



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

MEDIKUNTZA  
ETA ERIZAINZA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE MEDICINA  
Y ENFERMERÍA

Gradu Amaierako Lana

Medikuntzako Gradua

# ZELULA AMA BIDEZKO TERAPIA GARUN INFARTUAN ETA PATOLOGIA HIPOXIKO-ISKEMIKOAN

Egilea:

Miren Arbulu Astorkia

Zuzendaria:

Gaskon Ibarretxe Bilbao

Abraham Martín

© 2023, Miren Arbulu Astorkia

Leioa, 2023ko Aprilaren 24a

## **AURKIBIDEA**

<b>LABURPENA</b> .....	II
1. SARRERA.....	1
1.1. IKTUSA.....	1
1.1.1. Kontzeptu orokorrak: Sailkapena.....	1
1.1.2. Epidemiologia.....	2
1.1.3. Arrisku faktoreak eta prebentzio neurriak.....	3
1.1.4. Fisiopatologia.....	4
1.1.5. Klinika.....	6
1.1.6. Diagnostikoa.....	7
1.1.7. Tratamendua.....	8
1.2. ZELULA AMA BIDEZKO TERAPIA.....	10
1.2.1. Zelula ama motak.....	11
1.2.2. Txerto motak.....	14
1.2.3. Administrazio bidea.....	14
2. HELBURUA.....	15
3. METODOLOGIA.....	16
4. EMAITZAK ETA EZTABAIDA.....	17
4.1. ENTSEGU PREKLINIKOAK.....	17
4.1.1. Gantz-ehuneko zelula ama mesenkimalak (AD-MSK).....	17
4.1.2. Hezur muineko zelula ama mesenkimalak (BM-MSK).....	21
4.1.3. Hartz muineko zelula amak (DPSC).....	25
4.1.4. Animalia ereduko ikerketen emaitza bateratuak.....	31
4.2. ENTSEGU KLINIKOAK.....	32
4.2.1. Hezur-muineko zelula ama mesenkimalak (BM-MSK).....	35
4.2.2. Gantz-ehuneko zelula ama mesenkimalak (AD-MSK).....	35
4.2.3. Hartz-muineko zelula amak (DPSC).....	36
5. ONDORIOAK.....	37
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	1

## LABURPENA

Iktusa mundu osoko desgaitasun eta heriotza arrazoi nagusienetarikoa da. Nahiz eta aurrerapenak egon diren iktus akutuaren tratamenduan, epe luzeko susperraldia lortzea benetako erronka da. Zelula amak aukera terapeutiko moduan azaldu dira kaltetutako ehunak birsortu eta konpontzeko ahalmenagatik. Iktusaren tratamendu eraginkor baten bilaketa garrantzitsua da zenbait arrazoirengatik: epe luzera hobekuntza funtzionala lortzeko, iktusak momentu akutuan zein epe luzera gizartean sortzen duen karga ekonomikoa murrizteko eta baita gaixotasunaren fisiopatologia hobetu ulertzera heltzeko ere.

Lan honen helburua zelula ama bidezko terapiak iktusean izan ditzakeen efektu terapeutikoak ikertzea da eta etorkizun batean praktika klinikoan erabili ahalko den tratamendu sendagarri potentzial baten bilaketa egitea.

Errebisio honetan gantz-ehunetik deribaturiko zelula ama mesenkimalekin, hezur muineko zelula ama mesenkimalekin eta hortz-muineko zelula amekin egin diren zenbait ikerketa bildu eta emaitzak bateratu dira. Zelula ama bidezko terapiak iskemia ondorengo aldaketa fisiopatologikoen kontra egiteko dituen mekanismo desberdinak deskribatu eta hauen bidezko eragin terapeutiko potentziala proposatu da. Arratoi-ereduko ikerketetan ikusi da iskemia osteko errekupeazioa hobetu dezakeela inflamazioa murriztuz, ehunen birsorkuntza sustatuz eta plastikotasun neurologikoa hobetuz. Ikuspuntu klinikoago batetik, entsegu klinikoetan momentuz argi geratu da zelula ama bidezko terapia segurua dela eta nolabait funtzio neurologikoaren hobekuntza eragiten duela.

Garuneko istripu baskularren tratamendurako zelula ama bidezko terapiaren erabilera estrategia itxaropentsua da eta etorkizun batean iktusaren sendaketarako bide eraginkorra izan daiteke.

**Hitz gakoak:** Zelula amak, Birsortze medikuntza, Iktus iskemikoa, Hortz muineko zelula amak, Zelula ama mesenkimalak, Entsegu klinikoak.

## 1. SARRERA

### 1.1. IKTUSA

Gaur egun garuneko istripu baskular akutua oso kontsulta arrazoi ohikoa da eta patologia hau osatzen duten manifestazio desberdinek larrialdi mediku eta osasun sistema arazo bat suposatzen dute. Mundu mailan heriotzaren bigarren kausa da eta epe luzerako desgaitasunaren lehen kausa, honek tratamendu eta errekupeziorako inpaktu sozioekonomiko handia suposatzen du (1) (2).

Hori dela eta, azken urteetan patologiaren kudeaketarako hainbat terapia eta protokolo garatu dira heriotza-tasa murrizteko, eta etorkizunari begira funtzionalitatea eta bizi kalitatea eskaintzeko (3).

#### 1.1.1. Kontzeptu orokorrak: Sailkapena

Garuneko istripu baskularrek (GIB) edo iktusek alterazioak eragiten dituzte nerbio sistema zentralerako baskularizazioan; oxigeno ekarpen eta oxigeno beharren arteko desoreka agertzen da. Horrek zelulen nekrosia eta apoptosia eragingo du garunehunaren kalte iragankorra edo itzulezina sortuz. Beraz, modu akutuan garunaren disfuntzio fokala azalduko da (3).

Garuneko istripu baskularrak (GIB) bi eratakoak izan daitezke: iskemikoak eta hemorragikoak.

##### 1.1.1.1. Iktus iskemikoak

Iktus iskemikoak ohikoagoak dira (%80-85), honetan garunera odola eramaten duten arterietako bat buxatzen da. Buxadurak irauten duenaren arabera bi iktus iskemiko mota banatu ditzakegu: sintomek 24 ordu baino gutxiago irauten dutenean (orokorrean < 1 ordu), **garuneko istripu iragankorra** (AIT) izango da, honetan disfuntzio neurologikoa laburra da eta neuroirudi tekniketari ez da infartua antzematen. Baina sintoma neurologikoen 24 ordu baino gehiago iruten dutenean edo neuroirudi tekniketari infartuaren ebidentzia ikus daitekenean, iktusak lesio itzulezinak eragin dituenaren seinale izango da eta honi **garuneko infartua** ere deitzen zaio (3).

Iktus iskemikoak hainbat jatorri izan ditzake eta garrantzitsua da hauek behar bezala bereiztea bakoitzari tratamendu espezifiko eskaintzeko (4).

- **Iktus aterotronbotikoak:** ohikoenak dira. Odol-hodi handien (karotida edo orno-arteriak) edo garun barneko arterien arterioesklerosiagatik ematen da. Odol-hodiaren buxadura odolbildu batek lokalki eragindakoa izan daiteke edo hurbileko arteriatan sorturiko odolbildua garunera garraiatzean agertu daiteke (enbolia) (4). Klinika intermitente eta fluktuantea da, minutu-orduak pasatu ahala okerrera egiten du (5).
- **Iktus kardioenbolikoa:** garuneko arteria buxatzen duen odolbilduak bihotzean du jatorri. Kausa ohikoena fibrilazio aurikularra da (4). Klinikari dagokionez, aurrekoan ez bezala defizit nagusia hasieran izaten da (5).
- **Odol-hodi txikiko gaixotasuna edo iktus lakunarra:** garuneko arteria zulatzaile txiki bat buxatzean ematen da, infartu gunea 15 mm baino gutxiagokoa delarik (4) (5).
- **Jatorri zehaztugabea:** kasuen %40-an, ikerketa burutu ez delako edo ikerketa burututa etiologia aurkitu ez delako (4) (5).

#### 1.1.1.2. Iktus hemorragikoak

Iktus hemorragikoak gutxiago ematen diren arren (% 10-15), askoz ere larriagoak dira. Arrazoi desberdinen ondorioz odol-hodi bat haustean gertatzen da, horrek zirkulazio normala eragozteaz gain garuneko eremu batzuk odolez bete eta konpresioz kaltetzen ditu. Jatorri ohikoena hipertentsio arteriala da, adinekoetan angiopatia amiloidea ere sarri ikusten da eta gazteetan malformazio arteriobenosoak (3).

Bi eratako hemorragiak daude apurtutako arteriaren lokalizazioaren arabera: **intraparenkimatosoak** eta **subaraknoideoak** (hemorragia epidural eta subduralak ere badaude baina hauek normalean kausa traumatikoa dute eta desberdinak dira klinika, pronostiko eta tratamendu aldetik) (5).

#### 1.1.2. Epidemiologia

Garuneko istripu baskularra heriotzaren eragile garrantzitsuenetariko bat da mundu mailan. OMS-en datuen arabera 17 miloi pertsonak sufritzen dute GIB urteko, horietatik 6,5 miloi hiltzen dira eta beste 5 miloi desgaitasun batekin geratzen dira (6).

Espanian emakumezkoen artean lehen heriotza arrazoia da eta gizonezkoen artean bigarrena (5).

Gaixotasunaren intzidentziak adinarekin batera gora egiten du modu esponentzian; 10.000 pertsonatik 3 kaltetzen ditu hiru eta laugarren hamarkaden bitartean, eta 1.000 pertsonatik 300 kaltetzera ere heldu izan da zortzigarren eta bederatzigarren hamarkadetan (7).

Sexuari dagokionez, nahiz eta gizonezkoetan intzidentzia altuagoa izan, emakumezkoetan larriagoa izan ohi da menpekotasun handiagoa sortzen duelako, beranduago detektatzen delako eta arrasto txar gehiago uzten dituelako. Horrez gain, bost urteren buruan ohikoagoa da bigarren iktus bat eta baita depresioa garatzea emakumezkoengan (8).

### 1.1.3. Arrisku faktoreak eta prebentzio neurriak

Garuneko istripu baskularra jasateko arrisku faktoreen artean batzuk aldagarriak dira eta beste batzuk ez. Aldagarriak diren arrisku faktoreen artean hurrengoak daude (9) (10):

- **Hipertentsio arteriala:** GIB hemorragiko zein iskemikoa emateko arrisku faktore garrantzitsua da edozein sexu edo adinekoa izanda. Are gehiago, GIB kasuen %40 inguru erlazionatuta dago presio arterial sistolikoa 140 mmHg baino altuagoa izatearekin (7)(11).
- **Kolesterol altua:** hiperkolesterolemiak odol-hodi handien hormetan atherosklerosia eragin dezake GIB iskemikoa izateko arriskua areagotuz. Arrisku altuko baloreak kontsideratzen dira > 240 mg% kolesterol totala, > 100 mg% LDL kolesterola eta < 35 mg% HDL kolesterola. Balore guztietatik erlazio estuena erakusten duena LDL/HDL ratioa da (12).
- **Diabetesa:** diabetesa pairatzen dutenek gaixotasun kardiobaskularrak garatzeko arrisku altuagoa dute. Honen kontrola berebizikoa da, batez ere intsulinarekiko menpekota den diabetesa (tipo I) duten pertsona gazteetan, non arterien lesioa zabal eta zehaztugabea den (13).
- **Tabakoa:** mota guztietako GIB-ekin erlazionatzen da. Adikzioa sortzeaz gain, nikotinak odoleko kolesterola areagotzen du eta tabakoaren keak endotelioan kalte zuzena eragiten du arteriosklerosiaren progresioa erraztuz (14).

- **Obesitatea:** Gainpisu eta obesitateak GIB arriskua areagotu dezakete, bereziki beste arrisku faktore batzuen agerpena sustatzen duelako; diabetesa, hipertentsioa eta kolesterol altua (15).
- **Beste batzuk:** alkoholismoa, sedentarisinoa, bihotzeko gaixotasunak (bihotzekoa, paretako tronboa, fibrilazio aurikularra, bihotz gutxiegitasuna, gaixotasun balbular erreumatikoa, balbula protesiak), legez kontrako droga kontsumoa eta beste zenbait (9).

Arrisku faktore hauen artean garrantzitsuenak tabakismoa eta hipertentsio arteriala dira. Tabakoa uztea da arrisku baskular sistemikoaren murrizketan inpaktu handiena duena, baina iktus arriskuari estuen lotuta dagoen faktorea hipertentsio arteriala da. Bestalde, sedentarisinoa, estresa eta lipidoetan aberatsa den dieta GIB abiarazle izan ohi dira (9)(10).

Arrisku faktore aldagaitzen artean hurrengoak daude:

- **Adina:** faktore garrantzitsuenetarikoa da, iktusa pairatu dutenen hirutik bik 65 urte edo gehiago dituzte (2).
- **Sexua:** gizonezkoek istripu baskularra jasateko arrisku gehiago dute, baina esan bezala emakumezkoengan larriagoa izan ohi da (8).
- **Familiarteko aurrekariak eta aurrekari pertsonalak:** Gaixotasun koronario edo zerebro-baskularreko familia aurrekaria dutenek arrisku altuagoa dute, horrez gain aurretik garun istripua jasandakoek arrisku altuagoa dute beste bat edukitzeko (16).

Garuneko istripu baskularren prebentzioa egiteko ezinbestekoa da arrisku faktore aldagarriak kontrolpean izatea. Garrantzitsuena bizimoduan aldaketak egitea da, adibidez, erretzeari utzi, alkoholaren kontsumo mugak ez gaintu, dieta hobetu (kolesterola eta gatz murriztu) eta eguneroko jarduera fisikoa areagotu. Ondoren, beharrezkoa bada farmakoak erabili daitezke presio arteriala zuzentzeko (17).

#### 1.1.4. Fisiopatologia

Organismoko funtzioak koordinatzeko garunak bihotz-gastuko glukosa eta oxigenoaren %20 behar du, gorputzeko pisu totala kontuan hartuz %2 izango dena.

Garunak bere kabuz energia metatzeko gaitasun gutxi edo nulua du, beraz, energia ekarpena eteteak (aldi labur batean izanda ere) kalte katastrofikoak eragin ditzake (18).

Garuneko odol fluxua (FSC) egonkor mantetzen da 60 - 150 mmHg arteko presio arterial media batean. GIB iskemikoan garuneko odol fluxua eta garuneko perfusio presioa jaisten dira, hasieran autoerregulazio mekanismoak abiarazten diren arren (basodilatazioa, oxigenoaren estrakzio frakzioa, ehun metabolismoa, zirkulazio kolaterala...) hauek xahutzean prozesu iskemikoak aurrera egiten du (18).

Teorikoki kaltetutako garuna bi gunetan banatu daiteke: nukleo iskemikoa eta penunbra gunea. Nukleo iskemikoan odol fluxua baxuagoa da zelulen biziraupenerako beharrezkoa dena baino, beraz, zelulak era itzulezinean kaltetu eta nekrosiz hiltzen dira. Beste alde batetik, penunbran dagoen odol fluxua baxuegia da funtzio neurologikoak era egokian betetzeko, baina energia minimo bat eskaintzen du zelulak bideragarri izaten jarraitzeko. Hala, odol-fluxua azkar berrezartzen bada garuneko zelulak sendatu ahalko dira eta hau da gaur egun erabiltzen diren fase akutuko tratamenduen (fibrinolisia eta tronbektomia mekanikoa) helburua (19). Bestalde, iskemiak espontaneoki berreskuratzen diren gunek ere hartzen ditu barne, oligohemia onbera deritze (3).

Penunbra iskemikoaren infarturako progresioa zirkulazio kolateral, lesioaren iraupen eta metabolismo zelularren araberakoa izango da. Denboraz prozesu iskemikoak aurrera egiten du eta heriotza zelularra eramaten duen hainbat gertaera eragiten ditu; adenosin trifosfato (ATP) produkzio murrizketa; sodio, potasio eta kaltzio kontzentrazio aldaketak; laktato areagotzea; azidosia; oxigenoaren erradikal askeen metaketa; glutamato askapen exzitotoxikoa hartzaileen etengabeko estimulazioa eraginez eta zelula barneko ur metaketa. Gertaera hauek istripuaren lehen minutu edo orduetan hasi daitezke (fase akutua) (20).

Fase akutu honen ondorengo ordu edo asteen burura (fase subakutua) zelula neuronalen apoptosia, zelula inflamatorioen aktibazio eta infiltrazioa (neutrofiloak, monozitoak eta mikroglia) eta garuneko edema moduko gertaerak eman daitezke (20). GIB iskemikoen %10 gaizto moduan sailkatzen dira garuneko edema egotearen ondorioz, honek garezur barneko hipertentsio eta garun herniazio arriskua baitu.



Edemak bi mekanismo fisiopatologiko ditu: zitotoxikoa eta basogenikoa. Edema zitotoxikoan estres oxidatiboaren ondorioz ezin izango da ATP ekoitzi, zelulek ezin izango dute beraien mintz-potentziala mantendu eta azkenean desoreka osmotiko bat sortuko da neurona barneko ur metaketa eraginez. Edema basogenikoan hesi hematoentzefalikoaren (HHE) iragazkortasuna areagotzearen da, ondorioz hainbat makromolekula espazio estrazelularrean barneratuko dira bertako bolumena gehiegi handituz (21).

Hilabete eta urteen buruan (fase kronikoa) garunaren egoera egonkortu daitekeen arren duela gutxi frogatu da inflamazioak eta barrera hematoentzefalikoaren iragazkortasunak jarrai dezakela, eta hauek kaltegarriak izango dira garunaren sendaketarako (22) (23).

### **1.1.5. Klinika**

Klinika hainbat faktoreren arabera izango da: iktusaren etiologia, denbora perfila, zirkulazio kolateralaren egoera eta kaltetutako garun eremua (5).

Kasu guztietan iskemiak garun-ehunaren kaltea eragiten du eta eremu horrek betetzen duen funtzioaren arabera bat-bateko hainbat sintoma agertu daitezke. Hauek dira agertzen diren sintoma ohikoenak (24):

- Aurpegi, beso edo hankaren sorgortzea edo bat-bateko ahultasuna. Normalean lesioaren kontrako aldeko hemigorputzari eragiten dio. Hemiparesia aurpegi asimetria bat bezala manifestatu daiteke.
- Nahasmena, lozorroa edo logura. Hitz egiteko edo hizkera ulertzeko zailtasuna.
- Ikusmen alterazioak edo mina begi bakarrean edo bietan.
- Oinez egiteko zailtasuna, zorabioa, orekaren edo koordinazioaren galera. Erorketak gerta daitezke.
- Bat-batean ezarritako buruko min bortitza eta jatorri ezagunik ez duena.
- Gernu inkontinentzia.

Garrantzitsuena lehen bait-lehen sintoma hauetaz jabetu eta medikuen laguntza lortzea da, sintoma ohikoenak hemiparalisia eta buruko mina dira (24).

### 1.1.6. Diagnostikoa

Denbora funtsezkoa da iktusaren diagnostiko eta tratamenduan. Lehenik eta behin garrantzitsuenak sintoma eta historia klinikoaren inguruan galdetzea da. Ondoren azterketa fisiko egoki bat egin behar da hurrengoak biltzen dituenak: erretasun mentala, koordinazio eta oreka, aurpegi, beso eta hanketako ahultasuna eta argi hitz egiteko zailtasuna (5).

Susmo kliniko sendo baten aurrean hurrengo pausua etiologia bilatzea izango da tratamendu egoki bat eman ahal izateko. Zenbait froga osagarri eskatu daitezke:

- **Neuroirudi frogak:** garun infartua ikusteko egiten dira. Erresonantzia magnetikoa (RM) tomografia konputerizatua (TAC) baino sentsibleagoa da garuneko lesio gehienetan, hiru salbuespen ezik: lesio hemorragiko akutuak, kaltzio metaketak eta hezur lesioak (3).
  - TAC beti gauzatu behar da urgentziaz tumore edo hemorragia bat baztertzeko, baina iktus iskemikoa ezingo da ikusi 24-48 ordu pasa arte. Hala ere, batzuetan zeinu goiztiarrak ikusi daitezke: ildoen eta substantzia zuri-gris mugaren ezabaketa (garun edemagatik) eta garuneko erdiko arteriaren hiperdensitatea (3).
  - Erresonantzia magnetiko bidez infartua hasieratik ikus daiteke difusio-perfusio teknika berriekin, hala fluxua berrezartzeko teknika bidez libratu daitekeen ehuna baloratu daiteke (honi miss-match deritzo) (3).
- **Ikerketa kardiakoa:** odolbilduak sortu ditzaketen gaixotasun kardioenbolikoak ikertzeko erabiltzen dira, bereziki fibrilazio aurikularra. Izan ere, ez bada arazoa zuzentzen probabilitate handia dago berriz gertatzeko. Elektrokardiograma, ekokardiografia eta 24 orduko holterra erabili ohi dira (25).
- **Laborategiko analisi basikoak:** erabilera gutxikoak izan arren, iktusa eragin dezaketen kausa arraroak baztertzeko erabilgarriak izan daitezke: anemia (globulu gorri gutxi), polizitemia (globulu gorri gehiegi), leuzemia (globulu zurien minbizia) edo infekzioa (25).

### 1.1.7. Tratamendua

Tratamendua garuneko istripu baskularraren larritasun eta etiologiaren arabera aldatzen da. Kontuan izanda GIB iskemikoak ohikoenak direla, hauen tratamenduan zentratuko gara.

#### 1.1.7.1. Urgentziazko tratamendua fase akutuan

Iktus iskemikoaren fase akutuan denbora berebizikoa da. Gaur egun, fibrinolisia eta tronbektomia dira iskemiaren fase akutuan estandarizatuta dauden tratamendu bakarrak eta hauen helburua odol-hodia zabaldu eta penunbratik berreskuratzea da. Hain denbora laburrean administratu behar izateak eragiten du GIB jasaten dutenen %5-10 bakarrik izatea tratamendu hau jasotzeko aukerako (26).

- **Tratamendu tronbolitiko edo fibrinolitiko:** Afekzio honentzat baimenduta dagoen tratamendu farmakologiko bakarra zain bidezko plasminogenoaren ehun aktibatzailea (rtPA) da. Proteina proteolitiko honek odol-fluxua oztopatzen duen koagulua edo tronboa desegingo du. Farmako erabiliena “alteplasa” izeneko produktua da (27). Klinika hasi denetik lehen 4,5 orduetan bakarrik administratu daiteke (ahal bezain laster), hortik aurrera tratamenduarekiko onura/arrisku erlazio negatiboa ikusi da. Gainera beharrezkoa da inklusio kriterio zehatz batzuk betetzea. Tratamenduaren konplikazio ohikoena hemorragia da, bereziki adin altukoetan (26).
- **Tronbektomia mekanikoa edo endobaskularra:** kateterismo bidez bide inginaletik baskularizazio intrakranealera heltzen da eta “stent retrievers” gailuak erabiltzen dira odolbildua atera eta estenosi arteriala dilatatzeko. Tratamendu hau erabiltzen da arteria nagusi baten buxadura eman denean (barne karotida, garuneko erdiko arteria proximala, arteria basilarra) eta sintomen hasieratik 6 ordu baino gutxiago pasatu denean. Fibrinolisiarekin terapia konbinatuan erabili daiteke edo tronbektomia bakarrik fibrinolisia kontraindikaturik dagoenean (26).

### 1.1.7.2. Iktus osteko tratamendua. Prebentzio sekundarioa.

Iktus aterotronbotikoaren mortalitatea %20-koa da (5). Lehen mailako prebentziorako arterioesklerosirako arrisku faktoreak kontrolatu behar dira. Iktus aterotronbotikoa jasan duten gaixoen bigarren mailako prebentzioan hauek erabiltzen dira:

- **Farmako antiagregante plaketarioak:** Aspirina lehen aukerakoa da 100-300 mg/egun dosian. Kontraindikaziorik egonez gero klopidogrel edo tiklopidina erabili daitezke (28).
- **Estatinak:** Ateroma plaka egonkortu eta iktus errekuwentzia murrizteko (28).
- **Endarterektomia karotideoa:** Lepoan ebaki bat egiten da barne karotidaren jatorritik sartu eta barneko ateroma plakak garbitzeko. Prozedimendu hau erabilgarria izan daiteke sintomak edo errekuwentziarako arrisku altua duten estenosi larrietan. Arrisku kirurgiko handiko pazienteetan **karotidako angioplastia bidez stent** bat jarri daiteke (28).

Iktus kardioenbolikoan hauek erabili ohi dira:

- **Antikoagulazioa:** Azenokumarol edo warfarina bidez beti antikoagulatuko da bigarren mailako prebentzio moduan iktus kardioenboliko bat jaso dutenengan, baina baita lehen mailako prebentziorako fibrilazio aurikularra dutenengan (5).
- **Antiagregazioa:** antikoagulaziorako kontraindikazioa duten pazienteetan, adibidez, odoljario handiko aurrekariak edo iktus zabal baten fase akutua (5).

### 1.1.7.3. Errehabilitazioa.

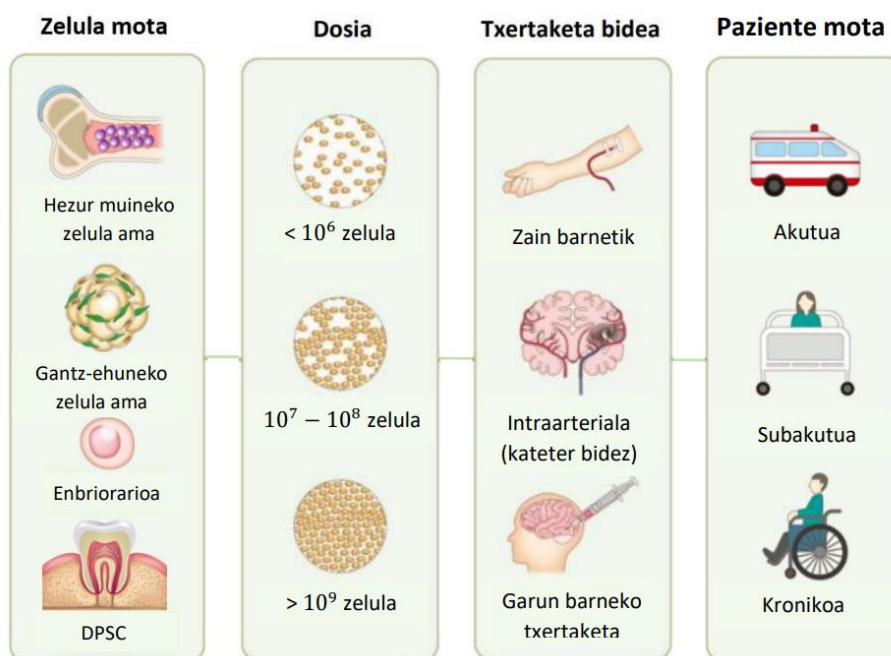
Garuneko istripu baskular iskemiko batetik bizirik irteten direnen %44-k desgaitasun larriak garatzen dituzte eta errehabilitazioa beharko dute. Orokorrean bost desgaitasun mota eragiten ditu: paralisi edo mugikortasun arazoak, nahaste sentsorialak, hizkera arazoak, pentsamendu eta memoria nahasteak eta nahaste emozionalak. Errehabilitazio egoera orokorra egonkortzen denean abiarazten da, iktusa jasan eta 24-48 ordura. Helburu nagusia isktusaren ondorioz galdutako gaitasunak berreskuratzea da paziente ahalik eta independenteen izan dadin bizi-kalitate hobea izateko (29).

Hala ere, ez iktusaren fase akutuko tratamenduek ezta errehabilitazioak ere, ezingo dute garun kaltea lehengoratu (30).

## 1.2. ZELULA AMA BIDEZKO TERAPIA

Azken urteetan ama zelula bidezko terapiak indar handia hartu du ikerkuntza munduan eta sakon ikertu dira zenbait patologietatik babesteko gaitasuna ematen dieten mekanismoak; adibidez, angiogenesiaren eta neurogenesiaren sustapena, funtzio immunomodulatzailerak, lesioatutako ehunaren konponketa edo ordezkapena errazten duten zeluletarako diferentziazioa, lesio neurala konpontzen laguntzen duten zitokinen askapena eta migrazio zelularra (31).

Entsegu prekliniko ugari egin dira ama zelulen bidezko terapiak garuneko istripu baskularren tratamenduan izan dezakeen eragina ikertzeko. Animal-ereduko ikerketa hauetan emaitza itxaropentsu ugari lortu dira iktusean ematen den penunbra iskemiko gunearen berreskurapenerako, hori dela eta, geroz eta entsegu kliniko gehiago abiarazi dira terapia berri honen segurtasuna eta eraginkortasuna frogatzeko. Irudian ikus daiken moduan (1 Irudia), momentuz zalantza ugari daude argitzeke terapia zelularren metodo optimoari dagokionez (32):



**1 Irudia. Zelula ama bidezko terapian argitu gabe dauden zalantzak iktus iskemikoaren tratamendurako.** Oraindik ez da zelula ama bidezko terapiaren metodo eraginkor eta seguruena ezarri. Irudian azaltzen den moduan erronka nagusienak zelula ama motaren aukeraketa, zelula ama dosi egokia, txertaketa egiteko administrazio bidea eta paziente mota dira. DPSC: hortz muineko zelula ama. "Kawabori et al. 2020 (32) artikulutik egokitutakoa".

Ama zelulak desberdinu gabeko zelula populazioak dira. Bizitzako etapa enbrionarioan, fetalean eta helduan topatzen dira, hauetatik ehun eta organoen oinarrizko osagai diren zelula diferentziatuak sortzen dira. Zelula amaren ezaugarri nagusiak dira: (a) auto-berrikuntza, (b) klonalitatea eta (c) potentzia edo hainbat zelula motetan desberdintzeko gaitasuna. Hala ere, propietate hauek desberdinak izan daitezke zelula amen artean (3)(33).

Garuneko istripu baskularretan izan dezakeen efektu terapeutikoa aurrera eramateko ama zelulen propietate nagusiak desberdintzapen zelularra eta eragin parakrinoa dira:

- **Desberdintzapen zelularra:** Kaltetutako zelulen ordezkapena lortu daiteke transplantatutako zelulak zelula neuronal edo baskularretara diferentziatuz (funtzio galduak konpentsatuko dituen) edo zuzenean jatorrizko zelula ama neuralen aktibazioaren bidez (32).
- **Ama zelulen eragin parakrinoa:** Zitokina, kimiosina eta exosoma moduko faktore trofikoek askapenak kalte iskemikoa hobetu eta zirkuitu neuronal berriak birsortu ditzake. Efektu antiinflamatorioak eta immunomodulatuzaileak bultzatzeaz gain, faktore hauek efektu antiapoptotikoa dute eta zelula ama endogenoak mobilizatzen dituzte, adibidez, zelula ama neuralak (NSC). Faktore hauek iskemia inguruan askatzen dira zuzenean ehunetan zehar iragaziz edo besikula estrazelular (EV) bidez (32).

### 1.2.1. Zelula ama motak

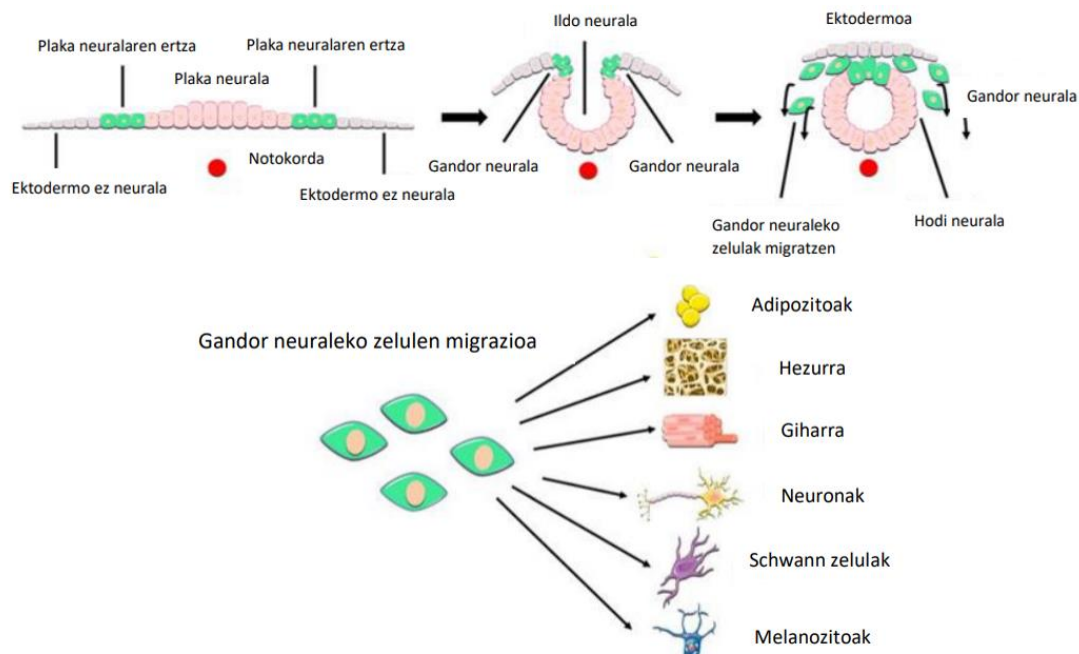
Ama zelulak hiru talde nagusitan banatu daitezke jatorria kontuan hartuta: zelula ama enbrionarioak (ESC), zelula ama helduak eta bihurtutako ama zelula pluripotenteak (iPSC). ESC-ek gaitasun pluripotentea dute, hau da, blastozisto barneko zelula masan kokaturik eta gorputzeko edozein ehun heldura desberdintzeko gaitasuna mantentzen dute. Zelula ama mota guztien artean autoberrikuntza eta desberdintzapen gaitasun handiena dute (33).

ESC-en antzeko auto-berritze gaitasun eta ahalmen pluripotenzialdun zelulak lortzeko ingeniariak zelular bidez zelula somatikoak genetikoki eraldatu ziren. In vitro lorturiko zelula hauei bihurtutako ama zelula pluripotente daitu zitzaien (iPSC) (33).

ESC-en eta iPSC-en erabilera gai polemikoa da. Zelula hauek arazo etiko desberdinak suposatzen dituzte, izan ere; giza zelula enbrionarioen iturri bakarra giza enbrioak dira eta zelula hauen bidez bakarkako baten klonazioa lor daiteke. Arazo etikoez gain, ikerketetan zenbait muga erakutsi dituzte, izan ere, tumoregenizitate arriskuarekin eta txertoaren aurkako errefus erreakzio immunearekin erlazionatu dira (34).

Zelula ama bidezko terapian erabiliko den zelula mota aukeratzeko hainbat faktore izan beharko lirateke kontuan: eskuragarritasuna, alderdi etikoak, transplante-errefus arriskua, alegiak eta tumoregenizitatea. Gaur egun ikerketetan erabiltzen ari diren zelula ama nagusienetariko batzuk:

- **Zelula ama helduak:** zelula hauek organismoko ehun desberdinetan aurkitzen dira garapen fetala eta gero. Organo edo ehun-baterako zelula espezializatu eta diferentziatuak sortzeko aktibatu daitezke edo ehun barnean latente geratu daitezke lesio osteko konponketa behar denean proliferatzeko. Hauen artean ezagunenak **zelula ama mesenkimalak (MSC)** dira, organismo helduan hainbat egituretan aurkitu daitezke: hezurrian, kartilagoan, muskuluan, lotailuetan, tendoietan, gantz-ehunetan, odol-hodien ondoko gunetan eta plazentan, odol menstrualean, heste-hodian eta hortz egituretan (33).
- **Hortz-muineko zelula amak (DPSC):** Zelula ama hauek gandar neuralean dute jatorri. Garapen enbrionarioan zehar gandar neuraleko zelula hauek hodi-neuraletik kanpora migratzen dute aho-barrunbeko zelula mesenkimal edo ez-mesenkimalak sortzeko (2 Irudia). DPSC-en funtzioa hortzeko zelula heldu diferentziatuak berriztea da, adibidez, zelula odontoblastikoak edo Schwann zelulak. Guzti hau kontuan hartuta, esan liteke zelula ama enbrionarioak baino desberdinduago daudela baina ez zelula ama mesenkimalak beste, bien arteko maila batean kokatu daitezke gaitasun multipotente sendoarekin (35).



**2 Irudia: Giza hortz muineko zelula amen jatorri enbrionarioa eta desberdintzapen gaitasuna.** Giza DPSC gandor neuralean kokaturik dauden zelula ametatik datoz. Gandor neuraleko zelula horiek egitura kraneomaxilofazialak sortzen dituzte, hortz-muina barne. Garapenean zehar, gandor neuraleko zelulek trantsizio epitelial-mesenkimatotsua jasaten dute eta hodi neuroletik kanpora migratzen dute aho barrunbeko leinu zelular mesenkimal edo ez-mesenkimalak sortzeko, adibidez, neuronak, zelula glialak, eta adipozitoak. Giza DPSC gandor neuraleko hainbat ezaugarri adierazten dituzte, bereziki, gandor neuraleko markatzaile adierazpena eta beste MSC batzuk baino gaitasun zabalagoa leinu neuroletako zeluletara desberdintzeko. “Luzuriaga J, et al. 2021 (35) artikulutik egokitutakoa”.

MSC garrantzitsuenak izaten jarraitzen dute haien eskuragarritasuna erraza delako eta babeserako hainbat mekanismo dituztelako. Hala ere, hortz muineko zelula amak geroz eta gehiago ari dira ikertzen. Zelula ama hauek gizakien garapenean zehar erortzen diren esnezko hortzetatik edo erauzketa terapeutiko baten ondoren lorturiko behin-betiko hortz helduetatik eskuratu daitezke, hau da, ez da prozedimendu inbaditzaile behar. Bestalde, histokonpatibilitate antigenoen adierazpen baxua erakusten dutenez DPSC txertoaren aurkako errefus erreakzioak ez dira batere ohikoak (36).



### 1.2.2. Txerto motak

Zelula ama bidezko terapian txerto autologoak edo alogenikoak erabiltzeko aukera dago. Txertaketa alogeniko batean, pazientean administratuko diren zelula amak beste emaile batengan dute jatorria. Autotxertaketan, aldiz, zelula amak paziente berarenek dira. Transplante ondorengo errefus arriskua altua denean hobe da zelula ama autologoak erabiltzea. Arazoa da zelula autologo osaturiko txertoa lortzeko behar den zelulahazkuntzak tratamendua atzeratu dezakeela eta kasu horretan iskemiak aurrera egingo du kalte akutua larriagotuz. Hori dela eta, zelula alogenikoak gero eta gehiago erabiltzen dira kantitate handitan lortu ahal direlako emaile immunobateragarrietatik (37).

### 1.2.3. Administrazio bidea

Zelula ama terapiaren administrazio bideari dagokionez, oraindik ez dago argi zein den txertaketa bide egokiena. Entsegu preklinikoetan hainbat bide erabili izan dira: zain barnekoa, intraarteriala, intrabenosoa, intratekala, intrabentrikularra, intrazerebrala, subaraknoidea, intranasala eta intraperitoneala.

Zain barneko bidea (IV) eta bide intraarteriala (IA) ez dira beste bideak bezain inbaditzaileak. Zain barneko bidean ez bezala, bide intraarterialaren bidez txertaturiko zelula amek organo periferikoak saihestu ditzakete (gibela, barea eta birrikak), beraz, zelula amen garuneko txertaketa eta distribuzio biologikoa handiagoa izan litezke (38).

Bide intrazerebralean (IC) zelula amak zuzenean nerbio sistema zentralera sartzen dira zirkuitu neurala birsortu eta kaltetutako ehuna ordezkatzeko asmoz. Bide guztien artean zelula amen txertaketa handiena lortuko du. Hala ere, zenbait desabantailak ditu: alde batetik, kirurgiak berak arrisku handia suposatzen du, eta bestalde, dosi handiegiak erabiltzeak garun barneko presioa gehiegi areagotu dezake (39).

## 2. HELBURUA

Garuneko patologia hipoxiko iskemikoak garatutako herrialdetako heriotzaren arrazoi nagusienetakoa dira eta oraindik ez da hautentzat tratamendu sendagarririk aurkitu. Garuneko arterien tronbosiak orokorrean oso pronostiko txarra du, maila funtzionalean bigarren mailako ondorio kaltegarri eta atzeraezinak uzten ditu infartuko gunean ematen den heriotza neuronal eta glialagatik (25).

Gaur egun erabiltzen diren tratamenduen helburua kaltetutako garun gunea ahalik eta gehien murriztea da odol-fluxua lehen bait-lehen berrezarritzeko, hala ere, ez dira gai hondatutako ehuna berreraikitzeke eta funtzio neuronal egokia lortzeko (3).

Azken urteetan zelula ama bidezko terapiak indarra hartu du eta tratamendu itxaropentsua da garuneko iskemia/hipoxia osteko ehun-berreraikitzeke. Orain arte egindako entseguetan inguru iskemiko batean bizirauteke gai diren zelula amak aurkitu dira, aurretik zegoen garuneko odol-sistema sortzeko gaitasuna dutenak eta nerbio sistema zentralke zeluletara desberdindu ahal direnak (40). Beraz, zelula ama bidezko terapiak garunaren berreskurapen funtzionalerako ahalmena izan dezake. Nahiz eta honezkerok tratamenduaren jasangarritasuna, segurtasuna eta bideragarritasuna frogatuta dagoen, oraindik zalantza asko daude erabili beharreko zelula ama mota, administrazio bide eta administraziorako iktus-fase egokienaren inguruan (32).

Lan honetan zelula ama bidezko terapiak garuneko istripu baskular iskemikoetan izan dezakeen eragina eta ekintza mekanismoak deskribatzen dira. Zelula ama mesenkimalak eta hortz muineko zelula amak erabili dituzten animalia ereduko entsegu preklinikoan eta entsegu klinikoan emaitzak batu dira, frogatuta dagoena jakinarazi eta etorkizunari begira sakonago ikertu beharko litzatekeena argitzeko. Helburu nagusia hainbesteko inpaktu sozioekonomikoa duen patologiarentzat zelula ama bidezko terapiak izan ditzakeen efektu terapeutikoak ikertzea da eta etorkizun batean praktika klinikoan erabili ahalko den tratamendu sendagarri potentzial baten bilaketa egitea.

### 3. METODOLOGIA

Gradu amaierako lan hau aurrera eramateko hainbat artikuluren, datu baseren eta iktusarekin erlazionatutako web orrien errebisio bibliografikoa eraman da aurrera. Erabili diren datu base nagusiak: PubMed eta Google scholar izan dira. Baliabide horiek eskuragarri izateko EHU-ko liburutegitik sarbidea lortu da. Bestalde, AMIR akademiaren eskutik argitaraturiko “Manual de neurología y neurocirugía” liburua erabili da garuneko istripu baskularrei buruzko datu klinikoen informazio bilaketarako (etiologia, klinika, diagnostikoa eta tratamendua).

Datu baseetan bilaketa egiteko erabili diren hitz nagusiak hauek izan dira: “stroke”, “ischemic stroke” “classification”, “risk factors”, “physiopathology”, “diagnosis”, “treatment”, “stem cell”, “rodent”, “adipose derived mesenchymal stem cells”, “bone marrow mesenchymal stem cells”, “dental pulp stem cells”, “angiogenesis”, “neurogenesis”, “blood brain barrier”, “neovasculogenesis”. Artikulu eta ikerketen aukeraketarako erabili diren inklusio kriterio nagusiak emaitza positibo interesgarriak, zita kopuru eta inpaktu altua, eta entseguen intereseko metodologia (arratoietan txeraturako zelula mota zehatzak eta txertaketa bide desberdinak) izan dira.

Lanean azaldutako entsegu klinikoei dagokienez, bilaketa clinicaltrials.gov eta PubMed datu basetan burutu da. Bilaketa kriterioak “ischemic stroke” eta “stem cell” izan dira 28/03/2023. Aurkituriko ikerketa guztietatik “completed” egoeran zeudenak eta zelula ama konkretuekin egindakoak aukeratu ziren: gantz-ehunetik eta hezur-muinetik deribatutako zelula ama mesenkimalak eta hortz-muineko zelula amak.

Horrez gain, lana aurrera eramateko UPV/EHUko Zelulen biologia eta Histologia sailean eta Achucarro Neurozientzia zentroan lanean dabiltzan Gaskon Ibarretxe eta Abraham Martin ikerlariekin elkarlanean aritu naiz. Hauek hortz muineko zelula amen bidezko terapia ikertzen ari dira arratoi ereduko entsegu preklinikoan, hurrengo artikuluan argitaratu dena: “Luzuriaga J, Pastor-Alonso O, Encinas JM, Unda F, Ibarretxe G, Pineda JR. Human Dental Pulp Stem Cells Grown in Neurogenic Media Differentiate Into Endothelial Cells and Promote Neovasculogenesis in the Mouse Brain. *Front Physiol.* 2019-03-28;10.” Gainera gaur egun eskuartean daramaten GIB arratoi ereduaren lortutako eta oraindik argitaratu gabeko aurkikuntza interesgarri eta garrantzitsuak partekatu dizkirate.

## **4. EMAITZAK ETA EZTABAIDA**

### **4.1. ENTSEGU PREKLINIKOAK**

#### **4.1.1. Gantz-ehuneko zelula ama mesenkimalak (AD-MSC)**

Gantz ehuna zelula desberdinez eratutako energia metaketarako erabilia den ehuna da. Adipozitoak, zelula endotelialak, zelula hematopoietikoa, fibroblastoak eta zelula ama mesenkimalak aurki daitezke, guztiak baskulatura nahasi batez irrigaturik (36).

Zelula ama enbrionario eta hezur muinetik deribaturiko zelula ama mesenkimalekin alderatuz, AD-MSCEk zenbait abantaila dituzte: ugariak dira, liposukzio bidez erraz izan daitezke isolatuak emailearen erikortasun txikiarekin eta hazkuntza inguruetan zelula kopuru nahikoa lortu daiteke terapia zelular autologoetan erabili ahal izateko arazo etikoak sortu gabe. Zelula hauek gune inginal eta abdominaleko azal azpiko gantz-ehunean aurki daitezke (41).

Arratoi-ereduarekin egindako entsegu preklinikoan ikertu zuten ea AD-MSC bidezko terapiak garuneko infartuaren tamaina murriztu eta garuneko funtzio neurologikoa hobetzeko gaitasuna zuen. Horretarako arratoien epididimo inguruko gantz-ehunetik lortutako ama zelulak behi jatorriko serum fetalean (FBS%10) hazi eta txertaketa autologoa egin zen zain bidez. Iskemia osteko 21 egunean ehunak ikertu ziren (42).

4.1.1.1. Migrazio eraginkorra, infartu eremu murrizketa eta funtzio neurologiko hobekuntza.

Ikerketako aurkikuntza garrantzitsuenetarikoa izan zen 21 egunean CM-Dil kolorantearekin tindaturiko AD-MSC zelulak garuneko gune infartuan inplantaturik aurkitu zirela immunofluoreszentzia bidez, beraz, zain bidez txertatutako zelulek hesi hematoentzefalikoa zeharkatu eta migrazio eraginkorra lortu zuten.

Garuneko infartuaren tamainari dagokionez, TTC (cloruro de 2,3-trifenil-5H-tetrazolio) tindatzailearen bidez argi geratu zen AD-MSC jasotako arratoien garuneko mozketan koronaletan infartuko gune txuri-horixka murriztuta zegoela.

Gainera, AD-MSK txertaketak aurreko gorputz adarren mobilitate berreskurapena erraztu zuela ikusi zen “Corner Froga funtzional psikomotorea”-ren bidez, hau da, funtzio neurologikoaren hobekuntza eragin zuen (42).

#### 4.1.1.2. Eragin antiinflamatorio, antiapoptotiko eta estres oxidatibo aurkakoa.

Iskemiak IL-18, TLR-4 eta plasminogenoaren aktibatzaile tisularra (PAI-1) zitokina inflamatorioak areagotu zituen garunean. Hala ere, hauen ARNm adierazpenak esanguratsuki altuagoak izan ziren kontrol taldean AD-MSK tratamendua jasotako taldearekin alderatuz, beraz, AD-MSK terapiak erreakzio inflamatorioa gutxitu zuen.

Horrez gain, Bcl-2 ren ARNm indize antiapoptotikoaren adierazpena murriztu zen arratoien kontrol taldean AD-MSK tratamendua jaso zutenekin alderatuz. Bax eta caspasa 3 ARNm adierazpena apoptosi indizeari dagokionez, esanguratsuki handiagoa izan zen kontrol taldean tratamendua jasotakoan baino. Iskemiaren osteko “in situ” heriotza zelularra detektatzeko TUNEL entseguaren bidez nukleo apoptotikoak markatu eta bereizmen handiko mikroskopia analisisien bidez neurtu ziren. Tratamendua jaso zuten arratoiek nukleo apoptotikoen kopuru esanguratsuki baxuagoa izan zuten. Ebidentzia guzti hauek argi utzi zuten AD-MSK txertaketak eragin antiapoptotikoa izan zuela tratamendu taldean.

Estres oxidatiboa neurtzeko OxyBlot probak dakartzan errektiboen bidez proteina oxidatuak detektatu ziren. Frogatu zen estres oxidatiboa mitokondrietan altuagoa zela kontroleko arratoietan, osasuntsu edo AD-MSK terapia bidez tratatutakoetan baino.

AD-MSK terapiak azido fibrilar glialeko proteinaren (GFAP) adierazpena moteldu zuen. Proteina hau erreakzio glialaren eta inflamazioaren adierazle izanik, tratamenduak garunean ematen den iskemia ondorengo gliosia murrizten duela esan daiteke, garunaren zahartzearekin eta endekapenarekin loturik dagoen prozesua.

Azkenik, IL-8/Grop mRNA espresioa altuagoa izan zen tratamendua jasotako taldean, agente kimiotaktiko honek iskemiak eragindako estresaren aurrean ama zelulen migrazioaren erregulazioan parte hartzen du “cell homing” efektu babeslea bultzatuz (42).

#### 4.1.1.3. AD-MSK terapiak angiogenesisia eta neurogenesisia hobetzen du

Orokorrean diferentziazio eta proliferazio zelular handiagoa izan zen AD-MSK tratamendu ondorengo arratoietan, izan ere, immunohistokimika (IHQ) bidez aztertu zen BrdU proliferazio markatzailearentzat positibo ziren zelula kopuru altuagoa zegoela tratamendua jasotako arratoietan.

Angiogenesiari dagokionez, iskemia egoeran HIF-1 (hipoxiaz induzitutako  $1-\alpha$  faktorea) transkripzio faktorea expresatzen da, honek SDF-1 (zelula estromaletik deribaturiko 1 faktorea) kimioerakarlearen transkripzioa estimulatu du. SDF-1 $\alpha$  zelula ama endotelialen kimiozina bat da eta hauen mobilizazioan, inkorporazioan, lokalizazioan, biziraupenean, proliferazioan eta desberdintzapenean parte hartzen du. Horretarako SDF-1 $\alpha$  zelula ama endotelialen gainazalean adierazten den CXCR4 hartzailearekin lotuko da eta hainbat seinalizazio bide aktibatuko ditu. Immunohistokimika zein Western Blot bidez ikusi zen AD-MSK terapia bidez SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 ardatza positiboki erregulatu zela, beraz, honek pentsarazten du tratamenduaren bidez zelula ama endotelialen mobilizazioa erraztu daitekeela iskemia jasandako garun eremura.

Horrez gain, IHQ tintzioan ikusi zen vWF garuneko odol hodietako zelula endotelial markatzailearen kopurua asko handitu zela AD-MSK bidez tratatutako arratoietan.

IHQ eta hematoxilina-eosina bidezko tindaketa bidez ikusi zen garuneko infartu gunean arteriolen (diametroa  $\leq 15 \mu\text{m}$ ) kopurua txikiagoa zela kontrol taldean tratatutako arratoi taldean baino (42).

Neurogenesiari dagokionez, garuneko iskemiaren prozesuak berezko neurogenesi fisiologiko eta endogenoa eragiten du garun helduan, baina babes mekanismo moduan abiarazten den neurogenesi hau ez da nahikoa GIB ondorengo kalteak konpontzeko (43). Zelula ama bidezko terapiak prozesu hau bultzatu dezakeen aztertzeko doblekortina neurogenesi markatzailearen adierazpena neurtu da. Doblekortina (DCX) mikrotubuluekin erlazionaturiko proteina bat da, zelula neuralen aitzindarietan eta neurona gazteetan adierazten dena. Ikerketan ikusi zen, doblekortina adierazpena positiboki erregulatu izan zela tratatutako taldean, beraz, AD-MSK bidezko terapiak neurogenesisia bultzatzen du (42).

#### 4.1.1.4. AD-MSK migrazioa infartu gunera eta desberdintzapen endoteliala

Ziurtasun osoz transplantaturiko AD-MSK garuneko gune infartatura zihoazela konprobatzeko CM-Dil eta DAPI bidezko tindaketa bikoitza egin zuten. DAPI hildako zelulen ADN kate bikoitzari lotzen den markatzaile fluoreszentea da. Espero zen bezala tindaturiko AD-MSK zelulak ondo txertatuak ikusi ziren DAPI bidez tindaturiko infartu eremuan. Gainera, zelula endotelialen fenotipoa adierazteko gai ziren aztertzeko, CM-Dil eta vWF tindaketa bikoitza egin zen eta honetan ikusi zen tindaturiko zelulak tamaina txikiko odol-hodietan barneratuak izan zirela. Aurkikuntza honek azaldu dezake AD-MSK batzuk zelula endotelialek desberdindu ahalko litezkela (42).

#### 4.1.1.5. Dosifikazioa

Transplantean eman beharreko AD-MSK kopuruari dagokionez, arratoiekin egindako beste ikerketa batean gantz-ehunetik deribaturiko zelula amen dosi desberdinen efektua arteria barnetik administratzean aztertu zuten. Entseguan plazebo gantz-soluzioa jaso zuten kontrol taldeko arratoiez gain, hiru dosi desberdineko arratoi taldeak erabili ziren:  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^5$ , eta  $5 \times 10^4$  AD-MSK. Gantz-ehuneko zelula amak burdin oxidozko partikula superparamagnetikoekin markatuak izan ziren (VSOP) erresonantzia magnetiko bidez zelula hauen jarraipena egin ahal izateko. RMN bidez bi irudi erabili ziren: iskemia eragin eta 48 orduren buruan eta 9 egunen buruan (44).

Hiru dosiekin AD-MSK seinale intentsitatearen areagotzea eman zen kaltetutako hemisferioan iskemia osteko 48 orduan, honek adierazten du arteria barneko administrazioaren bidez txertatutako zelulen migrazioa eraginkorra izan zela. Gainera txertaketa tasa dosiarekiko proportzionala izan zen irudi intentsioenak  $1 \times 10^6$  taldekoek izan zutelako. Hala ere, 48 ordu ondoren ateratako irudietan infartuaren bolumena areagotu egin zen  $1 \times 10^6$  AD-MSK txertatu zirenean kontrol taldearekin eta  $5 \times 10^4$  jasotakoekin konparatuz. 9 egun ondoren ateratako irudiei dagokienez,  $3 \times 10^5$  dosiak infartuaren bolumen murrizketa eragin zuen modu esanguratsu batean (44).

Ikerketan frogatu zuten zelula ama dosi egokia txeratzea oso garrantzitsua dela eragina duelako zelulen migrazioa tasan eta infartu bolumenean, eta emaitzarik hoberenak  $1 \times 10^6$  AD-MSK baino zelula dosi txikiagoekin lortu ziren (44).

#### 4.1.1.6. Besikula estrazelularrak

Gaur egun uste da AD-MSK bidezko tratamenduak eskaintzen duen efektu babeslea besikula estrazelularren askapenaren bidezkoa dela. Besikula estrazelularrak (EV) bigeruz lipidikoko mintz egiturak dira eta proteinak, lipidoak eta azido nukleikoak (ARN) garraiatzen dituzte. Hainbat zelula motek jariatzen dituzte eta zelulen arteko komunikazioan daude inplikaturik (efektu parakrinoa) (45).

MSK bidezko tratamendurekin konparatuz VE eraginkorragoak dira odol-hodien buxadura eta tronbosi mikrobaskularraren arriskua murrizten, eta hesi hematoentzefalikoa gurutzatzeko gaitasun handiagoa dute. Immunitateari dagokionez, MHC-II konplexua aurkezten duten EV-ek ez dute gaitasunik T linfozitoak aktibatzeke, hori dela eta MSK baino erantzun immunogeniko baxuagoak dituzte (46).

Giza gantz-ehuneko zelula ama mesenkimalatik ateratako besikula estrazelular alogenikoen sudur-barneko administrazioak garuneko infartuaren bolumena murriztu, HEE iragazkortasuna berreskuratu eta angiogenesisia eragin dezaketela frogatu da. Gainera, EV bidezko tratamenduak infartu inguruko eremuaren berreskurapenean laguntzen du eta funtzio motore eta portaeraren endekapena lehengoratzten du (46).

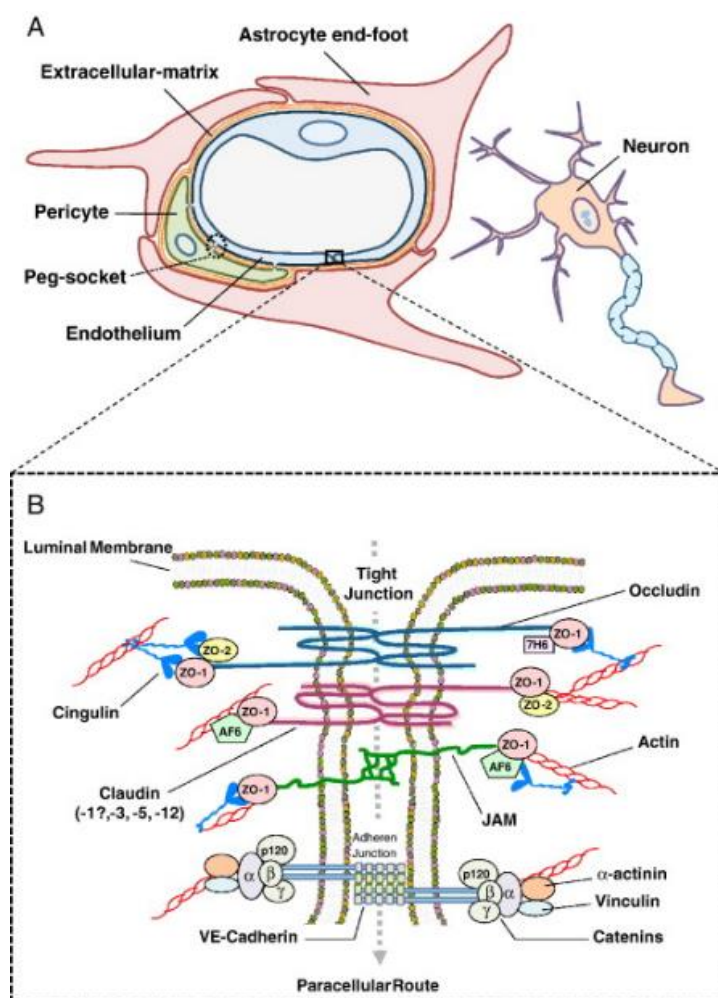
Aurkikuntza hauek kontuan hartuz, besikula estrazelularren erabilera gehiago ikertu beharko litzatekeen estrategia terapeutikoa da garuneko istripu baskular iskemikoaren tratamendurako.

#### 4.1.2. Hezur muineko zelula ama mesenkimalak (BM-MSK)

Hezur muineko zelula ama mesenkimalak (BM-MSK) hezurren barneko ehun trabekularrean aurkitzen diren zelula ama helduak dira. Zelula ama hauek hainbat zeluletara desberdintzeko gaitasuna dute, adibidez, hezur-zelulak, kartilago-zelulak, adipotsuak eta muskularrak. Zelula hauek gaitasun antiinflamatorioak eta immunomodulatuzaileak dituzte. Gainera berriztatze eta ehun konponketarako propietateak dituztenez, oso interesgarriak dira birsorkuntza terapiarako (36)(47).



Odol-hodietako lesio endotelialak eragiten duen hesi hematoentzefalikoaren (HHE) etendurak iskemia osteko edema basogenikoa larriagotu eta pronostikoa okertzen du, izan ere HHE garuneko homeostasiaren arduradun nagusia da (21). Efektu honetan akuaporina 4 (AQP4) proteinak duen papera ikertu da, izan ere, AQP4 garuneko astrozito izeneko zelula glialetan adierazten den ur-kanala da eta berebizikoa da ur mugimenduaren erregulazio bidez garuneko homeostasia mantentzeko. Horrez gain, garuneko toxikoen kanporaketan, transmisio sinaptikoan eta astrozitoen migrazioan ere eragiten du 3 irudian ikusi daitezkeen egitura desberdinen bidez (22).



**3 Irudia:** Hesi hematoentzefaliko (HHE) garuneko homeostasia mantentzeaz arduratzen den egitura. Zelula endotelialez gain, perizitoz, astrozitoz, neuronaz eta zelulaz kanpoko matrizeaz osaturik dago; osagai hauek sortzen duten egitura sinpleenari unitate neurobaskularra deritzo. "Sandoval KE, et al. 2008 (22) artikulutik hartua".

4.1.2.1. Astrozito apoptosi, garun edema eta hesi hematoentzefaliko iragazkortasun murrizketa AQP4 erregulatuz.

Arratoi ereduaren egindako entsegu preklinikoetan ikusi da hezur muinetik lorturiko zelula ama autologoaren garuneko txertaketa estereotaxikoa egitean funtzio neurologikoaren hobekuntza, garuneko edemaren murrizketa eta HHE etenaren hobekuntza ematen dela (48).

Zelula ama txertaketa egin osteko 1 eta 3 egunetan animalien egoera neurologikoa neurtzeko mNSS eskalako frogak (larritasun neurologikoa puntuatzeko froga egokituak) egin ziren, non BM-MSK bidez trataturiko arratoiaren defizit neurologikoa esanguratsuki murriztu zen. Ehun-heze eta lehorraren pisuak alderatuz garuneko ur proportzioa kalkulatu zen, MSC jasotako arratoiaren baxuagoa izan zena. Horrez gain, tratamenduak hesi hematoentzefalikoaren babes efektua erakutsi zuen, iskemiaren alde ipsilateraleko HHEren iragazkortasuna jaitsi zela ikusi zen Evans-uridin tindatzaile eta IgG iragazketaren murrizketa neurtzean. Gertakizun honen mekanismoa ikertzeko HHE-koan dauden okludina eta zonula occludens-1 (ZO-1) lotura estuko egitura proteikoaren lokalizazioa ikertu zuten CD31/okludina eta CD31/ZO-1 tindatzailearen bidez. Ikusi zen iskemia jasandako ehunetan okludina eta ZO-1 positibotasuna galdu zela eta MSC terapia eta gero esanguratsuki berreskuratu zela (48).

Bestalde, astrozitoen apoptosia murriztu zela ikusi zen, TUNEL/GFAP tindaketa bikoitzaren bidez markaturiko astrozito nukleo apoptotiko kopuru baxuagoa izan baitzen. BM-MSK txertaketak AQP4 adierazpen murriztu zuen penunbrako gune iskemikoan. Garuneko lesioak AQP4 adierazpena positiboki erregulatzen du, honek astrozitoen hantura sortzean apoptosira bideratzen ditu eta HHE-ren deskonposaketara bideratzen du. Ikerketan AQP4-ren ARNm eta proteina kopuruaren murrizketa esanguratsua ikusi zen MSC txertaketa jaso zuten garunetan 3 egunean. Gainera AQP4 eta garuneko kalteen arteko erlazioa sakonago ikertzean ikusi zuten AQP4 kontrako interferentziako ARN (iARN) txertatzean garuneko edema, IgG iragazkortasuna eta astrozito apoptosia murriztu zirela kontroleko taldearekin alderatuz. AQP4 murrizketa honen eragilea MSC-ek eragindako eragin immunomodulatzaileen ondoriozkoa izan daiteke, izan ere, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  zitokina proinflamatzailen adierazpena esanguratsuki murriztu zen terapia eta gero (48).

#### 4.1.2.2. Hesi-hematoentzefalikoaren babesa metaloproteinasa-9 murrizketaren bidez ICAM-1 adierazpena murriztuz

Arratoietan BM-MSC autologo bidez egindako beste entsegu batean, metaloproteinasa-9 (MPP-9) eginkizuna ikertu dute hesi hematoentzefalikoaren lesio murrizketaren erantzule moduan (49). Metaloproteinasak beste proteina estrukturalak moztu eta degradatu ditzaketen entzima taldea dira. Jarduera katalitiko horretarako zink moduko metalak behar dituzte. Zehazki MPP-9 lotura estuko proteinak (okludina eta kaudina-5) eta xafla-basaleko proteinak (fibronektina, laminina, kolagenoa) apurtzen dituzenez, prozesu fisiologikoan zehar garuneko HHE degradatzen du. Ikusi da, garuneko istripu baskular iskemikoa eta gero neutrofiloek jariaturiko MMP-9ek ekintza garrantzitsua dutela HHE lesio eta iragazkortasunean (50).

Ikerketan ikusi zen, iskemia jasan eta gero MMP-9 adierazpena areagotu egin zela. Areagotze hau moteldua izan zen hezur muineko MSC txertaketa jaso zuten arratoi taldean kontrolekoarekin alderatuz. Honen atzean dagoen mekanismoa zelula ama mesenkimal txertaketak eragiten duen zelula endotelialeko ICAM-1 adierazpenaren erregulazioa dago (49).

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) zelula endotelial, zelula immune eta beste hainbat zelulen gainazalean dagoen adhesio proteina bat da. Eginkizun garrantzitsua du zelula immunitarioen migrazioan hesi hematoentzefalikoan zehar inflamazio eta infekzio gunetara. Iskemia eta gero ICAM-1 adierazpena handitzearen ondorioz neutrofiloen migrazioa ematen da HHE zehar eta hauek MMP-9 askatzean lesioa larriagotzen dute. Ikerketan ikusi zen hezur muineko zelula ama terapiak ICAM-1 adierazpena murriztu zuela (49).

#### 4.1.3. Hortz muineko zelula amak (DPSC)

DPSC bidezko terapia zelularra gero eta gehiago ari da ikertzen, izan ere, beste zelula ama motekin alderatuz zenbait abantaila dituzte, garrantzitsuenak eskuragarritasun altua, immunogenizitate baxua eta desberdintzapen gaitasun zabalagoa izanik (51)(36).

Ikusi da kondizio aproposetan hainbat zelula motara desberdintzeko gai direla, batez ere, leinu mesenkimaletara; osteoblastoak, kondroblastoak eta adipozitoak. Garun iskemiaren tratamenduari begira, interesekoa da, leinu neuronaletara desberdintzeko gaitasuna ere erakutsi dutela, bereziki zelula hauek serum fetalik gabeko hazkuntza medio Neurobasalean hazi direnean, B27 eta EGF/FGF hazkuntza faktoreekin aberastuta. Hala ere, ez dago argi zelula hauek guztiz neuronalak diren edo markatzaile neuronalak aurkezten dituzten zelulak diren; beraz, zalantzan dago “in vivo” zelula hauek transplantatzean gai izango ote diren ostalariaren konektibotasun neuronalean ondo integratzeko (52).

Bestalde, DPSC-ak fenotipo osteoblastikora eta zelula endotelialetera diferentziatzeko gaitasuna dute behi-serum fetala (FBS) duen hazkuntza ingurunean kultibatzean (53). Frogatuta dago subkutaneoki “in vivo” txertatzean baskularizazio altuko hezur antzeko ehuna sortzeko gai direla. Hala ere, ez da sakon ikertu DPSC-en erabilera neobaskularizazio sistema baten iturri moduan, diferentziazio endotelialerako prozedimendu gehienetan FBS erabiltzen baita. Serum hau biziraupen zelularrerako eta proliferazio azkar baterako erabilgarria den arren, DPSC-ak leinu osteoblastiko/odontoblastiko batera diferentziatzea bultzatzen du eta gainera ostalariaren alergiaz eta transplantatutako zelulen aurkako erreakzio immuneak emateko arriskua areagotzen du (54).

Achucarro zentroan egindako entsegu preklinikoan, ikertu da ea posible den genetikoki modifikatu gabeko giza DPSC-tatik “in vivo” transplantatu ahal diren zelula endotelialak lortzea serum fetala erabili gabe. Helburua garun iskemia ostean neobaskularizazioa eragiteko terapia berriaren bilaketa izan zen. Hau ikertzeko giza hortzetatik erauzitako zelulak NeuroCult™ izeneko zelula ama neuralen (NSC) hazkuntza ingurune komertzial batean hasi ziren, osagaien artean heparina, EGF/FGF eta B27 zituen, baina serum fetal gabekoa.

Ikerketa gauzatzeko 19 eta 45 urte arteko emaile osasuntsuen hirugarren molarrak erabili ziren. Hortzak mekanikoki apurtu ziren, muinaren digestio entzimatikoa egin zen eta zentrifugatu ondoren isolatutako DPSC bi hazkuntza inguruetan hazi ziren hilabete batez: DMEM + %10 FBS inguru klasikoa eta Neurocult proliferazio ingurua.

DPSC zelulen hazkuntza Neurocult inguruan eraginkorra den aztertzeke, arratoien hipokanpotik ateratako zelula ama neuralen (NSC) hazkuntza erabili zen kontrol moduan, izan ere, Neurocult ingurua diseinaturik dago nitxo neurogenikoetatik neuroesferak sortzeke. Kontrol talde hau konparatu zen DMEM/FBS hazkuntza ingurune estandarrean eta Neurocult hazkuntza ingurunean hazitako DPSC-ekin (55).

#### 4.1.3.1. In vitro ikerketa

##### 4.1.3.1.1. Desberdintzapen neurala

Neurocult inguruan hazitako DPSC zelulek “garunetik deribatutako faktore neurotrofikoaren (BDNF)” adierazpena mantendu zuten, neurogenesian eta neuronen biziraupenean parte hartzen duen neutrofina. Hazkuntza zinematika aldetik hDPSC proliferazio indizea arratoien NSC zelulena baino baxuagoa izan zen. DMEM + FBS%10 inguruan hazitako DPSC zelulak matrazaren gainazalera itsatsita hazi ziren era lauan, Neurocult inguruan, berriz, DPSC zelulek dentosfera flotanteak sortu zituzten, normalean NSC-ek egiten duten moduan.

Azkenik, frogatu zen Neurocult-en hazitako hDPSC, zelula ama neuralen berezkoak diren markatzaileak partekatzen zituztela arratoi NSC-kin. hDPSC positiboak izan ziren Nestin markatzaile eta baita GFAP eta S100 $\beta$  markatzaile astroglietarako ere.

##### 4.1.3.1.2. Leinu neuraletara desberdintutako zelulen markatzaileak eta morfologia

Zelula amak desberdintzean sorturiko leinu neurala aztertzeke, DCX (doblekortina) eta NeuN markatzaileak erabili ziren. Kasu honetan ere ez zen desberdintasun esanguratsurik ikusi markatzaile hauentzat positibo ziren zelulen kopuruan DPSC eta NSC hazkuntzak Neurocult inguruan konparatzean. Hala ere, desberdintutako NSCek neurona antzeko morfologia dendritikoa hartu zuten eta hDPSC desberdinduek, aldiz, aldakortasun handiagoa erakutsi zuten, batzuetan lamelipodio luzedun morfologia aurkeztuz, dendrita edo neuronen beste ezaugarri morfologiko gabekoa.

#### 4.1.3.1.3. Desberdintzapen endoteliala

Aurreko ikerketetan frogatu zen serum fetala zeukan inguruan DPSC gai zirela zelula endotelialetara desberdintzeko (56). Desberdintzapen hau serum fetalaren presentziaren mendekoa zen edo ez ikertzeko FBS gabeko Neurocult hazkuntza ingurua erabili zen. DPSC zelulek Nestin markatzailea adierazi zuten eta hau zelula ama endotelialetan ere agertzen denez, ikertu zen ea DPSC zeluletatik CD31 eta VEGF markatzailea adierazten zuten zelula endotelialak lortu ahal ziren.

Immunofluoreszentzia bidezko analisian ikusi zen arratoi NSC guztiz negatiboak izan zirela anti-CD31 antigorputz bidezko immunotindaketan. Bestalde, PCR azkar bidezko CD31 ARNm adierazpen neurketak, immunofluoreszentzia intentsitateen analisiak eta fluxuzko zitometriak agerian utzi zuten CD31 adierazpena esanguratsuki altuago zela Neurocult inguruan hazitako DPSC zeluletan DMEM+% 10 FBS inguruan hazitako DPSC zelulekin konparatuz.

Laburbilduz, FBS gabeko Neurocult hazkuntza inguruak CD31 markatzaile endotelialaren adierazpena areagotu zuen DPSC zelulen hazkuntzan.

#### 4.1.3.2. hDPSC txertaketa arratoietan, in vivo ikerketa

Neurocult hazkuntza ingurunekeo DPSC zelulen markatzaileak eta angiogenesi-neurogenesirako gaitasun potentziala ikertu eta gero, 10.000 giza DPSC txertatu ziren “nude” arratoi atimikoen hipokanpo barruan, zirkonbuluzio dentatuan.

30 egun itxaron eta gero giza zelulak anti-gizaNestin antigorputzaren bidez identifikatu ziren. Ikusi zen giza zelula hauetariko asko arratoi odol-hodien barruan edo oso hurbil kokatu zirela (hauek laminina eta VEGF bidez tindatu ziren).

Ko-immunomarkaketa egin zen zenbait antigorputzen bidez: CD146 antigorputza garunekeo kapilareei lorturiko giza perizitoak markatzeko, CD31 antigorputza endotelioa markatzeko eta gizaNestin gizaki jatorriko zelulak markatzeko. Nestin bidez markaturiko DPSC zeluletatik deribatutako odol-hodien paretan zelula endotelialak ikusi ziren CD31 bidez markaturik eta giza perizito zelulak sortu berri zegoen baskulaturaren kanpoko geruzan integratuta.

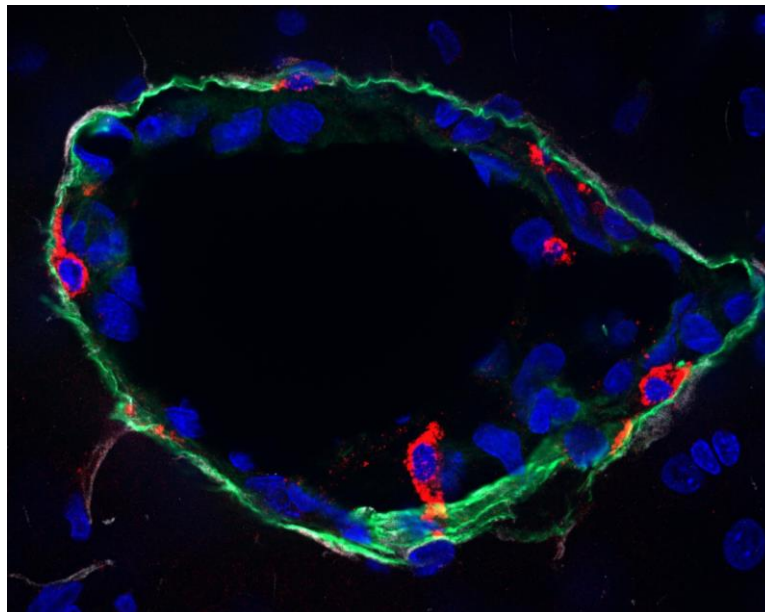
hDPSC deribatutako giza zelula endotelialen presentzia gehiago egiaztatzeko gizakiarekiko espezifikoak ziren anti-CD31 erabili ziren hilabete bat beranduago eta arratoian giza-CD31 positiboak ziren zelulak integratuta ikusi ziren garuneko baskulaturan.

UPV/EHU eta Achucarron egin duten ikerketaren bidez lehen aldiz frogatu dute giza zelula hauek arratoien garuneko odol-hodietan integratu eta hilabete beranduago CD31 positibo diren zelula endotelialak eta CD146 positibo diren perizitoak sortu ditzaketela osteoblasto/kartilagoa sortu gabe.

Bestalde, Nestinaz markatutako sortu berri ziren odol-hodi hauen artean tamaina txiki-ertaineko asko egon ziren VEGF aurkezten zutenak eta laminina bidezko tintzio altuagoa zutenak. Honek pentsarazten du txertatutako DPSC angiogenesi eta neobaskulogenesi prozesuak bultzatzen dituztela.

Ikerketa honen ekarpen nagusienetakoa izan da DPSC hazkuntza serum fetalaren presentzia gabe egitea. Izan ere, iktus iskemikoaren zelula ama bidezko terapia ikertu duten aurretiko entseguek FBS erabili izan dute % 10-20 kontzentrazioan zelula amen biziraupena bultzatu eta proliferazio zelularra estimulatzeko (42)(44)(46)(48)(49). Hala ere, honen erabilera ez da aproposa bi arazo nagusirengatik: (i) txertatutako zelulak diferentziazio osteoblastikoa izan dezakete eta hezuraren sorrera garunean ez da interesekoa, eta (ii) transplante errefusa eragin dezake. Ikerketa honetan erabilitako Neurocult inguruak ez du mentuaren errefusa eragiten (55).

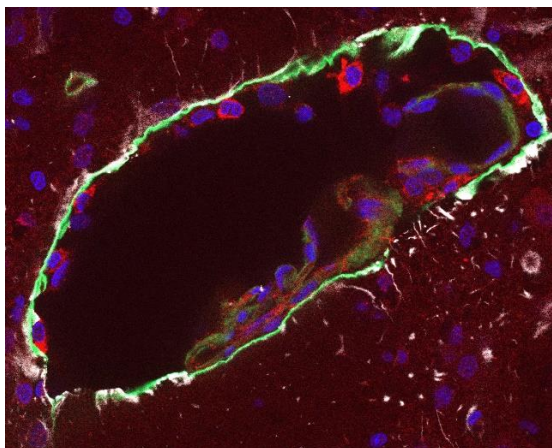
Momentuan bigarren entsegu baten dabilta Achucarro zentroan non jada DPSC zelula amak arteria barnetik (karotidatik) txertatu eta gero arratoien garuneko gune infartatuan odol-hodi berriak sortu direla frogatu duten. Lamininaz tindaturiko odol-hodian giza DPSC jatorriko zelula ama endotelialak identifikatu dituzte immunofluoreszentzia bidez 4 irudian ikus daitekeen moduan.



**4 Irudia. Giza DPSCek sortutako odol hodiak, infartua jasotako arratoi garun eremu batean.** Zelulak intrakaratideoki txertatu ziren infartua sortu eta 2 ordutara, eta odol hodi berrien sorkuntza egiaztatu zen handik 14 egunera, garun infartu eremuan. Irudian giza DPSC jatorrizko CD31+ zelula endotelial heldu batzuk ikusten dira (gorriz), garapen bidean dagoen odol hodi heldugabe baten lumenera begira. Odol hodiak laminina proteinan aberatsa den xafla basal bat argi erakusten du (berdez), eta zelula endotelialak haren gainean dispostzen dira, kasu batzuetan zelula hauen berezko itxura zapal ohikoa erakutsiz. Xafla basalaren azpitik astrozitoen oin terminalak bereizten dira (txuriz) HHE izango dena sortzeko. Nukleoak DAPI tindaketarekin erakusten dira (urdinez). (Irudia Ibarretxe eta Martin zuzendari-kideek emandakoa da, eta ikerketa honen emaitzak ez dira oraindik argitaratu).

Odol-hodi berriaren lumenari begira badaude giza-CD31 antigorputzarekin markatzen ez diren zelulak. Garapen bidean dagoen odol-hodi bat izanik bi aukera daude: zelula horiek oraindik CD31 adierazten ez duten DPSC jatorrizko endoteliozito heldugabeak izatea, edota arratoiaren zelula endotelial helduak izatea, giza-CD31 proteinarako negatibo direnak. Jatorri zehaztugabeko zelula horien izaera ikertzeko endotelio heldugabearen markatzailea den giza-Nestina erabili zen (5 irudia).





**5. Irudia. Giza DPSCek sortutako odol-hodia: zelula endotelial heldugabeak.** Irudi honetan odol-hodi berriaren lumenari begira giza-Nestina positiboak diren zelula endotelial heldugabeak markatuta agertzen dira (gorriz). Horrez gain, laminina ugariko xafla-basala (berdez), nukleoak DAPI tindaketarekin (urdinez) eta astrozitoen zitoesketoko GFAP proteina (txuriz) ikus daitezke. Aurreko irudiarekin alderatuz astrozito luzakinak askoz hobeto ikusten dira odol hodia inguratzen xafla basalaren azpitik. GFAP: proteina gliofibrilar azidoa (Irudia Ibarretxe eta Martin zuzendari-kideek emandakoa da, eta ikerketa honen emaitzak ez dira oraindik argitaratu).

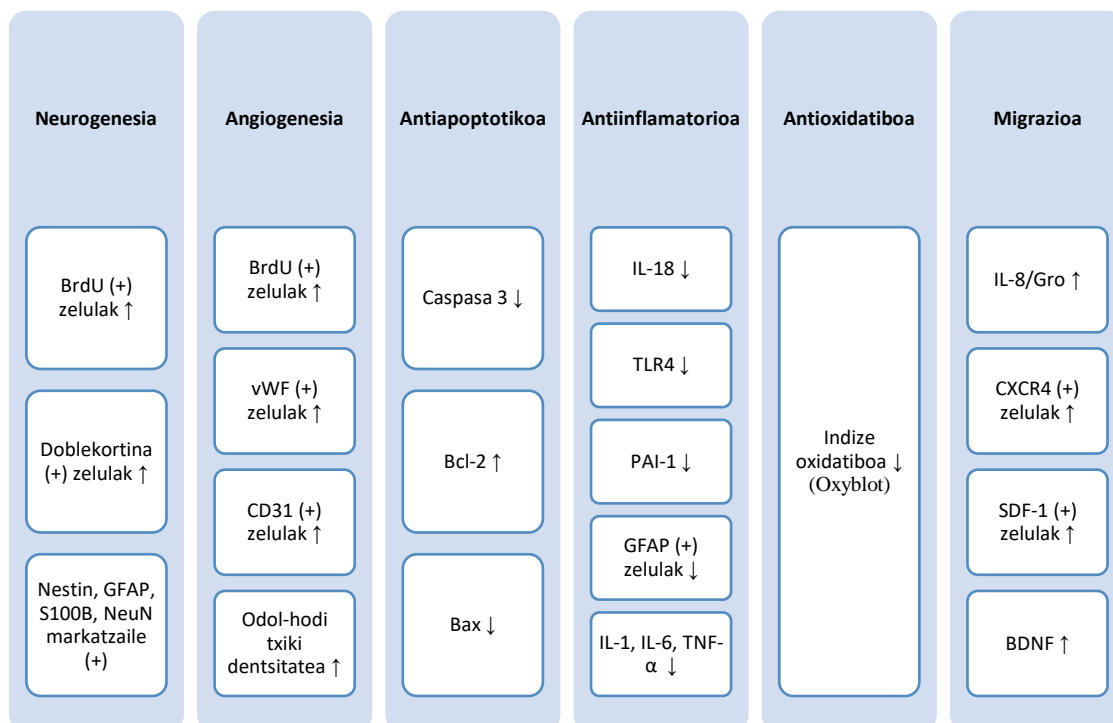
Giza-Nestin bidezko markaketan ikusi da 4 irudian CD31 positibo ez diren odol-hodiaren endotelioko gainontzeko zelulak giza-Nestin bidez markatu direla, beraz, giza DPSC jatorriko endoteliozito heldugabeak dira,

Emaitza itxaropentsu hauek atea irekitzen dute etorkizunean DPSC txertaketa neobaskularizazio sistema baten iturri moduan erabiltzeko garuneko iskemia moduko patologian.

#### 4.1.4. Animali ereduko ikerketen emaitza bateratuak

##### 4.1.4.1. Zelula amen ekintza-mekanismoak iskemia osteko babeserako

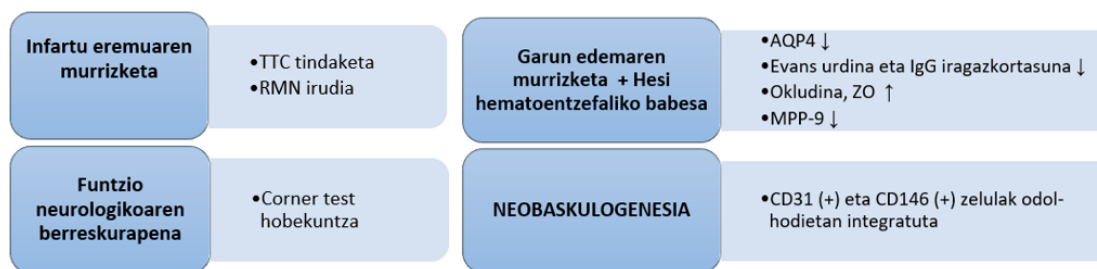
Ama zelulek hainbat mekanismo dituzte garuneko istripu baskular iskemikoa eta gero ematen diren aldaketa fisiopatologikoei aurre egiteko. Orain arte aztertutako animalia-ereduko ikerketen emaitzak bateratu dira ondorengo irudian.



**5 Irudia. Zelula amen ekintza mekanismoak.** AD-MSC, BM-MSC eta DPSC ama zelulek entsegu preklinikoetan erakutsi dituzten efektu terapeutikoetarako mekanismoen artean daude neurogenesia, angiogenesisia, neuroinflamazioa eta erantzun immunearen modulazioa, babes faktoreen sekrezioa eta migrazioa zelularra.

##### 4.1.4.2. Zelula ama bidezko terapiaren helburu terapeutiko potentzialak GIB iskemikoan

Azken urteetan sakon ikertu da GIB eta gero ematen diren aldaketa fisiopatologikoak. Iktusa eta gero ematen diren mikroingurunearen aldaketak eta iskemia ondorengo aktibitate zelularra ama zelula bidezko terapiaren helburu bihurtu daitezke. 6 Irudian helburu terapeutiko potentzialak laburbildu dira animalia-ereduko ikerketetan aztertu diren babes-mekanismoetan eta garun kaltearen hobekuntza ebidentzian oinarrituz.



**6 Irudia. Zelula ama txertaketaren helburu terapeutiko potentzialak.** Helburu potentzial nagusiak infartu eremuaren murrizketa eragitea, hesi hematoentzefaliko babestuz garun edemaren murrizketa lortzea, funtzio neurologikoa hobetzea eta bereziki neobaskulogenesia dira.

## 4.2. ENTSEGU KLINIKOAK

Hezur-muineko eta gantz-ehuneko zelula ama mesenkimalekin eta hortz-muineko zelula amekin egindako zenbait entsegu kliniko bildu dira. Taula batean bildu dira entseguetan erabili den metodologia eta lortu diren emaitza nagusiak (1 Taula).

Zelula iturria	Txerto mota	Txerto bidea	Dosia	Emaitza nagusiak
<b>AKUTUA (&lt; 1 aste)</b>				
BM-MSC	Alojenikoa	Zain barnetik	1,2 x 10 <sup>9</sup>	Funtzio neurologikoaren berreskurapenean ez dago desberdintasunik (balorazio irizpide nagusia), baina momentu goiztiarrago bat (24-36 ordu) onuragarria izan daiteke (57).
AD-MSC	Alojenikoa	Zain barnetik	1 + 10 <sup>6</sup> / Kg	Kontrako efektu, konplikazio eta garapen tumoralaren gabezia. Funtzio neurologikoaren hobekuntza infartu eremuaren murrizketarekin (58).
AD-MSC	Alojenikoa	Zain barnetik	1 + 10 <sup>6</sup> / Kg	Iktusaren sintomak ezarri eta lehen 2 astetan terapia segurua eta jasangarria de dosi bakarrean. Funtzio hobekuntza esanguratsurik ez (59).

<b>SUBAKUTUA (1 aste – 6 hilabete)</b>				
DPSC (JTR-161)	Alogenikoa	Zain barnetik	$1-3 \times 10^8$	DPSC administrazioa segurua eta jasagarria da. Gainera funtzio neurologikoetan hobekuntzarako tendentzia antzeman da (60).
BM-MS1	Autologoa	Zain barnetik	$1 \times 10^8$	Tratamendua jasotako taldeak kontrolak baino berreskurapen neurologiko hobea izan zuen (61).
BM-MS1	Autologoa	Zain barnetik	$1 \times 10^8$	Berreskurapen hobea eta 5 urtetara heriotza-tasa baxuagoa (62).
BM-MS1	Autologoa	Zain barnetik	$0,8-1,5 \times 10^8$	Lesioaren bolumen murrizketa frogatu zen RMN bidez eta funtzio neurologikoaren berreskurapena tumore edo hazkuntza zelular atipikorik gabe (63).
BM-MS1	Autologoa	Zain barnetik	$1 \text{ edo } 3 \times 10^8$	Aldaketa orokorrik ez. Baina funtzio motorearen hobekuntza (64).
<b>KRONIKOA (&gt; 6 hilabete)</b>				
BM-MS1	Autologoa	Zain barnetik	$5-6 \times 10^7$	Ez zen desberdintasun esanguratsurik egon kontroleko taldearekin alderatuz 4 urtera arte (65) (66).
BM-MS1 (hipoxiaz tratatuak)	Alogenikoa	Zain barnetik	$1 \times 10^8$	Berreskurapen neurologiko esanguratsua ikusi zen datu-basearekin alderatuz (67).
BM-MS1 BM-MNC	Autologoa	Zain barnetik	$5-6 \times 10^7$	Funtzio neurologiko hobekuntza esanguratsua adierazi zuen (68).
MN-MS1 (genetikoki modifikatuak)	Alogenikoa	Garun barnekoa	$2,5 \times 10^6$ $5 \times 10^6$ $10 \times 10^6$	2 urtetara berreskurapen neurologikoa (ESS, NIHSS, F-M test) (39) (69).
AD-MS1 (GXNPC1)	Alogenikoak	Garun barnekoa	$1 \times 10^8$	Ez zen kontrako efekturik egon. Funtzio neurologikoaren ebaluazio eskalak puntuazio hobea adierazi zuten 6 hilabetera (70).
DPSC	Autologoa	Garun barnekoa	$1 \times 10^7$	Funtzioaren berreskurapen seguru, egingarri eta behatua (71).

**1 Taula. Argitaraturiko entsegu klinikoak non zelula amak erabili dituzten garuneko istripu baskular iskemikoaren tratamendurako.** Ikerketa desberdinak txertoaren administrazio denboraren arabera sailkatu dira: akutua iktusa jasan ondorengo aste bat baino goizago, subakutua aste bat eta 6 hilabete bitartean eta kronikoa 6 hilabete baino beranduago. Bestalde, zelula ama jatorria, txerto mota, administrazio bidea eta txertaturiko zelula kopurua (dosia) ere adierazi dira. Azkenik emaitza nagusiak laburbildurik daude.

Entsegu guztietan metodologia guztiz desberdina izan da. Gehienak hezur-muineko zelula ama mesenkimal autologoekin egin dira (BM-MSC), hauez gain, gantz-ehunetik deribaturiko MSC eta hortz-muineko zelula amekin egindako entseguak ere ikus daitezke. Zelula ama gehienak zain barnetik izan dira txertatuak, garun barneko txertaketa egiteko prozedimenduak arrisku handia suposatzen baitu pazienteentzat. Bestalde, dosietan ikus daitekeen bezala zelula kopuru handiagoa txertatzeko aukera ematen du zain bideak ( $3 \times 10^8$  arte), garun barnekoak baino ( $1 \times 10^7$ ). Dosi desberdintasun honen azalpena garun barneko zelula kopuru administrazio handiegiak dakarren masa efektuan dago (39).

Entseguetan ikusi daiteke zain barneko administrazioa batez ere fase akutu eta subakutuetan ikertu dela eta garun barneko administrazioa, berriz, fase kronikoan. Hau garun iskemiaren prozesu fisiopatologikoan dago oinarrituta, izan ere, iskemiaren fase bakoitzak helburu terapeutiko bat izango du: fase akutuan penunbra aldia luzatu, fase subakutuan zentsu gabeko inflamazioa ekidin eta fase kronikoan neurogenesi-angiogenesisia eragin (72).

Entsegu bakoitzean funtzio neurologikoaren ebaluazioa egiteko metodologia guztiz desberdina izan zen arren, orokorrean denek erabili zituzten “escala de Rankin modificada (mRS)”, “la escala de accidentes cerebrovasculares del Instituto Nacional de Salud (NIHSS)” eta Barthel indizea (BI).

Orokorrean, momentuz egindako entsegu klinikoen emaitzak positiboak izan dira, zelula aman bidezko terapian erabilitako metodologia gehienak seguruak ematen baitute.

#### **4.2.1. Hezur-muineko zelula ama mesenkimalak (BM-MSC)**

Esan bezala entsegu gehienak hezur muineko zelula ama mesenkimalekin burutu dira. Horien artean bereziki deigarria da Lee et al. 2010-ean buruturiko ikerketa (62). I/II faseko entsegu kliniko zabala, aleatorioa eta kontrolatua izan zen non “ex vivo” hazitako BM-MSC autologoen zain bideko txertaketaren segurtasuna eta eraginkortasuna ebaluatu zen iktus iskemiko akutua jasan zuten pazienteetan. 30-75 urte bitarteko pazienteek hartu zuten parte. Zelula ama autologoak eskuratzeko pazienteen atzeko gandor iliakotik 5 ml hezur muin xurgatu ziren iktus ondorengo lehen hilean. Hazkuntza egin ostean, gero eta dosi handiagoko txertaketak burutu zituzten zain bidez. handituz zihoan dosi mailakatuetan administratu zitzaaien zain bidez. Iktus akutua jasandako 16 pazienteek tratamendua jaso zuten (trataturako taldea) eta 36 pazienteek ez (kontrol taldea) (62).

Emaitzek adierazi zuten terapia segurua eta eraginkorra dela epe luzera, izan ere, mRS eskala bidez neurturiko funtzio neurologikoaren berreskurapena hobetu eta heriotza-tasa murriztu zen. Hala ere, beharrezko ikusten dute epe luzeko jarraipena barneratzen duen ikerketa egitea zenbait arrazoiengatik: (i) ikerketan MSC hazkuntzarako erabili den serum fetalak (FBS) eragin ditzazkeen konplikazioak aztertzeke, eta (ii) ikerketako datuetan hobekuntza funtzionala terapia osteko lehen momentuan agertu eta denboraz txikitu egin zen, beraz, interesekoa da epe luzera MSC transplanteak dakarren emaitza funtzionala ebaluatzea (62).

Gainera, ikerketan aztertu zen ea SDF-1 zelula estromaletatik deribatutako proteinaren adierazpenak eragina zuen terapiaren eraginkortasunean. Aurretik azaldu den bezala proteina hau areagotu egiten da iktusaren ondoren eta zelula amen mobilizazioan, inkorporazioan, lokalizazioan, biziraupenean, proliferazioan eta diferentziazioan parte hartzen du. Ikerketan ikusi da erlazio zuzena dagoela hobekuntza klinikoaren eta tratamendua eman den momentuan zegoen odoleko SDF-1 $\alpha$  mailen artean (62).

#### **4.2.2. Gantz-ehuneko zelula ama mesenkimalak (AD-MSC)**

Garuneko istripu baskular kronikoa pairatzen duten I faseko ikerketa klinikoan, gantz-ehuneko zelula ama mesenkimal autologoen osaturiko GXNPC1 produktua ikertu dute Chiu et al. 2022-an (70).

Txertoa lortzeko ebakuntzaz pazienteen sabel-hormako 2-5 gramo gantz-ehun atera eta in vitro hazkuntza egin eta gero  $1 \times 10^8$  zelulako dosian txertaketak egin zituzten garun barnean. Ikerketaren helburu nagusia GXNPC1 produktuaren segurtasuna frogatzea izan zen, horretarako kontrako erreakzioak, hematologia, koagulazioa eta biokimika ikertu zituzten txertaketa egin eta 6 hilabete ondoren. Bigarren mailako helburua eraginkortasuna ikertzea izan zen GIB kronikodun pazienteetan hobekuntza neurologiko funtzionalak neurtuz 6 hilabeteren buruan zenbati eskalaren bidez (NIHSS, BI, Berg oreka eskala, potentzial ebokatu somatosensorial eta beste zenbait probaz). Bestalde, garun parenkimaren aldaketa ebolutiboa erresonantzia magnetiko bidez izan zen kontrolatua hiru pazienteetan.

Entsegu klinikoak GXNPC1-ren garun barneko txertaketaren segurtasun eta eraginkortasun frogatu zuen. Entseguko pazienteek ez zuten inongo kontrako erreakziorik manifestatu, garun barneko hemorragia edo nerbio sistema zentralako infekzioak ere kontuan hartuta (garun barneko administrazio beraren arriskuak). Horrez gain, funtzio eta sintoma neurologikoen hobekuntza ikusi zen 6 hilabeteren buruan, txertaketa osteko RMN irudi aldaketekin erlazioa izan dezakeena. Emaizta positibo hauen aurrean II faseko entsegu klinikoa hastear daude (70).

#### **4.2.3. Hortz-muineko zelula amak (DPSC)**

Entsegu preklinikoetan DPSC txertaketak emaitza itxaropentsuak izan dituen arren, orain arte egindako entsegu klinikoek momentuz segurtasuna eta eraginkortasuna besterik ez dute frogatu. Bereziki interesgarria suertatzen da Suda et al. 2019-an hazitako entsegu klinikoaz aritzea, non JTR-161 izenetako produktua ikertu den (60) JTR-161 gizaki heldu osasuntsuen hortzetatik lorturiko hortz-muineko zelula amaz (hDPSC) osaturik dagoen produktu zelular alogenikoa da. J-REPAIR izeneko ikerketa multizentriko, aleatorizatu eta plazebo bidez kontrolatu honen helburua da frogatzea garuneko istripu baskular iskemiakoa jasan duten pazienteetan DPSC erabilera segurua eta eraginkorra dela. Azken 24 orduetan GIB iskemikoa jasandako 40 eta 80 urte bitarteko pazienteek parte hartu zuten. Pazienteak era aleatorioan banatuak izan ziren hortz-muineko zelula amen  $1 \times 10^8$  dosiko infusioa (JTR-161) edo plazeboa jasotzeko.

Tratamenduaren eraginkortasuna ikertzeko zenbait parametro neurtu ziren. JTR-161 eta plazebo taldeen arteko desberdintasunak detektatzeko balorazio kriterio nagusia hurrengo kontsideratu zen: mRS  $\leq 1$ , NIHSS  $\leq 1$  eta BI  $\geq 95$  (emaitza bikainaren adierazgarri direnak). Bestalde, EQ-5D-5L eskala, presio arteriala, gorputzeko tenperatura, infartuaren eremua, odoleko zitosina eta hazkuntza faktoreak eta oxigeno saturazioa ere baloratu ziren administrazio ondorengo zenbait egunetan.

Ikerketak frogatu zuen hDPSC txertaketa segurua eta jasangarria dela GIB akutua pairatu duten pazienteetan. Gainera, emaitza funtzionaletan hobekuntzarako joera ikusi zen zelula amak jaso zituzten pazienteetan kontrolekoekin alderatuz. Hala ere, oraindik ez da J-REPAIR ikerketaren emaitza esanguratsurik argitaratu eta etorkizunari begira ikerketa gehiago egin beharko dira aurkikuntzak egiaztatu eta dosi optimoa eta protokolo egokiak finkatzeko (60).

## 5. ONDORIOAK

Arratoi ereduetan egindako ikerketa preklinikoen bidez argi geratu da bai zelula ama mesenkimalek zein hortz muineko zelula amek zenbait babes mekanismo eraginkor dituztela iskemiak eragindako kalteen kontra egin eta iktusaren aurkako terapia potentzial bat izateko. Entsegu klinikoetan hobekuntza nabarmena ikusi da zelula ama bidez tratatutako pazienteengan. Hala ere, entsegu kliniko gehienak I edo II segurtasun fasean aurkitzen dira, beraz, hurrengo pausua erabilera klinikodun terapia berri baten bilaketarako entseguak abiaraztea da kohorte zabalagoekin eta zenbait zalantza argituz: zelula mota, administrazio bidea, administraziorako momentua eta dosi egokiena.

Nahiz eta asko dagoen ikasteko, orain arteko ikerketen emaitzek pentsarazten dute zelula ama bidezko terapia aukera itxaropentsua eta eraginkorra izan daitekeela garuneko istripu baskular iskemikoaren tratamendurako.



## **BIBLIOGRAFIA**

- (1) Feigin VL, Roth GA, Naghavi M, Parmar P, Krishnamurthi R, Chugh S, et al. Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Neurol.* 2016;15(9): 913-924.
- (2) Sociedad Española de Neurología, GEECV. El Atlas del Ictus de España 2019. [Internet]. 2019th ed. Fesemi.org. 2020 [konsulta 2023/02/05].
- (3) García Alfonso C, Martínez Reyes AE, García V, Ricaurte Fajardo A, Torres I, Coral Casas J. Actualización en diagnóstico y tratamiento del ataque cerebrovascular isquémico agudo. *Univ Med.* 2019; 60(3):1-17.
- (4) Sobrino García P, García Pastor A, García Arratibel A, Vicente Peracho G, Rodríguez Cruz PM, Pérez Sánchez JR, et al. Clasificación etiológica del ictus isquémico: comparación entre la nueva clasificación A-S-C-O y la clasificación del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. *Neurología.* 2013; 28(7): 417-424.
- (5) Franco Diez E, Campos Pavón J, Suárez Barrientos A, Sánchez Vadillo I, et al. *Manual de Neurología y Neurocirugía* . 16th ed.: AMIR España. 2022.
- (6) Feigin VL, Brainin M, Norrving B, Martins S, Sacco RL, Hacke W, et al. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *Int J Stroke.* 2022; 17(1): 18-29.
- (7) Giuria M. Causas determinantes del Accidente Cerebrovascular [Tesis]. Buenos Aires: Universidad FASTA. 2010.
- (8) Gall SL, Tran PL, Martin K, Blizzard L, Srikanth V. Sex Differences in Long-Term Outcomes After Stroke. *Stroke.* 2012; 43(7):1982-1987.
- (9) Wolf PA, Clagett GP, Easton JD, Goldstein LB, Gorelick PB, Kelly-Hayes M, et al. Preventing Ischemic Stroke in Patients With Prior Stroke and Transient Ischemic Attack : A Statement for Healthcare Professionals From the Stroke Council of the American Heart Association. *Stroke.* 1999; 30(9): 1991-1994.

- (10) O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Hongye Z, Lim Chin S, Rao-Melacini P, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet*. 2010; 376(9735): 112-123.
- (11) Yusuf S, Lonn E, Pais P, Bosch J, López-Jaramillo P, Zhu J, et al. Blood-Pressure and Cholesterol Lowering in Persons without Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2016; 374(21): 2032-2043.
- (12) Demarin V, Lisak M, Morović S, Cengić T. Low high-density lipoprotein cholesterol as the possible risk factor for stroke. *Acta Clin Croat*. 2010; 49(4): 429-439.
- (13) Hewitt J, Castilla Guerra L, Fernández-Moreno MdC, Sierra C. Diabetes and Stroke Prevention: A Review. *Stroke Res Treat* . 2012; Vol. 2012.
- (14) Pan B, Jin X, Jun L, Qiu S, Zheng Q, Pan M. The relationship between smoking and stroke. *Medicine*. 2019; 98(12): e14872.
- (15) Strazzullo P, Elia L, Cairella G, Garbagnati F, Cappuccio FP, Scalfi L. Excess body weight and incidence of stroke: meta-analysis of prospective studies with 2 million participants. *Stroke*. 2010; 41(5): 418-426.
- (16) Kulshreshtha A, Vaccarino V, Goyal A, McClellan W, Nahab F, Howard VJ, et al. Family History of Stroke and Cardiovascular Health in a National Cohort. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2015; 24(2): 447-454.
- (17) Fuentes B, Gállego J, Gil-Nuñez A, Morales A, Purroy F, Roquer J, et al. Guía para el tratamiento preventivo del ictus isquémico y AIT (I). Actuación sobre los factores de riesgo y estilo de vida. *Neurología*. 2012; 27(9): 560-574.
- (18) Markus HS. Cerebral perfusion and stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75(3): 353-361.
- (19) Fisher M. The Ischemic Penumbra: A New Opportunity for Neuroprotection. *Cerebrovasc Dis*. 2006; 21 Suppl 2: 64-70.
- (20) Kawabori M, Yenari MA. Inflammatory responses in brain ischemia. *Curr Med Chem*. 2015; 22(10):1258-1277.

- (21) Chen S, Shao L, Ma L. Cerebral Edema Formation After Stroke: Emphasis on Blood-Brain Barrier and the Lymphatic Drainage System of the Brain. *Front Cell Neurosci.* 2021; 15: 716825.
- (22) Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis.* 2008; 32(2): 200-219.
- (23) Kawabori M, Yenari MA. The role of the microglia in acute CNS injury. *Metab Brain Dis.* 2015; 30(2): 381-392.
- (24) MedlinePlus en español [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.) [actualizado 27 ago. 2019]. Accidente cerebrovascular [consulta 2023/02/02].
- (25) Ustrell-Roig X, Serena-Leal J. Ictus. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cerebrovasculares. *Revista Española de Cardiología.* 2007; 60(7): 753-769.
- (26) Goldstein LB. Acute ischemic stroke treatment in 2007. *Circulation.* 2007; 116(13): 1504-1514.
- (27) Gurman P, Miranda OR, Nathan A, Washington C, Rosen Y, Elman NM. Recombinant tissue plasminogen activators (rtPA): A review. *Clin Pharmacol Ther.* 2015; 97(3): 274-285.
- (28) Kleindorfer DO, Towfighi A, Chaturvedi S, Cockroft KM, Gutierrez J, Lombardi-Hill D, et al. 2021 Guideline for the Prevention of Stroke in Patients With Stroke and Transient Ischemic Attack: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2021; 52(7): e364-e467.
- (29) Fedace.org [Internet]. El Daño Cerebral. Modelo de atención al Daño Cerebral Adquirido. FEDACE (Federación Española de Daño Cerebral) [consulta 2023/03/05].
- (30) Noé E, Gómez A, Bernabeu M, Quemada I, Rodríguez R, Pérez T, et al. [Internet] Guía: Principios básicos de la neurorrehabilitación del paciente con daño cerebral adquirido. Recomendaciones de la Sociedad Española de Neurorrehabilitación. *Neurología.* 2021. [consulta 2023/01/29].

- (31) Zhou G, Wang Y, Gao S, Fu X, Cao Y, Peng Y, et al. Potential Mechanisms and Perspectives in Ischemic Stroke Treatment Using Stem Cell Therapies. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 646927.
- (32) Kawabori M, Shichinohe H, Kuroda S, Houkin K. Clinical Trials of Stem Cell Therapy for Cerebral Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(19):7380.
- (33) Kolios G, Moodley Y. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration.* 2012; 85(1): 3-10.
- (34) Tan Y, Ooi S, Wang L. Immunogenicity and tumorigenicity of pluripotent stem cells and their derivatives: genetic and epigenetic perspectives. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014; 9(1): 63-72.
- (35) Luzuriaga J, Polo Y, Pastor-Alonso O, Pardo-Rodríguez B, Larrañaga A, Unda F, et al. Advances and Perspectives in Dental Pulp Stem Cell Based Neuroregeneration Therapies. *IJMS.* 2021; 22(7).
- (36) Luzuriaga J. Birsortze neuralean erabiltzeko hortz muineko ama zelulen gaitasun funtzionalaren azterketa [Tesia] UPV/EHU: Biologia zelular eta Histologia Saila Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea 2018.
- (37) Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell.* 2015;17(1):11-22.
- (38) Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al. A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med.* 2015; 372(1): 11-20.
- (39) Steinberg GK, Kondziolka D, Wechsler LR, Lunsford LD, Coburn ML, Billigen JB, et al. Clinical Outcomes of Transplanted Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stroke: A Phase 1/2a Study. *Stroke.* 2016; 47(7): 1817-1824.
- (40) Yamaguchi S, Yoshida M, Horie N, Satoh K, Fukuda Y, Ishizaka S, et al. Stem Cell Therapy for Acute/Subacute Ischemic Stroke with a Focus on Intraarterial Stem Cell Transplantation: From Basic Research to Clinical Trials. *Bioengineering (Basel).* 2022; 10(1).

- (41) Nouri N, Aghebati-Maleki L, Yousefi M. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Promising Tool in the Treatment of pre mature ovarian failure. *J Reprod Immunol.* 2021;147:103363.
- (42) Leu S, Lin Y, Yuen C, Yen C, Kao Y, Sun C, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats. *J Transl Med.* 2010; 8(1): 63.
- (43) Marques BL, Carvalho GA, Freitas EMM, Chiareli RA, Barbosa TG, Di Araújo AGP, et al. The role of neurogenesis in neurorepair after ischemic stroke. *Semin Cell Dev Biol.* 2019; 95: 98-110.
- (44) Grudzenski S, Baier S, Ebert A, Pullens P, Lemke A, Bieback K, et al. The effect of adipose tissue-derived stem cells in a middle cerebral artery occlusion stroke model depends on their engraftment rate. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8(1): 96.
- (45) Zhang B, Tian X, Hao J, Xu G, Zhang W. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Tissue Regeneration. *Cell Transplant.* 2020; 29.
- (46) Rohden F, Teixeira LV, Bernardi LP, Ferreira PCL, Colombo M, Teixeira GR, et al. Functional Recovery Caused by Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Administered 24 h after Stroke in Rats. *IJMS.* 2021; 22(23).
- (47) Dharmasaroja P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. *J Clin Neurosci.* 2009; 16(1): 12-20.
- (48) Tang G, Liu Y, Zhang Z, Lu Y, Wang Y, Huang J, et al. Mesenchymal Stem Cells Maintain Blood-Brain Barrier Integrity by Inhibiting Aquaporin-4 Upregulation After Cerebral Ischemia. *Stem Cells.* 2014; 32(12): 3150.
- (49) Cheng Z, Wang L, Qu M, Liang H, Li W, Li Y, et al. Mesenchymal stem cells attenuate blood-brain barrier leakage after cerebral ischemia in mice. *J Neuroinflammation.* 2018; 15(1).
- (50) Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.* 2009; 8(2): 205-216.

- (51) Uribe-Etxebarria V, Pineda JR, García-Gallastegi P, Agliano A, Unda F, Ibarretxe G. Notch and Wnt Signaling Modulation to Enhance DPSC Stemness and Therapeutic Potential. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(8).
- (52) Foudah D, Monfrini M, Donzelli E, Niada S, Brini AT, Orciani M, et al. Expression of Neural Markers by Undifferentiated Mesenchymal-Like Stem Cells from Different Sources. *J Immunol Res.* 2014; 2014: 987678-16.
- (53) Hilkens P, Bronckaers A, Ratajczak J, Gervois P, Wolfs E, Lambrechts I. The Angiogenic Potential of DPSCs and SCAPs in an In Vivo Model of Dental Pulp Regeneration. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: 2582080-14.
- (54) Kim B, Bae H, Kwon I, Lee E, Park J, Khademhosseini A, et al. Osteoblastic/Cementoblastic and Neural Differentiation of Dental Stem Cells and Their Applications to Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012; 18(3): 235-244.
- (55) Doğan A, Demirci S, Şahin F. In vitro differentiation of human tooth germ stem cells into endothelial- and epithelial-like cells. *Cell Biol Int.* 2015; 39(1): 94-103.
- (56) Luzuriaga J, Pastor-Alonso O, Encinas JM, Unda F, Ibarretxe G, Pineda JR. Human Dental Pulp Stem Cells Grown in Neurogenic Media Differentiate Into Endothelial Cells and Promote Neovasculogenesis in the Mouse Brain. *Front Physiol.* 2019; 10.
- (57) Hess DC, Wechsler LR, Clark WM, Savitz SI, Ford GA, Chiu D, et al. Safety and efficacy of multipotent adult progenitor cells in acute ischaemic stroke (MASTERS): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 2017; 16(5): 360-368.
- (58) Díez-Tejedor E, Gutiérrez-Fernández M, Martínez-Sánchez P, Rodríguez-Frutos B, Ruiz-Ares G, Lara ML, et al. Reparative Therapy for Acute Ischemic Stroke with Allogeneic Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue: A Safety Assessment: A Phase II Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Single-center, Pilot Clinical Trial. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2014; 23(10): 2694-2700.
- (59) de Celis-Ruiz E, Fuentes B, Alonso de Leciñana M, Gutiérrez-Fernández M, Borobia AM, Gutiérrez-Zúñiga R, et al. Final Results of Allogeneic Adipose Tissue-

Derived Mesenchymal Stem Cells in Acute Ischemic Stroke (AMASCIS): A Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single-Center, Pilot Clinical Trial. *Cell Transplant* 2022; 31: 9636897221083863.

(60) Suda S, Nito C, Ihara M, Iguchi Y, Urabe T, Matsumaru Y, et al. Randomised placebo-controlled multicentre trial to evaluate the efficacy and safety of JTR-161, allogeneic human dental pulp stem cells, in patients with Acute Ischaemic stroke (J-REPAIR). *BMJ Open*. 2022;12(5): e054269-054269.

(61) Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol*. 2005; 57(6): 874-882.

(62) Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY. A Long-Term Follow-Up Study of Intravenous Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Ischemic Stroke. *Stem Cells*. 2010; 28(6):1099-1106.

(63) Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y, Ishiai S, Onodera R, et al. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain*. 2011; 134(Pt 6): 1790-1807.

(64) Jaillard A, Hommel M, Moisan A, Zeffiro TA, Favre-Wiki I, Barbieux-Guillot M, et al. Autologous Mesenchymal Stem Cells Improve Motor Recovery in Subacute Ischemic Stroke: a Randomized Clinical Trial. *Transl Stroke Res*. 2020; 11(5): 910-923.

(65) Bhasin A, Kumaran SS, Bhatia R, Mohanty S, Srivastava MVP. Safety and Feasibility of Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Chronic Stroke in Indian patients. A four-year follow up. *J Stem Cells Regen Med*. 2017; 13(1): 14-19.

(66) Bhasin A, Srivastava M, Bhatia R, Mohanty S, Kumaran S, Bose S. Autologous intravenous mononuclear stem cell therapy in chronic ischemic stroke. *J Stem Cells Regen Med*. 2012; 8(3):181-189.

(67) Levy ML, Crawford JR, Dib N, Verkh L, Tankovich N, Cramer SC. Phase I/II Study of Safety and Preliminary Efficacy of Intravenous Allogeneic Mesenchymal Stem Cells in Chronic Stroke. *Stroke*. 2019; 50(10): 2835-2841.

(68) Bhasin A, Padma Srivastava MV, Mohanty S, Bhatia R, Kumaran SS, Bose S. Stem cell therapy: A clinical trial of stroke. *Clin Neurol Neurosurg.* 2013; 115(7): 1003-1008.

(69) Steinberg GK, Kondziolka D, Wechsler LR, Lunsford LD, Kim AS, Johnson JN, et al. Two-year safety and clinical outcomes in chronic ischemic stroke patients after implantation of modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells (SB623): a phase 1/2a study. *J Neurosurg* 2018: 1-11.

(70) Chiu T, Baskaran R, Tsai S, Huang C, Chuang M, Syu W, et al. Intracerebral transplantation of autologous adipose-derived stem cells for chronic ischemic stroke: A phase I study. *J Tissue Eng Regen Med.* 2022; 16(1): 3-13.

(71) Nagpal A, Karlea LK, Monica A Hamilton-Bruce, Kaidonis X, Austin GM, Levi C, et al. TOOTH (The Open study Of dental pulp stem cell Therapy in Humans): Study protocol for evaluating safety and feasibility of autologous human adult dental pulp stem cell therapy in patients with chronic disability after stroke. *Int J Stroke.* 2016; 11(5): 575-585.

(72) Liu H, Reiter S, Zhou X, Chen H, Ou Y, Lenahan C, et al. Insight Into the Mechanisms and the Challenges on Stem Cell-Based Therapies for Cerebral Ischemic Stroke. *Front Cell Neurosci.* 2021; 15: 637210.