

UAH

**VESÍCULAS EXTRACELULARES
EN EL DIAGNÓSTICO Y
TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES
CARDIOVASCULARES**

**EXTRACELLULAR VESICLES
IN DIAGNOSIS AND
TREATMENT OF
CARDIOVASCULAR DISEASES**

Grado en Medicina

Presentado por:

D. JUAN LORENZO FRAILE, estudiante de Grado en Medicina de la Universidad de Alcalá.

Tutorizado por:

D.ª MARTA SAURA REDONDO, Profesora Titular del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá.

Alcalá de Henares, a 5 de mayo de 2023

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

**VESÍCULAS EXTRACELULARES EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO
DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES**

**EXTRACELLULAR VESICLES IN DIAGNOSIS AND TREATMENT OF
CARDIOVASCULAR DISEASES**

Autor: D. Juan Lorenzo Fraile¹.

Tutora: D.^a Marta Saura Redondo².

¹Estudiante de Grado en Medicina de la Universidad de Alcalá.

²Profesora Titular del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá.

Palabras clave: vesículas extracelulares, infarto agudo de miocardio, ictus isquémico, enfermedad cardiovascular, exosomas, biomarcadores, células cardíacas.

Keywords: extracellular vesicles, acute myocardial infarction, ischemic stroke, cardiovascular disease, exosomes, biomarkers, cardiac cells.

En Alcalá de Henares, a 5 de mayo de 2023.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
- Resumen/Abstract	1
- Abreviaturas	3
- Introducción y objetivos	4
- Material y métodos	6
- Resultados y discusión	8
1. <i>Las vesículas extracelulares</i>	8
2. <i>Tipos de EV</i>	10
3. <i>EV en el sistema cardiovascular</i>	12
3.1. <i>Células productoras de EV</i>	
3.2. <i>EV en fisiopatología cardiovascular</i>	
4. <i>EV en el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares</i>	17
4.1. <i>Infarto agudo de miocardio</i>	
4.2. <i>Accidente cerebrovascular</i>	
5. <i>Potencial terapéutico en enfermedades cardiovasculares</i>	20
5.1. <i>Infarto agudo de miocardio</i>	
5.2. <i>Accidente cerebrovascular</i>	
6. <i>Limitaciones actuales de las EV</i>	23
- Conclusiones	24
- Bibliografía	27
- Agradecimientos	34

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en los países occidentales, siendo el infarto agudo de miocardio y el ictus isquémico dos de las entidades con mayor peso en términos de defunciones y morbilidad asociada. Desde su descubrimiento, las vesículas extracelulares han suscitado un interés considerable en la comunidad científica, produciéndose en los últimos años un aumento exponencial de su relevancia en el campo de la medicina cardiovascular a medida que se reconoce el potencial derivado de sus funciones. La posibilidad para transportar todo tipo de moléculas reguladoras, incluyendo diferentes tipos de RNA, lípidos y proteínas, sumado a su capacidad para modificar la actividad de las células diana e inducir fenómenos como la angiogénesis e inhibir la apoptosis, ha puesto a estas moléculas en el punto de mira de las investigaciones relacionadas con el diagnóstico y tratamiento de todo tipo de enfermedades, en especial, aquellas relacionadas con el corazón y los vasos sanguíneos. Teniendo en cuenta el incremento constante de publicaciones relacionadas con este campo, resulta necesario describir el conocimiento obtenido hasta la fecha sobre las características básicas de estas moléculas, para posteriormente centrarse en sus funciones en el sistema cardiovascular. La comprensión de estos procesos puede ayudar en el desarrollo de biomarcadores y agentes terapéuticos que impulsen el progreso de la medicina regenerativa.

Palabras clave: vesículas extracelulares, infarto agudo de miocardio, ictus isquémico, enfermedad cardiovascular, exosomas, biomarcadores, células cardíacas.

Abstract

Cardiovascular diseases are the main cause of death in Western countries, with acute myocardial infarction and ischemic stroke being two of the entities with the greatest weight in terms of deaths and associated morbidity. Since their discovery, extracellular vesicles have aroused considerable interest in the scientific community, with their relevance in the field of cardiovascular medicine exponentially increasing in recent years as the potential derived from their functions is recognized. The possibility of transporting all kinds of regulatory molecules, including different types of RNA, lipids, and proteins, added to their ability to modify the activity of target cells and induce phenomena such as angiogenesis and inhibit apoptosis, has put these molecules in the spotlight of research related to the diagnosis and treatment of all kinds of diseases, especially those related to

the heart and blood vessels. Considering the constant increase in publications related to this field, it is necessary to describe the knowledge obtained to date on the basic characteristics of these molecules, to later focus on their functions in the cardiovascular system. Understanding these processes may help in the development of biomarkers and therapeutic agents that drive progress in regenerative medicine.

Key words: extracellular vesicles, acute myocardial infarction, ischemic stroke, cardiovascular disease, exosomes, biomarkers, cardiac cells.

Abreviaturas

ACV: Accidente cerebrovascular

CD: Cluster of differentiation

CI: Cardiopatía isquémica

CPC: Células progenitoras cardíacas

ECV: Enfermedades cardiovasculares

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

HIF: Factor inducible por hipoxia

HSP: Heat Shock Proteins/Proteínas de shock térmico

IAMCEST: Infarto agudo de miocardio con elevación del ST

IC: Insuficiencia cardíaca

IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

ILV: Vesículas intraluminales

ISEV: Sociedad Internacional para las Vesículas Extracelulares

LCR: Líquido cefalorraquídeo

miRNA: micro RNA

MISEV: Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles

MMP-9: Metalopeptidasa de matriz 9

mRNA: RNA mensajero

MSC: Mesenquimal stem cell

MV: Microvesículas

MVB: Cuerpos multivesiculares

NEAT1: Transcrito nuclear abundante enriquecido 1

NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

qRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RAA: Renina-angiotensina-aldosterona

TNF: Tumoral necrosis factor/Factor de necrosis tumoral

VE: Vesículas extracelulares

Introducción y objetivos

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) comprenden un amplio espectro de condiciones patológicas que involucran los vasos sanguíneos y el corazón, siendo la cardiopatía isquémica (CI), la enfermedad arterial coronaria, la insuficiencia cardíaca (IC) y el accidente cerebrovascular (ACV) los tipos más frecuentes¹. Según el último informe de la OMS, las enfermedades cardiovasculares siguen siendo hoy en día la primera causa de defunción a nivel mundial, representando un tercio del total de muertes globales (de las cuales el 85% son debidas a infarto e ictus)² y siendo responsables de una enorme carga socioeconómica: solo la cardiopatía isquémica (principal causa de muerte en Europa), representa 1.8 millones de muertes al año, derivándose unos costes a la economía de la Unión Europea de hasta 60.000 millones de euros anuales en concepto de pérdidas de productividad y gasto directo del sistema sanitario³. A pesar de los numerosos avances en el ámbito de la farmacoterapia, el pronóstico de estas enfermedades sigue siendo ciertamente infausto. Para ilustrarlo, pongamos el caso de la insuficiencia cardíaca, cuya mortalidad es comparable a la de los procesos cancerosos más prevalentes, aportando cifras de supervivencia a los 4 años inferiores al 50% según las series⁴. Si bien es cierto que el manejo de las patologías mencionadas podría mejorar enormemente mediante el diagnóstico precoz, lograrlo supone todavía un auténtico reto. Véase el ejemplo de los péptidos natriuréticos y las troponinas cardíacas: aun considerándose dos marcadores diagnósticos ampliamente empleados en el ámbito clínico, su sensibilidad y especificidad se ven modificadas sistemáticamente por factores como la edad, el sexo e incluso comorbilidades como la insuficiencia renal^{5,6}. Del mismo modo, y a pesar del desarrollo farmacológico, el tratamiento de las principales ECV se sigue basando en el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), betabloqueantes, inhibidores del receptor de mineralocorticoides, antitrombóticos, neprilisina y estatinas⁷. Estos fármacos, aunque logran frenar el avance de la enfermedad, están lejos de lograr la regeneración del músculo cardíaco perdido³. De esta forma, los esfuerzos se están centrando en la búsqueda de biomarcadores precisos capaces de ofrecer una certeza diagnóstica precoz (e incluso a nivel preventivo), así como terapias más eficaces, centradas en el ámbito de la medicina regenerativa y que sean capaces de mejorar significativamente el pronóstico de las ECV.

Desde su descubrimiento en la década de los 70, las vesículas extracelulares (EV) han suscitado un enorme interés a los miembros de la comunidad científica. Las EV son,

básicamente, estructuras delimitadas por una bicapa lipídica que se liberan de forma natural desde las células y que, además, carecen de capacidad para replicarse. Inicialmente, se pensó que el funcionamiento de estas vesículas se limitaba a la eliminación de productos de desecho⁸, mientras que, desde hace unas tres décadas, las vesículas extracelulares se han erigido como uno de los grandes métodos de comunicación intercelular que poseen los organismos pluricelulares, junto con la liberación de moléculas y el contacto directo entre células⁹. Hoy por hoy son bien conocidas tanto su capacidad para transportar todo tipo de moléculas (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y otros metabolitos) como su participación en numerosos procesos biológicos, entre los que destacan la ya mencionada comunicación intercelular y la liberación de cuerpos apoptóticos para el correcto mantenimiento de la homeostasis^{10,11}. La inmensa variedad de posibilidades derivadas de sus funciones (por otra parte, esenciales para el organismo), dota a las EV de un potencial muy atractivo desde el punto de vista clínico. Actualmente se sabe que prácticamente todos los fluidos corporales contienen EV en mayor o menor medida, siendo estas secretadas tanto en situaciones fisiológicas como en el contexto de procesos patológicos. Hasta la fecha han sido descritos tres tipos de EV: los exosomas, las microvesículas y los cuerpos apoptóticos, divididos según su tamaño y en función del mecanismo de liberación (aunque su clasificación constituye todavía un importante motivo de debate)⁸. De la misma forma, los métodos de aislamiento y análisis de vesículas no se encuentran todavía bien definidos, constituyendo su estandarización uno de los principales desafíos en este campo⁹. La resolución de estos problemas puede resultar de gran ayuda en el desarrollo de futuras herramientas diagnósticas¹².

En lo que al sistema cardiovascular respecta, se ha demostrado que las EV podrían ser liberadas por las principales células del corazón, como los cardiomiocitos, los fibroblastos, células endoteliales y las células musculares lisas pertenecientes a los vasos sanguíneos¹³. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, las EV han generado un enorme interés en el campo de la cardiología, postulándose cada vez más como el futuro de los biomarcadores en términos de predicción de ECV y también en el ámbito terapéutico, dada su potencial capacidad para el transporte de moléculas farmacológicamente activas¹³. Aun con todo, para lograr la introducción de estas partículas en un contexto clínico, todavía es necesario dominar todos los aspectos

referentes a su caracterización y funcionamiento, así como impulsar el desarrollo de ensayos que permitan comprobar su eficacia y seguridad en pacientes humanos.

El objetivo de esta revisión es, en primer lugar, dar a conocer el mundo de las vesículas extracelulares mediante un planteamiento teórico que incluya los diferentes tipos de EV y sus características diferenciales, así como su funcionamiento básico en el organismo, para, posteriormente centrarse en sus implicaciones concretas en el sistema cardiovascular. En segundo lugar, se describe el papel de las EV como biomarcadores y su potencial uso en el diagnóstico de las enfermedades cardiovasculares más relevantes, exponiendo los principales avances alcanzados hasta la fecha en este ámbito en función de la bibliografía existente. Por último, se enumeran las posibles aplicaciones terapéuticas que las EV puedan tener en patología cardiovascular y las perspectivas de futuro en este campo.

Material y métodos

Para la realización del presente Trabajo de Fin de Grado, se llevó a cabo una revisión bibliográfica de la literatura actual relacionada con las vesículas extracelulares y sus potenciales aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Del mismo modo, se consideró conveniente incluir información básica acerca del funcionamiento de las vesículas para facilitar la comprensión del resto de apartados. En primer lugar, se procedió a la lectura de revisiones anteriores para conocer el estado del tema en concreto. Todas ellas fueron publicadas entre los años 2015 y 2017. Una vez recopilada la información necesaria para organizar la estructura del trabajo, se recurrió a las bases de datos para obtener los artículos que más adelante serían utilizados.

El principal recurso empleado para obtener la bibliografía fue la base de datos PubMed, siendo las únicas excepciones la utilización de 2 artículos pertenecientes a la Revista Española de Cardiología y la web de la Organización Mundial de la Salud, que sirvieron de ayuda para confeccionar el apartado de *introducción y objetivos*. La totalidad de las búsquedas se realizaron en inglés, además, los artículos se filtraron por año de publicación, manejándose únicamente aquellos publicados en la última década: entre 2013 y 2023, ambos inclusive, con la finalidad de contar con la información más actualizada posible. La única excepción a esta norma se presentó en 6 artículos cuya información se extrajo para completar los capítulos relacionados con la caracterización de las vesículas en los primeros epígrafes del apartado *resultados y discusión*.

Para confeccionar los tres primeros capítulos se realizó una búsqueda bibliográfica empleando palabras clave como: *biogenesis, biomarkers, cardiovascular disease, exosomes, extracellular vesicles, ischaemia, microvesicles, physiology, proteins, RNA*, y otras. Teniendo en cuenta los criterios anteriormente mencionados, se seleccionaron unos 90 artículos con información relacionada con el funcionamiento de las vesículas extracelulares y su protagonismo en el sistema cardiovascular. Se comenzó leyendo el resumen para seleccionar aquellos con contenido relevante, quedando además excluidos los que aportaban contenidos similares o redundantes en comparación con otros, priorizando los más actualizados según la fecha de publicación. Quedaron excluidos alrededor de 30 artículos, empleándose finalmente 50 para la consecución de estos capítulos. Los criterios de inclusión para los capítulos relacionados con diagnóstico y tratamiento fueron más estrictos. Para llevar a cabo la búsqueda se empleó la herramienta *PubMed Advanced Search Builder*, siendo las combinaciones de términos y operadores booleanos que arrojaron mejores resultados las siguientes: *((Extracellular vesicles) OR (exosomes)) AND (diagnosis) AND ((acute myocardial infarction) OR (ischemic stroke))* para el apartado de diagnósticos y *((Extracellular vesicles) OR (exosomes)) AND (treatment) AND ((acute myocardial infarction) OR (ischemic stroke)) AND (trial)* para el de tratamientos. Se seleccionaron aquellos artículos consistentes en trabajos experimentales, ya fuese en humanos o animales, excluyendo las revisiones bibliográficas. Finalmente se emplearon para la confección de estos últimos capítulos un total 24 artículos científicos. Las referencias bibliográficas se presentaron según el orden de aparición en el texto, estando convenientemente citadas en formato Vancouver.

Resultados y discusión

1. LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Las EV constituyen una familia heterogénea de vesículas limitadas por membrana cuyo origen puede ser encontrarse en un endosoma o en la propia membrana plasmática¹⁴. Las vesículas pueden proceder de todo tipo de células, véase: células dendríticas, plaquetas, células B y T, mastocitos, células epiteliales y endoteliales, células madre mesenquimales (MSC), células neuronales, e incluso células tumorales. Del mismo modo, se ha logrado aislar estas vesículas en todo tipo de fluidos corporales a parte de la sangre: líquido amniótico, ascítico, líquido cefalorraquídeo (LCR), saliva, orina, leche materna y semen⁹. Estas partículas a nano-escala se encuentran encerradas en membranas capaces de ser liberadas por todas las células, tanto eucariotas como procariotas, transportando en su interior proteínas, lípidos y moléculas de DNA o RNA¹⁵. Por otra parte, poseen en sus membranas marcadores específicos de la familia de las tetraspaninas, siendo los más empleados para su identificación el CD9, CD63, CD81 y CD82⁹, aunque algunos estudios indican que CD63 podría no encontrarse en todos los subgrupos de vesículas¹⁶, y, hasta la fecha, no se ha encontrado ningún marcador exclusivo de EV¹⁷. Dado el extraordinario aumento en el número de publicaciones científicas tratando de describir las funciones fisiológicas y patológicas de las EV, sumado a la evidente heterogeneidad que presentan entre sí, la Sociedad Internacional para las Vesículas Extracelulares (ISEV por sus siglas en inglés) propuso en el año 2014 la guía *Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles* (MISEV), que recientemente ha sido actualizada a su versión de 2018. MISEV2018 define las EV como todas aquellas partículas liberadas de forma natural por la célula que se encuentran rodeadas por una bicapa lipídica y no tienen capacidad de replicación (es decir, no tienen núcleo)¹⁸. La guía ofrece además diferentes pautas en relación con la nomenclatura a seguir, los métodos adecuados de aislamiento y separación de EV, así como su caracterización y diferentes estudios para aclarar su funcionamiento.

En un primer momento se consideró la liberación de EV como un mecanismo de la célula de origen para eliminar metabolitos no deseados y otros productos de desecho procedentes del espacio intracelular⁸. Hoy en día, la visión de las EV como meros recipientes de desechos celulares ha sido ampliamente superada, habiéndose asociado numerosas funciones a la liberación de estas vesículas: mantenimiento de la homeostasis, procesos relacionados con la coagulación¹⁹, promoción de la angiogénesis²⁰, diferenciación y proliferación celular²¹, e incluso funciones relacionadas con el sistema

inmunológico, como la presentación de antígenos y la implicación en numerosas enfermedades de carácter inflamatorio (como el cáncer, la obesidad, la DM2, procesos reumatológicos y degenerativos, etc.)^{22,23}. El denominador común a todas estas funciones y que, en esencia, permite a las EV llevar a cabo todos los procesos mencionados es su papel clave en la comunicación intercelular. El modo en que las EV interactúan con las células determina sus efectos. De este modo, la vesícula puede desencadenar una cascada de señalización a través de la interacción entre sus proteínas y/o ligandos lipídicos con receptores de la superficie celular¹⁴, o bien pueden internalizarse en el citoplasma o en el núcleo^{14,24}. Las diferentes vías de captación de EV quedan resumidas en la Figura 1. Existen evidencias de que cada tipo celular es capaz de sintonizar la biogénesis de EV en función de su estado fisiológico y, del mismo modo, modificar su composición y, por tanto, su función²⁵. En relación con esto último, dado que la mayor parte de la información publicada se ha centrado hasta ahora en conocer las posibles funciones de las EV y no en sus orígenes, todavía no está del todo claro qué subespecies son responsables de cada efecto²⁶.

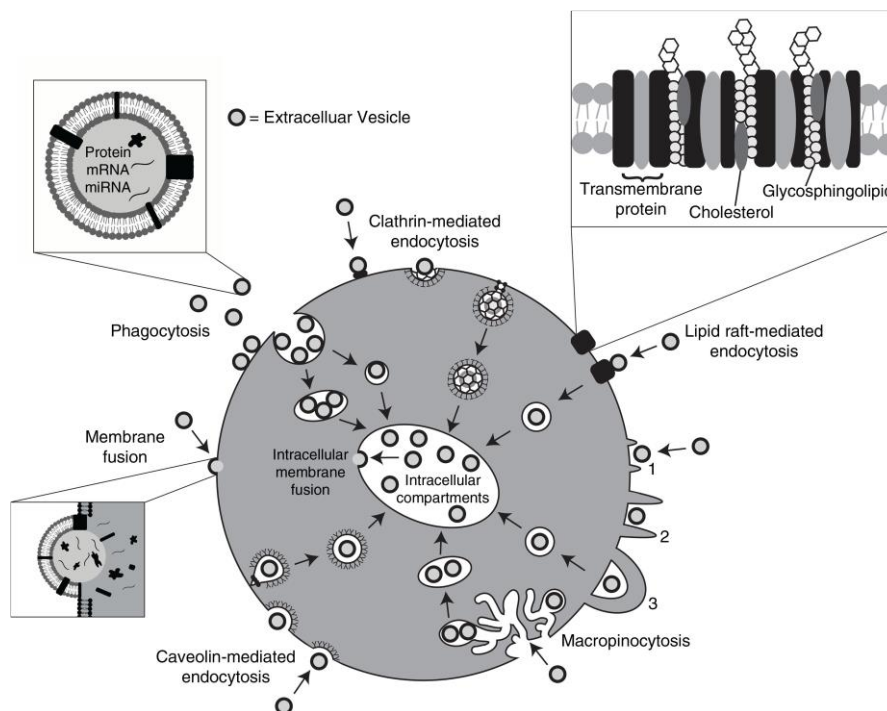


Figura 1. Vías de participación en la captación de EV por parte de las células diana. Se ha demostrado que las EV pueden internalizarse en las células por medio de fagocitosis, y endocitosis mediada por clatrina y caveolina. También existe evidencia que apoya la interacción con balsas lipídicas, dando como resultado la absorción de EV. Otro modelo es la macropinocitosis, donde las protuberancias de la membrana rodean a la EV para encerrarla y atraerla hacia el interior. Las EV pueden liberar las partículas transportadas (proteínas, mRNA, miRNA) mediante fusión directa con la membrana plasmática. Por último, tras la endocitosis, las EV pueden fusionar su membrana con la membrana limitante del endosoma para permitir que su contenido produzca una respuesta fenotípica. Extraído de *Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake*[24].

2. TIPOS DE EV

Las EV se pueden clasificar en función de su mecanismo de biogénesis (exosomas, microvesículas, apoptosomas y vesículas autofágicas) o en función de su tamaño (por ejemplo, EV pequeñas y EV grandes)^{27,28}. La clasificación más común distingue así tres tipos principales: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos (figura 2).

Los exosomas son los más pequeños (40-100 nm de diámetro)^{9,17}. El término deriva de “endosomas secretados por exocitosis”, y resume tanto su origen como su principal característica. La biogénesis de los exosomas se produce por la vía de endocitosis-exocitosis. En un primer momento, la célula absorbe pequeñas cantidades de líquido en una región específica de membrana previamente invaginada. En segundo lugar, con la gemación de la membrana endosomal se formarán las vesículas intraluminales (ILVs) o cuerpos multivesiculares (MVBs). Por último, la fusión de los MVBs con la membrana celular y la liberación de las ILV al ambiente extracelular dará a las vesículas el nombre de exosomas^{9,29}. El proceso de formación de exosomas se encuentra altamente regulado. Estas partículas contienen en su membrana una gran cantidad de anexinas, tetraspaninas (las ya mencionadas CD9, CD63 y CD81), proteínas de shock térmico, clatrina y proteínas Alix³⁰. La encapsulación en una bicapa protege el contenido de los exosomas y les permite viajar grandes distancias a través de los diferentes tejidos. Su membrana posee grandes cantidades de colesterol, ceramida y esfingolípidos, junto con una pequeña proporción de fosfatidilserina^{31,32}. El contenido de estas partículas puede ser tanto proteínas como material genético (mRNA, miRNA, pre-miRNA y RNA no codificante). Cuando los exosomas son liberados al entorno extracelular, estos pueden interactuar con las células receptoras para liberar su contenido a través de: captación endocítica, fusión directa con la membrana celular y adhesión a la superficie mediante interacción con un receptor^{31,33}. Los exosomas han sido estudiados además en el contexto de enfermedades degenerativas. Se observó que, en enfermedades como el Parkinson y el Alzheimer, las neuronas secretan exosomas con α -sinucleína y β -amiloide, marcadores de enfermedad de ambas enfermedades, respectivamente³⁰.

Las microvesículas (MV) o vesículas de desprendimiento presentan un rango de tamaño más amplio (100-1000 nm de diámetro)¹⁷. Su formación tiene lugar a partir de la gemación de la membrana celular (de manera que contienen proteínas citoplasmáticas específicas de la célula de origen), lo cual involucra la reorganización del citoesqueleto para su producción. Además, a diferencia de los exosomas, su producción depende de la

concentración intracelular de calcio³¹. Otro punto que permite la distinción de las MV con respecto a los exosomas es la composición de su membrana. En este caso, las cantidades de fosfatidilserina son proporcionalmente mucho mayores. Del mismo modo, la membrana es rica en el marcador de superficie CD40³⁰. Por otra parte, el cargamento de estas partículas es algo más amplio (proteínas, diferentes tipos de RNA y, además, lípidos). La interacción con las células diana se produce mediante uniones ligando-receptor específicas⁹. Se sabe que las MV son capaces de influir en la funcionalidad de las células diana mediante la liberación de proteínas en su interior. De esta forma, a modo de ejemplo, las microvesículas derivadas de células endoteliales son capaces de promover la angiogénesis a través de la transferencia de moléculas proangiogénicas (como factores de crecimiento)³⁰. Es importante destacar que los mecanismos de biogénesis y liberación de MV han sido menos estudiados que en el caso de los exosomas.

Los cuerpos apoptóticos son los que presentan un mayor tamaño (>800 nm de diámetro)¹⁷ y su función es muy distinta a la de las partículas anteriormente mencionadas. Su génesis es fruto del proceso de muerte celular programada, surgiendo mediante la formación de ampollas hacia el exterior de la membrana de aquellas células que experimentan apoptosis. Su contenido es básicamente DNA asociado a histonas y otros restos celulares. Aunque su proceso de formación es menos relevante en el caso que nos ocupa, debe destacarse que se encuentra altamente regulado para evitar la liberación accidental de productos tóxicos para las células³⁴. Del mismo modo, constituyen una potente vía de señalización del microambiente en el que se encuentran las células muertas. Por su gran tamaño y la estrecha relación con el proceso de apoptosis, hasta la fecha no se han encontrado funcionalidades en este tipo de partículas en relación con el ámbito clínico.

Si bien es cierto que esta clasificación en función de la biogénesis y el tamaño de las partículas es la más comúnmente empleada, la ISEV¹⁸ advierte que, al no existir un consenso sólido sobre los marcadores específicos de cada subgrupo de EV, no deben emplearse los términos aquí presentados a no ser que se pueda observar (mediante el uso de técnicas de imagen) el proceso de biogénesis. Lo más adecuado es limitarse a nombrar cada vesícula en función de sus características físicas (tamaño, densidad, etc.), bioquímicas (nombrando los marcadores concretos observados) o en función de su origen celular. Aun así, la mayor parte de autores sigue empleando terminología no aceptada.

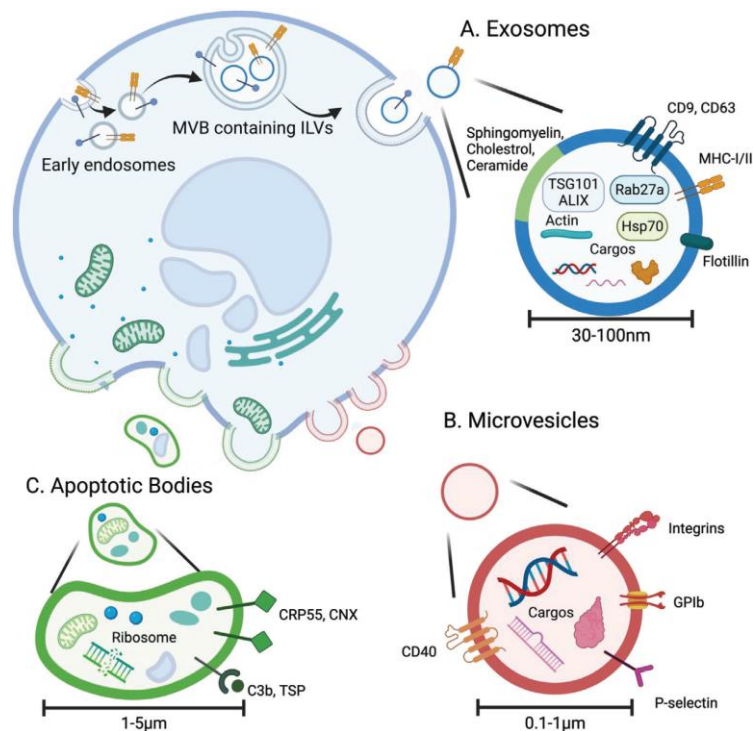


Figura 2. Vías de biogénesis y composición bioquímica básica de los diferentes tipos de EV. Extraído de *Exosome Processing and Characterization Approaches for Research and Technology Development*[35].

3. EV EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

Existen numerosos factores de estrés capaces de producir daños en el sistema cardiovascular, y más concretamente en el corazón: véase el estrés inducido por volumen o aumento del flujo sanguíneo (insuficiencias valvulares), estrés por aumento en los niveles de presión (estenosis aórtica, hipertensión arterial) o aquel mediado por la pérdida de contractilidad del miocardio (en cardiopatías dilatadas o en infartos de miocardio). El mantenimiento de estos factores en el tiempo puede conducir a la insuficiencia cardíaca, y para evitarlo, tienen lugar diferentes medidas adaptativas. En primer lugar, se produce la hipertrofia de los cardiomiocitos, pero cuando el daño se vuelve crónico, estas células sufren de apoptosis y necrosis cardíaca. En este momento, el tejido cardíaco comienza a sufrir cambios, proceso denominado “remodelado”, donde intervienen otras células, como los fibroblastos³⁶. Se ha demostrado que las EV pueden ser liberadas por gran parte de las células que conforman el sistema cardiovascular, como pueden ser los ya mencionados cardiomiocitos y fibroblastos, además de las células progenitoras cardíacas y las células endoteliales. Las EV ejercen funciones clave para la comunicación intercelular entre estos tipos de células, de manera que están involucradas de forma directa en el proceso de remodelado, regulando la hipertrofia y fibrosis cardíaca, los procesos de apoptosis y la angiogénesis³⁷.

3.1. CÉLULAS PRODUCTORAS DE EV

3.1.1. Cardiomiocitos

Los cardiomiocitos constituyen las células principales del corazón, y su función es la contracción muscular. Uno de los primeros estudios en evidenciar la liberación de EV por parte de los cardiomiocitos fue publicado por Gupta y Knowlton en 2007. De esta forma, se demostró *in vitro* (en cardiomiocitos de rata bajo condiciones de hipoxia) la capacidad de estas células para liberar proteínas de shock térmico (HSP) como la HSP60, HSP70 y HSP90 a través de exosomas³⁸. Estas proteínas constituyen una señal de peligro para el resto de células. Por otra parte, también se ha demostrado que, en situaciones de isquemia persistente, los cardiomiocitos pueden liberar TNF α , facilitando la apoptosis y con ella, la liberación de cuerpos apoptóticos³⁹, caracterizados por su poder de señalización del microambiente celular. Además de liberar proteínas, las EV producidas en los cardiomiocitos pueden transportar miRNA, moléculas capaces de afectar a la función inflamatoria y la liberación de citoquinas⁴⁰.

3.1.2. Células progenitoras cardíacas

Las células progenitoras cardíacas (CPC), también denominadas cardioesferas⁴¹ se caracterizan por su capacidad de diferenciarse a cardiomiocitos cuando se encuentran rodeadas de estos. Las vesículas liberadas por esta estirpe celular parecen recabar los beneficiosos efectos cardioprotectores y regenerativos que caracterizan a las CPC⁴². De esta forma, el contenido de los exosomas es rico en fragmentos de miRNA como miRNA-132 y miRNA-210, moléculas con conocidos efectos cardioprotectores y relacionados con el remodelado vascular (angiogénesis) respectivamente⁴³. Igualmente, se ha comprobado que la hipoxia es capaz de estimular la liberación de exosomas por parte de las CPC, regulando al alza la expresión de genes tanto antifibróticos como proangiogénicos, además de aumentar el transporte de los miRNA ya mencionados⁴⁴. Es importante destacar que los estudios mencionados parten de investigaciones en ratas.

3.1.3. Fibroblastos

Como ya se ha mencionado, factores como la isquemia y la sobrecarga de presión o volumen juegan un papel importante en la hipertrofia del músculo cardíaco. Los fibroblastos, en constante comunicación cruzada con el resto de células del corazón, son responsables de la síntesis de matriz extracelular y de los cambios en la misma, influyendo de manera directa en la mencionada hipertrofia muscular⁴⁵. Para lograr una adecuada

comunicación con los cardiomiocitos, los fibroblastos emplean, una vez más, exosomas⁴⁶. El protagonismo del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA) es bien conocido en los procesos de daño miocárdico: su activación crónica induce efectos deletéreos en el músculo cardíaco, promoviendo una remodelación aberrante del mismo con el consecuente daño tisular y la consecuente disminución del gasto cardíaco. En 2015, Linmao L. et al. publicaron un estudio en el que se revelaba el papel de la angiotensina II en la estimulación de los fibroblastos cardíacos, capaces de liberar exosomas responsables del aumento de receptores para la angiotensina II (AT2R) en los cardiomiocitos, amplificando de esta forma la hipertrofia patológica del músculo⁴⁷.

3.1.4. Células endoteliales

Es sabido que todo endotelio vascular sano es capaz de responder de forma eficiente a señales de estrés como la inflamación o la hipoxia. En estos casos, secreta factores de crecimiento y citocinas que permiten la adaptación fisiológica de las células diana. Del mismo modo, se ha visto que el endotelio es una fuente importante de EV⁴⁵. En el año 2012, de Jong et al. demostraron la influencia del TNF α en estas células, de manera que el endotelio expuesto a esta molécula aumentaba significativamente la liberación de exosomas cargados con proteínas de adhesión celular (ICAM-1) así como modificaba la composición en miRNA de los mismos⁴⁸. En relación con el miRNA, otro estudio confirmó (*in vitro* en células humanas e *in vivo* en células de ratón) la importancia del miRNA-214: el endotelio sería capaz por tanto de secretar esta molécula a través de exosomas, promoviendo la migración de otras células endoteliales y la angiogénesis, evitando así la senescencia y estimulando la formación de nuevos vasos sanguíneos⁴⁹. De esta forma, se abre una ventana al potencial empleo de los exosomas liberados por el endotelio como marcadores de estrés y daño tisular.

3.2. EV EN FISIOPATOLOGÍA CARDIOVASCULAR

Dentro de las moléculas capaces de inducir modificaciones en la fisiología del corazón, los ya mencionados miRNA cobran especial importancia. Los microRNA constituyen pequeños fragmentos de RNA no codificante de unos 22-25 nucleótidos de longitud, capaces de modular la expresión génica postranscripcional uniéndose a la molécula de RNA mensajero correspondiente, promoviendo tanto su traducción como, por otra parte, su supresión o degradación^{50,51}. Los miRNA están protegidos de la degradación por parte de las nucleasas precisamente porque se encuentran encapsulados en el interior de los exosomas. En el sistema cardiovascular, los miRNA son capaces de regular genes en las

células diana que posteriormente orquestarán procesos tanto fisiológicos como patológicos⁵¹.

3.2.1. Hipertrofia miocárdica

Recientemente se ha demostrado la capacidad de los exosomas para regular la hipertrofia cardíaca a través de la comunicación intercelular. De hecho, se ha visto que los exosomas originados en las CPC protegen a los cardiomiocitos durante el remodelado⁵². Como ya se explicó anteriormente, se sabe que la angiotensina II es responsable de la hipertrofia miocárdica en contextos patológicos. Además, los exosomas originados en fibroblastos miocárdicos tras la estimulación por parte de esta molécula, podría activar el sistema RAA, acelerando así la hipertrofia de los cardiomiocitos⁵³. Del mismo modo, un estudio publicado en 2014 ha destacado la importancia del miRNA-21, también capaz de promover la hipertrofia miocárdica. En este caso, se ha evidenciado la expresión de esta molécula por parte de los exosomas liberados, una vez más, por los fibroblastos cardíacos. El miRNA-21 sería capaz de dirigirse a los genes SORBS2 y PDLIM5 del cardiomiocito, para activar la hipertrofia. Del mismo modo, miRNA-200a, encontrado por primera vez en tejido adiposo, parece responsable de promover la activación de mTOR, encontrándose así otra vía de promoción de la hipertrofia cardíaca⁵⁴.

3.2.2. Fibrosis miocárdica

La fibrosis consiste en el depósito de cantidades excesivamente grandes de colágeno intersticial insoluble derivado del daño crónico en diversos tejidos y órganos, considerándose una condición altamente debilitante⁵⁵. En el miocardio, la lesión del tejido induce, como ya se ha mencionado, hipertrofia, pero la fibrosis también juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad del músculo. Los miofibroblastos son los principales responsables de llevar a cabo el proceso de fibrosis. Un estudio reciente ha demostrado *in vitro* que aquellos cardiomiocitos expuestos a hipoxia o a angiotensina II son capaces de producir exosomas ricos en miRNA-208, molécula capaz de promover la activación de los miofibroblastos⁵⁶. Otra de las vías involucradas parece derivar directamente de la liberación por parte de los cardiomiocitos de exosomas con HSP90 en su interior. Estas vesículas, actuando de forma conjunta con la IL-6 secretada en los procesos inflamatorios, parecen estar involucradas en la activación del transductor de señal y activación de la transcripción STAT3 de los fibroblastos, con la consecuente producción y depósito de colágeno⁵⁷.

3.2.3. Angiogénesis

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de una red vascular preexistente. Durante el crecimiento y el desarrollo de los organismos ocurre de manera fisiológica, y también puede aparecer como respuesta a una lesión. En este sentido, resulta un proceso esencial en la reparación y regeneración del miocardio tras producirse un daño^{17,58}. En condiciones fisiológicas, se ha visto que son los propios cardiomiocitos, a través de la liberación de exosomas enriquecidos en HSP20 los responsables de la proliferación y migración de células endoteliales (en modelos empleando vena umbilical humana). De la misma forma, las EV liberadas por células madre mesenquimales también juegan un papel importante en restaurar el potencial angiogénico de las células endoteliales tras producirse un infarto de miocardio¹⁷. Otras proteínas proangiogénicas clave liberadas por EV de células madre mesenquimales son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)⁵⁹. En relación con los miRNA, destacan el miRNA-126 y miRNA-214, habiendo demostrado promoción de la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones⁶⁰.

3.2.4. Apoptosis

La apoptosis es un proceso ampliamente conocido, consistente en la muerte celular programada que no provoca una respuesta inflamatoria. Cuando el estrés sobre el músculo cardíaco persiste (en forma de hipoxia o isquemia miocárdica crónica), se produce la apoptosis tanto de los cardiomiocitos como de los fibroblastos, proceso que desemboca a la larga en el fallo del órgano. Actualmente, existen evidencias acerca del papel protector de las EV derivadas de células madre mesenquimales sobre los cardiomiocitos susceptibles de sufrir apoptosis^{17,61}. De esta forma, se teoriza sobre la posibilidad bloquear la muerte celular programada para prevenir las consecuencias, hasta ahora irreversibles, del daño miocárdico⁶². Más concretamente, se ha demostrado que los exomas aislados del plasma de individuos sanos son capaces de bloquear la apoptosis de cardiomiocitos mediante la activación de una vía de señalización que activa HSP27, una proteína cardioprotectora⁶³. Por otra parte, se ha visto que el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) facilita la liberación por parte de células madre pluripotenciales de miRNA-21 y miRNA-210 en exosomas que, una vez captados por el cardiomiocito, le protegen contra la apoptosis⁶¹.

4. EV EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.

El creciente interés por el estudio de las EV (y más concretamente de los exosomas) en la última década y su estudio en el campo de los métodos diagnósticos se debe principalmente a tres motivos: en primer lugar, existen en prácticamente todos los fluidos corporales, y su bicapa lipídica les confieren una gran estabilidad. Segundo, los exosomas son secretados por células vivas, de manera que contienen información biológica relacionada con el estado de las células de origen, lo cual resulta mucho más representativo que el DNA secretado durante los procesos de apoptosis o necrosis. Por último, los procesos de identificación de estas vesículas son cada vez más sencillos, basta con identificar las proteínas de superficie para emplearlos como marcadores distinguibles de otro tipo de partículas⁶⁴. De esta forma, se plantea la posibilidad de utilizarlas como herramienta diagnóstica, en este caso, de enfermedades cardiovasculares. De entre todas las moléculas capaces de ser integradas en las EV, son los ya mencionados miRNA aquellos que han destacado como posibles marcadores diagnósticos y, potencialmente, pronósticos. Para su obtención, se plantea el uso de la biopsia líquida, principalmente empleada en sangre. A continuación, se exponen los avances en dos de las enfermedades más prevalentes y cuya mortalidad es más elevada a nivel mundial, como son el infarto agudo de miocardio y el accidente cerebrovascular.

4.1. INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Actualmente, el marcador estándar para el diagnóstico del IAM sigue siendo la obtención de niveles de troponina de alta sensibilidad. En el entorno clínico está considerado un potente biomarcador, pero la búsqueda de nuevos indicadores de enfermedad sigue activa y está justificada, ya que un diagnóstico más temprano se traduce en un mejor pronóstico. Hasta la fecha, uno de los avances más importantes ha sido la demostración del aumento de moléculas miRNA circulantes en el plasma de aquellos pacientes con IAM: por ejemplo, el miRNA-208, indetectable en sujetos sanos, se ha visto elevado en todos los pacientes con IAM 4 horas después de comenzar el dolor torácico, un intervalo de tiempo mucho más corto que el manejado para la aparición de troponina⁶⁵. A continuación, se muestran los artículos publicados más recientes en relación con este tipo de hallazgos.

En un estudio publicado por Burello et al. en 2020, se demostró que los pacientes con IAM con elevación del ST (IAMCEST) presentaban un perfil de EV característico en los análisis y fácilmente diferenciable de los controles sanos. Concretamente, se emplearon 3 parámetros: concentración de EV, niveles de CD62P y niveles de CD42a (epítomos de

superficie de las vesículas). Para su medición se empleó la citometría de flujo. Tanto la concentración de EV como los niveles de epítomos se vieron aumentados en sangre en los pacientes con IAMCEST. Realizando la medición junto con troponina, se obtenían unos valores de sensibilidad y especificidad del 100% y el 95%. En el caso de medir únicamente la troponina, la sensibilidad se mantenía, pero la especificidad disminuía al 85%. Del mismo modo, los investigadores apuntaron que los marcadores derivados de EV se elevaban en estadios más tempranos que las troponinas. Dentro de las limitaciones del estudio, se destaca a la dificultad para obtener de manera rápida y eficaz los valores correspondientes a EV. Por otra parte, se tiene en cuenta que los controles sanos no se corresponden con la realidad clínica habitual, de manera que los pacientes con enfermedades crónicas susceptibles de sufrir un IAM pueden tener elevadas las concentraciones de EV de base⁶⁶.

Otro estudio publicado por Chen et al. ese mismo año, teorizó sobre la relación entre los marcadores NEAT1, MMP-9 y miRNA-204 y el IAMCEST. NEAT1 corresponde a una cadena larga de RNA no codificante que ha demostrado promover la isquemia cardíaca. MMP-9, es un marcador sérico capaz de discriminar IAM de angina inestable y, además, predice la severidad de la enfermedad. Por su parte, miRNA-204 es una molécula relacionada con la inhibición de la apoptosis y la inflamación. El estudio, llevado a cabo en 47 pacientes con IAMCEST y comparados con pacientes con angina consistió en el aislamiento de exosomas en sangre para la posterior identificación de los marcadores mencionados, empleando PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Los resultados arrojaron un aumento de NEAT1 y MMP-9 en los exosomas de aquellos pacientes con IAMCEST y una disminución en los niveles de miRNA-204. De esta forma, se concluyó la potencia de los marcadores exosomales en el diagnóstico de IAM⁶⁷.

Otro ejemplo en el que se emplea el uso de miRNA contenidos en exosomas para el posible diagnóstico de IAM es el estudio de Zhang et al. publicado en 2017. En este caso, se investigó a cerca de las diferencias entre 37 pacientes con IAM y otros 42 con angina estable, comparando los niveles circulantes tanto del epítomo CD31 expresado en EV en plasma, como los niveles de miRNA-92a, medidos con qRT-PCR. Como parámetro diagnóstico de rutina, se empleó la troponina cardíaca I. Los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativo en los niveles de ambos marcadores en aquellos pacientes con IAM en comparación con los que sufrían angina estable, postulándose así

como posibles nuevos biomarcadores en el diagnóstico diferencial de estas dos patologías⁶⁸.

Se ha demostrado además que las MSC liberan exosomas ricos en miRNA-21, miRNA-23a, miRNA-130a, miRNA-126 y miRNA-210, todos ellos implicados en la inducción de daño cardíaco isquémico tras un IAM. Todas estas moléculas son aislables en sangre, proporcionando una fuente de nuevos biomarcadores en el diagnóstico y pronóstico de ECV⁶⁹.

4.2. ACCIDENTE CEREBROVASCULAR

El accidente cerebrovascular (ACV) está considerado como una entidad muy compleja, cuyo diagnóstico debe pasar por diferentes fases. En un primer momento, debe examinarse la historia clínica y realizarse una exploración física y neurológica. Para una correcta clasificación del ACV, este debe poder distinguirse de aquellas enfermedades con síntomas similares (tumores cerebrales, enfermedades infecciosas o metabólicas, etc.) y además hay que discernir entre los ACV isquémicos y los hemorrágicos. Hasta la fecha, el diagnóstico de ictus se basa en la neuroimagen, ya sea mediante TC o RM. Del mismo modo, se sabe que el tiempo de intervención es crucial para los pacientes que sufren un ACV agudo, pues restaurar el flujo sanguíneo de manera precoz se traduce en la posibilidad de salvar una mayor cantidad de tejido cerebral. En los últimos años, muchos estudios han investigado sobre la posibilidad de emplear marcadores inflamatorios, citoquinas e incluso microRNA en el diagnóstico de ACV⁷⁰. Para ser considerado un buen biomarcador diagnóstico de esta patología, la molécula debe liberarse de manera consistente en la fase hiperaguda del proceso, ser específica de cada tipo de ictus y, además, tiene que poder medirse de manera sencilla. Si se garantiza la optimización en los procesos de aislamiento y detección de EV, estas pueden ser el perfecto candidato para actuar como biomarcadores diagnósticos de ACV⁷¹. Al igual que en otras patologías ya mencionadas, los miRNA han ganado mucha popularidad en los últimos años a la hora de proponerse como futuros marcadores de enfermedad en el ictus isquémico.

En 2016, Ji et al. publicaron por primera vez un artículo en el que se relacionaban las alteraciones en la concentración de miRNA procedente de exosomas en el suero con el desarrollo de ACV. Para ello, tomaron un grupo de 65 pacientes con ictus isquémico que fue comparado con un grupo control. La extracción de sangre se llevó a cabo a las 16h de su llegada. Los métodos de aislamiento de los exosomas consistieron en el almacenamiento a -80°C y posterior centrifugado. Para el análisis de la muestra, se

empleó el Western blot y la qRT-PCR. Los resultados arrojados mostraron que, en aquellos pacientes con ictus, la concentración sérica de exosomas ricos en miRNA-9 y miRNA-124 se encontraba elevada de manera estadísticamente significativa. Por otra parte, para reforzar su validez como método diagnóstico, se comprobó el nivel de correlación existente entre la concentración de las mencionadas moléculas y los valores arrojados por la escala NIHSS (*National Institutes of Health Stroke Scale*), confirmándose la existencia de una relación muy estrecha entre los niveles de estos miRNA y el daño cerebral⁷².

Posteriormente, Zhou et al. publicaron en 2018 un estudio de características similares en el que se tomó a 50 pacientes con ictus isquémico (confirmado por RM) a los que se les realizó un análisis sanguíneo para extraer exosomas y comprobar sus niveles de miRNA-134, para después compararlos con el grupo control. Para aislar la molécula, se emplearon técnicas como el Western blot y la qRT-PCR. Los datos sugirieron la posibilidad de considerar al miRNA-134 como un factor de riesgo independiente de ACV. Además, se comprobó que sus niveles de sensibilidad y especificidad para alcanzar el diagnóstico eran del 75% y 72% respectivamente. Del mismo modo, se observó que los niveles de miRNA-134 se relacionaban de manera proporcional tanto con los valores obtenidos en la NIHSS como con el volumen de tejido infartado⁷³.

Otras moléculas como miRNA-21-5p, miR30a-5p y miRNA-422a han mostrado un pico en la sangre de aquellos pacientes con ictus isquémico, seguido de una disminución en sus niveles en fases subagudas del cuadro⁷⁴. Estos datos sugieren la potencialidad de los miRNA como marcadores para reflejar el tiempo transcurrido desde el ACV, gracias a sus fluctuaciones en sangre en función de la fase del ictus. De igual forma, los estudios mencionados parecen apuntar hacia la posibilidad para emplear estas moléculas a la hora de evaluar el daño causado por la isquemia. Aun así, existen evidentes limitaciones que influyen en la variabilidad de los resultados a obtener, como por ejemplo el momento en el que se obtienen las muestras de sangre y el propio método de aislamiento aún sin estandarizar^{71,75}.

5. POTENCIAL TERAPÉUTICO EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Existen numerosas características propias de las EV que las hacen ideales como posibles agentes terapéuticos o incluso portadores de fármacos. Por un lado, las vesículas son capaces de adquirir una carga de moléculas biológicamente activa propia de las células madre de donde proceden, ejerciendo una actividad hasta cierto punto similar a la que

realizaría la célula de origen por sí misma. Además, la estructura membranosa sirve para proteger y preservar el contenido bioactivo de la degradación, facilitando así su administración por diferentes vías. Por otra parte, las EV son capaces de atravesar de manera eficaz todo tipo de barrera biológica, incluyendo la barrera hematoencefálica, permitiendo así su entrada en todo tipo de células. A diferencia de las células vivas, aparte de ser más sencillas de obtener y modificar, cuentan con un tamaño más pequeño y manejable. Por último, es importante destacar que su inmunogenicidad *in vivo* es relativamente baja en comparación con otras terapias biológicas (como las células madre)⁷⁶. De esta forma, las EV han sido en la última década ampliamente evaluadas en modelos de estudio en animales como posible tratamiento para numerosas enfermedades.

5.1. INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

El IAM constituye una de las principales patologías causantes de insuficiencia o fallo cardíaco. La isquemia aguda se traduce en procesos de apoptosis, necrosis, fibrosis intersticial e inflamación que dan lugar a una reducción del tejido contráctil útil. Lo más preocupante de esta patología es que, con el tratamiento actual, un corazón dañado es incapaz de regenerarse por sí mismo. Es aquí donde el papel de las EV, y más concretamente, de los exosomas, parece tener mayor relevancia. Cada vez parece más evidente la importancia de estos últimos en las terapias cardioprotectoras basadas en células madre: Las vesículas liberadas por las células progenitoras son capaces de crear un microambiente tisular con características reparadoras y regenerativas que puede ser incluso más importante que el potencial de diferenciación de las mismas células madre⁷⁷. Tanto es así que los estudios se centran en identificar qué moléculas son las responsables de la creación de este beneficioso microambiente, para proceder a su aislamiento y posterior empleo como tratamiento.

Véase, por ejemplo, el estudio publicado en 2020 por Wen et al.: siendo bien conocido el efecto cardioprotector del miRNA-144 sobre la apoptosis de los cardiomiocitos en condiciones de hipoxia, se trató de aislar esta molécula a partir de MSC procedentes de médula ósea. Para llevar a cabo el proceso, se cultivaron y estimularon las células para producir la liberación de exosomas, que posteriormente serían aislados y caracterizados mediante técnicas de análisis de micropartículas. Los exosomas ricos en miRNA-144 fueron transferidos a un grupo de células musculares de rata en condiciones de hipoxia, comprobándose posteriormente el nivel de apoptosis sufrido y comparándose con un grupo de células control. Se demostró que la cardioprotección estaba mediada

principalmente por los efectos paracrinos de los exosomas⁷⁸. Paralelamente, ese mismo año, Chen et al. publicaron un artículo muy similar tanto en metodología como en resultados, que demostraba el papel de la molécula miRNA-125b liberada en exosomas a la hora de inhibir tanto la inflamación como la apoptosis en el tejido miocárdico sometido a isquemia⁷⁹.

Las MSC no son las únicas capaces de generar EV con potencial terapéutico en el corazón. En el año 2017, Gallet et al. llevaron a cabo un novedoso estudio, esta vez en cerdos, donde observaron el efecto de los exosomas liberados por células derivadas de la cardioesfera (células progenitoras cardíacas) en los corazones de estos animales tras sufrir un IAM. Se comprobó que aquellos animales que recibieron exosomas procedentes de CPC humanas, mostraron una reducción significativa de la escara producida por el IAM. De igual forma, a nivel histológico se comprobó que los exosomas habían sido responsables de la disminución de los niveles de colágeno en el VI, al mismo tiempo que incrementaban la densidad de vasos (angiogénesis)⁸⁰.

Aunque este tipo de estudio se lleva a cabo en modelos animales, la cantidad de artículos relacionados con la liberación de exosomas como terapia del IAM ha ido incrementándose de manera gradual en los últimos años. La comunidad científica ha consensuado que la protección otorgada por las células madre está altamente influenciada por la liberación de EV, considerando además a los exosomas como una terapia novedosa en el mundo de la medicina regenerativa⁸¹.

5.2. ACCIDENTE CEREBROVASCULAR

La isquemia cerebral está considerada como una de las patologías más importantes del sistema nervioso central (SNC). El ictus isquémico engloba el 87% del total del ictus y es la tercera causa de muerte más común en personas mayores de 60 años en países desarrollados⁸². Cuando sobreviene el accidente isquémico, se produce un daño muy importante en el tejido nervioso como resultado del bloqueo del flujo sanguíneo, con la consecuente disminución en los niveles de oxígeno y nutrientes. La cascada bioquímica derivada de este evento resulta finalmente en daño directo sobre el tejido a través de la activación de un proceso inflamatorio que producirá la apoptosis y necrosis de las células del tejido nervioso⁸³. Actualmente, el tratamiento para los pacientes con ictus isquémico consiste en la terapia de reperfusión mediante el uso de fibrinolíticos o la trombectomía mecánica. Por desgracia estas terapias cuentan con muchas limitaciones, como por ejemplo la estrecha ventana terapéutica (4.5h para la fibrinólisis y unas 6-8h en el caso

de la trombectomía mecánica). Del mismo modo, en muchas ocasiones el proceso de rehabilitación de los pacientes resulta insuficiente y en muchos casos no son capaces de recuperar las funciones perdidas. Las terapias experimentales centradas en reducir las reacciones inflamatorias tras la isquemia empleando inhibidores celulares o mediadores de la inflamación no han resultado ser demasiado exitosas. Ante esta situación, se están probando nuevos mecanismos de inmunomodulación, como el uso de EV derivadas de MSC. Existen numerosos procesos involucrados en la potencial actividad terapéutica de estas vesículas, como son la neuroprotección, la inmunomodulación e incluso la estimulación de la formación de nuevas sinapsis⁸⁴.

De igual forma que ocurría en las terapias para el IAM, el tratamiento del ACV mediante el uso directo de EV sobrepasa el beneficio terapéutico que se suponía mediante el uso de MSC. Sabiendo que los exosomas brindan un beneficio terapéutico al menos equivalente al que proporcionaría su fuente celular, la internalización de exosomas por las células receptoras evita numerosos problemas potenciales derivados de la administración directa de células vivas⁸⁵. En comparación con la terapia celular, las ventajas del uso de exosomas en posibles terapias para ictus incluyen: inmunogenicidad baja, reducción del riesgo de microtrombosis secundaria al efecto obstructivo de la terapia celular en los vasos, habilidad para cruzar la barrera hematoencefálica y penetrar en el parénquima cerebral y posibilidad para modificar el contenido de los exosomas empleados⁸⁴.

Uno de los mecanismos responsables de las propiedades terapéuticas de las EV es, una vez más, la transferencia de miRNA entre células. Numerosos experimentos *in vitro* muestran que las EV procedentes de MSC pueden estimular el crecimiento axonal a través de procesos en los que los miRNA están directamente involucrados⁸⁶. Además, algunos estudios *in vivo* han confirmado que las EV pueden modular, a través de la transferencia de miRNA, tanto la regulación génica como la expresión de proteínas en las células diana, contribuyendo a una mejora acelerada de las funciones neurológicas en aquellos animales sometidos a ACV⁸⁴. Véase el artículo publicado por Huang et al. en 2018: se demostró, en un modelo en ratones, como el incremento en los niveles de miRNA-124 derivado de EV en células de la microglía, activa la polaridad de estas células hacia un fenotipo antiinflamatorio, induciendo además la remodelación de las neuronas dañadas⁸⁷.

6. LIMITACIONES ACTUALES DE LAS EV

El uso de EV en procesos diagnósticos y terapéuticos aporta numerosas ventajas con respecto a los métodos actuales e incluso comparándose con otras terapias biológicas,

como el empleo de células madre. Sin embargo, hoy en día todavía existen varios aspectos para tener en cuenta que dificultan la entrada de las vesículas en el mundo clínico: en primer lugar, se han observado diferencias terapéuticas entre fracciones de EV a priori comparables, lo cual podría deberse a diferencias entre donantes o a la propia heterogeneidad de las EV recolectadas⁸⁸. Teniendo esto en cuenta, dado que las vesículas aisladas pueden ser heterogéneas por naturaleza, se debe asumir que solo una proporción de las vesículas aisladas sería responsable de los efectos terapéuticos observados. De esta forma, y dado que aún se desconoce qué fracción de las vesículas es responsable de la actividad biológica (la membrana y sus epítomos, el contenido o ambas), es prioritario investigar más a fondo el mecanismo de acción. Por otro lado, la farmacocinética de las vesículas es en gran parte desconocida, al igual que la mayor parte de los antígenos que transportan, siendo necesario un estudio pormenorizado de sus características intrínsecas. Para lograr superar todos estos inconvenientes y conseguir la introducción de EV en ensayos clínicos, la comunidad científica aboga por el desarrollo de métodos reproducibles a escala industrial para aislar y caracterizar las vesículas⁴⁵.

Conclusiones

Las vesículas extracelulares constituyen hoy en día un campo de estudio muy prometedor por sus posibilidades en el diagnóstico y tratamiento de multitud de patologías. Sus características bioquímicas y su presencia en la gran mayoría de fluidos biológicos, sumado a su más que demostrado papel en los procesos de comunicación intercelular, les confieren un potencial en el mundo clínico cuyos límites todavía están por delimitar. Aunque desde su descubrimiento se ha avanzado exponencialmente en el conocimiento de sus funciones, su biogénesis y todos los mecanismos moleculares en los que se encuentran involucradas, todavía son muchas las incógnitas que rodean a estas partículas.

Uno de los principales problemas radica en la falta de consenso a la hora de establecer una nomenclatura común. Si bien es cierto que la existencia de organismos como la ISEV se esfuerzan por unificar los criterios de clasificación, los distintos investigadores no terminan de adaptarse a sus normas. Probablemente, uno de los motivos por los que resulta tan complicado alcanzar el acuerdo sea la dificultad que entraña el aislamiento y caracterización de las vesículas con las técnicas actuales. A esto se le debe sumar su gran heterogeneidad en forma y contenido, pues estos factores se ven modificados en función no solo de la naturaleza de la célula progenitora, sino también de su estado fisiológico. En este sentido, y a pesar de la cantidad de estudios que avalan el potencial de las

vesículas extracelulares por su papel como herramientas de diagnóstico clínico, las limitaciones técnicas no permiten todavía el empleo de éstas como biomarcadores. De esta forma, la estandarización de los métodos constituye uno de los escollos que deben superarse de manera urgente si se desea continuar con la investigación. Para lograrlo, deben definirse y simplificarse los procedimientos analíticos y de clasificación, abogando además por el desarrollo tecnológico como uno de los objetivos primordiales para permitir el avance en este campo.

A pesar de las dificultades que plantea la superación de estos desafíos, los resultados obtenidos en la mayor parte de los estudios y modelos preclínicos realizados hasta la fecha son realmente prometedores. En lo que respecta al ámbito terapéutico, se ha demostrado la gran relevancia de estas partículas por el abanico de posibilidades que presentan en relación con la medicina regenerativa. Una gran cantidad de estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales, apoyan la idea de que las vesículas extracelulares suponen un avance sin precedente en el terreno de las terapias biológicas. De hecho, las corrientes de pensamiento más recientes defienden la superioridad de estas partículas con respecto a los tratamientos basados en células madre: habiendo demostrado que el poder terapéutico de estas células se debe en gran medida a la liberación de vesículas y que estas últimas presentan propiedades que les confieren mayor seguridad, estabilidad y eficiencia en sus métodos de producción, los esfuerzos se están centrando en el desarrollo de procedimientos que permitan su reproducibilidad a nivel industrial, junto con la implementación de estándares de validación dado su potencial como medicamentos de terapia avanzada. No obstante, para lograr el empleo de este tipo de moléculas aún deben superarse algunas limitaciones. Pese a que los estudios publicados aportan resultados muy positivos, en su mayoría se realizan *in vitro* o en animales, y, aquellos en los que se han empleado células de pacientes humanos, cuentan con cohortes demasiado pequeñas como para poder extrapolar los resultados a la población general. Teniendo esto en cuenta, deben dilucidarse por completo los mecanismos de acción de estas moléculas, así como resolverse las incógnitas relacionadas con su farmacocinética para poder establecer un perfil de seguridad que permita su introducción en el mundo de los ensayos clínicos a gran escala. Además, la creación de un protocolo que especifique como deben caracterizarse, aislarse y almacenarse estas partículas es esencial como paso a la hora de considerar las vesículas como posible producto farmacéutico.

El aumento progresivo durante la última década de artículos publicados relacionados con las vesículas extracelulares supone un fiel reflejo del interés que genera este campo en la comunidad científica. Aun teniendo en cuenta la cantidad de limitaciones a las que se ven sometidas, es previsible que a lo largo de los próximos años se vayan despejando las dudas y las vesículas continúen a la cabeza, tanto en la búsqueda de nuevos biomarcadores diagnósticos, como en el entorno de la medicina regenerativa, pues en ambos ámbitos se han mostrado muy prometedoras.

Bibliografía

1. Huang C, Neupane YR, Lim XC, Shekhani R, Czarny B, Wacker MG, et al. Extracellular vesicles in cardiovascular disease. En: *Advances in Clinical Chemistry*. Academic Press Inc.; 2021. p. 47-95.
2. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. [citado 14 de marzo de 2023]. Disponible en: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
3. Fröhlich GM, Meier P, White SK, Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury: Looking beyond primary PCI. *Eur Heart J*. 14 de junio de 2013;34(23):1714-24.
4. Pons F, Lupón J, Urrutia A, González B, Crespo E, Díez C, et al. Mortalidad y causas de muerte en pacientes con insuficiencia cardiaca: experiencia de una unidad especializada multidisciplinaria. *Rev Esp Cardiol* [Internet]. 1 de marzo de 2010 [citado 15 de marzo de 2023];63(3):303-14. Disponible en: <http://www.revespcardiol.org/es-mortalidad-causas-muerte-pacientes-con-articulo-13147698>
5. Takase H, Dohi Y. Kidney function crucially affects B-type natriuretic peptide (BNP), N-terminal proBNP and their relationship. *Eur J Clin Invest*. marzo de 2014;44(3):303-8.
6. Mueller-Hennessen M, Lindahl B, Giannitsis E, Biener M, Vafaie M, DeFilippi CR, et al. Diagnostic and prognostic implications using age- and gender-specific cut-offs for high-sensitivity cardiac troponin T - Sub-analysis from the TRAPID-AMI study. *Int J Cardiol*. 15 de abril de 2016;209:26-33.
7. L.J. Visseren F, Mach F, M. Smulders Y, Carballo D, C. Koskinas K, Bäck M, et al. Guía ESC 2021 sobre la prevención de la enfermedad cardiovascular en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol* [Internet]. 1 de mayo de 2022 [citado 14 de marzo de 2023];75(5):429.e1-429.e104. Disponible en: <http://www.revespcardiol.org/es-guia-esc-2021-sobre-prevencion-articulo-S0300893221004620>
8. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1 de enero de 2018;75(2):193-208.
9. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. Vol. 200, *Journal of Cell Biology*. 2013. p. 373-83.
10. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-89.
11. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4(2015):1-60.
12. Boulanger CM, Loyer X, Rautou PE, Amabile N. Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nat Rev Cardiol*. 1 de mayo de 2017;14(5):259-72.
13. de Freitas RCC, Hirata RDC, Hirata MH, Aikawa E. Circulating extracellular vesicles as biomarkers and drug delivery vehicles in cardiovascular diseases. *Biomolecules*. 1 de marzo de 2021;11(3):1-20.

14. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 1 de abril de 2016;36(3):301-12.
15. O'Brien K, Breyne K, Ughetto S, Laurent LC, Breakefield XO. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1 de octubre de 2020;21(10):585-606.
16. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4(2015):1-60.
17. Bei Y, Das S, Rodosthenous RS, Holvoet P, Vanhaverbeke M, Monteiro MC, et al. Extracellular vesicles in cardiovascular theranostics. Vol. 7, *Theranostics*. Ivyspring International Publisher; 2017. p. 4168-82.
18. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 1 de enero de 2018;7(1).
19. Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Novel frontiers in regenerative medicine. Vol. 9, *Stem Cell Research and Therapy*. BioMed Central Ltd.; 2018.
20. Ma T, Chen Y, Chen Y, Meng Q, Sun J, Shao L, et al. MicroRNA-132, delivered by mesenchymal stem cell-derived exosomes, promote angiogenesis in myocardial infarction. *Stem Cells Int*. 2018;2018.
21. Sharma KD, Schaal D, Kore RA, Hamzah RN, Pandanaboina SC, Hayar A, et al. Glioma-derived exosomes drive the differentiation of neural stem cells to astrocytes. *PLoS One*. 1 de julio de 2020;15(7).
22. Lindenbergh MFS, Wubbolts R, Borg EGF, van 'T Veld EM, Boes M, Stoorvogel W. Dendritic cells release exosomes together with phagocytosed pathogen; potential implications for the role of exosomes in antigen presentation. *J Extracell Vesicles*. 1 de enero de 2020;9(1).
23. Console L, Scalise M, Indiveri C. Exosomes in inflammation and role as biomarkers. Vol. 488, *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V.; 2019. p. 165-71.
24. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. Vol. 3, *Journal of Extracellular Vesicles*. Co-Action Publishing; 2014.
25. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. Vol. 30, *Annual review of cell and developmental biology*. 2014. p. 255-89.
26. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Vol. 19, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 213-28.
27. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell*. 4 de abril de 2019;177(2):428-445.e18.

28. Sheta M, Taha EA, Lu Y, Eguchi T. Extracellular Vesicles: New Classification and Tumor Immunosuppression. *Biology (Basel)*. 10 de enero de 2023;12(1):110.
29. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M, Kim JH. Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
30. Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Novel frontiers in regenerative medicine. Vol. 9, *Stem Cell Research and Therapy*. BioMed Central Ltd.; 2018.
31. Konala VBR, Mamidi MK, Bhonde R, Das AK, Pochampally R, Pal R. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. Vol. 18, *Cytotherapy*. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 13-24.
32. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. marzo de 2006;3(22):1-29.
33. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 2012;64(3):676-705.
34. Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
35. Lai JJ, Chau ZL, Chen SY, Hill JJ, Korpany K V., Liang NW, et al. Exosome Processing and Characterization Approaches for Research and Technology Development. Vol. 9, *Advanced Science*. John Wiley and Sons Inc; 2022.
36. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2. *Circulation*. 23 de julio de 2013;128(4):388-400.
37. Waldenström A, Ronquist G. Role of exosomes in myocardial remodeling. *Circ Res*. 2014;114(2):315-24.
38. Gupta S, Knowlton AA. HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: Role of the exosomal pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. junio de 2007;292(6).
39. Yu X, Deng L, Wang D, Li N, Chen X, Cheng X, et al. Mechanism of TNF- α autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: Initiated by hypoxia inducible factor 1 α , presented by exosomes. *J Mol Cell Cardiol*. diciembre de 2012;53(6):848-57.
40. Ohayon L, Zhang X, Dutta P. The role of extracellular vesicles in regulating local and systemic inflammation in cardiovascular disease. *Pharmacol Res*. 1 de agosto de 2021;170.
41. Rueda-Martínez C, Rodríguez-Losada N, Jiménez-Navarro MF. What is a stem cell? Stem cell therapy applications in cardiovascular diseases. Vol. 46, *Cardiocyte*. Elsevier Doyma; 2011.
42. Ibrahim AGE, Cheng K, Marbán E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Reports*. 6 de mayo de 2014;2(5):606-19.
43. Barile L, Lionetti V, Cervio E, Matteucci M, Gherghiceanu M, Popescu LM, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte

- apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 1 de septiembre de 2014;103(4):530-41.
44. Gray WD, French KM, Ghosh-Choudhary S, Maxwell JT, Brown ME, Platt MO, et al. Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia-treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology. *Circ Res.* 16 de enero de 2015;116(2):255-63.
 45. Sluijter JPG, Davidson SM, Boulanger CM, Buzás EI, De Kleijn DPV, Engel FB, et al. Extracellular vesicles in diagnostics and therapy of the ischaemic heart: Position Paper from the Working Group on Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. Vol. 114, *Cardiovascular Research*. Oxford University Press; 2018. p. 19-34.
 46. Bellin G, Gardin C, Ferroni L, Chachques JC, Rogante M, Mitrečić D, et al. Exosome in cardiovascular diseases: A complex world full of hope. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
 47. Lyu L, Wang H, Li B, Qin Q, Qi L, Nagarkatti M, et al. A critical role of cardiac fibroblast-derived exosomes in activating renin angiotensin system in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1 de diciembre de 2015;89:268-79.
 48. de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, Vader P, Gremmels H, Posthuma G, et al. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J Extracell Vesicles.* 2012;1(1).
 49. M van Balkom BW, de Jong OG, Smits M, Brummelman J, den Ouden K, de Bree PM, et al. Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells Key Points. *Blood Journal.* 2013;121(19):3997-4004.
 50. Schüttler D, Clauss S, Weckbach LT, Brunner S. Molecular mechanisms of cardiac remodeling and regeneration in physical exercise. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
 51. Henning RJ. Cardiovascular Exosomes and MicroRNAs in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. Vol. 14, *Journal of Cardiovascular Translational Research*. Springer; 2021. p. 195-212.
 52. Liu Q, Piao H, Wang Y, Zheng D, Wang W. Circulating exosomes in cardiovascular disease: Novel carriers of biological information. Vol. 135, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l.; 2021.
 53. Gallet R, Dawkins J, Valle J, Simsolo E, De Couto G, Middleton R, et al. Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *Eur Heart J.* 1 de enero de 2017;38(3):201-11.
 54. Bang C, Batkai S, Dangwal S, Gupta SK, Foinquinos A, Holzmann A, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation.* 2014;124(5):2136-46.
 55. Brigstock DR. Extracellular vesicles in organ fibrosis: Mechanisms, therapies, and diagnostics. Vol. 10, *Cells*. MDPI; 2021.

56. Yang J, Yu X, Xue F, Li Y, Liu W, Zhang S. Exosomes derived from cardiomyocytes promote cardiac fibrosis via myocyte-fibroblast cross-talk. *Am J Transl Res.* 2018;10(12):4350-66.
57. Datta R, Bansal T, Rana S, Datta K, Datta Chaudhuri R, Chawla-Sarkar M, et al. Myocyte-Derived Hsp90 Modulates Collagen Upregulation via Biphasic Activation of STAT-3 in Fibroblasts during Cardiac Hypertrophy. *Mol Cell Biol.* 1 de marzo de 2017;37(6).
58. Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Extracellular vesicles in angiogenesis. Vol. 120, *Circulation Research.* Lippincott Williams and Wilkins; 2017. p. 1658-73.
59. Anderson JD, Johansson HJ, Graham CS, Vesterlund M, Pham MT, Bramlett CS, et al. Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-kappaB signaling. *Stem Cells.* 1 de marzo de 2016;34(3):601-13.
60. Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Extracellular vesicles in angiogenesis. Vol. 120, *Circulation Research.* Lippincott Williams and Wilkins; 2017. p. 1658-73.
61. Wang Y, Zhang L, Li Y, Chen L, Wang X, Guo W, et al. Exosomes/microvesicles from induced pluripotent stem cells deliver cardioprotective miRNAs and prevent cardiomyocyte apoptosis in the ischemic myocardium. *Int J Cardiol.* 9 de junio de 2015;192:61-9.
62. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. Vol. 39, *Bioscience Reports.* Portland Press Ltd; 2019.
63. Vicencio JM, Yellon DM, Sivaraman V, Das D, Boi-Doku C, Arjun S, et al. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol.* 21 de abril de 2015;65(15):1525-36.
64. Zhou B, Xu K, Zheng X, Chen T, Wang J, Song Y, et al. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. Vol. 5, *Signal Transduction and Targeted Therapy.* Springer Nature; 2020.
65. Femminò S, Penna C, Margarita S, Comità S, Brizzi MF, Pagliaro P. Extracellular vesicles and cardiovascular system: Biomarkers and Cardioprotective Effectors. Vol. 135, *Vascular Pharmacology.* Elsevier Inc.; 2020.
66. Burrello J, Bolis S, Balbi C, Burrello A, Provasi E, Caporali E, et al. An extracellular vesicle epitope profile is associated with acute myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 1 de septiembre de 2020;24(17):9945-57.
67. Chen Z, Yan Y, Wu J, Qi C, Liu J, Wang J. Expression level and diagnostic value of exosomal NEAT1/miR-204/MMP-9 in acute ST-segment elevation myocardial infarction. *IUBMB Life.* 1 de noviembre de 2020;72(11):2499-507.
68. Zhang Y, Cheng J, Chen F, Wu C, Zhang J, Ren X, et al. Circulating endothelial microparticles and miR-92a in acute myocardial infarction. *Biosci Rep.* 28 de abril de 2017;37(2).

69. Cui M, Han Y, Yang J, Li G, Yang C. A narrative review of the research status of exosomes in cardiovascular disease. *Ann Palliat Med.* 1 de enero de 2022;11(1):363-77.
70. Gandolfi M, Smania N, Vella A, Picelli A, Chirumbolo S. Assessed and Emerging Biomarkers in Stroke and Training-Mediated Stroke Recovery: State of the Art. *Neural Plast.* 2017;2017.
71. Gualerzi A, Picciolini S, Rodà F, Bedoni M. Extracellular vesicles in regeneration and rehabilitation recovery after stroke. Vol. 10, *Biology.* MDPI; 2021.
72. Ji Q, Ji Y, Peng J, Zhou X, Chen X, Zhao H, et al. Increased brain-specific MiR-9 and MiR-124 in the serum exosomes of acute ischemic stroke patients. *PLoS One.* 1 de septiembre de 2016;11(9).
73. Zhou J, Chen L, Chen B, Huang S, Zeng C, Wu H, et al. Increased serum exosomal miR-134 expression in the acute ischemic stroke patients. *BMC Neurol.* 4 de diciembre de 2018;18(1).
74. Tang K, Just J, Ankerlund R, Ryun K. Extracellular vesicles in acute stroke diagnostics. *Biomedicines.* 1 de agosto de 2020;8(8).
75. Forró T, Bajkó Z, Bălașa A, Bălașa R. Dysfunction of the neurovascular unit in ischemic stroke: Highlights on micrnas and exosomes as potential biomarkers and therapy. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI; 2021.
76. Han C, Yang J, Sun J, Qin G. Extracellular vesicles in cardiovascular disease: Biological functions and therapeutic implications. Vol. 233, *Pharmacology and Therapeutics.* Elsevier Inc.; 2022.
77. Davidson SM, Andreadou I, Barile L, Birnbaum Y, Cabrera-Fuentes HA, Cohen M V., et al. Circulating blood cells and extracellular vesicles in acute cardioprotection. Vol. 115, *Cardiovascular Research.* Oxford University Press; 2019. p. 1156-66.
78. Wen Z, Mai Z, Zhu X, Wu T, Chen Y, Geng D, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate cardiomyocyte apoptosis in hypoxic conditions through microRNA144 by targeting the PTEN/AKT pathway. *Stem Cell Res Ther.* 23 de enero de 2020;11(1).
79. Chen Q, Liu Y, Ding X, Li Q, Qiu F, Wang M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-secreted exosomes carrying microRNA-125b protect against myocardial ischemia reperfusion injury via targeting SIRT7. *Mol Cell Biochem.* 1 de febrero de 2020;465(1-2):103-14.
80. Gallet R, Dawkins J, Valle J, Simsolo E, De Couto G, Middleton R, et al. Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *Eur Heart J.* 1 de enero de 2017;38(3):201-11.
81. Ailawadi S, Wang X, Gu H, Fan GC. Pathologic function and therapeutic potential of exosomes in cardiovascular disease. Vol. 1852, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease.* Elsevier; 2015. p. 1-11.
82. Roy-O'Reilly M, McCullough LD. Sex differences in stroke: The contribution of coagulation. Vol. 259, *Experimental Neurology.* Academic Press Inc.; 2014. p. 16-27.

83. Gervois P, Wolfs E, Ratajczak J, Dillen Y, Vangansewinkel T, Hilkens P, et al. Stem Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke: Preclinical Results and the Potential of Imaging-Assisted Evaluation of Donor Cell Fate and Mechanisms of Brain Regeneration. Vol. 36, Medicinal Research Reviews. John Wiley and Sons Inc.; 2016. p. 1080-126.
84. Dabrowska S, Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Neuroinflammation as a target for treatment of stroke using mesenchymal stem cells and extracellular vesicles. *J Neuroinflammation*. 12 de septiembre de 2019;16(1).
85. Zhang ZG, Chopp M. Exosomes in stroke pathogenesis and therapy. Vol. 126, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2016. p. 1190-7.
86. Zhang Y, Chopp M, Liu XS, Katakowski M, Wang X, Tian X, et al. Exosomes Derived from Mesenchymal Stromal Cells Promote Axonal Growth of Cortical Neurons. *Mol Neurobiol*. 1 de mayo de 2017;54(4):2659-73.
87. Huang S, Ge X, Yu J, Han Z, Yin Z, Li Y, et al. Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons. *FASEB Journal*. 1 de enero de 2018;32(1):512-28.
88. Lai RC, Tan SS, Yeo RWY, Choo ABH, Reiner AT, Su Y, et al. MSC secretes at least 3 EV types each with a unique permutation of membrane lipid, protein and RNA. *J Extracell Vesicles*. 1 de enero de 2016;5(1)

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mi tutora, Marta Saura Redondo, toda la ayuda que me ha proporcionado en la realización de este Trabajo de Fin de Grado.

A mi madre y a mi padre, por educarme en la persona que soy y por apoyarme, desde el primer minuto y hasta el último, en la decisión de dedicarme a la Medicina. A todos aquellos que, acompañándome en este camino, se han convertido en amigos y a los que llevan siéndolo toda la vida.

Autor: Juan Lorenzo Fraile

Tutora: Marta Saura Redondo. Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Fisiología, Universidad de Alcalá

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en el mundo, representando casi un tercio del total de defunciones. La cardiopatía isquémica y los accidentes cerebrovasculares son responsables del 85% de ellas. A pesar de los numerosos avances en el ámbito de la Cardiología, las técnicas diagnósticas y los tratamientos actuales presentan un amplio margen de mejora en términos de pronóstico y cifras de supervivencia.

Desde su descubrimiento en la década de los 70, las **vesículas extracelulares (EV)** han suscitado un enorme interés en la comunidad científica. Se definen como todas aquellas partículas liberadas de forma natural por la célula, rodeadas por una bicapa lipídica y sin capacidad de replicación.

Su capacidad para transportar todo tipo de moléculas y sus implicaciones como **método de comunicación intercelular**, dota a estas partículas de un potencial muy atractivo desde el punto de vista clínico.

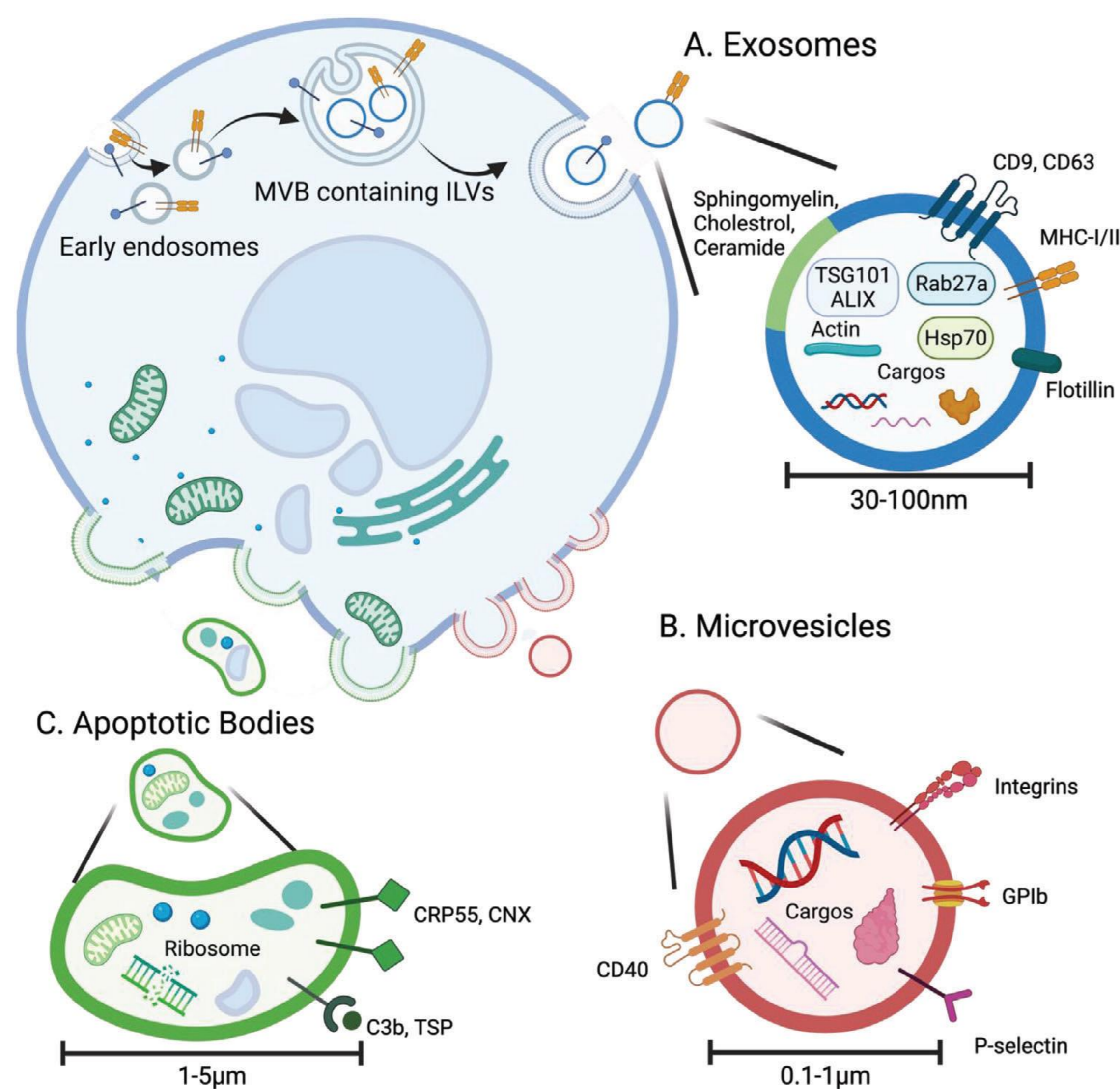


Figura 1. Vías de biogénesis y composición bioquímica básica de los diferentes tipos de EV.

Los **objetivos** de este TFGM son:

- 1) Dar a conocer el mundo de las EV, destacando sus principales características, su funcionamiento y las implicaciones en el sistema cardiovascular.
- 2) Describir su papel como biomarcadores y su uso en el diagnóstico de las enfermedades cardiovasculares más relevantes.
- 3) Enumerar las posibles aplicaciones terapéuticas, así como las perspectivas de futuro y sus principales limitaciones.

Material y métodos

Revisión bibliográfica conformada por **87 artículos** científicos.

Base de datos empleada: **PubMed**.

La totalidad de las búsquedas se llevaron a cabo en **inglés**, manejándose únicamente aquellos artículos publicados en la **última década**.

Palabras clave: biomarcadores, células cardíacas, enfermedad cardiovascular, exosomas, ictus isquémico, infarto agudo de miocardio, vesículas extracelulares.

Resultados

Angiogénesis	<ul style="list-style-type: none"> • miRNA-126, miRNA-132, miRNA-146a, • PDGF, EGF, FGF
Hipertrofia miocárdica	<ul style="list-style-type: none"> • miRNA-21, miRNA-200a • Ang II
Protección frente a apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> • miRNA-21, miRNA-30, miRNA-210 • HSP60
Protección frente a fibrosis miocárdica	<ul style="list-style-type: none"> • miRNA-29b, miRNA-144, miRNA-195, • miRNA-208, HSP90

Tabla 1. Principales moléculas transportadas por exosomas y su relación con el sistema cardiovascular.

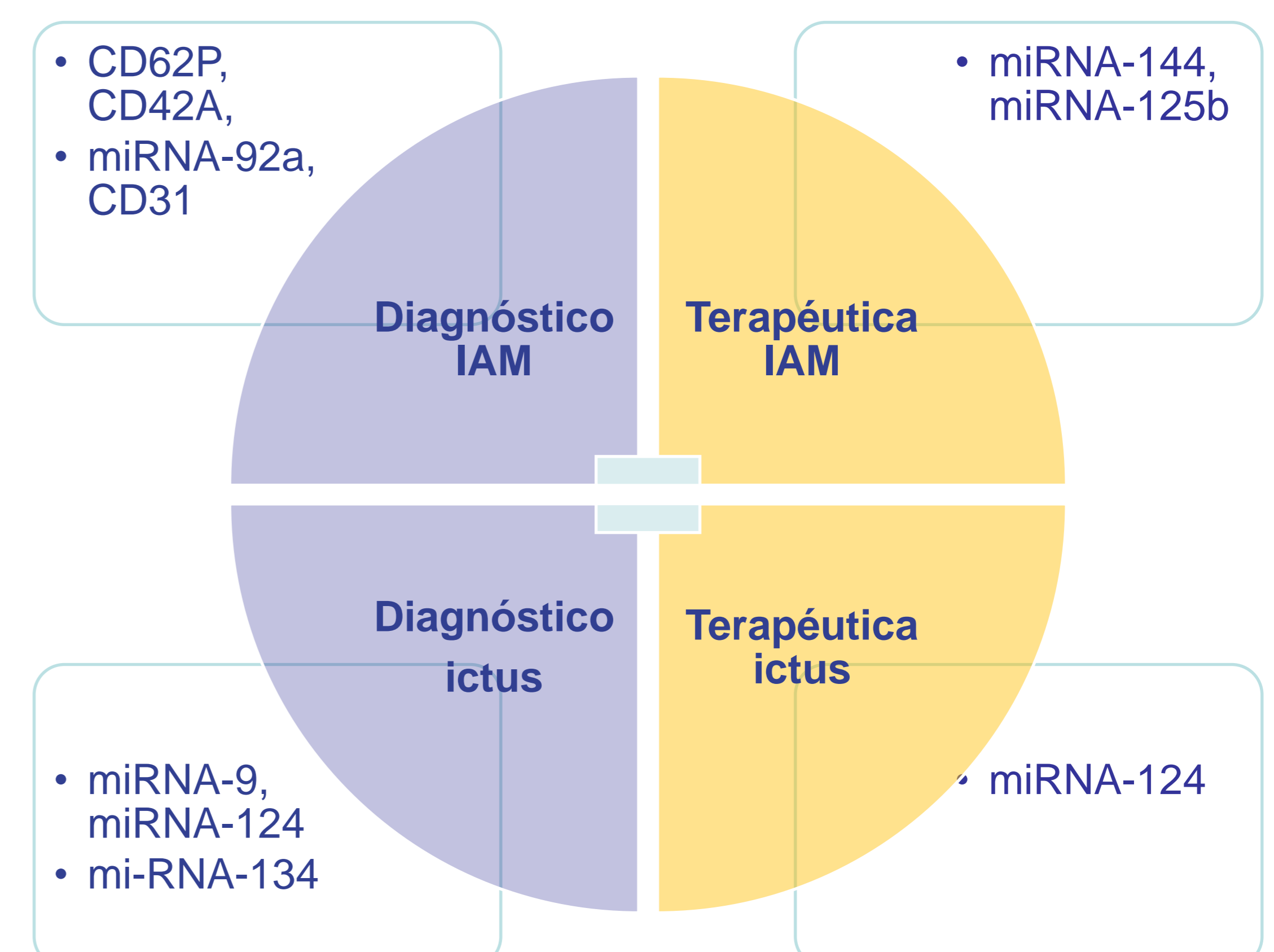


Figura 2. Relación de moléculas cuya utilidad como biomarcadores y/o capacidad terapéutica ha sido demostrada.

Las **limitaciones** de estos estudios comprenden:

- Heterogeneidad entre las EV obtenidas de cada donante.
- Dificultad para discernir la fracción responsable de la actividad biológica
- Farmacocinética desconocida → Imposibilidad para establecer perfil de seguridad en humanos.

Conclusiones

- ✓ Las EV constituyen hoy en día un campo de estudio muy prometedor por sus posibilidades en el diagnóstico y tratamiento de multitud de patologías. Sus **características bioquímicas** y su presencia en la gran **mayoría de fluidos biológicos** les confieren un potencial cuyos límites están aún por delimitar.
- ✓ El principal factor limitante para considerar el uso de las EV como biomarcadores radica en la dificultad que supone su aislamiento y caracterización con las técnicas actuales. La **estandarización de los métodos obtención** y el establecimiento de unos **criterios de clasificación comunes** constituyen los objetivos principales para permitir su empleo como herramienta diagnóstica.
- ✓ Se ha demostrado la relevancia de las EV en el ámbito de la **medicina regenerativa**. Las corrientes de pensamiento actuales defienden la superioridad de estas partículas con respecto a los tratamientos basados en células madre: sus propiedades les confieren mayor **seguridad, estabilidad y eficiencia**.
- ✓ Los estudios publicados hasta la fecha se han realizado en su mayoría **in vitro o en animales**, y aquellos realizados en humanos cuentan con **cohortes demasiado pequeñas** como para poder extrapolar resultados a la población general.

