



# **Efecto de TNF- $\alpha$ sobre la protección conferida por vesículas extracelulares pequeñas endoteliales frente a isquemia/reperfusión**

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica especialización en bioquímica clínica

Memoria para optar al título de Bioquímico

***Nicolás Gabriel Herrera Zelada***

**Dr. Jaime Riquelme Meléndez**

Director de tesis

Laboratorio de transducción de señales moleculares

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Universidad de Chile

**Dr. Sergio Lavandero González**

Director de tesis

Laboratorio de transducción de señales moleculares

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Universidad de Chile

**Santiago-Chile**

**2022**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

## NICOLÁS GABRIEL HERRERA ZELADA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Bioquímica Clínica y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día ..... de ..... del año 2022.

Directores de Tesis:

Dr. Jaime Riquelme Meléndez

---

Dr. Sergio Lavandero González

---

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Carmen Romero

---

Dra. Lorena Lobos

---

Dr. Guillermo Días

---

## TABLA DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	5
<b>ABREVIATURAS</b>	6
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	11
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	12
<b>FINANCIAMIENTO</b>	13
<b>RESUMEN</b>	14
<b>ABSTRACT</b>	16
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	18
1.1. Infarto del miocardio	17
1.2. Cardioprotección	18
1.3. Endotelio y su papel en cardioprotección	19
1.4. Factores de confusión en cardioprotección	20
1.5. Vesículas extracelulares endoteliales pequeñas: nuevos agentes protectores contra el infarto del miocardio	21
1.6. Inflamación, señalización de TNF- $\alpha$ y disfunción endotelial: potencial desconexión entre el laboratorio y la clínica	24
<b>2. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	26- 27
<b>3. METODOLOGÍA</b>	29
3.1. Animales	29
3.2. Cultivo de células endoteliales	29
3.3. Aislamiento de vesículas extracelulares pequeñas (SEVs)	29
3.4. Extracción de proteínas y análisis Western-blot	30
3.5. Análisis de IL-6 por ELISA	31
3.6. Análisis de nanopartículas	31
3.7. Marcadores de vesículas extracelulares pequeñas	32
3.8. Microscopía electrónica	32

3.9.	Cultivo de cardiomiocitos e isquemia/reperfusión simulada	32
3.10.	Modelo <i>ex vivo</i> de isquemia/reperfusión global	33
3.11.	Medición de tamaño del infarto	34
3.12.	Análisis estadístico	34
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
4.1.	Resultados del Objetivo N°1	35
4.1.1.	Validación de modelo HUVEC de activación endotelial	35
4.1.2.	Expresión de Interleuquina 6	37
4.1.3.	Disminución de eNOS en presencia de TNF- $\alpha$	38
4.1.4.	Obtención de fracción rica en vesículas extracelulares pequeñas	40
4.1.5.	Concentración y tamaño de fracción rica en SEVs de 24 h por <i>nanoparticle tracking analysis</i> (NTA).	42
4.1.6.	Verificación de estado de activación endotelial luego de cambio de medio en células HUVEC.	44
4.1.7.	Concentración y tamaño de fracción rica en SEVs por <i>nanoparticle tracking analysis</i> (NTA) tras cambio de medio y re-estimulación con TNF- $\alpha$ a las 24 h.	46
4.1.8.	Determinación de CD81 y microscopia electrónica para la determinación de SEVs.	48
4.2.	Resultados del Objetivo N°2	50
4.2.1.	Efecto del pre-condicionamiento de vesículas extracelulares pequeñas secretados por células HUVEC tratadas con TNF- $\alpha$ en cardiomiocitos de rata neonata sometidos a isquemia/reperfusión simulada.	50
4.2.2.	Determinación de tamaño de infarto de corazón de ratón adulto sometido a isquemia/reperfusión global pre-condicionado con vesículas extracelulares pequeñas secretados por células HUVEC tratadas con TNF- $\alpha$ .	52
<b>5.</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>54</b>
5.1.	Modelo de activación endotelial	54

5.2.	Caracterización de vesículas extracelulares pequeñas	55
5.3.	Efecto de vesículas extracelulares pequeñas secretadas por endotelio activado en I/R <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> .	58
5.4.	Limitaciones del Estudio	63
5.5.	Perspectivas futuras	69
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>ACTIVIDADES DERIVADAS DE LA TESIS</b>	<b>71</b>
7.1.	Publicaciones durante el periodo de tesis	71
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>72</b>

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer el desarrollo de este trabajo en primer lugar a mi familia por darme la oportunidad de estudiar fuera de mi región. A mi madre y mi padre por apoyarme en todo, a mi hermana por siempre estar ahí y a mi abuela que en paz descanse. Muchas gracias a toda la gente que conocí durante la carrera, todos mis amigos que siempre estuvieron a mi lado, codo a codo superando las dificultades que impone estudiar una carrera como bioquímica. Espero que nos sigamos viendo. Un especial cariño a la señora Gindra del laboratorio de transducción de señales de la facultad que nos ayudó a poner en marcha el modelo que me permitió desarrollar la última parte de este trabajo y a la gente del laboratorio por enseñarme con toda la disposición en todo momento. Al Dr. Jaime Riquelme, una excelente persona y un maravilloso profesor, que siempre me apoyo en todo y me ayudo a ver lo emocionante que es hacer ciencia, gracias por recibirme para permitir desarrollar este trabajo, cualquier alumno a su cargo será muy afortunado de tener un docente como él. Al profesor Sergio Lavandero por siempre estar atento y pendiente de mi progreso y recibirme en esa unidad en pregrado que me termino por encantar y decidirme desarrollar esta tesis. Espero poder haber llenado las expectativas de todos tanto en lo personal como en lo profesional, les agradezco mucho todo lo que hicieron por mí.

Muchas Gracias.

## ABREVIATURAS

IM	: Infarto del miocardio
ROS	: Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>Reactive oxygen species</i> )
DNA	: Ácido desoxirribonucleico (del inglés <i>deoxyribonucleic acid</i> )
I/R	: Isquemia/reperfusión
Akt	: Proteína quinasa B (del inglés <i>protein kinase B</i> )
ERK 1/2:	: Quinasa relacionada con señalización extracelular 1/2 (del inglés <i>extracellular-signal-related kinase 1/2</i> )
PKC	: Proteína quinasa C (del inglés <i>protein kinase C</i> )
RISK	: Quinasas de rescate de daño por reperfusión (del inglés <i>Reperfusion Injury Salvage Kinases</i> )
PI3K:	: Fosfoinositida 3-quinasa (del inglés <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
MEK1/2	: Proteína quinasa quinasa activada por mitógeno 1/2 también conocida como MAP2K1 (del inglés <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> )
SAFE	: Realce del factor activador de sobrevivencia (del inglés <i>Survivor Activator Factor Enhancement</i> )
JAK	: Quinasa Janus (del inglés <i>Janus kinase</i> )
STAT	: Activador de transcripción y transductor de señales (del inglés <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> )
MCU:	: Uniportador de calcio mitocondrial (del inglés <i>mitochondrial calcium uniporter</i> )
NO	: Óxido nítrico (del inglés <i>Nitric oxide</i> )

CO : Monóxido de carbono (del inglés *Carbon monoxide*)

eNOS : Óxido nítrico sintasa endotelial (del inglés *endothelial nitric oxide synthase*)

EV : Vesículas extracelulares (del inglés *extracellular vesicles*)

CMV : Cuerpo multivesicular

ESCTR : Complejo de clasificación endosomal (del inglés *endosomal sorting complex required for transport*)

ALIX: : Proteína X que interactúa con ALG2 (del inglés *ALG-2-interacting protein X*)

VSP32 : Proteína de almacenamiento vegetativo 32 (del inglés *vegetative storage protein 32*)

TSG101 : Gen de susceptibilidad tumoral 101 (del inglés *tumor susceptibility gene 101*)

GM130 : Proteína de matriz Golgi de 130 kDa (del inglés *Golgi matrix 130 kDa*)

MHC : Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés *major histocompatibility complex*)

RAB : Unión asociada a Ras (del inglés *Ras-associated binding*)

RNA : Ácido ribonucleico (del inglés *ribonucleic acid*)

CD : Cúmulos de diferenciación (del inglés *cluster differentiation*)

miRNA/miR: : micro ácido ribonucleico (del inglés *micro ribonucleic acid*)

mRNA : Ácido ribonucleico mensajero (del inglés *Messenger ribonucleic acid*)

TNF- $\alpha$  : Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés *tumor necrosis factor alpha*)

TLR4 : Receptor tipo toll 4 (del inglés *toll like receptor 4*)

- ICAM-1 : Molécula de adhesión intercelular 1 (de inglés *intercellular adhesion molecule 1*)
- VCAM-1 : Molécula de adhesión celular vascular 1 (del inglés *Vascular cell adhesion molecule 1*)
- SHIP1 : Inositol 5 polifosfatasa 1 que contiene SH-2 (del inglés *SH-2 containing inositol 5' polyphosphatase 1*)
- SOCS1 : Supresor de la señalización de citocinas 1 (del inglés *suppressor of cytokine signaling 1*)
- IL-6 : Interleuquina 6 (del inglés *interleukin 6*)
- LFA-1: : Antígeno asociado a la función de leucocitos 1 (del inglés *Lymphocyte function-associated antigen 1*)
- VLA-1 : Proteína de activación tardía (del inglés *very late activation 1*)
- TNFR : Receptor del factor de necrosis tumoral (del inglés *tumor necrosis factor receptor*)
- JNK : Quinasas de c-Jun N-terminal (del inglés *c-Jun N-terminal kinase*)
- MAPK : Quinasa de proteína mitógeno-activada (del inglés *mitogen-activated kinase protein*)
- NF-κB : Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas (del inglés *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
- SEVs : Vesículas extracelulares pequeñas (del inglés *small extracellular vesicles*)
- cSEVs : Vesículas extracelulares secretadas por endotelio control (del inglés *control small extracellular vesicles*)
- aSEVs : vesículas extracelulares derivadas de endotelio activado (del inglés *activated endothelium small extracellular vesicles*)

- NTA : Análisis de seguimiento de nanopartículas (del inglés *nanoparticle tracking analysis*)
- EGM-2 : Medio de crecimiento de células endoteliales 2 (del inglés *endothelial grow medium 2*)
- HUVEC : Células endoteliales vasculares umbilicales humanas (del inglés *human umbilical vascular endothelial cells*)
- PBS: : Tampón fosfato salino (del inglés *phosphate buffered saline*)
- RIPA : Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (del inglés *radioimmunoprecipitation assay buffer*)
- SDS-PAGE : Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
- PVDF : Fluoruro de polivinilideno (del inglés *Polyvinylidene fluoride*)
- TBS : Tampón tris-salino (del inglés *Tris buffered saline*)
- ELISA : Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés *enzyme linked immunosorbent assay*)
- DMEM : Medio Eagle modificado por Dulbeco's (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
- SFB : Suero fetal bobino
- HEPES: : Del inglés *2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid*
- LDH : Lactado deshidrogenasa (del inglés *lactate deshydrogenase*)
- ANOVA : Análisis de varianza (del inglés *Analysis of Variance*)

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Modelo de tesis propuesto: Pérdida de la capacidad cardioprotectora de SEVs endoteliales en un contexto inflamatorio.	28
<b>Figura 2</b>	Efecto de TNF- $\alpha$ en los niveles proteicos de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1.	36
<b>Figura 3</b>	Efecto de TNF- $\alpha$ en la secreción de interlucina-6 (IL-6) en células HUVEC.	37
<b>Figura 4</b>	Efecto de TNF- $\alpha$ en los niveles proteicos de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).	39
<b>Figura 5</b>	Diagrama de obtención y caracterización de vesículas extracelulares pequeñas.	41
<b>Figura 6</b>	Distribución, Tamaño modal y concentración de vesículas extracelulares pequeñas a las 24 h de la activación endotelial.	43
<b>Figura 7</b>	Estado de activación endotelial en células HUVEC luego de cambio de medio tras 24 h de estimulación.	45
<b>Figura 8</b>	Distribución, tamaño modal y concentración de vesículas extracelulares pequeñas a las 24 h de la activación endotelial.	47
<b>Figura 9</b>	Determinación de CD81 y microscopia electrónica para la determinación de SEVs.	49
<b>Figura 10</b>	Modelo <i>in vitro</i> de isquemia/reperfusión simulada de cardiomiocitos de rata neonata pre-condicionados con vesículas extracelulares pequeñas secretadas por endotelio control y endotelio activado.	51

---

<b>Figura 11</b>	Modelo ex vivo de perfusión de corazón aislado Langendorff pre-condicionado con vesículas extracelulares pequeñas secretadas por endotelio control y endotelio activado	53
------------------	--	----

---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1</b>	Anticuerpos utilizados para Western-blot	31
----------------	--	----

---

## FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación fue financiado a través de los siguientes proyectos:

- Fondecyt de Iniciación 11181000 – Jaime Riquelme Meléndez
- FONDAP 15130011 – Sergio Lavandero González, Jaime Riquelme Meléndez
- Fondecyt 1200490 – Sergio Lavandero González

## RESUMEN

El infarto del miocardio es actualmente la mayor causa de muerte a nivel mundial, llegando al 15% del total de muertes cada año. A lo largo de las décadas, diversas metodologías de cardioprotección se han desarrollado para limitar el daño del miocardio inducido por isquemia/reperfusión (I/R). El endotelio es un componente esencial en múltiples estrategias protectoras en infarto, secretando factores que han demostrado reducir el daño por I/R. Por otra parte, las vesículas extracelulares pequeñas (SEVs), como los exosomas, son pequeñas vesículas de 50-200 nm producidas por diversos tipos celulares. Estas nano-vesículas transportan proteínas, miRNAs, RNAs y DNA de una célula a otra, siendo una forma de comunicación celular muy variada. Adicionalmente, las SEVs son potenciales nuevos agentes cardioprotectores. En este sentido, se ha observado que las SEVs producidas por células endoteliales reducen la muerte celular generada por I/R *in vitro*. Si bien las estrategias cardioprotectoras han producido resultados exitosos en el laboratorio, esta realidad no se ha logrado reproducir en ensayos clínicos. Esta desconexión entre la ciencia básica y la clínica puede ser atribuida a la presencia de otros factores, tales como comorbilidades, co-medicaciones y envejecimiento. En este contexto, una posible explicación a la actual brecha entre el laboratorio y la clínica tiene relación con la inflamación, la cual es un factor común en la mayoría de las enfermedades asociadas a patologías cardiovasculares. Por esta razón, se ha postulado que condiciones proinflamatorias podrían reducir la efectividad de diversas estrategias cardioprotectoras en pacientes con comorbilidades. El presente estudio propuso como hipótesis de trabajo que las SEVs aisladas de células endoteliales en un estado proinflamatorio (activación endotelial), promueven la generación de SEVs defectuosas, anulando así su efecto protector en I/R. Para evaluar esta hipótesis, los objetivos consideraron el tratamiento de células endoteliales HUVEC con TNF- $\alpha$  y evaluación de expresión de parámetros proinflamatorios VCAM1, ICAM1 y eNOS mediante Western blot. Luego, se aislaron de SEVs de células endoteliales tratadas con la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$

(aSEVs) utilizando cromatografía de exclusión por tamaño. Para caracterizar estas nano-vesículas, se midió su tamaño y concentración mediante *Nanoparticle Tracking Analysis*, mientras que la expresión del marcador de superficie CD81 fue determinado mediante inmunoensayo y su visualización y morfología fue evaluada por microscopía electrónica. El efecto de estas SEVs fue evaluado en un modelo de cardiomiocitos de rata neonata sometidos a I/R *in vitro* y en un modelo de I/R global *ex vivo* en corazones aislados de ratones adultos. Los resultados mostraron que el tratamiento de células HUVEC con TNF- $\alpha$  generó un aumento en el contenido proteico de los marcadores proinflamatorios VCAM-1, ICAM-1 e IL-6, además de la disminución de los niveles de eNOS. La caracterización de SEVs muestra un tamaño asociado a exosomas entre 100 y 200 nanómetros, además de presentar el marcador de superficie CD81, evaluado mediante inmunoensayo. En el modelo de I/R *in vitro*, no se observaron diferencias en el porcentaje de LDH -un marcador de muerte celular- entre las células tratadas con SEVs controles y las tratadas con aSEVs. En un modelo de infarto *ex vivo*, tampoco se observaron diferencias significativas en el tamaño de infarto entre los controles de I/R y los corazones tratados con SEVs o aSEVs. Sin embargo, se obtuvo un aumento en la presión de perfusión en los corazones tratados con aSEVs, lo que sugiere daño del miocardio. Por lo tanto, esta investigación propone a la inflamación como un blanco terapéutico para poder restaurar la cardioprotección mediada por SEVs en un contexto patológico en el cual existan comorbilidades asociadas.

## ABSTRACT

Myocardial infarction is currently the leading cause of death worldwide, reaching 15% of all deaths each year. Over the decades, various cardioprotective methodologies have been developed to limit ischemia/reperfusion (I/R)-induced myocardial damage. The endothelium is an essential component in multiple protective strategies in infarction, secreting factors that have been shown to reduce I/R damage. On the other hand, small extracellular vesicles (SEVs), like exosomes, are small 50-200 nm vesicles produced by various cell types. These nano-vesicles transport proteins, miRNAs, RNAs and DNA from one cell to another, being a very varied form of cellular communication. Additionally, SEVs are potential new cardioprotective agents. In this sense, it has been observed that SEVs produced by endothelial cells reduce cell death generated by I/R in vitro. Although cardioprotective strategies have produced successful results in the laboratory, this reality has not been reproduced in clinical trials. This disconnection between basic and clinical science can be attributed to the presence of other factors, such as comorbidities, co-medications, and aging. In this context, an explanation for the current gap between the laboratory and the clinic is related to inflammation, which is a common factor in most diseases associated with cardiovascular pathologies. For this reason, it has been postulated that proinflammatory conditions could reduce the effectiveness of various cardioprotective strategies in patients with comorbidities. The present study proposed as a working hypothesis that SEVs isolated from endothelial cells in a proinflammatory state (endothelial activation), promote the generation of defective SEVs, thus nullifying their protective effect on I/R. To evaluate this hypothesis, the objectives considered the treatment of HUVEC endothelial cells with TNF- $\alpha$  and evaluation of the expression of proinflammatory parameters VCAM1, ICAM1 and eNOS by Western blot. Then, SEVs were isolated from endothelial cells and treated with the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  (aSEVs), using size exclusion chromatography. To characterize these nanovesicles, their size and concentration were measured by Nanoparticle Tracking Analysis, while the

expression of the surface marker CD81 was determined by immunoassay and the morphology and visualization was evaluated by electron microscopy. The effect of these SEVs was evaluated in an *in vitro* I/R neonatal rat cardiomyocyte model and in an *ex vivo* global I/R model in isolated adult mouse hearts. The results showed that the treatment of HUVEC cells with TNF- $\alpha$  generated an increase in the protein content of the proinflammatory markers VCAM-1, ICAM-1 and IL-6, in addition to a decrease in eNOS levels. The characterization of SEVs shows a size between 100 and 200 nanometers, in addition to presenting the surface marker CD81, evaluated by immunoassay. In the *in vitro* I/R model, no differences were observed in the percentage of LDH -a marker of cell death- between cells treated with control SEVs and those treated with aSEVs. In an *ex vivo* infarct model, no significant differences in infarct size were observed between I/R controls and hearts treated with SEVs or aSEVs. However, an increase in perfusion pressure was evidenced in hearts treated with aSEVs, suggesting myocardial damage. Therefore, this research proposes inflammation as a therapeutic target to restore cardioprotection mediated by SEVs in a pathological context in which there are associated comorbidities.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Infarto del miocardio

La función esencial del corazón es bombear la sangre al resto del cuerpo. Esta función es ejercida por el tejido muscular especializado del corazón, el miocardio, el cual depende de la coordinación de los cardiomiocitos, las células cardiacas contráctiles. El corazón además presenta otros tipos celulares como fibroblastos cardiacos, células endoteliales y células de la musculatura lisa [1], [2]. Esta funcionalidad contráctil puede ser afectada por diversas causas, como la obesidad, el consumo de tabaco, el síndrome metabólico, la hipertensión arterial y una baja actividad física que derivan en las llamadas enfermedades cardiovasculares. Dentro de estas se encuentra el infarto del miocardio (IM), responsable del 15% de muertes cada año [3]. El IM se origina a partir de la ruptura de una coagulo sanguíneo o trombo generalmente formado en una placa aterosclerótica, esto puede causar la oclusión de una arteria coronaria, reduciendo parcial o completamente el flujo sanguíneo hacia una cierta parte del corazón, impidiendo el aporte de nutrientes y oxígeno, generando lo que se conoce como un evento isquémico [4].

A medida que aumenta el tiempo y la severidad de la isquemia, los cardiomiocitos comienzan a sufrir un daño irreversible y comienzan a morir, generando muerte del tejido del miocardio, el cual pierde su capacidad contráctil, aumentando el tamaño del infarto [5]. El procedimiento que permite que vuelva el flujo sanguíneo a la zona isquémica se conoce como reperfusión [6]. Si no se produce la reperfusión, el tamaño del infarto aumenta de manera progresiva, abarcando la totalidad del área de isquemia. Si bien la reperfusión evita que muera la totalidad del tejido, paradójicamente puede generar muerte del miocardio, proceso conocido como daño por reperfusión [6], por lo que a lo largo de los años se han explorado diversas metodologías protectoras para evitar el daño por reperfusión [5].

## 1.2. Cardioprotección

A lo largo de los años, se han desarrollado diversas estrategias de protección frente al IM para reducir, prevenir y reparar el daño miocárdico inducido por los procesos de isquemia/reperfusión (I/R). Este tipo de metodologías que logran reducir el tamaño del infarto se conocen como metodologías cardioprotectoras [7]. Estas metodologías se clasifican generalmente en dos categorías, el condicionamiento isquémico y la cardioprotección farmacológica. El condicionamiento isquémico (CI), descrito hace más de 3 décadas, corresponde a un conjunto de estrategias cardioprotectoras endógenas basadas en ciclos cortos de isquemia y reperfusión.

La protección mediada por estas estrategias ocurre debido a que, durante los breves ciclos de I/R, el cardiomiocito comienza a producir moléculas como, adenosina, bradiquinina, esfingosina y opioides los cuales actúan sobre receptores acoplados a proteína  $G_{i/q/s}$  en la membrana del cardiomiocito, activando 3 vías principales de protección. La vía PKC-eNOS-PKG, la vía RISK, cuyas moléculas de señalización corresponde a las vías PI3K-Akt y MEK1/2 y ERK1/2 y la vía SAFE, que se asocia a la activación de la vía JAK-STAT. Estas tres cascadas de señalización convergen en la mitocondria, generando protección de la muerte celular por medio de la inhibición de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, entidad que durante la reperfusión es permeable a diferentes moléculas y genera la muerte del cardiomiocito, además de la disminución en la producción de ROS.

Por su parte, el condicionamiento farmacológico, a través de los años, se ha enfocado principalmente en activar farmacológicamente receptores y vías transduccionales relacionadas con la supervivencia celular como las vías RISK-SAFE (adenosina, bradiquinina), antioxidantes, utilizando como blanco la mitocondria (bendavia, ciclosporina A, bloqueadores de MCU), antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos (metoprolol) y moduladores de la síntesis de óxido nítrico (NO) [8].

### 1.3. El endotelio y su papel en cardioprotección

Actualmente, se postula que la cardioprotección considera la estimulación e interacción de los distintos tipos de células cardíacas [9]. En dicho sentido, el endotelio juega un papel crucial en múltiples estrategias cardioprotectoras [10]. Para ilustrar este punto, cabe destacar en primer lugar el rol fundamental que juegan las células endoteliales en el sistema cardiovascular, teniendo características tanto funcionales y estructurales actuando como barrera entre la sangre y la pared del vaso sanguíneo, regulando la fibrinólisis y la cascada de coagulación por medio de la producción de factores coagulantes y anticoagulantes que mantienen las propiedades hemostáticas de los vasos sanguíneos [11]. Adicionalmente, el endotelio también controla la permeabilidad hacia el interior de la célula de los componentes del plasma, regula el tono vascular mediando los estímulos para que las células de la musculatura lisa produzcan tanto la relajación, como la contracción del vaso sanguíneo. Además, las células endoteliales son capaces de participar en procesos como la angiogénesis y aterogénesis [11]. En el miocardio, existe una densa red de capilares, en la cual, al menos un capilar y una célula endotelial, sobrepasan en número a los cardiomiocitos en una proporción de 3:1 [12].

En este contexto, el endotelio juega un rol fundamental en cuanto a la protección frente al infarto, debido a que puede actuar como un “receptor” de señales transmitidas vía sanguínea, como lo son las estrategias de condicionamiento isquémico y cardioprotección farmacológica así como nuevas estrategias cardioprotectoras prometedoras que se encuentran en su mayoría en fase de estudios preclínicos [10]. El endotelio también puede actuar como sensor de estrés hipóxico y como un órgano paracrino involucrado en transmitir diferentes tipos de señales al cardiomiocito, secretando moléculas vasodilatadoras como lo son el óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), bradiquinina y adenosina [9]. Además, el endotelio también produce moléculas que generan vasoconstricción, como la endotelina, angiotensina II, tromboxano A<sub>2</sub> y ROS [13].

Leucker *et al.* descubrieron que el co-cultivo de células endoteliales con cardiomiocitos de rata neonata disminuyen la muerte celular producida por el daño por I/R *in vitro* [14]. Este mismo grupo demostró que el endotelio es fundamental para la protección de los cardiomiocitos frente a la I/R al utilizar el isoflurano [15]. De igual forma, en un estudio de nuestro laboratorio se observó que la cardioprotección mediada por el agonista  $\alpha 2$  adrenérgico dexmedetomidina ocurre mediante un mecanismo dependiente de la activación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y producción de NO. Adicionalmente, este estudio mostró que esta protección no se genera en ausencia de endotelio [16], lo que sugiere que el endotelio es un tipo celular clave requerido para generar cardioprotección.

#### 1.4. Factores de confusión en cardioprotección

Desafortunadamente, la mayoría de las estrategias cardioprotectoras que han sido efectivas en modelos animales, al momento de trasladarlas al ámbito clínico, no se han traducido en terapias efectivas en pacientes [17]. En este contexto, a pesar de los buenos resultados en los ensayos clínicos pequeños [18], ensayos clínicos con un mayor número de pacientes como el ensayo ERICCA, el cual evaluó a 1.612 pacientes a los que se les sometió a CI antes de cirugía cardíaca, demostró que no existía ninguna mejora frente al infarto del miocardio en comparación a aquellos que no fueron pre-condicionados [19]. Mas recientemente, se realizó el ensayo clínico CONDI-2/ERIC-PPCI, en el cual se evaluaron a 5.115 pacientes con infarto del miocardio con onda ST elevada. Estos pacientes, que se sometieron a CI antes de someterse a cirugía cardíaca, no mostraron mejora en los resultados clínicos. El estudio indica que el número de pacientes controles o sometidos a CI que sufrían muerte cardíaca o insuficiencia cardíaca era muy similar, no existiendo diferencias significativas [20]. Hasta la fecha, solamente un centro reportó una mejoría en los resultados en pacientes, aunque no mostró evidencia de reducción del tamaño del infarto [21].

Estos resultados llevan a la conclusión que existe una desconexión entre el laboratorio y la clínica, la cual es posible de explicar debido a que los modelos preclínicos utilizados son generalmente reduccionistas y no toman en cuenta comorbilidades, las cuales están presentes en pacientes que normalmente tienen problemas cardiacos, tales como hipertensión, obesidad, diabetes, dislipidemias, etc. Adicional a las comorbilidades, el envejecimiento y las co-medicaciones podrían enmascarar o reducir el efecto protector de distintas estrategias que ayudan a mejorar el daño por I/R, ya que estas también están presentes en pacientes con problemas cardiacos y que son los que normalmente son utilizados para los ensayos clínicos [22]. Por un lado, se reporta que la cardioprotección mediada por el CI, no ejercería efecto ante el envejecimiento [19]. Por otra parte, el condicionamiento farmacológico es capaz de ofrecer protección frente al daño por isquemia/reperfusión [16], de esta manera el efecto beneficioso del precondicionamiento remoto puede verse enmascarado por la protección farmacológica. Además, enfermedades como diabetes u obesidad pueden anular el efecto beneficioso de estrategias cardioprotectoras [51,52].

### **1.5. Vesículas extracelulares endoteliales pequeñas: nuevos agentes protectores contra el infarto del miocardio**

Las vesículas extracelulares (EV) son partículas con bicapa lipídica, las cuales son secretadas por una gran variedad de tipos celulares. Estas vesículas juegan un rol fundamental en la comunicación célula-célula, participando tanto en procesos fisiológicos como patológicos [49,50]. Las vesículas extracelulares se pueden clasificar principalmente en 3 grupos: vesículas extracelulares pequeñas (SEVs) como los exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos, cada uno con un origen de biosíntesis distinto, así como diferencias en su composición y contenido [27].

Las SEVs como los exosomas, corresponden a nano-vesículas extracelulares de entre 30 – 150 nm de diámetro con forma cóncava, estas contienen un cargo muy variado, hasta la fecha se ha identificado aproximadamente 4400 proteínas, dentro de las cuales destacan moléculas como tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), proteínas *heat shock* (HSP70, HSP90) y proteínas de biogénesis de exosomas (ALIX, TSG101), los cuales son comúnmente usadas como proteínas marcadoras de exosomas, además de presentar una variada cantidad de lípidos, mRNAs y miRNAs [28]

Si bien las SEVs presentan un cargo definido dependiendo del tipo celular del cual son secretados, su composición puede ser alterada por estímulos externos y de esta manera, se puede modificar su función al momento de entrar en contacto con otra célula, esto incluye células del sistema cardiaco como células endoteliales y cardiomiocitos [29].

Desde una perspectiva de cardioprotección, las SEVs han sido investigados extensamente en los últimos años con el objetivo de estudiar si su administración reduce el tamaño del infarto [50], [67–70]. Se ha observado que el co-cultivo de SEVs aislados de endotelio con cardiomiocitos de rata adulta, reducen el porcentaje de muerte celular, al realizar un procedimiento de I/R *in vitro*. Además, en esta misma investigación se demostró que al inhibir la proteína ERK1/2 con dos inhibidores farmacológicos distintos, esta protección se pierde [34]. Una investigación pionera en la cardioprotección mostró que SEVs derivados de plasma pueden reducir la muerte celular inducida por reperfusión en cardiomiocitos de rata adulta y en la línea de músculos cardiaco HL-1, lo cual fue confirmado al observar que estas también redujeron el tamaño del infarto en corazones de rata sujetos a daño por I/R *in vivo* y *ex vivo*. Este estudio demostró además que esta protección frente al daño por I/R, es mediada por HSP70, la cual se une a un receptor tipo toll 4 (TLR4), activando la vía de señalización ERK1/2 – HSP27 [35]. Esta protección contra el daño por I/R por SEVs aisladas de plasma fue recientemente replicada en un estudio independiente, mostrando además que ocurre por un mecanismo dependiente de miR-24 [36]. Otro estudio mostró que SEVs aislados de células

madre de tejido adiposo que sobreexpresan miR-2126, protegen contra el daño por I/R [37]. Asimismo, SEVs aislados de células madres mesenquimales y derivados de células derivadas de cardioesferas también protegen contra el infarto del miocardio [38][39]. Por lo tanto, SEVs de diversos tipos celulares confieren protección contra el daño por I/R, sin embargo, los mecanismos específicos por los cuales ocurre esta protección aún no son del todo claros. En este sentido, aún no es bien sabido por qué SEVs aislados de ratas no estimuladas o de células endoteliales protegen contra el daño por reperfusión y cuál es la relevancia de esta protección en el contexto de la fisiología cardiovascular. Sin embargo, dada la capacidad de alterar la producción y contenido de SEVs de una célula en respuesta a un estímulo [40], se piensa que el efecto protector de los SEVs también podría ser alterado en un contexto fisiopatológico [41]. Siguiendo esta lógica, se ha reportado que las SEVs aisladas de plasma de ratas diabéticas no son capaces de reducir la muerte celular en cardiomiocitos de rata adulta, luego de daño por I/R *in vitro*, siendo estas SEVs incapaces de activar la vía de señalización Hsp70/TLR4/Erk1/2 - Hsp27 [41]. Además, se reportó que las SEVs aisladas de endotelio reducen la muerte celular, pero sorprendentemente no presentaban Hsp70 [41], lo cual sugiere que la reducción en la muerte celular frente al daño por I/R es mediada por un mecanismo alternativo desconocido. En este sentido, cuando estas células endoteliales fueron incubadas con elevadas concentraciones de glucosa, producían SEVs que no redujeron la muerte celular frente al daño por I/R [41]. También se ha descrito que las SEVs de pacientes obesos juegan un rol importante en sus complicaciones metabólicas, como la estimulación de un estado proinflamatorio, aumentando la cantidad de citoquinas proinflamatorias, regulado por diferentes proteínas y miRNAs [42]. Esta evidencia sugiere que comorbilidades, como la diabetes u obesidad podrían alterar el efecto protector de las SEVs en enfermedades cardiovasculares, como el infarto del miocardio.

## 1.6. Inflamación, señalización de TNF- $\alpha$ y disfunción endotelial: potencial desconexión entre el laboratorio y la clínica

La inflamación, definida como la respuesta a un estímulo patogénico o a señales endógenas como daño celular, lleva al reclutamiento leucocitario. Cada tejido tiene su propia respuesta a estímulos inflamatorios como resultado de un proceso molecular, inmunológico y patológico tanto general, como local [43]. En este contexto, las células endoteliales responden a la inflamación a través de un proceso llamado activación endotelial. Esta se presenta en un contexto tanto fisiológico (actividad física, embarazo), como en múltiples patologías del sistema cardiovascular (hipertensión arterial, enfermedades de la arteria coronaria, aterosclerosis, infarto e isquemia/reperfusión) [44]. En el contexto de la cardioprotección, un estado proinflamatorio endotelial puede ser la causa de las dificultades que tienen las estrategias terapéuticas que tienen como blanco el endotelio, ya que todas las terapias, sean farmacológicas o no farmacológicas, en el algún punto, sus señales deben atravesar el endotelio para poder llegar al corazón. Por lo tanto, si el endotelio presenta alteraciones debido a estas patologías es posible que, las estrategias cardioprotectoras dejen de funcionar, debido a que deben atravesar el endotelio para generar su efecto.

La activación endotelial se caracteriza por ciertos cambios en la célula endotelial; pérdida de la integridad vascular, expresión de moléculas de adhesión leucocitaria, cambio fenotípico de antitrombótico a protrombótico y producción de citoquinas [45]. Las células endoteliales no activadas normalmente no interactúan con leucocitos. Sin embargo, bajo un contexto inflamatorio en el que el endotelio se vea expuesto a citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , se induce la expresión de nuevas moléculas en su superficie como las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, además de moléculas como interleuquina 6 (IL-6) [46]. En dicho contexto, los leucocitos circulantes se unen a estas moléculas por medio de sus integrinas como LFA-1 y VLA-1, lo que permite posteriormente la extravasación al interior de los tejidos [47]. TNF- $\alpha$  es una citoquina proinflamatoria producida en varios tipos

celulares, incluidos macrófagos, monocitos, linfocitos y fibroblastos en respuesta a inflamación, infección y daño, siendo su principal blanco de acción las células endoteliales [48]. La respuesta del endotelio a TNF- $\alpha$  ocurre principalmente a través de su receptor TNFR-1 es capaz de activar mecanismos de muerte como lo es la activación caspasa-8 que culmina con la apoptosis celular [49]. Adicionalmente, la señalización de TNFR-1 conlleva a la activación del regulador maestro de la inflamación NF- $\kappa$ B. Este factor transcripcional regula la expresión de las moléculas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM-1 [50].

Si bien normalmente el endotelio no pasa por periodos inflamatorios muy prolongados, en ciertas patologías se genera un estado inflamatorio crónico con una exposición constante a citoquinas proinflamatorias (como TNF- $\alpha$ ). Estas citoquinas actúan directamente en el endotelio, lo que genera una disminución en la expresión de eNOS [51]. Al existir menor cantidad de eNOS, se reduce la biodisponibilidad de NO, produciendo un desbalance en la cantidad de ROS generadas, lo que a su vez genera oxidación de proteínas, activación de proteasas y una disminución en la capacidad vasodilatadora del endotelio. En conjunto, esto promueve el establecimiento de disfunción endotelial [69,70]. La disfunción endotelial está presente en muchas enfermedades cardiovasculares como obesidad, aterosclerosis, isquemia-reperfusión, diabetes mellitus e hipertensión arterial [45].

## 1. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las comorbilidades asociadas a enfermedades cardiovasculares generalmente están asociadas a un proceso de inflamación crónica, lo que afecta directamente al endotelio, que pasa de un estado fisiológico a un estado patológico, perdiendo parte de su funcionalidad. Esto puede ser una explicación de por qué las estrategias cardioprotectoras dejan de funcionar en contextos comorbilidades asociadas a las enfermedades cardiovasculares como obesidad y diabetes, ya que muchas de las estrategias cardioprotectoras necesariamente deben atravesar el endotelio para llegar al miocardio. De esta misma forma, las SEVs como los exosomas que presentan características cardioprotectoras como lo son los SEVs secretadas por células endoteliales, podrían perder este efecto cardioprotector al venir de un endotelio en estado patológico, como lo es el contexto de inflamación crónica como se representa en el modelo propuesto de la **Figura 1**, lo cual sugeriría que la inflamación puede ser un blanco terapéutico importante para considerar, con el fin de restablecer el efecto protector de SEVs y potencialmente, otras estrategias cardioprotectoras.

Por lo tanto, la hipótesis es:

***“Vesículas extracelulares pequeñas secretadas por células endoteliales humanas tratadas con TNF- $\alpha$ , pierden su efecto protector frente a isquemia/reperfusión cardíaca”.***

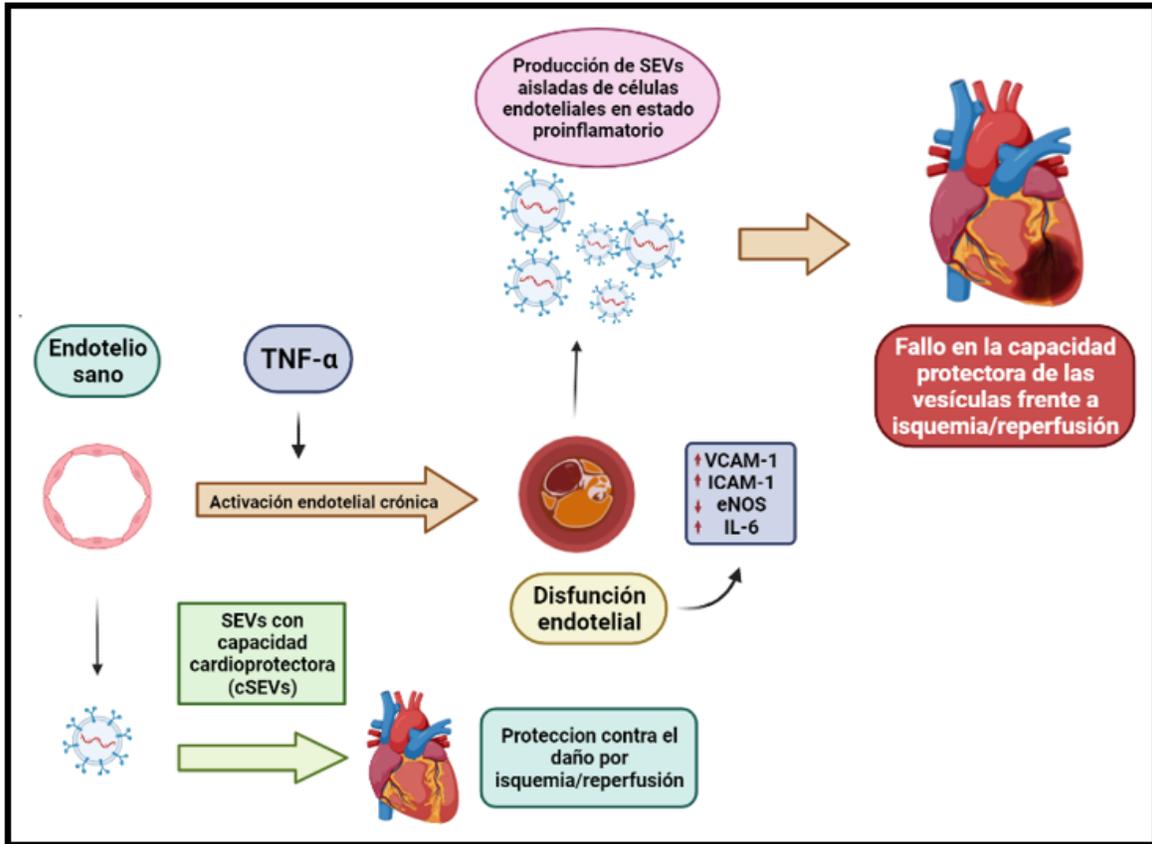
## Objetivo General

Determinar si las vesículas extracelulares pequeñas de células endoteliales humanas tratadas con TNF- $\alpha$ , pierden su efecto protector en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata expuestos a isquemia/reperfusión simulada y en un modelo *ex vivo* de corazón de ratón adulto sometido a isquemia/reperfusión global.

## Objetivos específicos:

**Objetivo 1:** Evaluar el efecto de la activación endotelial mediada por TNF- $\alpha$  en la concentración y tamaño de las vesículas extracelulares pequeñas secretadas por células endoteliales.

**Objetivo 2:** Determinar *in vitro* y *ex vivo* si las vesículas extracelulares pequeñas secretadas por células endoteliales tratadas con TNF- $\alpha$  pierden su efecto protector frente al daño por isquemia/reperfusión.



**Figura 1: Modelo de tesis propuesto: Pérdida de la capacidad cardioprotectora de SEVs endoteliales en un contexto inflamatorio.** Las comorbilidades asociadas al infarto como lo son la obesidad, diabetes y síndrome metabólico comparten el estado patológico de inflamación crónica, lo que conlleva a la síntesis de citoquinas proinflamatorias como lo son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). En un contexto fisiológico, el endotelio es capaz de secretar vesículas extracelulares pequeñas (SEVs) con efectos cardioprotectores (cSEVs). Sin embargo, en un contexto de inflamación crónica, se genera disfunción endotelial, aumento en la síntesis de moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, además de la disminución de eNOS, lo que lleva a una menor producción de óxido nítrico (NO), lo que reduce la capacidad vasodilatadora del endotelio. Esta disfunción endotelial podría afectar la producción de SEVs, que podrían presentar un elevado poder inflamatorio de manera que podrían potencialmente perder la capacidad cardioprotectora frente al daño por isquemia/reperfusión (aSEVs).

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1. Animales.

Se utilizaron ratones macho C57BL/6, de 8-12 semanas. Los ratones se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y todos los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo con la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (8<sup>va</sup> edición, 2011) y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (CBE-2018-16).

### 3.2. Cultivo de células endoteliales.

Se utilizaron células primarias de cordón umbilical humano (HUVEC), mantenidas en Endothelial BASAL Medium-2 (Lonza), suplementado con EGM-2 SingleQuot kit (Lonza). Adicionalmente se utilizó medio con suero libre de vesículas extracelulares (vesicle-free), para el posterior aislamiento de vesículas. Los pasajes se realizaron con Accutase (Sigma) y se trabajó con células entre el pasaje 3, hasta el 12. Las células se incubaron a 37° C con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> constante hasta el día siguiente. Al alcanzar una confluencia de aproximadamente del 80-90%, se sembraron en frascos T75 o en placas de 60 y 100 mm, según los experimentos realizados.

### 3.3. Aislamiento de vesículas extracelulares pequeñas (SEVs).

Para el aislamiento de SEVs, se utilizaron HUVEC con 80-90% de confluencia y se administraron 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  durante 24 h. Al término de este periodo, se extrajo el medio condicionado y se reemplazó el medio por otro que contiene suero libre de vesículas extracelulares (vesicle-free) y se estimuló nuevamente con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$ , dejando estas células incubando por otras 24 h. Se realizó el

mismo procedimiento de cambio de medio para las vesículas sin tratamiento. Luego, se obtuvo el sobrenadante y se centrifugó a 300 g y 4° C por 10 min para excluir células vivas, luego a 2000 g y 4° C por 10 min para deshacerse de células muertas y posteriormente, a 10,000 g por 30 min y 4° C para excluir microvesículas. Luego, se procedió a concentrar el medio extraído con filtros Amicon de 10 kDa. Finalmente, se purificaron las SEVs utilizando columnas de exclusión por tamaño (Izon). Brevemente, se comenzó a correr el buffer por la columna que en este caso es PBS (vehículo), para equilibrarla. Una vez equilibrada la columna la muestra se comenzó a correr por esta e inmediatamente se recolectaron las fracciones. A partir de los 3 mL de elución, comienzan a aparecer las SEVs. La fracción rica en SEVs se guardó a -80° C hasta su uso.

### 3.4. Extracción de proteínas y análisis de Western blot.

Las placas con las muestras se trataron con 60 µL de buffer de lisis RIPA. El homogenizado fue centrifugado a 12000 rpm a 4° C por 12 min y se extrajo el sobrenadante, descartando el pellet. La cuantificación de las proteínas se realizó por medio del método de Bradford y fueron separadas por SDS-PAGE con un gel al 8% y luego transferidas a una membrana de PVDF. Esta membrana fue bloqueada con una solución de leche al 5% con TBS 1x por 1 h. Luego, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario específico a 4° C durante la noche. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: ICAM-1, VCAM-1, eNOS, se utilizará β-Tubulina como control de carga (**Tabla 1**). Al día siguiente, se recuperó el anticuerpo primario y la membrana se lavó 3 veces durante 5 min con TBS 1x, para luego agregar el anticuerpo secundario apropiado, incubando la membrana por 1 h a temperatura ambiente. Luego de la incubación, la detección de la unión antígeno-anticuerpo fue realizada por medio de una reacción quimioluminiscente, y los blots fueron cuantificados por densitometría utilizando el programa UN-SCAN-IT.

Anticuerpos	Marca y código	Origen	MW (kDa)	Dilución
VCAM-1	Santa Cruz - sc-13160	Mouse	100	1:1000
ICAM-1	Santa Cruz - sc-8439	Mouse	90	1:1000
eNOS	BD - 610297	Mouse	120	1:1000
$\beta$ -Tubulina	Sigma - T-0198	Mouse	55	1:5000
Anti-mouse	Calbiochem - 402335	Rabbit		1:5000

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados para Western blot.** Anticuerpos con origen, peso molecular (MW) y dilución utilizada. VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular 1), ICAM-1 (Molécula de adhesión intracelular 1) eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial).

### 3.5. Análisis de IL-6 por ELISA.

Células HUVEC fueron tratadas por 24 h con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$ , posteriormente se obtuvo el medio y se procedió a realizar el análisis colorímetro por medio de kit de ELISA (RyD systems), según las instrucciones del fabricante.

### 3.6. Análisis de nanopartículas.

Para cuantificar y medir las SEVs, se realizó un análisis de nanopartículas usando una luz laser de 405 nm a un ángulo fijo a la suspensión de vesículas previamente extraída. Luego, la luz dispersa fue capturada utilizando un microscopio y una cámara de alta sensibilidad. La preparación de SEVs fue diluida en PBS y examinada utilizando Nanosight NS300 (Nanosigh Ltd), como se ha descrito previamente [35], a flujo constante.

### **3.7. Marcadores de vesículas extracelulares pequeñas.**

Para evaluar la presencia del marcador de superficie de CD81, se utilizó un kit de ELISA Human CD81 antigen de Cusabio (CSB-EL004960HU) para detectar la presencia de este marcador en la fracción rica en SEVs previamente aislada, según las instrucciones del fabricante.

### **3.8. Microscopia electrónica**

La visualización de los SEVs se realizó por microscopia electrónica en un microscopio de transmisión electrónica Talos F200C G2, luego de un protocolo de marcación con solución Uranylless. Brevemente, se coloca una gota de la muestra (aproximadamente 10  $\mu$ L) en una superficie hidrofóbica como Parafilm, luego con unas pinzas se coloca una rejilla recubierta con carbono formar en la gota por 1 minuto, secando con papel filtro. Luego se coloca la rejilla con la muestra en la solución Uranylless, se deja secar por 5 minutos y se observa la muestra en el microscopio.

### **3.9. Cultivo de cardiomiocitos e isquemia/reperfusión simulada.**

Se aislaron cardiomiocitos de rata neonata Sprague Dawley de 1-3 días de edad. Las células fueron previamente tratadas para descartar todas las células que no son cardiomiocitos y la fracción rica en cardiomiocitos fue plaqueada en placas de 24 pocillos que con gelatina 2% previamente agregada. Las células se incubaron en medio DMEM/M199 (4:1) con 10% (p/v) de SFB y 100 mM de bromodeoxirudina, 24 h antes de los experimentos. Para realizar la I/R, se utilizó un protocolo previamente descrito [54]. Brevemente, los cardiomiocitos de rata neonata se incubaron en una solución que simula el ambiente isquémico, la cual corresponde a una mezcla de NaCl (139 mM), KCl (12 mM), MgCl<sub>2</sub> (0,5 mM), CaCl<sub>2</sub> (1,3 mM), HEPES (5 mM), 2-

desoxi-D-glucosa (10 mM), y ácido láctico (20 mM), pH 6.2. Luego de reemplazar el medio por el buffer de isquemia, las células fueron incubadas en una cámara hipóxica bajo 95% nitrógeno, 1%  $O_2$  y 5% de  $CO_2$  a 37 °C por 6 h. Se inició la reperfusión cambiando la solución isquémica a DMEM/M199 (4:1 suplementado con 10% (p/v) de SFB. Luego, las células se incubaron por 16-18 h en 95%  $O_2$  y 5%  $CO_2$ . Se realizaron controles con un procedimiento similar, pero con una solución distinta: HEPES (5 mM), D-glucosa (23 mM), NaCl (139 mM), KCl (4,7 mM),  $MgCl_2$  (0,5 mM),  $CaCl_2$  (1,3 mM), pH 7,4 en 95%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ , para luego ser reperfundidas con medio de mantención (MM) 10% SFB. Para medir la muerte celular por necrosis, se determinó la liberación de LDH utilizando un kit colorimétrico (PROMEGA-G1781), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

### 3.10. Modelo *ex vivo* de isquemia/reperfusión global.

Ratones macho C57BL/6, de 8-12 semanas, fueron anestesiados con pentobarbital 60 mg/kg + heparina 100 UI por vía intraperitoneal. Una vez comprobado el plano anestésico por pérdida del reflejo pedal, se realizó una toracotomía. Los corazones fueron rápidamente extraídos para canular la arteria aorta ascendente y montados en un sistema de Langendorff a 37° C y perfundidos con una solución tampón Krebs que contiene: NaCl (118,3 mM), KCl (4,7 mM),  $CaCl_2$  (1,84 mM),  $NaHCO_3$  (25 mM),  $KH_2PO_4$  (1,21 mM),  $MgSO_4$  (1,22 mM) y glucosa (11 mM) a pH 7,4 a 37° C, al equilibrarse con una mezcla de 95%  $O_2$  y 5%  $CO_2$ . Luego, se sometió a un periodo de estabilización de 20 minutos en donde se debe mantener una presión de perfusión entre 60-90 mmHg. Pasado el tiempo de estabilización, se administraron las SEVs durante 10 min a una concentración de  $10^8$  partículas/mL, seguidos de 35 min de isquemia en la que se corta la perfusión del tampón Krebs y 2 h de reperfusión, según la técnica ya descrita [55]. Se evaluaron las siguientes condiciones experimentales: **1)** I/R **2)** I/R + cSEVs **3)** I/R + aSEVs. La presión de perfusión se registró continuamente durante todo el período experimental. Los datos

recogidos se guardaron y analizaron en un utilizando el software PowerLab (ML866 ADInstruments, Australia).

### 3.11. Medición de tamaño de infarto.

Al final de la reperusión, los corazones fueron perfundidos con una solución de cloruro de trifeniltetrazolio al 1% (Sigma) en PBS pH 7.4 a 37° C durante 10 min. Luego, los corazones fueron congelados a -20° C para posteriormente ser cortados en 5 rebanadas, las cuales se dejaron en una solución de paraformaldehído al 10% hasta el día siguiente. Finalmente, las rebanadas se montan sobre un cubreobjeto de forma ordenada de acuerdo con la forma del corazón, son escaneados y finalmente se mide el tamaño del infarto mediante planimetría utilizando el programa Image J.

### 3.12. Análisis estadístico.

Para comparación de dos grupos de datos, se utilizó la prueba Mann-Whitney. En el caso del experimento *ex vivo* en corazón de rata adulta se utilizó un ANOVA test de una vía, seguido de una comparación múltiple de Tukey. Los datos fueron presentados con promedio  $\pm$  SD. Se consideraron diferencias significativas para  $p < 0.05$ .  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*),  $P < 0,001$  (\*\*\*)

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Resultados del Objetivo N°1

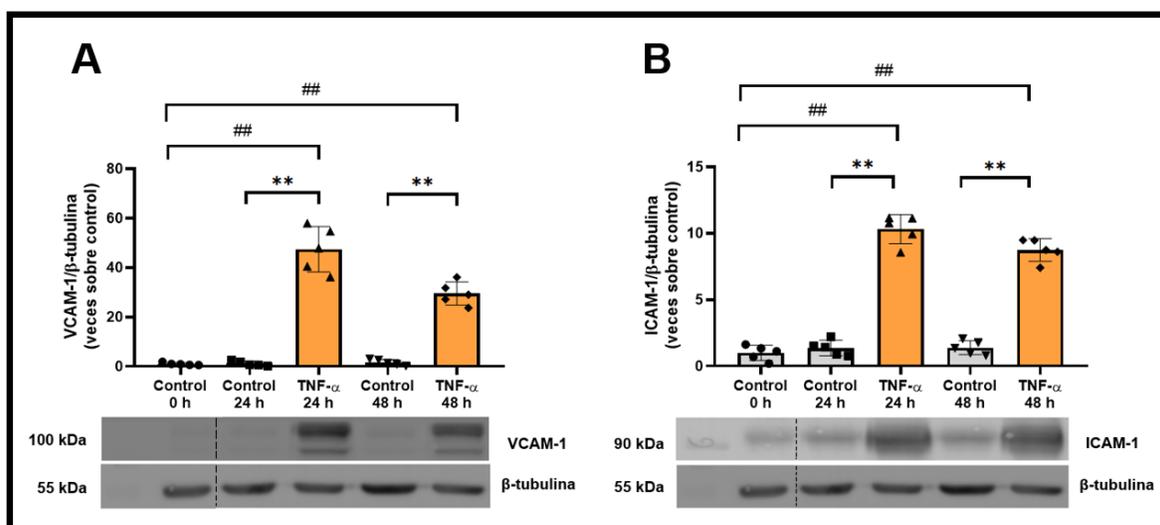
**“Evaluar el efecto de la activación endotelial mediada por TNF- $\alpha$  en la concentración y tamaño de las vesículas extracelulares pequeñas secretadas por células endoteliales.”**

Primero se debe observar si existe algún cambio en cuanto a la concentración, tamaño o morfología de las vesículas extracelulares pequeñas (SEVs por sus siglas en inglés) tratados con TNF- $\alpha$  al compararlos con las vesículas extracelulares pequeñas controles de endotelio no activado (cSEVs). Para esto, se debe asegurar que el endotelio se encuentre activado, mediante la cuantificación de proteínas de adhesión celular como ICAM-1 y VCAM-1 además de la proteína eNOS. Luego se deben aislar y caracterizar fracciones ricas en SEVs, tanto de endotelio no tratado (cSEVs) como de endotelio tratado con TNF- $\alpha$  (aSEVs) para luego evaluar si existen diferencias entre estos.

#### 4.1.1. Validación de modelo HUVEC de activación endotelial.

En primer lugar, se evaluó si TNF- $\alpha$  produce activación endotelial [45]. Para este fin, se utilizaron células HUVEC, las cuales fueron tratadas con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  y se evaluó la síntesis de moléculas de adhesión celular VCAM-1 e ICAM-1 a las 24 y 48 h por medio de análisis de Western blot. La **Figura 2** muestra el patrón de expresión de ICAM-1 y VCAM-1. Como control de carga se utilizó  $\beta$ -Tubulina y como control se utilizó el vehículo de TNF- $\alpha$ , que corresponde a PBS + Albumina de suero bovino (BSA) al 5%. Se puede observar que, a las 24 y 48 h, existe un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 de manera estadísticamente significativa con respecto a sus controles, así como al control a las 0 h. Esto mismo se puede corroborar al comparar la expresión de ambas moléculas

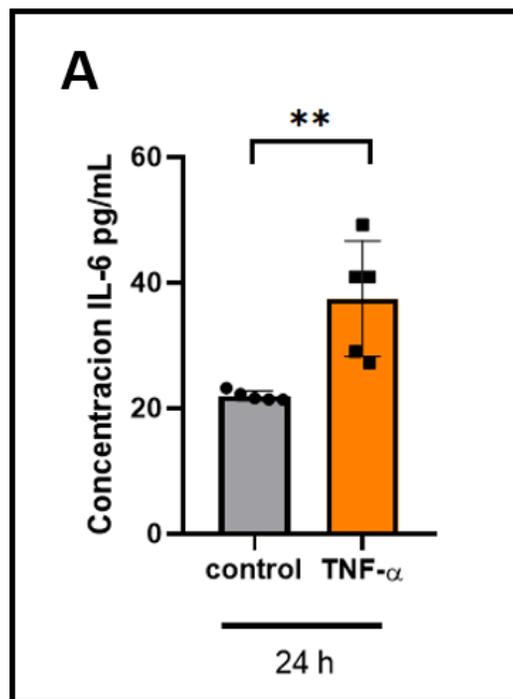
con sus Western-blots representativos, en donde podemos observar el mismo patrón de cambio tanto para VCAM-1 (**Figura 2A**) como ICAM-1 (**Figura 2B**) en donde se ve un aumento claro de estas proteínas a las 24 y 48 h tanto con respecto a sus respectivos controles de tiempo y al control 0 h.



**Figura 2: Efecto de TNF- $\alpha$  en los niveles proteicos de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1.** Células HUVEC fueron tratadas con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  para evaluación de expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 durante 24 y 48 h por medio de Western blot. Se representa por veces de cambio de VCAM-1 o ICAM-1 sobre el control de carga  $\beta$ -Tubulina. Como control se utilizaron células HUVEC tratadas con vehículo (PBS+BSA 5%). **A.** Análisis densitométrico de VCAM-1 a las 0, 24 y 48 h en veces de cambio sobre control de carga. **B.** Análisis densitométrico de ICAM-1 a las 0, 24 y 48 h en veces de cambio sobre control de carga. Análisis estadístico: para la significancia se utilizó test de Mann-Whitney para datos no paramétricos;  $P < 0,01$  (\*\*), vs control 24 o 48 h,  $P < 0,01$  (##) vs control 0 horas. Promedio  $\pm$  SD, N=5.

#### 4.1.2. Expresión de Interleuquina 6.

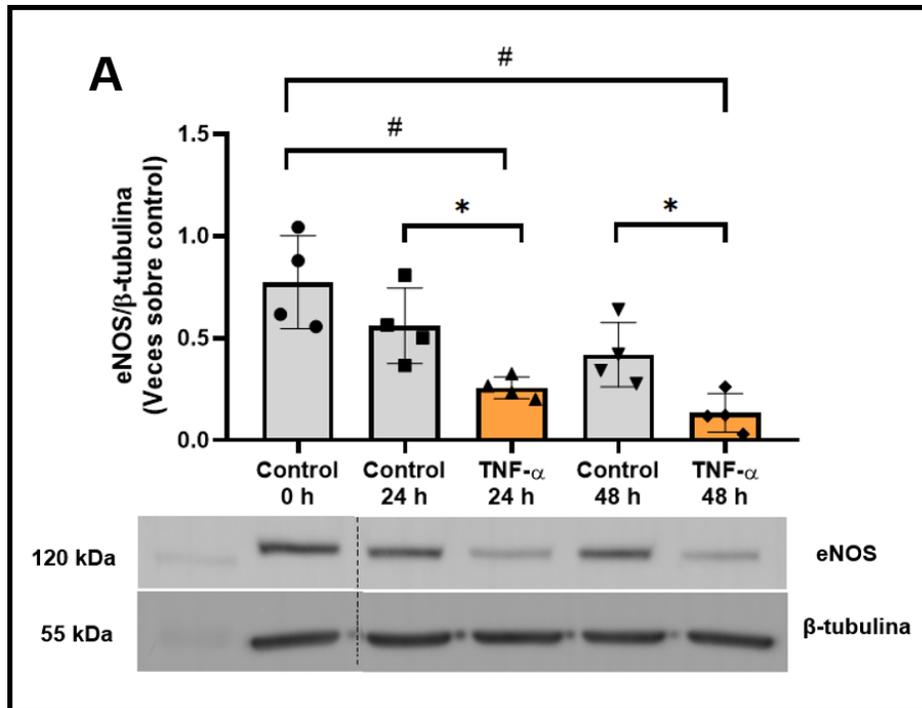
IL-6 es una citoquina presente en mecanismos de inflamación aguda, así como de inflamación crónica [56], su activación mediante TNF- $\alpha$  por células endoteliales está relacionada con activación endotelial [57]. Es por esta razón que se midió su presencia en el medio usando un ensayo de colorimetría por ELISA. Para esto, se utilizó el sobrenadante de células HUVEC que fueron tratadas con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  o con su vehículo (PBS+BSA 5%) como control durante 24 h. En la **Figura 3** se observa una diferencia significativa entre el control y el estímulo con TNF- $\alpha$ , mostrando la presencia de esta citoquina.



**Figura 3: Efecto de TNF- $\alpha$  en la secreción de interleuquina 6 (IL-6) en células HUVEC.** Células HUVEC se estimularon con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  o con vehículo (PBS+BSA %5) como control por 24 h, luego se recolecta el sobrenadante para ser evaluado. **A.** Niveles de IL-6 en sobrenadante de células HUVEC estimuladas con TNF- $\alpha$  o control por 24 h. Análisis estadístico: para significancia se utilizó test Mann-Whitney para datos no paramétricos;  $P < 0,01$  (\*\*) vs control, Promedio +/- SD, N=5.

#### 4.1.3. Disminución de eNOS en presencia de TNF- $\alpha$ .

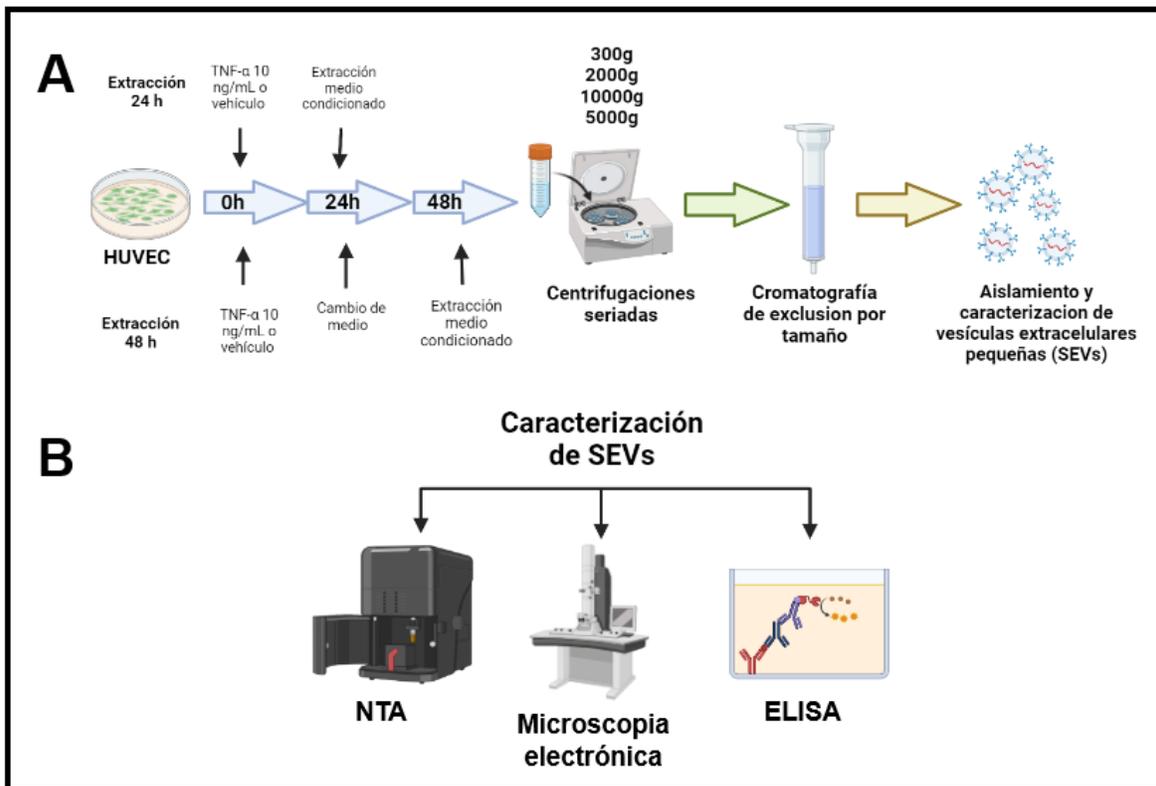
La eNOS es un factor muy importante en la función de células endoteliales, regulando la vasodilatación del endotelio vascular. Estímulos como TNF- $\alpha$  disminuyen su expresión, lo que genera una menor capacidad vasodilatadora, lo que a su vez induce disfunción endotelial [51], [53]. Por esta razón, se evaluó su variación en el tiempo en células HUVEC. Para esto, HUVEC fueron estimuladas con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  durante 24 y 48 h y se evaluó su contenido proteico mediante Western blot. Se puede observar en la **Figura 4** que, a las 24 y 48 h, existe una disminución de esta proteína de manera estadísticamente significativa al comparar con sus respectivos controles de tiempo, así como con el control a las 0 h. Esto puede ser corroborado con el Western-Blot representativo en donde se observa el mismo patrón de expresión que el análisis densitométrico en donde se disminuye la expresión de eNOS a las 24 y 48 h.



**Figura 4: Efecto de TNF- $\alpha$  en los niveles proteicos de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).** Células HUVEC fueron tratadas con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  para evaluación de la expresión de eNOS durante 24 y 48 h por medio de Western blot. Se representa por veces de cambio de eNOS sobre el control de carga  $\beta$ -tubulina. Como control se utilizaron células HUVEC tratadas con vehículo (PBS+BSA 5%). **A.** Análisis densitométrico de eNOS a las 0, 24 y 48 h en veces de cambio sobre control de carga. Análisis estadístico: para la significancia se utilizó test Mann-Whitney para datos no paramétricos;  $P < 0,05$  (\*) vs control 24 y 48 h,  $P < 0,05$  (#) vs control 0 horas. Promedio  $\pm$  SD, N=4.

#### 4.1.4. Obtención de fracción rica en vesículas extracelulares pequeñas.

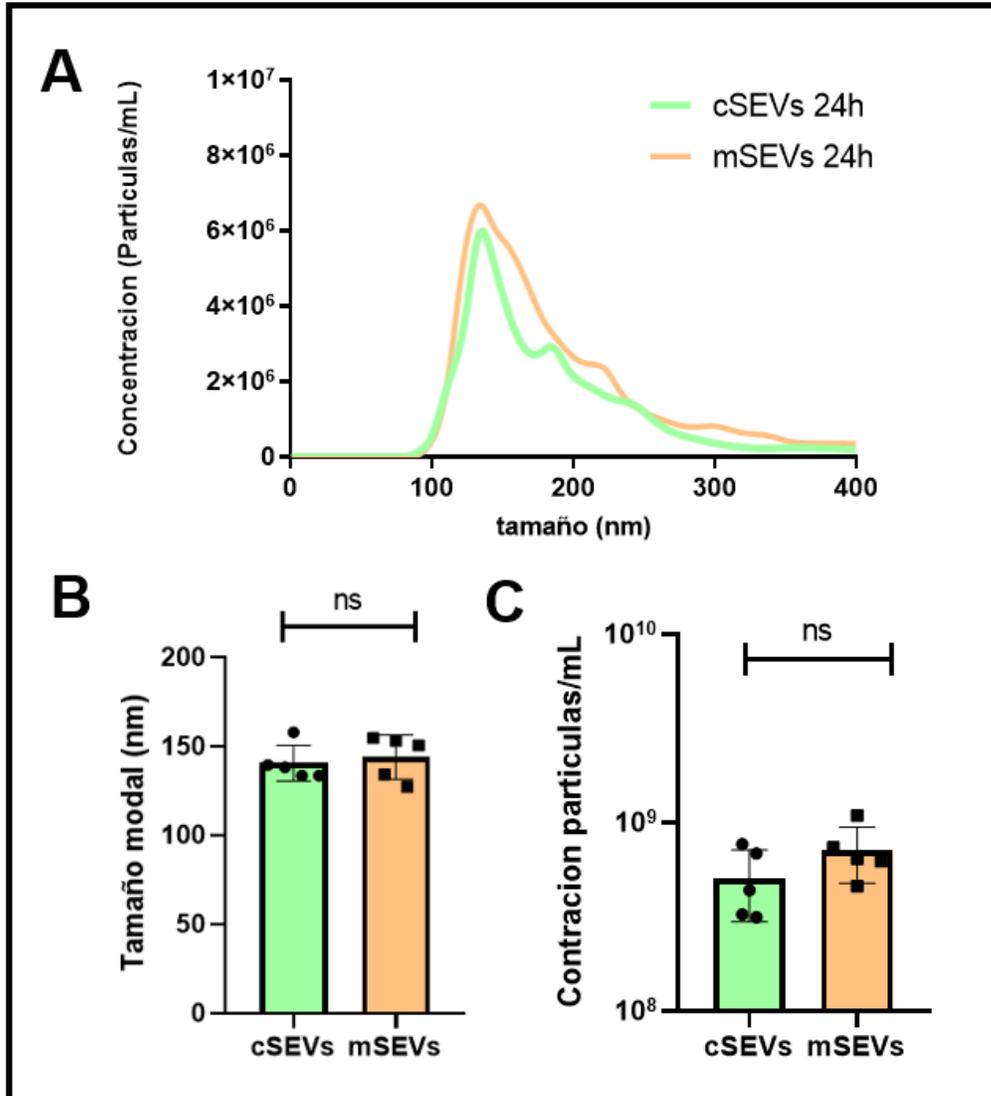
Una vez establecido el modelo de activación endotelial, se procedió a obtener las SEVs tanto de endotelio activado por TNF- $\alpha$  (aSEVs) como de endotelio control (cSEVs) extraídas a las 24 o 48 h desde la activación endotelial. Se empleó el protocolo de aislamiento descrito en la **Figura 5A**, en el que las SEVs son obtenidas a partir del medio de células HUVEC estimuladas con TNF- $\alpha$  o con su vehículo (PBS+BSA 5%). En primer lugar, el medio celular obtenido es sometido a centrifugaciones a diferentes velocidades para eliminar células vivas (300 g), células muertas (2000 g) y microvesículas (10000 g) y finalmente, para concentrar la muestra (5000 g). Luego, las SEVs son obtenidas a partir de cromatografía de exclusión por tamaño, en donde se separan las distintas moléculas y vesículas que pueden eluir en diferentes fracciones. En la **Figura 5B**, se observan las metodologías empleadas de caracterización de la fracción rica en SEVs, como *Nanoparticle Tracking analysis* (NTA) para evaluar tamaño y concentración de vesículas, la microscopía electrónica para evaluar presencia e integridad en la membrana de las vesículas, y el ensayo de ELISA para evaluar marcador de superficie de SEVs, CD81 [27].



**Figura 5: Diagrama de obtención y caracterización de vesículas extracelulares pequeñas.** **A.** Diagrama general de obtención de vesículas extracelulares pequeñas (SEVs) a partir de células HUVEC estimuladas con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  (aSEVs) o vehículo (cSEVs) extraídas a las 24 o 48 h posterior a la activación endotelial. **B.** Técnicas utilizadas en la caracterización de SEVs; *nanoparticle tracking analysis* (NTA), microscopía electrónica y la detección de marcadores por medio de ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

#### 4.1.5. Concentración y tamaño de fracción rica en SEVs de 24 h por *nanoparticle tracking analysis* (NTA).

Inicialmente, como se ve en el protocolo de la **Figura 5A**, se estimularon células HUVEC durante 24 h con TNF- $\alpha$  o su vehículo. Se extrajo este medio condicionado y se realizó el protocolo de aislamiento. Una vez obtenida la fracción de SEVs, se realizó su posterior caracterización, a través de NTA, una técnica que combina un microscopio junto con un láser y una cámara que permite la visualización y el seguimiento de nanopartículas individuales entre 30 y 1000 nm en una solución [58]. Esta técnica permite evaluar el tamaño y la concentración de nanopartículas como lo son las SEVs. Es importante mencionar que al momento de extraer las SEVs secretadas por células HUVEC estimuladas con TNF- $\alpha$ , estas no son provenientes en su totalidad de endotelio activado, sino más bien una mezcla entre endotelio que aún no se activa por completo y endotelio que se está activando hasta completar 24 h de estímulo. Por este motivo, a estas vesículas obtenidas se les denominó mezcla de SEVs (mSEVs) y a las vesículas que fueron estimuladas con vehículo por 24 h se les llamo SEVs control (cSEVs). La **Figura 6A** se presenta un gráfico de distribución de tamaño y concentración de cSEVs y mSEVs a las 24 h de extracción, observándose que el pico de la distribución modal de las partículas se encuentra en el rango de tamaño entre 100 y 200 nanómetros (nm). En la **Figura 6B**, se observa el tamaño modal de cSEVs como de mSEVs a las 24 h de extracción, sin observarse diferencias significativas entre ambos grupos. La **Figura 6C** muestra la concentración promedio de cSEVs como de mSEVs a las 24 h de extracción, sin observarse diferencias significativas entre ambas condiciones.

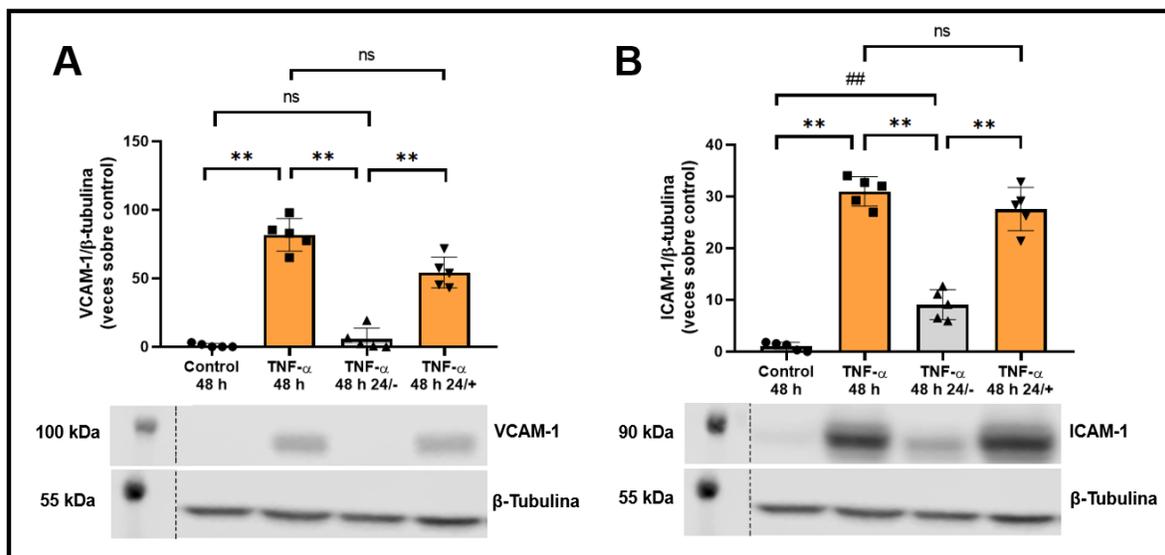


**Figura 6: Distribución, Tamaño modal y concentración de vesículas extracelulares pequeñas a las 24 h de la activación endotelial.** Distribución, tamaño modal y concentración de vesículas extracelulares pequeñas (SEVs) secretados por células HUVEC tras 24 h de tratamiento con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  (mSEVs) o control, vehículo (cSEVs), obtenidos a través de *nanoparticle tracking analysis* NTA. **A.** Distribución de tamaño (nm) y concentración (partículas/mL) de cSEVs y mSEVs. **B.** Tamaño modal en nanómetros (nm) de cSEVs y mSEVs a las 24 h desde la activación endotelial. **C.** Concentración de partículas/mL de cSEVs y mSEVs a las 24 h de la activación endotelial. Análisis estadístico: para la significancia se utilizó una prueba de Mann-Whitney para datos no paramétricos; Promedio  $\pm$  SD, N=5.

#### 4.1.6. Verificación de estado de activación endotelial luego de cambio de medio en células HUVEC.

Para asegurar que todas las SEVs son obtenidas a partir de endotelio activado por TNF- $\alpha$  y no una mezcla entre endotelio activado y endotelio que aún no se activa, como lo es en el caso de mSEVs, tras 24 h de estimulación con TNF- $\alpha$  se realizó un cambio medio por un medio libre de vesículas extracelulares (vesicle-free) y se incubaron las células en este medio por otras 24 h (TNF- $\alpha$  48 h 24/-). Esto permite eliminar cualquier vesícula que no sea exclusivamente de endotelio activado, ya que como se mostró mediante Western blot en la **Figura 2** y **Figura 4**, tanto el aumento de VCAM-1 como de ICAM-1 se mantiene a las 48 h, además de la disminución de eNOS. Adicionalmente, este experimento permite descartar la acción directa de TNF- $\alpha$  en los experimentos funcionales en tejido cardiaco, ya que esta citoquina no estaría presente en el medio. Sin embargo, existe la posibilidad de que al retirar el medio con TNF- $\alpha$  en él, este deje de ejercer su efecto sobre las células HUVEC, lo que eliminaría la activación endotelial. Es por esto que se incluyó una condición en la que, luego de cambiar el medio, se realizó una re-estimulación con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  en las células HUVEC (TNF- $\alpha$  48 h 24/+) y se procedió a evaluar la expresión de VCAM-1 e ICAM-1. Como control, se incubaron células HUVEC por 48 h sin estimular (control 48 h) y un control a las 48 h con células HUVEC estimuladas con 10ng/mL de TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  48 h), en ambas condiciones experimentales. El análisis densitométrico tanto en la **Figura 7A**, como en la **Figura 7B** muestra un aumento de la expresión tanto de VCAM-1 como de ICAM-1 en los carriles TNF- $\alpha$  48 h, en comparación con Control 48 h. Al realizar el cambio de medio a las 24 h sin re-estimulación con TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  48 h 24/-), se observa una disminución en la expresión tanto de VCAM-1 como de ICAM-1 con respecto a TNF- $\alpha$  48 h. La comparación entre TNF- $\alpha$  48 h 24/- y el Control 48 h muestra que en el caso de VCAM-1, esta disminución es similar entre ambas señales. Sin embargo, se puede observar que en el caso de ICAM-1 hay una reducción, mas no una pérdida total la expresión de esta proteína, comparada contra TNF- $\alpha$  48 h. En ambos casos, al

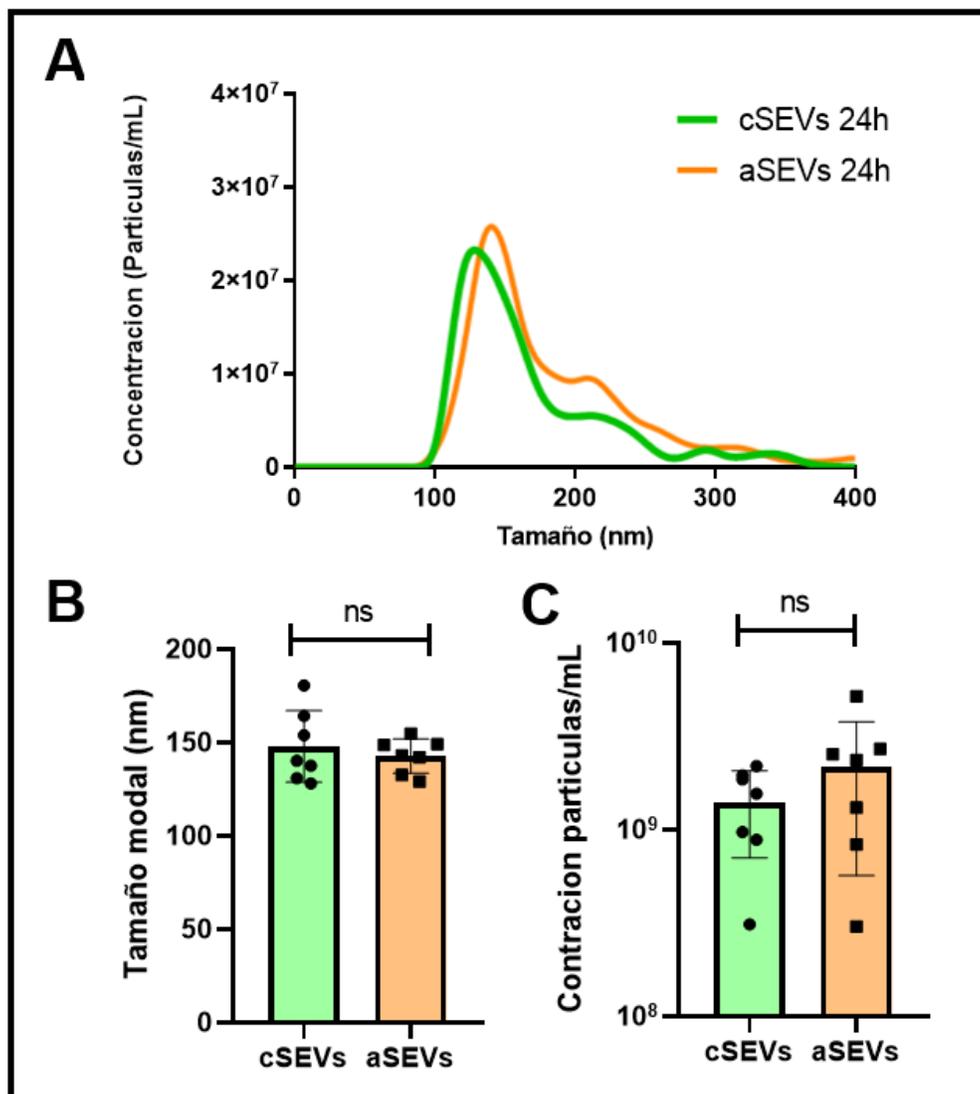
realizar el cambio de medio a las 24 h, pero re-estimulando con TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  48 h 24/+), se observa una recuperación de la señal de ambas proteínas, en comparación con TNF- $\alpha$  48 h 24/-, esta diferencia significativa es similar a lo que ocurre con TNF- $\alpha$  48 h al compararlo con TNF- $\alpha$  48 h 24/- y Control 48 h. Por lo tanto, los resultados revelan la necesidad de realizar la re-estimulación con TNF- $\alpha$ , de manera tal de garantizar el estado de activación endotelial al momento de aislar SEVs.



**Figura 7: Estado de activación endotelial en células HUVEC luego de cambio de medio tras 24 h de estimulación:** Expresión de moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 al realizar cambio de medio en células de endotelio control y activado. Como controles de estimulación, células HUVEC fueron estimuladas por 48 h con vehículo (PBS+BSA 5%, control 48 h) o con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  48 h). Para evaluación de estado de activación endotelial, células estimuladas con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  por 24 h se les realizó cambio de medio sin y con re-estimulación de 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  y se volvieron a cultivar por otras 24 h (TNF- $\alpha$  48 h 24/-, 24/+). Como control de carga se utilizó  $\beta$ -Tubulina. **A.** Análisis densimétrico de VCAM-1 representado en veces de cambio sobre control de carga. **B.** Análisis densimétrico de ICAM-1 representado en veces de cambio sobre control de carga. Análisis estadístico; para la significancia se utilizó test Mann-Whitney para datos no paramétricos. P < 0,01 (\*\*) vs control 48 h o TNF- $\alpha$  48 h 24/-, P < 0,01 (##) control 48 h vs TNF- $\alpha$  48 h 24/-, Promedio +/- SD, N=5.

#### 4.1.7. Concentración y tamaño de fracción rica en SEVs por *nanoparticle tracking analysis* (NTA) tras cambio de medio y re-estimulación con TNF- $\alpha$ a las 24 h.

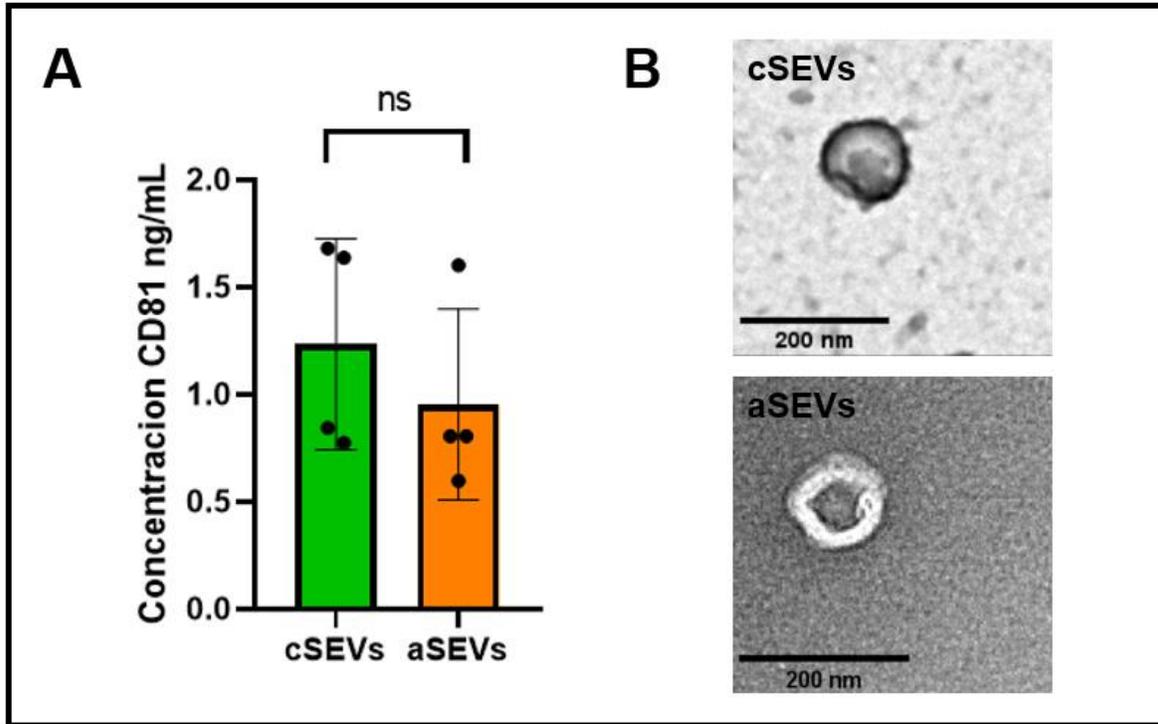
Luego de establecer que el cambio de medio en efecto reduce la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 y que, por lo tanto, es necesario estimular nuevamente con TNF- $\alpha$  para que se mantenga la activación endotelial, se procedió a realizar el protocolo de cambio de medio y re-estimulación con TNF- $\alpha$  descrito en la **Figura 5A**, seguido del aislamiento de SEVs. Para los siguientes experimentos se utilizó el protocolo de cambio de medio y re-estímulo para las vesículas a utilizar, es decir, vesículas de células HUVEC estimuladas con vehículo por 24 h luego del cambio de medio se llamarán cSEVs y las vesículas estimuladas por 24 h con TNF- $\alpha$  desde el cambio de medio se llamarán aSEVs. En la **Figura 8A** se presenta la distribución de tamaño y concentración tanto de cSEVs como de aSEVs tras 24 h desde el cambio de medio y posterior re-estímulo con vehículo o TNF- $\alpha$ , respectivamente. Se observa un tamaño que varía entre los 100 y 200 nm. En la **Figura 8B** se observa el tamaño modal tanto de cSEVs como de aSEVs, en los que no se observan diferencias significativas entre ambos grupos. Finalmente, en la **Figura 8C** se representa la concentración promedio de cSEVs y aSEVs, en los que no se observan diferencias entre ambos grupos.



**Figura 8: Distribución, tamaño modal y concentración de vesículas extracelulares pequeñas a las 24 h de la activación endotelial.** Distribución, tamaño modal y concentración de vesículas extracelulares pequeñas (SEVs) secretados por células HUVEC tras 24 h de tratamiento con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  o control, seguido de cambio de medio vesicle-free con re-estimulo de TNF- $\alpha$  (aSEVs) o vehículo (cSEVs), obtenidos a través de *nanoparticle tracking analysis* NTA. **A.** Distribución de tamaño (nm) y concentración (partículas/mL) de cSEVs y aSEVs. **B.** Gráfico de tamaño modal en nanómetros (nm) de cSEVs y aSEVs a las 24 h desde el cambio de medio y re-estimulación con TNF- $\alpha$  o vehículo. **C.** Gráfico de concentración en partículas/mL de cSEVs y mSEVs a las 24 h desde el cambio de medio y re-estimulación con TNF- $\alpha$  o vehículo. Análisis estadístico: Para ver distribución de datos se utilizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Tamaño modal (nm) y concentración (partículas/mL) de SEVs presentan distribución normal, para significancia se utilizó un T-test para datos paramétricos. Promedio +/- SD, N=7.

#### 4.1.8. Determinación de CD81 y visualización de SEVs por microscopia electrónica.

Los SEVs pueden presentar varios marcadores de superficie que los diferencian de otras vesículas extracelulares. Una de estas moléculas corresponde a la tetraspaninas CD81, la cual es ampliamente usada en la caracterización de SEVs como lo son los exosomas [27]. Se evaluó la presencia de la tetraspaninas CD81, tanto en cSEVs como en aSEVs, por medio de la técnica ELISA. Como se observa en la **Figura 9A**, tanto en cSEVs como en aSEVs se detecta la tetraspanina CD81 en concentraciones de ng/mL, sin diferencias significativas entre ambas. Mediante microscopia electrónica, se pudo visualizar las vesículas. Estas presentan la forma característica de *cup shape* o forma cóncava, producto del protocolo por el cual se realiza la microscopia electrónica [59]. Como se muestra en la **Figura 9B**, tanto en cSEVs como en aSEVs se observa la forma característica de SEVs. Adicionalmente, no se observa daño a la integridad de la membrana y presentan el tamaño descrito en la literatura para este tipo de vesículas menor a 200 nm [40].



**Figura 9: Detección de CD81 y determinación de presencia de SEVs por microscopía electrónica. A.** Concentración de CD81 en ng/mL en vesículas extracelulares pequeñas (SEVs) secretados por células HUVEC tras 24 h de estimulación con TNF- $\alpha$  o vehículo, seguido de cambio de medio por vesicle-free más re-estimulación con 10 ng/mL TNF- $\alpha$  (aSEVs) o control (cSEVs) detectado por ELISA. Análisis estadístico: datos presentan distribución normal (Shapiro-Wilk), para significancia se aplicó un T-test para datos paramétricos; Promedio  $\pm$  SD, N=4. **B.** Presencia de SEVs detectadas por microscopía electrónica, pertenecientes a un tamaño menor a 200 nm.

## 4.2. Resultados del Objetivo N°2

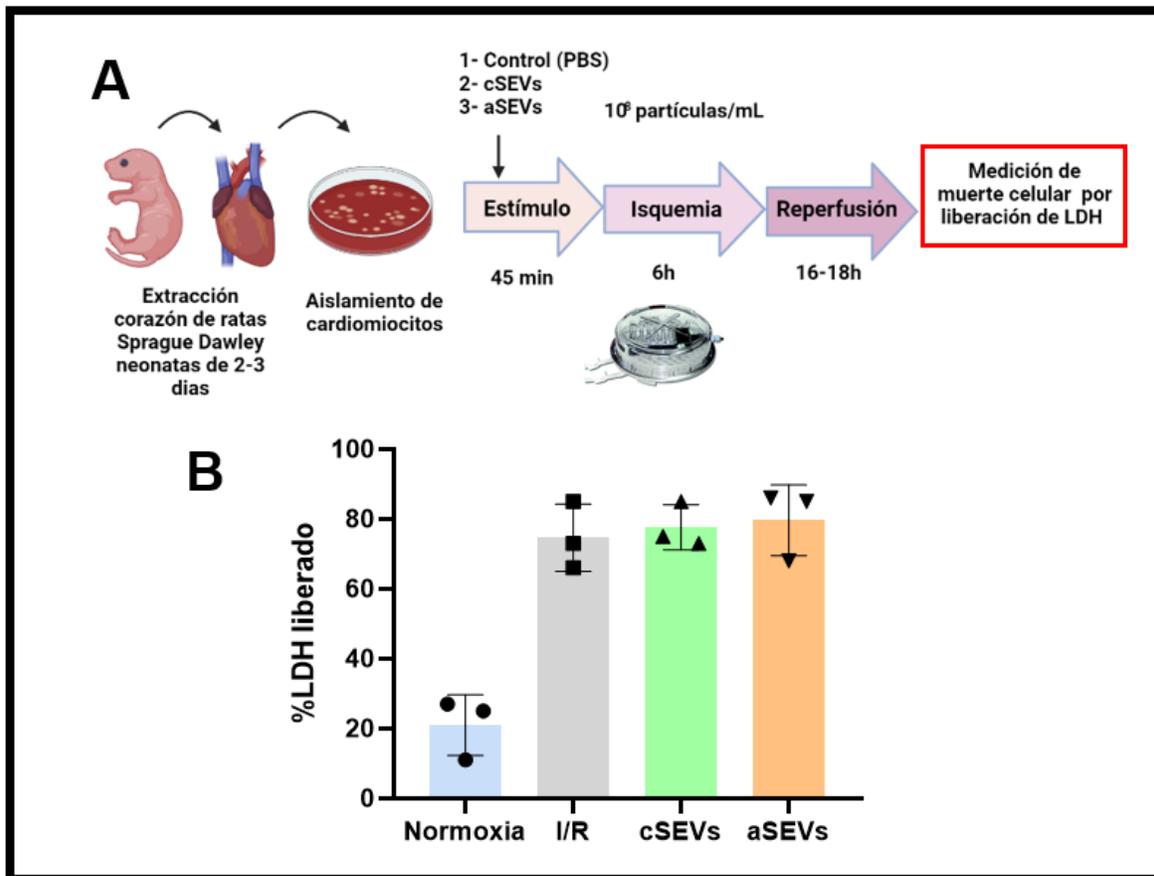
**“Determinar *in vitro* y *ex vivo* si las vesículas extracelulares pequeñas secretadas por células endoteliales tratadas con TNF- $\alpha$  pierden su efecto protector frente al daño por isquemia/reperfusión.”**

Para evaluar si las aSEVs pierden la capacidad de proteger de la muerte celular en un modelo *in vitro* de cardiomiocitos de rata neonata y en un modelo *ex vivo* de corazón de ratón adulto, primero se deben aislar cardiomiocitos de rata neonata para que sean sometidos a I/R simulada, los cuales serán estimulados tanto con cSEVs como aSEVs para ver si existe aumento o disminución de la muerte celular frente a este daño. Además, se aislarán corazones de ratón adulto y serán montados en un sistema de Langendorff, perfundiendo ambas SEVs y posteriormente, se procederá a realizar una I/R global, para finalmente evaluar el tamaño del infarto.

### 4.2.1. Efecto del pre-condicionamiento de vesículas extracelulares pequeñas aisladas de células HUVEC tratadas con TNF- $\alpha$ en cardiomiocitos de rata neonata sometidos a isquemia/reperfusión simulada.

Las SEVs de células endoteliales han demostrado proteger contra el daño por isquemia/reperfusión en un modelo *in vitro* de cardiomiocitos de rata adulta [34], [60]. Para evaluar el efecto de cSEVs y aSEVs, se utilizó un modelo *in vitro* de cardiomiocitos de rata neonata sometidos a isquemia/reperfusión (IR). En la **Figura 10A** se presenta el esquema general del protocolo realizado. Los cardiomiocitos de rata neonata fueron pre-tratados con  $10^8$  SEVs durante 45 minutos y posteriormente fueron sometidos a 6 h de isquemia, seguido a 16-18 horas de reperfusión. La

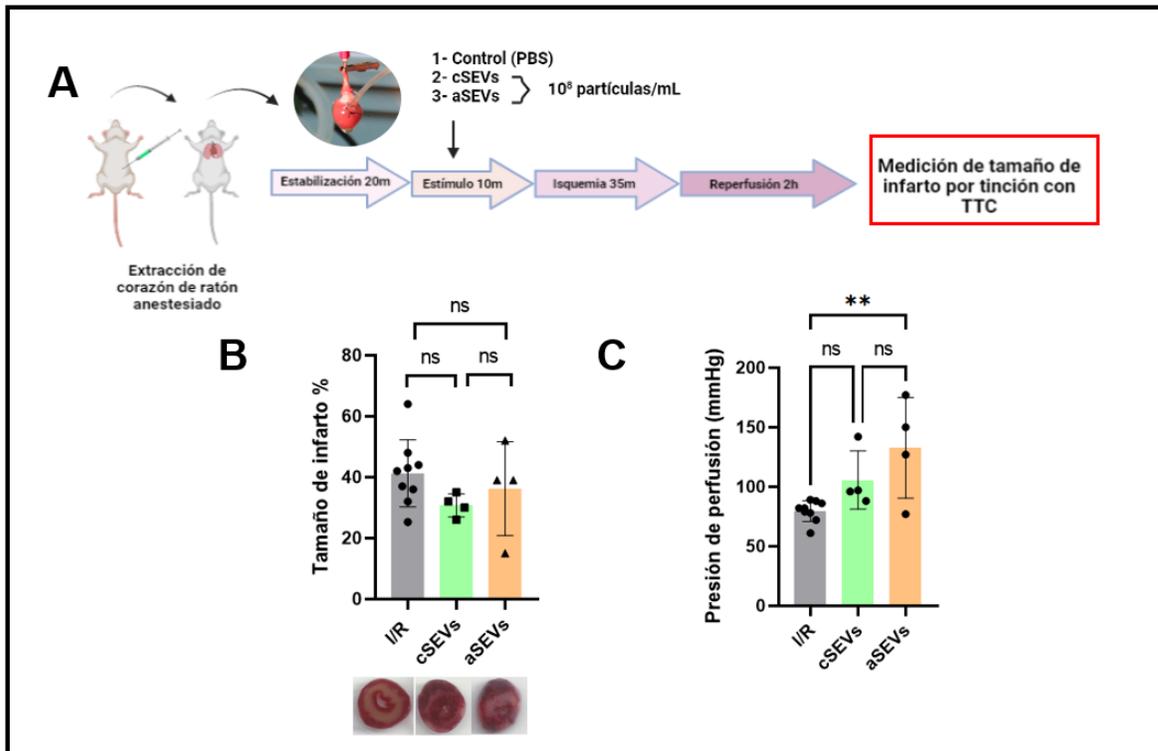
muerte celular fue determinada mediante un ensayo de LDH. En la **Figura 10B** se presenta el gráfico de porcentaje de liberación de LDH y se puede observar que la muerte celular en normoxia ronda el 20%, mientras que tanto I/R como I/R + cSEVs e I/R + aSEVs presentan una muerte celular cercana al 80%. No se realizó estadística debido a la falta de datos (n=3).



**Figura 10: Modelo *in vitro* de isquemia/reperfusión simulada de cardiomiocitos de rata neonata pre-condicionados con vesículas extracelulares pequeñas secretadas por endotelio control y endotelio activado: A.** Diagrama representativo que se utilizó para el aislamiento de cardiomiocitos de rata neonata y el protocolo utilizado para el pre-condicionamiento con las vesículas extracelulares pequeñas de endotelio control (cSEVs) y de endotelio activado (aSEVs), posterior isquemia/reperfusión y medición de muerte celular por liberación de LDH. **B.** Gráfico de porcentaje de LDH liberado en cardiomiocitos de rata neonata controles de normoxia e I/R y en cardiomiocitos de rata neonata pre-condicionados con cSEVs y aSEVs sometidos a I/R. Promedio +/- SD. N=3

#### 4.2.2. Determinación de tamaño de infarto de corazón de ratón adulto sometido a isquemia/reperfusión global pre-condicionado con vesículas extracelulares pequeñas aisladas de células HUVEC tratadas con TNF- $\alpha$ .

Para evaluar el efecto de cSEVs y aSEVs en infarto del miocardio, se utilizó un modelo de I/R global. Como se observa en la **Figura 11A**, se generó un protocolo de aislamiento de corazón aislado de ratón adulto, en el que posterior a un periodo de estabilización de 20 minutos, se realizó un pre-tratamiento durante 10 minutos con  $10^8$  de cSEVs y aSEVs, seguido de una isquemia global de 35 min y una reperfusión de 2 h. Adicionalmente, se realizó una condición control que fue sometida a infarto, sin tratamiento con SEVs. El tamaño de infarto fue determinado mediante tinción con cloruro de trifeniltetrazolio. En la **Figura 11B** se puede observar el porcentaje de tamaño de infarto de los corazones de ratón adulto sometidos a I/R global pre-condicionados con cSEVs y aSEVs. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas, tanto en los corazones controles como en los corazones pre-condicionados con cSEVs y aSEVs. En la **Figura 11C** se muestra la presión de perfusión representada en mmHg, tanto de corazones controles, como de corazones pre-condicionados con cSEVs y aSEVs. Los datos muestran una diferencia significativa entre los corazones controles y los corazones tratados con aSEVs, indicando que existe una mayor presión de perfusión en estos corazones.



**Figura 11: Modelo ex vivo de perfusión de corazón aislado Langendorff pre-condicionado con vesículas extracelulares pequeñas secretadas por endotelio control y endotelio activado.** **A.** Diagrama representativo del protocolo en sistema de Langendorff utilizado para el aislamiento del corazón de ratón adulto. Primero se anestesia el ratón con pentobarbital y se realiza una toracotomía para extraer el corazón. Luego, rápidamente se cánula en el sistema de Langendorff, se procede a estabilizar el corazón por 20 min. Posteriormente, se administra un pre-tratamiento con  $10^8$ /mL de vesículas extracelulares pequeñas de endotelio control (cSEVs) y de endotelio activado (aSEVs), seguido de 35 min de isquemia global y 120 min de reperusión y determinación del tamaño de infarto mediante tinción con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC). **B.** Porcentaje de tamaño de infarto e imagen representativa de corazones sometidos a I/R controles y pre-tratados con cSEVs y aSEVs. **C.** Presión de perfusión de corazones de ratón adulto obtenidos en el sistema de Langendorff en corazones I/R controles y pre-condicionados con cSEVs y aSEVs. Análisis estadístico: datos presentan distribución normal (Shapiro-Wilk), para la significancia se utilizó ANOVA de una vía seguido de un post-test Tukey;  $P < 0,01$  (\*\*), vs I/R. Promedio  $\pm$  SD, I/R N=9, cSEVs N=4, aSEVs N=4.

## 5. DISCUSIÓN

El presente estudio mostró que la estimulación de células HUVEC con TNF- $\alpha$  indujo la expresión de marcadores proinflamatorios VCAM-1, ICAM-1, IL-6 y redujo el contenido proteico de eNOS. Este estado proinflamatorio no afectó la concentración, tamaño o expresión de CD81 en las SEVs aisladas de células endoteliales, adicionalmente presentaban la forma y tamaño descrito en la literatura para estas vesículas. Las vesículas extracelulares aisladas de HUVECs tratadas con o sin TNF- $\alpha$  (aSEVs), no redujeron la muerte celular en un modelo de I/R simulada en cardiomiocitos de rata neonata ni tampoco disminuyeron el tamaño de infarto en un modelo de I/R global en corazones aislados de ratón. Sin embargo, las vesículas extracelulares extraídas de células tratadas de TNF- $\alpha$  aumentaron la presión de perfusión al final de la reperfusión.

### 5.1. Modelo de activación endotelial

Durante la primera parte de este estudio, se estableció la activación endotelial mediada por TNF- $\alpha$  en las células HUVEC, para validar el modelo que confirmara un estado proinflamatorio en células endoteliales. Los resultados mostraron que TNF- $\alpha$  induce la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, así como la expresión de IL-6 y disminución de eNOS que, en conjunto, se asocian a la activación endotelial. El patrón de expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 por Western blot sugiere que ambas moléculas aumentan su expresión a las 24 y 48 h al compararlas con el control a las 0 h y con sus respectivos controles de tiempo. Estos resultados concuerdan con lo ya reportado en literatura, observándose la expresión de ambas moléculas a las 24 h en este tipo celular, usando la concentración utilizada de TNF- $\alpha$  a 10 ng/mL [61]. Además, se observó un segundo bandeo en el Western-blot de VCAM-1, lo cual se puede explicar por la aparición de isoformas de VCAM-1, descritas previamente en este tipo celular [62]. Se observó un aumento en la producción de IL-6 en células HUVEC estimuladas

con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  a las 24 h de tratamiento, confirmando lo ya descrito en estas células [63]. Esta interleuquina se expresa en presencia de factores proinflamatorios como TNF- $\alpha$  y, al igual que las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, participa en la respuesta inmunitaria asociada a la inflamación [45]. En la **Figura 4** se muestra el patrón de expresión de eNOS en HUVEC tratadas con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$ , observándose una disminución en la expresión de esta proteína a las 24 y 48 h. Este resultado es similar a lo ya descrito en otro estudio, en el que se mostró que TNF- $\alpha$  disminuye la expresión de esta proteína en células HUVEC [51]. Por lo tanto, se continuó usando las temporalidades de 24 h o 48 h para la posterior extracción de vesículas. Los experimentos realizados permiten obtener una caracterización robusta de la expresión de marcadores proinflamatorios. Cabe señalar que los datos obtenidos no son suficientes para establecer en concreto la disfunción endotelial, ya que esta condición está acompañada con una disminución en la producción de NO, la cual no fue medida, al igual que una pérdida de la funcionalidad de la vasculatura, la cual podría ser evaluada de manera *ex vivo* [64]. Sin embargo, la expresión de los 3 marcadores proinflamatorios VCAM-1, ICAM-1 e IL-6, sumado a la disminución en los niveles de eNOS, confirman el modelo de un estado proinflamatorio de células endoteliales.

## 5.2. Caracterización de vesículas extracelulares pequeñas

Una vez establecido el modelo de un estado proinflamatorio en células HUVEC, se procedió al aislamiento de vesículas extracelulares. En la **Figura 6A** se muestra una distribución de SEVs, cuyo rango se observa entre 100-200 nm. Cabe destacar que estas fracciones aisladas contienen poblaciones mixtas de vesículas extracelulares. Como se observa en el gráfico de la **Figura 6A**, existen poblaciones que superan los 200 nm o más, sugiriendo la presencia de otras vesículas, debido a que hasta la fecha no existe una metodología que asegure la completa purificación de SEVs [65].

La medición del tamaño modal mostró que las SEVs aisladas de células endoteliales tratadas con o sin TNF- $\alpha$  no superaron los 200 nm, lo que se ajusta a los valores descritos para caracterización de SEVs [66] y sugiere el aislamiento de fracciones enriquecidas en SEVs. Además, el tratamiento con TNF- $\alpha$  no produjo cambios en el tamaño modal de las vesículas producidas por células endoteliales. Asimismo, los resultados muestran que no hay diferencias significativas en la concentración de vesículas. Al respecto, cabe destacar que se ha reportado que el estímulo con TNF- $\alpha$  en otros tipos celulares sí aumenta la producción de SEVs [67], [68]. En células HUVEC, el estímulo con TNF- $\alpha$  por 24 h produce un aumento en la concentración de vesículas [69]. Esta discrepancia se puede deber a la diferencia de técnica de aislamiento utilizada, debido a que en el estudio de *Li, et al., 2019* utilizaron el método de ultracentrifugación, lo que ha mostrado obtener mayores rendimientos en comparación con la cromatografía de exclusión por tamaño [65]. Adicionalmente, se utilizó una concentración mayor de TNF- $\alpha$ , ya que, en el estudio de *Li, et al., 2019* se utilizaron 10  $\mu\text{g/mL}$ , en lugar de los 10  $\text{ng/mL}$  usados en el presente estudio. Estas condiciones podrían afectar la producción de SEVs, aumentándola, toda vez que en otros tipos celulares, el incremento de la concentración de TNF- $\alpha$  aumenta la producción de SEV secretadas [68]. Es importante considerar que esta alta concentración podría afectar la viabilidad de las células HUVEC, pero se ha reportado que esto solo ocurre a partir de concentraciones mayores a 25  $\mu\text{g/mL}$ , luego de 24 h de tratamiento [70].

Con el fin de garantizar que todas las vesículas extracelulares aisladas provengan de células con un estado proinflamatorio establecido, se realizó un pre-tratamiento con TNF- $\alpha$  por 24 h, para luego cambiar el medio y re-estimular las células endoteliales con TNF- $\alpha$ , garantizando así que todas las vesículas extracelulares aisladas provienen de endotelio activado. En el contexto de lo indicado, es importante señalar que para descartar un posible efecto directo de TNF- $\alpha$  al administrar SEVs en los experimentos funcionales de I/R *in vitro* y *ex vivo*, se realizaron experimentos en los que se evaluó un pre-tratamiento de HUVECs con TNF- $\alpha$  por 24 h, para posteriormente realizar un cambio de medio sin la presencia de esta citoquina proinflamatoria. Sin embargo, los resultados mostraron que al

reemplazar el medio durante 24 h por uno sin TNF- $\alpha$ , se observa una disminución de ambas proteínas al momento de cambiar el medio, recuperándose esta señal al tratar nuevamente con TNF- $\alpha$ . Se evidencia que el reemplazo por el medio sin TNF- $\alpha$ , se traduce en una completa pérdida en el contenido proteico de VCAM-1, mientras que hay una reducción significativa en los niveles de ICAM-1, pero la señal sigue presente. Por lo tanto, el cambio de medio estaría afectando la activación endotelial, generando un fenotipo parcialmente proinflamatorio. Estos antecedentes sugirieron la necesidad de la re-estimulación con TNF- $\alpha$  para la expresión de marcadores proinflamatorios, para asegurar que la producción de vesículas proviene de endotelio activado. Esta diferencia en la señal de las moléculas de adhesión en presencia o ausencia de TNF- $\alpha$ , se debe a que esta citoquina podría continuar en solución ejerciendo su efecto, por cuanto el TNF- $\alpha$  soluble humano en cultivos *in vitro* presenta una vida media de aproximadamente 100 horas. Este valor se predijo con la herramienta ProtParam de ExPASy, la cual predice la vida media de una secuencia de aminoácidos [71]. Cabe destacar que en este experimento no se evaluó el contenido proteico de eNOS, sin embargo, considerando la drástica reducción de los niveles de VCAM-1 e ICAM-1, sumado a lo indicado en la **Figura 6** en donde al estimular por 24 h con TNF- $\alpha$  existe una disminución de esta proteína, es posible hipotetizar que el contenido proteico de eNOS sería restaurado con el cambio de medio, mientras que tendería a disminuir tras la re-estimulación con TNF- $\alpha$ . Es importante reconocer que la re-estimulación con esta citoquina constituye una limitación del estudio, por cuanto no se puede descartar el efecto directo de TNF- $\alpha$  en las preparaciones de SEV al evaluar su efecto en cardioprotección. Sin embargo, cabe destacar que se utilizó la metodología de aislamiento de SEV por cromatografía de exclusión de tamaño, en cuyo protocolo se indica que las vesículas extracelulares eluyen, sin contar el volumen muerto eluído, entre las fracciones 1-3, mientras que las proteínas lo hacen desde las fracciones 6 en adelante [72], sugiriendo la ausencia o niveles reducidos de TNF- $\alpha$  en las fracciones enriquecidas en SEVs.

Una vez establecido el protocolo de pre-tratamiento y re-estimulación con TNF- $\alpha$ , se realizó el aislamiento y caracterización de SEVs. Al igual que los experimentos anteriores, el pre-tratamiento y re-estimulación con TNF- $\alpha$  no generó diferencias de tamaño y concentración de SEVs. Luego de la caracterización por NTA, se procedió a evaluar la proteína de superficie CD81, presente en la vasta mayoría de SEVs [73], [74]. Esta tetraspanina, junto a otras como CD63 o CD9, participan en el enrutamiento intracelular de los cargos en la formación de SEVs, como los exosomas [74]. Además, también participan en así como en la biogénesis y la comunicación SEV-célula blanco [75]. Los resultados del presente estudio evidencian la expresión de esta tetraspanina tanto en cSEVs como en aSEVs, sin diferencias significativas entre ambas poblaciones. Si bien esta tetraspanina ha sido considerada como un marcador de SEVs, también se ha encontrado en vesículas de origen diferente, como lo es la formación de ciernes en la membrana plasmática o *budding*, característico de las microvesículas en diversas líneas celulares [76]. Adicionalmente se pudo observar la presencia de SEVs por medio de microscopia electrónica, esta técnica permite tener una imagen clara y visible a simple vista de la presencia de SEVs en una determinada muestra dando cuenta de su integridad, forma y tamaño [61]. En este experimento, tanto cSEVs como aSEVs presentan un tamaño descrito para estas vesículas además de presentar la forma descrita para estas [40], [61].

### **5.3. Efecto de vesículas extracelulares pequeñas secretadas por endotelio activado en I/R *in vitro* e *ex vivo*.**

El potencial terapéutico de SEVs provenientes de endotelio para prevenir el daño por I/R cardiaca ya ha sido evaluado previamente. Un estudio realizado por Davidson *et al.*, 2017, exploró el uso de SEVs producidas por células HUVEC en un modelo de I/R *in vitro* de cardiomiocitos de rata adulta, demostrando que SEVs reducen la muerte celular [41]. Este estudio estableció que la disminución de la muerte celular ejercida por estas SEVs se pierde cuando son aisladas de células

HUVEC pre-incubadas con altas concentraciones de glucosa [41]. El efecto protector de las SEVs endoteliales aisladas de HUVEC se confirmó en un estudio posterior que no solo replicó la reducción de muerte celular de cardiomiocitos en I/R *in vitro*, sino que también se estableció que este efecto es mediado por la activación de quinasas de supervivencia, como MEK 1/2 y ERK 1/2 [34]. En el presente estudio, cSEV no redujeron la muerte celular de cardiomiocitos de rata neonata sometidos a I/R *in vitro*, mientras que aSEVs no redujeron, ni tampoco aumentaron la muerte celular. A diferencia de los estudios de Davidson *et al.*, [34], [41] cSEVs no redujeron el daño por I/R. Una posible explicación es el alto porcentaje de muerte celular obtenido en el presente estudio, de manera tal que las cSEVs no podrían reducir la muerte celular ante la severidad del daño celular producido por el protocolo de I/R *in vitro* utilizado. También es posible que el rol protector de SEVs solo sea posible observarlo en un modelo de cardiomiocitos de rata adulta, esto se podría explicar porque los cardiomiocitos de rata neonata estos presentan un metabolismo distinto a los cardiomiocitos de rata adulta, además de regulación diferencial de quinasas y factores de transcripción [77]–[79], por lo que las SEVs pudieran actuar por vías de señalización específicas en cardiomiocitos de rata adulta que no esté presente en cardiomiocitos de rata neonata. Además, el presente estudio no evaluó pre-incubaciones con SEVs durante periodos de tiempo más largos. Tampoco se realizaron incubaciones con SEVs durante la isquemia o durante la reperfusión. Además, no se evaluaron distintas concentraciones de SEVs. Al respecto, Vicencio *et al.* 2015 mostraron que SEVs aislados de plasma reducen la muerte celular de cardiomiocitos de rata adulta de una forma dependiente de la concentración. Es decir, a mayor concentración, mayor reducción de la muerte celular [35]. También se puede considerar que el cultivo de cardiomiocitos no permite evaluar las interacciones con otros tipos celulares, tales como células endoteliales o fibroblastos [80]. Como se ha mostrado en otros estudios, el endotelio es un componente fundamental en diversas estrategias cardioprotectoras, por lo que es posible que la falta de endotelio en este cultivo afecte la internalización de las SEVs [10]. Adicionalmente tampoco se utilizó un control positivo de protección contra I/R en este tipo celular como lo sería por ejemplo insulina [81]. Por lo tanto, si bien el

presente estudio no mostró un efecto protector de cSEVs, esto se puede atribuir al modelo utilizado y al diseño experimental y no necesariamente a una falta de efecto protector en I/R.

Otro aspecto importante para evaluar sería considerar las partículas/células utilizadas en este experimento. Considerando la concentración de SEVs utilizadas de  $10^8$  partículas/mL y la cantidad de cardiomiocitos de rata neonata utilizados, que correspondían a 250.000 por placa, se obtiene una cantidad de 400 partículas/célula que son administradas a los cardiomiocitos. Este factor es muy importante para la reproducibilidad de datos, ya que permite estandarizar una cantidad de vesículas que agregar a las células ya que, por ejemplo, cuando se estima la cantidad de células por confluencia, se desconoce la cantidad de células por placa. Es por esto que, si se utiliza una concentración estándar para todos los experimentos con confluencias estimadas, se podrían obtener resultados con alta variabilidad entre repeticiones, ya que, podría ser, que ese tipo celular en específico podría requerir más o incluso menos partículas/célula para observar un efecto. Considerando que no existe literatura respecto de cuantas partículas/cardiomiocito de rata neonata se deben administrar con este tipo de SEVs para observar un efecto, se debería realizar una curva con distintas cantidades de partículas/célula para determinar la concentración óptima. Alternativamente, se podría evaluar distintas densidades de células por placa, manteniendo la misma concentración de partículas para observar cambios en el contexto de I/R *in vitro*. En los resultados obtenidos en el experimento *in vitro*, observamos resultados neutrales con respecto a la utilización de 400 partículas/célula. Sin embargo, sin una optimización de la relación partículas/célula, tampoco se puede descartar un potencial efecto protector que disminuya la muerte celular inducida por reperfusión.

La medición del tamaño de infarto corresponde a la metodología más robusta para el estudio de estrategias cardioprotectoras, tanto en modelos de fase preclínica, como clínica de fase II [82]. Por lo tanto, se planteó el modelo *ex vivo* de I/R global en corazón de ratón adulto representado en la **Figura 11A**. Los datos obtenidos muestran que cSEVs no redujeron el tamaño del infarto, así como tampoco se

observaron cambios en el tamaño del infarto en corazones tratados con aSEV. Al igual que lo observado en cardiomiocitos, cabe señalar que no se puede descartar un efecto de cSEV y aSEV mientras no se evalúen distintas concentraciones y tiempos de administración.

Respecto al parámetro hemodinámico evaluado, se produjo un aumento en la presión de perfusión al final de la reperfusión en corazones tratados con aSEVs. Esto se puede explicar por un aumento en la resistencia vascular del miocardio. Adicionalmente, este incremento en la presión de perfusión se puede atribuir a un aumento en el estado de hipercontractura del miocardio [83]. Este proceso se relaciona con necrosis del miocardio, lo que a su vez se traduce en un aumento en el tamaño del infarto [84], [85]. Este aumento en la presión de perfusión y posible hipercontractura, se puede haber generado a consecuencia de que las aSEVs hayan reducido la capacidad vasodilatadora de la vasculatura del miocardio, gatillando un incremento de la resistencia vascular.

En búsqueda de un mecanismo a través del cual ocurre este efecto, cabe indicar que si bien se ha detectado un gran número de proteínas y RNAs en SEVs y en SEVs de células endoteliales estimuladas con TNF- $\alpha$  [86], resulta difícil identificar la o las proteínas que podría causar el aumento en la presión de perfusión. Sin embargo, las proteínas y mRNA de SEVs tratadas con TNF- $\alpha$  contienen las proteínas ICAM-1 y TNFRAIP3, así como mRNA de NF- $\kappa$ B [86]. Si bien no se ha relacionado ninguna de estas moléculas con estados alterados de función vascular, se ha reportado que SEVs aisladas de endotelio en un contexto inflamatorio, debido a la inhibición de IL-10, simula una inflamación crónica [87]. En dicho contexto, SEVs secretadas por células endoteliales progenitoras, pierden la capacidad de reparar el miocardio luego de sufrir daño por isquemia/reperfusión *in vivo* [87]. Adicionalmente, se ha observado que SEVs aisladas de otros tipos celulares tratados con TNF- $\alpha$ , pueden promover un fenotipo proinflamatorio en células endoteliales [88]. Además, se ha observado que SEVs aisladas de células endoteliales tratadas con TNF- $\alpha$  disminuyen el consumo de oxígeno e inducen apoptosis en células endoteliales [69]. También existen microRNAs aislados de

células endoteliales que juegan roles clave en enfermedades cardiovasculares [27]. Por ejemplo, miR-505 es liberado por células endoteliales en presencia de ox-LDL, participa en una mayor producción de especies reactivas de oxígeno por parte de neutrófilos, así como en la progresión de aterosclerosis [89]. Asimismo, miR-155 es liberado por células endoteliales en presencia de ox-LDL y participa en el cambio de un fenotipo antiinflamatorio a uno proinflamatorio [90], así como suprimir reguladores negativos de la inflamación como SHIP1 y SOCS1 [91], [92].

Es importante considerar la posibilidad de que el mecanismo a través del cual aSEVs aumentan la presión de perfusión no esté relacionado con la entrega de mRNA o microRNA a la célula blanco. Esta idea se relaciona a que los efectos descritos en la **Figura 11B** se observaron en un modelo agudo de I/R cardiaca, por lo que es más probable que el aumento en la presión de perfusión esté mediado por cambios post-traduccionales. Por ejemplo, aSEVs podrían inducir la activación de ciertas quinasas que disminuyan la capacidad vasodilatadora de la vasculatura del miocardio. La activación de, por ejemplo, PKC o Rho-quinasa está relacionada con la inhibición de la actividad catalítica de eNOS, alterando la producción de NO [93], [94], esta activación podría ser bien activando algún receptor de membrana o liberando su contenido al interior de la célula blanco. También es posible que las aSEVs sean capaces de llevar ROS o aumentar la producción de ROS en la vasculatura del miocardio, lo que culminaría con una disminución de NO y aumento en la vasoconstricción. Cabe destacar que este estudio corresponde al primero en el que se explora el efecto de SEVs endoteliales en corazón aislado *ex vivo*, de modo que no existe literatura relacionada al tema y los mecanismos a investigar requieren la identificación de moléculas que afecten la capacidad protectora de las SEVs. Es importante recordar también que las SEVs fueron administradas antes de la isquemia, de manera tal que se evaluó su potencial de prevenir (no revertir) el daño por I/R cardiaca. Sin embargo, futuros estudios también deben explorar la posibilidad de administrar estas vesículas durante la reperfusión, como ocurre por ejemplo con el post-condicionamiento isquémico o la cardioprotección farmacológica que se administra de manera intracoronaria [7], lo cual ciertamente es de alta relevancia clínica.

#### 5.4. Limitaciones del estudio

En primer lugar, es importante analizar las dificultades asociadas al aislamiento y caracterización de SEVs. Actualmente, aún existe incertidumbre en cuanto a la clasificación de vesículas extracelulares. Por un lado, existen diferencias en relación con el nombre que se le asigna a sub-poblaciones específicas de vesículas extracelulares, como los exosomas [95]. Actualmente, es complejo asignar un nombre a una subpoblación de vesículas por su origen, ya sea de endosomas - como los exosomas- o derivados de membrana como las microvesículas, ya que para esto se debería observar su producción en tiempo real [66]. Sin embargo, es posible clasificar las vesículas dependiendo de las características físicas, como el tamaño. Por ejemplo, las vesículas extracelulares pequeñas o SEVs presentan un tamaño entre 100 y 200 nm y además, expresan proteínas en la superficie, como las tetraspaninas como CD9, CD63 y CD81 [66]. [74]. Además, a pesar de las diferentes metodologías disponibles para aislamiento de las vesículas extracelulares, aún no es posible purificar completamente SEVs como los exosomas, ya que en la mayoría de los protocolos de purificación existe contaminación con lipoproteínas [96], RNAs [97], proteínas no vesiculares [98] u otras poblaciones de vesículas extracelulares.

Existen otras limitaciones asociadas al estudio de SEVs. Por ejemplo, se puede utilizar sondas fluorescentes lipofílicas para marcar SEVs y así poder estudiar su captación por distintos tipos celulares. Sin embargo, este marcaje no está exento de contaminación, ya que además de SEVs, se ha observado que también se une a proteínas y lipoproteínas [99]. En cuanto a los métodos de aislamiento, si bien la ultracentrifugación ha sido ampliamente utilizado en el aislamiento de SEVs, existen otros métodos para obtener SEVs, como la precipitación con polietilenglicol, captura por inmunofluorescencia y cromatografía de exclusión por tamaño [100]. En este trabajo se utilizó la cromatografía de exclusión por tamaño. Esta metodología destaca por ser una forma sencilla y rápida de obtención de vesículas, además de la utilización de poco volumen de muestra. Sin embargo, presenta limitaciones como baja

concentración del preparado final de vesículas, así como posibles contaminantes como co-precipitados de proteínas y lipoproteínas [65], [99]. Esta limitación impidió obtener una cantidad de proteína suficiente para realizar la evaluación por Western blot de tetraspaninas y otros marcadores como ALIX, o un control negativo, como GM130. Esto limitó la evaluación de marcadores de superficie a uno solo, utilizando un inmunoensayo, cuya sensibilidad es mayor a la del Western blot. Cabe recordar que aún no existe un método óptimo que permita una completa purificación de SEVs, como los exosomas. Cada técnica presenta limitaciones, ya que aún no se pueden separar entidades no vesiculares de las fracciones enriquecidas con SEVs, así como tampoco se puede excluir por completo la presencia de diferentes subpoblaciones de vesículas extracelulares [66].

De acuerdo con las guías de MISEV 2018 (*Minimal Information for studies of Extracellular vesicles*), se requieren al menos 3 marcadores diferentes para poder categorizar las diferentes SEVs [66]. Entre las categorías mencionadas en MISEV 2018, se encuentra la detección de proteínas transmembrana asociadas a endosomas, que pueden ser tejido específico (PECAM1 en el caso de células endoteliales) o no tejido específico (tetraspaninas, MHC). Proteínas de la biogénesis de vesículas (TSG101, ALIX), componentes co-aislados de estructuras no vesiculares (lipoproteínas, agregados proteína-ácido nucleico) y adicionalmente, algún marcador de contaminación asociadas a otros compartimientos celulares (calnexina, GM130), además de la utilización de microscopía electrónica para observar la integridad de la membrana y la morfología de las vesículas [66], [101]. En el presente estudio de SEVs, solo se utilizó CD81 como marcador de vesículas, lo que sumado a la caracterización por NTA y microscopía electrónica, no son suficientes para dar el nombre de exosomas a estas vesículas. Tampoco correspondería asignarles el nombre de vesículas extracelulares, ya que, si bien se extrajeron del medio condicionado y no de un lisado celular, es necesario evaluar la presencia de marcadores de contaminación, debido a que existen compartimientos celulares capaces de producir vesículas, como el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Para evaluar esto se utilizan marcadores como calnexina o Grp78, en el caso de retículo y GM130, en el caso de Golgi [102]. Por lo tanto, los resultados

obtenidos no permiten garantizar la pureza de estas vesículas. Sin embargo, tampoco se puede descartar la presencia de SEVs, ya que las fracciones aisladas presentan el tamaño moda descrito para estas vesículas y además, expresan el marcador CD81, que indica que corresponden a vesículas producidas a partir de CMV [75].

También cabe destacar que en el experimento de I/R *in vitro* se tiene una muerte celular de casi un 80%, mientras que otros estudios han reportado valores cercanos al 40-50%, utilizando el mismo modelo de I/R *in vitro* en cardiomiocitos de ratas neonatas [103]–[105]. Adicionalmente, se obtuvo una baja cantidad de experimentos independientes ( $n = 3$ ), por lo que no es posible realizar una estadística adecuada. Además, como fue mencionado anteriormente, no se evaluaron distintos tiempos de incubación, así como se utilizó una sola concentración de SEVs, correspondiente a  $10^8$  partículas/mL. Si bien esta concentración ha sido descrita como protectora, ya que redujo la muerte celular de cardiomiocitos de rata adulta sometidos a I/R *in vitro*, [34], [41], resulta necesario evaluar más concentraciones de SEVs para ver descartar que este sea el motivo por el cual no se observó un efecto.

El sistema de Langendorff es una excelente metodología para observar el efecto de cualquier estímulo en el tejido cardíaco sometido a I/R [82]. Esta es una técnica delicada que requiere experticia de parte de él/la operador/a, por cuanto existen importantes criterios de inclusión, como una rápida extracción quirúrgica del corazón y posterior canulación, así como obtener un valor de presión de perfusión superior a 60 mmHg, entre otras [82]. También se deben evitar los cambios bruscos de temperatura y sobre-manipulación del tejido, ya que debido al reducido tamaño del corazón de ratón, es más fácil dañar el tejido, llevando a resultados inconsistentes [106]. En el set de experimentos *ex vivo* se puede indicar que existen una cantidad insuficiente de repeticiones experimentales en las condiciones cSEVs y aSEVs. Es importante mencionar también que los rendimientos de SEVs obtenidos con nuestro diseño experimental y metodología empleada, impidieron la administración de concentraciones superiores a la utilizada ( $10^8$  partículas/mL), por lo que al igual que

en modelo *in vitro*, no evaluar distintas concentraciones constituye una importante limitación del presente estudio.

También es posible que las células HUVEC en específico no sean un tipo celular óptimo para probar efectos sobre I/R, ya que, por ejemplo, se podrían buscar otros tipos celulares que estén más estrechamente relacionado con el tejido cardiaco, tanto para los experimentos de rata neonata *in vitro* como para los experimentos *ex vivo* de corazón de rata adulta, como lo son cultivos primarios de endotelio cardiaco. Dos ejemplos de estos son células endoteliales de endocardio y coronarias de corazón de rata [107] o células endoteliales coronarias de corazón de ratón [108]. Sin embargo, la obtención de estos tipos celulares resulta complejo, debido a que es muy difícil aislarlo, también existe bajo rendimiento y heterogeneidad, además de dificultades en mantener estos tejidos a largo plazo [109]. Debido a estas complicaciones, estos tipos celulares no resultarían óptimos al momento de obtener SEVs, debido a la complejidad técnica para obtener elevados rendimientos celulares, lo que no permitiría obtener rendimientos adecuados de vesículas. Otra posibilidad sería probar SEVs secretadas células progenitoras endoteliales, las cuales se han reportado que actúan en el corazón y los vasos sanguíneos teniendo propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antiapoptóticas, inhibición de fibrosis cardiaca y reparación del miocardio post-IM [87], [110]. Sin embargo, su efecto se ha visto alterado en un contexto proinflamatorio, en un modelo murino de IM que presentaban un knockdown de IL-10, una interleuquina antiinflamatoria, en la cual las SEVs de células endoteliales progenitoras de medula ósea, no redujeron el tamaño de herida de infarto a 31 días post-IM, al comparar con las SEVs wild-type. Además, estas SEVs de células endoteliales progenitoras regulan factores como NF- $\kappa$ B, que aumenta la expresión de genes proinflamatorios, exacerbando la respuesta inflamatoria frente a IM [87]. Interesantemente, este fenotipo fue similar al tratar una línea celular de células endoteliales cardiacas (CLU510) con TNF- $\alpha$ , las cuales también activan NF- $\kappa$ B [87].

Es importante destacar también que debido a que existen diferentes subpoblaciones de células endoteliales en el tejido cardiaco, se podrían generar diferentes

subpoblaciones de SEVs, debido a que los diferentes tipos de células endoteliales presentan variaciones entre ellas mismas, como un metabolismo diferencial y marcadores celulares [111], [112]. Se ha observado también que subpoblaciones de células endoteliales progenitoras varían en enfermedad de arteria coronaria [113], por lo que estos tipos celulares de células endoteliales son afectados también en un contexto proinflamatorio.

Se podría considerar también en la utilización de líneas celulares endoteliales inmortalizadas como lo es la línea HMEC-1 o CLU510. Sin embargo, la mayoría de estas líneas celulares son tumorigénicas, como lo es ECV304 [114], además de expresar genes diferenciales en comparación, por ejemplo, a células HUVEC, expresando genes antiapoptóticos y de control del ciclo celular [115]. El presente estudio contempló el uso de células HUVEC, ya que es un modelo altamente estudiado en la literatura tanto para los estímulos de TNF- $\alpha$ , expresión de marcadores, además del aislamiento de SEVs [32], [51], [61]. Adicionalmente, todas las líneas celulares son comparadas con este modelo para establecerse como un modelo de células endoteliales para estudios de vasculatura [114]. A pesar de esto, estas células presentan ciertas limitaciones, como por ejemplo, que pierden su fenotipo cuando pasan los 15 pasajes, alcanzando un fenotipo senescente, marcado por cambios en su metabolismo y morfología, se vuelven multinucleadas y mueren [116]. Además, se ha demostrado que en este estado producen más SEVs, reflejado en un aumento en la expresión de marcadores como CD9 y CD81 en comparación con SEVs de células HUVEC en pasajes menores [117].

Finalmente, tampoco se determinó el potencial mecanismo a través del cual aSEVs indujeron un aumento en la presión de perfusión. El estudio de Vicencio et al., estableció que los SEVs de plasma son protectores en el contexto de I/R cardíaca, mediante un mecanismo dependiente de la expresión de HSP70 en la superficie de las SEVs y activación de la vía TLR4/ERK<sub>1/2</sub> en el cardiomiocito [35]. Sin embargo, Davidson et al., reportaron que SEVs endoteliales reducen la muerte celular en I/R, mas no expresan HSP70 en la superficie [41]. Adicionalmente, un estudio reciente reportó que SEVs endoteliales pueden inducir la migración de células HUVEC [118].

Interesantemente, SEVs por producidas por HUVECs en estado de senescencia también conservan la capacidad de inducir migración de células endoteliales [118]. Por otra parte, el presente estudio que SEVs aisladas de células HUVEC tratadas con TNF- $\alpha$  alteran un parámetro hemodinámico en el contexto de I/R cardiaca. En resumen, en los últimos años, ha habido un claro progreso en el entendimiento de los efectos que pueden generar las SEVs endoteliales en distintos contextos fisiológicos y fisiopatológicos, pero existen múltiples interrogantes acerca de los mecanismos que estarían mediando sus efectos biológicos.

## 5.5. Perspectivas futuras

Múltiples estrategias terapéuticas han mostrado una sólida cardioprotección en estudios preclínicos [7]. Sin embargo, existe una desconexión entre el laboratorio y la clínica, por cuanto muchas estrategias cardioprotectoras no funcionan en pacientes [10] y se especula que la presencia de comorbilidades y co-medicaciones pueden tener un papel clave en la pérdida de protección de diversas terapias protectoras en infarto del miocardio [119]. Al respecto, Wojciechowska et al. 2015, hipotetizaron que la inflamación crónica -presente en múltiples comorbilidades- puede ser reducir la efectividad del preconditionamiento isquémico [120]. El presente estudio mostró que un estado proinflamatorio se asocia a la producción de SEVs que generan una alteración hemodinámica en corazones sometidos a isquemia/reperfusión, confirmando la importancia de considerar a la inflamación como un blanco terapéutico relevante para restaurar la protección de estrategias cardioprotectoras frente a infarto del miocardio. Futuros estudios deben establecer de forma robusta si SEVs endoteliales pueden reducir el daño por I/R cardiaca, evaluando distintas cantidades de partículas/célula y tiempos de administración, para así confirmar dichos resultados en modelos *in vitro* de infarto del miocardio. Posteriormente, es necesario evaluar si la reducción del estado proinflamatorio de la vasculatura puede restaurar el efecto protector de SEVs en I/R cardiaca, acercando así la terapia con vesículas extracelulares para el tratamiento del infarto del miocardio en pacientes.

## 6. CONCLUSIONES

- 1) TNF- $\alpha$  indujo un estado proinflamatorio en células HUVEC, aumentando la expresión de VCAM1, ICAM1 e IL-6 y reduciendo el contenido proteico de eNOS.
- 2) El tratamiento de células HUVEC con TNF- $\alpha$  no alteró la concentración, tamaño o expresión de CD81 de vesículas extracelulares producidas por estas células.
- 3) La administración de  $10^8$ /mL vesículas extracelulares aisladas de células HUVEC tratadas con o sin TNF- $\alpha$  no redujeron la muerte celular de cardiomiocitos de rata neonata sometidos a I/R *in vitro*.
- 4) La administración de vesículas extracelulares aisladas de células HUVEC tratadas con o sin TNF- $\alpha$ , no tienen efecto sobre el tamaño de infarto de corazones de ratón sometidos a I/R *ex vivo*.
- 5) La administración de vesículas extracelulares aisladas de células HUVEC tratadas con TNF- $\alpha$ , aumentan la presión de perfusión al final de la reperfusión en corazones de ratón sometidos a I/R *ex vivo*.

## 7. ACTIVIDADES

### 7.1. Publicaciones durante el periodo de tesis

**"Targeting the Endothelium to Achieve Cardioprotection". N. Herrera-Zelada, U. Zuñiga-Cuevas, A. Ramirez-Reyes, S. Lavandero, y J. A. Riquelme, *Front. Pharmacol.*, vol. 12, 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.636134.**

**"Potential Therapies to Protect the Aging Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury." Díaz-Vesga, M., Zúñiga-Cuevas, Ú., Ramírez-Reyes, A., Herrera-Zelada, N., Palomo, I., Bravo-Sagua, R., & Riquelme, J. (2021). Potential Therapies to Protect the Aging Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Frontiers In Cardiovascular Medicine*, 8. doi: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.770421>**

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. Pangonyte, E. Stalioraityte, R. Žiuraitiene, D. Kazlauskaite, J. Palubinskiene, and I. Balnyte, “Cardiomyocyte remodeling in ischemic heart disease,” *Medicina (B. Aires)*, vol. 44, no. 11, pp. 848–854, 2008, doi: 10.3390/medicina44110107.
- [2] S. Doll *et al.*, “Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/S41467-017-01747-2.
- [3] S. S. S. and J. P. Joshua Chadwick Jayaraj, Karapet Davatyan, “Epidemiology of Myocardial Infarction,” *Intech*, vol. i, p. 13, 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- [4] G. Heusch, “Regulation of Coronary Blood Flow in Normal and Ischemic States Myocardial ischemia: lack of coronary blood flow, myocardial oxygen supply-demand imbalance, or what?,” *Am J Physiol Hear. Circ Physiol*, vol. 316, pp. 1439–1446, 2019, doi: 10.1152/ajpheart.00139.2019.-This.
- [5] E. McAlindon, C. Bucciarelli-Ducci, M. S. Suleiman, and A. Baumbach, “Infarct size reduction in acute myocardial infarction,” *Heart*, vol. 101, no. 2. Heart, pp. 155–160, Jan. 01, 2015, doi: 10.1136/heartjnl-2013-304289.
- [6] N. G. Frangogiannis, “Pathophysiology of myocardial infarction,” *Compr. Physiol.*, vol. 5, no. 4, pp. 1841–1875, 2015, doi: 10.1002/cphy.c150006.

- [7] G. Heusch, "Myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection in perspective," *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 17, no. 12, pp. 773–789, 2020, doi: 10.1038/s41569-020-0403-y.
- [8] A. Caricati-Neto, P. R. Errante, and F. S. Menezes-Rodrigues, "Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 16, p. 4002, 2019, doi: 10.3390/ijms20164002.
- [9] R. M. Bell and D. M. Yellon, "Conditioning the whole heart-not just the cardiomyocyte," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 53, no. 1, pp. 24–32, 2012, doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.04.001.
- [10] N. Herrera-Zelada, U. Zuñiga-Cuevas, A. Ramirez-Reyes, S. Lavandero, and J. A. Riquelme, "Targeting the Endothelium to Achieve Cardioprotection," *Front. Pharmacol.*, vol. 12, 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.636134.
- [11] C. Michiels, "Endothelial cell functions," *J. Cell. Physiol.*, vol. 196, no. 3, pp. 430–443, 2003, doi: 10.1002/jcp.10333.
- [12] F. Perbellini, S. A. Watson, I. Bardi, and C. M. Terracciano, "Heterocellularity and Cellular Cross-Talk in the Cardiovascular System," *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 5, no. November, pp. 1–11, 2018, doi: 10.3389/fcvm.2018.00143.
- [13] A. Krüger-Genge, A. Blocki, R. P. Franke, and F. Jung, "Vascular endothelial cell biology: An update," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 18, 2019, doi: 10.3390/ijms20184411.
- [14] T. M. Leucker *et al.*, "Impairment of Endothelial-Myocardial Interaction

Increases the Susceptibility of Cardiomyocytes to Ischemia/Reperfusion Injury,” *PLoS One*, vol. 8, no. 7, pp. 1–9, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0070088.

- [15] T. M. Leucker *et al.*, “Endothelial-cardiomyocyte crosstalk enhances pharmacological cardioprotection,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 51, no. 5, pp. 803–811, 2011, doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.06.026.
- [16] J. A. Riquelme *et al.*, “Dexmedetomidine protects the heart against ischemia-reperfusion injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism,” *Pharmacol. Res.*, vol. 103, pp. 318–327, 2016, doi: 10.1016/j.phrs.2015.11.004.
- [17] Y. J. Cho and W. H. Kim, “Perioperative Cardioprotection by Remote Ischemic Conditioning,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 19, p. 4839, 2019, doi: 10.3390/ijms20194839.
- [18] D. J. Hausenloy and D. M. Yellon, “Ischaemic conditioning and reperfusion injury,” *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 13, no. 4, pp. 193–209, 2016, doi: 10.1038/nrcardio.2016.5.
- [19] D. J. Hausenloy *et al.*, “Remote ischemic preconditioning and outcomes of cardiac surgery,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, no. 15, pp. 1408–1417, 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1413534.
- [20] D. J. Hausenloy *et al.*, “Effect of remote ischaemic conditioning on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (CONDI-2/ERIC-PPCI): a single-blind randomised controlled trial,” *Lancet*, vol. 6736, no. 19, pp. 1–

10, 2019, doi: 10.1016/s0140-6736(19)32039-2.

- [21] A. Gaspar *et al.*, “Randomized controlled trial of remote ischaemic conditioning in ST-elevation myocardial infarction as adjuvant to primary angioplasty (RIC-STEMI),” *Basic Res. Cardiol.*, vol. 113, no. 3, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1007/s00395-018-0672-3.
- [22] X. Rossello and D. M. Yellon, “Cardioprotection: The disconnect between bench and bedside,” *Circulation*, vol. 134, no. 8, pp. 574–575, 2016, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022829.
- [23] J. Wider, V. V. R. Undyala, P. Whittaker, J. Woods, X. Chen, and K. Przyklenk, “Remote ischemic preconditioning fails to reduce infarct size in the Zucker fatty rat model of type-2 diabetes: role of defective humoral communication,” *Basic Res. Cardiol.*, vol. 113, no. 3, 2018, doi: 10.1007/s00395-018-0674-1.
- [24] Z. D. Ge *et al.*, “Failure of Isoflurane Cardiac Preconditioning in Obese Type 2 Diabetic Mice Involves Aberrant Regulation of MicroRNA-21, Endothelial Nitric-oxide Synthase, and Mitochondrial Complex i,” *Anesthesiology*, vol. 128, no. 1, pp. 117–129, 2018, doi: 10.1097/ALN.0000000000001926.
- [25] M. Tkach and C. Théry, “Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go,” *Cell*, vol. 164, no. 6. Cell, pp. 1226–1232, Mar. 10, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.01.043.
- [26] C. M. Boulanger, X. Loyer, P. E. Rautou, and N. Amabile, “Extracellular vesicles in coronary artery disease,” *Nature Reviews Cardiology*, vol. 14, no.

5. pp. 259–272, 2017, doi: 10.1038/nrcardio.2017.7.
- [27] G. Jia and J. R. Sowers, “Targeting endothelial exosomes for the prevention of cardiovascular disease,” *Biochim. Biophys. acta. Mol. basis Dis.*, vol. 1866, no. 8, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.BBADIS.2020.165833.
- [28] Y. Zhang, Y. Liu, H. Liu, and W. H. Tang, “Exosomes : biogenesis , biologic function and clinical potential,” *Cell Biosci.*, pp. 1–18, 2019, doi: 10.1186/s13578-019-0282-2.
- [29] M. Y. Xu, Z. S. Ye, X. T. Song, and R. C. Huang, “Differences in the cargos and functions of exosomes derived from six cardiac cell types: A systematic review,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1186/s13287-019-1297-7.
- [30] J. M. Vicencio *et al.*, “Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 65, no. 15, pp. 1525–1536, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.jacc.2015.02.026.
- [31] Z. Hou *et al.*, “Longterm Exercise-Derived Exosomal miR-342-5p: A Novel Exerkine for Cardioprotection,” *Circ. Res.*, vol. 124, no. 9, pp. 1386–1400, 2019, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314635.
- [32] S. M. Davidson, J. A. Riquelme, Y. Zheng, J. M. Vicencio, S. Lavandero, and D. M. Yellon, “Endothelial cells release cardioprotective exosomes that may contribute to ischaemic preconditioning,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-34357-z.
- [33] L. Barile, T. Moccetti, E. Marbán, and G. Vassalli, “Roles of exosomes in

- cardioprotection,” *Eur. Heart J.*, vol. 38, no. 18, pp. 1372–1379, 2017, doi: 10.1093/eurheartj/ehw304.
- [34] S. M. Davidson, J. A. Riquelme, Y. Zheng, J. M. Vicencio, S. Lavandero, and D. M. Yellon, “Endothelial cells release cardioprotective exosomes that may contribute to ischaemic preconditioning,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-34357-z.
- [35] J. M. Vicencio *et al.*, “Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 65, no. 15, pp. 1525–1536, 2015, doi: 10.1016/j.jacc.2015.02.026.
- [36] W. Minghua *et al.*, “Plasma exosomes induced by remote ischaemic preconditioning attenuate myocardial ischaemia/reperfusion injury by transferring MIR-24 article,” *Cell Death Dis.*, vol. 9, no. 3, 2018, doi: 10.1038/s41419-018-0274-x.
- [37] Q. Luo, D. Guo, G. Liu, G. Chen, M. Hang, and M. Jin, “Exosomes from MiR-126-Overexpressing Adscs Are Therapeutic in Relieving Acute Myocardial Ischaemic Injury,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 44, no. 6, pp. 2105–2116, 2018, doi: 10.1159/000485949.
- [38] X. L. Wang *et al.*, “Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells improve myocardial repair via upregulation of Smad7,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 41, no. 5, pp. 3063–3072, 2018, doi: 10.3892/ijmm.2018.3496.
- [39] R. Gallet *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.*, vol. 38, no. 3, pp. 201–211, 2017, doi: 10.1093/eurheartj/ehw240.

- [40] M. Colombo, G. Raposo, and C. Théry, “Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles,” *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 30. pp. 255–289, 2014, doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- [41] S. M. Davidson *et al.*, “Cardioprotection mediated by exosomes is impaired in the setting of type II diabetes but can be rescued by the use of non-diabetic exosomes in vitro,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 22, no. 1, pp. 141–151, 2018, doi: 10.1111/jcmm.13302.
- [42] A. Kim, A. Shah, and T. Nakamura, “Extracellular Vesicles: A Potential Novel Regulator of Obesity and Its Associated Complications,” *Children*, vol. 5, no. 11, p. 152, 2018, doi: 10.3390/children5110152.
- [43] “A current view on inflammation,” *Nat. Immunol.*, vol. 18, no. 8, p. 825, 2017, doi: 10.1038/ni.3798.
- [44] M. Drahansky *et al.*, “The Markers of Endothelial Activation,” *Intech*, vol. i, no. 1, p. 13, 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- [45] M. L. Iruela-Arispe, “Endothelial cell activation,” *Angiogenes. An Integr. Approach From Sci. to Med.*, vol. 316, no. May, pp. 35–43, 2008, doi: 10.1007/978-0-387-71518-6\_3.
- [46] J. S. Pober, “Endothelial activation: intracellular signaling pathways,” *Arthritis*

*Res.*, vol. 4, pp. S109–S116, 2002, doi: 10.1186/ar576.

[47] J. S. Pober, “Endothelial activation: intracellular signaling pathways,” *Arthritis Res.*, vol. 4, pp. S109–S116, 2002.

[48] S. Pober, “Cytokines and Endothelial,” vol. 70, no. 2, 1990.

[49] L. A. Madge and J. S. Pober, “TNF signaling in vascular endothelial cells,” *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 70, no. 3, pp. 317–325, 2001, doi: 10.1006/exmp.2001.2368.

[50] Z. Zhou, M. C. Connell, and D. J. MacEwan, “TNFR1-induced NF- $\kappa$ B, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells,” *Cell. Signal.*, vol. 19, no. 6, pp. 1238–1248, 2007, doi: 10.1016/j.cellsig.2006.12.013.

[51] G. Yan, B. You, S.-P. Chen, J. K. Liao, and J. Sun, “TNF-alpha Downregulates Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNA Stability via Translation Elongation Factor 1-alpha 1,” *Psychiatry Interpers. Biol. Process.*, vol. 12, no. September, pp. 591–597, 2008, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.173963.TNF-alpha.

[52] S. Giannitsi, B. Maria, A. Bechlioulis, and K. Naka, “Endothelial dysfunction and heart failure: A review of the existing bibliography with emphasis on flow mediated dilation,” *JRSM Cardiovasc. Dis.*, vol. 8, p. 204800401984304, 2019, doi: 10.1177/2048004019843047.

[53] J. E. Deanfield, J. P. Halcox, and T. J. Rabelink, “Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance,” *Circulation*, vol. 115, no. 10, pp.

1285–1295, 2007, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859.

- [54] E. Mendoza-Torres *et al.*, “Protection of the myocardium against ischemia/reperfusion injury by angiotensin-(1–9) through an AT<sub>2</sub> R and Akt-dependent mechanism,” *Pharmacol. Res.*, vol. 135, pp. 112–121, 2018, doi: 10.1016/j.phrs.2018.07.022.
- [55] X. Rossello *et al.*, “The role of PI3K $\alpha$  isoform in cardioprotection,” *Basic Res. Cardiol.*, vol. 112, p. 66, 2017, doi: 10.1007/s00395-017-0657-7.
- [56] S. Kaur, Y. Bansal, R. Kumar, and G. Bansal, “A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 28, no. 5, p. 115327, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.BMC.2020.115327.
- [57] L. Chi *et al.*, “Interleukin-6 Production by Endothelial Cells via Stimulation of Protease-Activated Receptors Is Amplified by Endotoxin and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  TNF- $\alpha$  on PAR-mediated cytokine production was associated with corresponding increases in nuclear NF- $\kappa$ B proteins. The results demonstrate significant potentiation of PAR-induced signaling by LPS and TNF- $\alpha$  and indicate the potential cooperation of proteases and inflammatory stimuli in amplifying vascular inflammation,” *J. Interf. CYTOKINE Res.*, vol. 21, pp. 231–240, 2001.
- [58] V. Filipe, A. Hawe, and W. Jiskoot, “Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates,” *Pharm. Res.*, vol. 27, no. 5, p. 796, May 2010, doi: 10.1007/S11095-010-0073-2.

- [59] S. T. Y. Chuo, J. C. Y. Chien, and C. P. K. Lai, "Imaging extracellular vesicles: Current and emerging methods," *J. Biomed. Sci.*, vol. 25, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1186/S12929-018-0494-5.
- [60] S. M. Davidson *et al.*, "Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: JACC Review Topic of the Week," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 73, no. 1. Elsevier USA, pp. 89–99, Jan. 08, 2019, doi: 10.1016/j.jacc.2018.09.086.
- [61] Y. Sawa *et al.*, "Effects of TNF- $\alpha$  on leukocyte adhesion molecule expressions in cultured human lymphatic endothelium," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 55, no. 7, pp. 721–733, Jul. 2007, doi: 10.1369/JHC.6A7171.2007.
- [62] D. Montes-Sánchez *et al.*, "BMC Chemical Biology Glycosylated VCAM-1 isoforms revealed in 2D western blots of HUVECs treated with tumoral soluble factors of breast cancer cells," 2009, doi: 10.1186/1472-6769-9-7.
- [63] L. Chi *et al.*, "Interleukin-6 production by endothelial cells via stimulation of protease-activated receptors is amplified by endotoxin and tumor necrosis factor- $\alpha$ ," *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 21, no. 4, pp. 231–240, 2001, doi: 10.1089/107999001750169871.
- [64] M. Azzawi, "Assessment of vascular function and contractility, Ex Vivo," in *Handbook of Vascular Biology Techniques*, Springer Netherlands, 2015, pp. 65–79.
- [65] G. K. Patel *et al.*, "Comparative analysis of exosome isolation methods using

culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-41800-2.

- [66] C. Théry *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*, vol. 7, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- [67] Y. Nakao *et al.*, “Exosomes from TNF- $\alpha$ -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss,” *Acta Biomater.*, vol. 122, pp. 306–324, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2020.12.046.
- [68] H.-G. Zhang *et al.*, “A Membrane Form of TNF- $\alpha$  Presented by Exosomes Delays T Cell Activation-Induced Cell Death,” *J. Immunol.*, vol. 176, no. 12, pp. 7385–7393, 2006, doi: 10.4049/jimmunol.176.12.7385.
- [69] B. Li, L. Li, Q. Zhang, H. Zhang, and R. Xiu, “Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced exosomes on the endothelial cellular behavior, metabolism and bioenergetics,” *Microcirculation*, vol. 26, no. 1, pp. 0–2, 2019, doi: 10.1111/micc.12515.
- [70] C. Wang *et al.*, “Attenuation of TNF- $\alpha$ -Induced Inflammatory Injury in Endothelial Cells by Ginsenoside Rb1 via Inhibiting NF- $\kappa$ B, JNK and p38 Signaling Pathways,” 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00464.
- [71] E. Gasteiger *et al.*, “Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server,” in *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 2005, pp.

571–607.

- [72] E. Oeyen *et al.*, “Ultrafiltration and size exclusion chromatography combined with asymmetrical-flow field-flow fractionation for the isolation and characterisation of extracellular vesicles from urine,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 7, no. 1, 2018, doi: 10.1080/20013078.2018.1490143.
- [73] D. W. Greening, R. Xu, S. K. Gopal, A. Rai, and R. J. Simpson, “Proteomic insights into extracellular vesicle biology - defining exosomes and shed microvesicles,” *Expert Rev. Proteomics*, vol. 14, no. 1, pp. 69–95, Jan. 2017, doi: 10.1080/14789450.2017.1260450.
- [74] G. Van Niel, G. D’Angelo, and G. Raposo, “Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 19, no. 4, pp. 213–228, 2018, doi: 10.1038/nrm.2017.125.
- [75] Z. Andreu and M. Yáñez-Mó, “Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function,” *Front. Immunol.*, vol. 5, no. SEP, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00442.
- [76] R. Crescitelli *et al.*, “Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 2, no. 1, 2013, doi: 10.3402/jev.v2i0.20677.
- [77] B. M. Rothen-Rutishauser, E. Ehler, E. Perriard, J. M. Messerli, and J. C. Perriard, “Different Behaviour of the Non-sarcomeric Cytoskeleton in Neonatal and Adult Rat Cardiomyocytes,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 30, no. 1, pp. 19–31, Jan. 1998, doi: 10.1006/JMCC.1997.0596.

- [78] G. Calmettes, S. A. John, J. N. Weiss, and B. Ribalet, "Hexokinase–mitochondrial interactions regulate glucose metabolism differentially in adult and neonatal cardiac myocytes," *J. Gen. Physiol.*, vol. 142, no. 4, pp. 425–436, Oct. 2013, doi: 10.1085/JGP.201310968.
- [79] T. E. Cullingford, M. J. Butler, A. K. Marshall, E. L. Tham, P. H. Sugden, and A. Clerk, "Differential regulation of Krüppel-like factor family transcription factor expression in neonatal rat cardiac myocytes: Effects of endothelin-1, oxidative stress and cytokines," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1783, no. 6, pp. 1229–1236, Jun. 2008, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2008.03.007.
- [80] V. Ravi, A. Jain, A. Taneja, K. Chatterjee, and N. R. Sundaresan, "Isolation and Culture of Neonatal Murine Primary Cardiomyocytes," *Curr. Protoc.*, vol. 1, no. 7, p. e196, Jul. 2021, doi: 10.1002/cpz1.196.
- [81] A. K. Jonassen, B. K. Brar, O. D. Mjøs, M. N. Sack, D. S. Latchman, and D. M. Yellon, "Insulin administered at reoxygenation exerts a cardioprotective effect in myocytes by a possible anti-apoptotic mechanism," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 32, no. 5, pp. 757–764, May 2000, doi: 10.1006/jmcc.2000.1118.
- [82] H. E. Bøtker *et al.*, "Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection," *Basic Research in Cardiology*, vol. 113, no. 5, p. 39, 2018, doi: 10.1007/s00395-018-0696-8.
- [83] S. M. Humphrey and J. B. Gavin, "The effect of coronary pressure on

contracture and vascular perfusion in the hypoxic isolated rat heart\*),” 1984.

- [84] F. Padilla *et al.*, “L-Arginine administration prevents reperfusion-induced cardiomyocyte hypercontracture and reduces infarct size in the pig,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 46, no. 3, pp. 412–420, 2000, doi: 10.1016/S0008-6363(00)00048-1.
- [85] J. A. Barrabés *et al.*, “Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ: Relation to hypercontracture and myocardial necrosis,” *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 431, no. 4, pp. 519–526, 1996, doi: 10.1007/bf02191898.
- [86] O. G. de Jong *et al.*, “Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 1, no. 1, pp. 1–12, 2012, doi: 10.3402/jev.v1i0.18396.
- [87] Y. Yue *et al.*, “Interleukin-10 Deficiency Alters Endothelial Progenitor Cell-Derived Exosome Reparative Effect on Myocardial Repair via Integrin-Linked Kinase Enrichment,” *Circ. Res.*, pp. 315–329, Jan. 2020, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315829.
- [88] W. Gao *et al.*, “Exosomes derived from mature dendritic cells increase endothelial inflammation and atherosclerosis via membrane TNF- $\alpha$  mediated NF- $\kappa$ B pathway,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 20, no. 12, pp. 2318–2327, 2016, doi: 10.1111/jcmm.12923.
- [89] L. Chen, L. Hu, Q. Li, J. Ma, and H. Li, “Exosome-encapsulated miR-505 from ox-LDL-treated vascular endothelial cells aggravates atherosclerosis by

inducing NET formation,” *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 51, no. 12, pp. 1233–1241, 2019, doi: 10.1093/abbs/gmz123.

- [90] S. He, C. Wu, J. Xiao, D. Li, Z. Sun, and M. Li, “Endothelial extracellular vesicles modulate the macrophage phenotype: Potential implications in atherosclerosis,” *Scand. J. Immunol.*, vol. 87, no. 4, 2018, doi: 10.1111/sji.12648.
- [91] R. M. O’Connell, A. A. Chaudhuri, D. S. Rao, and D. Baltimore, “Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 17, pp. 7113–7118, 2009, doi: 10.1073/pnas.0902636106.
- [92] D. Zhou, L. Chen, K. Yang, H. Jiang, W. Xu, and J. Luan, “SOCS molecules: The growing players in macrophage polarization and function,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 36, pp. 60710–60722, Aug. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.19940.
- [93] K. I. Hirata *et al.*, “Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C,” *Hypertension*, vol. 25, no. 2, pp. 180–185, 1995, doi: 10.1161/01.hyp.25.2.180.
- [94] E. Amin *et al.*, “Rho-kinase: Regulation, (dys)function, and inhibition,” *Biological Chemistry*, vol. 394, no. 11. Biol Chem, pp. 1399–1410, Nov. 2013, doi: 10.1515/hsz-2013-0181.
- [95] K. W. Witwer and C. Théry, “Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature,” *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 8, no. 1. 2019, doi:

10.1080/20013078.2019.1648167.

- [96] Y. Yuana, J. Levels, A. Grootemaat, A. Sturk, and R. Nieuwland, "Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation," 2014, doi: 10.3402/jev.v3.23262.
- [97] G. V. Shelke, C. L. Sser, Y. S. Gho, J. Lö Tvall, and J. Lö, "Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum," 2014, doi: 10.3402/jev.v3.24783.
- [98] J. Webber and A. Clayton, "How pure are your vesicles?," 2013, doi: 10.3402/jev.v2i0.19861.
- [99] K. Takov, D. M. Yellon, S. M. Davidson, and R. M. Schiffelers, "Confounding factors in vesicle uptake studies using fluorescent lipophilic membrane dyes; Confounding factors in vesicle uptake studies using fluorescent lipophilic membrane dyes," 2017, doi: 10.1080/20013078.2017.1388731.
- [100] K. Sidhom, P. O. Obi, and A. Saleem, "A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option?," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 18. pp. 1–19, 2020, doi: 10.3390/ijms21186466.
- [101] J. Wang *et al.*, "The Novel Methods for Analysis of Exosomes Released from Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells," *Stem Cells Int.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/2639728.
- [102] C. Lässer, M. Eldh, and J. Lötval, "Isolation and characterization of RNA-

containing exosomes,” *J. Vis. Exp.*, no. 59, pp. 1–6, 2012, doi: 10.3791/3037.

- [103] V. Champattanachai, R. B. Marchase, and J. C. Chatham, “Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2,” *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 294, no. 6, Jun. 2008, doi: 10.1152/AJPCELL.00456.2007/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH00060855960007.JPG.
- [104] M. Shen *et al.*, “Resveratrol Attenuates Ischemia/Reperfusion Injury in Neonatal Cardiomyocytes and Its Underlying Mechanism,” 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0051223.
- [105] R. D. Rakhit, M. H. Mojet, M. S. Marber, and M. R. Duchon, “Mitochondria as Targets for Nitric Oxide-Induced Protection During Simulated Ischemia and Reoxygenation in Isolated Neonatal Cardiomyocytes,” 2001. [Online]. Available: <http://www.circulationaha.org>.
- [106] N. Motayagheni, “Modified Langendorff technique for mouse heart cannulation: Improved heart quality and decreased risk of ischemia,” *MethodsX*, vol. 4, pp. 508–512, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.mex.2017.11.004.
- [107] A. Klein, B. Bayrau, Y. Miao, and M. Gu, “Isolation of endocardial and coronary endothelial cells from the ventricular free wall of the rat heart,” *J. Vis. Exp.*, vol. 2020, no. 158, p. e61126, Apr. 2020, doi: 10.3791/61126.
- [108] S. Luo, A. H. Truong, and A. Makino, “Isolation of mouse coronary endothelial cells,” *J. Vis. Exp.*, vol. 2016, no. 113, Jul. 2016, doi:

10.3791/53985.

- [109] B. Pratumvinit, K. Reesukumal, K. Janebodin, N. Ieronimakis, and M. Reyes, “Isolation, characterization, and transplantation of cardiac endothelial cells,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/359412.
- [110] C.-Y. Zeng, J. Xu, X. Liu, and Y.-Q. Lu, “Cardioprotective Roles of Endothelial Progenitor Cell-Derived Exosomes,” *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 8, p. 717536, 2021, doi: 10.3389/fcvm.2021.717536.
- [111] A. S. Kalluri *et al.*, “Single-Cell Analysis of the Normal Mouse Aorta Reveals Functionally Distinct Endothelial Cell Populations,” *Circulation*, vol. 140, no. 2, pp. 147–163, 2019, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038362.
- [112] S. J. Dumas, M. García-Caballero, and P. Carmeliet, “Metabolic Signatures of Distinct Endothelial Phenotypes,” *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 31, no. 8. Elsevier Inc., pp. 580–595, Aug. 01, 2020, doi: 10.1016/j.tem.2020.05.009.
- [113] M. Shaik, M. Shaik, and S. Gangapatnam, “Analysis of endothelial progenitor subpopulation cells, oxidative DNA damage, and their role in coronary artery disease,” *Biomed. Biotechnol. Res. J.*, vol. 2, no. 2, p. 136, 2018, doi: 10.4103/bbrj.bbrj\_41\_18.
- [114] D. Bouïs, G. A. P. Hospers, C. Meijer, G. Molema, and N. H. Mulder, “Endothelium in vitro: A review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research,” *Angiogenesis*, vol. 4, no. 2. pp. 91–102, 2001, doi: 10.1023/A:1012259529167.

- [115] M. Boerma, G. R. Burton, J. Wang, L. M. Fink, R. E. McGehee, and M. Hauer-Jensen, "Comparative expression profiling in primary and immortalized endothelial cells: Changes in gene expression in response to hydroxy methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition," *Blood Coagul. Fibrinolysis*, vol. 17, no. 3, pp. 173–180, Apr. 2006, doi: 10.1097/01.mbc.0000220237.99843.a1.
- [116] X. Sun and M. W. Feinberg, "Vascular Endothelial Senescence: Pathobiological Insights, Emerging Long Noncoding RNA Targets, Challenges and Therapeutic Opportunities," *Frontiers in Physiology*, vol. 12, 2021, doi: 10.3389/fphys.2021.693067.
- [117] J. A. Riquelme *et al.*, "Increased production of functional small extracellular vesicles in senescent endothelial cells," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 24, no. 8, pp. 4871–4876, Apr. 2020, doi: 10.1111/jcmm.15047.
- [118] J. A. Riquelme *et al.*, "Increased production of functional small extracellular vesicles in senescent endothelial cells," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 24, no. 8, pp. 4871–4876, 2020, doi: 10.1111/jcmm.15047.
- [119] P. Kleinbongard, H. E. Bøtker, M. Ovize, D. J. Hausenloy, and G. Heusch, "Co-morbidities and co-medications as confounders of cardioprotection— Does it matter in the clinical setting?," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 177, no. 23, pp. 5252–5269, 2019, doi: 10.1111/bph.14839.
- [120] M. Wojciechowska, M. Zarebiński, P. Pawluczuk, and D. Szukiewicz, "Decreased effectiveness of ischemic heart preconditioning in the state of

chronic inflammation,” *Med. Hypotheses*, vol. 85, no. 5, pp. 675–679, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.mehy.2015.08.008.