

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Medikuntza Gradua / Grado en Medicina

Utilización de células madre mesenquimales (MSCs) en el tratamiento de la lesión tisular por isquemia-reperfusión cardíaca.

Egilea /Autor:
Mikel Isla Jover
Zuzendaria / Director/a:
Ana Isabel Alonso Varona

© 2022, Mikel Isla Jover

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora y profesora Ana Isabel Alonso Varona, por su inestimable ayuda y su gran disposición.

A las personas cercanas que me han acompañado y me acompañan.

Yo soy yo y mi circunstancia, y si no la salvo a ella no me salvo yo.

José Ortega y Gasset, *Meditaciones del Quijote*, 1914.

RESUMEN

Introducción: la lesión miocárdica producida por eventos isquémicos-reperfusivos es la principal causa de mortalidad en el mundo, según la Organización Mundial de la Salud. La utilización de células madre de origen mesenquimal (MSCs) constituye una nueva propuesta terapéutica.

Objetivos: realizar una revisión y elaborar una síntesis del conocimiento actual sobre el empleo de las MSCs como estrategia terapéutica en la lesión tisular por isquemia-reperusión a nivel cardíaco.

Métodos: se realizó una revisión bibliográfica y análisis de los 50 artículos más citados, publicados entre 2016 y 2021 en PubMed, ClinicalKey, Cochrane, Ovid, TripDataBase, Web of Science y Epistemonikos.

Resultados: la evidencia obtenida en ensayos realizados *in vivo* e *in vitro* pone de manifiesto que el tratamiento con MSCs mejora la función miocárdica y la supervivencia, reduciendo el daño tisular, a través de una disminución de la inflamación, del estrés oxidativo y de la frecuencia de eventos apoptóticos. Asimismo, se produce una estimulación de la proliferación celular, mejora la perfusión del tejido lesionado y se regulan los procesos de autofagia. Sin embargo, los resultados obtenidos en los ensayos clínicos realizados no han cumplido las expectativas del tratamiento.

Discusión: la evidencia disponible presenta limitaciones relacionadas con la elección de modelos experimentales, la heterogeneidad de los protocolos de aplicación terapéutica de MSCs y la ausencia de estudios encaminados a analizar los efectos de dicha terapia a nivel sistémico. Sin embargo, los datos aportados en la bibliografía muestran una gran coherencia en cuanto a los mecanismos de acción y los resultados preclínicos obtenidos con la aplicación terapéutica de las MSCs.

Conclusión: la utilización de MSCs como terapia en eventos isquémicos-reperfusivos requiere intensificar la investigación encaminada a potenciar su eficacia terapéutica, antes de que esta terapia pueda llegar a la práctica clínica.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 DAÑO TISULAR POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.....	1
1.1.1 Características generales.....	1
1.1.2 Características, clínica y frecuencia a nivel cardíaco.....	2
1.1.3 Tratamiento del daño tisular por isquemia-reperfusión.....	4
1.2 APLICABILIDAD TERAPÉUTICA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AL DAÑO TISULAR POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN .	4
2. OBJETIVOS	6
3. MÉTODOS	7
4.RESULTADOS.....	11
4.1 ISQUEMIA-REPERFUSIÓN CARDÍACA	11
4.1.1 Evidencia disponible	11
4.1.2 Efectos del tratamiento con MSCs.....	18
4.1.3 Mecanismos implicados	24
5. DISCUSIÓN	37
5.1 LIMITACIONES DE LA EVIDENCIA.....	37
5.1.1 Modelos.....	37
5.1.2 Variabilidad.....	37
5.1.3 Momento de aplicación.....	38
5.1.4 Efectos sistémicos del daño miocárdico	38
5.2 COHERENCIA EN LA LITERATURA ANALIZADA.....	39
5.3 ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN	39
5.4 LIMITACIONES DE LA PRESENTE REVISIÓN	41
6. CONCLUSIONES	42
7. BIBLIOGRAFÍA	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DAÑO TISULAR POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.

1.1.1 Características generales.

Los eventos isquémicos son la principal causa de morbimortalidad en los países occidentales. Es un problema clínico relevante en el que se producen una privación/disminución del flujo sanguíneo en un órgano y la restitución posterior de dicho flujo. Este síndrome cursa con un estrés oxidativo local y una respuesta inflamatoria (tanto local como sistémica) que acentúan el daño celular en el órgano hipóxico tras la restauración del aporte de oxígeno.

El daño producido en los tejidos como consecuencia de la falta de aporte sanguíneo es proporcional a su intensidad y duración. Así, además del daño celular ocasionado por la hipoxia (disminución del ATP y el pH intracelulares, aumento de los niveles de calcio y alteración de los mecanismos de regulación del volumen celular, entre otros)(1), la isquemia-reperfusión aumenta significativamente los niveles locales de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), proteína inductora de interferón gamma (IP-10) e interleucina 6 (IL-6). Algunos de estos factores son responsables de movilizar y reclutar leucocitos, que liberan especies reactivas de oxígeno (ROS), activadores endoteliales y enzimas proteolíticas. Por último, también está descrito un daño microcirculatorio asociado a la liberación de factores inflamatorios (2).

Paradójicamente, la perfusión del tejido isquémico, aun siendo globalmente beneficiosa y necesaria para tratar de preservarlo, produce en sí misma un aumento del daño. Esto ocurre a través de un incremento de la concentración intracelular de ROS, estrés del retículo endoplásmico liso y rugoso, secuestro de células inmunes proinflamatorias, y falta del flujo capilar post-reperfusión (por disfunción microvascular y endotelial). Se ha definido el mecanismo del daño por isquemia-reperfusión como una destrucción tisular asociada a una deficiencia microcirculatoria, a la acción de células inflamatorias y al exceso de ROS producido. (3)

Como consecuencia, en el daño tisular se producen necrosis, apoptosis mediada por múltiples vías de señalización (*Fas* y activación de caspasas 8 y 3) y autofagia (1,4).

1.1.2 Características, clínica y frecuencia a nivel cardíaco.

La cardiopatía isquémica es la principal causa de mortalidad en el mundo. En la Unión Europea, la forma aguda es responsable del 40% de las muertes, siendo más frecuente en varones y aumentando su incidencia y prevalencia con la edad. Los síndromes coronarios agudos tienen una mortalidad de un 5,3% - 6,3% (con y sin elevación del ST, respectivamente) (5).

Las personas que padecen cardiopatía isquémica crónica tienen una mortalidad global elevada en un 30%, es decir, un riesgo relativo de 1,3 con respecto a otras personas de las mismas características que carecen de afectación cardíaca.

La clínica característica del síndrome coronario agudo es un dolor precordial opresivo, con posible irradiación hacia el lado izquierdo de la mandíbula o el hombro izquierdo. En ocasiones, también puede presentarse con dolores de localización atípica, clínica general inespecífica, insuficiencia cardíaca aguda, arritmias o inestabilidad hemodinámica.

Además de los mecanismos fisiopatológicos generales de la lesión por isquemia-reperusión, en la lesión juega un papel relevante la contractilidad del tejido miocárdico (**Figura 1**). Entre otros factores, los desequilibrios iónicos (destacando la sobrecarga de calcio) y el incremento de ROS condicionan una hipercontracción y una rotura sarcolemal en unos cardiomiocitos con una fragilidad aumentada. Esto contribuye a la necrosis de los cardiomiocitos y a la consecuente liberación de su contenido, que actúa como proinflamatorio, quimiotáctico y proapoptótico, contribuyendo a la propagación de la lesión (6). Así, las células necróticas activan vías de señalización proinflamatorias de receptores *toll-like* y del complemento, dando lugar a una liberación de citocinas inflamatorias (IL-1 y TNF- α , entre otros) y quimiocinas (MCP-1). Esto ocasiona un efecto quimiotáctico sobre neutrófilos y monocitos. Tras la eliminación de los restos de células necróticas, estas células liberan mediadores antiinflamatorios, y se observa un infiltrado mononuclear de predominio M2. Esto se asocia a una activación de células reparadoras: proliferan los

fibroblastos, que sufren una transdiferenciación miofibroblástica, depositando grandes cantidades de matriz extracelular. Este proceso genera un tejido conectivo con abundante colágeno, carente de capacidad contráctil, alterando de manera crítica la función cardíaca (**Figura 2**) (7).

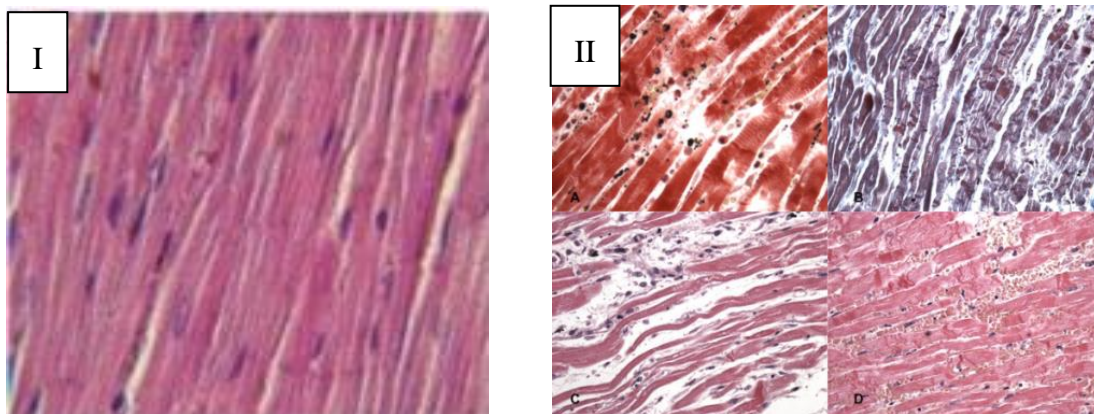


Figura 1. Histología del infarto agudo de miocardio. En la imagen I, tejido miocárdico sano (82). En la imagen II, hallazgos histológicos característicos del infarto agudo de miocardio: infiltración polimorfonuclear (A), hipercontracción cardiomiocítica (B), elongación sarcomérica y nuclear (C) y áreas de reperfusión (D). Tinción con hematoxilina-eosina. Obtenido de Turillazzi, et al. (83)

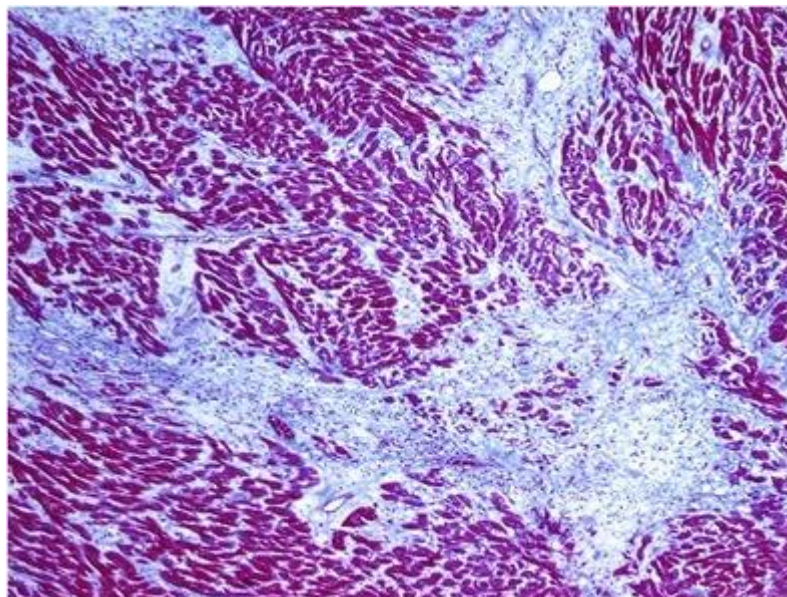


Figura 2. Fibrosis miocárdica. Tejido fibroso, no contráctil, en un área sometida a la lesión por isquemia-reperfusión. Tinción con tricrómico de Masson, a 40 aumentos. Obtenido de Perea, et al. (84)

1.1.3 Tratamiento del daño tisular por isquemia-reperfusión.

Los principios fundamentales por los que se rige el tratamiento de los eventos isquémicos son la restauración precoz de la vascularización y el tratamiento de soporte.

Los métodos principales de revascularización son los orientados a la disolución y prevención de coágulos (fibrinólisis, anticoagulación), la desobstrucción mecánica (percutánea o quirúrgica) o técnicas puente (cirugía tipo *bypass*). El tratamiento de soporte incluye fluidoterapia, fármacos vasoactivos, antibioterapia en casos de isquemia mesentérica aguda, y otras técnicas de soporte vital, adecuadas al órgano afectado.

En el caso de la isquemia miocárdica es necesario tener en cuenta que la cicatriz resultante de la lesión origina con frecuencia un defecto funcional que requiere su propio tratamiento para mejorar la sintomatología y la supervivencia. A ello se añaden las medidas destinadas a la prevención secundaria y de recurrencias.

Sin embargo, en la práctica clínica habitual no se aplican medidas que actúen específicamente sobre los mecanismos fisiopatológicos correspondientes al daño por isquemia-reperfusión tales como la respuesta inflamatoria o el estrés oxidativo. Con el objetivo de proponer nuevas estrategias terapéuticas dirigidas al control de estos mecanismos fisiopatológicos responsables del daño tisular, en los últimos años se han ensayado tratamientos tales como la suplementación con óxido nítrico, antioxidantes, glutamina, glicina y terapias anticomplemento y antileucocitarias. Es interesante destacar que, recientemente, se ha propuesto la medicina regenerativa que utiliza células madre de origen mesenquimal o sus derivados, como agentes con actividad antioxidante y antiinflamatoria.

1.2 APLICABILIDAD TERAPÉUTICA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AL DAÑO TISULAR POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Como se ha explicado previamente, los eventos clínicos de origen isquémico-reperfusivo suponen un problema de salud de primer orden. A pesar de los avances terapéuticos logrados hasta la fecha, la morbimortalidad sigue siendo elevada. Por

esta razón existe un amplio interés por desarrollar nuevas posibilidades terapéuticas, evidenciado por una intensa labor investigadora.

Una propuesta prometedora procede de la medicina regenerativa, una rama de la medicina que trata el proceso de reemplazar o regenerar células humanas, tejidos u órganos, para restaurar o restablecer su funcionamiento normal. En este ámbito tiene especial relevancia la terapia celular basada en la administración de células o de productos derivados de ellas como estrategia terapéutica. Las células madre (**Figura 3**) son un tipo de células presentes en los organismos pluricelulares, que se caracterizan por la capacidad de autorrenovación y división durante periodos muy prolongados, su carácter indiferenciado y la posibilidad de dar lugar a células diferenciadas. Las células madre de origen mesenquimal (MSCs) son capaces de diferenciarse en tipos celulares de origen mesodérmico (adipocitos, condrocitos, osteocitos, miocitos, células endoteliales), pero también lo hacen en células de estirpe endodérmica (hepatocitos) y ectodérmica (queratinocitos, neuronas). Su potencial terapéutico parece tener su origen tanto en su capacidad de diferenciación como en la actividad de secreción de factores tróficos, mediante la liberación de vesículas extracelulares.

Esta propuesta terapéutica tiene un doble sustrato: *i*) se ha observado que las células madre, por su actividad antioxidante y antiinflamatoria, podrían modular los mecanismos fisiopatológicos del daño tisular por isquemia-reperfusión, reduciendo



Figura 3. Células madre mesenquimales humanas (MSCs) procedentes de tejido adiposo. Imagen obtenida por el Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Biología Celular e Histología.

así su magnitud; y *ii*) se ha demostrado que la capacidad regenerativa inherente a las células madre mesenquimales hace de las mismas una potencial herramienta para recuperar la funcionalidad de los órganos que hayan quedado dañados como consecuencia de estos fenómenos isquémico-reperfusivos.

Las MSCs pueden ejercer su efecto de forma directa reemplazando la población de células dañadas, o a través de su actividad paracrina, mediante la secreción de vesículas extracelulares (inhiben la apoptosis, estimulan la angiogénesis y reducen la respuesta inflamatoria y la producción de ROS). (2,3,8)

Actualmente existen diversas aproximaciones terapéuticas, como son: *i*) la inyección de las propias células madre, que puede hacerse directamente o mediante esferoides (agregados multicelulares); *ii*) la utilización de vehículos celulares (andamios o *scaffolds* equivalentes a matrices extracelulares) de diversa índole que contribuyen a la adecuada administración y funcionalidad de las células (9) y *iii*) mediante la inyección de vesículas extracelulares y factores secretados por las MSCs (10).

2. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL: realizar una revisión y elaborar una síntesis del conocimiento actual sobre el empleo de células madre mesenquimales como estrategia terapéutica en la lesión tisular por isquemia-reperusión a nivel cardíaco.

OBJETIVOS CONCRETOS:

- Realizar una búsqueda bibliográfica de los estudios llevados a cabo en modelos *in vitro*, en modelos animales *in vivo*, así como en humanos sobre la utilización de las terapias con MSCs aplicadas al tratamiento del Síndrome de Isquemia -Reperusión.
- Evidenciar los mecanismos por los que las células madre mesenquimales pueden ejercer su efecto terapéutico e identificar las principales líneas de investigación actuales.
- Evaluar, en base a la información disponible, la eficacia del potencial terapéutico de las células madre mesenquimales en las lesiones por isquemia-reperusión miocárdica.

- Enumerar las conclusiones más relevantes.

3. MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos mencionados, se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica, realizada entre septiembre de 2021 y enero de 2022.

Inicialmente se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica con el objetivo de comprender la realidad clínica y la fisiopatología del daño por isquemia-reperfusión cardíaco. Para ello se analizó una serie de revisiones bibliográficas (tres revisiones) de los últimos 10 años obtenidas a través de PubMed utilizando los términos ‘*myocardial ischemia reperfusion*’ (1,5,7); así como la información disponible en el sitio web de la Sociedad Española de Cardiología (11), y otros 21 artículos relacionados con el fenómeno de isquemia-reperfusión, citados en los trabajos y fruto de búsquedas específicas.

Asimismo, se indagó en el marco teórico y conceptual correspondiente a la herramienta terapéutica a estudio, es decir, las células madre mesenquimales. Para ello se consultó una pequeña selección inicial de literatura que incluía un fragmento de una tesis doctoral al respecto (12), así como un conjunto de revisiones bibliográficas fruto de una búsqueda en PubMed (*‘tissue engineering’*, *‘regenerative medicine’*, *‘cell therapy’* y *‘gene therapy’* revisiones de los últimos 10 años ordenadas por importancia) (9,10,13,14,15,16,17); y la información disponible en los sitios web de las sociedades americana y británica de terapia celular y génica (18,19).

Una vez realizada esta primera aproximación al tema, se establecieron los objetivos del trabajo y se procedió a seleccionar los documentos más adecuados para llevar a cabo la presente revisión. Los motores de búsqueda y bases de datos utilizados fueron: PubMed, ClinicalKey, Cochrane, Ovid, TripDataBase, Web of Science y Epistemonikos.

El método se basó en una progresiva transición de búsquedas más amplias a más restringidas. Si el resultado de una búsqueda resultaba excesivamente amplio, se

continuaba con una búsqueda más concreta. Una vez obtenido un número de resultados susceptible de ser analizado individualmente, se procedía a la selección manual de los artículos que cumplieran los siguientes criterios:

- El uso de MSCs como herramienta terapéutica.
- La aplicación de MSCs en el tratamiento del daño tisular ocasionado en el síndrome de isquemia-reperfusión.
- Utilidad de dicho tratamiento en el caso concreto de isquemia miocárdica.

Las búsquedas incluyeron todo tipo de publicaciones, sin restricciones cronológicas ni de ningún otro tipo. A continuación, se detallan las búsquedas realizadas (**Figura 4**):

Se hizo una búsqueda en **PubMed** el día 3/10/2021 con los términos ‘*mesenchymal stem cells AND ischemia reperfusion injury*’, que proporcionó 674 resultados. Se llevó a cabo una búsqueda más avanzada posterior relativa al miocardio, para la que se utilizaron los términos en ((((((((*mesenchymal stem cells*) OR (*mesenchymal stromal cells*)) AND (((*myocardial*) OR (*heart*)) AND ((*ischemia-reperfusion*) OR (*ischemia-reperfusion injury*)))))) NOT (*liver*)) NOT (*lung*)) NOT (*kidney*)) NOT (*renal*)) NOT (*nervous*)) NOT (*brain*),,,"((((("mesenchymal stem cells"[MeSH Terms] OR ("mesenchymal"[All Fields] AND "stem"[All Fields] AND "cells"[All Fields]) OR "mesenchymal stem cells"[All Fields] OR ("mesenchymal stem cells"[MeSH Terms] OR ("mesenchymal"[All Fields] AND "stem"[All Fields] AND "cells"[All Fields]) OR "mesenchymal stem cells"[All Fields] OR ("mesenchymal"[All Fields] AND "stromal"[All Fields] AND "cells"[All Fields]) OR "mesenchymal stromal cells"[All Fields])) AND ((("myocardially"[All Fields] OR "myocardium"[MeSH Terms] OR "myocardium"[All Fields] OR "myocardial"[All Fields] OR ("heart"[MeSH Terms] OR "heart"[All Fields] OR "hearts"[All Fields] OR "heart s"[All Fields])) AND ("ischemia-reperfusion"[All Fields] OR ("ischaemia reperfusion injury"[All Fields] OR "reperfusion injury"[MeSH Terms] OR "reperfusion"[All Fields] AND "injury"[All Fields]) OR "reperfusion injury"[All Fields] OR ("ischemia"[All Fields] AND "reperfusion"[All Fields] AND "injury"[All Fields]) OR "ischemia reperfusion injury"[All Fields])))) NOT

(""liver""[MeSH Terms] OR ""liver""[All Fields] OR ""livers""[All Fields] OR ""liver s""[All Fields])) NOT (""lung""[MeSH Terms] OR ""lung""[All Fields])) NOT (""kidney""[MeSH Terms] OR ""kidney""[All Fields] OR ""kidneys""[All Fields] OR ""kidney s""[All Fields])) NOT (""renal""[All Fields] OR ""renals""[All Fields])) NOT (""anxiety""[MeSH Terms] OR ""anxiety""[All Fields] OR ""nervous""[All Fields])) NOT (""brain""[MeSH Terms] OR ""brain""[All Fields] OR ""brains""[All Fields] OR ""brain s""[All Fields])" arrojó 183 resultados, de los cuales 33 no estaban presentes en la anterior búsqueda.

De todos estos resultados, se seleccionaron aquellos relacionados con el objeto de la investigación y susceptibles de ser incluidos en la revisión: 109 artículos relacionados con el daño miocárdico.

En **Web of Science** se buscaron el día 3/10/2021 los términos *‘mesenchymal stem cells AND ischemia-reperfusion injury’*, obteniendo 202 resultados. De ellos, 37 relacionados con el daño miocárdico cumplieron los criterios establecidos para la revisión, sin estar incluidos en anteriores búsquedas.

En **ClinicalKey** se buscaron el día 3/10/2021 los términos *‘mesenchymal stem cells AND ischemia-reperfusion injury’*, obteniendo 1.364 resultados. Con el objetivo de acotar la búsqueda, en relación con el miocardio, se buscó *‘mesenchymal stem cells for myocardial ischemia-reperfusion injury’*, obteniendo 552 resultados, de los cuales 29 cumplieron los criterios establecidos para la revisión, sin estar incluidos en anteriores búsquedas.

La búsqueda de los términos *‘mesenchymal stem cells AND ischemia-reperfusion injury’* el día 3/10/2021 en **TripDataBase, Cochrane, Ovid y Epistemonikos** no proporcionó ningún resultado que cumpliera con los criterios de búsqueda y no estuviese incluido en anteriores búsquedas.

De este modo, tras estas búsquedas cumplieron los criterios de la revisión 175 artículos. Un nuevo análisis en busca de duplicidades puso de manifiesto 7 duplicidades. Es así que finalmente 168 artículos cumplieron los criterios de esta revisión. De los 168 artículos, se seleccionaron 50, siendo estos los artículos más citados publicados entre 2016 y 2021.

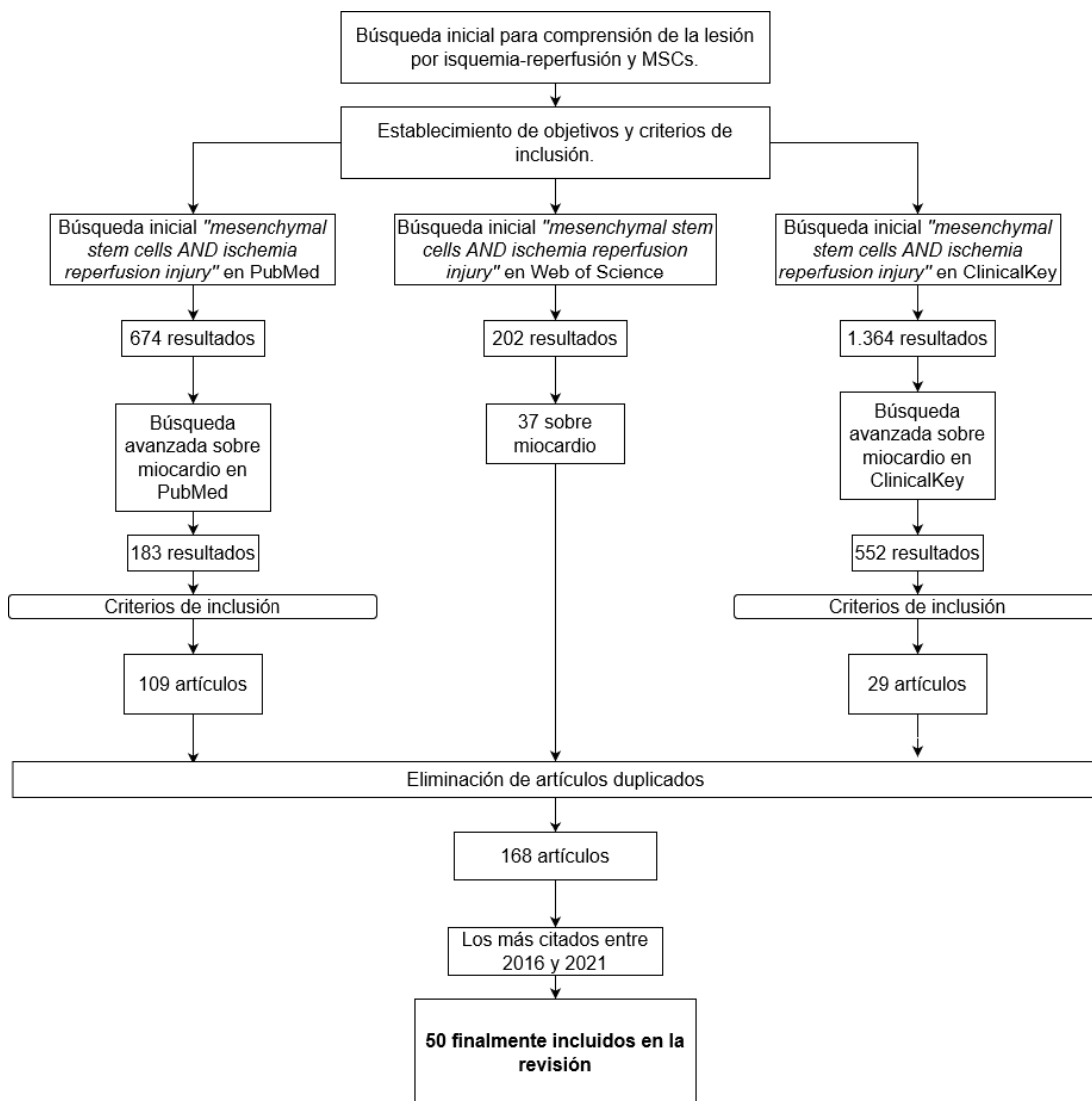


Figura 4. Proceso de selección bibliográfica. Se reflejan las búsquedas bibliográficas que arrojaron resultados, así como el proceso de selección de los mismos hasta la inclusión en la revisión.

4.RESULTADOS

4.1 ISQUEMIA-REPERFUSIÓN CARDÍACA

4.1.1 Evidencia disponible

Tras el proceso de búsqueda bibliográfica, se seleccionaron 50 artículos publicados entre 2016 y 2021.

La mayor parte de la evidencia disponible corresponde a estudios *in vivo*: 38 artículos consistieron en estudios llevados a cabo en modelos animales, de los cuales 31 incluían estudios en modelos *in vitro*. En cuanto a la evidencia clínica en seres humanos, se tomó como referencia una revisión bibliográfica (20), que recogía la información de los 15 artículos correspondientes a ensayos clínicos con MSCs para isquemia-reperfusión miocárdica en humanos, todos los cuales habían sido publicados con anterioridad a 2016, y por lo tanto no incluidos directamente en la presente revisión.

4.1.1.1 Estudios *in vivo*

En cuanto a los modelos animales, la evidencia se ha desarrollado en ocho modelos diferentes: las ratas Sprague-Dawley (727 ratas) (21), los ratones C57B16J (más de 233 ratones) (22), ratas Lewis (32 animales) (23), ratas Wistar (84 ratas) (24), ratas desnudas CBH-RNU (44 animales) (25), conejos de Nueva Zelanda (32 conejos) (26), cerdos experimentales chinos (22 cerdos) (27) y ratones atómicos desnudos (un estudio que no especifica el número de animales empleado) (28) (**Figura 5**).

La metodología para la inducción del daño tisular por isquemia-reperfusión fue similar en todos los estudios *in vivo*. Tras un periodo de aclimatación a su nuevo medio, los animales fueron sometidos a una cirugía con anestesia general. Mediante toracotomía media o lateral izquierda, se accedió a la arteria coronaria descendente anterior, la cual fue ocluida mediante clampaje atraumático o un nudo con hilo. Transcurrido el periodo de isquemia deseado, se soltaron los clampajes, dando comienzo al periodo de reperfusión. Finalizado este periodo, se procedía a la toma de muestras cardíacas y/o sistémicas de diversa índole, o a la realización de pruebas

funcionales, según el estudio. Cabe destacar las excepciones en las que la isquemia de la descendente anterior se indujo mediante cateterismo con balón (27), y en los que la isquemia-reperusión miocárdica ocurría en el contexto de un trasplante cardíaco (23,29).

El periodo de isquemia osciló entre los 25 y los 90 minutos; el periodo de reperusión se prolongó hasta la toma de muestras y pruebas funcionales (desde 15 minutos hasta los 30 días); en la mayoría de los casos, se tomaron muestras en varios momentos dentro de ese intervalo de tiempo.

Las células madre mesenquimales más utilizadas fueron las células madre mesenquimales de médula ósea (BMSCs) (21,30). Asimismo, se utilizaron células madre mesenquimales de tejido adiposo (ADMSCs) (31), de líquido amniótico (AFMSCs) (32), mesenquimales de cordón umbilical (UCMSCs) (33), MSCs cardíacas (CMSCs) (28) y MSCs de membrana amniótica (AMMSCs) (24). En un estudio se utilizaron células madre mesenquimales de pluripotencialidad inducida (iPSC-MSCs, Cymerus MSCs) (25). Algunos estudios *in vivo* no especifican el tipo de MSCs empleadas (34,26) (**Figura 6**).

La cantidad de células madre empleadas, independientemente de la vía de administración, osciló entre $2 \cdot 10^5$ y $2 \cdot 10^6$ en la mayoría de estudios, siendo de $3 \cdot 10^{10}$ en el estudio con conejos (25). En todos los casos, las MSCs pertenecían a la misma especie que los animales modelo (trasplantes heterólogos). En muchos

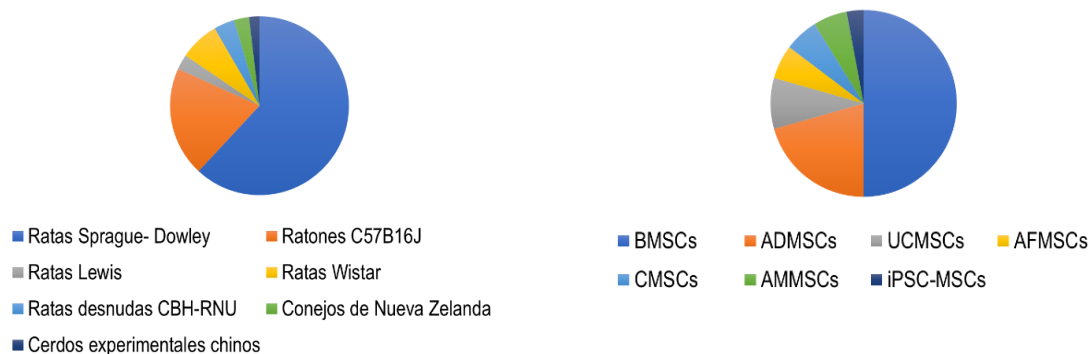


Figura 5. Modelos animales. Representación gráfica de la proporción de los principales modelos animales empleados.

Figura 6. Tipos de MSCs utilizados. Representación gráfica de la proporción de los principales tipos de MSCs utilizados.

estudios no se utilizaron las propias células madre, sino sus productos (vesículas extracelulares liberadas al medio por las MSCs) (24,28).

En cuanto a la vía de administración, se emplearon la inyección intramiocárdica (la más utilizada) (21), la infusión intravenosa (31), la inyección intracoronaria (35) y la administración a través de la perfusión (en los dos estudios efectuados en el contexto de un trasplante cardíaco) (23) (**Figura 7**).

El momento de la administración de las MSCs varió según el estudio. En diez de los estudios, la administración fue previa al fenómeno de isquemia-reperusión: durante el periodo de isquemia antes de restaurar el flujo coronario o incluso antes de la oclusión de la arteria (32). En nueve estudios, el tratamiento se aplicó inmediatamente después de la restauración del flujo coronario (36). En otros nueve, el margen para la reperusión previo a la administración de MSCs fue mayor, según el tiempo de reperusión deseado: entre 15 minutos y 30 días (37). Otros estudios no especifican el momento de aplicación.

Para determinar los resultados del daño tisular por isquemia-reperusión y su tratamiento con MSCs, se utilizaron diversas herramientas:

i) evaluación de la supervivencia de los animales, lo cual fue llevado a cabo únicamente en dos de los estudios. (21,27)

ii) análisis histológico de muestras cardíacas, llevado a cabo en todos los estudios *in vivo*. Además de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E), se han utilizado ampliamente tinciones para cuantificar la extensión del infarto y el grado de fibrosis

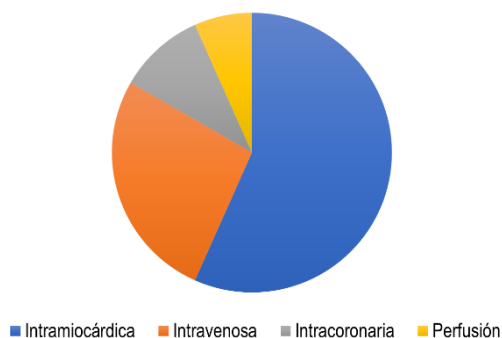


Figura 7. Vías de administración. Representación gráfica de las principales vías de administración de MSCs empleadas.

secundaria a la isquemia cardíaca (destacando el tricrómico de Masson, cloruro de trifenil tetrazoilo (TTC) o azul de Evans). Además del estudio por microscopía óptica, varios trabajos incluyeron la microscopía electrónica. (21,38)

iii) estudio bioquímico y molecular, tanto en muestras sistémicas como locales. Las principales técnicas fueron el Western Blot, ELISA, la PCR, la espectrofotometría y la inmunohistoquímica, en función del objetivo del análisis. En este sentido, se determinaron los niveles de diversos marcadores relacionados con los mecanismos fisiopatológicos del fenómeno en estudio (la lesión miocárdica por isquemia-reperusión). Así, se valoraron:

- **Daño tisular:** es relevante la medición local de proteínas relacionadas con la unión intercelular como la conexina 43, y los niveles de troponina T cardíaca (cTnT) mediante inmunohistoquímica. La CK-MB, mioglobina (Mb), troponinas cardíacas (cTn), adenosín trifosfato (ATP) y péptidos natriuréticos atrial y ventricular (ANP y BNP, marcadores de insuficiencia cardíaca) se han determinado también a nivel local. Para evaluar el daño mitocondrial se ha estudiado la expresión de genes relacionados con la función mitocondrial a nivel de ARNm, mediante PCR como *Cyts*, *Ndufa8*, *Cox7a1* y *TFAM*, así como el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), o la integridad de la membrana mitocondrial mediante ensayos de fluorescencia (32,31,39,40). El estrés sobre el retículo endoplásmico se ha analizado midiendo los niveles de proteína regulada por glucosa 78 (GRP78), proteína homóloga a C/EBP (CHOP), endorribonucleasa de quinasa transmembrana demandante de inositol 1 α (*inositol-requiring transmembrane kinase endorribonuclease-1 α* , IRE1 α) y el factor de transcripción activador 6 (*activating transcription factor 6*, ATF6). (41)

El grado de fibrosis ha sido evaluado mediante el estudio de la expresión de fibronectina, colágeno III y factor de transcripción ETS-1. Se han evaluado marcadores séricos de daño miocárdico mediante ELISA, como la troponina I cardíaca (cTnI), la creatina quinasa-banda miocárdica (CK-MB) y la lactato deshidrogenasa (LDH). (24,42)

- **Estrés oxidativo:** se han estudiado la expresión de la glutatión peroxidasa (GPx) por Western Blot y la actividad de superóxido dismutasa (SOD1 y 2) por espectrofotometría. El nivel de malondialdehído (MDA) es indicador de peroxidación lipídica; también se han medido la elevación de los niveles locales de mieloperoxidasa (MPO), H₂O₂ e ion superóxido, y la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo como Serpinib1b, Dnm2, Txnrd2, Epx, Gpx, Mpo, Dhcr24, Tpo, Nox4, Noxo1 y Aox1. (21,24,43)
- **Apoptosis:** se han medido marcadores a nivel local, como Bax, caspasa-3 escindida, c-jun, PDCD4, FasL, PTEN, Peli1, Birc5, Cd40lg, Fadd, Bcl2l11, Casp2, Bid, Caspo8 y Akt1; niveles de factores antiapoptóticos como proteína 2 de linfoma de células B (Bcl-2), ciclina-D1, modulador de apoptosis estimulado por p53 (*p53 upregulated modulator of apoptosis*, PUMA) o p-53, medidos por Western Blot. Es posible también determinar la cantidad de núcleos apoptóticos (prueba TUNEL). (29,44)
- **Viabilidad celular:** estimación de la viabilidad celular mediante el sistema *Cell Counting Kit-8* (CCK-8) o mediante tinción con azul tripán. (39)
- **Proliferación:** destaca la tinción inmunohistoquímica para Ki67 (presente en células en fase activa del ciclo). Asimismo, se ha empleado la determinación de pERK1/2 (ERK1/2 fosforilado, una proteína implicada en una vía de señalización estimulante de la proliferación), así como de MMP-9. También se ha empleado la prueba de MTT. (33,37)
- **Inflamación local y sistémica:** como biomarcadores inflamación, se han utilizado la cuantificación de células inflamatorias circulantes (polimorfonucleares, monocitos o linfocitos NK, medidas por citometría de flujo); estimación de los niveles de IL-1, TGF-β1, IL-6, TNF-α, NF-κB, MMP-9, MPO, PCR, CXCL1 e iNOS, mediante Western Blot; niveles locales de adenosina mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (a menor biodisponibilidad de adenosina, mayor inflamación). Para estudiar el perfil de los linfocitos, se ha empleado la citometría de flujo en busca de marcadores de linfocitos T reguladores (CD4, CD25 y FoxP3). Para la caracterización de macrófagos, se han estudiado marcadores de macrófagos

M1 (iNOS, IL-1 β , IL-6 y TNF α) Y M2 (Arg1, IL-10, CD206, TGF- β , CD-11b). (42,45,46)

- **Angiogénesis:** se ha analizado la angiogénesis mediante la determinación de factores proangiogénicos como el VEGF, marcadores endoteliales como KDR (receptor de VEGF2 o VEGFR2), CD31 o factor de von Willebrand (vWF) mediante PCR o inmunohistoquímica; y marcadores de músculo liso (SM22 α , α SMA o CNN1) mediante PCR. (27,47)
- **Migración de MSCs:** se ha estudiado localmente, mediante RT-PCR, la expresión de factores que regulan la migración de MSCs al lugar de la lesión, como SDF-1 y CXCR4, que interactúan entre sí. También se ha estudiado la presencia del gen SRY o cromosoma Y, en casos en los que estaba presente en las MSCs, pero no en las células del receptor. También se ha recurrido al marcaje con 5-Bromo-2-deoxyuridina (BrdU) de las MSCs. En los casos en los que se han empleado MSCs humanas, se ha estudiado su migración mediante una detección del antígeno nucleolar humano (HNA). (21,38)
- **Otros marcadores:** destacan la determinación de niveles locales de factores relacionados con vías de señalización, tales como el Akt, niveles de quinasa de proteínas activada por adenosín monofosfato (*AMP-activated protein kinase*, AMPK) y diana de rapamicina en células de mamífero (*mammalian target of rapamycin*, mTOR), mediante RT-qPCR. Asimismo, se ha estudiado la expresión de genes implicados en la vía de fosfatidilinositol 3 quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt) (Tcl1a, Akt1, Akt3, Mapk3, Pak1, Foxg1, Mtor, Adar), así como la vía del transductor de la quinasa-sígnal de Jano y activador de la transcripción (JAK/STAT), Wnt1, Wnt3a, glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK-3 β), β -catenina y β -actina. (26,31,39,48)

Asimismo, se han estudiado marcadores de autofagia mediante Western Blot, como la cadena ligera 3B de proteínas 1A/1B asociadas a microtúbulos (*microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*, LC3B), p62 (marcador de disminución de autofagia), beclina-1. También se ha analizado la autofagia a través del mRFP-GFP-LC3 *reporter plasmid*. (49,50)

iv) determinación de la función cardíaca: las herramientas más empleadas han sido la ecocardiografía transesofágica y el cateterismo para el cálculo de diversos índices (acortamiento fraccional del ventrículo izquierdo o AFVI, fracción de eyección del ventrículo izquierdo o FEVI, volumen telediastólico o VTD, volumen telesistólico o VTS, volumen de eyección). También se han empleado el mapa óptico dual para analizar el potencial de acción miocárdico, la dinámica intracelular del calcio y la resonancia magnética cardíaca (RMC) para evaluar el área infartada, la oclusión microvascular y la función cardíaca. (51)

4.1.1.2 Estudios *in vitro*

La evidencia *in vitro* es casi tan abundante como la descrita *in vivo* en la presente revisión. El modelo celular más empleado fueron las células H9c2, un modelo de cardiomiocito. También se han utilizado corazones de ratón C57BL/6J *ex vivo*, cardiomiocitos neonatales de ratón C57BL/6J, macrófagos y neutrófilos, además de las propias células madre mesenquimales de todos los tipos mencionados en el apartado 4.2.1.1, en análoga proporción, con predominio de las BMSC. Para establecer el modelo de la lesión por isquemia-reperfusión, se han utilizado dos métodos: la hipoxia-reoxigenación de los cultivos (el establecimiento transitorio de una deprivación de oxígeno y glucosa) y la aplicación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). (31,48)

Para evaluar los efectos del uso de MSCs, se utilizaron principalmente marcadores bioquímicos y moleculares, muchos de los cuales coinciden con los utilizados en los estudios *in vivo*. Para estudiar la migración *in vitro*, se utilizan métodos como el *Transwell migration assay*. Para estudiar el nivel de apoptosis se han empleado el test de Annexina V-PE/7-AAD, el estudio de marcadores mediante Western Blot como la proteína antiapoptótica Bcl-2 o proteínas apoptóticas como Bax. Para estudiar la viabilidad celular, se ha utilizado el ensayo de CCK-8. Para determinar el estrés oxidativo, se ha empleado el CM-H₂DCFDA (indicador de los niveles de ROS intracelulares). Se han estudiado marcadores de autofagia mediante Western Blot, como el LC3B, p62, beclina-1. También se ha analizado la autofagia a través del mRFP-GFP-LC3 *reporter plasmid*. Se han estudiado también las proteínas AMPK y

Akt, y m-TOR, tanto en su estado fosforilado como no fosforilado. El estudio de la angiogénesis se ha efectuado mediante la detección de factores proangiogénicos como el VEGF, el estudio de formación tubular por imagen y el cultivo con Isolectina B4 marcada con fluoresceína. (39,52,53)

4.1.1.3 Evidencia clínica

Dentro de la literatura analizada, la evidencia clínica tan solo se encuentra descrita en el contexto de una revisión bibliográfica de 2019 (20) que recoge 14 ensayos clínicos. Todos ellos son anteriores a 2016, y por ello no están incluidos individualmente en la presente revisión.

En ellos, se empleó la administración local de MSCs (intramiocárdica o intracoronaria), siendo las BMSCs las más utilizadas. En todos ellos se cumplieron los requisitos de seguridad, tanto con MSCs de origen autólogo como heterólogo. Sin embargo, el tratamiento a menudo no ha obtenido los objetivos terapéuticos primarios. Una revisión Cochrane de 2015 sobre el tratamiento de la lesión miocárdica por isquemia-reperfusión manifestó la ausencia beneficio a nivel de mortalidad, morbilidad, calidad de vida o FEVI (54). Este fracaso a nivel terapéutico se ha atribuido principalmente a las escasas supervivencia y *homing* de las MSCs. Por esa razón, la investigación se ha centrado de nuevo en estudios preclínicos a fin de mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento con MSCs (20).

4.1.2 Efectos del tratamiento con MSCs

4.1.2.1 Supervivencia

El único estudio que evaluó la supervivencia comparando la registrada en los grupos tratado y control fue un estudio llevado a cabo con 22 cerdos experimentales, en el que inmediatamente después de una isquemia de 90 minutos, se administraron 10^6 UCMSCs/kg al grupo experimental. Se observó que la supervivencia a los 8 días era del 80% en el grupo experimental, frente a un 50% en el grupo control. (27)

4.1.2.2 Daño histológico

En cuanto al daño histológico, todos los estudios mostraron una reducción del mismo con el tratamiento con MSCs, independientemente del modelo animal, el periodo de isquemia, la vía de administración, cantidad y tipo de MSCs utilizadas y el momento de obtención de las muestras.

Se ha demostrado una disminución del daño de la membrana cardiomiocítica, de la infiltración de células inflamatorias, de la mionecrosis, de la desorganización de la condensación cromatínica, de la tumefacción y disrupción de crestas a nivel mitocondrial y de la pérdida de vacuolas y miofibras a nivel citoplasmático (32). Se asocia también un menor edema intersticial y una reducción del espacio intercelular (24).

El estudio con TTC ha mostrado que el tratamiento con MSCs puede reducir el tamaño del infarto. Los exosomas derivados de MSCs humanas sometidas a condiciones de hipoxia obtuvieron una reducción del tamaño del infarto de un 16% (de un 24% a un 8%) (26), en concordancia con la reducción de un 20,7% (de un 27% a un 6,3%) con la administración de un medio condicionado por ADMSCs (55); un estudio con BMSCs en corazones *ex vivo* de ratones redujo el tamaño de infarto de un 56% a un 24% (56). Se ha observado también con el empleo de CMSCs humanas una disminución del grado de fibrosis y un aumento del tamaño de los miocitos presentes en el área lesionada, si bien en el estudio no se observó una disminución en la extensión del infarto (28). La reducción del área de infarto y de la cantidad de tejido fibrótico son hallazgos muy transversales que se han observado también con el empleo de UCMSCs (27) o con un medio condicionado por ADMSC, en el que la reducción en la fibrosis se constató también a través de una menor expresión de fibronectina, colágeno III y ETS-1 (55).

Los exosomas de CMSCs humanas han mostrado dar lugar, asimismo, a un mayor grosor en la cicatriz cardíaca resultante, con una mayor cantidad de cardiomiocitos vivos en la misma (22).

Este efecto terapéutico podría incrementarse mediante la sobreexpresión de miR-146 (31), miR-125b (57), miR-29c (49), miR-486-5p (58), N-Cadherina (47) y cisteína-arginina-ácido glutámico-lisina-alanina (CREKA) (59); así como con la

administración de etinostat (un inhibidor de HDAC1) (28) o sustancia P (reducción del tamaño de infarto del 73% al 31% y de la fibrosis del 15% al 2,7% en ratas) (42); también mediante la represión de miR-23 (60), mayor purificación de los exosomas derivados de MSCs (61), el sometimiento de las MSCs a hipoxia previa al tratamiento (29) o el tratamiento con TGF- β 1 (38).

4.1.2.3 Función cardíaca

Como se ha explicado previamente, la función cardíaca, medida a través de diversos métodos ecocardiográficos o cateterismo, es un factor relevante para evaluar la eficacia del tratamiento con MSCs en el daño por isquemia-reperfusión miocárdica.

El tratamiento con AFMSCs en conejos dio lugar a una mejora tanto de la FEVI (67,42% frente a 58,62%) como de la AFVI (33,65% frente a 29,18%) (32). Este dato coincide con el obtenido en otro estudio utilizando BMSC en ratas (FEVI del 68,2% con tratamiento frente al 57% sin tratamiento) (36). Asimismo, la utilización de exosomas procedentes de CMSCs humanas sobre ratones incrementó en un 10% el valor de la FEVI (35 a 45%) (22). Otros estudios *in vivo* han mostrado hallazgos similares, con mejoras de este parámetro de un 10-20%. (45,47)

Algunas medidas que han mostrado potenciar este efecto son la sobreexpresión de Akt (32), miR-146 (62), miR-181a (45), miR-125b (57), miR-150-5p (63), N-Cadherina (47) y CREKA (59), el postcondicionamiento y preconditionamiento isquémicos (21) (29); el pretratamiento de las MSCs con etinostat (28), resistina (37), lipopolisacárido (LPS) (35) o sustancia P (42); la administración terapéutica precoz de las MSCs (41) y el uso de iPSC-MSCs (25).

En el contexto de trasplante cardíaco, se ha observado que la perfusión del órgano con medio condicionado por BMSCs reduce el tiempo necesario para la recuperación de las contracciones cardíacas, además de mejorar la función sistólica y diastólica. (23)

4.1.2.4 Fisiopatología a nivel cardíaco

En relación con la fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperfusión, existen evidencias de que el tratamiento con MSCs reduce la inflamación local, el estrés oxidativo y la apoptosis, al mismo tiempo que estimula la proliferación celular y la perfusión del tejido lesionado, regulando los procesos de autofagia. Como las alteraciones histológicas, estos hallazgos son transversales, y son independientes del modelo animal, el periodo de isquemia, la vía de administración, cantidad y tipo de MSCs utilizadas y el momento de obtención de las muestras. Los mecanismos responsables se exponen con más detalle en el apartado 4.2.3.

4.1.2.5 Mejora de la eficacia del tratamiento

Tienen una presencia relevante en la literatura las acciones orientadas a mejorar la eficacia del tratamiento con MSCs. En este sentido, se han utilizado diversas estrategias, destacando:

i) la **inyección local** de las MSCs en lugar de la sistémica; *ii)* la **inducción de la sobreexpresión** de determinados factores en las MSCs o en sus productos (vesículas extracelulares o exosomas), como el **Akt**, una serina-treonina quinasa relacionada con la viabilidad y proliferación celulares, implicada en la regulación del ciclo celular de los cardiomiocitos durante la diferenciación y en la supervivencia y proliferación de células progenitoras. La sobreexpresión de Akt en AFMSCs ocasiona una reducción del daño histológico, de la apoptosis y de la inflamación, al mismo tiempo que mejora la función del ventrículo izquierdo (un mayor acortamiento fraccional y mejor FEVI) en experimentos *in vivo*. También se observó un aumento en la tasa de injerto, la angiogénesis (mayor expresión de VEGF y densidad de capilares), la expresión de marcadores específicos de cardiomiocitos (GATA-4, conexina 34 y cTNT) así como en la secreción de FGF-2, HGF, IGF-1 y timosina β -4. (32)

Asimismo, se ha demostrado que la sobreexpresión de **Wnt11** en BMSCs mejora la supervivencia de los cardiomiocitos, relacionada con una mayor integridad de la membrana mitocondrial y asociada a un incremento en los niveles de IGF-1 y VEGF. (40)

La sobreexpresión de **N-Cadherina** produjo un aumento de la expresión de β -catenina, incrementando las MMP-10/13 y el HGF. Este efecto mejoró la FEVI asociada a una reducción de la fibrosis y la apoptosis cardiomiocítica, y una mayor proliferación celular, densidad de capilares en la zona lesionada y un mejor injerto de las ADMSCs. (47)

El incremento de **SDF-1** en exosomas de UCMSCs humanas indujo un efecto terapéutico mejorando de la función cardíaca *in vivo*, asociada a un menor daño tisular miocárdico, una reducción en la respuesta inflamatoria, así como una mayor regeneración vascular endotelial. El mecanismo fisiopatológico subyacente es una disminución de la autofagia, así como una activación de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR. (44)

Otros factores de gran relevancia, cuya sobreexpresión o represión ha mostrado mejorar los resultados terapéuticos del tratamiento con MSCs, son los **microARNs**. Así, la sobreexpresión de determinados miRNAs como el miR-146, miR-181a, miR-29c, miR-150-5p, miR-145 o miR-486-5p ha mostrado un aumento de la angiogénesis y la proliferación de cardiomiocitos, así como una reducción del área de infarto, la inflamación, niveles de LDH y fibrosis, mejorando la función cardíaca y modulando la autofagia (45,49,58,62,63,64). Por otro lado, la inhibición de miR-23 en BMSCs induce una mayor diferenciación de las células *in vitro*, así como una reducción del daño miocárdico en ratas sometidas a una isquemia-reperfusión miocárdica (menor daño a nivel histológico y niveles superiores de marcadores cardíacos a nivel local como Mb, CK-MB y cTn) (60).

iii) tratamiento con otros agentes adicionales. En este sentido, el tratamiento de las BMSCs con **TGF- β 1** consiguió un incremento del injerto, con la consiguiente reducción significativa del área infartada (reducción del 36% en el TTC) (38). El **etinostat**, un inhibidor de histona deacetilasa, mejoró la función sistólica *in vivo*, asociada a un menor grado de fibrosis y un mayor tamaño de miocitos. Este mismo agente, utilizado *in vitro* indujo la diferenciación de las MSCs en cardiomiocitos (aumento de marcadores troncales como OCT4, NANOG, SOX2 y KLF4; aumento de marcadores cardiomiogénicos como GATA4, MEF2C, MYBPC3, NKX2.5 y TBX5). Sin embargo, el estudio *in vivo* mostró que los beneficios observados no estaban asociados a una mayor vasculogénesis ni cardiomiogénesis. (28)

El pretratamiento de ADMSCs con **resistina** (una adipocina) mejoró la función cardíaca a través de un mayor *homing*. También hubo una disminución de la apoptosis y la fibrosis y un aumento de la angiogénesis *in vivo*. En experimentos *in vitro*, se ha demostrado que la resistina favorece tanto la proliferación como la migración de las ADMSCs. (37)

Por otro lado, se ha visto que el pretratamiento de BMSCs con **lipopolisacárido** (LPS) obtiene una mejora de la función cardíaca. Este efecto parece mediado por una activación del receptor TLR4 de las MSCs por parte del LPS, dando lugar a una vía de señalización dependiente de MyD88 y stat3. (35)

La **sustancia P**, una molécula movilizadora de MSCs y antiinflamatoria, liberada espontáneamente en la lesión por isquemia-reperfusión, reduce la inflamación y el tamaño de infarto e incrementa la movilización de MSCs, potenciando la angiogénesis y mejorando la función miocárdica. (42)

Asimismo, se ha demostrado que las UCMSCs humanas responden a **estrógenos** a través de los receptores α y β de estas hormonas, induciendo la proliferación celular y regulando la expresión de diversos genes y proteínas implicadas en la remodelación tisular, la migración y la angiogénesis. (33)

iv) condicionamiento isquémico: consiste en la inducción de una isquemia controlada, breve y transitoria, que puede efectuarse tanto a nivel local como a distancia. Un estudio donde se aplicaron BMSCs vía intramiocárdica a ratas mostró que el poscondicionamiento isquémico reducía el estrés oxidativo (menores niveles de MDA y aumento de SOD), el daño mitocondrial (mayor contenido miocárdico de ATP y aumento de expresión de *Cyts*, *Ndufa8*, *Cox7a1* y *TFAM*), la fibrosis y la inflamación; todo ello asociado a un mayor injerto y mejor función cardíaca (incremento de FEVI y AFVI). (21)

En el contexto del trasplante cardíaco en modelos animales, se han observado mejores resultados con la perfusión de un medio condicionado por BMSCs cultivadas en condiciones de hipoxia. Si bien ambas fueron eficaces, las BMSCs hipóxicas requirieron menos tiempo para recuperar la contractilidad, con una FEVI superior, y tuvieron menor daño histopatológico, actividad inflamatoria y apoptosis. Estos efectos parecen estar mediados por una activación de la vía de PI3K/Akt. (29)

v) momento de administración del tratamiento: la administración de ADMSCs en el momento de iniciar la reperfusión, reduce la respuesta inflamatoria, mejora la función cardíaca y reduce el área de infarto, si se compara con la administración diferida del tratamiento. (41)

vi) mayor purificación de los exosomas derivados de AFMSCs: consigue una reducción del tamaño del infarto de un 38% (61).

vii) utilización de MSCs de pluripotencialidad inducida (iPSC-MSCs): en ratas atímicas congénitas sometidas a una isquemia de 60 minutos, las iPSCs lograron una mejoría superior en la función miocárdica, así como una mayor capacidad angiogénica que utilizando BMSCs (25).

4.1.3 Mecanismos implicados

4.1.3.1 Regulación de la inflamación

Como se ha comentado previamente, uno de los principales efectos del tratamiento con MSCs en el tratamiento del daño tisular por isquemia-reperfusión a nivel miocárdico es una disminución de la inflamación. En este sentido, se ha demostrado una disminución de las señales proinflamatorias y un aumento de las vías antiinflamatorias.

El tratamiento con exosomas de BMSCs ha mostrado, a través del miR-181a, lograr una disminución de la respuesta inflamatoria (menores niveles de TNF- α e IL-6; aumento de IL-10), como consecuencia de un aumento de los linfocitos T reguladores (CD4+ y Foxp3+) condicionado por la represión del factor c-Fos (45). El miR-21a-5p, presente en estos exosomas, participaría favoreciendo la polarización de macrófagos de fenotipo M1 (proinflamatorios) a M2 (antiinflamatorios, CD206+ y CD11b+) (46). El tratamiento con UCMSCs ha mostrado este efecto antiinflamatorio también a través de unos menores niveles séricos de PCR, y un menor número de linfocitos NK tanto en suero como en el tejido lesionado, contribuyendo a la disminución de la oclusión microvascular observada (27). El efecto antiinflamatorio se ha constatado también mediante una reducción de CXCR1, IL-1 (56) e IL-8 (44), y de la expresión de genes relacionados con citocinas (Tnf y Ccl11) e interleucinas (IL9, Cd40lg) proinflamatorias (23).

Las BMSCs han mostrado también aumentar la biodisponibilidad local de adenosina, reduciendo la infiltración de neutrófilos y macrófagos a nivel histológico, que se revirtió al inhibir la síntesis de adenosina. Así, parece que las BMSCs transforman el adenosín monofosfato (AMP, una molécula proinflamatoria presente en la lesión por isquemia-reperfusión) en adenosina (una molécula con actividad antiinflamatoria), mediante el CD73 (una importante ecto-5'-nucleotidasa). (36)

El efecto antiinflamatorio de las MSCs, transversal en la literatura analizada, se ha logrado potenciar gracias a diversas estrategias, como la adición de sustancia P (reducción de TNF- α y aumento de IL-10 y proporción de monocitos M2 y linfocitos T reguladores) (42,41), la sobreexpresión de CREKA (mejor *homing*) (59), la sobreexpresión de miR-125b (57), el preconditionamiento isquémico de MSCs (29) y la sobreexpresión de SDF-1 (44).

4.1.3.2 Reducción del estrés oxidativo

El tratamiento con MSCs ha demostrado reducir el estrés oxidativo, tanto a través de una disminución en los niveles de agentes oxidantes como mediante un aumento de agentes antioxidantes. Se trata de un punto común a distintos métodos terapéuticos con MSCs y diferentes modelos animales.

Se ha constatado una disminución en los niveles locales de MDA, H₂O₂ e ion superóxido, junto con un aumento en los niveles de SOD. Este efecto parece ser superior cuando se aplica un poscondicionamiento isquémico (21,36).

Asimismo, el medio condicionado por BMSCs es capaz de reprimir genes relacionados con el estrés oxidativo como *Serp1b1*, *Dnm2*, *Txnrd2*, *Epx*, *Gpx*, *Mpo*, *Dhcr24*, *Tpo*, *Nox4*, *Nox1* y *Aox1* (23). Los resultados son similares utilizando otros tipos de células madre: el medio condicionado por AMMSC humanas ha mostrado aumentar *in vivo* los niveles de SOD y GPx, junto a una reducción de MDA. La reducción del estrés oxidativo aparece asociada a un menor daño tisular a nivel histológico y se ve reflejado en una reducción de niveles séricos de marcadores como el cTnI. (24)

4.1.3.3 Disminución de la apoptosis

Se ha atribuido, al menos parcialmente, el potencial terapéutico de las MSCs a una inhibición de las vías de señalización proapoptóticas.

Hay amplio consenso, tanto a nivel *in vivo* como *in vitro*, de que las MSCs y sus productos, independientemente del tipo u origen de las mismas, consiguen una reducción en el grado de apoptosis de los cardiomiocitos del área lesionada: un menor número de células apoptóticas, junto con una mayor expresión de Bcl-2 y ciclina-D1, y represión de caspasa-3 y Bax. En el caso de los exosomas de las ADMSCs, estos efectos parecen asociados a una estimulación de la vía Wnt/ β -catenina (31). Asimismo, el medio condicionado por MSCs ha mostrado ocasionar una represión de genes proapoptóticos como Birc5, Cd40lg, Fadd, Bcl2l11, Casp2, Faslg, Bid, Caspo8 y Akt1 (23) y regular los niveles de p53 fosforilado y PUMA (55).

Los mecanismos que han logrado potenciar este efecto antiapoptótico incluyen el pretratamiento de ADMSCs con resistina (37), el uso de sustancia P (42), la sobreexpresión de miR-125b (57), N-Cadherina (47), miR-150-5p (63), SDF-1 (44) y Wnt (reducción del porcentaje de células apoptóticas de un 37% a un 14,6% *in vitro*) (40) y el preconditionamiento isquémico de las MSCs (29).

4.1.3.4 Aumento de la proliferación celular y factores de crecimiento

Un efecto de la terapia con MSCs parece ser un aumento en la proliferación celular del tejido dañado. Así, se ha visto un incremento en el número de células positivas para Ki67 tras el empleo de exosomas procedentes de estas células. Estos exosomas han mostrado también promover la proliferación cardiomiocítica mediante la represión de la H3K27 demetilasa UTX (22). Asimismo, las MSCs secretan factores tróficos como IGF-1, VEGF, HGF, timosina B4 (52), FGF7 o NFKBIZ (35). Asimismo, se ha observado que la sobreexpresión de Wnt en BMSCs es capaz de potenciar el aumento de IGF-1 y VEGF, en asociación con una mayor supervivencia de los cardiomiocitos (40). Lo mismo ocurre con la sobreexpresión de SDF-1 en exosomas procedentes de UCMSCs (44).

4.1.3.5 Mejora del aporte vascular

El tratamiento con MSCs induce una mejora del aporte vascular después del periodo de isquemia, a través de la secreción de factores proangiogénicos. Los estudios de formación de tubos vasculares *in vitro* han confirmado un aumento de la angiogénesis tras el tratamiento con exosomas de CMSCs humanas, acompañado también de una mayor densidad de vasos capilares en el área afectada por la isquemia en estudios realizados *in vivo* (22). Asimismo, se ha demostrado un aumento en los niveles de CCL2 (también llamado LCP3) (35), bFGF y VEGF y en la densidad histológica de capilares al utilizar AFMSCs (32).

El efecto proangiogénico se ha visto potenciado por la sobreexpresión de miR-146 (mayor número de ramas y puntos de ramificación en el estudio de formación tubular *in vitro*, a través de un aumento en los niveles de VEGF y HIF-1 y reprimiendo el inhibidor de HIF-1 HIF1AN) (62), el pretratamiento de las ADMSCs con resistina (a través de la vía ERK1/2-MMP-9) (37), la administración de sustancia P (42), la sobreexpresión de CREKA (al mejorar el *engraftment*) (59), la sobreexpresión de N-Cadherina (mediante la activación de la β -catenina, mejora el *engraftment* e incrementa la angiogénesis a través de MMP-10, MMP-13 y HGF) (47), la sobreexpresión de SDF-1 (mayor expresión de VEGF, MMP-9, MMP-2) (44), y la exposición de UCMSCs a estrógenos (mayor secreción de MMP-9, ANG y VEGF) (33). Se ha señalado que las iPSC-MSCs podrían tener una capacidad angiogénica superior a la de las BMSCs, como consecuencia de una expresión superior de factores proangiogénicos como VEGF, GRO, IL-8, leptina, b-FGF o trombopoyetina, entre otros, así como por una menor expresión de factores antiangiogénicos (TIMP-1 y TIMP-2) (25).

La angiogénesis no es el único mecanismo por el que las MSCs mejoran el aporte vascular en el tejido cardíaco sometido a isquemia-reperusión. Un componente relevante de esta lesión es la obstrucción microvascular (un factor independiente de mal pronóstico en el infarto agudo de miocardio), debida en parte a una embolización distal, agregación plaquetaria y, especialmente, a la reacción inflamatoria. Un estudio en cerdos experimentales tratados con UCMSCs mostró una disminución de esta oclusión microvascular, asociada a una disminución de la respuesta inflamatoria, que

dio lugar a un menor tamaño del infarto y a una mejor FEVI, llegando incluso a mejorar la supervivencia de los animales tratados. (27)

4.1.3.6 Vesículas extracelulares, exosomas y miRNA

La evidencia pone de manifiesto que las MSCs ejercen su acción, al menos parcialmente, a través de vesículas extracelulares. Se trata de vesículas de cubierta lipídica secretadas por las MSCs, que contienen proteínas y ácidos nucleicos, elementos relevantes de la comunicación intercelular. Las vesículas extracelulares de menor tamaño (30-150 nm de diámetro) se denominan exosomas (**Figura 8**).

Al poseer una parte importante de las propiedades terapéuticas de las MSCs y carecer de algunos de sus inconvenientes, los exosomas son una importante alternativa terapéutica. Se ha observado que estos exosomas son captados preferentemente por las células lesionadas distribuyéndose su contenido en la región perinuclear del citoplasma de la célula receptora (52), modulando así sus funciones fisiológicas y fisiopatológicas (65).

Un metaanálisis de estudios *in vivo* mostró que el tratamiento con exosomas derivados de MSCs lograba una moderada reducción del área infartada del ventrículo izquierdo, incrementando el grosor de la cicatriz miocárdica, junto a una discreta mejoría de la FEVI y de otros parámetros de función miocárdica (22,51), además de reducir los niveles séricos de CK-MB, LDH y cTnI (31,66).

Estos efectos mejoran la viabilidad celular (39) y disminuyen la apoptosis (aumento

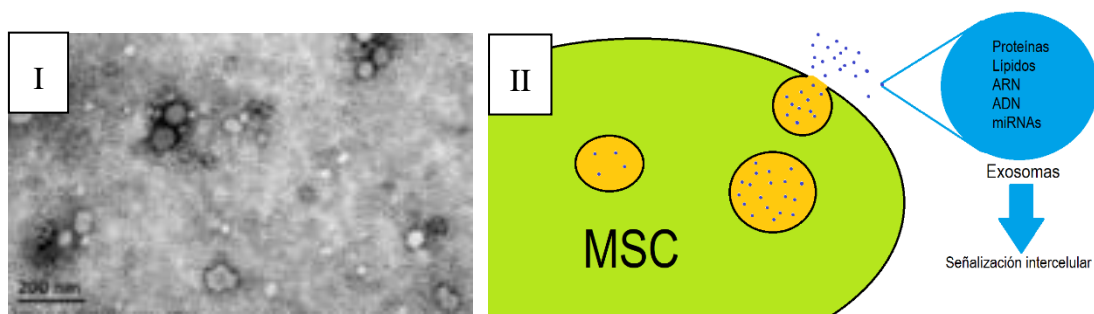


Figura 8. Exosomas de MSC. En la imagen I, exosomas de BMSC a través de microscopía electrónica de transmisión a 100.000 aumentos. Obtenida de Lu, et al. (85). En la imagen II, un diagrama acerca de los exosomas.

de Bcl-2 y disminución de Bax y caspasa 3), reducen el estrés oxidativo y la señalización proinflamatoria (66), tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (donde se ha observado una disminución del efecto proapoptótico del estrés oxidativo) (53,67), asociados a una estimulación de la vía de Wnt/ β -catenina y GSK-3 β (los exosomas de ADMSCs aumentaron su expresión, y los efectos beneficiosos desaparecían al inhibir esta vía) (31). El tratamiento con exosomas de CMSCs ha logrado una mejor función cardíaca tras un periodo de isquemia miocárdica en ratones incrementando la densidad de vascularización capilar (mayor expresión de CD31) y el grosor de la cicatriz, asociada a un incremento en la proliferación de cardiomiocitos (mayor porcentaje de células Ki67 positivas) además de una mayor angiogénesis *in vitro* (22).

Es relevante la presencia de Hsp70 (proteína de shock térmico de 70 kD), ya que a través del TLR4 puede activar la Hsp27, una proteína cardioprotectora gracias a su función como preservadora de la integridad de los microtúbulos y del citoesqueleto de actina, además de su rol como chaperona (53). Se ha observado, además, que los exosomas contienen en su membrana esfingolisina-1-fosfato (SIP, un inhibidor de apoptosis y estimulante de angiogénesis) que puede incrementar los niveles de ATP y NADH, disminuyendo el estrés oxidativo, además de regular la vía de PI3K/Akt (51). Un estudio *in vitro* con vesículas extracelulares de UCMSCs mostró que estas, a través de una estimulación de la vía PI3K/Akt, ocasionaban un descenso en el estrés del retículo endoplásmico (menores niveles de GRP78, CHOP, IRE1 α y ATF6). Este efecto incrementó la supervivencia y viabilidad celulares, inhibiendo la apoptosis y reduciendo la liberación de LDH (68).

Entre los componentes de los exosomas destacan los miRNAs. Como se ha referido previamente, se trata pequeños fragmentos de 20-25 nucleótidos de ARN que se unen a la región 3' UTR de ARN mensajeros (ARNm) inhibiendo su traducción y reprimiendo así la expresión de diversos genes. Los principales miRNAs con un papel relevante en la acción de las MSCs y sus exosomas se reseñan a continuación.

Tras la secuenciación de los miRNA presentes en los exosomas de BMSCs, se demostró que el miRNA cardioprotector más abundante era el **miR-21a-5p**. Este produjo una disminución de la apoptosis de cardiomiocitos H9c2 *in vitro* a través de

la represión de los factores proapoptóticos PDCD4, FasL, PTEN y Peli1. Asimismo, la supresión del miR-21a-5p redujo el efecto protector de los exosomas sobre las células. La reducción porcentual de la muerte celular fue de un 15% en ausencia de este miR, mientras que con su presencia fue de un 23% (52). El miR-21a-5p presente en exosomas de MSCs contribuye *in vitro* a la mejora de la función cardíaca y a la disminución del tamaño del infarto, favoreciendo una reducción de la inflamación (menores niveles de IL-6 y mayores de IL-10) a través de la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2, en detrimento del M1. Estos efectos fueron parcialmente revertidos al inhibirse el miR-21a-5p, cuya diana es el TLR4, regulando así la señalización PI3K/Akt (46).

La sobreexpresión de **miR-146** induce una mayor expresión de VEGF, promoviendo la angiogénesis (mayor número de ramas y puntos de ramificación en pruebas de formación tubular *in vitro*), reduciendo tanto la fibrosis cardíaca como el área de infarto (14% frente a 25%), y mejorando la función cardíaca. Estos efectos son consecuencia de la represión de NF2 y de la activación de Akt, PAK1 y Rac. (62)

Asimismo, se ha demostrado en un estudio *in vivo* que el **miR-26a** presente en exosomas derivados de MSCs humanas con preconditionamiento isquémico mejoró la conducción eléctrica y redujo la aparición de arritmias y el tamaño del infarto (de un 24% a un 8%). Además, mejoró la dinámica intracelular del calcio, disminuyendo su sobrecarga, mediante una supresión de GSK-3 β y un aumento de Wnt1, β -catenina y Cx43. (26)

Otro miRNA relevante es el **miR-181a**, cuyas dianas son los receptores de células T y del TGF- β . Este protooncogén podría atenuar la activación de células dendríticas y disminuir la inflamación a través del c-Fos. Así, la disminución de c-Fos ocasiona un aumento de linfocitos T reguladores que reducen la inflamación y el área de infarto, mejorando la función miocárdica. (45)

El **miR-125b** ha mostrado también efectos cardioprotectores ante la isquemia-reperfusión miocárdica en ratas, al mejorar la función cardíaca y disminuir el área de infarto, en asociación con una mayor viabilidad cardiomiocítica y una menor inflamación y apoptosis. Esto parece ocurrir como consecuencia de la represión del

SIRT7 (una proteína implicada en la proliferación celular, procesos oncogénicos y la regulación de la respuesta al estrés y la muerte celular) por parte del miR-125b. (57)

El **miR-320b**, presente en exosomas derivados de MSCs humanas, es responsable de la disminución de la piroptosis, un proceso de muerte celular programada asociada a la respuesta inflamatoria, activada por la vía del NLRP3, que transforma la procaspasa 1 en caspasa 1 activa, que a su vez amplifica la reacción inflamatoria y la muerte celular a través de las IL-1 e IL-18. (34)

El **miR-29c**, presente en exosomas de BMSCs contribuye a reducir el tamaño de infarto, la muerte celular y los niveles séricos de LDH, a través de una inhibición de PTEN y una consecuente disminución de la autofagia. (49)

Asimismo, la sobreexpresión de **miR-150-5p**, presente en exosomas de BMSCs, es capaz de reducir el tamaño de infarto, así como la extensión de la fibrosis y la apoptosis. El TXNIP, reprimido por el miR-150-5p, es un inhibidor de Trx1, de modo que su sobreexpresión en la lesión por isquemia-reperfusión causa una hipersensibilidad al estrés oxidativo. (63)

Un estudio *in vitro* sobre cardiomiocitos H9c2 mostró que los exosomas de BMSCs contienen **miR-149-5p** y Let-7c-5p. Estas moléculas, a través de una represión de Faslg, dan lugar a un aumento de β -catenina que, como se ha explicado en el punto 4.2.2.5, es responsable de una disminución del daño tisular asociado a la lesión por isquemia-reperfusión miocárdica. (43)

El preconditionamiento isquémico de las ADMSCs, previo al aislamiento de sus exosomas, redujo el tamaño de infarto y la apoptosis *in vivo*. El estudio *in vitro* demostró que este efecto podía ser debido a un aumento en la cantidad de algunos miRNA, destacando el **miR-224-5p**, que podría reprimir el TXNIP, reduciendo así la degradación de GATA4 mediada por caspasa-1. Esta situación mantendría elevada la expresión de Bcl-2, con efecto cardioprotector. (67)

En otro estudio *in vivo* se obtuvo una mejor función cardíaca y una reducción en el área de infarto, la inflamación, el estrés oxidativo y el daño tisular (menor liberación de LDH) tras la administración del medio condicionado por ADMSC. En este medio se detectó la presencia de **miR-221** y **miR-222**, que reprimen MAPK y NF- κ B, de modo que se inhibió la vía del ETS-1 (responsable de la reacción fibrótica asociada a

la expresión de fibronectina y colágeno III) y del PUMA (logrando así un efecto antiapoptótico). (55)

Por otro lado, la sobreexpresión de **miR-486-5p** induce una reducción en el área del infarto y en la frecuencia de apoptosis, así como un incremento en la proliferación de cardiomiocitos. (58)

El **miR-23**, expresado por las BMSCs, es un miRNA que causa una represión de Has2. Su inhibición eleva los niveles de Has2, lo cual, asociado a una activación de la vía de Wnt1/TCF4/ β -catenina, condujo en un estudio a una reducción en el daño miocárdico a nivel histológico. (60)

No obstante, no todos los miRNA secretados por las MSCs tienen un efecto terapéutico beneficioso. Se ha observado que el **miR-29a** secretado por BMSCs da lugar a una represión de la folistatina 1, una molécula antiapoptótica, ocasionando un aumento de la apoptosis de los cardiomiocitos a través de una inhibición de la vía JAK2/STAT3. (64)

Se ha señalado que los exosomas derivados de las MSCs contienen habitualmente una cantidad elevada de impurezas, debido a los métodos de aislamiento comúnmente utilizados (fundamentalmente la centrifugación), que pueden ocasionar la ruptura o deterioro de los exosomas. En este sentido, un estudio demostró que una mayor purificación de exosomas de AFMSCs lograba *in vivo* una reducción del tamaño de infarto de un 38%. Cabe señalar que esto no se correspondió con un efecto protector sobre los cardiomiocitos a nivel *in vitro*, por lo que se atribuyó a algún efecto indirecto *in vivo*, posiblemente mediado por el endotelio, dado que *in vivo* se mostró un aumento en la migración celular endotelial mediada por PI3K. (61)

4.1.3.7 Autofagia

La autofagia es el proceso de degradación de estructuras intracelulares de desecho, a través de autofagosomas y autolisosomas. En general, se considera deletérea una activación temprana desajustada de la autofagia, mientras que una activación moderada algo más tardía parece ser beneficiosa (48). Se ha observado una excesiva activación autofágica en cardiomiocitos sometidos a daño por isquemia-reperfusión

(aumento de marcadores de autofagia como LC3B y Beclina-1; disminución de marcadores de descenso de autofagia como el p62), asociada a una disminución de señales proapoptóticas (aumento de la relación Bcl-2/Bax).

Un estudio con exosomas de MSCs mostró un menor daño miocárdico (menores niveles séricos de LDH y menor tamaño de infarto) como consecuencia de una disminución de la excesiva autofagia. Esto ocurrió debido a una represión de PTEN por el miR-29c y consecuente activación de la vía Akt/mTOR (estimulante de mTOR) (49). Con la misma tendencia, la sobreexpresión de SDF-1 en exosomas de UCMSCs humanas ha mostrado una mejora en los resultados terapéuticos (función cardíaca, daño tisular, inflamación y angiogénesis). Este efecto está asociado a una disminución de la autofagia junto a una activación de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR, que parecen revertirse al inhibirse la acción de SDF-1 (44). Otro estudio mostró que un medio condicionado por AMMSCs administrado a ratas logró una mejora de la función cardíaca y una disminución de la fibrosis y los niveles de CK-MB, mediados por una reducción de la autofagia a través de la activación de la vía mTOR/ULK1 (50).

Sin embargo, se ha visto que un aumento de la autofagia causado por los exosomas derivados de BMSCs produce, tanto *in vitro* sobre células H9c2 como *in vivo* en ratas, un descenso del nivel de ROS y de la apoptosis y un aumento de la viabilidad celular, además de una reducción en el tamaño del infarto y una mejor función cardíaca (mejores FEVI y AFVI). Todo ello parece estar regulado, al menos en parte, por la estimulación de la vía de AMPK/mTOR (inhibidora de mTOR) y la reducción de Akt/p-mTOR (estimulante de mTOR) (48). De hecho, el medio condicionado por BMSCs es capaz de reprimir la expresión de genes implicados en la vía PI3K/Akt (Tcl1a, Akt1, Akt3, Mapk3, Pak1, Foxg1, Mtor, Adar) (23). *In vitro*, el aumento de la autofagia por el medio condicionado por BMSCs redujo la liberación de LDH y el descenso en el $\Delta\Psi_m$, gracias a una inhibición de Notch2, su diana Hes-1 y mTOR, elevados en la lesión por isquemia-reperfusión, perdiéndose los beneficios al revertir esta inhibición. (39)

4.1.3.8 *Homing* de las MSC

Una cuestión recurrente son la capacidad de las células para llegar a la zona lesionada (*homing*) y la tasa de injerto (*engraftment*) de las MSCs administradas sistémicamente, en definitiva, la cantidad de células que se asientan en el tejido/órgano diana. Este proceso parece estar afectado tanto por un componente físico (atrapamiento de las células en la microcirculación de los tejidos) como bioquímico (interacción entre moléculas como SDF-1 y CXCR4, factores de crecimiento, etc.).

La tasa de *homing* de las MSCs a nivel miocárdico es muy baja (1-3%) (33). La mayoría de las células administradas quedan atrapadas en el lecho vascular de otros órganos, como los pulmones, el páncreas o el bazo (35). Si bien cada vez más datos sugieren que quizá no sea necesario el *homing* para obtener un efecto terapéutico por parte de las MSCs, pudiendo actuar a distancia a través de la liberación de diversos factores y exosomas, existe evidencia que sugiere que la eficacia de la terapia con MSCs podría ser, al menos parcialmente, dependiente del grado de *homing* de las células. De hecho, la escasa supervivencia de las células (el 90% de las MSCs mueren en la primera semana (35)) y *homing* de las MSCs han sido el principal factor al que se ha atribuido la escasez de éxito terapéutico que se ha observado, particularmente a nivel clínico (20).

Por todo ello, una parte de las estrategias orientadas a mejorar el efecto de las MSCs que se han mencionado previamente están dirigidas a mejorar el *homing*. Existen diversas opciones: *i) la administración local* (la mayoría de los estudios utilizan una vía de administración intramiocárdica o intracoronaria) (21,32,62) (**Figura 7**).

ii) la sobreexpresión de ciertos factores como el Akt en AFMSC, mejorando su *engraftment* a nivel miocárdico (de 9,3 células marcadas con BrdU por campo frente a 14,8) (32); la sobreexpresión de CREKA, una molécula que permite a las MSCs la adhesión a la fibrina, (una capacidad migratoria 2,5-6,5 veces superior), (59); la sobreexpresión de N-Cadherina ha mostrado también mejorar el *homing* de ADMSCs en ratones (47). Asimismo, una sobreexpresión de CCL7, que puede inducirse mediante LPS, puede mejorar el *homing* de las MSCs (35).

iii) el poscondicionamiento isquémico también aumenta el grado de *engraftment* de BMSCs en el miocardio de ratas Sprague-Dawley tras un periodo de isquemia-

reperfusión, efecto asociado a la vía de SDF-1 α /CXCR-4 (21). La interacción de SDF-1 con CXCR-4 participa en la migración y *homing* de las MSCs. En este sentido, una posibilidad es el tratamiento con TGF- β 1, ya que promueve la sobreexpresión de CXCR-4, logrando así un aumento en la tasa de migración celular *in vitro* (de un 30% a un 53%) y el *engraftment in vivo*, tal y como se ha observado en el tratamiento con BMSCs a ratas. (38)

iv) la encapsulación celular, como la realizada en BMSCs con gel de polietilenglicol y alginato. (36)

v) el pretratamiento de ADMSCs con resistina antes de su administración intravenosa mejora el *engraftment* de estas células a través de la vía ERK1/2-MMP-9, obteniendo así una mejora de la función ventricular. (37)

vi) la exposición de UCMSCs a estrógenos también ha mostrado mejorar significativamente el *engraftment* en tejido miocárdico. Este efecto se ha asociado a un aumento de EMMPRIN y MMP-9, implicadas en la remodelación tisular y la migración celular. (33)

La relación entre los principales mecanismos de acción de las MSCs mencionados se refleja en la **Figura 9**.

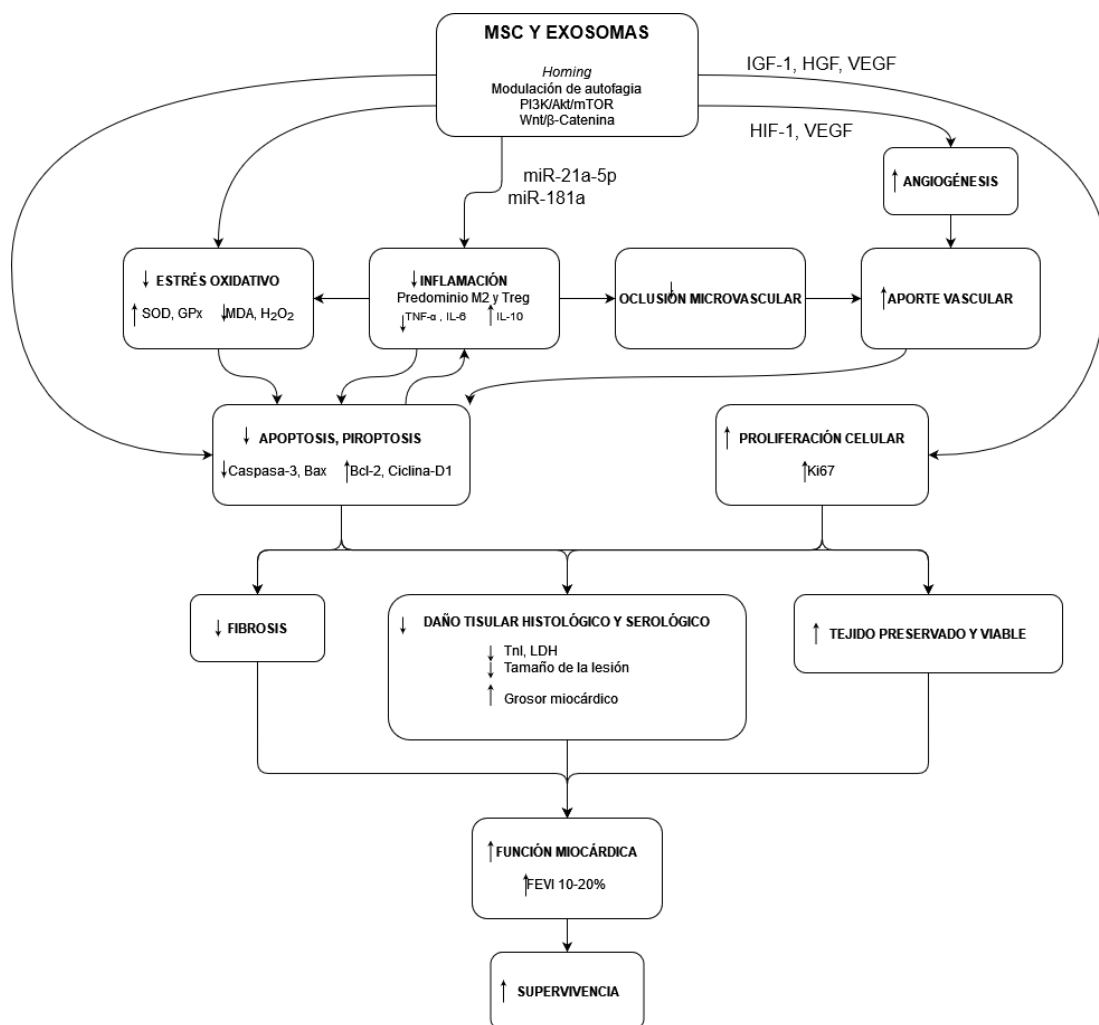


Figura 9. Mecanismos de acción de las MSCs. Resumen gráfico de una propuesta de relación conceptual entre los principales mecanismos de acción de la terapia con MSCs para la lesión miocárdica por isquemia-reperfusión, y sus efectos terapéuticos.

5. DISCUSIÓN

5.1 LIMITACIONES DE LA EVIDENCIA

5.1.1 Modelos

Como se ha mencionado previamente, la práctica totalidad de la evidencia disponible acerca del tratamiento del daño miocárdico por isquemia-reperusión, consiste en estudios *in vitro* e *in vivo* en animales. Como es inherente al empleo de modelos celulares y animales, aunque imprescindibles en investigación de nuevas terapias, proporcionan evidencia cuya extrapolación a la especie humana es compleja. De hecho, no pocos de los beneficios clínicos observados en modelos animales no han podido ser reproducidos en ensayos clínicos en humanos.

Uno de los argumentos que pueden explicar este hecho es que la práctica totalidad de los estudios *in vivo* en animales utilizaron como modelo pequeños roedores jóvenes y sanos, en los que la lesión por isquemia-reperusión se estableció mediante una oclusión directa y posterior reapertura de una arteria. Se ha señalado que estas condiciones distan notablemente de la situación en la que tiene lugar la lesión por isquemia-reperusión en la realidad clínica. Este tipo de lesión suele ser de un origen multicausal y prolongado en el tiempo, no solo incluyendo múltiples agentes etiopatogénicos, sino también teniendo lugar en conjunción con otras diversas comorbilidades y tratamientos farmacológicos en el contexto de una vasculopatía aterosclerótica. Son relevantes el sexo (mayor frecuencia en hombres), la edad (mayor frecuencia en edades avanzadas), la diversidad racial y étnica, etc. Asimismo, la fisiología a nivel cardíaco, incluso en estado sano, puede diferir mucho entre roedores y humanos (69). Todos ellos son factores que pueden desempeñar un papel relevante en los resultados clínicos y que la evidencia disponible no refleja adecuadamente.

5.1.2 Variabilidad

Como se ha observado, si bien la evidencia es muy homogénea en cuanto a los métodos empleados para establecer el modelo de lesión por isquemia-reperusión (hipoxia y reoxigenación *in vitro* y clampaje/desclampaje vascular *in vivo*), no lo es

tanto a la hora de establecer el abordaje terapéutico mediante MSCs. Se han utilizado MSCs o exosomas de MSCs en dosis muy diversas (algunos estudios utilizan dosis 10 veces superiores a otros), sin seguir estas ningún tipo de proporcionalidad con el peso de los animales de experimentación, el tipo celular o la vía de administración empleadas. Si bien ha habido algún artículo señalando este hecho y proponiendo medidas para una mayor estandarización de la evidencia (70), la falta de homogeneidad persiste, dificultando la extracción de conclusiones en relación con esta alternativa terapéutica. Así, en primer lugar, complica la inferencia por método comparativo, al dificultar la atribución de posibles diferencias a uno u otros factores. En segundo lugar, imposibilita una síntesis cuantitativa de la información aportada por los diversos estudios mediante metaanálisis, complicando así la obtención de conclusiones precisas.

5.1.3 Momento de aplicación

Un aspecto crítico que tener en cuenta es el momento de aplicación del tratamiento, teniendo en consideración que existe evidencia de que la precocidad en el tratamiento con MSCs influye en los resultados (41). En la mayor parte de los estudios, el periodo de isquemia establecido hasta la aplicación de la terapia oscila entre 15 y 90 minutos; incluso se ha optado en numerosas ocasiones por administrar las MSCs, o los productos derivados de ellas, antes del establecimiento de la propia isquemia. Esto puede no ser representativo de la realidad clínica, dado que el periodo medio desde la instauración de la clínica de una isquemia miocárdica hasta la revascularización en el ámbito clínico en España se ha estimado en 193 minutos (71).

5.1.4 Efectos sistémicos del daño miocárdico

No se han encontrado evidencias del efecto de la administración terapéutica de las MSCs en la fisiopatología de otros órganos de la economía tras la lesión miocárdica por isquemia-reperfusión. Este hecho puede ser una limitación relevante, dado que la lesión de otros órganos y el potencial fallo multiorgánico pueden jugar un papel determinante en el desenlace del cuadro clínico (72).

5.2 COHERENCIA EN LA LITERATURA ANALIZADA

A pesar de una cierta falta de homogeneidad en cuanto a los protocolos de la aplicación terapéutica de las MSCs, encontrada en la literatura analizada y ya mencionada en el punto 5.1.2, la bibliografía estudiada es muy coherente en cuanto a los efectos terapéuticos de estas células o del material derivado de ellas y los mecanismos implicados en su fisiopatología.

Una amplia mayoría de los trabajos evidencian que las MSCs reducen la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo y la apoptosis, mejorando la viabilidad celular y estimulando la proliferación y la angiogénesis mediante la secreción de diversas citocinas, así como a través de sus exosomas. De esta manera, se reduce el tamaño de las lesiones y el daño tisular ocasionado por el evento isquémico-reperfusivo, lo que ocasiona una mejor funcionalidad del órgano en cuestión (mejor función contráctil del miocardio). Existe amplio consenso en lo referente a estos aspectos que constituyen el núcleo de la cuestión tratada en la presente revisión. En relación con el efecto del tratamiento sobre la supervivencia, aunque son escasos los estudios que han analizado este parámetro, existen datos que demuestran una mejora considerable de dicha supervivencia tras la aplicación terapéutica de las MSCs.

Por último, sería interesante valorar la existencia de un posible sesgo de publicación, dada la falta casi completa de resultados no favorables en la evidencia *in vitro* e *in vivo*. Para un correcto análisis del mismo sería imprescindible llevar a cabo un metaanálisis y un *funnel plot*, aunque la heterogeneidad de la literatura dificulta enormemente esta tarea.

5.3 ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

Uno de los objetivos de este estudio es identificar las principales líneas investigadoras y la orientación de la evidencia a la vista de los datos disponibles. Como se ha explicado, la investigación relativa al tratamiento con MSCs del daño tisular por isquemia-reperusión, después de una fase preclínica, ha pasado a una incipiente fase clínica, desarrollada desde 2006 hasta 2016 (20). Sin embargo, a pesar de haberse cumplido las expectativas en cuanto a seguridad, los resultados obtenidos en cuanto a eficacia terapéutica a nivel clínico han sido calificados como

decepcionantes. Esta falta de beneficio terapéutico ha sido atribuida principalmente al insuficiente *engraftment* de las MSCs en el tejido lesionado. Aunque este es un factor relevante, existen otras limitaciones a las que podría atribuirse la falta de correlación entre la eficacia observada *in vivo* y en los estudios clínicos, ya desarrolladas en el punto 5.1. Actualmente la investigación está centrada de nuevo en el ámbito preclínico, con tres abordajes fundamentales estrechamente ligados entre sí:

El primero es el orientado a mejorar la comprensión de la fisiopatología de las MSCs y de sus mecanismos terapéuticos, así como la comprensión de sus efectos sobre el tejido lesionado.

Otro abordaje, que incluye una proporción muy importante de la literatura disponible, es el orientado a mejorar la eficacia del tratamiento con MSCs o los productos derivados de ellas. Para ello se están estudiando los efectos de diversas estrategias tales como el preconditionamiento isquémico de las MSCs, el tratamiento previo de las MSCs con diversas sustancias, la inducción de la sobreexpresión de algunos genes, la adecuación de vías y momentos de administración, etc.

Por último, y de manera conjunta con las otras dos líneas mencionadas, se encuentra aquella centrada en el estudio de las propiedades de las vesículas extracelulares derivadas de las MSCs, como medio terapéutico que podría compartir los beneficios del tratamiento con las propias MSCs, eludiendo algunos de los inconvenientes que plantea la aplicación de las células. Así, se están estudiando ampliamente los efectos de la aplicación de estas vesículas, así como los mecanismos fisiopatológicos de su eficacia terapéutica. Destaca el papel de los microARNs, que se han identificado como un componente clave en la acción de las MSCs y sus vesículas extracelulares. En este sentido, se está indagando en su modo de actuación, y en las posibilidades que ofrecen su sobreexpresión o su inhibición a la hora de potenciar los efectos beneficiosos del tratamiento con MSCs.

5.4 LIMITACIONES DE LA PRESENTE REVISIÓN

La presente revisión ofrece una visión global sobre los principales aspectos del tratamiento con MSCs del daño cardíaco por isquemia-reperfusión, así como de los aspectos más relevantes de la literatura existente. Sin embargo, la revisión realizada no está exenta de ciertas limitaciones.

La primera viene dada por la extensión acotada de la revisión. Es inherente a una labor de búsqueda de información y síntesis una cierta pérdida de matices presentes en la lectura individual de cada uno de los estudios incluidos, cuando se pretende transmitir una visión global completa y comprensible. Aunque se ha tratado de recoger, sintetizar y cohesionar toda la evidencia analizada, el autor es consciente de la inevitable pérdida de precisión en un trabajo de extensión limitada.

La segunda limitación, relacionada con la primera, es la cantidad de información encontrada. El volumen de publicaciones relativas a la lesión miocárdica ha obligado a hacer una estricta selección que ha excluido parte de las publicaciones. Se han aplicado criterios cronológicos y de impacto de la evidencia, lo que implica el riesgo de haber obviado información relevante, por no cumplir con los criterios establecidos. Algo análogo puede acontecer con la evidencia no recogida en las bases de datos utilizadas para la búsqueda bibliográfica.

6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta todo lo expuesto previamente, las conclusiones obtenidas del trabajo pueden recogerse como sigue:

- La lesión tisular por isquemia-reperfusión cardíaca es un problema clínico de primer orden.
- Se trata de un fenómeno multifactorial y complejo, en el que intervienen diversos procesos sobre los que pueden actuar de terapéuticamente las MSCs.
- La mayor parte de la evidencia encontrada consiste en estudios *in vivo* e *in vitro*. A pesar de la heterogeneidad en cuanto a los protocolos terapéuticos con MSCs, hay una importante uniformidad en cuanto a los modelos utilizados y a los resultados obtenidos.
- En modelos *in vitro* e *in vivo* en animales de experimentación, las MSCs parecen mejorar la lesión por isquemia-reperfusión a nivel cardíaco. Lo hacen reduciendo la inflamación, el estrés oxidativo y la apoptosis, y mejorando a viabilidad celular y estimulando la proliferación y la angiogénesis; se reducen así el tamaño de las lesiones y el daño, mejorando la funcionalidad del órgano.
- Los resultados clínicos obtenidos en humanos han sido calificados como decepcionantes, de modo que la investigación ha vuelto a centrarse en un ámbito preclínico.
- La investigación se encuentra actualmente dirigida a la comprensión de la fisiología de las MSCs, la mejora de su efecto terapéutico y a la utilización de exosomas, vesículas extracelulares y miRNA.

Como conclusión final, cabe señalar que los resultados del tratamiento de la lesión miocárdica con MSCs son prometedores, y aunque todavía requieren investigación para potenciar su eficacia terapéutica a nivel clínico, han cumplido el criterio de seguridad y es probable que lleguen a la práctica clínica generalizada en un futuro próximo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol*. 2016; 7(1): 113-70.
2. Kavanagh DPJ, Suresh S, Newsome PN, Frampton J, Kalia N. Pretreatment of Mesenchymal Stem Cells Manipulates Their Vasculoprotective Potential While Not Altering Their Homing Within the Injured Gut. *Stem Cells*. 2015; 33(9): 2785-97.
3. Inan M, Bakar E, Cerkezkayabekir A, Sanal F, Uluçam E , Subaşı C, et al. Mesenchymal Stem Cells Increase Antioxidant Capacity in Intestinal Ischemia/reperfusion injury. *J. Pediatr. Surg*. 2017; 52(7): p. 1196-206.
4. Weil BR, Markel TA, Hermann JL, Abarbanell AM, Meldrum DR. Mesenchymal stem cells enhance the viability and proliferation of human fetal intestinal epithelial cells following hypoxic injury via paracrine mechanisms. *J. Surg*. 2009; 146(2): 190-7.
5. Viétez-Flórez JM, García-Rivas S, Zamorano-Gómez JL. Cardiopatía isquémica: concepto, clasificación, epidemiología, medidas preventivas y tratamiento no farmacológico. *Medicine*. 2021; 13(37): 2119-24.
6. Ruiz-Meana M GDD. Fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperusión: nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol*. 2009; 62(2): 199-209.
7. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*. 2016; 119(1): 91-112.
8. Jiang H, Qu L, Li Y, Gu L, Shi Y, Zhang J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells reduce intestinal ischemia/reperfusion injuries in rats. *J Surg Res*. 2011; 168(1): 127-34.
9. Bakhshandeh B, Zarrintaj P, Oftadeh MO, Keramati F, Fouladiha H, Sohrabi-jahromi S, et al. Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2017; 33(2): 144-72.
10. Trohatou O, Roubelakis MG. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Past, Present, and Future. *Cell Reprogram*. 2017; 19(4): 217-24.
11. Secardiologia.es. [Internet]. Madrid: Sociedad Española de Cardiología; 2021 [consulta, 19/09/2021]. Disponible en: www.secardiologia.es.
12. Garrido Pascual P. Tissue Engineering and Stem Cells [tesis]. Leioa: Universidad del País Vasco; 2019.
13. Shafiee A, Atala A. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annu*

- Rev Med. 2017; 68:29-40.
14. Edgar L, Porter B, Aziz JM, La Pointe C, Asthana A, Orlando G. Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation. *Br J Surg.* 2020; 107(7): 793-800.
 15. Kolios G MY. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration.* 2013; 85(1): 3-10.
 16. Keshtkar S ANGM. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1): 63.
 17. Cossu G, Birchall M, Brown T, et al. Lancet Commission: Stem cells and regenerative medicine. *Lancet.* 2018; 391(10123): 883-910.
 18. Asgct.org. [Internet]. Waukesha: American Society of Gene+Cell Therapy; 2021 [consulta, 19/09/2021]. Disponible en: www.asgct.org.
 19. Basgct.org. [Internet]. Cardiff: British Society for Gene and Cell Therapy; 2021 [consulta, 19/09/2021]. Disponible en: www.bsgct.org.
 20. Terashvili M, Bosnjak ZJ. Stem Cell Therapies in Cardiovascular Disease. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2019; 33(1): 209-22.
 21. Jiang Q, Yu T, Huang K, Zhang H, Hu S. Remote Ischemic Postconditioning Ameliorates the Mesenchymal Stem Cells Engraftment in Reperfused Myocardium. *PLoS One* [Internet]. 2016 [consulta, 19/09/2021]; 11(1): e0146074. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0146074>
 22. Ju C, Shen Y, Ma G, Liu Y, Cai J, Kim IM, et al. Transplantation of Cardiac Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promotes Repair in Ischemic Myocardium. *J Cardiovasc Transl Res.* 2018; 11(5): 420-8.
 23. Korkmaz-Icöz S, Li S, Hüttner R, Ruppert M, Radovits T, Loganathan S, et al. Hypothermic perfusion of donor heart with a preservation solution supplemented by mesenchymal stem cells. *J Heart Lung Transplan.* 2019; 38(3): 315-26.
 24. Mokhtari B, Azizi Y, Abookheili AR, Aboutaeb N, Nazarinia D, Naderi N. Human amniotic membrane mesenchymal stem cells-conditioned medium attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by targeting oxidative stress. *Iran J Basic Med Sci.* 2020; 23(11): 1453-61.
 25. Thavapalachandran S, Le TYL, Romanazzo S, Rashid FN, Ogawa M, Kilian KA, et al. Pluripotent stem cell-derived mesenchymal stromal cells improve cardiac function and vascularity after myocardial infarction. *Cytotherapy.* 2021; 23(12): 1074-84.
 26. Park H, Park H, Kim H, Lee SH, Cui S, Pak HN, et al. MICRORNA-26A FROM HYPOXIC HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS: DERIVED

MICROVESICLES ENHANCE CARDIAC CONDUCTION FOLLOWING MYOCARDIAL INFARCTION. *JACC*. 2017; 69(11): 343.

27. Wang J, Chen Z, Dai Q, Zhao J, Wei Z, Hu J, et al. Intravenously delivered mesenchymal stem cells prevent microvascular obstruction formation after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 2020; 115(4): 40.
28. Moore JB, Tang XL, Zhao J, Fischer AG, Wu WJ, Uchida S, et al. Pigenetically Modified Cardiac Mesenchymal Stromal Cells Limit Myocardial Fibrosis and Promote Functional Recovery in a Model of Chronic Ischemic Cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*. 2018; 114(1): 3.
29. Zhou P, Liu H, Liu X, Ling X, Zezhou X, Zhu P, et al. Donor heart preservation with hypoxic-conditioned medium-derived from bone marrow mesenchymal stem cells improves cardiac function in a heart transplantation model. *Stem Cell Res Ther*. 2021; 12(1): 56.
30. Zhang H, Xiang M, Meng D, Sun N, Chen S. Inhibition of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Exosomes Secreted from Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int* [Internet]. 2016 [consulta, 29/10/2021]; 2016(1): 4328362. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2016/4328362/>
31. Cui X, He Z, Liang Z, Chen Z, Wang H, Zhang J. Exosomes From Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Protect the Myocardium Against Ischemia/Reperfusion Injury Through Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017; 70(4): p. 225-31.
32. Wang Y, Li Y, Song L, Li Y, Jiang S, Zhang S. The transplantation of Akt-overexpressing amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells protects the heart against ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Mol Med Rep*. 2016; 14(1): 234-42.
33. Mihai MC, Popa MA, Suica VI, Antohe F, Jackson EK, Simionescu M, et al. Mechanism of 17 β -estradiol stimulated integration of human mesenchymal stem cells in heart tissue. *J Mol Cell Cardiol*. 2019; 133(1): 115-24.
34. Tang J, Jin L, Liu Y, Li L, Ma Y, Lu L, et al. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Protect the Myocardium Against Ischemia/Reperfusion Injury Through Inhibiting Pyroptosis. *Drug Des Devel Ther*. 2020; 14(1): 3765-75.
35. Chu X, Xu B, Gao H, Li BY, Liu Y, Reiter JL, et al. Lipopolysaccharides Improve Mesenchymal Stem Cell-Mediated Cardioprotection by MyD88 and stat3 Signaling in a Mouse Model of Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Stem Cells Dev*. 2019; 28(9): 620-31.
36. Shin EY, Wang L, Zemskova M, Deppen J, Xu K, Strobel F, et al. Adenosine Production by Biomaterial-Supported Mesenchymal Stromal Cells Reduces the

Innate Inflammatory Response in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2018 [consulta, 12/10/2021]; 13;7(2): e006949. Disponible en:

https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/JAHA.117.006949?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org

37. Yan W, Yanjie G, He Y, Xia Y, Zhang F, Guo Y, et al. Resistin-pretreatment promotes homing of mesenchymal stem cells into damaged heart for functional recovery after myocardial ischemia/reperfusion via ERK1/2-MMP-9 signaling pathway. *JACC*. 2018; 72(16): 55.
38. Zhang SJ, Song XY, Yu SB. Effect of TGF- β 1/SDF-1/CXCR4 signal on BM-MSCs homing in rat heart of ischemia/perfusion injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016; 20(5): 899-905.
39. Li X, Xie X, Yu Z, Chen Y, Qu G, Yu H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells-derived conditioned medium protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced injury through Notch2/mTOR/autophagy signaling. *J Cell Physiol*. 2019; 234(10): 18906-16.
40. Li HX, Lin J, Jiang B, Yang XJ. Wnt11 preserves mitochondrial membrane potential and protects cardiomyocytes against hypoxia through paracrine signaling. *J Cell Biochem*. 2020; 121(2): p. 1144-55.
41. Zhang Z, Tian H, Yang C, Liu J, Zhang H, Wang J, et al. Mesenchymal Stem Cells Promote the Resolution of Cardiac Inflammation After Ischemia Reperfusion Via Enhancing Efferocytosis of Neutrophils. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2020 [consulta, 12/10/2021]; 9(5): e014397. Disponible en: https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/JAHA.119.014397?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org
42. Hong HS, Kim S, Lee S, Woo JS, Lee KH, Cheng CW, et al. Substance-P Prevents Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury by Modulating Stem Cell Mobilization and Causing Early Suppression of Injury-Mediated Inflammation. *Cell Physiol Biochem*. 2019; 25(1): 40-56.
43. Zou L, Ma X, Wu B, Chen Y, Xie D, Peng C. Protective effect of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes on cardiomyoblast hypoxia-reperfusion injury through the miR-149/let-7c/Faslg axis. *Free Radic Res*. 2020; 54(10): 722-31.
44. Gong XH, Liu H, Wang SJ, Liang SW, Wang GG. Exosomes derived from SDF1-overexpressing mesenchymal stem cells inhibit ischemic myocardial cell apoptosis and promote cardiac endothelial microvascular regeneration in mice with myocardial infarction. *J Cell Physiol*. 2019; 234(8): 13878-93.

45. Wei Z, Quiao S, Zhao J, Liu Y, Li Q, Wei Z, et al. miRNA-181a over-expression in mesenchymal stem cell-derived exosomes influenced inflammatory response after myocardial ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 2019; 232(1): 116632.
46. Shen D, He Z. Mesenchymal stem cell-derived exosomes regulate the polarization and inflammatory response of macrophages via miR-21-5p to promote repair after myocardial reperfusion injury. *Ann Transl Med.* 2021; 9(16): 1323.
47. Yan W, Lin C, Guo Y, Chen Y, Du Y, Lau WB, et al. N-Cadherin Overexpression Mobilizes the Protective Effects of Mesenchymal Stromal Cells Against Ischemic Heart Injury Through a β -Catenin-Dependent Manner. *Circ Res.* 2020; 126(7): 857-74.
48. Liu L, Jin X, Hu CF, Li R, Zhou Z, Shen CX. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Rescue Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury by Inducing Cardiomyocyte Autophagy Via AMPK and Akt Pathways. *Cell Physiol Biochem.* 2017; 43(1): 52-68.
49. Li T, Gu J, Yang O, Wang J, Wang Y, Kong J. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal miRNA-29c Decreases Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury Through Inhibition of Excessive Autophagy via the PTEN/Akt/mTOR Signaling Pathway. *Circ J.* 2020; 84(8): 1304-11.
50. Mokhtari B, Badalzadeh R, Aboutaleb N. Modulation of autophagy as the target of mesenchymal stem cells-derived conditioned medium in rat model of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Mol Biol Rep.* 2021; 48(4): 3337-48.
51. Zhang H, Xiang M, Meng D, Sun N, Chen S. Inhibition of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Exosomes Secreted from Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016; 2016(1): 4328362.
52. Luther KM, Haar L, McGuinness M, Wang Y, Lynch TL, Phan A, et al. Exosomal miR-21a-5p mediates cardioprotection by mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2018; 119(1): 125-37.
53. Liu Z, Xu Y, Wan Y, Gao J, Chu Y, Li J. Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells prevent cardiomyocyte apoptosis induced by oxidative stress. *Cell Death Discov.* 2019; 5(1): 79.
54. Fisher SA, Zhang H, Doree C, Mathur A, Martin-Rendon E. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2015 [consulta, 12/10/2021]; 2015(9): CD006536. Disponible en: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD006536.pub4/full>
55. Lee TL, Lai TC, Lin SR, Lin SW, Chen YC, Pu CM, et al. Conditioned medium from adipose-derived stem cells attenuates ischemia/reperfusion-induced cardiac

- injury through the microRNA-221/222/PUMA/ETS-1 pathway. *Theranostics*. 2021; 11(7): 3131-49.
56. Nernpermpisooth N, Sarre C, Barrere C, Contreras R, Luz-Crawford P, Tejedor G, et al. PPAR β/δ Is Required for Mesenchymal Stem Cell Cardioprotective Effects Independently of Their Anti-inflammatory Properties in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Cardiovasc Med*. 2021; 8(1): 681002.
 57. Chen Q, Liu Y, Ding X, Li Q, Qiu F, Wang M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-secreted exosomes carrying microRNA-125b protect against myocardial ischemia reperfusion injury via targeting SIRT7. *Mol Cell Biochem*. 2020; 465(1-2): 103-14.
 58. Sun XH, Wang X, Zhang Y, Hui J. Exosomes of bone-marrow stromal cells inhibit cardiomyocyte apoptosis under ischemic and hypoxic conditions via miR-486-5p targeting the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Thromb Res*. 2019; 177(1): 23-32.
 59. Chen J, Song Y, Huang Z, Zhang N, Xie X, Liu X, et al. Modification with CREKA Improves Cell Retention in a Rat Model of Myocardial Ischemia Reperfusion. *Stem Cells*. 2019; 37(5): 663-76.
 60. Lu M, Xu Y, Wang M, Guo T, Luo F, Su N, et al. MicroRNA-23 inhibition protects the ischemia/reperfusion injury via inducing the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019; 12(3): 1060-9.
 61. Takov K, He Z, Johnston HE, Timms JF, Guillot PV, Yellon DM, et al. Small extracellular vesicles secreted from human amniotic fluid mesenchymal stromal cells possess cardioprotective and promigratory potential. *Basic Res Cardiol*. 2020; 115(3): 26.
 62. Seo HH, Lee SY, Lee CY, Kim R, Oh S, Lee H, et al. Exogenous miRNA-146a Enhances the Therapeutic Efficacy of Human Mesenchymal Stem Cells by Increasing Vascular Endothelial Growth Factor Secretion in the Ischemia/Reperfusion-Injured Heart. *J Vasc Res*. 2017; 54(2): 100-8.
 63. Ou H, Teng H, Qin Y, Luo X, Yang P, Zhang W, et al. Extracellular vesicles derived from microRNA-150-5p-overexpressing mesenchymal stem cells protect rat hearts against ischemia/ reperfusion. *Aging*. 2020; 12(12): 12669-83.
 64. Li KS, Jiang WP, Li QC, Zhang HW, Bai Y, Zhang X, et al. MiR-29a in mesenchymal stem cells inhibits FSTL1 secretion and promotes cardiac myocyte apoptosis in hypoxia-reoxygenation injury. *Cardiovasc Pathol*. 2020; 46(1): 107180.
 65. Nasser MI, Masood M, Adlat S, Gang D, Zhu S, Li G, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosome microRNA as therapy for cardiac ischemic injury. *Biomed*

- Pharmacother. 2021; 143:112118.
66. Du W, Wang X, Maimaitiyiming D, Sai Q, Zhao G, Tuerxun G. Exosomes from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviates Rat Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Oxidative Stress and Inflammatory Response. *J Biomater Tissue Eng.* 2021; 11(1): 38-43.
 67. Mao C, Li D, Zhou E, Gao E, Zhang T, Sun S, et al. Extracellular vesicles from anoxia preconditioned mesenchymal stem cells alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury. *Aging.* 2021; 13(4): 6156-70.
 68. Zhang C, Wang H, Chan GCF, Zhou Y, Lai X, Lian M. Extracellular Vesicles Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Protect Cardiac Cells Against Hypoxia/Reoxygenation Injury by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress via Activation of the PI3K/Akt Pathway. *Cell Transplant* [Internet]. 2020 [consulta, 20/11/2021] ; 29(1): 963689720945677. Disponible en:
https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0963689720945677?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed
 69. Shin HS, Shin HH, Shudo Y. Current Status and Limitations of Myocardial Infarction Large Animal Models in Cardiovascular Translational Research. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021; 9(1): 673683.
 70. Trindade F, Leite-Moreira A, Ferreira-Martins J, Ferreira R, Falcao-Pires I, Vitorino R. Towards the standardization of stem cell therapy studies for ischemic heart diseases: Bridging the gap between animal models and the clinical setting. *Int J Cardiol.* 2017; 228(1): 465-80.
 71. Rodríguez-Leor O, Cid-Álvarez AB, Pérez de Prado A, Rosselló X, Ojeda S, Serrador A, et al. Análisis de la atención al infarto con elevación del segmento ST en España. Resultados del Registro de Código Infarto de la ACI-SEC. *Rev Esp Cardiol* [Internet]. 2021 [consulta, 12/10/2021]. Disponible en: <https://www.revespcardiol.org/es-analisis-atencion-al-infarto-con-avance-S0300893221004632>
 72. Tehrani BN, Truesdell G, Psotka MA, Ronser C, Singh R, Sinha SS, et al. A Standardized and Comprehensive Approach to the Management of Cardiogenic Shock. *JACC Heart Fail.* 2020; 8(11): 879-91.
 73. Williams AR, Hare MJ. Mesenchymal stem cells: Biology, patho-physiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res.* 2011; 109(8): 923-40.
 74. Nguyen PK RJWJ. Adult stem cell therapy and heart failure, 2000 to 2016: a systematic review. *JAMA Cardiol.* 2016; 1(7): 831-41.
 75. Zhang J, Gong JF, Zhang W, Zhu WM, Li JS. Effects of transplanted bone

- marrow mesenchymal stem cells on the irradiated intestine of mice. *J Biomed Sci.* 2008; 15(5): 585-94.
76. Qin Y, Luo X, Yang P, Zhang W, Chen W, Lv D, et al. Extracellular vesicles derived from microRNA-150-5p-overexpressing mesenchymal stem cells protect rat hearts against ischemia/reperfusion. *Aging.* 2020; 12(13): 12669-83.
 77. Liu L, He YR, Liu SJ, Hu L, Liang LC, Liu DL, et al. Enhanced Effect of IL-1 β -Activated Adipose-Derived MSCs (ADMSCs) on Repair of Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury via COX-2-PGE 2 Signaling. *Stem Cells Int.* 2020; 2020(1): 2803747.
 78. Chen L, Ruan Z. Overexpression of miR-145 in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Improves Myocardial Injury in Rats. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering.* 2021; 11(8): 1618-23.
 79. Mazini L, Rochette L, Amine M, Malka G. Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Int J Mol Sci.* 2019; 20(10): 2523.
 80. Oltean M. The Chiu/Park scale for grading intestinal ischemia-reperfusion: if it ain't broke don't fix it! *Intensive Care Med.* 2010; 36(6): 1095.
 81. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A. morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg.* 1970; 101: 478-83.
 82. Sadeghzadeh J, Vakili A, Smeni HR, Shadnoush M, Bandegi AR, Khorasani MZ. The Effect of Oral Consumption of Probiotics in Prevention of Heart Injury in a Rat Myocardial Infarction Model: a Histopathological, Hemodynamic and Biochemical Evaluation. *Iran Biomed J.* 2017; 21(3): 174-81.
 83. Turillazzi E, Di Giammarco G, Neri M, Bello S, Riezzo I, Fineschi V. Coronary ostia obstruction after replacement of aortic valve prosthesis. *Diagn Pathol.* 2011; 6: 72.
 84. Perea RJ, Ortiz-Pérez JT, Sole M, Cibeira MT, De Caralt TM, Prat-González S, et al. T1 mapping: characterisation of myocardial interstitial space. *Insights imaging.* 2015; 6(2): 189-202.
 85. Lu K, Li Hy, Yang K, Wu JI, Cai XW, Zhou Y, et al. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Res Ther.* 2017; 8: 108.