



Fundació
La Marató de TV3

21º SIMPOSIUM
Enfermedades del corazón



INVESTIGACIÓN DE INTERACTORES GENÉTICOS Y MECANÍSTICOS EN CARDIOMIOPATÍA FAMILIAR MEDIANTE EL MODELADO AVANZADO DE ENFERMEDADES

Ángel Raya Chamorro

Centre Medicina Regenerativa de Barcelona

José Luís de la Pompa Mínguez

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III - Madrid

Juan Ramón Gimeno Blanes

Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca - Múrcia

1. Resumen

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) es la enfermedad cardíaca hereditaria más frecuente y afecta al 0,2% de la población. La HCM es una enfermedad marcada por una heterogeneidad fenotípica y genotípica. La miocardiopatía de no compactación ventricular izquierda (LVNC) se asocia frecuentemente con HCM, pero se desconoce si HCM y LVNC son entidades de enfermedades genéticamente o mecánicamente conectadas. Nuestro objetivo principal es identificar los interactores genéticos y de mecanismo que vinculan HCM y LVNC, lo que podría explicar la comorbilidad presente en un subconjunto de pacientes con HCM, así como arrojar luz sobre la relación genotipo-fenotipo actualmente poco conocida en estas cardiomiopatías hereditarias. Para este propósito, proponemos generar:

- 1) Datos clínicos e imágenes de una gran cohorte de pacientes con MCH (1.090), que se analizarán para establecer la prevalencia de LVNC.
- 2) Secuenciación de nueva generación (exoma) en un grupo seleccionado de 50 familias con HCM y LVNC, seguida de análisis de patogenicidad y cosegregación y por correlación genotipo-fenotipo.
- 3) Modelos de enfermedad avanzada que utilizan líneas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) de pacientes con HCM y LVNC con mutaciones conocidas, y organoides de miocardio-endocardio generados *in vitro*.
- 4) Los interactivos putativos que unen HCM y LVNC, que se encuentran en estudios genéticos de pacientes y análisis de mecanismo en modelos avanzados de enfermedades, se validarán funcionalmente utilizando líneas celulares derivadas de pacientes y peces cebras.

Nuestros resultados deberían conseguir lo siguiente:

- 1) Identificar variantes genéticas que predispongan a los pacientes con MCH a desarrollar LVNC.

2) Identificar mecanismos patogénicos que cooperan en los cardiomiocitos derivados del paciente para desarrollar fenotipos HCM o LVNC.

3) Proporcionar una comprensión más clara de la relación genotipo-fenotipo en las cardiomiopatías hereditarias.

2. Resultados

Objetivo específico 1: identificación de variantes genéticas que predisponen a los pacientes con MCH a manifestar LVNC

Tarea específica 1.1: selección de pacientes para análisis de imágenes

El socio 3 produjo y revisó una lista de pacientes con MCH con imágenes de eco de alta calidad (grupo 1-Eco, n = 800), de los cuales el 29% cumplieron con los criterios de LVNC. También se produjo una lista de pacientes con imágenes CMR disponibles para su evaluación tradicional y automática (*software* dedicado) (grupo 1-CMR, n = 299). Todos los casos en este grupo fueron revisados y clasificados según si cumplían los criterios actuales de LVNC (27%) o no (73%). También se produjo una lista adicional de portadores silenciosos (sin HVI) con CMR disponible (grupo 2, n = 35), completando así la tarea de selección de pacientes.

Tarea específica 1.2: imagen cardíaca

El socio 3 completó la revisión de las imágenes almacenadas de la ecocardiografía (n = 1.090) (Xcelera) y la resonancia magnética cardíaca (n = 424) (PACS y Xcelera) de pacientes con MCH. Se elaboraron las listas de pacientes de los 3 grupos y se recopiló su información clínica en una base de datos dedicada. Se revisó el 100% de las imágenes ecocardiográficas y los individuos se clasificaron según el criterio de LVNC y no LVNC. Se revisó el 100% de las imágenes de CMR y los pacientes se clasificaron de manera similar según si cumplían o no con los criterios de CMV de LVNC. Las imágenes CMR también se recopilaron y se convirtieron al formato de archivo apropiado para la medición automatizada de trabeculaciones. El ingeniero contratado completó el análisis de estas imágenes.

Tarea específica 1.3: selección de pacientes para estudios genéticos

Según los resultados preliminares del análisis de imágenes cardíacas, el socio 3 produjo una lista de 50 familias candidatas con HCM y LVNC. La lista final se anotó completamente con los resultados de la trabeculación del análisis de imágenes CMR automatizado con un *software* dedicado. Para el análisis del exoma, se priorizaron las familias con un mayor número de individuos afectados, y sus muestras fueron recolectadas, almacenadas en un biobanco (IMIB) y se extrajo el ADN. En coordinación con el socio 2, otras 50 familias no relacionadas con LVNC fueron seleccionadas para una secuenciación profunda, sus muestras fueron recolectadas, almacenadas en un biobanco (IMIB) y se extrajo el ADN.

Tarea específica 1.4: secuenciación de próxima generación

La secuenciación del exoma se completó en un esfuerzo coordinado por los socios 1, 2 y 3 en muestras de casos índice y familiares evaluados de las 50 familias seleccionadas inicialmente con HCM-LVNC, y de casos índice y familiares evaluados de las 50 familias adicionales con LVNC. Las variantes detectadas se confirmaron mediante secuenciación de Sanger. Los socios 2 y 3 realizaron los estudios de patogenicidad de las variantes, cosegregación y correlaciones genotipo/fenotipo. Estas actividades condujeron a la identificación de genes candidatos y a la generación de los siguientes modelos de ratones (véanse más detalles en la tarea específica 3.1): $Bcl7a^{AG,GA/+}$, $Mib1^{V943F/+}$, $Cep192^{T1522M/+}$ y $Tmx3^{F191X/+}$.

Objetivo específico 2: generación de modelos avanzados de enfermedades para investigar las interacciones mecanicistas entre HCM y LVNC.

Tarea específica 2.1: Edición del genoma de iPSC específico del paciente

Las líneas iPSC que representan a dos pacientes con MCH que portaban la mutación K600fs en MYBPC3, disponibles en el laboratorio del socio 1, fueron corregidas por genes mediante la edición de genes mediada por CRISPR/Cas9 para generar controles isogénicos. Los iPSC específicos del paciente que albergan la mutación $MIB1^{R530X}$ se editaron de manera similar para producir controles isogénicos. Un iPSC de tipo salvaje utilizado como control también fue editado con éxito para incorporar la mutación $MIB1^{R530X}$. La corrección genética de las líneas iPSC específicas del paciente que portaban la mutación $MIB1^{V943F}$ presentaba dificultades adicionales. Para abordar esto, el socio 1 probó e implementó una plataforma robusta basada en la nucleofección de la

proteína Cas9 y los sgRNA modificados químicamente para una mayor eficiencia de la edición del genoma. Además, el proceso de selección se optimizó aún más para la selección de clones iPSC editados con éxito. Estas modificaciones dieron como resultado la generación exitosa de controles isogénicos para líneas iPSC que portaban la mutación MIB1^{V943F}, la introducción de la mutación MIB1^{V943F} en el control iPSC y la introducción de la mutación MYBPC3^{K600fs} en heterocigosis en dos hiPSC de control de tipo salvaje diferentes. La optimización de la edición del genoma que contiene grandes inserciones se realizó comparando diferentes tamaños de brazos de homología y formatos de plantillas. Para este propósito, se desarrolló una línea de reportero fluorescente hiPSC para NKX2.5 (el principal factor de transcripción expresado en progenitores cardíacos). La purificación de poblaciones progenitoras cardíacas tempranas fue instrumental para el desarrollo de organoides cardíacos (véase la tarea específica 2.4).

Tarea específica 2.2: diferenciación cardíaca de iPSC específica del paciente

El socio 1 logró la diferenciación cardíaca de control, MYBPC3^{K600fs} y MIB1^{R530X} mutante iPSC usando condiciones de diferenciación de monocapa y en capas de alimentación de células endocárdicas ventriculares embrionarias de ratón (MEVEC, proporcionadas por el socio 2). El grado de diferenciación se examinó usando qRT-PCR de varios marcadores cardíacos y se consideró demasiado inmaduro. Para superar este problema, implementamos varios sistemas para aumentar la maduración cardíaca:

- 1) El uso de factores y hormonas procardiogénicos, como la triyodotironina (T3) en combinación con el factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1) y la dexametasona, lo que resultó en la aparición de cardiomiocitos con respuesta hipertrófica aumentada y mayor capacidad de contracción.
- 2) El uso de un biorreactor paralelo para perfusión continua y estimulación eléctrica y registro de construcciones de macroescala cardíaca.

Usando una combinación de estos métodos, el socio 1 configuró las condiciones para detectar fenotipos relacionados con HCM en cardiomiocitos de iPSC que llevan la mutación MYBPC3^{K600fs}, y obtuvo muestras durante la diferenciación cardíaca de las líneas iPSC específicas del paciente y los controles isogénicos descritos en la tarea específica 2.1.

Tarea específica 2.3: perfiles de expresión durante la diferenciación cardíaca

Las hiPSC derivadas de pacientes con HCM o LVNC se diferenciaron en cardiomiocitos junto con sus líneas isogénicas corregidas por CRISPR. Se tomaron muestras en diferentes puntos de tiempo para el perfil de expresión génica. Los análisis preliminares identificaron importantes biomarcadores hipertróficos, como NPPA, regulados por aumento en los cardiomiocitos derivados de HCM iPSC, destacando el potencial de este sistema para recapitular los fenotipos del paciente. Además, el ARN total extraído de las muestras de cardiomiocitos en diferentes momentos del proceso de diferenciación se controló por calidad y se envió al socio 2 para elaborar el perfil de expresión génica por RNAseq. Los resultados de estos análisis se están comparando actualmente con los de los modelos de ratón (véase la tarea específica 3.1) y se enviarán para su publicación en breve.

Tarea específica 2.4: análisis de organoides miocardio-endocardio

El socio 1 ha desarrollado un sistema *in vitro* de organoides cardíacos en 3D que se asemeja a las primeras etapas del desarrollo cardíaco. Se basa en el cocultivo de progenitores cardíacos tempranos y células endoteliales ventriculares. Utilizando el indicador de fluorescencia descrito en la tarea específica 2.1, hemos podido cocultivar progenitores cardíacos purificados con FACS junto con células endoteliales ventriculares en esferoides 3D. Las células endoteliales ventriculares pudieron integrarse dentro de los cardiomiocitos y promovieron su crecimiento y maduración. La generación de cultivos organoides cardíacos en 3D se probó con cardiomiocitos derivados del control de hiPSC de tipo salvaje y se comparó con iPSC que porta la mutación MIB1^{R530X} para una validación adicional. En este caso, encontramos que las señales secretadas dentro del sistema de cocultivo disminuyeron en los mutantes, lo que destaca el uso potencial de este sistema de cocultivo 3D para la validación de objetivos adicionales.

Objetivo específico 3: validación funcional de supuestos interactores genéticos o mecanísticos

Tarea específica 3.1: validación funcional de variantes genéticas raras

Como se describe en la tarea específica 1.4, nuestros análisis de secuenciación del exoma identificaron dos nuevos genes candidatos que causan LVNC en la familia extendida que portan la mutación MIB1^{R530X}: APCDD1 y ASXL3, para los cuales se

encontraron mutaciones sin sentido que se segregaron conjuntamente con LVNC y con la mutación en MIB1. La validación funcional de estos resultados se realizó mediante la generación de nuevas líneas de ratones genéticamente modificados utilizando la edición de genes basada en CRISPR/Cas9. Específicamente, los alelos mutantes *Apcdd1* y *Asxl3* se generaron por microinyección de sgRNA, proteína Cas9 y ssODNs en los pronúcleos de embriones de ratón en etapa de una célula que llevan el alelo *Mib1*^{R530X}. El análisis de estos ratones mutantes triples se está finalizando actualmente, pero nuestros resultados hasta ahora indican que los animales heterocigotos triples muestran un fenotipo LVNC. En la familia que portaba la mutación *MIB1*^{V943F}, identificamos tres mutaciones cosegregantes en los genes *CEP192*, *BCL7A* y *TMX3*. La validación funcional se realizó generando líneas de ratón que portaban las mutaciones *Cep192*, *Tmx3* o *Bcl7A* independientemente o en combinación con el alelo *Mib1*^{V943F}. Si bien la caracterización detallada de estos modelos de ratones se extenderá más allá de la línea de tiempo de este proyecto, nuestros datos preliminares indican que los ratones triples heterocigotos mutantes para *Mib1*^{V943F}, *Cep192* y *Tmx3* desarrollan anomalías de la válvula cardíaca con alta penetración. En conjunto, nuestros resultados respaldan la hipótesis de que la LVNC (al menos la que involucra alteraciones en la señalización de *notch*) tiene una herencia autosómica dominante oligogénica, en lugar de monogénica.

Tarea específica 3.2: validación funcional de las vías de señalización

Hemos generado ratones con mutaciones dirigidas en *MIB1* idénticas a los alelos identificados en pacientes con LVNC (Val943Phe y Arg530X), utilizando la tecnología CRISPR/Cas9. Hemos establecido líneas endogámicas que llevan ambas mutaciones y las hemos criado con el alelo *Mib1*^{flox}. Curiosamente, la mutación R530X combinada en trans con el alelo *floxed* inactivado en el miocardio (*Mib1*^{R530X}/*Mib1*^{flox}; cTnT-Cre/+) causa LVNC, mientras que la mutación V943F no causa LVNC en ninguna condición (V943F /+, V943F/V943F o *Mib1*^{V943F/flox}; cTnT-Cre/+). Ya hemos criado ambos genotipos con los alelos nulos para *Notch1* y *RBPJ*, el receptor principal y el efector único de la vía *notch*, en un intento de examinar si estos alelos *Mib1* comprometen la función de señalización de *notch* al reducir la cantidad de función *notch* de tipo salvaje, en un experimento típico de sensibilización genética. Planeamos terminar esta parte del proyecto en la primavera del 2020 y luego presentar los resultados para su publicación.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Relevancia

Este proyecto ha conseguido que avanzara nuestro conocimiento acerca de los mecanismos moleculares subyacentes a la LVNC y las cardiomiopatías relacionadas, y se espera que ayude al diseño de estrategias preventivas o terapéuticas para estas enfermedades prevalentes. En particular, el desarrollo exitoso de este proyecto ha generado nuevos conocimientos sobre las bases moleculares y celulares de HCM y LVNC: se conocía muy poco acerca del proceso de compactación trabecular y el inicio de la hipertrofia cardíaca y cómo su alteración puede causar cardiomiopatía. Nuestros resultados han contribuido a mejorar nuestra comprensión de estas dos enfermedades y, por lo tanto, al diseño de nuevos enfoques diagnósticos y terapéuticos.

Posibles implicaciones futuras

- Nuestros resultados se pueden aplicar para mejorar los tratamientos y la decisión clínica: nuestro trabajo ha contribuido al establecimiento de criterios genéticos y de imágenes para el diagnóstico de HCM y LVNC y una mejor estratificación del paciente.
- Este proyecto ha generado información valiosa para tomar decisiones o adoptar políticas administrativas y para realizar el asesoramiento genético preciso para LVNC, lo que resulta en un mejor manejo del paciente que ayuda a racionalizar y reducir los costes para nuestro sistema nacional de salud.
- La implementación de este proyecto debería ayudar a mejorar la calidad de vida de los pacientes con LVNC y la satisfacción general del paciente. Nuestra investigación ha contribuido a mejorar el diagnóstico genético de HCM y LVNC y a gestionar mejor a los pacientes, en base a la nueva información genética y de imagen disponible.

4. Bibliografía científica generada

Publicaciones

Casanova JD, González-Carrillo J, Martín-Jiménez J, Cuenca-Muñoz J, Burillo E, de la Pompa JL, Raya A, Gimeno-Blanes JR, Sabater-Molina M, Bernabé-García G.

Trabeculated myocardium in Hypertrophic Cardiomyopathy.

Clinical implications (en revisión).

2019

Benzoni P, Campostrini G, Bertini V, Marchina E, Iascone M, Ahlberg G, Olesen MS, Crescini E, Mora C, Bisleri G, Muneretto C, Ronca R, Presta M, Poliani PL, Piovani G, Verardi R, Di Pasquale E, Consiglio A, Raya A, Baruscotti M, DiFrancesco D, Memo M, Barbuti A, Dell'Era P.

Human iPSC modeling of a familial form of atrial fibrillation reveals a gain of function of If and ICaL in patient-derived cardiomyocytes.

Cardiovasc Res, 2019, pii: cvz217. doi: 10.1093/cvr/cvz217. IF ISI: 6.290. PMID: 31504264.

Castaño J, Aranda S, Bueno C, Calero-Nieto FJ, Mejia-Ramirez E, Blanco E, Wang X, Prieto C, Zabaleta L, Rovira M, Gottgens B, Di Croce L, Menendez P, Raya A, Giorgetti A.

GATA2 directly represses cardiac fates to promote hematopoietic specification of human mesoderm.

Stem Cell Rep, 2019, 13:1-15. IF ISI: 5.499. PMID: 31402335.

Garcia-Puig A, Mosquera, JL, Jimenez-Delgado S, Garcia-Pastor C, Jorba I, Navajas D, Canals F, Raya A.

Proteomics analysis of extracellular matrix remodeling during zebrafish heart regeneration.

Mol Cell Proteomics, 2019, 18(9):1745-1755. IF ISI: 4.828. PMID: 31221719.

Travisano SI, Oliveira SL, Prados B, Grego-Bessa J, Piñeiro-Sabarís R, Bou V, Gómez MJ, Sánchez-Cabo F, MacGrogan D, de la Pompa JL.

Coronary arterial development is regulated by a Dll4-Jag1-EphrinB2 signaling cascade.

Elife 8, 2019. pii: e49977. IF ISI: 7.551. PMID: 31789590.

Torregrosa-Carrión R, Luna-Zurita L, García-Marqués F, D'Amato G, Piñeiro-Sabarís R, Bonzón-Kulichenko E, Vázquez J, de la Pompa JL.

NOTCH activation promotes valve formation by regulating the endocardial secretome.
Mol Cell Proteomics, 2019, 18(9):1782-1795. IF ISI: 4.828. PMID: 31789590.

Valls-Margarit M, Iglesias-García O, Di Guglielmo C, Sarlabous L, Paoli R, Comelles J, Blanco D, Jimenez-Delgado S, Castillo-Fernández O, Samitier J, Jané R, Martínez E, Raya A.

Engineered macroscale cardiac constructs elicit human myocardial tissue-like functionality.

Stem Cell Rep, 2019, 13:207-20. IF ISI: 5.499. PMID: 31231023.

Uroz M, Garcia-Puig A, Tekeli I, Elosegui-Artola A, Albertazzi L, Roca-Cusachs P, Raya A, Trepát X. *Traction forces at the cytokinetic ring regulate cell division and polyploidy in the migrating zebrafish epicardium.*

Nat Mat, 2019, doi: 10.1038/s41563-019-0381-9. IF ISI: 38.887. PMID: 31160803.

2018

Del Monte-Nieto G, Ramialison M, Adam AAS, Wu B, Aharonov A, D'Uva G, Bourke LM, Pitulescu ME, Chen H, de la Pompa JL, Shou W, Adams RH, Harten SK, Tzahor E, Zhou B, Harvey RP.

Control of cardiac jelly dynamics by NOTCH1 and NRG1 defines the building plan for trabeculation.

Nature, 2018, 557(7705):439-445. IF ISI: 43.70. PMID: 29743679.

Eley L, Alqahtani A, MacGrogan D, Salguero-Jiménez A, Richardson RV, Murphy L, Sintés Rodríguez San Pedro M, Tiurma S, McCutcheon L, Gilmore A, de la Pompa JL, Chaudhry B, Henderson DJ. *A novel source of arterial valve cells linked to bicuspid aortic valve without raphe in mice.*

Elife 7, 2018, pii:e34110. IF ISI: 7.551. PMID: 29956664.

Notari M, Ventura-Rubio A, Bedford-Guaus SJ, Jorba I, Mulero L, Navajas D, Martí M, Raya A.

The local microenvironment limits the regenerative potential of the mouse neonatal heart.
Sci Adv, 2018, 4:eaao5553. IF ISI: 12.804. PMID: 29732402.

MacGrogan D, Münch J, De la Pompa JL.

Notch and interacting signalling pathways in cardiac development, disease, and regeneration.

Nat Rev Cardiol, 2018, 15(11):686-704. IF ISI: 17.42. PMID: 30287945.

Matamoros-Angles A, Gayosso LM, Richaud-Patin Y, di Domenico A, Vergara C, Hervera A, Sousa A, Fernández-Borges N, Consiglio A, Gavín R, Lopez de Maturana R, Ferrer I, López de Munain A, Raya A*, Castilla J*, Sánchez-Pernaute R*, del Río JA*.

iPS cell cultures from a Gerstmann-Sträussler-Scheinker patient with the Y218N PRNP mutation recapitulate Tau pathology.

Mol Neurobiol, 2018, 55:3033-48. IF ISI: 4.586. PMID: 28466265.

Papoutsi T, Luna-Zurita L, Prados B, Zaffran S, de la Pompa JL.

Bmp2 and Notch cooperate to pattern the embryonic endocardium.

Development, 2018, 145(13). pii: dev163378. IF ISI: 5.763. PMID: 29853617.

Prados B, Gómez-Apiñániz P, Papoutsi T, Luxán G, Zaffran S, Pérez-Pomares JM, de la Pompa JL.

Myocardial Bmp2 gain causes ectopic EMT and promotes cardiomyocyte proliferation and immaturity.

Cell Death Dis, 2018, 9(3):399. doi: 10.1038/s41419-018-0442-z. IF ISI: 5.959.

PMID: 29540665.

Salguero-Jiménez A, Grego-Bessa J, D'Amato G, Jiménez-Borreguero LJ, de la Pompa JL.

Myocardial Notch1-Rbpj deletion does not affect NOTCH signaling, heart development or function.

PLoS One, 2018, 13(12):e0203100. IF ISI: 2.776. PMID: 30596653.

2017

Gálvez-Montón C, Soler-Botija C, Iborra-Egea O, Díaz-Güemes I, Martí M, Iglesias-García O, Prat-Vidal C, Crisóstomo V, Llucà-Valldeperas A, Perea-Gil I, Roura S, Sánchez-Margallo FM, Raya A, Bayes-Genis A.

Preclinical safety evaluation of allogeneic iPS cell-based therapy in a swine model of myocardial infarction.

Tissue Eng Part C Methods, 2017, 23:736-44. IF ISI: 2.638. PMID: 28699384.

Pulecio J, Verma N, Mejía-Ramírez E, Huangfu D, Raya A.
CRISPR/Cas9-based engineering of the epigenome.
Cell Stem Cell, 2017, 21:431-47. IF ISI: 23.394. PMID: 28985525.

Tekeli I, Garcia-Puig A, Notari M, García-Pastor C, Aujard I, Jullien L, Raya A.
Fate predetermination of cardiac myocytes during zebrafish heart regeneration.
Open Biol, 2017, 7. pii: 170116. doi: 10.1098/rsob.170116. IF ISI: 3.890. PMID:
28659386.

2016

Pulecio J, Alejo-Valle O, Capellera-Garcia S, Vitaloni M, Rio P, Mejía-Ramírez E, Caserta I, Bueren JA, Flygare J, Raya A.
Direct conversion of fibroblasts to megakaryocyte progenitors.
Cell Rep, 2016, 17(3):671-683. IF ISI: 8.282. PMID: 27732845.

Tekeli I, Aujard I, Trepas X, Jullien L, Raya A*, Zalvidea D*.
Long-term in vivo single cell lineage tracing of deep structures using three-photon activation.
Light Sci Appl, 2016, 5: e16084. IF ISI: 14.098. PMID: 30167169.

Tesis doctorales

Development of a biomimetic mechanical stimulation system to improve the maturation of human iPS-derived myocardial grafts, de Juan Crespo Santiago, Universitat de Barcelona, 21/07/2016; excelente *cum laude*.

Biotechnological approaches to cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells, de Claudia Di Guglielmo, Universitat de Barcelona, 09/02/2016; excelente *cum laude*.

Bioengineering approach to study the role of cell migration during zebrafish heart regeneration, de Isil Tekeli, Universitat de Barcelona, 03/02/2016; excelente *cum laude*.

Development of an advanced 3D culture system for human cardiac tissue engineering, de Maria Valls Margarit, Universitat de Barcelona, 07/07/2017; excelente *cum laude*.

Coronary vessel development in the mouse: Role of Notch signaling, de Stanislao Travisano, Universidad Autónoma de Madrid, 15/10/2018; excelente *cum laude*.

Study of extracellular matrix remodeling and the role of periostin b during zebrafish heart regeneration, de Anna Garcia-Puig, Universitat de Barcelona, 22/03/2019; excelente *cum laude*.

Role of Nrg1 in mouse heart development, de Paula Gómez Apiñániz, Universidad Autónoma de Madrid; 28/06/2019; excelente *cum laude*.

Role of caveolin-1 and midkine-a in zebrafish heart regeneration, de Dimitrios Grivas; Universidad Autónoma de Madrid, 19/12/2019; excelente *cum laude*.

Modelling the heterogeneity and complex inheritance of Left Ventricular Non-Compaction, de Marcos Sigüero-Alvarez; Universidad Autónoma de Madrid, 17/01/2020; excelente *cum laude*.