. Paradójicamente, aunque la restauración del flujo coronario es imprescindible para la supervivencia del miocardio en riesgo, la lesión por isquemia/reperfusión (I/R) se reconoce hoy como un componente patogénico esencial del daño cardíaco. La reintroducción abrupta de oxígeno y nutrientes desencadena una compleja cascada de eventos deletéreos, entre los que se incluyen una intensa respuesta inflamatoria, un incremento significativo del estrés oxidativo, disfunción microvascular, la activación de programas profibróticos y en el peor de los casos la muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis (Mechanic et al., 2025). En conjunto, estos procesos condicionan el remodelado ventricular adverso, la pérdida progresiva de función cardíaca y la evolución hacia insuficiencia cardíaca, lo que subraya la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas que no solo restauren la perfusión, sino que modulen activamente el microambiente postisquémico.

La presente tesis se planteó con el objetivo de evaluar el potencial cardioprotector de las hAMSC, así como de desentrañar los mecanismos moleculares responsables de sus efectos terapéuticos en el contexto de la lesión por I/R. El hallazgo más relevante de esta tesis es haber demostrado que la administración intravenosa de hAMSC mejora significativamente la función cardíaca tras un episodio de I/R miocárdica (véase el apartado 1.2 de *resultados*). La recuperación observada en los parámetros cardíacos de funcionalidad, refleja una preservación funcional del miocardio que se mantiene a lo largo del tiempo de seguimiento; un aspecto que ha sido descrito previamente tras la administración de MSC procedentes de distintas fuentes, tanto en modelos preclínicos como en ensayos clínicos, con resultados de mejora equiparables (Attar et al., 2021; Beitnes et al., 2012). Esta mejoría funcional se acompaña, además, de una reducción clara de la necrosis miocárdica y del remodelado fibrótico, lo que sugiere que las hAMSC no solo atenúan el daño inicial, sino que también modulan procesos patológicos determinantes de la progresión hacia insuficiencia cardíaca (Beitnes et al., 2012; Tripathi et al., 2023; L. Yang et al., 2023). En consonancia con ello, la reducción del tamaño del infarto y del área en riesgo, evidenciada mediante tinciones con azul de Evans/TTC, refuerza la idea de que las hAMSC actúan de forma temprana sobre mecanismos de muerte celular y preservación tisular, generando un efecto cardioprotector integral (funcional, estructural y molecular) que posiciona a estas células como una estrategia terapéutica prometedora frente al daño inducido por la I/R.

Discusión

Este efecto observado por las hAMSC se obtuvo tras la administración intravenosa de las células en los modelos de I/R miocárdica. Esta vía fue seleccionada frente a la intracoronaria o intramiocárdica por ofrecer mayor reproducibilidad y facilidad de estandarización (Bagno et al., 2022; J. Zhang et al., 2015), lo que favorece la extrapolación del tratamiento con hAMSC en otros modelos preclínicos, y su potencial traslación clínica (Dong et al., 2012; Liang et al., 2023). A pesar de que este tipo de administración no permite la introducción de las células inmediatamente en el microambiente post-infarto, reduce variabilidad técnica y riesgos asociados a la realización de un mayor número de intervenciones quirúrgicas invasivas en el animal.

Además del uso de la vía intravenosa como mecanismo de reproducibilidad de nuestro estudio, decidimos reforzar el concepto de especificidad mediante la utilización de controles experimentales que consideramos significativos para este tipo de experimentación. Concretamente, y además de inyectar los animales con el vehículo libre de células, llevamos a cabo los mismos ensayos mediante la inyección intravenosa de fibroblastos murinos NIH/3T3, por ser un tipo celular no descrito previamente como efector cardioprotector en el corazón infartado y sin propiedades tróficas conocidas (Frangogiannis, 2016). La aproximación de utilizar otras células no relacionadas con efecto terapéutico, ha sido llevada a cabo con anterioridad por otros grupos de investigación para aportar mayor robustez a la especificidad de la terapia celular (Luger et al., 2017; van der Bogt et al., 2008); no obstante, y aunque algunos estudios también utilizan este abordaje, la mayoría de trabajos de investigación tienen a utilizar únicamente el vehículo de resuspensión celular (PBS o DMEM) (Gao et al., 2015; Mokhtari et al., 2020; Noiseux et al., 2006; Rasmussen et al., 2014; F. Zhu et al., 2022). La ausencia de beneficio en estos grupos (PBS y NIH/3T3) nos permitió descartar efectos inespecíficos asociados a la administración intravenosa, al procedimiento o a la mera presencia de células circulantes, y apoya que la respuesta terapéutica observada es atribuible a propiedades biológicas específicas de las hAMSC. Este punto es particularmente relevante en el campo de la terapia celular cardiovascular, donde la heterogeneidad de resultados y la dificultad para establecer relaciones causales claras han sido obstáculos recurrentes para la traslación clínica: en este caso, el diseño con controles celulares y no celulares aporta un nivel adicional de rigor, fortalece la validez interna del estudio y refuerza la interpretación mecanística posterior, como ya hemos mencionado en el caso de trabajos previos relacionados con nuestra propuesta (Luger et al., 2017; van der Bogt et al., 2008).

Discusión

A principios de los años 2000, Orlic et al. describieron por primera vez la capacidad de las células derivadas de médula ósea para diferenciarse en células cardíacas en la zona necrosada de un modelo de infarto agudo de miocardio (Orlic et al., 2001). Este hallazgo tuvo un gran impacto en la comunidad científica y dio lugar al concepto de regeneración cardíaca mediada por células adultas. Posteriormente, diversos estudios propusieron que las células mesenquimales estromales, o MSC, derivadas de médula ósea también poseían capacidad regenerativa cardíaca en modelos similares de infarto de miocardio (Kawada et al., 2004; Pei et al., 2017; Quevedo et al., 2009; T. Wang et al., 2012). Sin embargo, investigaciones posteriores pusieron de manifiesto la baja reproducibilidad de estos resultados iniciales. Estos trabajos sugirieron que las observaciones previas podían deberse, al menos en parte, a fenómenos de fusión celular, capaces de generar artefactos que llevaban a interpretar erróneamente que poblaciones celulares heterogéneas derivadas de médula ósea se diferenciaban en cardiomiocitos (Murry et al., 2004; Terada et al., 2002).

A pesar de ello, la administración de MSC seguía asociándose con una mejora funcional y estructural del tejido cardíaco tras el infarto. Por este motivo, el estudio de los mecanismos responsables de la cardioprotección inducida por MSC se convirtió en un foco importante de investigación.

Un hallazgo clave de esta tesis es la demostración de que la cardioprotección inducida por hAMSC es independiente de su anidamiento o integración sostenida en el miocardio lesionado; resultado, a priori inesperado, ya que contrasta con estudios realizados con otras MSC de distinto origen (Passipieri et al., 2014). Este resultado se vio reforzado gracias a la detección residual para marcadores específicos de este tipo celular, como es el antígeno de estado específico de embrión-4 (del inglés *Stage-Specific Smbryonic Antigen-4*, SSEA-4), hecho confirmado metodológicamente mediante la creación de hAMSC positivas para la proteína verde fluorescente (GFP) mediante infección lentiviral con un plásmido de expresión de GFP (ver la sección metodológica), con resultados claramente negativos. El dato obtenido gracias a esta aproximación es coherente con la creciente evidencia que indica que los beneficios terapéuticos de las MSCs derivan fundamentalmente de mecanismos paracrinos, más que de la mera diferenciación directa hacia cardiomiocitos (Bagno et al., 2022; Bhaskara et al., 2023; Mabotuwana et al., 2022). Si comparamos nuestra investigación con otros trabajos similares, nuestro estudio aporta un grado relevante de novedad, tanto desde el punto de vista metodológico como por la originalidad del planteamiento experimental. En particular, la ausencia de células positivas para marcadores celulares específicos no permite

Discusión

descartar por completo la posible anidación de las células administradas ni su posterior transdiferenciación dentro del miocardio. Sin embargo, esta hipótesis no se ve respaldada por los ensayos de transducción viral realizados con hAMSC GFP positivas. La ausencia de señal de proteína verde fluorescente en las secciones histológicas de los corazones tratados apoya la idea de que las hAMSC no anidan de forma estable en el tejido cardíaco y, por tanto, hace aún menos probable una posterior transdiferenciación celular.

La infección lentiviral de MSC para inducir la expresión constitutiva de GFP se ha utilizado previamente para estudiar la distribución, migración y persistencia celular en distintos modelos patológicos (Bobi et al., 2017; Chin et al., 2024; Devine et al., 2003; Z. Li et al., 2011). No obstante, hasta donde conocemos, nuestro trabajo constituye la primera aplicación de esta estrategia en hAMSC en un modelo de infarto de miocardio. Este enfoque refuerza la solidez de nuestros resultados, ya que permite evaluar de forma directa la presencia o ausencia de las células administradas en el tejido cardíaco lesionado.

En conjunto, nuestros datos apoyan un cambio de paradigma en la terapia celular cardiovascular. Las células administradas no actuarían necesariamente como unidades de reemplazo estructural o funcional, sino como auténticas “plataformas biológicas” capaces de liberar señales reparadoras y modular el entorno tisular lesionado. Desde esta perspectiva, el beneficio terapéutico de las hAMSC estaría más relacionado con su actividad paracrina e inmunomoduladora que con su integración estable o transdiferenciación en células cardíacas.

Este cambio conceptual que acabamos de describir tiene profundas implicaciones traslacionales y abre la puerta al posible uso de estrategias basadas en la utilización de productos celulares con efectos homólogos a la inyección celular sin los efectos secundarios derivados de su administración. De hecho, la independencia del uso celular y, más aún, su anidamiento en el hospedador, pueden reducir significativamente los efectos indeseados de cara a la traslación al paciente, entre los que se encuentran la integración celular aberrante (Breitbach et al., 2007), la generación de comportamientos arritmogénicos, o la transformación tumoral (Patel et al., 2025). Por todos estos hechos, y en virtud de nuestros resultados, y los previamente descritos en otras investigaciones directa o indirectamente relacionadas con la nuestra, se abre la puerta de manera novedosa al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más seguras y controlables basadas en productos celulares aislados. En este contexto, la presente tesis identifica

Discusión

a las vesículas extracelulares (EVs), y específicamente a los exosomas, como mediadores centrales de los efectos cardioprotectores de las hAMSC.

Las EVs son nanopartículas bilipídicas capaces de transferir distintas sustancias, entre las que podemos incluir ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos entre células, desempeñando un papel fundamental en la comunicación intercelular en condiciones fisiológicas y patológicas (Boilard, 2018; Cheng & Hill, 2022; Tkach & Théry, 2016). En este sentido, su utilización en patologías cardiovasculares ya ha sido extensivamente realizada (Bian et al., 2014; Costa et al., 2022; El Harane et al., 2018) con resultados generalmente positivos sobre la funcionalidad cardíaca. En nuestro caso, la administración directa de EVs derivadas de hAMSC fue capaz de reproducir gran parte del fenotipo cardioprotector observado con la terapia celular completa, lo que refuerza su papel como efectores funcionales y sitúa a las EVs como una alternativa terapéutica libre de células con un alto potencial traslacional. Este enfoque se alinea, además, con una tendencia creciente en el campo de la medicina regenerativa, respaldada por estudios recientes que destacan el valor terapéutico de estrategias basadas en productos paracrinós frente a la administración celular directa (Balbi & Bollini, 2017; D'souza et al., 2015; Pittenger et al., 2019). Este enfoque permite conservar los beneficios paracrinós de la terapia celular, minimizando los riesgos derivados de la administración celular (Timmers et al., 2008).

Como anteriormente hemos comentado, las EVs son capaces de ejercer un efecto biológico gracias a la liberación de distintos componentes en órganos y tejidos (Cheng & Hill, 2022; Théry et al., 2018). En nuestro caso, y debido a la naturaleza de la patología del estudio, puede ser considerablemente interesante explorar la naturaleza de las EVs liberadas por las hAMSC en respuesta tanto a la hipoxia resultante tras la oclusión coronaria, como a la inflamación que tiene lugar tras la hipoxia. En relación con esto, nuestros resultados muestran que, bajo estas dos variables, las hAMSC liberan EVs cargadas con microRNAs como carga con actividad biológicamente relevante, entre los que destaca de forma consistente el microRNA miR-150-5p (Aonuma et al., 2022; Kawaguchi et al., 2023; Y. Tang et al., 2015). Considerando que los niveles de expresión intracelular de miR-150-5p son menores en hipoxia, y que la cuantificación de este microRNA en las EVs procedentes de células cultivadas en estas mismas condiciones muestra el patrón opuesto, nos permite sugerir que, bajo condiciones hipóxicas, las células podrían favorecer la transferencia de miR-150-5p al medio extracelular a través de la secreción de EVs. No obstante, serían necesarios estudios adicionales para dar

Discusión

validez a este fenómeno, como ha sido previamente demostrado en MSC de distinto origen al nuestro (Yuan et al., 2025).

Uno de los hallazgos centrales de nuestro trabajo supone el descubrimiento de miR-150-5p, como eje mecanístico en la cardioprotección que las hAMSC ejercen en el corazón infartado, a través del eje MIAT/miR-150-5p/HOXA-4, como una ruta reguladora clave del remodelado cardíacopostisquémico. El ARN largo no codificante MIAT ha sido identificado previamente como un regulador patológico relevante en el contexto cardíaco, asociado con una mayor susceptibilidad a desarrollar insuficiencia cardíaca (C. Yang et al., 2022). MIAT, como ya hemos descrito, actúa como un ARN esponja que secuestra distintos microRNAs entre los que figura el propio miR-150-5p, reduciendo de esta forma su disponibilidad funcional (Aonuma et al., 2022; C. Yang et al., 2022; X.-H. Zhu et al., 2016). Nuestros datos demuestran que la administración de hAMSC restablece el equilibrio de este eje molecular, incrementando los niveles de miR-150-5p, reduciendo por consiguiente la acción MIAT y suprimiendo la expresión del factor de transcripción profibrótico HOXA-4. Este hallazgo es especialmente relevante por estar en línea con estudios previos que han identificado al miR-150-5p como un regulador cardioprotector capaz de atenuar el remodelado adverso post-infarto, lo que demuestra que MIAT promueve el remodelado cardíaco patológico, mientras que miR-150 contrarresta sus efectos y reprime directamente al factor profibrótico HOXA-4 (Aonuma et al., 2022). Sin embargo, la novedad de nuestro trabajo claramente reside en la cuantificación de MIAT en tejido cardíaco, no observando diferencias significativas entre los grupos tratados y controles en las zonas infartadas, lo cual es coherente con el papel descrito de MIAT como regulador *upstream* (aguas arriba en español) de miR-150. Sin embargo, en las regiones sanas se evidenció una reducción de MIAT en los animales tratados con hAMSC, abordaje no contemplado en los estudios previos (Aonuma et al., 2022). Por todo ello, nuestros hallazgos sugieren que la administración de hAMSC podría limitar la extensión de la lesión necrótica y atenuar la activación de rutas patológicas asociadas al remodelado adverso tras el infarto.

Desde un punto de vista conceptual, la estrategia terapéutica propuesta en esta tesis guarda claros paralelismos con mecanismos ya consolidados en la clínica. En el eje PCSK9–LDLR, la inhibición de PCSK9 no induce la síntesis de nuevos receptores, sino que aumenta su disponibilidad funcional al evitar su secuestro y degradación (Abifadel et al., 2003; Lagace, 2014). De forma similar, en el ámbito cardiovascular, diversas intervenciones terapéuticas han demostrado que incrementar la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) permite contrarrestar su inactivación por estrés oxidativo, sin

Discusión

necesidad de eliminar directamente las especies reactivas responsables (Pepine, 2009; Saura et al., 2005). En esta línea, la administración de miR-150-5p contenido en EVs podría interpretarse como una estrategia equivalente a nivel postranscripcional, en la que el aumento de la disponibilidad funcional del microRNA permite superar su secuestro por MIAT y restablecer la regulación de dianas profibróticas como HOXA-4, favoreciendo la cardioprotección postisquémica. De hecho, esta modulación molecular se correlaciona de forma directa con la reducción de la fibrosis miocárdica y la mejora funcional observada, lo que confiere una fuerte coherencia a los resultados y apoya una relación mecanística significativa.

La relevancia causal de miR-150-5p en este proceso queda firmemente establecida mediante el uso de hAMSC deficientes en este microRNA, generadas en nuestro laboratorio mediante edición génica con la tecnología CRISPR/Cas9. En este contexto, la pérdida de miR-150-5p redujo significativamente los efectos cardioprotectores de las hAMSC, incrementando el remodelado adverso y eliminando la mejora funcional cardíaca, lo cual sitúa nuestros resultados en la misma línea de evidencia científica que la ejercida previamente en ensayos de trasplante de médula ósea procedente de ratones knockout para este microRNA (Z. Liu et al., 2015). La novedad de nuestros resultados sobre otras investigaciones radica en el establecimiento del efecto sobre el eje MIAT/miR-150-5p/HOXA-4. Sin embargo, este trabajo no es el punto final de nuestra investigación, al haber comprobado otros autores la relevancia de este miRNA sobre la inmunomodulación postisquémica, mediante la inhibición de rutas inflamatorias clave, las más significativas la de STAT1 y NF- κ B, y reducir la producción de citocinas proinflamatorias (Antonakos et al., 2022). Por tanto, el siguiente paso de nuestra investigación será determinar si, en nuestro sistema experimental, las hAMSC ejercen un efecto cardioprotector análogo a través de miR-150-5p, contribuyendo así a la mejora de la función cardíaca tras el infarto.

Si bien es cierto que serían necesarios estudios adicionales que evalúen de forma sistemática la implicación de la delección de miR-150-5p en distintos tipos celulares, con el fin de determinar si su deficiencia podría alterar rutas implicadas en la biogénesis o liberación de vesículas extracelulares, los datos disponibles hasta la fecha indican que el silenciamiento o *knockout* de este microRNA no compromete la viabilidad celular ni induce cambios fenotípicos evidentes. De hecho, el ratón *knockout* para miR-150-5p es viable y es capaz de sobrevivir ante eventos adversos (Aonuma et al., 2022; Fan et al., 2022; Z. Liu et al., 2015). En este sentido, estudios previos en los que se ha delecionado miR-150-5p describen de forma concordante con nuestros resultados, la ausencia de

Discusión

alteraciones en la proliferación celular o incrementos en la muerte celular, sin que se haya descrito previamente de manera consistente una pérdida de la actividad paracrina asociada su eliminación (Chirichella et al., 2022; Smith et al., 2015; Vidigal & Ventura, 2015). Por todo ello, nuestros hallazgos, aparte de ser los primeros que se han obtenido a partir del silenciamiento de miR-150-5p mediante edición génica, apoyan la interpretación de que la pérdida de eficacia terapéutica observada en nuestras hAMSC deficientes en miR-150-5p no se debe a un deterioro global de la funcionalidad celular, sino a la ausencia específica de este microRNA como efector molecular clave. Sería necesario en nuestro caso, poder evaluar sobre la función cardíaca, el efecto que pudieran tener las células editadas que sobreexpresaran ectópicamente miR-150-5p, o las EVs derivadas de las mismas, como validación definitiva y exclusiva al miRNA del efecto cardioprotector. Adicionalmente, tal y como demostraron la viabilidad previa del ratón deficiente para miR-150 (Aonuma et al., 2022; Fan et al., 2022; Z. Liu et al., 2015), la otra aproximación supondría infartar al animal *knockout* e inyectar la hAMSC wild type, o las hAMSC deficientes para miR-150-5p y alternativamente trabajar en un entorno libre de células mediante la inyección de las EVs de los dos tipos celulares.

En lo que respecta a las células hAMSC editadas, podría plantearse si el diseño de las guías utilizadas para la delección del locus *MIR150*, localizado en el cromosoma 19 (19q13.33) dentro de una región intergénica, podría afectar a otros elementos genómicos y, por ende, influir indirectamente en la actividad celular. En este punto resulta pertinente detallar el uso de un sistema previamente descrito por otros investigadores (Chirichella et al., 2022), basado en una estrategia de doble guía, que permite la eliminación eficiente del precursor completo del microRNA. Aunque dicho trabajo no especifica las secuencias exactas de las guías empleadas, sí describe un diseño dirigido a regiones flanqueantes del precursor, garantizando la actividad del sistema CRISPR/Cas9 mediante la presencia de la secuencia PAM (del inglés, *Protospacer Adjacent Motif*), requisito indispensable para la inducción de roturas de doble cadena y la generación de un *knockout* funcional.

Nuestra investigación ha desvelado uno de los mecanismos que están implicados en la cardioprotección ejercida por las hAMSC tras el infarto. No obstante, y aunque esta es la primera evidencia del efecto de este tipo celular sobre la función cardíaca, no podemos excluir mecanismos adicionales que pueden contribuir a la cardioprotección de los ratones infartados. Múltiples estudios han indicado que las MSC procedentes de distintos tejidos liberan diversas moléculas con acciones beneficiosas sobre el tejido cardíaco post-isquémico, tales como el factor proangiogénico VEGF (Y. L. Tang et al.,

Discusión

2004), y factores tróficos como IGF-1 y HGF (Gómez-Mauricio et al., 2016), capaces de promover la neovascularización y la reparación del tejido isquémico. De la misma forma, otros autores han resaltado de forma análoga a nuestra investigación, que las MSC son capaces de secretar mediante EVs diversos miRNAs, tales como miR-21, miR-19a o miR-210, los cuales contribuyen a la reducción de la apoptosis, la fibrosis y el tamaño del infarto (Keshtkar et al., 2018). Como ejemplos concretos, podemos destacar el efecto cardioprotector de los exosomas de células madre mesenquimales de médula ósea murina inyectados en ratas de manera intracoronaria con el miR-125b, inhibiendo SIRT7 (Q. Chen et al., 2020), o el efecto su administración intravenosa con miR25-3p, a través de la inhibición de la ruta de señalización JAK2/STAT3 (J. Du et al., 2024). De manera adicional, la inyección intravenosa de exosomas provenientes de células mesenquimales de cordón umbilical humano en ratas infartadas proporciona un efecto cardioprotector a través del efecto de miR-19a contenido en las vesículas y reduce el factor SOX6 con la consiguiente activación de la señalización mediada por la activación de Akt (Huang et al., 2020). Como ejemplos adicionales, también podemos destacar el efecto de células embrionarias de origen murino, con un marcado efecto protector a través de su efecto sobre el miR-294 cardíaco (Khan et al., 2015), o el efecto que proporcionan las células mesenquimales de tejido adiposo murino a través de su efecto sobre el miR-205 y su efecto promotor de angiogénesis (T. Wang et al., 2023).

Nuestros resultados también ponen de manifiesto la modulación de otros microRNAs, como es el caso del miR-93-3p, lo que sugiere, teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, la existencia de redes reguladoras complejas y redundantes que contribuyen al efecto terapéutico global. Esta observación es coherente con la naturaleza multifactorial del daño por I/R y subraya la necesidad de considerar enfoques terapéuticos capaces de modular las redes de interacciones moleculares completas, en lugar de centrarse en dianas aisladas. En definitiva, todos estos ejemplos de mecanismos de cardioprotección frente al infarto, nos inducen a la necesidad de continuar con nuestra investigación más allá del descubrimiento de distintos efectores, y de esta forma profundizar en las necesarias y aun inexploradas vías de señalización derivadas de su administración con el objetivo último de aportar nuevas dianas terapéuticas que los productos de la hAMSC pueden ejercer en respuesta al infarto, tal y como se ha podido contrastar con otras células mesenquimales (Othman Basri et al., 2026). Aunque nuestros resultados demuestran que miR-150-5p constituye un mediador clave en la acción cardioprotectora de las hAMSC, no puede descartarse que dicho efecto se vea potenciado por la acción sinérgica de otras moléculas presentes en su secretoma. En este sentido, la complejidad de las vesículas extracelulares sugiere que

Discusión

la respuesta terapéutica observada podría deberse a la interacción coordinada de múltiples factores bioactivos.

Un aspecto de especial relevancia potencial para su aplicación clínica es la clara dependencia temporal de la eficacia terapéutica derivada de la administración de hAMSC. En concreto, la administración realizada en una fase temprana post-infarto, correspondiente al periodo de transición entre la respuesta inflamatoria aguda y el inicio del remodelado tisular (Frangogiannis, 2014; Yin et al., 2023), resultó significativamente más eficaz que aquellas realizadas en fases más tardías. Cabe resaltar que, en otros tipos de células mesenquimales, se ha demostrado que la administración temprana tras el infarto puede asociarse con mayores beneficios funcionales. En particular, algunos estudios observaron una mejora más evidente de la función miocárdica cuando se emplearon MSC derivadas de médula ósea una semana después del infarto (X. Hu et al., 2007; Jiang et al., 2008; L. Yang et al., 2023). Asimismo, estudios comparativos con MSC derivadas de tejido adiposo también han mostrado que su administración inmediatamente después del infarto favorece en mayor medida los procesos de neovascularización (Rigol et al., 2014). No obstante, hasta donde conocemos, la definición de una ventana temporal óptima para la administración de MSC derivadas de placenta en el contexto del infarto de miocardio no ha sido abordada previamente por otros investigadores. Esta aproximación metodológica nos ha permitido identificar la existencia de una ventana terapéutica crítica en el periodo post-infarto temprano, durante la cual el miocardio lesionado presenta una mayor susceptibilidad a intervenciones reparadoras (U.S. National Library of Medicine, 2025).

Desde un punto de vista fisiopatológico, esta fase temprana se caracteriza por una elevada plasticidad biológica del tejido cardíaco, en la que coexisten procesos de muerte celular, una intensa respuesta inflamatoria y un remodelado dinámico de la matriz extracelular aún no consolidado de forma irreversible (Ushakov et al., 2020). La activación temprana de programas endógenos de reparación y la ausencia de una cicatriz fibrosa madurada, configuran un entorno en el que las señales terapéuticas pueden modular de manera más eficaz el “destino” celular y tisular, y por el contrario, en fases más avanzadas post-infarto predomina un fenotipo fibrótico establecido (Yin et al., 2023), con menor capacidad de reversión del daño estructural, lo que limita el impacto de intervenciones tardías.

Las hAMSC presentan características biológicas únicas que las diferencian de las MSCs adultas derivadas de médula ósea o tejido adiposo. Su origen fetal les confiere un perfil

Discusión

secretor particularmente rico en factores implicados en angiogénesis, remodelado tisular e inmunomodulación (Omar et al., 2019; Shin et al., 2021). Además, su bajo nivel de expresión de moléculas del MHC clase I y la ausencia de moléculas coestimuladoras necesarias para la activación de linfocitos T les otorgan un fenotipo inmunológicamente privilegiado (Boyle et al., 2010; Q.-W. Liu et al., 2021; Tsuji et al., 2010; Zhao et al., 2005). Este perfil inmunoevasivo permite la administración alogénica de hAMSC sin necesidad de inmunosupresión, lo que representa una ventaja sustancial adicional desde el punto de vista traslacional (Götherström et al., 2004).

En el caso del tipo celular de la presente tesis, la mayor eficacia observada tras la administración temprana de hAMSC podría estar estrechamente relacionada con su mecanismo de acción predominantemente paracrino. Durante este periodo, el miocardio se encuentra inmerso en una intensa actividad de comunicación intercelular, caracterizada por la liberación y captación activa de señales extracelulares, incluyendo vesículas extracelulares y microRNAs, lo que podría favorecer la captación y amplificación de los efectos terapéuticos (Deddens et al., 2016). Una vez instaurado un remodelado fibrótico avanzado, la capacidad de estas señales para reprogramar el tejido lesionado se ve considerablemente reducida. Además de esto, el miR-150-5p tiene una acción fundamental sobre los miofibroblastos, por lo que, la modulación temprana de los mismo evitaría la formación de esta mencionada cicatriz estable no contráctil (Aonuma et al., 2022). En conjunto, estas evidencias refuerzan la noción de que el éxito de las terapias celulares no depende únicamente del tipo celular empleado, sino también del estado biológico del tejido receptor en el momento de la intervención y de la capacidad de evasión del sistema inmunológico.

Desde una perspectiva aplicada a la traslación de nuestros resultados, como ya hemos discutido en profundidad, estos hallazgos subrayan la importancia de considerar el momento de administración como una variable crítica en el diseño de futuros ensayos clínicos, ya que la heterogeneidad temporal post-infarto podría contribuir a la variabilidad de resultados observada en estudios previos. En este contexto es importante destacar que las estrategias basadas en vesículas extracelulares o en nanopartículas cargadas con los agentes causales de la cardioprotección, en nuestro caso el miR-150-5p, podrían ofrecer ventajas adicionales, al permitir una mayor flexibilidad en la administración y un control más preciso del momento terapéutico, facilitando potencialmente la ampliación de esta ventana de intervención (Goyal et al., 2025). A este respecto, y aprovechando la experiencia de nuestro grupo de investigación en el campo, la presente tesis extiende estos hallazgos hacia un enfoque nanoteranóstico,

Discusión

demostrando que la liberación dirigida de miR-150-5p mediante nanopartículas diseñadas en nuestro laboratorio (a las que hemos denominado NMC-150), es capaz de reproducir de forma significativa los efectos funcionales y antifibróticos previamente observados con la administración tanto de las hAMSC como de sus vesículas extracelulares, lo cual, no solo refuerza el papel central del miR-150-5p como efector molecular clave de la cardioprotección mediada por las hAMSC, sino que, valida la posibilidad de separar el efecto terapéutico de la administración celular, identificando al miR-150-5p como una diana suficiente para modular el remodelado post-isquémico, reduciendo la variabilidad inherente a los sistemas celulares y facilitando la estandarización del tratamiento.

El uso de nanopartículas ofrece ventajas claras desde una perspectiva traslacional, al permitir un control más preciso de la dosis administrada, una mayor reproducibilidad entre lotes y una escalabilidad más eficiente del proceso de producción, además de aportar una mayor flexibilidad en los esquemas de administración (Desai et al., 2025). Además, en función de cómo han sido decoradas, el uso de las nanopartículas nos permiten llevar a cabo de manera muy eficaz procesos totalmente necesarios para su traslación a la clínica, incluyendo la biodistribución, curvas de supervivencia en el hospedador, farmacocinética y toxicidad (Cuadrado, Piedras, et al., 2016), así como nos pueden permitir su detección invasiva y no invasiva, lo que supone una ventaja significativa de cara a la traslación a la clínica (Ramírez et al., 2019; Ramirez-Carracedo et al., 2022). Todas estas características contribuyen a superar algunas de las limitaciones inherentes a la terapia celular convencional, tales como la baja supervivencia celular tras la administración, la variabilidad interdonante o los posibles efectos no deseados asociados al uso de células vivas. Si bien las hAMSC presentan ventajas evidentes frente a otras fuentes de MSCs, incluyendo un perfil inmunoelusivo favorable, una mayor facilidad de manipulación y la ausencia de controversias éticas al proceder de un tejido “de desecho” postparto (de Laorden et al., 2025); la transición hacia estrategias basadas en nanotecnología permitiría abordar y reducir de forma adicional los desafíos previamente mencionados, reforzando así el potencial traslacional de esta aproximación que en función de la composición de la nanopartícula y la patología en estudio, su utilización puede ser terapéutica, más allá de su mera detección o su efecto sobre el tratamiento (Cuadrado, Piedras, et al., 2016).

Desde una perspectiva mecanística, y en base a nuestra experiencia en el campo, el uso de nanopartículas vehiculizadas mediante un péptido análogo a IL-10, y cargadas con un mimético para el miR-150-5p (a la que hemos denominado NMC-150), es una

Discusión

alternativa claramente novedosa y coherente para facilitar la entrega de miR-150 en el tejido cardíaco post-I/R. En los últimos años, se han llevado a cabo múltiples aproximaciones utilizando la nanotecnología para transportar miméticos de microRNAs como principio terapéutico en diversas patologías (S. W. L. Lee et al., 2019). Como ejemplos, cabe destacar el uso de MRX34, nanopartícula liposomal con miR-34a para el tratamiento de tumores sólidos (Hong et al., 2020), o nanopartículas con miméticos de miR-21 dirigidas frente a macrófagos proinflamatorios para mejorar el remodelado post-isquémico (Bejerano et al., 2018). Otro ejemplo lo constituyen las nanopartículas funcionalizadas con el péptido RGD, que permiten dirigir las nanopartículas y el miR-133 hacia la superficie de células que expresan integrinas, como mecanismo de direccionamiento específico de las mismas, habiéndose testado con éxito en procesos de isquemia o angiogénesis (Sun et al., 2020). De la misma forma, sistemas basados en sílice mesopora con miméticos de miR-199a (H. Yang et al., 2019), o de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PGLA) para miR-145 (Nishio et al., 2019), también han sido empleados con distinto grado de éxito.

Un aspecto relevante a considerar en la evaluación funcional de NMC-150 es que la nanopartícula empleada como vehículo del mimético de miR-150 presenta por sí misma un efecto terapéutico previamente validado, derivado de la presencia de un péptido análogo de IL-10 que activa la vía STAT3/NF- κ B, reduciendo la inflamación, la fibrosis y el daño miocárdico (Tesoro et al., 2022). Este hecho podría introducir un sesgo en la interpretación de los resultados, ya que el grupo control constituye en sí mismo una intervención terapéutica, como así resultó, aunque sobre el efecto en el eje MIAT/miR-150/HOXA4, el uso de NMC-150 resultó un acierto significativo. Por este motivo, la presente Tesis Doctoral aporta por vez primera a la comunidad científica una nueva herramienta de eficacia adicional para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria como es el infarto agudo de miocardio, en donde la síntesis de nanopartículas capaces de frenar la respuesta inflamatoria, combinada con el transporte y liberación de moléculas, como en este caso miR-150-5p, con un marcado efecto terapéutico detectado en nuestro trabajo y por otros investigadores (Aonuma et al., 2021; Lin et al., 2019) ejercen un efecto terapéutico significativo y superior al de otros tratamientos descritos previamente.

Cabe resaltar que NMC-150, como se ha mencionado, es una nanopartícula derivada de NIL10, cuyos procesos de desarrollo se encuentran patentados y actualmente en trámite para su aplicación y evaluación bajo condiciones estándar internacionales de calidad, GMP (del inglés *Good Manufacturing Practice*) y GLP (del inglés *Good*

Discusión

Laboratory Practice). En este contexto, la posible extensión de dicha patente a su versión como vehículo para la administración del mimético de miR-150-5p refuerza la viabilidad de una extrapolación clínica más plausible de esta estrategia terapéutica. En su conjunto, la modulación terapéutica del eje MIAT/miR-150-5p/HOXA-4 mediante nanopartículas posiciona esta estrategia como una aproximación prometedora para limitar el daño inducido por la isquemia/reperfusión y frenar la progresión hacia insuficiencia cardíaca, estableciendo un puente sólido entre la terapia celular, la biología de vesículas extracelulares y la nanomedicina.

Conviene destacar que, el modelo murino de isquemia/reperfusión empleado en la presente tesis constituye una herramienta experimental ampliamente validada para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares implicados en el daño post-infarto (Zaragoza et al., 2011), así como para la evaluación preclínica de nuevas aproximaciones terapéuticas. Este modelo permite recapitular de manera controlada los principales eventos fisiopatológicos que ocurren tras la oclusión coronaria y la posterior reperfusión, incluyendo la necrosis miocárdica, la respuesta inflamatoria aguda, la activación de vías de remodelado de la matriz extracelular y la disfunción ventricular progresiva, lo que lo hace especialmente adecuado para evaluar terapias restaurativas y paracrinas, como las basadas en células madre mesenquimales. No obstante, y a pesar de estas ventajas, es necesario reconocer que este modelo no reproduce completamente la complejidad de la fisiopatología cardíaca humana, particularmente en lo que respecta a la respuesta inmune, la remodelación tisular y los resultados funcionales a largo plazo (Rossello et al., 2019; Saura et al., 2022). En este sentido, el uso de modelos genéticos, como ratones deficientes para miR-150 (Aonuma et al., 2022), permitiría evaluar de manera más precisa la contribución específica de las hAMSC como fuente exógena de este microRNA, e incluso el testado en el modelo de las EVs y de NMC-150 cargados con dicho microRNA y reforzar la asociación causal observada. Asimismo, la validación de estos hallazgos en modelos animales de mayor tamaño y mayor similitud fisiológica con el ser humano, como es el caso del modelo porcino de infarto de miocardio mediante inflado de balón de angioplastia, aportaría un valor significativo desde el punto de vista funcional y traslacional (Kleinbongard et al., 2024; Ramirez-Carracedo et al., 2022). Aunque estudios previos han relacionado miR-150 con una mejor recuperación de la función ventricular tras infarto de miocardio tanto en modelos animales como en humanos (Nagy et al., 2025), la evaluación de estrategias basadas en la administración exógena de miR-150 mediante hAMSC o nanopartículas en estos modelos avanzados resulta esencial para avanzar hacia su potencial aplicación clínica.

Discusión

La evidencia generada en esta tesis demuestra por vez primera que las hAMSC ejercen su efecto cardioprotector fundamentalmente a través de mecanismos paracrinos mediados por vesículas extracelulares y microRNAs, con un papel central del eje MIAT/miR-150-5p/HOXA-4 en la regulación del remodelado post-isquémico en un modelo murino de I/R. Estos hallazgos aportan una comprensión mecanística profunda del efecto terapéutico de las hAMSC, además de que presentan bases sólidas respecto a tiempos y dosis de administración, detallando ventanas terapéuticas no descritas hasta el momento en este grupo celular, y todo ello aportando el valor maspreciado de cara a su implantación en la clínica: aportando el valor funcional y estructural derivado de su administración en el animal infartado. Asimismo, nuestros resultados confirman de manera inequívoca que el efecto terapéutico de las hAMSC está mediado por mecanismos paracrinos a través de EVs, sin evidencia de integración aberrante en el tejido. De forma paralela, hemos establecido una relación causal directa entre la restauración de los niveles de miR-150, y el efecto cardioprotector observado, posicionando este microRNA como un regulador clave del remodelado postisquémico. En este contexto, la presente tesis no solo aporta conocimiento mecanístico, también propone estrategias terapéuticas innovadoras y extrapolables basadas en nanoterapia y en la modulación de ARN no codificantes, sentando un marco conceptual sólido para el desarrollo de nuevas aproximaciones reparativas con elevado potencial traslacional en el tratamiento del infarto agudo de miocardio.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La administración intravenosa de las hAMSC empleadas en esta Tesis Doctoral en un modelo murino de I/R miocárdica ejerce un efecto cardioprotector significativo, evidenciado por la mejoría de la función sistólica ventricular izquierda y por la reducción del daño estructural cardíaco postisquémico.
2. El tratamiento con hAMSC atenúa el remodelado cardíaco adverso tras la I/R, disminuyendo de forma significativa la necrosis miocárdica, el tamaño de infarto y la fibrosis cardíaca.
3. La eficacia terapéutica de las hAMSC depende del momento de administración tras el episodio isquémico. En particular, la intervención temprana (2 días post-I/R) fue la que mostró un mayor beneficio tanto funcional como estructural.
4. La cardioprotección inducida por hAMSC no depende de su anidamiento prolongado en el tejido miocárdico lesionado, ya que no se evidenció una integración significativa de estas células en el corazón tras su administración, apoyando de este modo un mecanismo de acción predominantemente paracrino.
5. Las EVs-hAMSC reproducen en gran medida el efecto cardioprotector observado con la terapia celular, y sugiere que actúan como mediadores funcionales clave de la acción biológica de las hAMSC y posicionándolas como una alternativa terapéutica libre de células.
6. Las hAMSC expresan miR-150-5p y lo liberan a través de EVs, observándose una secreción especialmente enriquecida en condiciones de hipoxia e inflamación, semejantes a las del microambiente generado tras el IAM.
7. Las EVs-hAMSC son capaces de transferir funcionalmente miR-150-5p al entorno cardíaco lesionado, incrementando sus niveles a nivel circulante y tisular, lo que apoya su papel como vehículo efectivo de señales cardioprotectoras en el contexto de la lesión por I/R.
8. La administración de hAMSC en un modelo de I/R miocárdica modula de forma relevante el eje MIAT/miR-150-5p/HOXA-4, incrementando la disponibilidad de miR-150-5p y reduciendo la expresión de HOXA-4.
9. La modulación del eje MIAT/miR-150-5p/HOXA-4 se asocia de forma coherente con la preservación funcional del miocardio y la reducción del depósito fibrótico.

Conclusiones

10. La generación de hAMSC deficientes en miR-150-5p mediante edición génica CRISPR/Cas9 permitió demostrar de forma causal que este microRNA constituye un mediador esencial del efecto cardioprotector de las hAMSC, ya que su pérdida redujo de manera marcada la mejoría funcional e incrementó el remodelado fibrótico tras la I/R.
11. La delección de miR-150-5p en hAMSC se acompañó de una reducción de sus niveles circulantes y tisulares, así como de un aumento significativo de HOXA-4, lo que respalda su relevancia funcional de este microRNA en la regulación de rutas profibróticas implicadas en la progresión del daño miocárdico post-infarto.
12. La administración de nanopartículas NMC-150 permitió una entrega eficaz de este microRNA al tejido cardíaco, incrementando sus niveles sistémicos y tisulares y reduciendo el remodelado adverso, lo que respalda su potencial como herramienta terapéutica en el contexto del infarto agudo de miocardio.
13. La incorporación de miR-150-5p en la nanopartícula NMC-150 aportó un efecto adicional, especialmente sobre procesos relacionados con la fibrosis, lo que sugiere un efecto complementario a NIL10 y refuerza su interés como estrategia terapéutica.
14. En conjunto, los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que las hAMSC ejercen su efecto cardioprotector principalmente a través de mecanismos paracrinos mediados por EVs, con un papel central de miR-150-5p y del eje MIAT/miR-150-5p/HOXA-4 en la regulación del remodelado cardíaco postisquémico, posicionando su modulación como una estrategia eficaz para limitar el daño por isquemia/reperfusión y frenar el remodelado adverso del miocardio.

CONCLUSIONS

Conclusions

1. The intravenous administration of the hAMSC used throughout this Doctoral Thesis in a murine model of myocardial infarction provides significant cardioprotection, reflected by an improvement in left ventricular systolic function and a clear reduction in post-ischemic structural cardiac damage.
2. Treatment with hAMSC attenuates adverse cardiac remodeling after ischemia/reperfusion, significantly reducing myocardial necrosis, infarct size, and cardiac fibrosis.
3. The therapeutic benefit exerted by hAMSC is strongly influenced by the timing of administration following the ischemic episode. In our experimental setting, early administration (2 days post-I/R) produced the most pronounced functional and structural improvement.
4. The cardioprotective action of hAMSC does not appear to rely on their long-term engraftment within the injured myocardium, as no significant cellular integration was detected after administration, supporting the idea that their effects are mainly mediated through paracrine signaling.
5. Extracellular vesicles derived from hAMSC (EVs-hAMSC) reproduced the beneficial effects observed following cell administration, supporting their role as major functional mediators of hAMSC biological activity and highlighting their potential as a cell-free therapeutic strategy.
6. hAMSC express miR-150-5p and actively release it through extracellular vesicles, with particularly enriched secretion under hypoxic and inflammatory conditions resembling those generated after acute myocardial infarction.
7. EVs-hAMSC are able to functionally transfer miR-150-5p to the injured myocardium, increasing both circulating and tissue levels of this microRNA, which further supports their role as effective carriers of cardioprotective molecular signals in the setting of ischemia/reperfusion injury.
8. The administration of hAMSC in a murine model of myocardial ischemia/reperfusion induced a marked modulation of the MIAT/miR-150-5p/HOXA-4 axis, characterized by increased miR-150-5p availability and reduced HOXA-4 expression.

Conclusions

9. This modulation of the MIAT/miR-150-5p/HOXA-4 axis was consistently associated with improved myocardial preservation and a reduction in fibrotic remodeling.
10. The generation of miR-150-5p-deficient hAMSC using CRISPR/Cas9 gene editing provided direct evidence that this microRNA plays a key role in the cardioprotective action shown by hAMSC, since its depletion markedly reduced functional recovery and enhanced fibrotic remodeling after ischemia/reperfusion injury.
11. The deletion of miR-150-5p in hAMSC was accompanied by lower circulating and tissue levels of this microRNA, together with a significant increase in HOXA-4 expression, reinforcing the functional relevance of miR-150-5p in the regulation of profibrotic pathways involved in post-infarction myocardial damage progression.
12. The administration of NMC-150 nanoparticles enabled the efficient delivery of miR-150-5p to cardiac tissue, increasing both systemic and myocardial levels of this microRNA while attenuating adverse remodeling, thus supporting its therapeutic potential in acute myocardial infarction.
13. The incorporation of miR-150-5p into the NMC-150 nanoparticle provided an additional beneficial effect, particularly in processes related to fibrosis, suggesting a complementary action to NIL10 and further supporting the therapeutic value of this nanotechnological strategy.
14. Taken together, the results obtained in this Doctoral Thesis demonstrate that the cardioprotective effects exerted by hAMSC are mainly mediated through paracrine mechanisms involving extracellular vesicles, with miR-150-5p and the MIAT/miR-150-5p/HOXA-4 axis playing a central role in the regulation of post-ischemic cardiac remodeling. Overall, these findings position the modulation of this pathway as a promising therapeutic strategy to limit ischemia/reperfusion injury and attenuate adverse myocardial remodeling.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi-Kangevari, M., Ghamari, S.-H., Safaeinejad, F., Bahrami, S., & Niknejad, H. (2019). Potential Therapeutic Features of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis: Immunomodulation, Inflammation Suppression, Angiogenesis Promotion, Oxidative Stress Inhibition, Neurogenesis Induction, MMPs Regulation, and Remyelination Stimulation. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00238>
- Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J.-P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derré, A., Villéger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J.-M., Luc, G., ... Boileau, C. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature Genetics*, 34(2), 154–156. <https://doi.org/10.1038/ng1161>
- Akbar, N., Razzaq, S. S., Salim, A., & Haneef, K. (2024). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Their MicroRNAs in Heart Repair and Regeneration. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 17(3), 505–522. <https://doi.org/10.1007/s12265-023-10449-8>
- Ala, M. (2023). The beneficial effects of mesenchymal stem cells and their exosomes on myocardial infarction and critical considerations for enhancing their efficacy. *Ageing Research Reviews*, 89, 101980. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.101980>
- Antonakos, N., Gilbert, C., Théroude, C., Schrijver, I. T., & Roger, T. (2022). Modes of action and diagnostic value of miRNAs in sepsis. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.951798>
- Aonuma, T., Moukette, B., Kawaguchi, S., Barupala, N. P., Sepúlveda, M. N., Corr, C., Tang, Y., Liangpunsakul, S., Payne, R. M., Willis, M. S., & Kim, I. (2021). Cardiomyocyte microRNA-150 confers cardiac protection and directly represses proapoptotic small proline-rich protein 1A. *JCI Insight*, 6(18). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.150405>
- Aonuma, T., Moukette, B., Kawaguchi, S., Barupala, N. P., Sepúlveda, M. N., Frick, K., Tang, Y., Guglin, M., Raman, S. V., Cai, C., Liangpunsakul, S., Nakagawa, S., & Kim, I. (2022). MiR-150 Attenuates Maladaptive Cardiac Remodeling Mediated by Long Noncoding RNA MIAT and Directly Represses Profibrotic *Hoxa4*. *Circulation: Heart Failure*, 15(4). <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.121.008686>
- Attar, A., Bahmanzadegan Jahromi, F., Kavousi, S., Monabati, A., & Kazemi, A. (2021). Mesenchymal stem cell transplantation after acute myocardial infarction: a meta-analysis

Bibliografía

- of clinical trials. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 600. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02667-1>
- Bagno, L. L., Salerno, A. G., Balkan, W., & Hare, J. M. (2022). Mechanism of Action of Mesenchymal Stem Cells (MSCs): impact of delivery method. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 22(4), 449–463. <https://doi.org/10.1080/14712598.2022.2016695>
- Bai, X., Yang, C., Jiao, L., Diao, H., Meng, Z., Wang, L., Cui, H., Sun, L., Zhang, Y., & Yang, B. (2021). LncRNA MIAT impairs cardiac contractile function by acting on mitochondrial translocator protein TSPO in a mouse model of myocardial infarction. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 172. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00538-y>
- Balbi, C., & Bollini, S. (2017). Fetal and perinatal stem cells in cardiac regeneration: Moving forward to the paracrine era. *Placenta*, 59, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.04.008>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Basit, H., Malik, A., & Huecker, M. R. (2023). Non–ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Beitnes, J. O., Øie, E., Shahdadfar, A., Karlsen, T., Müller, R. M. B., Aakhus, S., Reinholt, F. P., & Brinchmann, J. E. (2012). Intramyocardial Injections of Human Mesenchymal Stem Cells following Acute Myocardial Infarction Modulate Scar Formation and Improve Left Ventricular Function. *Cell Transplantation*, 21(8), 1697–1709. <https://doi.org/10.3727/096368911X627462>
- Bejerrano, T., Etzion, S., Elyagon, S., Etzion, Y., & Cohen, S. (2018). Nanoparticle Delivery of miRNA-21 Mimic to Cardiac Macrophages Improves Myocardial Remodeling after Myocardial Infarction. *Nano Letters*, 18(9), 5885–5891. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b02578>
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363–366. <https://doi.org/10.1038/35053110>

Bibliografía

- Bhaskara, M., Anjorin, O., & Wang, M. (2023). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal microRNAs in Cardiac Regeneration. *Cells*, 12(24), 2815. <https://doi.org/10.3390/cells12242815>
- Bhaskaran, M., & Mohan, M. (2014). MicroRNAs. *Veterinary Pathology*, 51(4), 759–774. <https://doi.org/10.1177/0300985813502820>
- Bhat, A., Malik, A., Yadav, P., Ware, W. J., Kakalij, P., & Chand, S. (2024). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Recent therapeutics and targeted drug delivery advances. *Journal of Extracellular Biology*, 3(5). <https://doi.org/10.1002/jex2.156>
- Bian, S., Zhang, L., Duan, L., Wang, X., Min, Y., & Yu, H. (2014). Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *Journal of Molecular Medicine*, 92(4), 387–397. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1110-5>
- Bianco, P., & Robey, P. G. (2001). Stem cells in tissue engineering. *Nature*, 414(6859), 118–121. <https://doi.org/10.1038/35102181>
- Blanpain, C., & Fuchs, E. (2014). Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science*, 344(6189). <https://doi.org/10.1126/science.1242281>
- Bobi, J., Solanes, N., Fernández-Jiménez, R., Galán-Arriola, C., Dantas, A. P., Fernández-Friera, L., Gálvez-Montón, C., Rigol-Monzó, E., Agüero, J., Ramírez, J., Roqué, M., Bayés-Genís, A., Sánchez-González, J., García-Álvarez, A., Sabaté, M., Roura, S., Ibáñez, B., & Rigol, M. (2017). Intracoronary Administration of Allogeneic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Myocardial Perfusion But Not Left Ventricle Function, in a Translational Model of Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American Heart Association*, 6(5). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005771>
- Boilard, E. (2018). Extracellular vesicles and their content in bioactive lipid mediators: more than a sack of microRNA. *Journal of Lipid Research*, 59(11), 2037–2046. <https://doi.org/10.1194/jlr.R084640>
- Boon, R. A., & Dimmeler, S. (2015). MicroRNAs in myocardial infarction. *Nature Reviews Cardiology*, 12(3), 135–142. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.207>
- Boyle, A. J., McNiece, I. K., & Hare, J. M. (2010). *Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cardiac Repair* (pp. 65–84). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-705-1_5

Bibliografía

- Breitbach, M., Bostani, T., Roell, W., Xia, Y., Dewald, O., Nygren, J. M., Fries, J. W. U., Tiemann, K., Bohlen, H., Hescheler, J., Welz, A., Bloch, W., Jacobsen, S. E. W., & Fleischmann, B. K. (2007). Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*, *110*(4), 1362–1369. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-063412>
- Buja, L. M. (2023). Pathobiology of Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury: Models, Modes, Molecular Mechanisms, Modulation, and Clinical Applications. *Cardiology in Review*, *31*(5), 252–264. <https://doi.org/10.1097/CRD.0000000000000440>
- Cabili, M. N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., & Rinn, J. L. (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes & Development*, *25*(18), 1915–1927. <https://doi.org/10.1101/gad.17446611>
- CAI, X., HAGEDORN, C. H., & CULLEN, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, *10*(12), 1957–1966. <https://doi.org/10.1261/rna.7135204>
- Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Jul;29(7):1947–1958. doi: 10.1006/jmcc.1997.0435. PMID: 9236148.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, *9*(5), 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: an overview. *Kidney International Supplements*, *1*(3), 63–67. <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.15>
- Chahine, J., & Alvey, H. (2023). Left Ventricular Failure. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Chen, L., Zhang, D., Yu, L., & Dong, H. (2019). Targeting MIAT reduces apoptosis of cardiomyocytes after ischemia/reperfusion injury. *Bioengineered*, *10*(1), 121–132. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1605812>
- Chen, Q., Liu, Y., Ding, X., Li, Q., Qiu, F., Wang, M., Shen, Z., Zheng, H., & Fu, G. (2020). Bone marrow mesenchymal stem cell-secreted exosomes carrying microRNA-125b protect against myocardial ischemia reperfusion injury via targeting SIRT7. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *465*(1–2), 103–114. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03671-z>

Bibliografía

- Cheng, L., & Hill, A. F. (2022). Therapeutically harnessing extracellular vesicles. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(5), 379–399. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00410-w>
- Chien, C.-H., Sun, Y.-M., Chang, W.-C., Chiang-Hsieh, P.-Y., Lee, T.-Y., Tsai, W.-C., Horng, J.-T., Tsou, A.-P., & Huang, H.-D. (2011). Identifying transcriptional start sites of human microRNAs based on high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 39(21), 9345–9356. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr604>
- Chin, S.-P., Marzuki, M., Tai, L., Mohamed Shahrehan, N. A., Ricky, C., Fanty, A., Salleh, A., Low, C. T., Then, K.-Y., Hoe, S. L. L., & Cheong, S. K. (2024). Dynamic tracking of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) following intravenous administration in mice model. *Regenerative Therapy*, 25, 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2024.01.003>
- Chirichella, M., Bianchi, N., Džafo, E., Foli, E., Gualdrini, F., Kenyon, A., Natoli, G., & Monticelli, S. (2022). RFX transcription factors control a miR-150/PDAP1 axis that restrains the proliferation of human T cells. *PLOS Biology*, 20(2), e3001538. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001538>
- Choi, Y. S., Park, Y.-B., Ha, C.-W., Kim, J. A., Heo, J.-C., Han, W.-J., Oh, S.-Y., & Choi, S.-J. (2017). Different characteristics of mesenchymal stem cells isolated from different layers of full term placenta. *PLOS ONE*, 12(2), e0172642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172642>
- Clevers, H. (2015). What is an adult stem cell? *Science*, 350(6266), 1319–1320. <https://doi.org/10.1126/science.aad7016>
- Cohn, J. N., Ferrari, R., & Sharpe, N. (2000). Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, 35(3), 569–582. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(99\)00630-0](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(99)00630-0)
- Condic, M. L. (2014). Totipotency: What It Is and What It Is Not. *Stem Cells and Development*, 23(8), 796–812. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0364>
- Costa, A., Balbi, C., Garbati, P., Palamà, M. E. F., Reverberi, D., De Palma, A., Rossi, R., Paladini, D., Coviello, D., De Biasio, P., Ceresa, D., Malatesta, P., Mauri, P., Quarto, R., Gentili, C., Barile, L., & Bollini, S. (2022). Investigating the Paracrine Role of Perinatal Derivatives: Human Amniotic Fluid Stem Cell-Extracellular Vesicles Show Promising

Bibliografía

- Transient Potential for Cardiomyocyte Renewal. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.902038>
- Cuadrado, I., Castejon, B., Martin, A. M., Saura, M., Reventun-Torralba, P., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2016). Nitric Oxide Induces Cardiac Protection by Preventing Extracellular Matrix Degradation through the Complex Caveolin-3/EMMPRIN in Cardiac Myocytes. *PLOS ONE*, 11(9), e0162912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162912>
- Cuadrado, I., Piedras, M. J. G. M., Herruzo, I., Turpin, M. del C., Castejón, B., Reventun, P., Martin, A., Saura, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2016). EMMPRIN-Targeted Magnetic Nanoparticles for In Vivo Visualization and Regression of Acute Myocardial Infarction. *Theranostics*, 6(4), 545–557. <https://doi.org/10.7150/thno.13352>
- de Laorden, E. H., Rodilla, B. L., Arroyo-Hernández, M., & Iglesias, M. (2025). Advances in human amniotic placenta membrane-derived mesenchymal stromal cells (hAMSCs) for regenerative medicine: enhancing therapeutic potential with biomaterials and scaffolds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1590393>
- de Laorden, E. H., Simón, D., Milla, S., Portela-Lomba, M., Mellén, M., Sierra, J., de la Villa, P., Moreno-Flores, M. T., & Iglesias, M. (2023). Human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate neuronal regeneration by promoting axon growth and restoring neuronal activity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1328261>
- Deddens, J. C., Vrijisen, K. R., Colijn, J. M., Oerlemans, M. I., Metz, C. H. G., van der Vlist, E. J., Nolte-'t Hoen, E. N. M., den Ouden, K., Jansen Of Lorkeers, S. J., van der Spoel, T. I. G., Koudstaal, S., Arkesteijn, G. J., Wauben, M. H. M., van Laake, L. W., Doevendans, P. A., Chamuleau, S. A. J., & Sluijter, J. P. G. (2016). Circulating Extracellular Vesicles Contain miRNAs and are Released as Early Biomarkers for Cardiac Injury. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 9(4), 291–301. <https://doi.org/10.1007/s12265-016-9705-1>
- DeGeare, V. S., Boura, J. A., Grines, L. L., O'Neill, W. W., & Grines, C. L. (2001). Predictive value of the Killip classification in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*, 87(9), 1035–1038. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(01\)01457-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(01)01457-6)

Bibliografía

- Deng, P., Chen, L., Liu, Z., Ye, P., Wang, S., Wu, J., Yao, Y., Sun, Y., Huang, X., Ren, L., Zhang, A., Wang, K., Wu, C., Yue, Z., Xu, X., & Chen, M. (2016). MicroRNA-150 Inhibits the Activation of Cardiac Fibroblasts by Regulating c-Myb. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38(6), 2103–2122. <https://doi.org/10.1159/000445568>
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D. G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J. B., Lipovich, L., Gonzalez, J. M., ... Guigó, R. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*, 22(9), 1775–1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>
- Desai, N., Rana, D., Patel, M., Bajwa, N., Prasad, R., & Vora, L. K. (2025). Nanoparticle Therapeutics in Clinical Perspective: Classification, Marketed Products, and Regulatory Landscape. *Small*, 21(29). <https://doi.org/10.1002/sml.202502315>
- Devaux, Y., Zangrando, J., Schroen, B., Creemers, E. E., Pedrazzini, T., Chang, C.-P., Dorn, G. W., Thum, T., Heymans, S., & Cardioline network. (2015). Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing. *Nature Reviews Cardiology*, 12(7), 415–425. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.55>
- Devine, S. M., Cobbs, C., Jennings, M., Bartholomew, A., & Hoffman, R. (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, 101(8), 2999–3001. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1830>
- DiStefano, J. K. (2018). *The Emerging Role of Long Noncoding RNAs in Human Disease* (pp. 91–110). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_6
- Dizaji Asl, K., Shafaei, H., Soleimani Rad, J., & Nozad, H. O. (2017). Comparison of Characteristics of Human Amniotic Membrane and Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells. *World Journal of Plastic Surgery*, 6(1), 33–39.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

Bibliografía

- Dong, F., Harvey, J., Finan, A., Weber, K., Agarwal, U., & Penn, M. S. (2012). Myocardial CXCR4 Expression Is Required for Mesenchymal Stem Cell Mediated Repair Following Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 126(3), 314–324. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.082453>
- D'souza, N., Rossignoli, F., Golinelli, G., Grisendi, G., Spano, C., Candini, O., Osturu, S., Catani, F., Paolucci, P., Horwitz, E. M., & Dominici, M. (2015). Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies. *BMC Medicine*, 13(1), 186. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0426-0>
- Du, J., Dong, Y., Song, J., Shui, H., Xiao, C., Hu, Y., Zhou, S., & Wang, S. (2024). BMSC-derived exosome-mediated miR-25-3p delivery protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by constraining M1-like macrophage polarization. *Molecular Medicine Reports*, 30(2). <https://doi.org/10.3892/mmr.2024.13266>
- Du, W., Li, X., Chi, Y., Ma, F., Li, Z., Yang, S., Song, B., Cui, J., Ma, T., Li, J., Tian, J., Yang, Z., Feng, X., Chen, F., Lu, S., Liang, L., Han, Z.-B., & Han, Z.-C. (2016). VCAM-1+ placenta chorionic villi-derived mesenchymal stem cells display potent pro-angiogenic activity. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0297-0>
- El Harane, N., Kervadec, A., Bellamy, V., Pidial, L., Neametalla, H. J., Perier, M.-C., Lima Correa, B., Thiébault, L., Cagnard, N., Duché, A., Brunaud, C., Lemitre, M., Gauthier, J., Bourdillon, A. T., Renault, M. P., Hovhannisyan, Y., Paiva, S., Colas, A. R., Agbulut, O., ... Renault, N. K. E. (2018). Acellular therapeutic approach for heart failure: in vitro production of extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors. *European Heart Journal*, 39(20), 1835–1847. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy012>
- Elsaygh, J., Zaher, A., Parikh, M. A., Frishman, W. H., & Peterson, S. J. (2024). Nanotechnology: The Future for Diagnostic and Therapeutic Intervention in Cardiovascular Diseases is Here. *Cardiology in Review*. <https://doi.org/10.1097/CRD.0000000000000727>
- European Heart Network. (2017). *European Cardiovascular Disease Statistics 2017*.
- European Society of Cardiology (ESC) Atlas of Cardiology. (s.f.). *ESC Atlas of Cardiology*. European Society of Cardiology. <https://www.escardio.org/data-science/data-collection/health-management-data-new/esc-atlas-of-cardiology/>

Bibliografía

- Fan, J., Wang, S., Lu, X., & Sun, Z. (2022). Transplantation of bone marrow cells from miR150 knockout mice improves senescence-associated humoral immune dysfunction and arterial stiffness. *Metabolism*, 134, 155249. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155249>
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*, 3(1), 16–20. <https://doi.org/10.1021/nn900002m>
- Fernando, T. R., Rodriguez-Malave, N. I., & Rao, D. S. (2012). MicroRNAs in B cell development and malignancy. *Journal of Hematology & Oncology*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-5-7>
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 102–114. <https://doi.org/10.1038/nrg2290>
- França, G. S., Vibranovski, M. D., & Galante, P. A. F. (2016). Host gene constraints and genomic context impact the expression and evolution of human microRNAs. *Nature Communications*, 7(1), 11438. <https://doi.org/10.1038/ncomms11438>
- Frangogiannis, N. G. (2014). The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature Reviews Cardiology*, 11(5), 255–265. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.28>
- Frangogiannis, N. G. (2015). Pathophysiology of Myocardial Infarction. In *Comprehensive Physiology* (pp. 1841–1875). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150006>
- Frangogiannis, N. G. (2016). Fibroblast—Extracellular Matrix Interactions in Tissue Fibrosis. *Current Pathobiology Reports*, 4(1), 11–18. <https://doi.org/10.1007/s40139-016-0099-1>
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230–247.
- Gao, L. R., Chen, Y., Zhang, N. K., Yang, X. L., Liu, H. L., Wang, Z. G., Yan, X. Y., Wang, Y., Zhu, Z. M., Li, T. C., Wang, L. H., Chen, H. Y., Chen, Y. D., Huang, C. L., Qu, P., Yao, C., Wang, B., Chen, G. H., Wang, Z. M., ... Hu, X. (2015). Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC Medicine*, 13(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0399-z>

Bibliografía

- Ghisi, M., Corradin, A., Basso, K., Frasson, C., Serafin, V., Mukherjee, S., Mussolin, L., Ruggero, K., Bonanno, L., Guffanti, A., De Bellis, G., Gerosa, G., Stellin, G., D'Agostino, D. M., Basso, G., Bronte, V., Indraccolo, S., Amadori, A., & Zanovello, P. (2011). Modulation of microRNA expression in human T-cell development: targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood*, 117(26), 7053–7062. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326629>
- Godnic, I., Zorc, M., Jevsinek Skok, D., Calin, G. A., Horvat, S., Dovc, P., Kovac, M., & Kunej, T. (2013). Genome-Wide and Species-Wide In Silico Screening for Intragenic MicroRNAs in Human, Mouse and Chicken. *PLoS ONE*, 8(6), e65165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065165>
- Gómez-Mauricio, G., Moscoso, I., Martín-Cancho, M.-F., Crisóstomo, V., Prat-Vidal, C., Báez-Díaz, C., Sánchez-Margallo, F. M., & Bernad, A. (2016). Combined administration of mesenchymal stem cells overexpressing IGF-1 and HGF enhances neovascularization but moderately improves cardiac regeneration in a porcine model. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0350-z>
- Götherström, C., Ringdén, O., Tammik, C., Zetterberg, E., Westgren, M., & Le Blanc, K. (2004). Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190(1), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2003.07.022>
- Goyal, A., Afzal, M., Goyal, K., Ganesan, S., Kumari, M., Sunitha, S., Dash, A., Saini, S., Rana, M., Gupta, G., Ali, H., Wong, L. S., Kumarasamy, V., & Subramaniyan, V. (2025). MSC-derived extracellular vesicles: Precision miRNA delivery for overcoming cancer therapy resistance. *Regenerative Therapy*, 29, 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2025.03.006>
- Griffiths-Jones, S. (n.d.). miRBase: The MicroRNA Sequence Database. In *MicroRNA Protocols* (pp. 129–138). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-123-1:129>
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M. F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B. W., Cassady, J. P., Cabili, M. N., Jaenisch, R., Mikkelsen, T. S., Jacks, T., Hacohen, N., Bernstein, B. E., Kellis, M., Regev, A., Rinn, J. L., & Lander, E. S. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 458(7235), 223–227. <https://doi.org/10.1038/nature07672>

Bibliografía

- Hanna, A., & Frangogiannis, N. G. (2019). The Role of the TGF- β Superfamily in Myocardial Infarction. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00140>
- Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J. M., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, F., Aken, B. L., Barrell, D., Zadissa, A., Searle, S., Barnes, I., Bignell, A., Boychenko, V., Hunt, T., Kay, M., Mukherjee, G., Rajan, J., Despacio-Reyes, G., Saunders, G., ... Hubbard, T. J. (2012). GENCODE: The reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Research*, 22(9), 1760–1774. <https://doi.org/10.1101/gr.135350.111>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- Hayasaka, T., Kawaguchi, S., Sepúlveda, M. N., Teoh, J., Moukette, B., Aonuma, T., Madhur, M. S., Desai, A. A., Liangpunsakul, S., Conway, S. J., & Kim, I. (2025). Cardiomyocyte-restricted MIAT deletion is sufficient to protect against murine myocardial infarction. *Cell Death Discovery*, 11(1), 70. <https://doi.org/10.1038/s41420-025-02352-9>
- Heusch, G. (2019). Myocardial ischemia: lack of coronary blood flow, myocardial oxygen supply-demand imbalance, or what? *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 316(6), H1439–H1446. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00139.2019>
- Hong, D. S., Kang, Y.-K., Borad, M., Sachdev, J., Ejadi, S., Lim, H. Y., Brenner, A. J., Park, K., Lee, J.-L., Kim, T.-Y., Shin, S., Becerra, C. R., Falchook, G., Stoudemire, J., Martin, D., Kelnar, K., Peltier, H., Bonato, V., Bader, A. G., ... Beg, M. S. (2020). Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *British Journal of Cancer*, 122(11), 1630–1637. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0802-1>
- Hu, X., Wang, J., Chen, J., Luo, R., He, A., Xie, X., & Li, J. (2007). Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 31(3), 438–443. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2006.11.057>
- Hu, Y.-Z., Li, Q., Wang, P.-F., Li, X.-P., & Hu, Z.-L. (2023). Multiple functions and regulatory network of miR-150 in B lymphocyte-related diseases. *Frontiers in Oncology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1140813>

Bibliografía

- Huang, L., Yang, L., Ding, Y., Jiang, X., Xia, Z., & You, Z. (2020). Human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomes transfers microRNA-19a to protect cardiomyocytes from acute myocardial infarction by targeting SOX6. *Cell Cycle*, 19(3), 339–353. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1711305>
- Hwangbo, S., Kim, J., Her, S., Cho, H., & Lee, J. (2010). Therapeutic Potential of Human Adipose Stem Cells in a Rat Myocardial Infarction Model. *Yonsei Medical Journal*, 51(1), 69. <https://doi.org/10.3349/ymj.2010.51.1.69>
- Ibáñez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M. J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., Caforio, A. L. P., Crea, F., Goudevenos, J. A., Halvorsen, S., Hindricks, G., Kastrati, A., Lenzen, M. J., Prescott, E., Roffi, M., Valgimigli, M., Varenhorst, C., Vranckx, P., Widimský, P., ... Gale, C. P. (2018). 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal*, 39(2), 119–177. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx393>
- Institute of Medicine. (2010). *Promoting Cardiovascular Health in the Developing World: A Critical Challenge to Achieve Global Health* (V. Fuster & B. B. Kelly, Eds.; 10.17226/12815). National Academies Press.
- Ishii, N., Ozaki, K., Sato, H., Mizuno, H., Susumu Saito, Takahashi, A., Miyamoto, Y., Ikegawa, S., Kamatani, N., Hori, M., Satoshi Saito, Nakamura, Y., & Tanaka, T. (2006). Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *Journal of Human Genetics*, 51(12), 1087–1099. <https://doi.org/10.1007/s10038-006-0070-9>
- Jia, H., Osak, M., Bogu, G. K., Stanton, L. W., Johnson, R., & Lipovich, L. (2010). Genome-wide computational identification and manual annotation of human long noncoding RNA genes. *RNA*, 16(8), 1478–1487. <https://doi.org/10.1261/rna.1951310>
- Jia, Y., Jiang, Y., He, Y., Zhang, W., Zou, J., Magar, K. T., Boucetta, H., Teng, C., & He, W. (2023). Approved Nanomedicine against Diseases. *Pharmaceutics*, 15(3), 774. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030774>
- Jiang, C., Gui, C., He, A., Hu, X., Chen, J., Jiang, Y., & Wang, J. (2008). Optimal time for mesenchymal stem cell transplantation in rats with myocardial infarction. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 9(8), 630–637. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820004>
- Kadam, S., Muthyala, S., Nair, P., & Bhonde, R. (2010). Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells and Islet-Like Cell Clusters Generated From These Cells as a

Bibliografía

- Novel Source for Stem Cell Therapy in Diabetes. *The Review of Diabetic Studies*, 7(2), 168–182. <https://doi.org/10.1900/RDS.2010.7.168>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. In *Int Rev Cell Mol Biol* (pp. 229–317). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Kawada, H., Fujita, J., Kinjo, K., Matsuzaki, Y., Tsuma, M., Miyatake, H., Muguruma, Y., Tsuboi, K., Itabashi, Y., Ikeda, Y., Ogawa, S., Okano, H., Hotta, T., Ando, K., & Fukuda, K. (2004). Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*, 104(12), 3581–3587. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1488>
- Kawaguchi, S., Moukette, B., Sepúlveda, M. N., Hayasaka, T., Aonuma, T., Haskell, A. K., Mah, J., Liangpunsakul, S., Tang, Y., Conway, S. J., & Kim, I. (2023). SPRR1A is a key downstream effector of MiR-150 during both maladaptive cardiac remodeling in mice and human cardiac fibroblast activation. *Cell Death & Disease*, 14(7), 446. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05982-y>
- Kawaguchi, S., Sepúlveda, M. N., Teoh, J., Hayasaka, T., Moukette, B., Aonuma, T., Roh, H. C., Madhur, M. S., & Kim, I. (2024). MicroRNA-150 Deletion from Adult Myofibroblasts Augments Maladaptive Cardiac Remodeling Following Chronic Myocardial Infarction. *Biomolecules*, 14(12), 1650. <https://doi.org/10.3390/biom14121650>
- Keeley, E. C., Boura, J. A., & Grines, C. L. (2003). Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *The Lancet*, 361(9351), 13–20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12113-7)
- Kehat, I., & Molkentin, J. D. (2010). Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation*, 122(25), 2727–2735. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.942268>
- Keshtkar, S., Azarpira, N., & Ghahremani, M. H. (2018). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0791-7>
- Khan, M., Nickoloff, E., Abramova, T., Johnson, J., Verma, S. K., Krishnamurthy, P., Mackie, A. R., Vaughan, E., Garikipati, V. N. S., Benedict, C., Ramirez, V., Lambers, E., Ito, A., Gao, E., Misener, S., Luongo, T., Elrod, J., Qin, G., Houser, S. R., ... Kishore, R. (2015).

Bibliografía

- Embryonic Stem Cell–Derived Exosomes Promote Endogenous Repair Mechanisms and Enhance Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circulation Research*, 117(1), 52–64. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305990>
- Killip, T., & Kimball, J. T. (1967). Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit. *The American Journal of Cardiology*, 20(4), 457–464. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(67\)90023-9](https://doi.org/10.1016/0002-9149(67)90023-9)
- King, J., & Lowery, D. R. (2023). Physiology, Cardiac Output. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Kitala, D., Klama-Baryła, A., Misiuga, M., Łabuś, W., Kraut, M., Szapski, M., Lesiak, M., Krakowian, D., Sieroń, A. L., Łos, M. J., & Kucharzewski, M. (2019). Heterogeneous Mixture of Amniotic Cells is Likely a Better Source of Stem Cells than Adipose Tissue. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 67(3), 189–196. <https://doi.org/10.1007/s00005-019-00538-5>
- Kjeldsen, K. (2003). Myocardial Na,K-ATPase: Clinical aspects. *Experimental and Clinical Cardiology*, 8(3), 131–133.
- Kleinbongard, P., Arriola, C. G., Badimon, L., Crisostomo, V., Giricz, Z., Gyöngyösi, M., Heusch, G., Ibáñez, B., Kiss, A., de Kleijn, D. P. V., Podesser, B. K., Carracedo, R. R., Rodríguez-Sinovas, A., Ruiz-Meana, M., Sanchez Margallo, F. M., Vilahur, G., Zamorano, J. L., Zaragoza, C., Ferdinandy, P., & Hausenloy, D. J. (2024). The IMproving Preclinical Assessment of Cardioprotective Therapies (IMPACT): multicenter pig study on the effect of ischemic preconditioning. *Basic Research in Cardiology*, 119(6), 893–909. <https://doi.org/10.1007/s00395-024-01083-9>
- Ko, J. H., Kim, H. J., Jeong, H. J., Lee, H. J., & Oh, J. Y. (2020). Mesenchymal Stem and Stromal Cells Harness Macrophage-Derived Amphiregulin to Maintain Tissue Homeostasis. *Cell Reports*, 30(11), 3806–3820.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.062>
- Kohlmaier, A., Holdt, L. M., & Teupser, D. (2023). Long noncoding RNAs in cardiovascular disease. *Current Opinion in Cardiology*. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000001041>
- Komatsu, S., Kitai, H., & Suzuki, H. I. (2023). Network Regulation of microRNA Biogenesis and Target Interaction. *Cells*, 12(2), 306. <https://doi.org/10.3390/cells12020306>

Bibliografía

- Kosaraju, A., Pendela, V. S., & Hai, O. (2023). Cardiogenic Shock. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Lagace, T. A. (2014). PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Current Opinion in Lipidology*, 25(5), 387–393. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000114>
- Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S. K., Choo, A., Chen, T. S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C. N., El Oakley, R. M., Pasterkamp, G., de Kleijn, D. P. V., & Lim, S. K. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, 4(3), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.12.003>
- Le Blanc, K., & Mougiakakos, D. (2012). Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*, 12(5), 383–396. <https://doi.org/10.1038/nri3209>
- Lee, E. J., Park, S. J., Kang, S. K., Kim, G.-H., Kang, H.-J., Lee, S.-W., Jeon, H. B., & Kim, H.-S. (2012). Spherical Bullet Formation via E-cadherin Promotes Therapeutic Potency of Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Umbilical Cord Blood for Myocardial Infarction. *Molecular Therapy*, 20(7), 1424–1433. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.58>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Lee, S. W. L., Paoletti, C., Campisi, M., Osaki, T., Adriani, G., Kamm, R. D., Mattu, C., & Chiono, V. (2019). MicroRNA delivery through nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 313, 80–95. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.007>
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Lei, D., Yang, W.-T., & Zheng, P.-S. (2021). HOXB4 inhibits the proliferation and tumorigenesis of cervical cancer cells by downregulating the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cell Death & Disease*, 12(1), 105. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03411-6>

Bibliografía

- Levick SP, Meléndez GC, Plante E, McLarty JL, Brower GL, Janicki JS. Cardiac mast cells: the centrepiece in adverse myocardial remodelling. *Cardiovasc Res*. 2011 Jan;89(1):12–19. doi: 10.1093/cvr/cvq272. PMID: 20833684.
- Li, J., Zhou, Z., Wen, J., Jiang, F., & Xia, Y. (2020). Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells Promote Endogenous Bone Regeneration. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.543623>
- Li, Z., Liao, W., Cui, X., Zhao, Q., Liu, M., Chen, Y., Liu, T., Liu, N., Wang, F., Yi, Y., & Shao, N. (2011). Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head. *International Journal of Medical Sciences*, 8(1), 74–83. <https://doi.org/10.7150/ijms.8.74>
- Li, Z., Liu, Y., Guo, X., Sun, G., Ma, Q., Dai, Y., Zhu, G., & Sun, Y. (2018). Long noncoding RNA myocardial infarction-associated transcript is associated with the microRNA-150-5p/P300 pathway in cardiac hypertrophy. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3700>
- Liang, X., Liu, J., Li, M., Lin, F., Zhuang, R., Meng, Q., Ma, X., Xin, Y., Gong, X., He, Z., Han, W., Zhou, X., & Liu, Z. (2023). Intravenously Administered Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell (HucMSC) Improves Cardiac Performance following Infarction via Immune Modulation. *Stem Cells International*, 2023, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2023/6256115>
- Lin, X., Lu, Y., Zhang, C., Cui, Q., Tang, Y.-D., Ji, X., & Cui, C. (2024). LncRNADisease v3.0: an updated database of long non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D1365–D1369. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad828>
- Lin, X., Zhang, S., & Huo, Z. (2019). Serum Circulating miR-150 is a Predictor of Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure. *International Heart Journal*, 60(2), 280–286. <https://doi.org/10.1536/ihj.18-306>
- Lindsey, M. L., Kassiri, Z., Virag, J. A. I., de Castro Brás, L. E., & Scherrer-Crosbie, M. (2018). Guidelines for measuring cardiac physiology in mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 314(4), H733–H752. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00339.2017>
- Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M., & Fessler, R. G. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Reviews and Reports*, 16(1), 3–32. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09935-x>

Bibliografía

- Liu, Q.-W., Huang, Q.-M., Wu, H.-Y., Zuo, G.-S.-L., Gu, H.-C., Deng, K.-Y., & Xin, H.-B. (2021). Characteristics and Therapeutic Potential of Human Amnion-Derived Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 970. <https://doi.org/10.3390/ijms22020970>
- Liu, Z., Ye, P., Wang, S., Wu, J., Sun, Y., Zhang, A., Ren, L., Cheng, C., Huang, X., Wang, K., Deng, P., Wu, C., Yue, Z., & Xia, J. (2015). MicroRNA-150 Protects the Heart From Injury by Inhibiting Monocyte Accumulation in a Mouse Model of Acute Myocardial Infarction. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 8(1), 11–20. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.000598>
- Lozano-Velasco, E., Inácio, J. M., Sousa, I., Guimarães, A. R., Franco, D., Moura, G., & Belo, J. A. (2024). miRNAs in Heart Development and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), 1673. <https://doi.org/10.3390/ijms25031673>
- Luger, D., Lipinski, M. J., Westman, P. C., Glover, D. K., Dimastromatteo, J., Frias, J. C., Albelda, M. T., Sikora, S., Kharazi, A., Vertelov, G., Waksman, R., & Epstein, S. E. (2017). Intravenously Delivered Mesenchymal Stem Cells. *Circulation Research*, 120(10), 1598–1613. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310599>
- Mabotuwana, N. S., Rech, L., Lim, J., Hardy, S. A., Murtha, L. A., Rainer, P. P., & Boyle, A. J. (2022). Paracrine Factors Released by Stem Cells of Mesenchymal Origin and their Effects in Cardiovascular Disease: A Systematic Review of Pre-clinical Studies. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(8), 2606–2628. <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10429-6>
- Maeda, N., Kasukawa, T., Oyama, R., Gough, J., Frith, M., Engström, P. G., Lenhard, B., Aturaliya, R. N., Batalov, S., Beisel, K. W., Bult, C. J., Fletcher, C. F., Forrest, A. R. R., Furuno, M., Hill, D., Itoh, M., Kanamori-Katayama, M., Katayama, S., Katoh, M., ... Hayashizaki, Y. (2006). Transcript Annotation in FANTOM3: Mouse Gene Catalog Based on Physical cDNAs. *PLoS Genetics*, 2(4), e62. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020062>
- Makkos, A., Ágg, B., Petrovich, B., Varga, Z. V., Görbe, A., & Ferdinandy, P. (2021). Systematic review and network analysis of microRNAs involved in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury and infarction: Involvement of redox signalling. *Free Radical Biology and Medicine*, 172, 237–251. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.034>

Bibliografía

- Mann, D.L., Libby, P. Bonow, R. O., Tomaselli, G. F. & Bhatt, D. L., Solomon, S. D. (2021). *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine* (12th ed.). Elsevier.
- Mann, D. L., & Felker, G. M. (2021). Mechanisms and Models in Heart Failure. *Circulation Research*, 128(10), 1435–1450. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318158>
- Marcos-Garcés, V., Bertolín-Boronat, C., Merenciano-González, H., Martínez Mas, M. L., Climent Alberola, J. I., López-Bueno, L., Payá Rubio, A., Pérez-Solé, N., Ríos-Navarro, C., de Dios, E., Gavara, J., Moratal, D., Rodríguez-Palomares, J. F., Ortiz-Pérez, J. T., Sanchis, J., & Bodi, V. (2025). Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction—Pathophysiology, Diagnostic Approach and Management During Cardiac Rehabilitation. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(22), 10964. <https://doi.org/10.3390/ijms262210964>
- Marquez-Curtis, L. A., & Janowska-Wieczorek, A. (2013). Enhancing the Migration Ability of Mesenchymal Stromal Cells by Targeting the SDF-1/CXCR4 Axis. *BioMed Research International*, 2013, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/561098>
- Mattick, J. S., Amaral, P. P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H. Y., Chen, L.-L., Chen, R., Dean, C., Dinger, M. E., Fitzgerald, K. A., Gingeras, T. R., Guttman, M., Hirose, T., Huarte, M., Johnson, R., Kanduri, C., Kapranov, P., Lawrence, J. B., Lee, J. T., ... Wu, M. (2023). Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(6), 430–447. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00566-8>
- Maurer, M. S., & Packer, M. (2020). How Should Physicians Assess Myocardial Contraction? *JACC: Cardiovascular Imaging*, 13(3), 873–878. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2019.12.021>
- Mayo Clinic. (2024, March 8). *Placenta: How it works and what's normal*. <https://www.mayoclinic.org/healthy-lifestyle/pregnancy-week-by-week/in-depth/placenta/art-20044425>.
- Mayo Clinic, & Mayo Foundation for Medical Education and Research. (2025). *Ejection Fraction*. <https://www.mayoclinic.org/es/tests-procedures/ekg/expert-answers/ejection-fraction/faq-20058286>.
- McDonagh, T. A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R. S., Baumbach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Čelutkienė, J., Chioncel, O., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Crespo-Leiro, M. G., Farmakis, D., Gilard, M., Heymans, S., Hoes, A. W., Jaarsma, T., Jankowska, E.

Bibliografía

- A., ... Skibelund, A. K. (2021). 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*, 42(36), 3599–3726. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368>
- Mechanic, O. J., Gavin, M., & Grossman, S. A. (2025). *Acute Myocardial Infarction*.
- Mello, B. H. G. de, Oliveira, G. B. F., Ramos, R. F., Lopes, B. B. C., Barros, C. B. S., Carvalho, E. de O., Teixeira, F. B. P., Arruda, G. D. S., Revelo, M. S. C., & Piegas, L. S. (2014). Validation of the Killip-Kimball Classification and Late Mortality after Acute Myocardial Infarction. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. <https://doi.org/10.5935/abc.20140091>
- Mirotsoy, M., Jayawardena, T. M., Schmeckpeper, J., Gnechi, M., & Dzau, V. J. (2011). Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(2), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2010.08.005>
- Mishra, V. K., Shih, H.-H., Parveen, F., Lenzen, D., Ito, E., Chan, T.-F., & Ke, L.-Y. (2020). Identifying the Therapeutic Significance of Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, 9(5), 1145. <https://doi.org/10.3390/cells9051145>
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Mokhtari, B., Aboutaleb, N., Nazarinia, D., Nikougoftar, M., Razavi Tousi, S. M. T., Molazem, M., & Azadi, M.-R. (2020). Comparison of the effects of intramyocardial and intravenous injections of human mesenchymal stem cells on cardiac regeneration after heart failure. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(7), 879–885. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.40886.9660>
- Monguió-Tortajada, M., Prat-Vidal, C., Martínez-Falguera, D., Teis, A., Soler-Botija, C., Courageux, Y., Munizaga-Larroudé, M., Moron-Font, M., Bayes-Genis, A., Borràs, F. E., Roura, S., & Gálvez-Montón, C. (2022). Acellular cardiac scaffolds enriched with MSC-derived extracellular vesicles limit ventricular remodelling and exert local and systemic immunomodulation in a myocardial infarction porcine model. *Theranostics*, 12(10), 4656–4670. <https://doi.org/10.7150/thno.72289>
- Moran, V. A., Perera, R. J., & Khalil, A. M. (2012). Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 40(14), 6391–6400. <https://doi.org/10.1093/nar/gks296>

Bibliografía

- Murphy, A. M., Wong, A. L., & Bezuhly, M. (2015). Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13069-015-0023-z>
- Murphy, M. B., Moncivais, K., & Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(11), e54–e54. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.94>
- Murry, C. E., Soonpaa, M. H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H. O., Rubart, M., Pasumarthi, K. B. S., Ismail Virag, J., Bartelmez, S. H., Poppa, V., Bradford, G., Dowell, J. D., Williams, D. A., & Field, L. J. (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 428(6983), 664–668. <https://doi.org/10.1038/nature02446>
- Nagy, R. N., Makkos, A., Baranyai, T., Giricz, Z., Szabó, M., Kravcsenko-Kiss, B., Bereczki, Z., Ágg, B., Puskás, L. G., Faragó, N., Schulz, R., Gyöngyösi, M., Lukovic, D., Varga, Z. V., Görbe, A., & Ferdinandy, P. (2025). Cardioprotective microRNAs (protectomiRs) in a pig model of acute myocardial infarction and cardioprotection by ischaemic conditioning: MiR-450a. *British Journal of Pharmacology*, 182(2), 396–416. <https://doi.org/10.1111/bph.17313>
- Namiot, E. D., Niemi, J. V. L., Chubarev, V. N., Tarasov, V. V., & Schiöth, H. B. (2022). Stem Cells in Clinical Trials on Neurological Disorders: Trends in Stem Cells Origins, Indications, and Status of the Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11453. <https://doi.org/10.3390/ijms231911453>
- National Institutes of Health. (2016). *Stem Cell Basics*. <https://Stemcells.Nih.Gov/Info/Basics/Stc-Basics>.
- Nian, M., Lee, P., Khaper, N., & Liu, P. (2004). Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circulation Research*, 94(12), 1543–1553. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000130526.20854.fa>
- Nishio, H., Masumoto, H., Sakamoto, K., Yamazaki, K., Ikeda, T., & Minatoya, K. (2019). MicroRNA-145-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles attenuate venous intimal hyperplasia in a rabbit model. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 157(6), 2242–2251. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.08.115>
- Noiseux, N., Gneccchi, M., Lopez-Illasaca, M., Zhang, L., Solomon, S. D., Deb, A., Dzau, V. J., & Pratt, R. E. (2006). Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair

Bibliografía

- infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Molecular Therapy*, 14(6), 840–850. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.05.016>
- Ojha, N., & Dhamoon, A. S. (2023). Myocardial Infarction. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Olena, A. F., & Patton, J. G. (2010). Genomic organization of microRNAs. *Journal of Cellular Physiology*, 222(3), 540–545. <https://doi.org/10.1002/jcp.21993>
- Omar, A. M., Meleis, A. E., Arfa, S. A., Zahran, N. M., & Mehanna, R. A. (2019). Comparative Study of the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue and Bone Marrow on Acute Myocardial Infarction Model. *Oman Medical Journal*, 34(6), 534–543. <https://doi.org/10.5001/omj.2019.97>
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., & Anversa, P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410(6829), 701–705. <https://doi.org/10.1038/35070587>
- O'Rourke, S. A., Dunne, A., & Monaghan, M. G. (2019). The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00101>
- Othman Basri, N. A., Che Roos, N. A., Aminuddin, A., A. Hamid, A., Hui, C. K., Mahadi, M. K., Kumar, J., & Ugusman, A. (2026). Mechanistic Insights into the Cardioprotective Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in Myocardial Ischemic Injury: A Systematic Review. *Pharmaceutics*, 18(3), 346. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics18030346>
- Ou, H., Teng, H., Qin, Y., Luo, X., Yang, P., Zhang, W., Chen, W., Lv, D., & Tang, H. (2020). Extracellular vesicles derived from microRNA-150-5p-overexpressing mesenchymal stem cells protect rat hearts against ischemia/reperfusion. *Aging*, 12(13), 12669–12683. <https://doi.org/10.18632/aging.102792>
- Packer, M., & McMurray, J. J. V. (2021). Rapid evidence-based sequencing of foundational drugs for heart failure and a reduced ejection fraction. *European Journal of Heart Failure*, 23(6), 882–894. <https://doi.org/10.1002/ehjhf.2149>

Bibliografía

- Pardal, R., Clarke, M. F., & Morrison, S. J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(12), 895–902. <https://doi.org/10.1038/nrc1232>
- Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G. P., Bilic, G., Bühring, H.-J., Evangelista, M., Hennerbichler, S., Liu, B., Magatti, M., Mao, N., Miki, T., Marongiu, F., Nakajima, H., Nikaido, T., Portmann-Lanz, C. B., Sankar, V., Soncini, M., Stadler, G., Surbek, D., ... Strom, S. C. (2008). Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*, 26(2), 300–311. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0594>
- Parveen, S., Misra, R., & Sahoo, S. K. (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(2), 147–166. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.016>
- Passipieri, J. A., Kasai-Brunswick, T. H., Suhett, G., Martins, A. B., Brasil, G. V, Campos, D. B., Rocha, N. N., Ramos, I. P., Mello, D. B., Rodrigues, D. C., Christie, B. B., Silva-Mendes, B. J., Balduino, A., Sá, R. M., Lopes, L. M., Goldenberg, R. C., Campos de Carvalho, A. C., & Carvalho, A. B. (2014). Improvement of cardiac function by placenta-derived mesenchymal stem cells does not require permanent engraftment and is independent of the insulin signaling pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(4), 102. <https://doi.org/10.1186/scrt490>
- Patel, T., Mešić, J., Meretzki, S., Bronshtein, T., Brlek, P., Kivity, V., Pancholy, S. B., Petrović, M., & Primorac, D. (2025). Therapeutic Potential and Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Coronary Artery Disease: Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(11), 5414. <https://doi.org/10.3390/ijms26115414>
- Pei, Z., Zeng, J., Song, Y., Gao, Y., Wu, R., Chen, Y., Li, F., Li, W., Zhou, H., & Yang, Y. (2017). In vivo imaging to monitor differentiation and therapeutic effects of transplanted mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Scientific Reports*, 7(1), 6296. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06571-8>
- Pekovic, V., & Hutchison, C. J. (2008). Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: the role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches. *Journal of Anatomy*, 213(1), 5–25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00928.x>

Bibliografía

- Pepine, C. J. (2009). The Impact of Nitric Oxide in Cardiovascular Medicine: Untapped Potential Utility. *The American Journal of Medicine*, 122(5), S10–S15. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.03.003>
- Pepper, G. S., & Lee, R. W. (1999). Sympathetic Activation in Heart Failure and Its Treatment With β -Blockade. *Archives of Internal Medicine*, 159(3), 225. <https://doi.org/10.1001/archinte.159.3.225>
- Pirahanchi, Y., Jessu, R., & Aeddula, N. R. (2023). Physiology, Sodium Potassium Pump. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Pittenger, M. F., Discher, D. E., Péault, B. M., Phinney, D. G., Hare, J. M., & Caplan, A. I. (2019). Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *Npj Regenerative Medicine*, 4(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Circulation Research*, 119(1), 91–112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>
- Psarras, S., Beis, D., Nikouli, S., Tsikitis, M., & Capetanaki, Y. (2019). Three in a Box: Understanding Cardiomyocyte, Fibroblast, and Innate Immune Cell Interactions to Orchestrate Cardiac Repair Processes. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00032>
- Qu, X., Du, Y., Shu, Y., Gao, M., Sun, F., Luo, S., Yang, T., Zhan, L., Yuan, Y., Chu, W., Pan, Z., Wang, Z., Yang, B., & Lu, Y. (2017). MIAT Is a Pro-fibrotic Long Non-coding RNA Governing Cardiac Fibrosis in Post-infarct Myocardium. *Scientific Reports*, 7(1), 42657. <https://doi.org/10.1038/srep42657>
- Quevedo, H. C., Hatzistergos, K. E., Oskouei, B. N., Feigenbaum, G. S., Rodriguez, J. E., Valdes, D., Pattany, P. M., Zambrano, J. P., Hu, Q., McNiece, I., Heldman, A. W., & Hare, J. M. (2009). Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 14022–14027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903201106>

Bibliografía

- Ragni, E., Papait, A., Perucca Orfei, C., Silini, A. R., Colombini, A., Viganò, M., Libonati, F., Parolini, O., & Girolamo, L. (2021). Amniotic membrane-mesenchymal stromal cells secreted factors and extracellular vesicle-miRNAs: Anti-inflammatory and regenerative features for musculoskeletal tissues. *Stem Cells Translational Medicine*, 10(7), 1044–1062. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0390>
- Ramírez, R., Díez, J., Sanmartín, M., Saura, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2019). Nanotechnology Applied to Preserve Extracellular Matrix as Teranostic Tool in Acute Myocardial Infarction. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 72(2), 171–174. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2017.12.023>
- Ramirez-Carracedo, R., Sanmartin, M., Ten, A., Hernandez, I., Tesoro, L., Diez-Mata, J., Botana, L., Ovejero-Paredes, K., Filice, M., Alberich-Bayarri, A., Martí-Bonmatí, L., Largo-Aramburu, C., Saura, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2022). Theranostic Contribution of Extracellular Matrix Metalloprotease Inducer-Paramagnetic Nanoparticles Against Acute Myocardial Infarction in a Pig Model of Coronary Ischemia-Reperfusion. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 15(6). <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.121.013379>
- Ramirez-Carracedo, R., Tesoro, L., Hernandez, I., Diez-Mata, J., Piñeiro, D., Hernandez-Jimenez, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2020). Targeting TLR4 with ApTOLL Improves Heart Function in Response to Coronary Ischemia Reperfusion in Pigs Undergoing Acute Myocardial Infarction. *Biomolecules*, 10(8), 1167. <https://doi.org/10.3390/biom10081167>
- Ramos, A. P., Cruz, M. A. E., Tovani, C. B., & Ciancaglini, P. (2017). Biomedical applications of nanotechnology. *Biophysical Reviews*, 9(2), 79–89. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0246-2>
- Rasmussen, J. G., Frøbert, O., Holst-Hansen, C., Kastrup, J., Baandrup, U., Zachar, V., Fink, T., & Simonsen, U. (2014). Comparison of Human Adipose-Derived Stem cells and Bone Marrow-Derived Stem cells in a Myocardial Infarction Model. *Cell Transplantation*, 23(2), 195–206. <https://doi.org/10.3727/096368912X659871>
- Reynolds, H. R., & Hochman, J. S. (2008). Cardiogenic Shock. *Circulation*, 117(5), 686–697. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.613596>

Bibliografía

- Richardson, W. J., Clarke, S. A., Quinn, T. A., & Holmes, J. W. (2015). Physiological Implications of Myocardial Scar Structure. In *Comprehensive Physiology* (pp. 1877–1909). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140067>
- Rigol, M., Solanes, N., Roura, S., Roqué, M., Novensà, L., Dantas, A. P., Martorell, J., Sitges, M., Ramírez, J., Bayés-Genís, A., & Heras, M. (2014). Allogeneic adipose stem cell therapy in acute myocardial infarction. *European Journal of Clinical Investigation*, 44(1), 83–92. <https://doi.org/10.1111/eci.12195>
- Rossello, X., Rodriguez-Sinovas, A., Vilahur, G., Crisóstomo, V., Jorge, I., Zaragoza, C., Zamorano, J. L., Bermejo, J., Ordoñez, A., Boscá, L., Vázquez, J., Badimón, L., Sánchez-Margallo, F. M., Fernández-Avilés, F., Garcia-Dorado, D., & Ibáñez, B. (2019). CIBER-CLAP (CIBERCV Cardioprotection Large Animal Platform): A multicenter preclinical network for testing reproducibility in cardiovascular interventions. *Scientific Reports*, 9(1), 20290. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56613-6>
- Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., Barengo, N. C., Beaton, A. Z., Benjamin, E. J., Benziger, C. P., Bonny, A., Brauer, M., Brodmann, M., Cahill, T. J., Carapetis, J., Catapano, A. L., Chugh, S. S., Cooper, L. T., Coresh, J., ... Fuster, V. (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(25), 2982–3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
- Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3), 203–222. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? *Cell*, 146(3), 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>
- Salto-Tellez M, Yung Lim S, El-Oakley RM, Tang TP, ALmsherqi ZA, Lim SK. Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: a quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovasc Pathol*. 2004 Mar-Apr;13(2):91-7. doi: 10.1016/S1054-8807(03)00129-7. PMID: 15033158.
- Samsonraj, R. M., Rai, B., Sathiyathan, P., Puan, K. J., Röttschke, O., Hui, J. H., Raghunath, M., Stanton, L. W., Nurcombe, V., & Cool, S. M. (2015). Establishing Criteria

Bibliografía

- for Human Mesenchymal Stem Cell Potency. *Stem Cells*, 33(6), 1878–1891. <https://doi.org/10.1002/stem.1982>
- Saura, M., Zamorano, J. L., & Zaragoza, C. (2022). Preclinical models of congestive heart failure, advantages, and limitations for application in clinical practice. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.850301>
- Saura, M., Zaragoza, C., Herranz, B., Giera, M., Diez-Marqués, L., Rodríguez-Puyol, D., & Rodríguez-Puyol, M. (2005). Nitric Oxide Regulates Transforming Growth Factor- β Signaling in Endothelial Cells. *Circulation Research*, 97(11), 1115–1123. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000191538.76771.66>
- Schmitz, S. U., Grote, P., & Herrmann, B. G. (2016). Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(13), 2491–2509. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2174-5>
- Shakerian, L., Ghorbani, S., Talebi, F., & Noorbakhsh, F. (2018). MicroRNA-150 targets PU.1 and regulates macrophage differentiation and function in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 323, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.06.010>
- Shammaa, R., El-Kadiry, A. E.-H., Abusarah, J., & Rafei, M. (2020). Mesenchymal Stem Cells Beyond Regenerative Medicine. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00072>
- Shang, R., Lee, S., Senavirathne, G., & Lai, E. C. (2023). microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nature Reviews Genetics*, 24(12), 816–833. <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00611-y>
- Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., & Farokhzad, O. C. (2017). Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 17(1), 20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>
- Shin, S., Lee, J., Kwon, Y., Park, K.-S., Jeong, J.-H., Choi, S.-J., Bang, S. I., Chang, J. W., & Lee, C. (2021). Comparative Proteomic Analysis of the Mesenchymal Stem Cells Secretome from Adipose, Bone Marrow, Placenta and Wharton's Jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 845. <https://doi.org/10.3390/ijms22020845>

Bibliografía

- Smith, N. L., Wissink, E. M., Grimson, A., & Rudd, B. D. (2015). miR-150 Regulates Differentiation and Cytolytic Effector Function in CD8⁺ T cells. *Scientific Reports*, 5(1), 16399. <https://doi.org/10.1038/srep16399>
- Smolarz, B., Durczyński, A., Romanowicz, H., Szyłło, K., & Hogendorf, P. (2022). miRNAs in Cancer (Review of Literature). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2805. <https://doi.org/10.3390/ijms23052805>
- Soliman, H., Theret, M., Scott, W., Hill, L., Underhill, T. M., Hinz, B., & Rossi, F. M. V. (2021). Multipotent stromal cells: One name, multiple identities. *Cell Stem Cell*, 28(10), 1690–1707. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.09.001>
- Song, N., Scholtemeijer, M., & Shah, K. (2020). Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(9), 653–664. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009>
- Song, Y.-S., Joo, H.-W., Park, I.-H., Shen, G.-Y., Lee, Y., Shin, J. H., Kim, H., & Kim, K.-S. (2017). Bone marrow mesenchymal stem cell-derived vascular endothelial growth factor attenuates cardiac apoptosis via regulation of cardiac miRNA-23a and miRNA-92a in a rat model of myocardial infarction. *PLOS ONE*, 12(6), e0179972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179972>
- Statello, L., Guo, C.-J., Chen, L.-L., & Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Sun, B., Liu, S., Hao, R., Dong, X., Fu, L., & Han, B. (2020). RGD-PEG-PLA Delivers MiR-133 to Infarct Lesions of Acute Myocardial Infarction Model Rats for Cardiac Protection. *Pharmaceutics*, 12(6), 575. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060575>
- Sun, S.-J., Wei, R., Li, F., Liao, S.-Y., & Tse, H.-F. (2021). Mesenchymal stromal cell-derived exosomes in cardiac regeneration and repair. *Stem Cell Reports*, 16(7), 1662–1673. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.05.003>
- Suri, S. S., Fenniri, H., & Singh, B. (2007). Nanotechnology-based drug delivery systems. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-2-16>
- Sutton, M. G. St. J., & Sharpe, N. (2000). Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation*, 101(25), 2981–2988. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.25.2981>

Bibliografía

- Sygitowicz, G., Maciejak-Jastrzębska, A., & Sitkiewicz, D. (2020). miRNAs in the development of left ventricular remodeling and post-myocardial infarction heart failure. *Polish Archives of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.20452/pamw.15137>
- Talman, V., & Ruskoaho, H. (2016). Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell and Tissue Research*, 365(3), 563–581. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2431-9>
- Tang, Y. L., Zhao, Q., Zhang, Y. C., Cheng, L., Liu, M., Shi, J., Yang, Y. Z., Pan, C., Ge, J., & Phillips, M. I. (2004). Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regulatory Peptides*, 117(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2003.09.005>
- Tang, Y., Wang, Y., Park, K., Hu, Q., Teoh, J., Broskova, Z., Ranganathan, P., Jayakumar, C., Li, J., Su, H., Tang, Y., Ramesh, G., & Kim, I. (2015). MicroRNA-150 protects the mouse heart from ischaemic injury by regulating cell death. *Cardiovascular Research*, 106(3), 387–397. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv121>
- Tarin, C., Lavin, B., Gomez, M., Saura, M., Diez-Juan, A., & Zaragoza, C. (2011). The extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN is a target of nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2), 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.021>
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E., & Scott, E. W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416(6880), 542–545. <https://doi.org/10.1038/nature730>
- Tesoro, L., Hernández, I., Ramírez-Carracedo, R., Díez-Mata, J., Alcharani, N., Jiménez-Guirado, B., Ovejero-Paredes, K., Filice, M., Zamorano, J. L., Saura, M., Zaragoza, C., & Botana, L. (2022). NIL10: A New IL10-Receptor Binding Nanoparticle That Induces Cardiac Protection in Mice and Pigs Subjected to Acute Myocardial Infarction through STAT3/NF-κB Activation. *Pharmaceutics*, 14(10), 2044. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102044>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles

Bibliografía

- 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., White, H. D., Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., White, H. D., Mickley, H., Crea, F., Van de Werf, F., Bucciarelli-Ducci, C., Katus, H. A., ... Corbett, S. (2019). Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *European Heart Journal*, 40(3), 237–269. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy462>
- Timmers, L., Lim, S. K., Arslan, F., Armstrong, J. S., Hoefer, I. E., Doevendans, P. A., Piek, J. J., El Oakley, R. M., Choo, A., Lee, C. N., Pasterkamp, G., & de Kleijn, D. P. V. (2008). Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Research*, 1(2), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2008.02.002>
- Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, 164(6), 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>
- Tripathi, H., Domingues, A., Donahue, R., Cras, A., Guerin, C. L., Gao, E., Levitan, B., Ratajczak, M. Z., Smadja, D. M., Abdel-Latif, A., & Tarhuni, W. M. (2023). Combined Transplantation of Human MSCs and ECFCs Improves Cardiac Function and Decrease Cardiomyocyte Apoptosis After Acute Myocardial Infarction. *Stem Cell Reviews and Reports*, 19(2), 573–577. <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10468-z>
- Tsuji, H., Miyoshi, S., Ikegami, Y., Hida, N., Asada, H., Togashi, I., Suzuki, J., Satake, M., Nakamizo, H., Tanaka, M., Mori, T., Segawa, K., Nishiyama, N., Inoue, J., Makino, H., Miyado, K., Ogawa, S., Yoshimura, Y., & Umezawa, A. (2010). Xenografted Human Amniotic Membrane–Derived Mesenchymal Stem Cells Are Immunologically Tolerated and Transdifferentiated Into Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 106(10), 1613–1623. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.205260>
- U.S. National Library of Medicine. (2025). *ClinicalTrials.gov*. <https://Clinicaltrials.gov>.
- Ushakov, A., Ivanchenko, V., & Gagarina, A. (2020). Regulation of Myocardial Extracellular Matrix Dynamic Changes in Myocardial Infarction and Postinfarct Remodeling. *Current Cardiology Reviews*, 16(1), 11–24. <https://doi.org/10.2174/1573403X15666190509090832>

Bibliografía

- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötval, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J., & Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs: Table 1. *Genes & Development*, 20(5), 515–524. <https://doi.org/10.1101/gad.1399806>
- van Berlo, J. H., Maillet, M., & Molkentin, J. D. (2013). Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 37–45. <https://doi.org/10.1172/JCI62839>
- van der Bogt, K. E. A., Sheikh, A. Y., Schrepfer, S., Hoyt, G., Cao, F., Ransohoff, K. J., Swijnenburg, R.-J., Pearl, J., Lee, A., Fischbein, M., Contag, C. H., Robbins, R. C., & Wu, J. C. (2008). Comparison of Different Adult Stem Cell Types for Treatment of Myocardial Ischemia. *Circulation*, 118(14_suppl_1). <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.759480>
- van Diepen, S., Katz, J. N., Albert, N. M., Henry, T. D., Jacobs, A. K., Kapur, N. K., Kilic, A., Menon, V., Ohman, E. M., Sweitzer, N. K., Thiele, H., Washam, J. B., & Cohen, M. G. (2017). Contemporary Management of Cardiogenic Shock: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 136(16). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000525>
- Vidigal, J. A., & Ventura, A. (2015). The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends in Cell Biology*, 25(3), 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.11.004>
- Vinhas, M., Araújo, A. C., Ribeiro, S., Rosário, L. B., & Belo, J. A. (2013). Transthoracic echocardiography reference values in juvenile and adult 129/Sv mice. *Cardiovascular Ultrasound*, 11(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1476-7120-11-12>
- Vizoso, F., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1852. <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>

Bibliografía

- Wang, A. Z., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2012). Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. *Annual Review of Medicine*, 63(1), 185–198. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-040210-162544>
- Wang, G., Yin, H., Li, B., Yu, C., Wang, F., Xu, X., Cao, J., Bao, Y., Wang, L., Abbasi, A. A., Bajic, V. B., Ma, L., & Zhang, Z. (2019). Characterization and identification of long non-coding RNAs based on feature relationship. *Bioinformatics*, 35(17), 2949–2956. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz008>
- Wang, L., Sun, H., Cao, L., & Wang, J. (2024). Role of HOXA1-4 in the development of genetic and malignant diseases. *Biomarker Research*, 12(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s40364-024-00569-x>
- Wang, T., Li, T., Niu, X., Hu, L., Cheng, J., Guo, D., Ren, H., Zhao, R., Ji, Z., Liu, P., Li, Y., & Guo, Y. (2023). ADSC-derived exosomes attenuate myocardial infarction injury by promoting miR-205-mediated cardiac angiogenesis. *Biology Direct*, 18(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13062-023-00361-1>
- Wang, T., Sun, S., Wan, Z., Weil, M. H., & Tang, W. (2012). Effects of bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model of myocardial infarction. *Resuscitation*, 83(11), 1391–1396. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2012.02.033>
- Wang, X.-Y., Guan, X.-H., Yu, Z.-P., Wu, J., Huang, Q.-M., Deng, K.-Y., & Xin, H.-B. (2021). Human amniotic stem cells-derived exosomal miR-181a-5p and miR-199a inhibit melanogenesis and promote melanosome degradation in skin hyperpigmentation, respectively. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 501. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02570-9>
- Ward, M., McEwan, C., Mills, J. D., & Janitz, M. (2015). Conservation and tissue-specific transcription patterns of long noncoding RNAs. *Journal of Human Transcriptome*, 1(1), 2–9. <https://doi.org/10.3109/23324015.2015.1077591>
- Whitesides, G. M. (2003). The “right” size in nanobiotechnology. *Nature Biotechnology*, 21(10), 1161–1165. <https://doi.org/10.1038/nbt872>
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855–862. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4)

Bibliografía

- Wilczynska, A., & Bushell, M. (2015). The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death & Differentiation*, 22(1), 22–33. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.112>
- World Health Organization. (2021). *Cardiovascular diseases (CVDs)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
- Xanthopoulos, A., Skoularigis, J., & Triposkiadis, F. (2023). The Neurohormonal Overactivity Syndrome in Heart Failure. *Life*, 13(1), 250. <https://doi.org/10.3390/life13010250>
- Xie, L., Zhang, Q., Mao, J., Zhang, J., & Li, L. (2021). The Roles of lncRNA in Myocardial Infarction: Molecular Mechanisms, Diagnosis Biomarkers, and Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.680713>
- Xing, P.-C., An, P., Hu, G.-Y., Wang, D.-L., & Zhou, M.-J. (2020). lncRNA MIAT Promotes Inflammation and Oxidative Stress in Sepsis-Induced Cardiac Injury by Targeting miR-330-5p/TRAF6/NF- κ B Axis. *Biochemical Genetics*, 58(5), 783–800. <https://doi.org/10.1007/s10528-020-09976-9>
- Yang, C., Zhang, Y., & Yang, B. (2022). MIAT, a potent CVD-promoting lncRNA. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(1), 43. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04046-8>
- Yang, H., Qin, X., Wang, H., Zhao, X., Liu, Y., Wo, H.-T., Liu, C., Nishiga, M., Chen, H., Ge, J., Sayed, N., Abilez, O. J., Ding, D., Heilshorn, S. C., & Li, K. (2019). An *in Vivo* miRNA Delivery System for Restoring Infarcted Myocardium. *ACS Nano*, 13(9), 9880–9894. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b03343>
- Yang, L., Hu, R., Yuan, C., Guan, L., & Mu, Y. (2023). Screening of the best time window for MSC transplantation to treat acute myocardial infarction with SDF-1 α antibody-loaded targeted ultrasonic microbubbles: An *in vivo* study in miniswine. *Open Life Sciences*, 18(1). <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0620>
- Yang, L., Wang, T., Zhang, X., Zhang, H., Yan, N., Zhang, G., Yan, R., Li, Y., Yu, J., He, J., Jia, S., & Wang, H. (2022). Exosomes derived from human placental mesenchymal stem cells ameliorate myocardial infarction via anti-inflammation and restoring gut dysbiosis. *BMC Cardiovascular Disorders*, 22(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12872-022-02508-w>
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17(24), 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>

Bibliografía

- Yin, X., Yin, X., Pan, X., Zhang, J., Fan, X., Li, J., Zhai, X., Jiang, L., Hao, P., Wang, J., & Chen, Y. (2023). Post-myocardial infarction fibrosis: Pathophysiology, examination, and intervention. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1070973>
- Yousefi, F., Shabaninejad, Z., Vakili, S., Derakhshan, M., Movahedpour, A., Dabiri, H., Ghasemi, Y., Mahjoubin-Tehran, M., Nikoozadeh, A., Savardashtaki, A., Mirzaei, H., & Hamblin, M. R. (2020). TGF- β and WNT signaling pathways in cardiac fibrosis: non-coding RNAs come into focus. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00555-4>
- Yuan, F., Liu, J., Zhong, L., Liu, P., Li, T., Yang, K., Gao, W., Zhang, G., Sun, J., & Zou, X. (2025). Enhanced therapeutic effects of hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles in renal ischemic injury. *Stem Cell Research & Therapy*, 16(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s13287-025-04166-z>
- Yuan, Q., Zhang, Y., & Chen, Q. (2020). Mesenchymal Stem Cell (MSC)-Derived Extracellular Vesicles: Potential Therapeutics as MSC Trophic Mediators in Regenerative Medicine. *The Anatomical Record*, 303(6), 1735–1742. <https://doi.org/10.1002/ar.24186>
- Zaaqoq, A. M., Mazzeffi, M. A., Vogelsong, M. A., Roeser, M., & Cho, S.-M. (2025). Lung injury in myocardial infarction-associated cardiogenic shock supported by venoarterial extracorporeal membrane oxygenation: a scoping review. *BMC Cardiovascular Disorders*, 25(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12872-025-04472-7>
- Zaragoza, C., Gomez-Guerrero, C., Martin-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L., Lavin, B., Mallavia, B., Tarin, C., Mas, S., Ortiz, A., & Egido, J. (2011). Animal Models of Cardiovascular Diseases. *BioMed Research International*, 2011(1). <https://doi.org/10.1155/2011/497841>
- Zaragoza, C., Saura, M., Hernández, I., Ramirez-Carracedo, R., García-García, F., Zamorano, J. L., Mangas, A., & Toro, R. (2019). Differential expression of circulating miRNAs as a novel tool to assess BAG3-associated familial dilated cardiomyopathy. *Bioscience Reports*, 39(3). <https://doi.org/10.1042/BSR20180934>
- Zhang, J., Wu, Y., Chen, A., & Zhao, Q. (2015). Mesenchymal Stem Cells Promote Cardiac Muscle Repair via Enhanced Neovascularization. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35(3), 1219–1229. <https://doi.org/10.1159/000373945>
- Zhang, W., Liu, X.-C., Yang, L., Zhu, D.-L., Zhang, Y.-D., Chen, Y., & Zhang, H.-Y. (2013). Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells promote myocardial regeneration and

Bibliografía

- cardiac repair after miniswine acute myocardial infarction. *Coronary Artery Disease*, 24(7), 549–558. <https://doi.org/10.1097/MCA.0b013e3283640f00>
- Zhao, P., Ise, H., Hongo, M., Ota, M., Konishi, I., & Nikaido, T. (2005). Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation*, 79(5), 528–535. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000149503.92433.39>
- Zhou, R.-S., Zhang, E.-X., Sun, Q.-F., Ye, Z.-J., Liu, J.-W., Zhou, D.-H., & Tang, Y. (2019). Integrated analysis of lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA network in squamous cell carcinoma of tongue. *BMC Cancer*, 19(1), 779. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5983-8>
- Zhou, S., Jin, J., Wang, J., Zhang, Z., Freedman, J. H., Zheng, Y., & Cai, L. (2018). miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(7), 1073–1084. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.30>
- Zhu, F., Chen, Y., Li, J., Yang, Z., Lin, Y., Jiang, B., Shao, L., Hu, S., & Shen, Z. (2022). Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Attenuate Myocardial Infarction Injury via miR-24-3p-Promoted M2 Macrophage Polarization. *Advanced Biology*, 6(11). <https://doi.org/10.1002/adbi.202200074>
- Zhu, X.-H., Yuan, Y.-X., Rao, S.-L., & Wang, P. (2016). LncRNA MIAT enhances cardiac hypertrophy partly through sponging miR-150. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20(17), 3653–3660.

ANEXOS

Anexos

Producción científica durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral:

Alcharani N, Tesoro L, Díez-Mata J, Zamorano JL, Saura M, Iglesias M, Zaragoza C. Identification of miR-150-5p in Human Amniotic Membrane Mesenchymal Cell-Derived Extracellular Vesicles as a Novel Mechanism Driving Cardioprotection. **Eur J Clin Invest.** 2026 May;56(5):e70212. doi: 10.1111/eci.70212. PMID: 42047346; PMCID: PMC13123203.

Viskadourou M, Chaudhry S, Scalco A, Reventun P, Toledano-Sanz P, An R, **Alcharani N**, Delgado Marin M, Fennell A, Zhao Q, Osburn W, McCallion AS, Quertermous T, Battle A, Lowenstein CJ, Arvanitis M. Functional Genomics Link REST to Endothelial Plasticity and Atherosclerosis. **Circ Res.** 2026 Jan 2;138(1):e326628. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.125.326628. Epub 2025 Nov 26. PMID: 41293823; PMCID: PMC12908446.

Reventun P, Toledano-Sanz P, Delgado-Marin M, Viskadourou M, Foster DB, de Vries PS, Sabater-Lleal M, **Alcharani N**, Gonzalez-Cucharero C, Osburn WO, Morrison AC, Wolberg AS, Smith NL, Arvanitis M; Cohorts for Heart and Aging in Genomic Epidemiology Hemostasis Working Group; Lowenstein CJ. RAB5C Increases Endothelial Release of VWF by Regulating Vesicle Trafficking. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2026 Mar;46(3):e323000. doi: 10.1161/ATVBAHA.125.323000. Epub 2026 Jan 15. PMID: 41537263; PMCID: PMC12823045.

Rodríguez-Serrano M, Martín-García E, Alonso-Andrés P, Conde-Moreno E, Pian H, Del Moral-Salmoral J, **Alcharani N**, Menacho-Román M, Crespo-Toro L, Ramos-Muñoz ME, Zaragoza C, Rincón LM, Barderas MG, García-Bermejo ML. Dynamic microRNA Signatures as Biomarkers for Cardiac Ischemia and Remodeling. **Int J Mol Sci.** 2026 Feb 3;27(3):1488. doi: 10.3390/ijms27031488. PMID: 41683909; PMCID: PMC12897856.

Hernandez I, Botana L, Díez-Mata J, Tesoro L, Jimenez-Guirado B, Gonzalez-Cucharero C, **Alcharani N**, Zamorano JL, Saura M, Zaragoza C. CAP1: a novel extracellular vesicle marker linked to endothelial senescence in atherosclerosis. **Biol Direct.** 2025 Apr 6;20(1):46. doi: 10.1186/s13062-025-00646-7. PMID: 40189560; PMCID: PMC11974053.

Reventun P, Toledano-Sanz P, **Alcharani N**, Viskadourou M, Morrison AC, Sabater-Lleal M, Wolberg AS, de Vries PS, Smith NL, Osburn WO, Arvanitis M, Lowenstein CJ. CD36 regulates factor VIII secretion from liver endothelial cells. **Blood Adv.** 2024 Jan 9;8(1):143-149. doi: 10.1182/bloodadvances.2023010023. PMID: 38157226; PMCID: PMC10787269.

Hernandez-Navarro I, Botana L, Díez-Mata J, Tesoro L, Jiménez-Guirado B, González-Cucharero C, **Alcharani N**, Zamorano JL, Saura M, Zaragoza C. Replicative Endothelial Cell Senescence May Lead to Endothelial Dysfunction by Increasing the BH2/BH4 Ratio Induced by Oxidative Stress, Reducing BH4 Availability, and Decreasing the Expression of eNOS. **Int J Mol Sci.** 2024 Sep 13;25(18):9890. doi: 10.3390/ijms25189890. PMID: 39337378; PMCID: PMC11432946.

Ramírez-Carracedo R, Hernández I, Moreno-Gómez-Toledano R, Díez-Mata J, Tesoro L, González-Cucharero C, Jiménez-Guirado B, **Alcharani N**, Botana L, Saura M, Zamorano JL, Zaragoza C. NOS3 prevents MMP-9, and MMP-13 induced extracellular matrix proteolytic degradation through specific microRNA-targeted expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in hypertension-related atherosclerosis. **J Hypertens.** 2024 Apr 1;42(4):685-693. doi: 10.1097/HJH.0000000000003679. Epub 2024 Feb 20. PMID: 38406874; PMCID: PMC10906209.

Toledano-Sanz P, Reventun P, Viskadourou M, Osburn WO, **Alcharani N**, Lowenstein CJ, Arvanitis M. The transcriptional landscape of human liver endothelial cells. **Blood Adv.** 2023 May 23;7(10):2047-2052. doi: 10.1182/bloodadvances.2022008818. PMID: 36634263; PMCID: PMC10196782.

Moreno-Gómez-Toledano R, Delgado-Marín M, Cook-Calvete A, González-Cucharero C, **Alcharani N**, Jiménez-Guirado B, Hernandez I, Ramirez-Carracedo R, Tesoro L, Botana L, Sánchez-Esteban S, Díez-Mata J, Zamorano JL, Bosch RJ, Zaragoza C, Saura M. New environmental factors related to diabetes risk in humans: Emerging bisphenols used in synthesis of plastics. **World J Diabetes.** 2023 Aug 15;14(8):1301-1313. doi: 10.4239/wjd.v14.i8.1301. PMID: 37664470; PMCID: PMC10473949.

Tesoro L, Hernández I, Ramírez-Carracedo R, Díez-Mata J, **Alcharani N**, Jiménez-Guirado B, Ovejero-Paredes K, Filice M, Zamorano JL, Saura M, Zaragoza C,

Botana L. NIL10: A New IL10-Receptor Binding Nanoparticle That Induces Cardiac Protection in Mice and Pigs Subjected to Acute Myocardial Infarction through STAT3/NF- κ B Activation. **Pharmaceutics**. 2022 Sep 26;14(10):2044. doi: 10.3390/pharmaceutics14102044. PMID: 36297479; PMCID: PMC9608724.

Premios y reconocimientos obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral:

Premio a mejor ponencia oral - *European Society for Clinical Investigation*

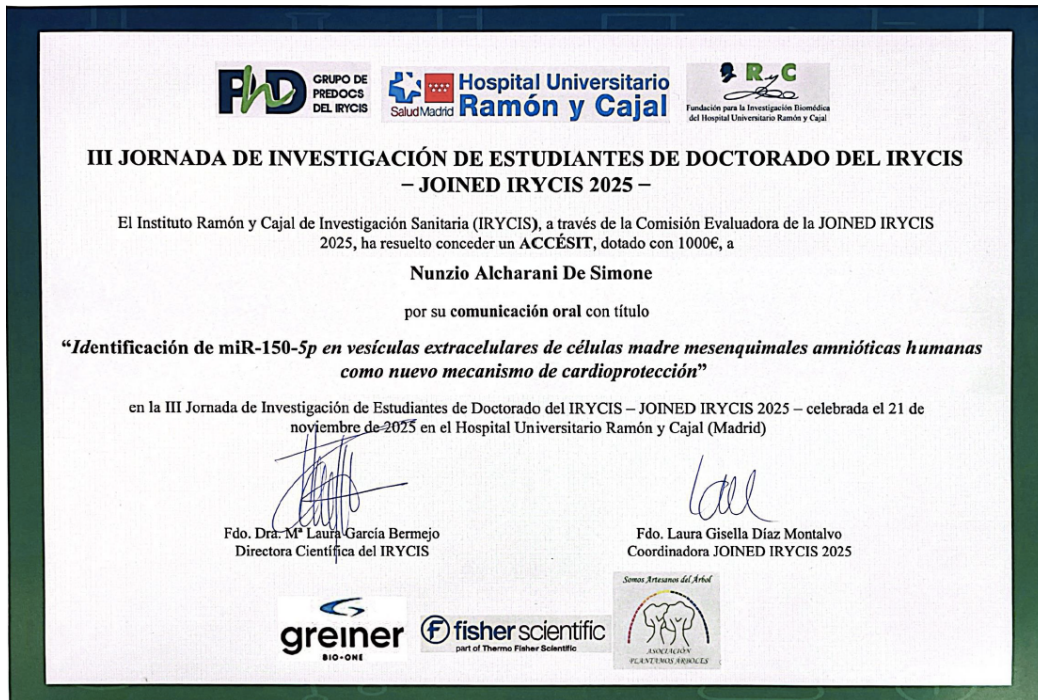


Premio a mejor presentación de póster - *European Society for Clinical Investigation*



Anexos

Premio por Presentación - III Jornada de Investigación de Estudiantes de Doctorado del IRYCIS



Premio por Presentación - Stem Cells and Regenerative Medicine Conference



Anexos

Ayuda Económica Para Personal Investigador Predoctoral 2025 - Banco Santander



¡Enhorabuena Nunzio Alcharani !

Santander Open Academy te concede una plaza para el programa

Beca Santander | Ayuda Económica Para Personal Investigador Predoctoral 2025



www.santanderopenacademy.com



