



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD TERAPÉUTICA DE
LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES
PROCEDENTES DE CÉLULAS ESTROMALES
MESENQUIMALES DE LA MÉDULA ÓSEA SOBRE
LA CARDIOTOXICIDAD INDUCIDA POR
DOXORUBICINA**

[TESIS DOCTORAL]

Ana Rico Sorlí

Salamanca

2020



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

Dr. Fermín Sánchez-Guijo Martín, con D.N.I. [REDACTED], Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca (USAL) y director del Área de Terapia Celular del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca

Dra. Sandra Muntión Olave, con D.N.I. [REDACTED] Doctora por la Universidad de Salamanca e Investigador postdoctoral en el Laboratorio de Terapia Celular del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca.

Dra. Silvia Preciado Pérez, con D.N.I. [REDACTED] Doctora por la Universidad de Salamanca e Investigador postdoctoral en el Laboratorio de Terapia Celular del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca.

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado “Estudio de la capacidad terapéutica de las vesículas extracelulares procedentes de células estromales mesenquimales de la médula ósea sobre la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina” realizada por Dña. Ana Rico Sorlí, bajo su supervisión en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, reúne a su juicio los criterios de originalidad para que su autora pueda optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firman la siguiente certificación, en Salamanca, a 26 de octubre de 2020

Dr. ~~Fermín~~ Sánchez-Guijo Martín Dra. Sandra Muntión Olave Dra. Silvia Preciado Pérez

Este proyecto de tesis ha sido financiado por:

El Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III en el subprograma de Proyectos Integrados de Excelencia en los Institutos y Ciber (AES 2014). Proyecto: “CARDioToxicity In the Elderly pRogramme: the CARTIER Project” (PIE14/00066).

El Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) en su Plan de Ayudas Pre-doctorales de 2017 para la realización de Tesis Doctorales.

Los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos:

Ana Rico; Sandra Muntión; Silvia Preciado; Carlos Moyano; Enrique Ocio; Fermín Sánchez-Guijo; Pedro Luis Sánchez; Consuelo del Cañizo. Study of the therapeutic capacity of extracellular vesicles from mesenchymal cells (MSC-EV) in chemotherapy-induced cardiotoxicity. **14th International Symposium on Stem Cell Therapy and Cardiovascular Innovations**. Madrid, 15 – 16 de junio 2017.

Ana Rico; Sandra Muntión; Silvia Preciado; Lika Osugui; Natalia Espinosa-Lara; Gerardo Martí-Chillón; Carlos Moyano; Pedro Luis Sánchez; Fermín Sánchez-Guijo. Estudio del efecto de las vesículas extracelulares procedentes de células mesenquimales sobre la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina. **LXI Congreso Nacional de la SEHH y XXXV Congreso Nacional de la SETH**. Valencia, 24 – 26 de octubre 2019.

Agradecimientos

Este trabajo va dedicado a todas aquellas personas que han hecho posible esta tesis. A todos aquellos que han confiado en mí, y me han apoyado y animado a seguir, porque su afecto y cariño ha sido indispensable para poder sobrellevar todas las adversidades que se me han presentado en el camino y poder cumplir mis metas y objetivos trazados.

En primer lugar, incluyo a las personas más importantes en mi vida. Quiero agradecer a mi familia y de manera especial a mis padres, quienes me inspiran a ser mejor persona y me han demostrado lo que es el amor y el apoyo incondicional, por acompañarme en los momentos de crisis y desesperación, así como en los momentos de felicidad, por ese apoyo incondicional, por darme ánimos y empujarme siempre hacia adelante y por ser mi fuerza e inspiración. A ellos les dedico de manera especial esta Tesis Doctoral y todo el esfuerzo invertido, ya que sin ellos no podría haber llegado hasta aquí.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Consuelo del Cañizo y al Dr. Fermín Sánchez-Guijo, por confiar en mí para realizar este proyecto y brindarme la oportunidad de trabajar con ellos y compartir sus conocimientos necesarios para el desarrollo de mi trabajo de investigación. A mis directores por el apoyo para culminar este proyecto de la mejor manera posible, con la paciencia y ardua labor que la caracterizan. Extiendo mi agradecimiento al Dr. Manuel Sánchez y a su equipo por su amabilidad y recibirme siempre con una sonrisa, así como al Dr. Carlos Moyano, por su colaboración y total disponibilidad.

Cómo no, a mis compañeros de trabajo, los cuales se convirtieron en mi familia por unos años. Les agradezco su profesionalidad, su gran ayuda, su solidaridad y su aportación, tanto a nivel personal como laboral.

Del mismo modo, al Dr. Singla por aceptarme en su grupo para realizar la estancia y a su magnífico equipo por hacerme sentir una más y aportarme tanto en tan poco tiempo.

Finalmente, a todos los amigos que han estado a mi lado, especialmente a mis imprescindibles, a quienes les estoy eternamente agradecida, por hacerme este camino más fácil al mostrarme su afecto y cariño, escucharme y aconsejarme. A aquellos que he ido conociendo durante estos cinco años, y a los amigos que desde la distancia me han apoyado, porque, pese a no estar físicamente cerca, están siempre en mi corazón.

*“El fracaso es parte de la vida;
si no fracasas no aprendes
y si no aprendes, no cambias”*

Paulo Coelho

Índice

<i>Lista de abreviaciones.....</i>	15
<i>Lista de figuras.....</i>	21
<i>Lista de tablas.....</i>	25
<i>Abstract.....</i>	27
INTRODUCCIÓN.....	31
1. Desarrollo cardíaco y tipos celulares presentes en el corazón	33
2. Función cardíaca	34
3. Cáncer y cardiotoxicidad.....	36
4. Cardiotoxicidad asociada al tratamiento con antraciclinas.....	36
4.1. Tipos de cardiotoxicidad	37
5. Doxorubicina	38
5.1. Concepto e historia	38
5.3. Posología y farmacocinética	39
5.4.1. Efecto tiempo-dependiente	40
5.4.2. Efecto dosis-dependiente.....	41
5.4.3. Otros factores de riesgo.....	42
5.5. Mecanismos moleculares de la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina	42
5.5.1. Generación de ROS.....	43
5.5.2. Apoptosis	46
5.5.3. Desregulación del Ca ²⁺	47
5.5.4. Inhibición de la Topoisomerasa II (TopII).....	48
5.5.5. Otros efectos de la doxorubicina sobre los cardiomiocitos	49
5.6. Control terapéutico de fármacos para la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina	50
5.6.1. Cómo diagnosticar la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina	50
5.7. Estrategias para la prevención o alivio de la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina	53
5.7.1. Alteración del régimen de dosis de doxorubicina	53
5.7.2. Formulación liposomal de la doxorubicina.....	54
5.7.3. Encapsulación de la doxorubicina en exosomas y nanopartículas	54

5.7.4.	Uso de agentes cardioprotectores: dexrazoxano.....	55
5.7.5.	Uso de citoquinas hematopoyéticas: EPO y TPO.....	56
5.7.6.	Uso de antioxidantes: vitaminas A, C y E, melatonina, N-acetil-cisteína, amifostina, mangiferina, probucol o resveratrol	56
5.7.7.	Uso de metformina.....	57
5.7.8.	Uso de β -bloqueantes, inhibidores de la ACE y ARBs	57
6.	<i>Regeneración cardíaca</i>	57
7.	<i>Células madre con potencial terapéutico en cardiología y cardiotoxicidad</i>	58
7.1.	Concepto.....	58
7.2.	Potencial terapéutico en cardiología y cardiotoxicidad	59
7.3.	Células estromales mesenquimales	59
7.3.1.	Concepto.....	59
7.3.2.	Potencial terapéutico en cardiología y cardiotoxicidad	60
8.	<i>Vesículas extracelulares.....</i>	62
8.1.	Concepto.....	62
8.2.	Potencial terapéutico en cardiología y cardiotoxicidad	65
8.3.	Vesículas extracelulares procedentes de MSC (VE-MSC).....	65
	<i>HIPÓTESIS.....</i>	67
	<i>OBJETIVOS.....</i>	71
	<i>MATERIALES Y MÉTODOS.....</i>	75
1.	<i>Caracterización de los cardiomiocitos primarios murinos</i>	77
1.1.	Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos primarios murinos	77
1.2.	Marcadores de caracterización de los cardiomiocitos murinos.....	79
2.	<i>Establecimiento del modelo de daño por doxorubicina in vitro</i>	81
2.1.	Estudio de la viabilidad celular mediante Citometría de flujo.....	82
2.2.	Estudio de la liberación de troponina T cardíaca	83
2.3.	Medida de las pulsaciones de los cardiomiocitos primarios	84
3.	<i>Caracterización e incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos primarios murinos.....</i>	84
3.1.	Cultivo de células estromales mesenquimales (MSC)	84

3.2.	Aislamiento y marcaje de vesículas extracelulares de MSC	90
3.3.	Caracterización de las vesículas extracelulares procedentes de las MSC	92
3.4.	Estudio de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos primarios murinos	93
4.	<i>Estudios funcionales de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos primarios para la prevención de la cardiotoxicidad</i>	<i>96</i>
4.1.	Viabilidad y muerte celular	96
4.2.	Medida de las pulsaciones de los cardiomiocitos primarios	99
4.3.	Liberación de troponina T cardíaca	99
4.4.	Detección de los niveles intracelulares de ROS	100
4.5.	Ensayo de daño en el DNA	101
4.6.	Análisis de expresión génica de p21 mediante RT-PCR	102
5.	<i>Análisis estadístico</i>	<i>104</i>
	RESULTADOS.....	105
1.	<i>Caracterización de los cardiomiocitos primarios murinos</i>	<i>107</i>
1.1.	Marcadores de caracterización de los cardiomiocitos murinos.....	107
2.	<i>Establecimiento del modelo de daño por doxorubicina in vitro</i>	<i>108</i>
2.1.	Viabilidad celular mediante Citometría de flujo	108
2.2.	Liberación de la troponina T cardíaca	109
2.3.	Cuantificación de las pulsaciones de los cardiomiocitos primarios	110
3.	<i>Caracterización e incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos primarios murinos.....</i>	<i>110</i>
3.1.	Cultivo de MSC procedentes de médula ósea	110
3.2.	Caracterización de las VE procedentes de las MSC.....	112
3.3.	Incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos primarios murinos.....	113
4.	<i>Estudios funcionales de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos primarios para la prevención de la cardiotoxicidad</i>	<i>115</i>

4.1.	Estudios de viabilidad y muerte de los cardiomiocitos primarios	115
4.2.	Liberación de la troponina T cardíaca	120
4.3.	Cuantificación de las pulsaciones de los cardiomiocitos primarios	121
4.4.	Niveles intracelulares de ROS	121
4.5.	Análisis del daño en el DNA	122
4.6.	Expresión génica de p21	123
<i>DISCUSIÓN.....</i>		<i>125</i>
<i>CONCLUSIONES.....</i>		<i>137</i>
<i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>		<i>141</i>

Lista de abreviaciones

A

ABC: *ATP-binding cassette*

ACC: AMPK/Acecil-CoA carboxilasa

ACE: enzima convertora de la angiotensina

ADP: difosfato de adenosina

AIF: factor inductor de la apoptosis mitocondrial

AKT o PKB: proteína kinasa B

ALS: sistema lisosomal/autofágico

AMPK: kinasa de la proteína activada por monofosfato de adenosina (AMP)

ANP: péptido natriurético atrial o auricular

APC: aloficocianina

ARBs: antagonistas del receptor de la angiotensina II

ASCO: Sociedad Americana de Oncología Clínica

ATM: ataxia telangiectasia mutada

ATP: trifosfato de adenosina

5-Aza: 5-azacitidina

7-AAD: 7-aminoactinomicina D

B

Bax: proteína X asociada a Bcl-2 o proteína del linfoma de células B

BM-MSC: células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea

BNP: péptido natriurético cerebral o tipo B

BSA: albúmina de suero bovino

C

Ca²⁺: calcio

CaMKII: proteína kinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina

CD: células dendríticas

CDs: grupo de diferenciación

CDCs: células derivadas de cardiosferas

cDNA: DNA complementario

CL: cardiolipina

C_{max}: concentración máxima

CO₂: dióxido de carbono

CMN: células mononucleadas
CSC o CPC: células madre cardíacas
CTE: cadena de transporte de electrones
cTnI: troponina I cardíaca
cTnT: troponina T cardíaca
C I-IV: complejos I-IV de la CTE

D

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DCF: 2',7'-diclorofluoresceína
DISC: complejo de señalización inductor de muerte
DMEM: *dulbecco's modified eagle medium*
DMSO: dimetil sulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
DRs: receptores de muerte

E

ECG: ecocardiograma
eNOS: sintasa de óxido-nítrico endotelial
EPC: células progenitoras endoteliales
EPO: eritropoyetina
ERK: kinasa regulada por señales extracelulares
ESC: células madre pluripotentes embrionarias
ET-1: endotelina-1

F

FasL: ligando de Fas
FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos
FE: fracción de eyección
FEVI: fracción de eyección ventricular izquierda
FITC: isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato
FLK1 o VEGFR2: receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular

G

GATA-4: proteína 4 de unión a la secuencia GATA
GPx: glutatión peroxidasa

H

HBSS: *hank's balanced salt solution*
HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HLA-DR: antígeno leucocítico humano del loci DR

HO·: radical hidroxilo

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

HSC: células madre hematopoyéticas

H₂DCFDA: diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

H₂O₂: peróxido de hidrogeno

I

IC: insuficiencia cardíaca

ICAMs: moléculas de adhesión intercelular

iCM: cardiomiocitos derivados de las iPSC

IF: inmunofluorescencia

iMSC: MSC derivados de las iPSC

INF- γ : interferón gamma

iPC: cardiomiocitos inducidos

iPSC: células madre pluripotentes inducidas

iPS-CMs: cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas

I/R: isquemia/reperfusión

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular

L

LC-MS/MS: cromatografía líquida con dos detectores de espectrometría de masas

LLA: leucemia linfoblástica aguda

M

MAPK: kinasa activada por mitógenos

MDR: transportadores de resistencia a múltiples fármacos

MEC: matriz extracelular

MEFs: factor potenciador específico de miocitos

MET: microscopia electrónica de transmisión

MFI: media de fluorescencia

MiCM: iCM derivados de MSC procedentes de placenta humana amniótica

MIF: factor inhibitorio de la migración de los macrófagos

mRNA: RNA mensajero

miRNA o miR: microRNA

MSC: células madre mesenquimales

mtDNA: DNA mitocondrial

mtROS: ROS mitocondrial

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol

N

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido oxidada

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido hidruro o reducida

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NBT/BCIP: nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

NCLX: intercambiador de Ca²⁺/Na⁺ mitocondrial

nDNA: DNA nuclear

NFAT: factor nuclear de los linfocitos T activados

NK: células *natural killer*

NOXs: familia de las oxidasas NADPH

NTA: análisis de rastreo de nanopartículas

O

ON: durante toda la noche

O₂: oxígeno molecular

O₂⁻: anión superóxido

OH[·]: radicales hidroxilos

¹O₂: oxígeno singlete

P

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PAR-1: proteasa activada del receptor 1

PARP1: polimerasa 1 poly [ADP-ribosa]

PBS: tampón fosfato salino

PE: ficoeritrina

PerCP: clorofila peridinina

PGC-1 α : co-activador 1- α del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa

PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa

R

RNA: ácido ribonucleico

RNS: especies reactivas al nitrógeno

ROS: especies reactivas al oxígeno

RPMI: medio *Roswell Park Memorial Institute*

RS: retículo sarcoplásmico

RT: temperatura ambiente

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

S

SBF: suero bovino fetal

SD: desviación estándar

SDS: dodecil sulfato de sodio

SEM: error estándar de la media

SERCA: ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico

SIRT1: sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD

SIRT3: sirtuina 3

SLC: transportadores de solutos

SOD2: superóxido dismutasa 2

sVE: VE pequeñas

T

TLRs: receptores como Toll

TNF α : factor de necrosis tumoral α

TNFR1: receptor 1 del factor de necrosis tumoral

TopII: topoisomerasa II

TPO: trombopoyetina

TRAIL: ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF

tRNA: ARN de transferencia

TUNEL: marcaje de final de corte deoxinucleotidil transferasa (dUTP) mediado por la transferasa deoxinucleotidil terminal (TdT)

U

UHPLC: cromatografía líquida de ultra alta eficacia

UPP: vía ubiquitin/proteosoma

UPR: respuesta de las proteínas mal plegadas

V

VE: vesículas extracelulares

VE-MSC: vesículas extracelulares procedentes de células estromales mesenquimales

VEGFR-2: receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular

VI: ventrículo izquierdo

Lista de figuras

- Figura 1** Estructura de la pared cardíaca
- Figura 2** Representación de los mecanismos celulares y moleculares de la contracción y la relajación cardíaca que ocurren en cada potencial de acción
- Figura 3** Estructura química de doxorubicina y la daunomicina
- Figura 4** Esquema de los mecanismos a través de los cuales la doxorubicina induce cardiotoxicidad
- Figura 5** Efectos de la doxorubicina sobre la producción de ROS en la mitocondria de los cardiomiocitos
- Figura 6** Representación de las vías intrínseca y extrínseca activadas por la doxorubicina en cardiomiocitos
- Figura 7** Estructura de los miofilamentos que componen las miofibrillas
- Figura 8** Clasificación de las VE según su tamaño
- Figura 9** Representación de la transferencia intercelular de las VE
- Figura 10** Estructura y contenido de una VE
- Figura 11** Representación esquemática del aislamiento y cultivo de los cardiomiocitos primarios murinos
- Figura 12** Representación esquemática de los estudios realizados para la identificación y caracterización de los cardiomiocitos primarios murinos
- Figura 13** Representación esquemática de los estudios realizados para el establecimiento del modelo de cardiotoxicidad inducida por 1 μ M de doxorubicina sobre los cardiomiocitos primarios murinos
- Figura 14** Representación esquemática del aislamiento y expansión de las MSC
- Figura 15** Representación esquemática del cultivo de MSC hasta la tinción de Oil-Red-O para evaluar la capacidad de diferenciación de las MSC a adipocitos

- Figura 16** Representación esquemática del cultivo de MSC hasta la tinción de Fosfatasa Alcalina para evaluar la capacidad de diferenciación de las MSC a osteoblastos
- Figura 17** Representación esquemática del procedimiento de aislamiento de las VE-MSC mediante ultracentrifugación
- Figura 18** Representación esquemática del procedimiento de marcaje de las VE-MSC mediante el colorante rojo *Vybrant Dil*
- Figura 19** Esquema de los co-cultivos de cardiomiocitos primarios murinos y VE-MSC marcadas con el colorante *Vybrant Dil* así como de los estudios realizados para evaluar la incorporación de las VE-MSC y determinar el tiempo óptimo de estudio
- Figura 20** Representación esquemática de los diferentes estudios realizados para la evaluación funcional de la incorporación de las VE-MSC en la prevención de la cardiotoxicidad inducida por la doxorubicina sobre los cardiomiocitos primarios murinos *in vitro*
- Figura 21** Representación esquemática del procedimiento del estudio de la viabilidad mediante MTT
- Figura 22** Representación esquemática del procedimiento del estudio de la viabilidad mediante un ensayo de luminiscencia
- Figura 23** Representación esquemática del procedimiento del estudio de la apoptosis mediante un ensayo de luminiscencia
- Figura 24** Representación esquemática del procedimiento para la detección de los niveles intracelulares de ROS
- Figura 25** Representación esquemática del procedimiento para la detección de los niveles de daño en el DNA
- Figura 26** Representación esquemática del proceso de análisis de la expresión génica de p21 mediante RT-PCR
- Figura 27** Marcadores de caracterización de los cardiomiocitos primarios murinos mediante citometría de flujo

Figura 28	Imágenes de inmunofluorescencia representativas de cardiomiocitos primarios murinos
Figura 29	Viabilidad de cardiomiocitos murinos primarios tratados con doxorubicina
Figura 30	Liberación de troponina T cardíaca por los cardiomiocitos primarios murinos tras el tratamiento con 1 μ M de doxorubicina durante diferentes tiempos
Figura 31	Pulsaciones/minuto de los cardiomiocitos primarios <i>in vitro</i>
Figura 32	Imagen representativa de MSC procedentes de médula ósea en cultivo
Figura 33	Caracterización de MSC de médula ósea
Figura 34	Diferenciaciones <i>in vitro</i> de MSC
Figura 35	Caracterización de VE-MSC
Figura 36	Incorporación de las VE-MSC en cardiomiocitos primarios murinos
Figura 37	Imágenes representativas de la incorporación de las VE-MSC en cardiomiocitos primarios murinos
Figura 38	Efectos de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos murinos sobre la viabilidad inducida por doxorubicina mediante citometría de flujo
Figura 39	Efectos de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos murinos sobre la muerte celular inducida por doxorubicina
Figura 40	Efectos de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos murinos sobre la viabilidad inducida por doxorubicina mediante MTT
Figura 41	Efectos de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos murinos sobre la viabilidad inducida por doxorubicina mediante actividad ATP
Figura 42	Efectos de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos murinos sobre la muerte celular inducida por doxorubicina mediante estudio de la activación de caspasas
Figura 43	Efectos de la incorporación de las VE-MSC en la liberación de TnT cardíaca al medio inducida por la doxorubicina
Figura 44	Efectos de la doxorubicina y de las VE-MSC sobre las pulsaciones de los cardiomiocitos primarios murinos

- Figura 45** Efectos de la doxorubicina y de las VE-MSC sobre el estrés oxidativo de los cardiomiocitos murinos
- Figura 46** Efectos de la doxorubicina y de las VE-MSC sobre el daño en el DNA en los cardiomiocitos murinos
- Figura 47** Efectos de la doxorubicina y de las VE-MSC sobre la respuesta al estrés de los cardiomiocitos murinos

Lista de tablas

Tabla 1	Panel de citometría utilizado para caracterizar los cardiomiocitos primarios murinos
Tabla 2	Panel de citometría utilizado para evaluar la viabilidad de los cardiomiocitos
Tabla 3	Panel de citometría utilizado para caracterizar las MSC
Tabla 4	Panel de citometría para evaluar el tiempo óptimo de incorporación de las VE en los cardiomiocitos murinos en las diferentes condiciones de estudio
Tabla 5	Reactivos del <i>kit High Capacity Reverse Transcription</i>
Tabla 6	Reactivos necesarios para llevar a cabo la RT-PCR

Abstract

Background

The use of anthracyclines increases the survival of some cancer patients, but at the same time it may also promote type I cardiotoxicity in some of them (1). Doxorubicin (dox) is one of the most used anthracyclines to treat a wide range of cancer types (2). Its mechanisms of action in the myocardium include the generation of oxygen reactive species (ROS), the alteration in mitochondrial function, the deregulation of calcium homeostasis and energy generation and the inhibition of topoisomerase II. In addition, its binding to DNA causes the alteration of gene expression and the synthesis of RNA and proteins, which ultimately cause apoptosis, loss of functional cardiomyocytes and irreversible myocardial damage.

Currently, treatments to prevent or revert the damage caused by dox are not effective. So, as an alternative, cell therapy with stem cells is one of the areas of greatest scientific interest for its potential use in diseases, especially in those without effective treatment to date (3, 4). MSC exert their regenerative, anti-inflammatory and immunomodulatory effects not only through direct cell-to-cell contact, but also secreting exosomes and microvesicles named as extracellular vesicles (EV), which have a size ranging from 30 nm to 1 μ m, that are capable of transferring biological molecules to neighbouring and distant cells and exert regulatory effects on them (5-8). Therefore, EV could have a potential therapeutic use in cell therapy programs.

Hypothesis and objectives

With this background, we wanted to develop an in vitro model of doxorubicin-induced acute myocardial damage (as the most paradigmatic cardiotoxic agent) establishing accurate biological variables that let us evaluate the therapeutic or preventive potential in a reliable way that, on this damage, extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells (MSC-EV) from the bone marrow of healthy donors may exert, after their eventual incorporation, and that allow us to analyse which key mechanisms of this potential beneficial effect could be.

To analyse the therapeutic effect of bone marrow MSC-EV from healthy donors on cardiomyocytes in an in vitro model of doxorubicin-induced cardiotoxicity. More specifically we wanted to develop and establish an in vitro model of doxorubicin-induced cardiotoxicity and to evaluate if human bone marrow MSC-EV from healthy donors are able to incorporate into murine cardiomyocytes and to analyze the incorporation rate. Finally, we assessed the effects of EV incorporation into cardiomyocytes damaged by doxorubicin (comparing with control cardiomyocytes) and the mechanisms by which these effects could be induced.

Methodology

To identify and characterize murine cardiomyocytes (CM) from 1-3-day old C57/BL6 neonatal mice, hearts were removed and the ventricles digested with collagenase II to isolate and culture

the cardiomyocytes. First, we tested the cardiomyocyte purity within the ventricle's cell population at 24 hours in culture by flow cytometry (FC) with the specific antibodies for cardiomyocytes: anti- α -actinin, anti-troponin T and anti-CD309 (VEGFR-2), and with 7-AAD to evaluate their viability. We also identified murine primary cardiomyocytes by immunofluorescence (IF) labeling them with α -actinin.

In order to establish the in vitro model of doxorubicin-induced damage, we performed studies of time-dependent response with 1 μ M of doxorubicin in which we evaluated cell viability in order to test the differential response to different times (1, 3, 6, 12 and 24 hours) and thus be able to select the time in which the viability decreases to perform the subsequent co-culture experiments with extracellular vesicles. The release of cardiac troponin T (cTnT), as a biomarker of acute cardiac damage (9), into the culture medium by cardiomyocytes treated with 1 μ M of doxorubicin was evaluated after 1, 3, 6, 12- and 24-hours post-treatment. We also evaluated the pulsations of primary cardiomyocytes after 24 hours of treatment.

For the characterization and incorporation of MSC-EV into murine primary cardiomyocytes, MSC from 20 healthy donors were isolated from bone marrow and expanded until culture passage 6. MSC were characterised analysing by FC different antibodies: CD73, CD90, CD105, CD44, CD166, CD14, CD19, CD34, CD45 and HLA-DR. Their in vitro differentiation capability to adipocytes and osteoblasts was also evaluated in passage 3.

We purified the EV-MSC from healthy donors released into the culture medium by ultracentrifugation and identified and characterized them by transmission electron microscopy (TEM) and nanoparticle-tracking analysis (NTA).

To study if human MSC-derived EV were able to incorporate into murine cardiomyocytes, we added fluorescence dye-labelled MSC-EV to primary cardiomyocytes during different times (1, 3, 6 and 24 hours) to study the optimal incorporation time by FC and we confirmed the incorporation of MSC-EV by IF after 24 hours.

Co-culture of MSC-EV with cardiomyocytes treated with doxorubicin was conducted to assess whether MSC-EV were able to attenuate doxorubicin-induced cardiac damage. We analysed the effect of MSC-EV incorporation into cardiomyocytes damaged with 1 μ M doxorubicin through the viability by MTT, luminescence (ATP production) and FC (Annexin V – 7-AAD) and cell death by luminescence (activity of caspases-3/7) and FC (Annexin V – 7-AAD). We also evaluated cTnT release by luminescence, the rate of beating, ROS production and DNA damage through FC and cellular response to stress through p21 expression by RT-PCR.

Results

We detected the presence of cardiomyocytes in the cell population with a mean of viability of $94,3\% \pm 4,4$ at 24 hours.

The viability of cardiomyocytes treated with 1 μ M of doxorubicin decreased in a time-dependent manner, with the greatest reduction occurring at 24 hours compared to untreated control cardiomyocytes ($76,4\% \pm 8,6$ viability versus 100%, respectively). Regarding the cTnT release, there were only statistical differences 24 hours post-treatment. At 24 hours after treatment with doxorubicin, a significant reduction in mean beats/min was observed versus baseline cardiomyocytes ($42 \pm 8,7$ vs $85 \pm 13,8$).

MSC characterization showed that: MSC adhered to a plastic surface with a characteristic fibroblast morphology; MSC expressed CD73, CD90, CD105, CD44 and CD166 and were negative for CD14, CD19, CD34, CD45 and HLA-DR; and MSC differentiated to the osteoblastic line, observing a polygonal morphology and positivity after the cytochemical labelling of alkaline phosphatase and they also differentiated to the adipogenic line, forming the lipid vacuoles stained through Oil-Red-O dye, according to the defining criteria of the International Society of Cell Therapy (ISCT) (10).

TEM confirmed that MSC-EV had a rounded morphology and a characteristic size (an average size of 215 nm) and a concentration of $1,05 \cdot 10^6$ particles/mL was observed by NTA, which values are established by the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) (11).

FC analysis revealed that EV were incorporated from the first hour of incubation (0.61%), and the highest rate of incorporation was observed after 24 hours (moment in which $21,5\% \pm 8,3$ of the cardiomyocytes had incorporated EV). The incorporation of MSC-EV from healthy donors into cardiomyocytes after 24 hours by confocal microscopy was also confirmed by IF.

In the studies of viability and death of murine primary cardiomyocytes by FC, doxorubicin treatment for 24 hours and also at 48 hours decreased the viability of murine cardiomyocytes in a statistically significant way. The presence of EV did not reverse this deleterious effect on doxorubicin-induced viability. From the point of view of apoptosis, doxorubicin for 24 hours does not significantly increase apoptosis, neither early nor late, while it does induce a significant increase in necrosis. The incorporation of EV into basal cardiomyocytes (without cardiotoxic treatment) or into treated cardiomyocytes did not cause significant changes in apoptosis or necrosis. With regard to the data at 48 hours after doxorubicin, the most relevant data is that the incorporation of EV into cardiomyocytes damaged with doxorubicin does significantly decrease cell necrosis, without relevant changes in the other parameters (similar to changes at 24 hours).

In the study of cell viability using MTT, it is also observed that the incorporation of EV into cardiomyocytes damaged with doxorubicin did not reverse the reduction in cell viability induced by the drug. The same was shown by quantifying the intracellular amount of ATP present in cardiomyocytes at 24 hours and at 48 hours.

After 24 hours of treatment with doxorubicin, a significant activation of caspases 3/7 was detected versus basal cardiomyocytes and the incorporation of EV from MSC into cardiomyocytes treated with doxorubicin did not reverse this effect.

Both 24 hours and 48 hours after treatment with 1 μ M of doxorubicin, there was a significant increase in the release of cardiac TnT to the culture medium. The addition of MSC-EV simultaneously with the drug significantly reduced this release of cardiac TnT at both times, even reaching values similar to those of undamaged cells.

In basal cardiomyocytes, the mean value of the beating rate in vitro was $85,5 \pm 13,8$ beats per minute, observing a significant reduction in cells treated with doxorubicin for 24 hours. MSC-EV incorporation into damaged cardiomyocytes reversed this effect significantly.

The damage induced in cardiomyocytes by doxorubicin induced a significant increase in ROS levels after 24 hours of treatment, and the incorporation of EV into damaged cells reversed this effect, significantly reducing the intracellular levels of ROS.

In basal conditions, cardiomyocytes presented low percentages of double-stranded breaks in DNA. Treatment with doxorubicin caused a significant increase in DNA breaks, which was significantly reversed after the incorporation of MSC-EV together with the drug. Doxorubicin induced a significant increase in total DNA damage and the incorporation of MSC-EV significantly reduced DNA damage at 24 hours.

Finally, we evaluated the gene expression of p21, related to cellular response to stress, and the results showed that treatment with 1 μ M of doxorubicin stimulated p21 expression, and the incorporation of MSC-EV into damaged cardiomyocytes did not induce significant changes.

Conclusions

Regarding the development of an in vitro model of doxorubicin-induced cardiotoxicity:

1. The addition of doxorubicin (1 μ M of doxorubicin for 24 hours) in the culture media containing neonatal murine cardiomyocytes induces acute cardiotoxicity in vitro decreasing viability and contractility and increasing cTnT release to the supernatant. This in vitro model may be employed to analyze drug-induced cardiotoxicity.

Regarding the incorporation of BM-MSC-EV into doxorubicin-damaged cardiomyocytes:

2. BM-MSC-EV are able to incorporate into murine primary cardiomyocytes in a time dependent manner, with higher efficiency after 24 hours of incubation.

Regarding the effects of EV incorporation into cardiomyocytes damaged by doxorubicin and the mechanisms by which these effects could be induced:

3. BM-MSC-EV incorporation do not prevent cell death and are insufficient to compensate for the loss of cardiomyocytes occurring during acute injury at 24 hours, while they do decrease necrosis after 48 hours of doxorubicin treatment.
4. Nevertheless, BM-MSC-EV incorporation contributes to reduce chemotherapy-induced cardiotoxicity by decreasing cTnT release and ROS production, improving cardiomyocytes' contractility and attenuating DNA damage in our in vitro model.

INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo cardíaco y tipos celulares presentes en el corazón

Los vertebrados tienen un corazón latente desde muy temprano en el desarrollo hasta el final de sus vidas. Los cardiomiocitos murinos comienzan a latir de manera autónoma antes de que haya un estímulo externo, entre los días embrionarios E8 y E9 (etapa temprana del desarrollo) (12), momento en el que la masa del mesodermo anterior sufre una transición morfológica debido a la migración de progenitores cardíacos mesenquimales y pasa de tener una estructura semilunar a formar un tubo recto cardíaco (miocardio), revestido por una capa de células endoteliales (endocardio). Las contracciones que se producen al inicio son irregulares y descoordinadas. Pero a medida que el tubo cardíaco se va desarrollando, las duraciones entre sístole y diástole se acortan, incrementa la velocidad de las pulsaciones por minuto, mejora la coordinación de las contracciones y el corazón cambia de una bomba peristáltica a un corazón que late (13).

Aunque el corazón de ratón está bien conformado a los 12,5 días de desarrollo, no es hasta los 16,5 – 17 días cuando alcanza su diferenciación, desarrollo y configuración completa (14). Existen estudios realizados en ratones que muestran que, en los días posteriores al nacimiento, cuando los cardiomiocitos proliferan lo hacen sin citocinesis, aunque sí duplican el DNA y el núcleo se divide. Entre los días 4 y 7 después de nacer se produce un incremento dramático de la binucleación en los cardiomiocitos, llegando al día 20 post-nacimiento a tener el 95% del total de los cardiomiocitos binucleados (15). Esta binucleación podría ser la causante de la pobre capacidad proliferativa de los cardiomiocitos adultos que se manifiesta en los ratones al día 7 después de nacer (16). Hasta hace poco se ha considerado el corazón como un órgano terminalmente diferenciado con capacidad regenerativa limitada debido a la pobre capacidad de los cardiomiocitos para proliferar (la ratio de mitosis en un corazón adulto sano es de aproximadamente un 1% al año en humanos y ratones).

El corazón adulto es un órgano compuesto por el **endocardio** que es la capa endotelial interna que está en contacto con el flujo sanguíneo, el **miocardio** que se encarga de las contracciones cardíacas, el **epicardio** que es la capa celular mesotelial más externa y la pared del **pericardio** que envuelve al corazón y los separa de las estructuras vecinas (Fig. 1). El endocardio está formado por una capa de células endoteliales. El miocardio está compuesto por cardiomiocitos, siendo éstos los tipos celulares mayoritarios, aunque también contiene fibroblastos intracardíacos y células estromales, todos ellos irrigados por la vasculatura coronaria. En 2001, Orlic et al. descubrieron la existencia de células madre cardíacas (CSC) residentes en el tejido miocardio adulto con potencial regenerativo y de diferenciación a cardiomiocitos (17). El epicardio es la última capa que se forma, compuesta por células epicárdicas o mesoteliales, y es esencial en la maduración cardíaca. El pericardio está formado por dos capas entre las cuales hay líquido que actúa como lubricante. Su función es limitar la dilatación del corazón, reducir la tensión

Introducción

endomiocárdica, prevenir la hipertrofia cardíaca, la retrogresión de la sangre desde el ventrículo a la aurícula, y regular la frecuencia cardíaca, así como la presión arterial. En el adulto, los niveles fisiológicos del estrés de la pared inhiben la proliferación de las células endoteliales y promueven su quiescencia.

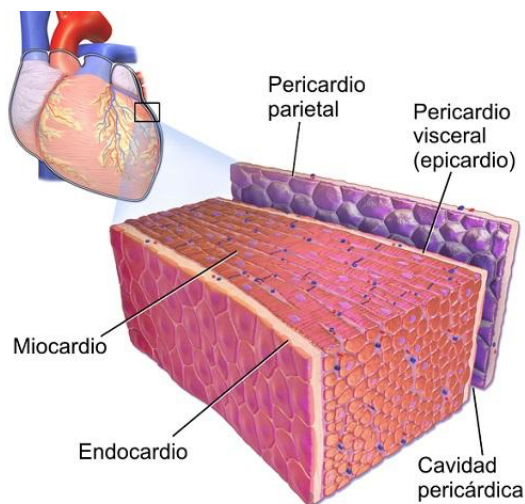


Figura 1. Estructura de la pared cardíaca. Fuente: *BruceBlas. Medical gallery of Blausen Medical 2014. Wikimedia Commons*

2. Función cardíaca

A nivel celular se producen gradientes de calcio en el nódulo sinoauricular que despolarizan la membrana e inician la transmisión del potencial de acción. Los potenciales de acción se extienden a lo largo de la membrana (sarcolema) de las células musculares cardíacas en forma de impulsos y van pasando de una célula a otra a través de las uniones gap. El aumento de calcio en la célula a través de los canales tipo L conduce a la activación del receptor Rianodina tipo 2 (RyR2) localizado en la membrana del retículo sarcoplásmico (RS), causando una mayor liberación de calcio por parte del RS hacia el citoplasma celular. El aumento de calcio dentro de la célula permite la activación indirecta de las fibras de actina y miosina. El calcio se une a la troponina, la cual cambia de conformación y se une a la miosina. La cabeza de la miosina se mueve en un proceso dependiente de ATP, de manera que la actina se desliza a través del filamento de miosina originando el acortamiento del músculo (contracción muscular). La relajación ocurre cuando la troponina vuelve al estado original, el calcio se desliga de ésta y la concentración intracelular de calcio disminuye, a través de la apertura de las bombas ATPasa de calcio del RS (SERCA) presentes en la membrana del RS, donde queda el calcio guardado para liberarlo con la llegada

del siguiente potencial de acción. Ambos mecanismos de contracción y relajación cardíaca se esquematizan en la siguiente figura (Fig. 2).

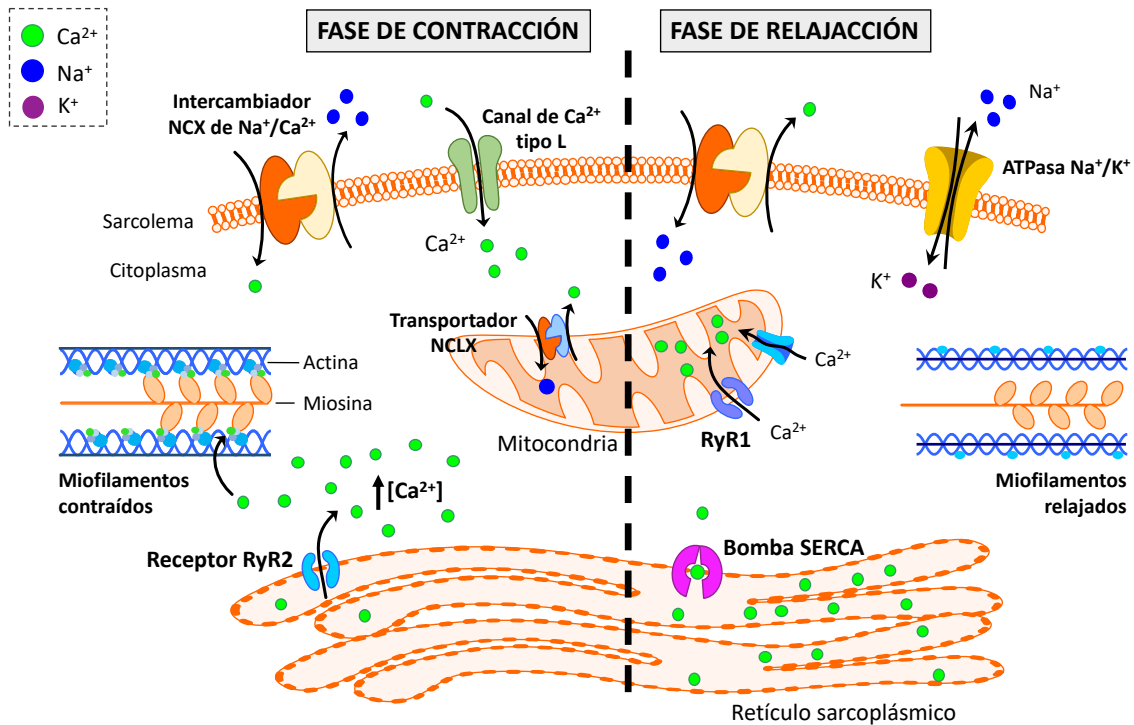


Figura 2. Representación de los mecanismos celulares de la contracción y la relajación cardíaca que ocurren en cada potencial de acción.

Un latido cardíaco es una acción de bombeo en dos fases: la sístole o fase de contracción y la diástole o fase de relajación. En la fase de diástole, cuando el corazón se relaja después de una contracción, permite que la sangre entre. En la diástole auricular, las aurículas se llenan de la sangre procedente de todas las células del cuerpo a través de la vena cava (aurícula derecha) y de la sangre recién oxigenada a través de las venas pulmonares (aurícula izquierda), y en la diástole ventricular los ventrículos se llenan de sangre proveniente de la aurícula de su mismo lado. Durante la sístole, cuando el corazón se contrae, expulsa (o eyecta) la sangre de los ventrículos hacia las arterias pulmonares en el caso del ventrículo derecho, y la aorta en el caso del ventrículo izquierdo (VI). Después de la contracción, el tejido cardíaco se relaja y se produce de nuevo la diástole auricular y ventricular. Sin embargo, por más fuerte que sea la contracción, el corazón nunca eyecta toda la sangre de los ventrículos.

Como el ventrículo izquierdo es la principal cavidad de bombeo del corazón, típicamente se mide la fracción de eyección (FE) de este ventrículo, y es la denominada fracción de eyección

Introducción

ventricular izquierda o FEVI como un signo temprano de disfunción cardíaca. Así pues, la FEVI indica cómo de fuerte se contrae el ventrículo izquierdo con cada latido. Los valores normales en un corazón sano el ventrículo izquierdo expulsa entre 55 y 70% de su capacidad total de sangre, existiendo una relación directa entre los valores de la FEVI y la supervivencia. Se considera que la extensión del infarto empieza a ser importante cuando la FE no supera el 50%, y por debajo del 20% se empieza a considerar el trasplante cardíaco.

3. Cáncer y cardiotoxicidad

Hoy en día se producen casi 18 millones de muertes al año por enfermedades cardiovasculares, casi el doble a las muertes debidas al cáncer (casi 10 millones). Esto se debe, en parte, a que el uso de la quimioterapia, en concreto las antraciclinas, ha mejorado el pronóstico de los pacientes oncológicos provocando potenciales toxicidades cardiovasculares (arritmias, disfunción ventricular o insuficiencia cardíaca (IC) que pueden provocar a largo plazo infarto de miocardio. De hecho, los supervivientes de cáncer tratados con antraciclinas tienen, a largo plazo, una probabilidad de muerte 8 veces mayor que la población general.

Además de la cardiotoxicidad derivada de las antraciclinas, existen otros quimioterápicos convencionales, como los taxanos (docetaxel), los antimetabolitos (5-fluorouracilo) y los alquilantes (ciclofosfamida), así como tratamientos dirigidos a HER2 (trastuzumab) e inhibidores de la angiogénesis (bevacizumab, sorafenib o sunitinib) que también pueden causar toxicidad cardiovascular.

Según el Comité de Revisión y Evaluación Cardíaca, la cardiotoxicidad se define como cualquier enfermedad cardiovascular derivada del uso de medicamentos onco-hematológicos, que presentan alguno de los siguientes síntomas: miocardiopatía con disminución de la función sistólica ventricular izquierda, síntomas de fallo cardíaco, signos asociados al fallo cardíaco como taquicardia, y/o disminución de al menos 5% de la FEVI con valores menores al 55% acompañado de síntomas o signos de fallo cardíaco congestivo o disminución de al menos 10% en la FEVI con valores menores al 55% sin presencia de signos o síntomas de fallo cardíaco congestivo.

4. Cardiotoxicidad asociada al tratamiento con antraciclinas

Las antraciclinas son una clase de agentes quimioterápicos efectivos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer desde su descubrimiento en los años 60. Son eficaces para diferentes tumores sólidos, leucemias y cánceres metastáticos.

En el caso de los pacientes con cáncer tratados con antraciclinas, el daño celular producido por estos fármacos provoca disfunción ventricular y en algunos casos, evolucionar a insuficiencia

cardíaca (IC). Durante el proceso de infarto de miocardio, los cambios patológicos más dramáticos a nivel celular que se van desarrollando progresivamente debido al tratamiento con antraciclinas son: decrecimiento del número de fibrillas miocárdicas, cambios mitocondriales, alteraciones en la regulación del Ca^{2+} y estrechamiento de la membrana. Al mismo tiempo se produce degeneración nuclear, desorganización del retículo endoplásmico y depleción de los gránulos de glicógeno. Además, se dan mecanismos de compensación que provocan cambios estructurales y constitutivos en la zona infartada denominados procesos de remodelación, en los que la pared del VI adelgaza debido a la proteólisis de la matriz extracelular (MEC). Esta disminución de MEC causa dilatación en la cámara ventricular y disfunción contráctil, y a la par, la pérdida del balance de la MEC provoca un incremento en la producción de MEC, que forma una cicatriz de colágeno en la zona del infarto y fibrosis intersticial en la zona no infartada. Esta fibrosis intersticial provoca rigidez tisular y una menor capacidad de contracción y de supervivencia de los cardiomiocitos, que aumenta el riesgo de arritmias. Finalmente, cuando la neoangiogénesis ya no es suficiente para suplir la demanda de la pared hipertrófica, se da la pérdida de tejido funcional (cardiomiocitos, fibroblastos y células endoteliales) y se forma más tejido fibroso que resulta en el desarrollo de la IC.

4.1. Tipos de cardiotoxicidad

4.1.1. Según el tiempo de inicio

A partir de estudios retrospectivos realizados en supervivientes pediátricos de cáncer, la cardiotoxicidad se puede clasificar en tres categorías según el tiempo de inicio. Aunque es la más utilizada no existe un consenso para esta clasificación (18, 19). La **cardiotoxicidad aguda** se desarrolla después de un solo ciclo de quimioterapia y las manifestaciones clínicas se identifican durante las dos primeras semanas tras el tratamiento. A menudo se presenta como un desorden de conducción intracardíaco y arritmias, y en unos pocos casos como pericarditis e insuficiencia cardíaca izquierda aguda. La toxicidad aguda se da en una baja incidencia, sobre todo ocurre tras el uso de elevadas dosis. La **cardiotoxicidad crónica de temprano inicio** se desarrolla tras un año de cesar la quimioterapia y normalmente se manifiesta como una cardiomiopatía dilatada y disfunción del ventrículo izquierdo, que da lugar a un fallo cardíaco. Finalmente, la **cardiotoxicidad crónica de inicio tardío** aparece años, incluso décadas después de finalizar la quimioterapia con antraciclinas, y se expresa como fallo cardíaco, cardiomiopatía o arritmias. A veces la disminución de la FEVI se detecta una vez producido el fallo cardíaco. No obstante, en ambos casos de cardiotoxicidad crónica el fallo cardíaco puede ocurrir tras disminuciones asintomáticas de la FEVI debido a un lento y progresivo deterioro de ésta durante meses o años que continúa una vez completado el tratamiento.

Introducción

Mientras que la cardiotoxicidad aguda se manifiesta en los pacientes con hipotensión reversible, pericarditis y anomalías transitorias del ecocardiograma (ECG) como cambios no específicos en las ondas ST y T, prolongaciones del intervalo QT y vasodilatación, la cardiotoxicidad crónica resulta en cardiomiopatías irreversibles que progresan hacia fallo cardíaco congestivo (20).

4.1.2. Según las manifestaciones clínicas

En los supervivientes de cáncer adultos no existen estudios prospectivos que evalúen el seguimiento de la función cardíaca durante más de 3 años y no está bien definido el momento en el que se manifiesta la cardiotoxicidad. En estos pacientes no existen pautas que especifiquen la frecuencia o la duración de la monitorización de la función cardíaca después de la administración de las antraciclinas, sino que las recomendaciones se limitan a los pacientes sintomáticos. Por lo tanto, en estos pacientes la cardiotoxicidad se clasifica en tres tipos según el estado evolutivo de los daños cardíacos y las manifestaciones clínicas (daño miocárdico celular preclínico, reducción de la FEVI o síntomas de fallo cardíaco) (21). En los pacientes adultos, hablamos de **cardiotoxicidad aguda** cuando se detecta daño celular miocárdico preclínico usando biomarcadores específicos, como la troponina, durante el transcurso de la quimioterapia o de manera temprana tras finalizar el tratamiento con antraciclinas. En la **cardiotoxicidad temprana** se detectan reducciones de la FEVI meses después de finalizar el tratamiento. Por último, en la **cardiotoxicidad tardía** las manifestaciones clínicas y los síntomas de fallo cardíaco pueden llevar varios años (21).

5. Doxorubicina

5.1. Concepto e historia

La doxorubicina, también denominada 14-hydroxydaunorubicina o adriamicina, es un antibiótico procedente de la fermentación aeróbica del *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, obtenido del *S. peucetius*. Estructuralmente, es un análogo de un compuesto clínico, la daunorubicina, difiriendo de ésta solo en una hidroxilación en el C¹⁴ (Fig. 3) lo que le confiere las mismas propiedades biológicas y clínicas.

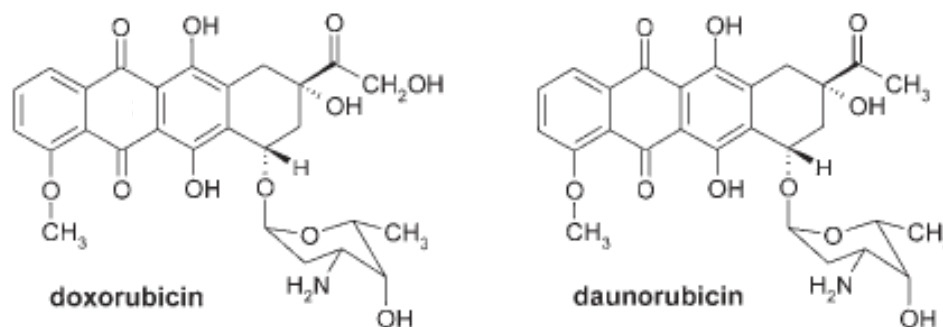


Figura 3. Estructura química de doxorubicina y daunorubicina. Fuente: *Simůnek T et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. Pharmacol Rep. 2009;61(1):154-71*

La doxorubicina se aisló en 1967 originalmente por la *Farmitalia Research Laboratories* en Milán, Italia, donde se iniciaron sus estudios clínicos en 1969, bajo la dirección del Dr. Gianni Bonadonna del *Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori*. Rápidamente se descubrió su actividad antitumoral, siendo mayor que la de la daunorubicina en leucemias y melanomas murinos, por lo que a mediados de los 70s se empezaron los ensayos clínicos en Estados Unidos. Durante los tres años consecutivos, se estudió el efecto de la doxorubicina como tratamiento único o en combinación con otros fármacos en pacientes con sarcomas, carcinomas y cáncer de mama metastásicos, consiguiendo la remisión completa o parcial en muchos de los casos.

5.2. Uso clínico

La doxorubicina se utiliza en una gran variedad de tumores, ya sean sólidos (sarcoma de Kaposi, melanoma, neuroblastoma, nefroblastoma, adenocarcinoma de mama, tumores testiculares, carcinoma de vejiga, de estómago, de tiroides, de la cavidad oral, nasofaríngeo, de pulmón, gastrointestinal, de próstata y carcinoma broncogénico, de ovario y de endometrio) o hematológicos (leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide, mieloma múltiple, linfomas y linfoma de Hodgkin) tanto en adultos como en niños (2, 22).

5.3. Posología y farmacocinética

La doxorubicina se administra por inyección intravenosa. Tiene una vida media de 20-48 horas en circulación, por lo que su actividad anti-tumoral puede persistir durante periodos largos de tiempo. Los estudios farmacocinéticos en humanos muestran una amplia distribución tanto en plasma como en los tejidos. Es rápidamente eliminada del plasma de los roedores y se ha observado en el hígado, bazo, riñón, pulmones y corazón. Se metaboliza predominantemente en

Introducción

el hígado, y su eliminación se da preferentemente a través del hígado y riñones a través de transportadores transmembrana de la familia *ATP-binding cassette* (ABC) y de transportadores de solutos (SLC). Aproximadamente la mitad del fármaco sin procesar se excreta en la bilis y un 30% adicional se secreta como conjugados. Su eliminación a través de la orina es prolongada: tan solo un 5% del fármaco es eliminado en los primeros 5 días, sugiriendo una unión prolongada en los tejidos.

5.4. Cardiotoxicidad asociada al tratamiento con doxorubicina

A pesar de su amplio uso en clínica, la terapia con doxorubicina está limitada a la dosis, ya que causa cardiotoxicidad tipo I, característica de las antraciclinas. La cardiotoxicidad tipo I se caracteriza por ser dosis dependiente, acumulativa e irreversible, y causa la muerte (tanto necrosis como apoptosis) de los cardiomiocitos, mientras que la cardiotoxicidad tipo II es dosis independiente, no acumulativa y reversible, y sus síntomas están asociados con disfunción celular, sin llegar a ocasionar la pérdida de cardiomiocitos (23). Este último tipo se da de manera frecuente tras el tratamiento con anticuerpos monoclonales como trastuzumab (24).

Además, la cardiotoxicidad tipo I puede clasificarse como aguda o crónica según el tiempo de tratamiento y el efecto del antineoplásico sobre los cardiomiocitos. La cardiotoxicidad aguda es dosis independiente y transitoria. Se manifiesta durante el tratamiento y desaparece al interrumpirlo. Causa hipotensión, pericarditis y anomalías electrocardiográficas transitorias. En cambio, la cardiotoxicidad crónica se caracteriza por ser dosis dependiente, acumulativa e irreversible y causa cardiomiopatía degenerativa que progresa de manera continua hacia insuficiencia cardíaca congestiva.

5.4.1. Efecto tiempo-dependiente

La toxicidad cardíaca se da entre el 4 y el 36% de los pacientes. Empieza, frecuentemente durante los primeros días tras el tratamiento, con un daño celular miocárdico, seguido de una disminución progresiva de la FEVI. Puede implicar anomalías o cambios transitorios del ECG (taquiarritmias supraventriculares, extrasístoles ventriculares y cambios de onda ST-T) y cardiomiopatías que, de no ser tratadas, causan finalmente infarto de miocardio. Cuando aparecen estas anomalías, en algunas ocasiones se detiene el tratamiento hasta que el ECG sea normal. La función del ventrículo izquierdo mejora en algunos pacientes, ya que se ha demostrado que el tiempo es un factor clave para conseguir una completa recuperación de la disfunción cardíaca en pacientes con cardiomiopatías asociadas a las antraciclinas.

La mayor incidencia de los cambios del ECG asociados al tratamiento con doxorubicina se dan durante el primer año después de completar el tratamiento, entre un 6 y 30% de los pacientes tratados (18), y más del 65% de los pacientes que han sido tratados con doxorubicina en su infancia pueden manifestar anomalías contráctiles del ventrículo izquierdo en algún momento de su vida. Con el fin de detectarla pronto y tratar la cardiotoxicidad cuanto antes, se pueden realizar controles ecocardiográficos cada cierto tiempo. De hecho, se ha demostrado que el seguimiento de la función cardíaca durante el primer año post-tratamiento es fundamental ya que, si se trata la cardiotoxicidad asociada a las antraciclinas de manera temprana es posible mejorar la FEVI en muchos de los casos (18), evitando así el consecuente fallo cardíaco. Sin embargo, no se ha establecido la asociación entre la medida de FEVI al final de la quimioterapia y el desarrollo de cardiotoxicidad o cardiomiopatías en pacientes adultos.

5.4.2. Efecto dosis-dependiente

La relación entre los niveles de la doxorubicina y el riesgo de cardiotoxicidad está bien definida. La prevalencia de fallo cardíaco incrementa a medida que aumenta la dosis acumulativa de doxorubicina. La administración de la doxorubicina mediante intervalos de tiempo más cortos y dosis más pequeñas limita el pico de concentración en sangre que se da con la infusión de una única dosis y reduce los efectos cardíacos adversos (25).

Las dosis de administración varían según el cáncer a tratar, el estadio en el que se encuentra, la ubicación del tumor, así como el peso, la edad y el cuadro clínico del paciente. El *National Cancer Institute* no recomienda una concentración total que exceda los 550 mg/m² del área de superficie corporal. Según Von Hoff et al, a partir de dosis más elevadas de 550 mg/m², la probabilidad de desarrollar fallo cardíaco congestivo aumenta de manera pronunciada. Además, se ha visto que, si se abandona la terapia tras utilizar la dosis de 550 mg/m² la incidencia de fallo cardíaco congestivo se reduce. No obstante, existen controversias en cuanto a la cardiotoxicidad producida por las diferentes dosis totales de doxorubicina. Se ha descrito que dosis acumulativas de 300 mg/m² también pueden causar riesgo de cardiotoxicidad en adultos (26) y en niños (1). En adolescentes, dosis menores a 250 mg/m² se asocian a un riesgo de más del doble de sufrir fallo cardíaco congestivo, y dosis igual o mayores a 250 mg/m² se asocian a un riesgo de 5 veces más probabilidad de desarrollar problemas cardíacos (27). La incidencia de fallo cardíaco congestivo incrementa de manera dosis dependiente con dosis acumulativas de doxorubicina: el fallo cardíaco congestivo en pacientes con cáncer de mama y pulmón se manifiesta en un 5% de los pacientes con 400 mg/m² de dosis acumulativa, en un 16% con dosis acumulativa de 500 mg/m², en un 26% con 550 mg/m² y en un 48% con una dosis mayor a 700 mg/m². Incluso se ha visto que dosis de 240 mg/m² pueden provocar cambios endomiocárdicos a nivel histopatológico (28).

5.4.3. Otros factores de riesgo

Los pacientes mayores de 65 años y los niños tienen una mayor probabilidad de desarrollar cardiotoxicidad asociada al tratamiento con doxorubicina. La toxicidad provocada por la doxorubicina también aumenta cuando se administra junto con otros fármacos como trastuzumab (29). Además, son más susceptibles de desarrollar cardiomiopatías aquellos pacientes que han recibido radioterapia o ciclofosfamida previamente al tratamiento con doxorubicina, así como pacientes con hipertensión, enfermedades cardíacas o con factores de riesgo cardiovascular siendo estos pacientes los mayores beneficiarios del uso temprano de cardioprotectores. Esto hace que el uso de la doxorubicina sea de gran consideración a la hora de decidir las dosis o cambiarlas. Otros factores como la raza, el sexo y el tipo del tumor no son considerados como factores de riesgo.

5.5. Mecanismos moleculares de la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina

La doxorubicina actúa sobre diversas vías de señalización intracelular interconectadas entre sí. No obstante, se desconocen cuáles son los mecanismos más relevantes responsables de inducir la disfunción cardíaca. El mecanismo clásico por el que se ha descrito que la doxorubicina provoca daño en el miocardio es la generación de especies reactivas al oxígeno (ROS). Pero este no es el único mecanismo por el que la doxorubicina ejerce su efecto antineoplásico a nivel celular, ya que se han propuesto también otros importantes mecanismos moleculares como son el daño en el DNA, la alteración en la función mitocondrial y en la generación de energía, la desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} y la inhibición de la topoisomerasa II (TopII) (Fig. 4). Además, su unión al DNA por intercalación con los pares de bases crea cambios estructurales e impedimento estérico que tiene como consecuencia la alteración de la expresión de genes específicos y de la síntesis de RNA y proteínas que provocan finalmente la apoptosis, la pérdida de cardiomiocitos funcionales y daño miocárdico irreversible.

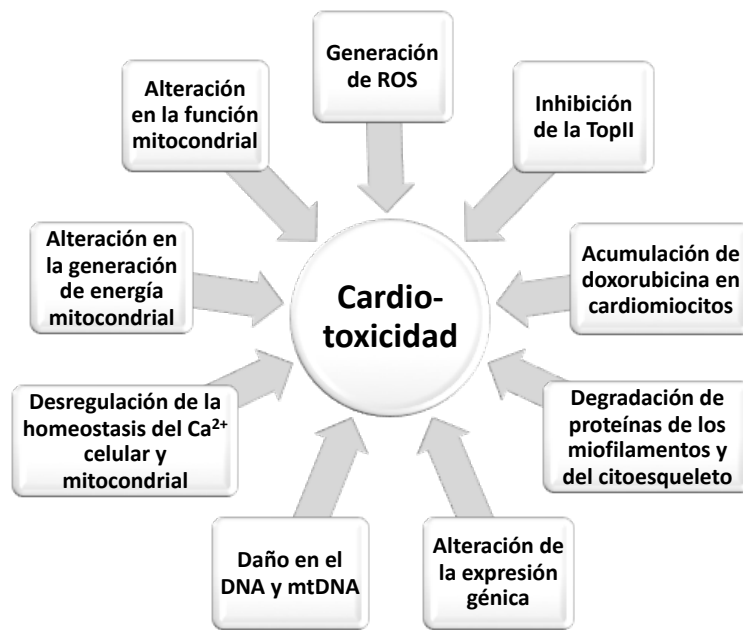


Figura 4. Esquema de los mecanismos a través de los cuales la doxorubicina induce cardiotoxicidad

Hay diversos mecanismos identificados por los que la doxorubicina induce cardiotoxicidad, aunque la contribución de cada uno de ellos por separado no se conoce completamente. Para ello, se han desarrollado modelos farmacológicos basados en sistemas, modelos matemáticos, análisis bioquímicos y análisis de vías en modelos murinos para identificar cuáles de estas vías causan cardiotoxicidad aguda y crónica inducida por el fármaco. Estos estudios propusieron que la inhibición de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria desempeña una función importante en la mediación de la cardiotoxicidad aguda (30), y demostraron que el daño directo en el DNA mitocondrial (mtDNA) provocado por dosis terapéuticas de doxorubicina es responsable de la cardiotoxicidad crónica y conduce a la disfunción mitocondrial irreversible.

5.5.1. Generación de ROS

La generación de especies reactivas al oxígeno (ROS) es uno de los principales mecanismos de cardiotoxicidad que provoca la doxorubicina, y está asociado a cardiotoxicidad tipo I. La mitocondria es el mayor orgánulo intracelular dañado bajo la exposición a doxorubicina, ya que ésta se acumula en la membrana mitocondrial interna debido a su elevada afinidad de unión a la cardiolipina. La cardiolipina es un fosfolípido presente en la membrana interna encargado de mantener la estructura, la función, el metabolismo energético cardíaco y la supervivencia celular. La fuerte unión entre la cardiolipina y la doxorubicina provoca una disminución de la actividad

Introducción

de los complejos I, III y IV de la cadena de transporte de electrones, ya que estos complejos requieren de la cardiolipina para mantener la máxima actividad (31).

Además, debido a su estructura química, la doxorubicina es fácilmente reducida por el complejo I de la cadena de transporte de electrones a un radical semiquinona, el cual puede ser re-oxidado por transferencia de un electrón al oxígeno molecular, permitiendo la formación de aniones superóxido (O_2^-). Esta transferencia de electrones a través de la doxorubicina puede causar la unión aún más fuerte a la cardiolipina. La acumulación de doxorubicina en la mitocondria provoca un aumento de la producción de ROS y de especies reactivas al nitrógeno (RNS) como $-OH$, O_2^- , H_2O_2 , $ONOO^-$, que al interactuar con el miocardio desequilibran el balance entre antioxidantes y sustancias pro-inflamatorias (Fig. 5). Estas especies son las causantes de la peroxidación lipídica y daño oxidativo en el DNA y proteínas, que finalmente provocan daño en el mtDNA, una mayor inhibición de la cadena de transporte de electrones (concretamente de los complejos I y III), pérdida de los niveles de adenosina trifosfato (ATP), peroxidación de la cardiolipina y una mayor permeabilidad de la membrana mitocondrial.

La disminución de ATP causa daño mitocondrial, mayor replicación y amplificación del genoma mitocondrial, así como un aumento de la masa de las mitocondrias (32). La formación de niveles elevados de ROS, el aumento del daño en el DNA y la inhibición de la cadena de transporte de electrones están directamente relacionados, así pues, la mayor producción de ROS inactiva la cadena de transporte de electrones y resulta en una mayor formación de ROS, el cual provoca daño en el mtDNA y éste inhibe la cadena de transporte de electrones, de manera que se agrava la disfunción mitocondrial y causa una mayor formación de ROS. Se han reportado defectos en la cadena respiratoria y acumulación de daños en el mtDNA en la cardiomiopatía crónica inducida por doxorubicina (30).

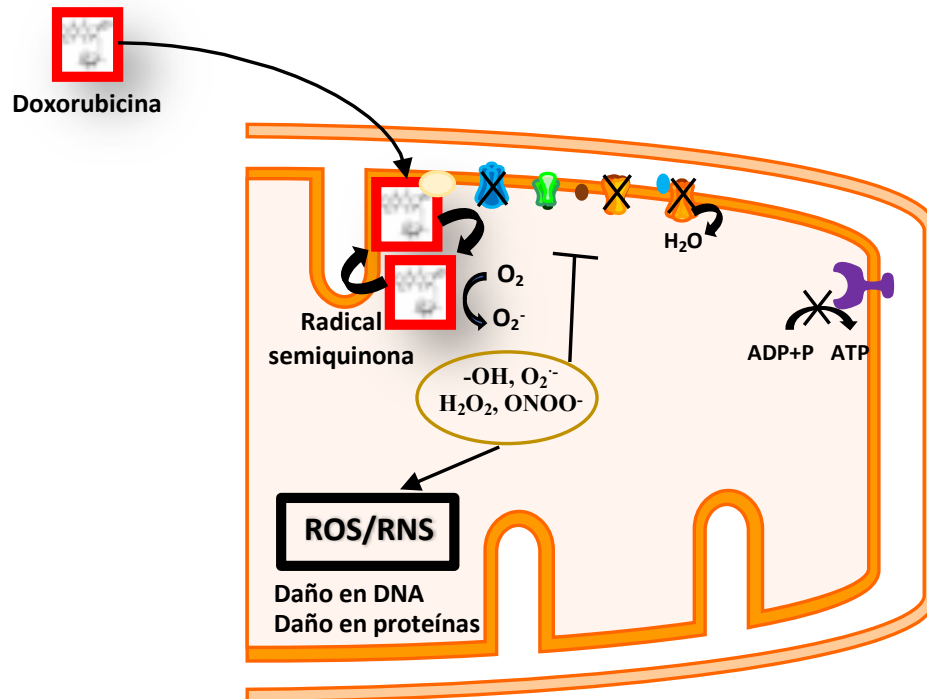


Figura 5. Efectos de la doxorubicina en la mitocondria de los cardiomiocitos.

Existen diversas enzimas capaces de reducir el grupo quinona de la doxorubicina: la sintasa de óxido-nítrico endotelial (eNOS), enzimas mitocondriales y enzimas unidas a la membrana, como las flavoproteínas oxidoreductasas, la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) deshidrogenasa (complejo I de la cadena de transporte de electrones), la citocromo p450 reductasa localizada en la membrana del retículo endoplásmico y la xantina oxidoreductasa (33).

Además, la doxorubicina afecta la actividad de todas las isoformas de las sintasas de óxido nítrico, resultando en una disminución de la producción de óxido nítrico y un incremento en la producción del anión superóxido (34). La suplementación de nitrato a través de la dieta mejoró la contractilidad del ventrículo izquierdo y redujo la muerte celular inducida por la doxorubicina en ratones (35), lo cual demuestra que la regulación del óxido nítrico es un mediador importante en la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina.

Debido a que el 20-40% del volumen celular del tejido cardíaco está ocupado por las mitocondrias, la producción de radicales libres a través del metabolismo oxidativo es elevada en los cardiomiocitos expuestos a la doxorubicina. Esto, sumado a que los cardiomiocitos poseen bajos niveles de una de las principales enzimas antioxidantes mitocondriales, la enzima superóxido dismutasa 2 (SOD2 o MnSOD), provoca que el balance se decante hacia un mayor

Introducción

nivel de estrés oxidativo en las células. Esto convierte al corazón en un tejido altamente susceptible al daño oxidativo producido por la doxorubicina.

5.5.2. Apoptosis

La doxorubicina activa tanto la vía intrínseca como la extrínseca de la apoptosis (Fig. 6). La vía intrínseca dependiente de la mitocondria se activa por regulación positiva de proteínas pro-apoptóticas y juega un papel importante en la cardiotoxicidad inducida por la doxorubicina. La doxorubicina puede reducir la ratio intracelular Bcl-2/Bax y promover la liberación del citocromo c de la mitocondria, la activación de la caspasa 9, seguida de la activación de los efectores de la caspasa 3. También provoca la apoptosis por activación de la vía de p53.

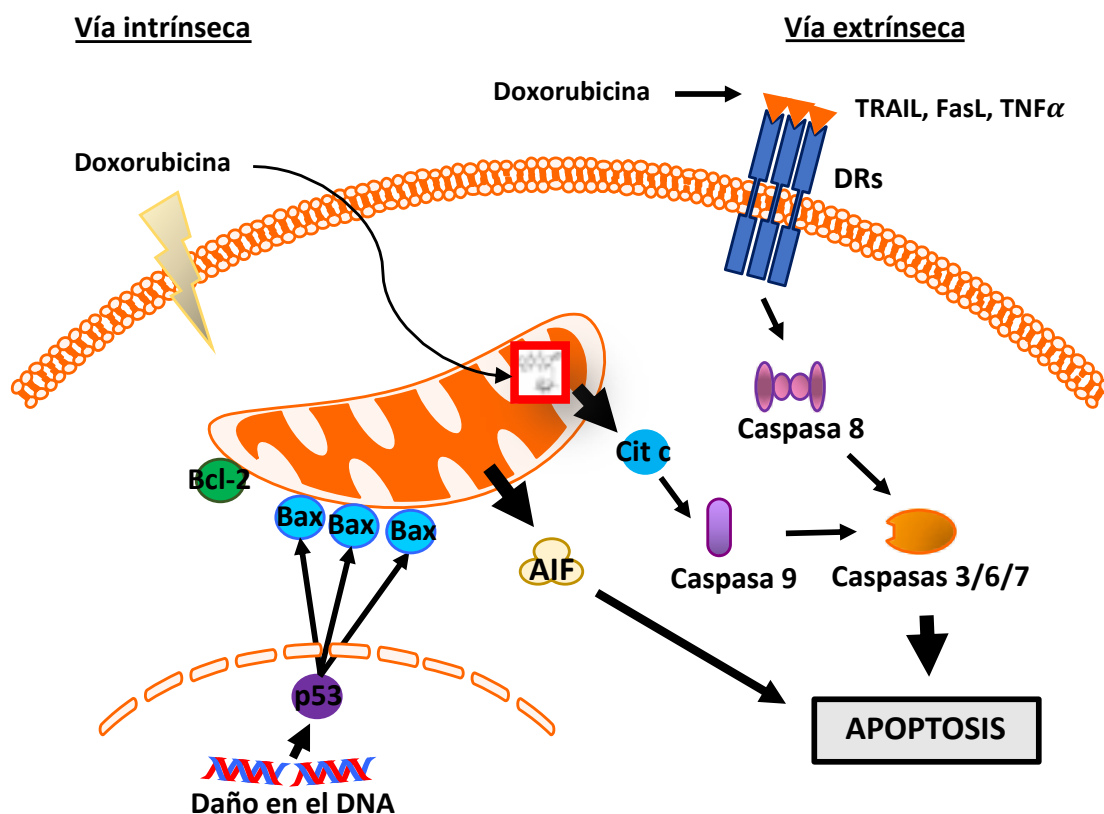


Figura 6. Representación de las vías intrínseca y extrínseca activadas por la doxorubicina en cardiomiocitos.

La doxorubicina unida a la cardiolipina en la membrana mitocondrial puede coger los electrones del complejo I y pasárselos al citocromo c en lugar de al oxígeno, ya que el citocromo c está también unido a la cardiolipina en la membrana. Esto, junto con la interacción entre ROS, el daño en el mtDNA y la inhibición de la cadena de transporte de electrones, conduce a la liberación de

citocromo c y factores apoptóticos mitocondriales, que desencadenan el inicio de la vía de la apoptosis. (30)

A pesar de que la apoptosis esté desencadenada por la activación de las cascadas de caspasas, la inhibición de éstas no provoca la prevención de la muerte celular. Esto se debe a que existe otra vía independiente de las caspasas en la que está involucrada el factor inductor de la apoptosis mitocondrial (AIF). En ésta, la producción de ROS generada por la doxorubicina incrementa la actividad de la catepsina B, responsable de la liberación de AIF de la mitocondria. AIF interacciona con los clústeres de la proteína X asociada a Bcl-2 (proteína del linfoma de células B o Bax) y causa daño en el DNA, una mayor expresión de p53 y la activación de PARP1, resultando en una apoptosis independiente de la vía de las caspasas.

Por otro lado, la vía extrínseca está mediada por receptores de muerte (DRs), tales como el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1), Fas, DR4 y DR5. Zhao et al. describió que la doxorubicina induce la expresión de estos DRs en los cardiomiocitos derivados de células madre humanas pluripotentes inducidas (iPS-CMs) (36). Sus ligandos, $\text{TNF}\alpha$, el ligando de Fas (FasL) y el ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), son producidos por diversos tipos celulares como las células T y las células *natural killer* (NK) y están presentes en la sangre y en el microambiente de los tejidos. Los niveles de FasL también se han visto elevados tras el tratamiento con doxorubicina. La unión de los ligandos con sus receptores induce el ensamblaje del complejo de señalización inductor de muerte (DISC) y desencadena la activación de una cascada de caspasas que lleva a la muerte celular. De esta manera, se han propuesto los niveles séricos del ligando TRAIL como un biomarcador predictivo de elevado riesgo de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina.

En modelos *in vivo* de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina, se ha detectado una mayor apoptosis de los cardiomiocitos respecto a los controles no tratados. Sin embargo, no se ha visto que dosis acumulativas de doxorubicina provoquen mayores efectos en la apoptosis. En un estudio previo, observaron que el porcentaje de células apoptóticas disminuyó hasta niveles basales tras 24-48 horas post-tratamiento con una única dosis (37), lo que sugiere que la apoptosis de los cardiomiocitos inducida por la doxorubicina puede ser un efecto agudo cardiotóxico con posibles efectos deletéreos a largo plazo.

5.5.3. Desregulación del Ca^{2+}

La desregulación del Ca^{2+} es otro de los mecanismos descritos mediante el cual la doxorubicina contribuye al daño de los cardiomiocitos. Existen varios mecanismos por los que la doxorubicina afecta la homeostasis del Ca^{2+} . Por un lado, su metabolito hidroxilo, el doxorubicinol, modula la

Introducción

ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) así como la bomba Na^+/K^+ del sarcolema (38). En un modelo de conejo de cardiomiopatía post-tratamiento con doxorubicina, se observó que una de las principales causas de la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} era debida a una menor expresión de las proteínas del retículo sarcoplásmico (RS) responsables del transporte del Ca^{2+} . Otros estudios revelaron el papel de la proteína kinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) en la desregulación del balance de Ca^{2+} al promover la fuga de Ca^{2+} del RS. (39)

Estudiando el desequilibrio del Ca^{2+} en la inducción de la apoptosis se identificó la implicación de la calcineurina, una fosfatasa dependiente de Ca^{2+} , en la activación de la apoptosis mediada por Fas (40). La generación de ROS mitocondrial, el daño en el mtDNA y el deterioro de la cadena de transporte de electrones en células cardíacas de rata causan un incremento en los niveles del Ca^{2+} citosólico, el cual permite a través de la calcineurina la activación del factor nuclear de los linfocitos T activados (NFAT) y, por último, un aumento de la muerte de estas células cardíacas mediada por Fas.

Se demostró que la sobreexpresión del intercambiador de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ mitocondrial (NCLX), encargado de expulsar el Ca^{2+} de la mitocondria, aumentaba el aclaramiento del Ca^{2+} mitocondrial y protegía de la generación de superóxido, de la necrosis y del fallo cardíaco en ratones (41). En otro estudio, la descarga mecánica permitió un incremento en la función de SERCA y una mejora en la regulación del Ca^{2+} y contractilidad en ratas con cardiomiopatía inducida por doxorubicina. Por lo tanto, las alteraciones en el flujo de Ca^{2+} en los cardiomiocitos preceden signos clínicos de disfunción cardíaca. En concreto el flujo del Ca^{2+} mitocondrial es esencial para mantener la función mitocondrial y la supervivencia celular. Es por ello que el tratamiento de la desregulación del Ca^{2+} está siendo un enfoque para tratar la cardiotoxicidad mediada por doxorubicina.

5.5.4. Inhibición de la Topoisomerasa II (TopII)

Una de las dianas celulares de la doxorubicina es la proteína TopII, a través de la cual causa roturas en el DNA. Las topoisomerasas son enzimas isomerasas que se localizan en el núcleo mayoritariamente, pero también están presentes en el citoplasma, en una ratio 10:1. Inducen roturas de cadena sencilla y doble en el DNA para regular los cambios topológicos durante la replicación del DNA, transcripción, recombinación y remodelación de la cromatina, enrollándolo para permitir un almacenaje más compacto o desenrollándolo para permitir su replicación y la síntesis de proteínas. Estas roturas selectivas permiten desenrollar el DNA para permitir el acceso de esta enzima y otras, capaces de cortar y pegar una o las dos hebras del DNA.

Existen dos enzimas de topoisomerasas, la I y la II. Mientras la TopI corta solo una de las hebras del DNA sin consumir ATP, la Top II (o girasa) corta las dos hebras del DNA en un proceso

dependiente de ATP. La isoforma TopIIa se encuentra predominantemente en células proliferativas y se requiere para la replicación del DNA, mientras que la TopIIb se encuentra en todas las células quiescentes y es la única isoforma que se encuentra de manera abundante en la mitocondria de los cardiomiocitos adultos.

Bajo el tratamiento con doxorubicina, la TopIIb forma un complejo con este fármaco y con el DNA, resultando en roturas de doble hebra en el DNA y disfunción mitocondrial al suprimir PPAR (regulador del metabolismo oxidativo). Los cambios en el transcriptoma llevan a una biogénesis mitocondrial defectiva, incrementos en ROS, activación y alteración de la vía de p53, alteración en la conducción del Ca^{2+} , disfunción mitocondrial y finalmente la muerte celular de los cardiomiocitos. La depleción de la TopIIb protege a los cardiomiocitos de las roturas de doble cadena del DNA inducidas por la doxorubicina, por lo que los protege de forma parcial contra la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina.

5.5.5. Otros efectos de la doxorubicina sobre los cardiomiocitos

Recientemente se ha propuesto la inhibición de la vía AMPK/PGC1- α como una de las causas de la menor viabilidad celular de los cardiomiocitos y de la disfunción cardíaca tras el tratamiento con doxorubicina. Esta vía juega un papel importante en la homeostasis energética mitocondrial (42).

Otra de las proteínas responsables de la disfunción mitocondrial inducida por doxorubicina es la proteasa activada del receptor-1 (PAR-1), la cual está involucrada en el daño cardíaco y remodelación cardíaca adversa (43).

La sirtuina 3 o SIRT3 es una enzima mitocondrial y otra de las proteínas importantes en el metabolismo celular, apoptosis, producción de ROS y respiración mitocondrial. El tratamiento con doxorubicina reduce los niveles de SIRT3 e incrementa el daño en el mtDNA y la producción de ROS (44).

Del mismo modo, el mecanismo energético cardíaco y su regulación están asociados también con el interferón gamma (INF γ). El tratamiento con doxorubicina estimula la liberación de INF γ en los cardiomiocitos primarios, el cual altera el metabolismo de los ácidos grasos y la capacidad respiratoria de la mitocondria suprimiendo el eje AMPK/Acecil-CoA carboxilasa (ACC) (45).

La doxorubicina también afecta la autofagia al desregular la inhibición de la acidificación lisosomal y causar la alteración del inicio de este proceso.

Introducción

Los receptores “Toll-like Receptors” (TLRs), como TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 y TLR9 expresados en los cardiomiocitos murinos también juegan un papel importante en los cambios patológicos inducidos por la doxorubicina respondiendo rápidamente a los ligandos patogénicos y no patogénicos producidos por los tejidos dañados, así como en la progresión de la disfunción cardíaca medida por doxorubicina (46).

5.6. Control terapéutico de fármacos para la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina

5.6.1. Cómo diagnosticar la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina

La Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) aconseja hacer un ECG como imagen rutinaria de diagnóstico y analizar la deformación, así como identificar biomarcadores cardíacos en sangre con el fin de identificar a los pacientes con cáncer y riesgo de desarrollar disfunción cardíaca, ya que son predictivos de la progresión de la cardiotoxicidad.

También puede ser útil evaluar las concentraciones plasmáticas de doxorubicina y sus metabolitos en sangre, siendo recomendable el uso de diversos análisis como el farmacéutico, el farmacocinético y el farmacodinámico por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), cromatografía líquida con dos detectores de espectrometría de masas (LC-MS/MS) o cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UHPLC).

Además, la medida de la FEVI mediante ECG debería combinarse con angiocardiografías en reposo que muestren el flujo de la sangre a través del corazón y los vasos sanguíneos, o medidas del eco *strain* que podría ser más sensible para detectar la cardiotoxicidad temprana que la medida de FEVI.

Finalmente, evaluar la anexina V y ante signos de apoptosis temprana, realizar el ensayo TUNEL en las células cardíacas. En caso de presentar signos de apoptosis tardía, se debería por último, medir las concentraciones plasmáticas de cTnT/I, endotelina-1 (ET-1), péptido natriurético atrial (ANP) y BNP y suspender la terapia con doxorubicina ante niveles detectables de tales biomarcadores plasmáticos (21).

5.6.1.1. Medida de la FEVI

El análisis de la FEVI es fácil de realizar y proporciona medidas reproducibles y fiables. Se utiliza para detectar y diagnosticar alteraciones cardíacas tempranas. No obstante, la medida de la FEVI no debería utilizarse como método único para controlar la función cardíaca de aquellos pacientes tratados con quimioterápicos. Además de la medida de la FEVI, la identificación de

biomarcadores cardíacos en sangre, como se describe a continuación, permite identificar y vigilar la cardiotoxicidad inducida por la doxorubicina.

5.6.1.2. Biomarcadores cardíacos solubles

Existen diferentes biomarcadores cardíacos séricos como las troponinas T e I (TnT/I), el péptido natriurético (ANP) y el péptido natriurético cerebral o tipo B (BNP), que se evalúan para controlar el tratamiento con fármacos cardiotóxicos. Estas proteínas son específicas del tejido cardíaco y son liberadas por los cardiomiocitos dañados. La medida de biomarcadores como la troponina, en combinación con la medida de la FEVI, se usa habitualmente para identificar pacientes con signos clínicos tempranos de cardiotoxicidad.

En 1998, se evaluó por primera vez la troponina T cardíaca (cTnT) como biomarcador de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina en un modelo de hipertensión en rata (47). Aunque sirve como biomarcador en modelos *in vivo*, su aplicación en pacientes pediátricos que reciben doxorubicina es limitada, ya que éstos no presentan elevaciones de cTnT tras el tratamiento con el fármaco (48). No obstante, esta proteína se ha establecido como un potencial biomarcador cardíaco de daño temprano que se evalúa mediante un método no invasivo de uso clínico tras el tratamiento con doxorubicina.

La TnT constituye uno de los componentes del sistema contráctil de la musculatura estriada. Se encuentra en los filamentos delgados de las miofibrillas (Fig. 7), y un 6% está presente como precursor citosólico en equilibrio con la forma miofibrilar. La TnT se libera como molécula libre o formando parte del complejo de troponinas T-I-C, al que está asociada, que posteriormente se separará en TnT libre. Los mecanismos que causan su liberación son la necrosis, la apoptosis, la renovación normal de los cardiomiocitos, la disociación o degradación proteolítica de los filamentos contráctiles, el incremento en la permeabilidad de la membrana celular cuando ésta se altera y la formación y liberación de vesículas. La lisis de los filamentos puede deberse a diversos procesos como la inhibición de la síntesis proteica, la reducción de la expresión de proteínas específicas del músculo, el ensamblaje inadecuado de los sarcómeros y el incremento en la degradación de los componentes miofibrilares. Así, la liberación temprana puede deberse a su susceptibilidad de ser degradada por proteasas citosólicas, y niveles elevados persistentes en sangre pueden ser debidos a un daño miocardio irreversible (49).

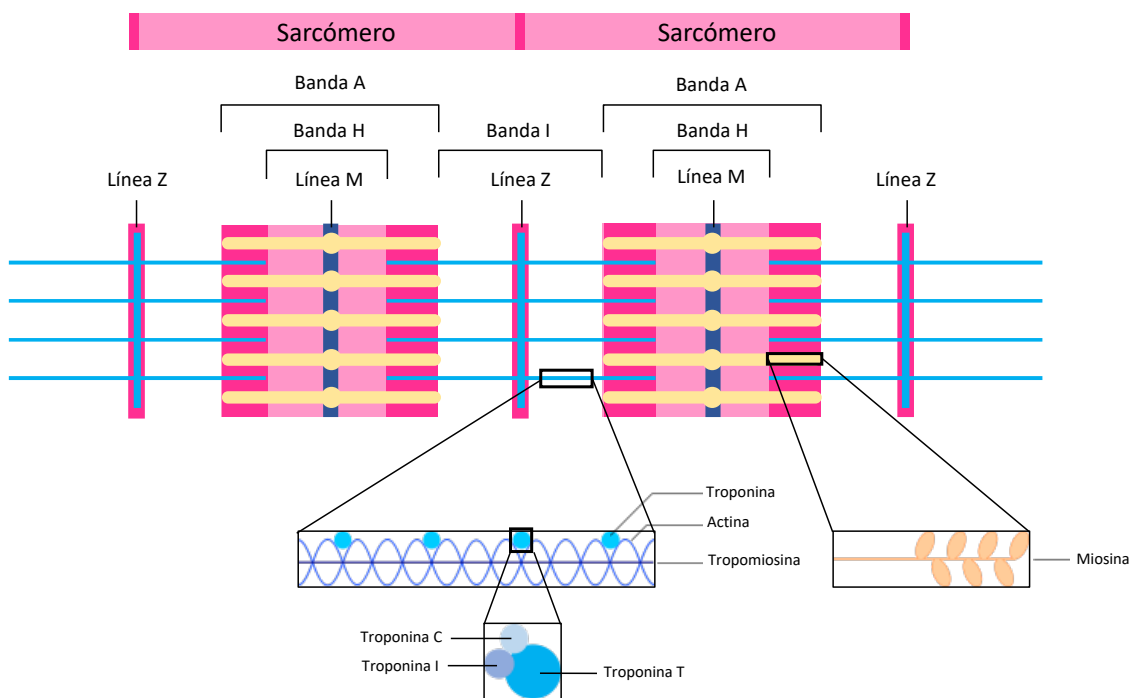


Figura 7. Estructura de los miofilamentos que componen las miofibrillas. Las miofibrillas cardíacas están compuestas por sarcómeros en los que se encuentran los miofilamentos de actina (filamentos delgados) y miosina (filamentos gruesos). En los miofilamentos de actina se asocian la tropomiosina y la troponina. La troponina es un complejo proteico formado por la troponina T, troponina C y troponina I.

La elevación de las concentraciones séricas de TnT se produce de forma precoz, tras las primeras horas de la administración de la quimioterapia, y predice el desarrollo de disfunción ventricular y su severidad, indicando estadios tempranos de daño miocárdico (50). El aumento en sangre de TnT ocurre bajo condiciones clínicas como la cardiotoxicidad fármaco-inducida (47), entre otras como la miocarditis, traumatismo o embolia pulmonar (51-53) o bajo condiciones normales tras el ejercicio extremo, estrés o renovación celular. Los niveles incrementados pueden persistir desde las 3-12 horas hasta los 7-14 días, en casos como el infarto agudo de miocardio. Los valores elevados de TnT se correlacionan con la severidad de la enfermedad y un pronóstico negativo, independientemente de los niveles de BNP o NT-proBNP.

La TnT es un marcador de detección más temprana, de mayor permanencia en sangre y es más estable tras varios ciclos de congelación-descongelación en comparación con la TnI. Por ello, la TnT es un marcador cardiospecífico muy sensible al daño miocárdico, siendo el marcador por excelencia del daño miocárdico.

5.6.1.3. Apoptosis por anexina V y ensayo enzimático TUNEL

La detección de anexina V no se utiliza como método diagnóstico del daño cardíaco inducido por quimioterapia, sino que proporciona información del daño miocárdico a nivel molecular y celular. En los estadios tempranos de apoptosis, los cardiomiocitos activan proteasas apoptóticas y esfingomielinasas que provocan la exposición de moléculas de fosfatidilserina hacia la capa extracelular de la membrana de los cardiomiocitos. La anexina V tiene una gran afinidad por las moléculas de fosfatidilserina expuestas de manera que permite evaluar la apoptosis de los cardiomiocitos. En estadios tardíos de la apoptosis, se producen alteraciones intracelulares como la fragmentación del DNA que puede ser cuantificada a través de la técnica de TUNEL. La combinación de ambas, apoptosis temprana y tardía, es una opción útil para el control terapéutico de fármacos.

5.7. Estrategias para la prevención o alivio de la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina

Hoy en día todavía no existe una guía clínica específica para el control de la cardiotoxicidad inducida por la doxorubicina, pero sí existen diferentes estrategias y fármacos para prevenirla o atenuarla. Las estrategias de prevención primaria son: reducir el potencial cardiotóxico administrando la doxorubicina mediante infusiones prolongadas, la encapsulación de la doxorubicina en vehículos como nanopartículas, hidrogeles o liposomas, o la co-administración con agentes cardioprotectores como podría ser el dexrazoxano o derivados menos cardiotóxicos (epirubicina o idarubicina), citoquinas hematopoyéticas como la eritropoyetina (EPO) o la trombopoyetina (TPO), antioxidantes como vitaminas, melatonina, N-acetil-cisteína, amifostina, mangiferina, probucol o resveratrol, glóbulos rojos cargados con doxorubicina, metformina, inhibidores de la corriente de sodio, bloqueantes de los receptores β -adrenérgicos (carvedilol, nebivolol o metoprolol), inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) (perindopril o enalapril) y antagonistas del receptor de la angiotensina II (ARBs) (valsartan).

5.7.1. Alteración del régimen de dosis de doxorubicina

Alterando el régimen de dosis con administraciones continuas y lentas, en lugar de elevadas dosis en bolo, en el que se administra una única dosis durante un período de tiempo corto, se consiguen picos más bajos de concentraciones plasmáticas y, por lo tanto, menores concentraciones en el tejido cardíaco. El beneficio más destacable de los regímenes de fraccionamiento de las dosis y de infusión continua, además de la mejor tolerancia a dosis acumulativas mayores, es la disminución en la incidencia de eventos cardíacos como el fallo cardíaco crónico, las cardiomiopatías y la disfunción de la FEVI. Este régimen de dosis más pequeñas y frecuentes ha

Introducción

demostrado una menor incidencia de eventos cardiotóxicos comparado con el régimen de dosificación convencional de tres semanas sin comprometer el efecto anti-tumoral en modelo de ratón (25), de rata (54) y en pacientes (55).

Se ha demostrado que duraciones prolongadas de infusiones intravenosas de doxorubicina durante más de 48-96 horas reducen la cardiotoxicidad sin comprometer la eficacia anti-cancerígena (56). Aunque las concentraciones en el tumor son las mismas, tanto con la administración continua como con la de en bolo, las concentraciones en el tejido cardíaco son mayores con el segundo método.

No obstante, la alteración del tiempo de administración causa distintos efectos: infusiones continuas de entre 48 y 72 horas son ampliamente utilizadas en pacientes con cáncer de mama, sarcomas y linfomas, mientras que no brindan cardioprotección en niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) tratados con doxorubicina (57, 58). Además, infusiones de más de 96 horas están asociadas a mayores incidencias de estomatitis.

5.7.2. Formulación liposomal de la doxorubicina

En los últimos años se han llevado a cabo estudios para reducir los efectos cardiotóxicos de la doxorubicina mediante su encapsulación en liposomas. Estas estructuras permiten la encapsulación de drogas hidrofílicas en el compartimento acuoso o la incorporación de drogas lipofílicas en la bicapa lipídica. La encapsulación de la doxorubicina en liposomas mejora su permeabilidad, modifica su farmacocinética y esto permite que estas estructuras se acumulen preferentemente en la zona del tumor y se reduzcan las concentraciones máximas circulantes de la doxorubicina libre en sangre, resultando en una disminución de ésta en el tejido cardíaco y una menor aparición de eventos cardíacos en comparación con el tratamiento con la doxorubicina convencional (59).

Actualmente existen dos formas de doxorubicina liposomal disponibles para el uso clínico: la doxorubicina liposomal pegilada (unión de un polietilenglicol) como Doxil/Caelyx y la doxorubicina liposomal no-pegilada como Myocet. Ambas formulaciones están aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para pacientes con cáncer de ovario, sarcoma de Kaposi y mieloma múltiple tras el fracaso de al menos una quimioterapia previa, aunque es la forma pegilada la más utilizada en Estados Unidos.

5.7.3. Encapsulación de la doxorubicina en exosomas y nanopartículas

La encapsulación de la doxorubicina en exosomas resulta en una mayor distribución tumoral y menor acumulación en el corazón, ya que, debido a las uniones estrechas de los vasos sanguíneos

del corazón, la doxorubicina encapsulada en exosomas no es capaz de traspasar la monocapa endotelial miocárdica. Por ello, la encapsulación reduce los efectos secundarios al decrecer la absorción sistémica.

Además, incrementa la potencia y la eficiencia de entrada en las células respecto a la doxorubicina libre o liposomal. Mientras la doxorubicina libre entra por difusión pasiva y se difunde por el citoplasma y núcleo, la doxorubicina encapsulada en exosomas se une de manera específica, entra por endocitosis formando estructuras endocíticas y se acumula en la membrana plasmática, aunque los exosomas son rápidamente liberados de los endosomas y se difunden por el citoplasma y núcleo. La doxorubicina encapsulada en exosomas permanece dentro de la célula durante un periodo de tiempo más largo que la doxorubicina libre, ya que los exosomas no están sujetos al flujo hacia afuera a través de los transportadores de resistencia a múltiples fármacos o MDR (por sus siglas en inglés *multidrug resistance*), a diferencia de la doxorubicina libre. Estos mayores niveles de doxorubicina intracelular causan una elevada toxicidad celular, el hinchamiento de las mitocondrias y una menor viabilidad celular en el tumor (60). La administración intravenosa de la doxorubicina encapsulada en exosomas inhibió el crecimiento tumoral sin causar toxicidad en el corazón, hígado, pulmones o bazo, en ratones con cáncer de mama (61).

Se han desarrollado nanopartículas de silicona porosa como transportadores de fármacos que tienen como diana las células tumorales. Estas nanopartículas se generan por endocitosis en las células tumorales y se secretan por exocitosis. Tras la administración intravenosa mejoran la acumulación tumoral, la extravasación de los vasos sanguíneos y la penetración en el parénquima tumoral. Además, tienen una gran captación y citotoxicidad en células tumorales y células madre tumorales, resultando en una actividad anticancerígena y en la reducción de las células madre tumorales en modelos *in vivo* (62).

5.7.4. Uso de agentes cardioprotectores: dexrazoxano

El dexrazoxano es el único fármaco aprobado por la FDA hasta la fecha para prevenir la cardiotoxicidad inducida por la doxorubicina. Es un agente quelante de hierro que puede actuar desplazando el hierro unido a la doxorubicina y previniendo la generación de daño oxidativo. No obstante, su principal mecanismo de protección de la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina se ha atribuido a la degradación proteosómica de la TopIIb tanto *in vitro* como *in vivo*. El dexrazoxano reduce la formación de los complejos covalentes TopIIb-DNA, que inducen roturas de doble cadena en el DNA, a través de estabilizar la conformación cerrada de TopIIb para el sitio de unión al ATP, el cual desencadena la degradación proteica de TopIIb (63). Los menores niveles proteicos de TopIIb resultan en una reducción del daño en el DNA y una menor apoptosis.

Introducción

Sus efectos beneficiosos se han demostrado a largo plazo en pacientes pediátricos y adolescentes (64, 65) pero no en adultos (66). En un ensayo clínico con niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) se demostró su actividad cardioprotectora al verse niveles disminuidos de troponina T en suero al final del tratamiento y mejores valores de FEVI tras 5 años. No obstante, en otro estudio el dexrazoxano produjo mielosupresión grave dada por una gran incidencia de leucopenia severa debido a sus efectos aditivos con la quimioterapia (67). Tras detectarse efectos secundarios debido a sus efectos aditivos con la quimioterapia, la Sociedad Americana de Oncología Clínica solo recomienda su uso en mujeres con cáncer de mama metastásico después de haber recibido una dosis acumulativa de doxorubicina superior a 300 mg/m² y que aún necesiten tratamiento adicional con doxorubicina, ya que interfiere con la actividad anti-neoplásica cuando se utiliza al inicio de la quimioterapia.

5.7.5. Uso de citoquinas hematopoyéticas: EPO y TPO

La EPO, además de tener un papel en la hematopoyesis y ser usado en el tratamiento de la anemia, ejerce efectos anti-atróficos y anti-apoptóticos en los cardiomiocitos y anti-fibróticos sobre el miocardio. Esto se debe a que sus receptores se expresan en diversos tejidos, entre los cuales se encuentran el corazón, el cerebro y el músculo esquelético. Su eficacia se ha probado *in vitro* e *in vivo*, viéndose una mejora en la disfunción del ventrículo izquierdo en ratones (68) y un menor estrés oxidativo y apoptosis en cardiomiocitos de ratas (69). Además, la EPO estimula la sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD (SIRT1) permitiendo una mejora de la función cardíaca lo que se traduce en una reducción de la toxicidad mitocondrial (70).

De manera similar, la TPO actúa inhibiendo la apoptosis de los cardiomiocitos tanto *in vivo* como *in vitro*. En modelos agudos y crónicos de rata tratados con doxorubicina se ha demostrado su capacidad de mejorar la función cardíaca a través de la activación de las vías de la proteína kinasa B (Akt) y ERK (71).

Ambas citoquinas reducen la disfunción del ventrículo izquierdo y aumentan la contractilidad y la recuperación cardíaca, aunque no hay evidencias de que sus efectos cardioprotectores en humanos sean a largo plazo.

5.7.6. Uso de antioxidantes: vitaminas A, C y E, melatonina, N-acetil-cisteína, amifostina, mangiferina, probucol o resveratrol

El uso de antioxidantes se ha empleado para disminuir el estrés oxidativo asociado al uso de doxorubicina, ya que es uno de los mecanismos principales mediante el cual este fármaco causa cardiotoxicidad.

Todos ellos son capaces de reducir la cardiotoxicidad a corto plazo, ya que existen otros mecanismos distintos a la producción de radicales libres en el tejido cardíaco que no permiten que ejerzan un efecto protector a largo plazo. Todos ellos se han estudiado en modelos *in vitro* e *in vivo* (42, 72-74), pero falta todavía estudiar sus efectos anti-oxidantes sobre la eficacia anti-neoplásica en humanos.

5.7.7. Uso de metformina

La metformina es un fármaco usado para tratar la diabetes. Además, es potencialmente útil para atenuar la cardiotoxicidad inducida por la doxorubicina, ya que mejora la función cardíaca y confiere cardioprotección en ratones y ratas obesos tratados con doxorubicina. El mecanismo de acción se basa en incrementar la actividad autofágica, proceso que se ha visto disminuido tras el tratamiento con doxorubicina.

5.7.8. Uso de β -bloqueantes, inhibidores de la ACE y ARBs

Hay dos maneras de tratar el fallo cardíaco congestivo, aunque sea irreversible. Una estrategia se basa en reducir la presión cardíaca y la otra en minimizar los factores que causan el fallo cardíaco congestivo en general. Los inhibidores de la ACE (enalapril o perindopril) y los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (valsartan) son medidas de cardioprotección para reducir las elevadas presiones sanguíneas, y los β -bloqueantes (carvedilol, nebivolol y metoprolol) para proteger al corazón de los efectos negativos producidos por las hormonas que produce el cuerpo frente al estrés. Estos tratamientos permiten que el corazón lata más fuerte y necesite menos oxígeno. Han mostrado resultados de cardioprotección prometedores en los pacientes tratados con doxorubicina (75-77).

Aunque todos los tratamientos actuales mejoran los síntomas y frenan la remodelación adversa cardíaca, no abordan el problema de la pérdida irreversible que se produce del tejido cardíaco. Por ello, son necesarios estudios clínicos adicionales que permitan desarrollar enfoques farmacológicos y prácticas clínicas con el fin de encontrar una alternativa terapéutica para los diferentes pacientes tratados con antraciclinas que desarrollan enfermedades cardiovasculares.

6. Regeneración cardíaca

Bajo condiciones patológicas, la migración celular local se ha descrito como uno de los mecanismos principales que contribuye a la reparación del corazón adulto. Los cardiomiocitos preexistentes constituyen la principal fuente celular primaria del músculo regenerado, ya que los cardiomiocitos presentes en zonas no dañadas del miocardio migran y proliferan durante los procesos de regeneración (78).

Introducción

Otro tipo celular que contribuye a la regeneración del corazón son las células epicárdicas, las cuales tienen una gran capacidad regenerativa (79). Estas células derivadas del epicardio pierden sus adhesiones celulares después de una hora de producirse el daño y se dirigen hacia la superficie para recubrir de nuevo el ventrículo dañado o hacia el miocardio donde dan lugar a células perivasculares y miofibroblastos y proporcionan sujeción a la vasculatura del área de regeneración (80). Además, de manera paracrina, abastecen de factores de crecimiento a los cardiomiocitos presentes en el miocardio.

La tercera población capaz de regenerar el tejido cardíaco son las células endoteliales endocárdicas, que, al igual que las células epicárdicas, responden de manera inmediata al daño enviando señales solubles a los cardiomiocitos. Además, las células endoteliales preexistentes promueven la neo-vascularización en los corazones adultos de ratones (81).

Del mismo modo, la migración de células madre cardíacas (CSC) indiferenciadas en el miocardio contribuye a la reparación cardíaca. En 2001, Orlic et al. descubrieron la existencia de CSC residentes en el corazón con capacidad de regeneración y diferenciación a cardiomiocitos en el tejido miocárdico adulto (17, 82). Las CSC se activan y proliferan tras un daño tisular, reemplazando a las células apoptóticas y manteniendo la renovación de cardiomiocitos (83). Estos cardiomiocitos son capaces de dividirse y regenerar la zona dañada de manera limitada reclutando células madre residentes o circulantes en el sitio dañado del corazón.

Del mismo modo, en 2011, se detectaron células estromales mesenquimales (MSC) en el corazón de ratones adultos capaces de promover la supervivencia, proliferación y diferenciación de las CSC *in vitro* (84).

Estos descubrimientos han cambiado el entendimiento de las características de auto-renovación del corazón, el cual se consideraba un órgano con capacidad regenerativa limitada.

7. Células madre con potencial terapéutico en cardiología y cardiotoxicidad

7.1. Concepto

Las células madre son células indiferenciadas con capacidad de generar todas las demás células con funciones especializadas, debido a que poseen tres características: pueden dividirse y renovarse a sí mismas de manera que forman nuevas células madre con capacidad de auto-renovación; no son especializadas, por lo que no pueden cumplir funciones específicas en los tejidos; y tienen capacidad de diferenciación por lo que pueden diferenciarse en células maduras

especializadas. Existen diversas fuentes de células madre como los embriones (células madre embrionarias) (85), tejidos adultos (células madre adultas) (86-89) y líquido amniótico o sangre del cordón umbilical (células madre perinatales) (90, 91).

En las últimas décadas, están siendo de gran interés para comprender el origen de las enfermedades, generar células sanas que regeneren y reparen tejidos dañados y testar nuevos medicamentos para probar su seguridad y eficacia. Pueden ser manipuladas para diferenciarse a tipos celulares específicos (células del músculo cardíaco, sanguíneas o nerviosas) para luego ser implantadas en los tejidos dañados y repararlos (92). De este modo, pueden emplearse en Medicina Regenerativa, para la reparación de tejidos lesionados o disfuncionales.

Las células madre adultas se están estudiando para tratar una amplia variedad de enfermedades como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal, diabetes y artritis, así como el daño producido por quimioterapia e insuficiencia cardíaca, entre otras (93-97).

7.2. Potencial terapéutico en cardiología y cardiotoxicidad

Durante las dos últimas décadas ha habido un gran avance en el campo de la Terapia Celular tanto en investigación básica como en modelos animales, llevándola incluso a la clínica (98, 99) en la repoblación de tejidos dañados con nuevos cardiomiocitos y vasos sanguíneos que ayuden a reestablecer el suministro de oxígeno y nutrientes en las áreas afectadas. En la Terapia Celular cardíaca, se han utilizado células madre procedentes de diferentes fuentes para mejorar o restablecer el funcionamiento del corazón dañado tras un infarto de miocardio: células madre cardíacas (CSC o CPC) (83), células madre pluripotentes embrionarias (ESC) (100) e inducidas (iPSC) (101), cardiomiocitos inducidos (iPC) por reprogramación celular (102), células madre adultas (mioblastos) y células madre derivadas de la médula ósea como las hematopoyéticas (HSC) (103), células progenitoras endoteliales (EPC) (104) y células madre mesenquimales (MSC) (105).

7.3. Células estromales mesenquimales

7.3.1. Concepto

Las MSC pertenecen a una población de células madre no hematopoyéticas multipotentes con capacidad de auto-renovación y diferenciación hacia diferentes tipos celulares como adipocitos, condrocitos, osteocitos, células endoteliales, miocitos y fibroblastos (106, 107). Las MSC se pueden aislar a partir de la médula ósea (1 de cada $10^4 - 10^5$ células mononucleadas), así como

Introducción

del tejido adiposo (2% del total de las células nucleadas), músculo esquelético, sangre periférica y de cordón umbilical, placenta y pulmón (108, 109).

Son ampliamente utilizadas en la clínica en diversos programas de medicina regenerativa para el tratamiento de diferentes patologías como el infarto de miocardio, la osteogénesis imperfecta (110), la artritis reumatoide, la distrofia muscular (111), el fallo renal y hepático (112), el Parkinson, síndromes respiratorios (113) y alteraciones inmunes como la enfermedad injerto contra huésped (114), la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple (115) o la diabetes tipo I (96).

Las MSC deben cumplir unos estándares mínimos según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) para ser identificadas y consideradas como MSC. Deben poseer una serie de propiedades físicas como la capacidad de adherencia al plástico y de expansión en cultivo, así como el potencial de diferenciación *in vitro* hacia al menos tres líneas diferentes: osteogénica, condrogénica y adipogénica. Además, deben expresar marcadores de superficie como CD73, CD90, CD105, y ser negativas para antígenos endoteliales o hematopoyéticos como CD14, CD11b, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR (10).

Tanto las MSC de origen autólogo como alogénico poseen propiedades inmunomoduladoras con efectos inmunosupresores, influenciando las actividades de todas las células involucradas en la respuesta inmune (116). *In vitro*, a través de interacciones directas célula-célula y de la secreción de factores solubles, las MSC inhiben la proliferación de las células T, de células B, de natural killer (NK) y de células dendríticas (CD). Además, disminuyen la citotoxicidad de las células T y NK, así como la secreción de citoquinas, inhiben la maduración de las células B y la secreción de anticuerpos, disminuyen la activación y maduración de las CD e impiden la presentación de antígenos (117-119).

Además, las MSC pueden actuar como células precursoras de tejidos estromales de manera que en la médula ósea proporcionan un ambiente propicio para el desarrollo y regulación de la hematopoyesis. Tienen un papel importante en el desarrollo y diferenciación de los distintos linajes hematopoyéticos a través de interacciones célula-célula y la producción de factores de crecimiento y citoquinas reguladoras relacionados con el crecimiento celular y la comunicación celular (120-122).

7.3.2. Potencial terapéutico en cardiología y cardiotoxicidad

En clínica, se ha mostrado la eficacia de la terapia celular basada en el uso de MSC, ya que mejoran los volúmenes ventriculares, el tamaño de infarto, la fracción de eyección y la perfusión

del miocardio (123, 124). Las MSC mejoran la capacidad funcional tanto en los pacientes con cardiomiopatía dilatada como con cardiomiopatía isquémica.

En 1995, Wakitani et al mostraron que las MSC pueden diferenciarse *in vitro* a células con un fenotipo miogénico, mejorando así la función cardíaca tras un daño causado por isquemia/reperfusión (125). Posteriormente, en 1999, Makino et al. confirmaron que MSC derivadas de la médula ósea de ratón tratadas con 5-azacitidina (5-Aza) se diferencian a cardiomiocitos al adoptar una morfología de miotubo, formar uniones gap, presentar potenciales de acción y contractibilidad celular espontánea, y expresar diversos genes (MEF-2A/MEF-2D) y péptidos cardíacos específicos (cadena pesada de la miosina, desmina, α -actinina y péptidos natriuréticos atriales) (126). Esto fue confirmado tanto *in vitro* como *in vivo* por Yang et al, sugiriendo que estos cardiomiocitos derivados de MSC una vez trasplantados *in vivo* podrían ser útiles para reparar el miocardio dañado (127). Sin embargo, no se han estudiado los efectos de diferenciación, injerto y función cardíaca de estos cardiomiocitos después de ser trasplantados.

Numerosos grupos han confirmado la efectividad de las MSC en diferentes modelos animales con infarto de miocardio (128-130). En 2002, Toma et al. fueron los primeros en mostrar *in vivo* que MSC humanas procedentes de médula ósea eran capaces de injertar en el miocardio de ratones adultos y diferenciarse a cardiomiocitos (128). Así pues, las MSC, tanto las ya presentes en el corazón como las que injertan, pueden regenerar el tejido mediante la remodelación del miocardio, la reducción del tamaño de infarto, la disminución de la fibrosis y la mejora de la función contráctil.

Sin embargo, existen diferentes estudios que contradicen la hipótesis de injerto y diferenciación para explicar la eficiencia de las MSC trasplantadas. Estos estudios proponen que las mejoras funcionales tras el trasplante con MSC no se deben al injerto o a la diferenciación celular (105). Se ha observado en modelos *in vivo* de daño por isquemia-reperfusión que el efecto paracrina de las MSC es capaz de reducir el tamaño de infarto (131).

Este efecto se ha observado también en la cardioprotección en un modelo murino de cardiomiopatía inducida por doxorubicina (132). Por ello, sus acciones paracrinas se han descrito como las posibles responsables de la diferenciación cardíaca y de la regeneración funcional *in vivo*. Además de secretar citoquinas y factores de crecimiento, las MSC también liberan vesículas extracelulares (VE), que se han descrito como mediadores importantes entre las células.

8. Vesículas extracelulares

8.1. Concepto

Las vesículas extracelulares (VE) son vesículas secretadas por casi todos los tipos celulares. Están presentes en el medio de cultivo y en diferentes fluidos corporales como la sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, leche materna, linfa y líquido sinovial (133-136).

Las VE engloban a las vesículas apoptóticas (>1000 nm de diámetro), las microvesículas o ectosomas (150-1000 nm de diámetro) y los exosomas o VE pequeñas (VE) (50-200 nm de diámetro) (Fig. 8).

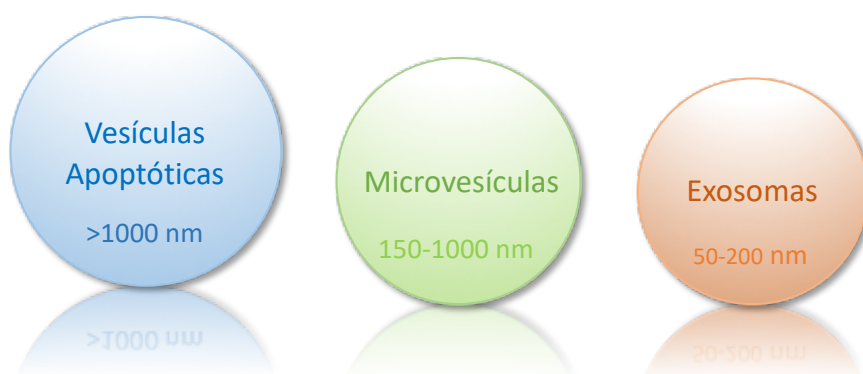


Figura 8. Clasificación de las VE según su tamaño.

Además del tamaño, también pueden clasificarse según el mecanismo de formación. Los exosomas se originan a partir de la membrana celular, que se invagina para formar el compartimento endosomal de la célula. Una vez formado el compartimento endosomal, éste va cambiando su composición y va formando vesículas denominadas vesículas intraluminares por invaginación de su membrana. Las moléculas presentes en la membrana de estas vesículas seleccionan de manera específica proteínas y ácidos nucleicos que incorporan en su interior y posteriormente son liberadas al exterior de la célula (137). En cambio, las microvesículas se forman a partir de la membrana plasmática y se liberan directamente (138) (Fig. 9).

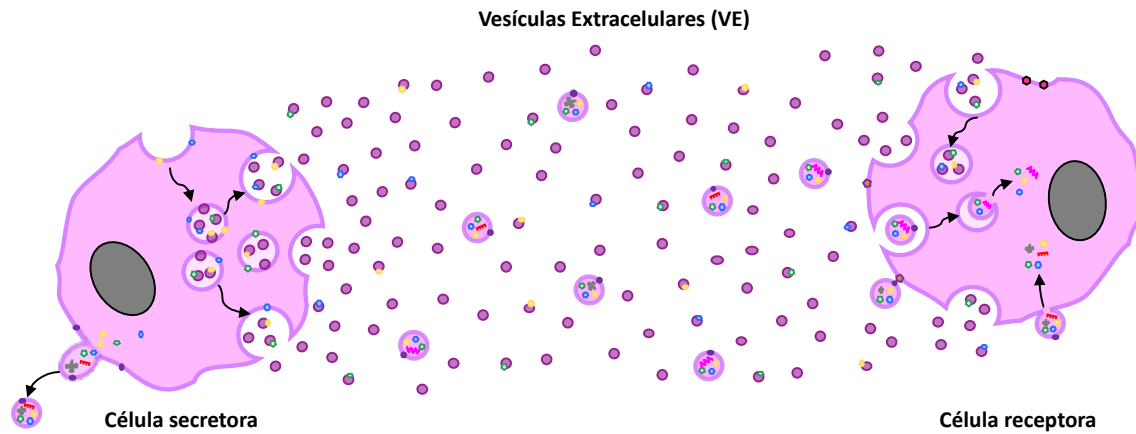


Figura 9. Representación de la transferencia de VE.

Contienen una bicapa lipídica que es diversa en cuanto a su composición rica en esfingomielina, colesterol, fosfatidilserina y tetrasparinas (CD9, CD63 y CD81) que envuelve su contenido (proteínas, lípidos, mRNA, miRNA, fragmentos de DNA, citoquinas, hormonas y factores de crecimiento) procedente de la célula de origen (139) (Fig. 10). Presentan anticuerpos originarios de la célula parental, como por ejemplo CD29, CD73, CD90, CD44 y CD105. Sin embargo, Baglio et al. demostraron que los exosomas procedentes de MSC incorporan de manera selectiva miRNA y tRNA específicos de la célula parental así como propios, de manera que los niveles y composición de éstos en los exosomas difieren de los de la célula de origen (140).

Según la composición de la membrana, las VE se van a liberar al espacio extracelular mediante fusión con la membrana plasmática o se destinarán a la degradación en los lisosomas.

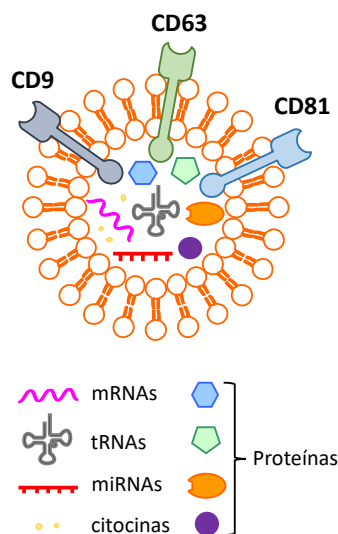


Figura 10. Estructura y contenido de una VE.

Introducción

Las proteínas de las VE participan en la biogénesis, tipo de carga y en el control de la liberación de las VE y les permite tener una elevada selectividad de interacción con las células diana a través de la unión específica de integrinas, tetraspaninas o ICAMs con sus receptores de la superficie de las células receptoras. La membrana lipídica le permite entrar en las células diana para liberar su contenido en el citoplasma de éstas. De este modo, el contenido presente en los exosomas afecta a las propiedades biológicas y la función de las células dianas alterando las vías intracelulares y la expresión génica de éstas (141-143) y modificando el microambiente en el que se encuentran (144, 145). Se ha descrito que en condiciones de hipoxia las células tumorales secretan exosomas que modulan el microambiente y promueven la angiogénesis y la metástasis (146).

Existen diferentes procesos fisiológicos intra- o extra-celulares que pueden mediar los mecanismos de secreción y captación de las VE. Por ejemplo, la secreción de los exosomas se puede ver aumentada bajo condiciones de estrés celular (estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico, hipoxia o isquemia) (147-149), resistencia a la insulina (143), pH ácido intracelular y del microambiente (150) o incrementos en los niveles de calcio intracelular (151). Del mismo modo, un pH bajo estimula la captación de exosomas (150). Se ha descrito que la captación de los exosomas procedentes de tumores es mayor en las células de origen metastásico que en las derivadas de tumores primarios o células normales. De igual manera, la densidad del cultivo afecta el comportamiento celular y el secretoma: las células sembradas a menor densidad producen una mayor secreción de VE (152). Además, el tiempo del cultivo también modula la producción de VE y puede alterar su eficacia (152).

La carga de los exosomas depende del origen celular, de las condiciones celulares y del microambiente en el que se encuentran las células (153). El contenido de los exosomas derivados de las CPC bajo condiciones de hipoxia fue diferente respecto al de las mantenidas en normoxia (154). Además, los niveles de pH bajos también modulan la composición lipídica de los exosomas y les confieren una mayor rigidez de membrana (150).

La liberación de VE es un mecanismo de compensación que usan las células para eliminar las moléculas tóxicas o restos no deseados y optimizar su supervivencia. Debido a que las VE pueden ser recolectadas de manera directa y con regularidad, es posible el seguimiento a tiempo real de la progresión de la enfermedad de los pacientes. Por ello, las VE podrían ser un biomarcador sensible para predecir el daño tisular y servir como candidatos diagnósticos en la clínica, ya que reflejan las condiciones del microambiente presente en las zonas dañadas o patológicas.

El número de VE circulantes procedentes de plaquetas y de células endoteliales de pacientes con problemas cardiovasculares es mayor que en sanos (155, 156). En modelos de ratón de diabetes tipo II también se han detectado mayores niveles de VE en la circulación procedentes de

eritrocitos (143). Estas VE procedentes de células dañadas pueden causar efectos patológicos o dañinos en el microambiente celular que le rodea o afectar a otros órganos (157). Además, la doxorubicina estimula la secreción de exosomas *in vivo* de manera tiempo-dependiente (158) con expresión única de proteínas como la fosforilasa de glicógeno visible desde las 24 horas post-tratamiento que podría servir como biomarcador de daño cardíaco temprano inducido por doxorubicina (159). Así pues, debido a que el contenido y la cantidad de las VE depende del estado de las células donantes, del microambiente y de las condiciones patológicas, la estandarización de las condiciones en las que se recolectan las VE es de gran importancia.

Dado el papel de las VE como mediadores de la comunicación intercelular, son de gran interés como herramientas terapéuticas para la medicina personalizada y la terapia génica. A pesar de las ambigüedades, su uso ha llevado a un número creciente de casos clínicos y ensayos en los que utilizan VE autólogas, alogénicas o modificadas procedentes de diversas fuentes para tratar o diagnosticar diferentes enfermedades (160, 161).

8.2. Potencial terapéutico en cardiología y cardiotoxicidad

Existen estudios con VE procedentes de diferentes tipos celulares sobre la regeneración del tejido cardíaco dañado tanto *in vitro* como *in vivo*. Las VE procedentes de MSC son las más estudiadas actualmente, aunque también son de gran interés las VE procedentes de ESC, HSC, CSC o CPC, células derivadas de cardiosferas (CDC), EPC, plaquetas, cardiomiocitos, iPSC y cardiomiocitos derivados de las iPSC (iCM), iCM derivados de MSC procedentes de placenta humana amniótica (MiCM) y MSC derivados de las iPSC (iMSC) sobre la apoptosis, el crecimiento y diferenciación, la fibrosis, la angiogénesis y la inflamación del miocardio dañado (162-167).

8.3. Vesículas extracelulares procedentes de MSC (VE-MSC)

Existen numerosos estudios en los que concretamente se han estudiado las VE procedentes de MSC en el campo de la medicina cardíaca regenerativa, especialmente en el daño cardíaco. Estas VE tienen como diana tanto células maduras como células progenitoras residentes en el corazón, provocando sobre ellas alteraciones de las propiedades biológicas y funcionales, que llevan a la optimización y mantenimiento del nicho y a la regulación de la inflamación. Gnechi et al. evidenció por primera vez que la secreción celular de las MSC por sí sola mejora la función cardíaca al reducir el tamaño de infarto en un modelo animal de infarto agudo de miocardio (168). Las VE procedentes de MSC causan, *in vivo*, aumentos de las ratios ATP/ADP y NADH/NAD⁺ y reducciones de la inflamación sistémica, lo cual reduce el estrés oxidativo vía PI3K/Akt y estimula la viabilidad miocárdica (169). En un modelo de infarto agudo de miocardio en rata mostraron que el ambiente inflamatorio del tejido modula la retención de las células trasplantadas

Introducción

en los corazones isquémicos, y que administrando los exosomas junto con las MSC el día +3 post-tratamiento disminuye la inflamación y aumenta la retención de las MSC en el tejido cardíaco (170). La mejora del microambiente inflamatorio del miocardio puede deberse a que los exosomas procedentes de MSC regulan la actividad de los macrófagos, a la vez que reducen el estrés oxidativo de los cardiomiocitos y mejoran la función contráctil en ratones con cardiomiopatía dilatada (171). A través de su contenido, las VE estimulan o activan vías de señalización de cardioprotección y reparación endógena en enfermedades cardíacas, mediando acciones pro-angiogénicas, proliferativas, de diferenciación, anti-oxidativas, anti-apoptóticas, anti-fibróticas, anti-inmunogénicas y anti-inflamatorias (172).

Recientemente, se ha estudiado la habilidad de las VE-MSC para modificar las capacidades terapéuticas de otros tipos celulares, así como la terapia con VE procedentes de MSC modificadas. Las CSC co-cultivadas con VE procedentes de MSC modificadas previamente, cambiaron su perfil de expresión de miRNAs respecto a las CSC solas, y el trasplante de estas CSC modificadas causó, después de 28 días, un mejor resultado cardíaco en un modelo de rata con infarto de miocardio: menor fibrosis ventricular, mayor fracción de eyección y mayor densidad capilar comparado con las ratas tratadas con las CSC normales (173). Las VE derivadas de MSC con sobreexpresión de Akt mejoraron la función cardíaca en un modelo de rata con infarto de miocardio agudo, al promover la angiogénesis (174). De manera más efectiva que las VE de MSC normales, las VE procedentes de MSC con sobreexpresión del factor inhibitorio de la migración de los macrófagos (MIF) atenuaron el daño de los cardiomiocitos al ser capaces de inhibir la fragmentación mitocondrial que lleva a la producción de ROS y a la apoptosis (175).

HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta toda la información indicada en el apartado previo, la hipótesis principal que ha guiado este trabajo de Tesis Doctoral se basa en que sería posible desarrollar *in vitro* un modelo de daño miocárdico (relativamente agudo) inducido por doxorubicina (como agente cardiotóxico más paradigmático) estableciendo unas variables biológicas precisas que nos permitieran evaluar de forma fehaciente el potencial terapéutico o preventivo que, sobre este daño, pudieran ejercer las vesículas extracelulares procedentes de células mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea de donantes sanos, tras su eventual incorporación, y que ello nos permitiera analizar cuáles pudieran ser los mecanismos claves de este potencial efecto beneficioso.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar, en un modelo *in vitro* de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina, el potencial efecto terapéutico de la incorporación de vesículas extracelulares procedentes de células mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea de donantes sanos.

Objetivos específicos:

- 1º) Desarrollar y establecer un modelo *in vitro* de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina.
- 2º) Evaluar la potencial incorporación de vesículas extracelulares procedentes de células mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea de donantes sanos a los cardiomiocitos dañados con doxorubicina (y en condiciones basales) y la dinámica de dicha incorporación.
- 3º) Analizar el potencial efecto que ejerce la incorporación de dichas vesículas extracelulares en los cardiomiocitos dañados con doxorubicina (en comparación con cardiomiocitos basales) y los mecanismos por los que estos efectos pudieran inducirse.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Caracterización de los cardiomiocitos primarios murinos

1.1. Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos primarios murinos

Los reactivos y medios utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Material quirúrgico: tijeras, pinzas y tijeras de precisión
- ◆ Colagenasa tipo II (Gibco 17101015)
- ◆ ADS 10x (6,8 g NaCl, 120 mg Na₂HPO₄·2H₂O, 400 mg KCl, 197 mg MgSO₄·7H₂O, 1 g glucosa, 4,8 g Hepes en 100 mL) a pH 7,4 y filtrado a 0,22 µm a 37°C y a 4°C
- ◆ *Thermo-Shaker TS-100C* (BioSan)
- ◆ DMEM 4,5 gr/L D-Glucosa (Gibco 21068) suplementado con 10% de SBF (Gibco), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco)
- ◆ Placas de Petri
- ◆ Medio de cultivo para cardiomiocitos: 160 mL DMEM 1 g glc/L (Gibco 31885) suplementado con 10% de SBF, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, 50 mL medio M199 (Gibco 31150), 5 mM Hepes y 20 mL suero de caballo (*Biowest S0960*).
- ◆ Azul de tripano (Gibco)
- ◆ Gelatina (SIGMA G9391) al 0,02%
- ◆ Fibronectina (SIGMA F1141, 1:200)

Para el aislamiento de cardiomiocitos ventriculares se utilizaron ratones C57/BL6 neonatos de entre 1-3 días de edad. Para la extracción del corazón se procedió a la decapitación, se realizó un corte hacia arriba partiendo de debajo de las costillas y del esternón, se extrajo el corazón y se colocó en ADS 1x frío. Posteriormente, en condiciones de esterilidad, se pasaron los corazones a placas con nuevo ADS 1x frío y se separaron las aurículas de los ventrículos para realizar digestiones enzimáticas de estos últimos. Se realizaron pequeños cortes en los ventrículos con tijeras de precisión para que el tejido fuera más accesible a la enzima. Los ventrículos se digirieron con colagenasa tipo II, diluida 1:100 con ADS 1x, durante 15 minutos a 1100 rpm y 37°C en un *Thermo-Shaker*. A continuación, se resuspendieron con una pipeta para facilitar la disgregación de los tejidos y tras dejar que el tejido sedimentase, se recogió el sobrenadante en un tubo con 2 mL de medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con 4,5 g/L D-Glucosa, que se mantuvo a 37°C hasta el final del proceso de digestión del tejido cardíaco. Este procedimiento con colagenasa II se repitió dos veces más, de modo que se iban recogiendo las células presentes en el sobrenadante. Seguidamente se centrifugaron los sobrenadantes de las 3 digestiones a 800

Materiales y métodos

rpm durante 4 minutos y el pellet se resuspendió en 10 mL DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Las células procedentes de cada 3-4 ventrículos se sembraron en una placa de Petri durante 1,5-2 horas para permitir que los fibroblastos se adhiriesen al plástico. Este procedimiento se repitió de nuevo cambiando el sobrenadante con las células que no se habían adherido a una nueva placa de Petri. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes de las placas y se centrifugaron a 800 rpm durante 4 minutos. Tras descartar el sobrenadante, los cardiomiocitos se resuspendieron en 1mL de medio de cultivo para cardiomiocitos y se procedió a su conteo con azul de tripano (dilución 1:10). Los cardiomiocitos se sembraron en placas previamente tratadas con 0,02% gelatina y fibronectina (1:200) durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) y se mantuvieron con medio para cardiomiocitos a 37°C con 90% humedad y 5% de CO₂ durante toda la noche (ON). Al día siguiente se procedió a la realización de los diferentes experimentos. Este procedimiento está esquematizado en la Figura 11.

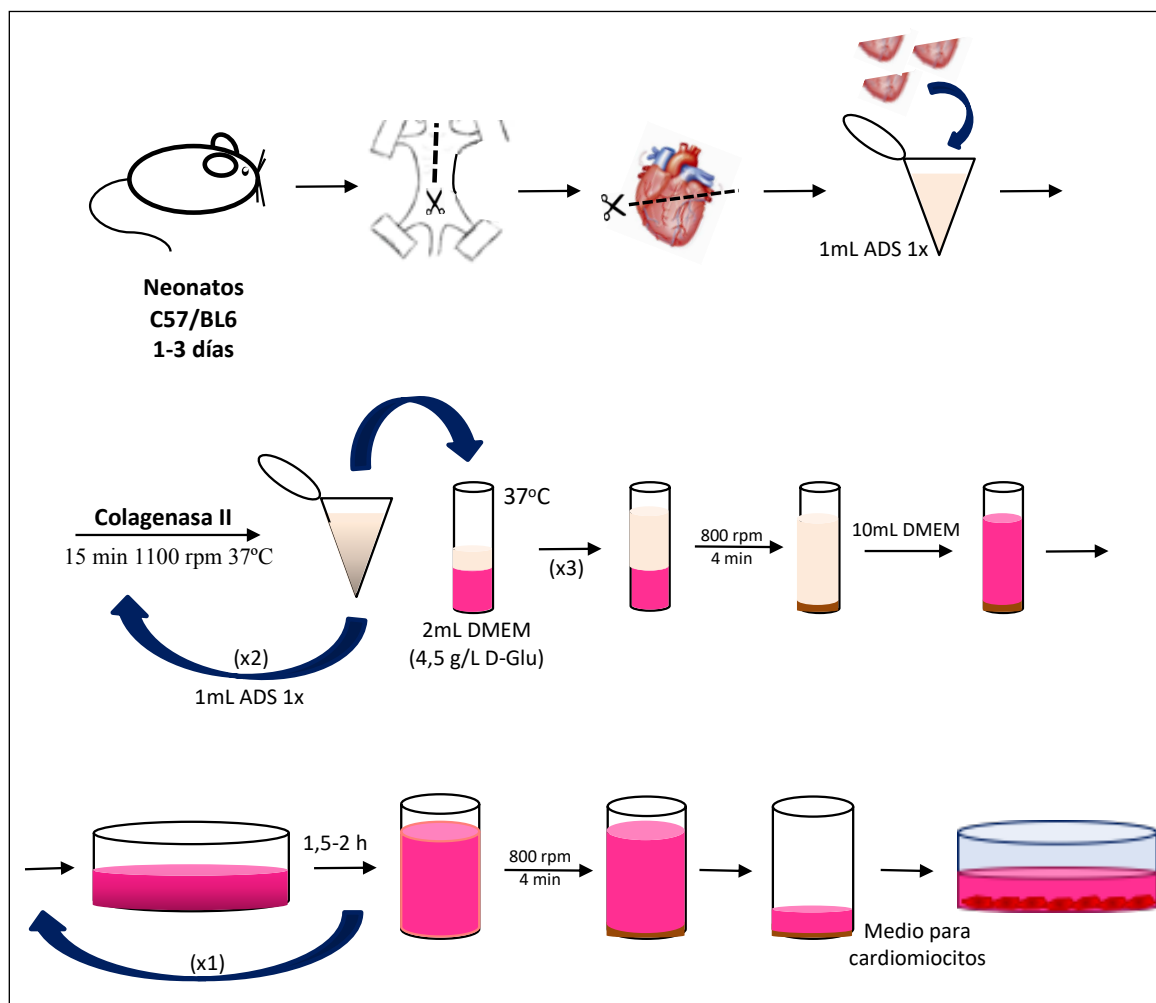


Figura 11. Representación esquemática del aislamiento y cultivo de los cardiomiocitos primarios murinos.

1.2. Marcadores de caracterización de los cardiomiocitos murinos

Con el objetivo de identificar y caracterizar los cardiomiocitos primarios murinos *in vitro* se llevaron a cabo estudios de citometría de flujo (CMF) e inmunofluorescencia (IF) (Fig. 12).

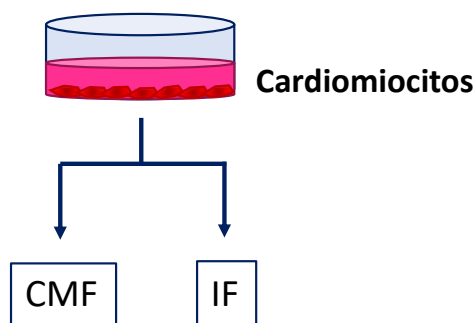


Figura 12. Representación esquemática de los estudios realizados para la identificación y caracterización de los cardiomiocitos primarios murinos.

1.2.1. Estudio de la caracterización mediante Citometría de flujo

Los materiales y reactivos utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Kit de permeabilización celular *Fix&Perm* (*An Der Grub*)
- ◆ Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD309 (FLK1) (*eBioscience*, 1:20) en APC
- ◆ Anticuerpo monoclonal recombinante de humano IgG1 anti- α -actinina (*Immunostep*, 1:10) en FITC
- ◆ Anticuerpo monoclonal de ratón anti-cTnT (*BD Bioscience*, 1:20) en PE
- ◆ PBS para citometría (*BD FACSTFlow™*)
- ◆ 7-AAD (*BD Bioscience*, 1:20) en PerCP
- ◆ Citómetro de flujo *FACSCalibur* (*BD Bioscience*)
- ◆ *Software Infinicyt* (*Cytognos*, Salamanca, España)

Con el objetivo de caracterizar los cardiomiocitos murinos mediante citometría de flujo, se tripsinizaron y se marcaron con un anticuerpo monoclonal de ratón APC anti-CD309 (FLK1) (1:20) durante 15 minutos en oscuridad a RT. Posteriormente sin lavar, las células se fijaron y permeabilizaron usando el kit de permeabilización celular *Fix&Perm*, y se marcaron con el anticuerpo monoclonal recombinante de humano IgG1 FITC anti- α -actinina sarcomérica (1:10) y el anticuerpo monoclonal de ratón PE anti-cTnT (1:20) durante 15 minutos en oscuridad a RT. Las células finalmente fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS) para citometría 5 minutos

Materiales y métodos

a 2000 rpm, e incubadas con PerCP 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (1:20) 5 minutos antes de ser adquiridas en el citómetro de flujo *FACSCalibur*. Se utilizó el correspondiente control de permeabilización sin marcar. Se adquirieron 20.000 eventos totales por condición y los datos fueron analizados empleando el *software Infinicyt*.

El panel empleado para el marcaje se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 1. Panel de citometría utilizado para caracterizar los cardiomiocitos primarios murinos.

	FITC	PE	PerCP	APC
Tubo control de permeabilización	-	-	-	-
Tubo marcado	α -actinina	troponina T	7-AAD	CD309

1.2.2. Estudio de la caracterización mediante Inmunofluorescencia

Los reactivos y materiales utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Solución de bloqueo (5% suero de mono, 5% BSA y 0,2% tritón, resuspendidos en PBS)
- ◆ PBS 1x (Gibco)
- ◆ Anticuerpo primario monoclonal anti- α -actinina sarcomérica (Abcam, 1:100)
- ◆ Anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con *Alexa Fluor 488* (Life Technologies, 1:500)
- ◆ DAPI (Life Technologies, 1:1000)
- ◆ Portaobjetos “Leica BOND Plus” (Leica Biosystems)
- ◆ Medio de Montaje *Vectashield H1000* (Vector Laboratories)
- ◆ Microscopio confocal de escaneo láser TCS SP5 (Leica Microsystems)

La tinción mediante inmunofluorescencia (IF) se empleó para identificar los cardiomiocitos murinos. Estos se tripsinizaron y fijaron en paraformaldehído al 4% durante 2 horas a 4°C. Seguidamente, se realizó un citospin para fijar 150.000 células en cada portaobjeto y se dejaron sumergidos en PBS a 4°C ON. Posteriormente, se lavaron con PBS 3 veces durante 10 minutos y se incubaron en solución de bloqueo durante 1 hora a RT en agitación y con humedad con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS 1x de 10 minutos y se incubaron las células con el anticuerpo primario monoclonal anti- α -actinina sarcomérica (1:100) a 4°C ON en agitación, oscuridad y humedad. Como control negativo, las células se incubaron con PBS 1x sin el anticuerpo primario. Tras 3 lavados con PBS

1x, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con *Alexa Fluor 488* (1:500) durante 2 horas a RT en movimiento, oscuridad y humedad. Los portaobjetos se lavaron de nuevo en PBS 1x 3 veces, se contrastaron los núcleos con DAPI (1:1000) durante 2,5 minutos a RT en agitación y se montaron directamente sobre un cubre con el medio de montaje. Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio confocal de escaneo láser TCS SP5.

El diseño del marcaje de los portaobjetos fue el siguiente:

- ◆ **Control de marcaje** (sin anticuerpo primario): solución de bloqueo + anticuerpo secundario conjugado con *Alexa Fluor 488* + DAPI
- ◆ **Porta marcado**: solución de bloqueo + anticuerpo anti- α -actinina sarcomérica + anticuerpo secundario conjugado con *Alexa Fluor 488* + DAPI

2. Establecimiento del modelo de daño por doxorubicina *in vitro*

La dosis de doxorubicina que se empleó en estos estudios *in vitro* se basó en las características farmacocinéticas del fármaco en humanos. La vida media de la doxorubicina en el plasma es de 20 - 48 horas y la concentración máxima plasmática (C_{max}) de 2-6 $\mu\text{g/ml}$. 1 μM es la concentración que la doxorubicina alcanza en el plasma de los pacientes sin sobrepeso 1 hora después de la infusión de una dosis única de 60 mg/m^2 de doxorubicina (176), de manera que elegimos esta concentración para nuestros experimentos ya que podría reflejar de manera objetiva lo que ocurre *in vivo*.

Con la finalidad de definir nuestro modelo de cardiotoxicidad *in vitro* y determinar el tiempo óptimo de tratamiento con la doxorubicina, realizamos estudios tratando los cardiomiocitos durante diferentes tiempos con 1 μM de doxorubicina y evaluamos la viabilidad celular y cuantificamos la presencia de TnT en el medio, así como las pulsaciones de los cardiomiocitos (Fig. 13). En todos los casos se sembraron $5 \cdot 10^4$ cardiomiocitos, y una vez adheridos al plástico se trataron con 1 μM de doxorubicina durante 1, 3, 6, 12 y 24 horas. Las pulsaciones se evaluaron tras 24 horas de tratamiento.

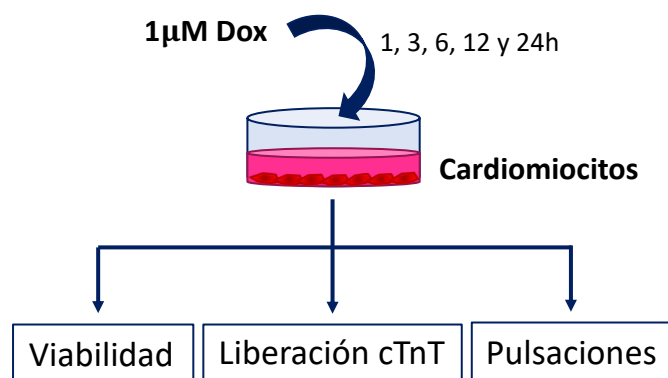


Figura 13. Representación esquemática de los estudios realizados para el establecimiento del modelo de cardiotoxicidad inducida por 1 µM de doxorubicina sobre los cardiomiocitos primarios murinos.

2.1. Estudio de la viabilidad celular mediante Citometría de flujo

Los reactivos y material utilizados fueron los siguientes:

- ◆ 1 µM Doxorubicina (SIGMA)
- ◆ Kit de detección de apoptosis con PE anti-Anexina V (*BD Bioscience*)
- ◆ PBS para citometría (*BD FACSTFlow™*)
- ◆ Citómetro de flujo *FACSCalibur* (*BD Bioscience*)
- ◆ *Software Infinicyt* (*Cytognos, Salamanca, España*)

Para evaluar la viabilidad celular se midió la expresión de Anexina V y 7-AAD. La Anexina V es una proteína que se utiliza para detectar células apoptóticas, debido a su capacidad para unirse a la fosfatidilserina, mientras que el 7-AAD se usa para la detección de células necróticas. En estado proliferativo o quiescente, las células presentan la fosfatidilserina en la membrana interna hacia el citosol. En cambio, durante las primeras fases de apoptosis, la fosfatidilserina se expone en el exterior de la membrana plasmática y es detectada por la Anexina V, marcando apoptosis temprana. En fases más tardías en las que se pierde la asimetría de la membrana plasmática, se descondensa el núcleo y se fragmenta el DNA, el 7-AAD es capaz de entrar en las células y unirse al DNA con gran afinidad. De este modo, las células serán positivas para ambos, Anexina V y 7-AAD, y marcarán apoptosis tardía. Cuando solo son positivas para 7-AAD, son células necróticas. El resto de células, es decir, la diferencia de la suma de células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necróticas, son células vivas.

Para realizar este estudio, los cardiomiocitos se tripsinizaron y se marcaron con Anexina V y 7-AAD usando el kit de detección de apoptosis con PE anti-Anexina V. Los cardiomiocitos se marcaron con Anexina V durante 15 minutos a RT en oscuridad, se lavaron con PBS a 2000 rpm durante 5 minutos y se marcaron con 7-AAD durante los 5 minutos previos a ser adquiridos en el citómetro de flujo *FACSCalibur*. Se utilizó el correspondiente control sin marcar. En todos los casos se adquirieron 20.000 eventos totales por muestra y los datos se analizaron a través del *software Infinicyt*. Las células viables se calcularon como la diferencia de las células apoptóticas y necróticas.

El diseño del marcaje fue el siguiente:

Tabla 2. Panel de citometría utilizado para evaluar la viabilidad de los cardiomiocitos.

	FITC	PE	PerCP	APC
Tubo control	-	-	-	-
Tubo marcado	-	Anexina V	7-AAD	-

2.2. Estudio de la liberación de troponina T cardíaca

Los reactivos y material utilizados fueron los siguientes:

- ◆ 1 μ M Doxorubicina (SIGMA)
- ◆ Test Elecsys Troponin T hs STAT (*Roche Diagnostics*)
- ◆ Analizador automático *Cobas e 601* (*Roche Diagnostics*)

La presencia de troponina T cardíaca en el medio de cultivo se utilizó como marcador de daño cardíaco agudo inducido por doxorubicina. Para ello, se empleó un inmunoensayo altamente sensible de electroquimioluminiscencia para cTnT (Elecsys Troponin T hs STAT). Dicho test comprende dos anticuerpos específicos que reconocen dos epítopos situados en la parte central de la proteína troponina T cardíaca. El test se basa en la unión de la muestra (antígeno) con un anticuerpo monoclonal anti-troponina T cardíaca biotinilado y un anticuerpo monoclonal anti-troponina T cardíaca marcado con quelato de rutenio, de manera que forman un complejo sándwich que reacciona con micropartículas recubiertas de estreptavidina. Por interacción entre la biotina y la estreptavidina, estas micropartículas se fijan por magnetismo a la superficie del electrodo, y al aplicar una corriente eléctrica se produce la reacción quimioluminiscente. En estos analizadores el límite inferior de detección de cTnT es de 5 pg/mL.

Materiales y métodos

Con el objetivo de cuantificar los niveles de TnT liberados al medio de cultivo tras los diferentes tiempos de tratamiento con doxorubicina, los cardiomiocitos se tripsinizaron y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante restante se recolectó para cuantificar la concentración de TnT cardíaca, en pg/mL, mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia altamente sensible de la cTnT con los analizadores automáticos *Elecsys* y *Cobas e*. Este análisis fue realizado por el Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario de Salamanca.

2.3. Medida de las pulsaciones de los cardiomiocitos primarios

El material utilizado fue el siguiente:

- ◆ 1 μ M Doxorubicina (SIGMA)
- ◆ Microscopio óptico
- ◆ Cronómetro

Una vez tuvimos los cardiomiocitos adheridos a la placa, contabilizamos los latidos por minuto de los cardiomiocitos sin tratar y tras 24 horas de tratamiento con doxorubicina, contando de manera manual con la ayuda de un cronómetro. El conteo se llevó a cabo sin cambiar el medio de cultivo. En cada muestra se realizaron entre 8 y 15 mediciones en diferentes campos elegidos al azar.

3. Caracterización e incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos primarios murinos

3.1. Cultivo de células estromales mesenquimales (MSC)

3.1.1. Aislamiento y expansión de las MSC

Los reactivos y medios utilizados fueron los siguientes:

- ◆ HBSS (Lonza)
- ◆ Ficoll-Paque (*GE Healthcare BioScience*)

- ◆ DMEM 1 g glc/L (Gibco 31885) suplementado con 10% de SBF y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen)
- ◆ *Flasks* de cultivo (Corning)
- ◆ PBS 1x (Gibco)
- ◆ Tripsina (Gibco)
- ◆ Solución de Türk
- ◆ Azul de tripano (Gibco)

A partir de aspirados de médula ósea (MO) de 18 donantes sanos (9 mujeres y 9 hombres) con una media de edad de 53 (rango de 26-81) se aislaron las células estromales mesenquimales (MSC). Las muestras de MO se diluyeron (dilución 1:3) con *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS). Las células mononucleadas (CMN) se aislaron mediante una separación por gradiente de densidad con Ficoll centrifugando a 1600 rpm durante 25 min con velocidades de aceleración y deceleración lentas. El ficoll se caracteriza por ser una solución de elevada densidad (densidad: 1.077k) con baja viscosidad y baja presión osmótica, de manera que mediante esta centrifugación obtuvimos diferentes capas celulares en función de su densidad, como se muestra en la figura 14. Se aislaron las CMN y, tras dos lavados de 10 minutos a 1200 rpm con HBSS, se resuspendieron en DMEM y se contaron con solución de Türk (dilución 1:100) para lisar los eritrocitos. Posteriormente, se sembraron las CMN a una densidad de 10^6 CMN/cm² en *flasks* con el medio de expansión DMEM 1 g glc/L suplementado con 10% de SBF y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Las CMN se mantuvieron a 37°C con 90% humedad y 5% de CO₂. El medio de las células fue renovado cada 3-4 días, de manera que se fueron eliminando las células no adherentes. Las MSC se aislaron debido a sus propiedades de adherencia a la superficie de plástico. Cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia, se tripsinizaron, se contaron con azul de tripano (dilución 1:100) y se sembraron a razón de 2500-5000 células/cm² en una superficie mayor con el fin de permitir su expansión. Se realizaron sucesivos pases desde el pase 1 (P1) hasta llegar al pase 6 (P6). Todos los experimentos se realizaron utilizando las MSC entre los pases 3 y 6, ya que es a partir del P3 cuando se considera que tenemos un cultivo puro de MSC. El procedimiento se ve representado esquemáticamente en la Figura 14.

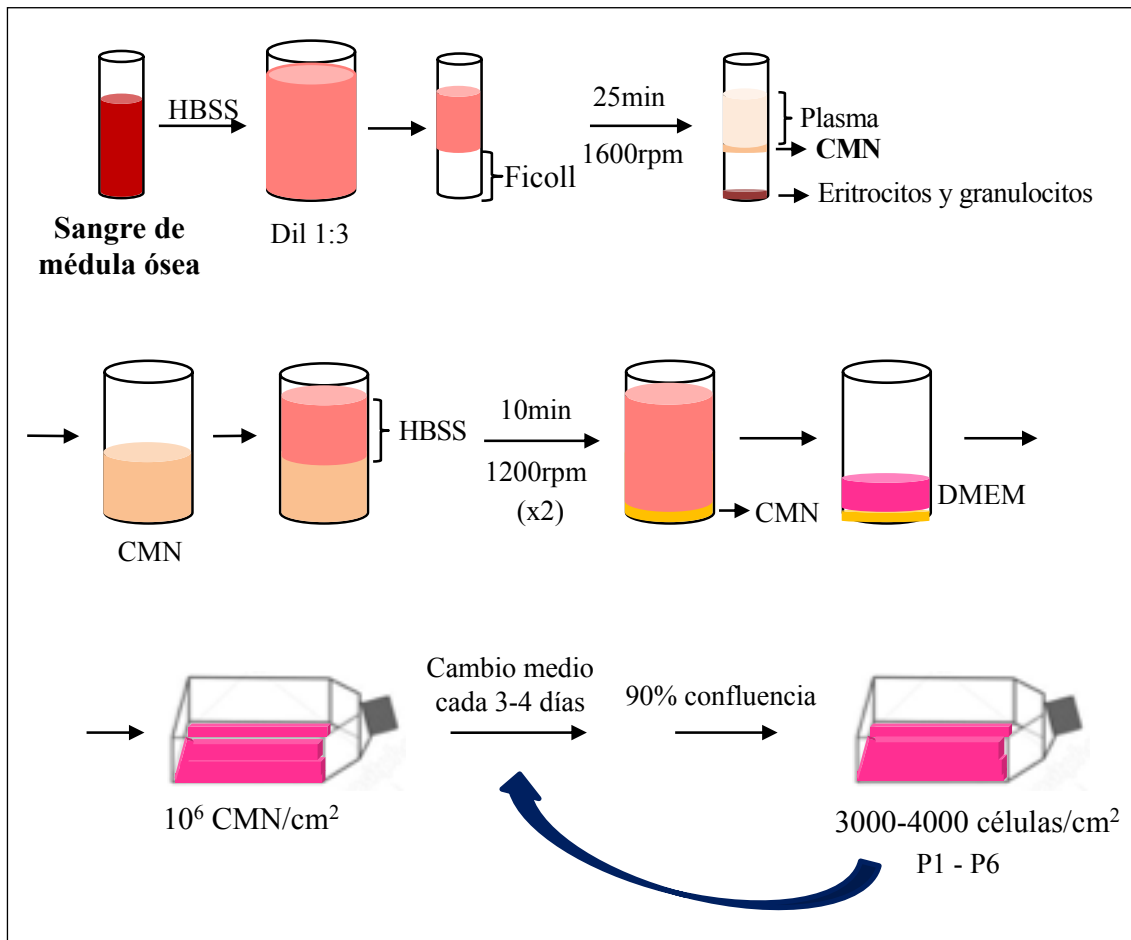


Figura 14. Representación esquemática del aislamiento y expansión de las MSC.

3.1.2. Caracterización de MSC

3.1.2.1. Caracterización de MSC mediante Citometría de flujo

Los materiales y reactivos utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Anticuerpos monoclonales humanos anti-CD90 (*BD Bioscience*), CD44 (*BD Bioscience*), CD34 (*eBioscience*) en FITC
- ◆ Anticuerpos monoclonales humanos anti-CD166 (*BD Bioscience*), CD14 (*Cytognos*) y CD73 (*BD Bioscience*) en PE
- ◆ Anticuerpo monoclonal humano anti-HLA-DR (*BD Bioscience*) en PerCP y anti-CD19 (*BD Bioscience*) y CD45 (*BD Bioscience*) en PerCP-Cy5.5
- ◆ Anticuerpo monoclonal humano anti-CD105 (*R&D Systems*) en APC
- ◆ 7-AAD (*BD Bioscience*, 1:20)
- ◆ PBS para citometría (*BD FACSTFlow™*)

- ◆ Citómetro de flujo *FACSCalibur* (*BD Bioscience*)
- ◆ *Software Infinicyt* (*Cytognos*, Salamanca, España)

Con el objetivo de caracterizar las MSC mediante citometría de flujo, $2 \cdot 10^5$ MSC se dividieron en 4 tubos para incubarse con un panel de anticuerpos monoclonales característicos de MSC (CD44, CD73, CD90, CD105 y CD166) así como anticuerpos negativos para éstas (CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR) en las concentraciones recomendadas por los fabricantes. Se incubaron durante 15 minutos en oscuridad a RT. Las células finalmente fueron lavadas con PBS para citometría 5 minutos a 2000 rpm, e incubadas con 7-AAD antes de ser adquiridas en el citómetro de flujo *FACSCalibur*. Se utilizó el correspondiente tubo control sin marcar. Se adquirieron 20.000 eventos totales por condición y los datos fueron analizados empleando el *software Infinicyt*.

El panel empleado para el marcaje fue el siguiente:

Tabla 3. Panel de citometría utilizado para caracterizar las MSC.

	FITC	PE	PerCP / PerCP-Cy5.5	APC
Tubo 1	CD90 (2 μ L)	CD166 (10 μ L)	HLA-DR (10 μ L)	-
Tubo 2	CD44 (10 μ L)	CD14 (10 μ L)	CD19 (10 μ L)	-
Tubo 3	CD34 (5 μ L)	CD73 (10 μ L)	CD45 (10 μ L)	CD105 (3 μ L)
Tubo 4	-	-	-	-
(control)	-	-	7-AAD (5 μ L)	-

3.1.2.2. Diferenciaciones de MSC *in vitro*

Una de las características que poseen las MSC humanas de MO es su capacidad de diferenciarse *in vitro* a diversas líneas celulares específicas incluyendo adipocitos (grasa) y osteoblastos (hueso), entre otros.

Diferenciación adipogénica

Los materiales y reactivos utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Placas Nunc de 9 cm² (*Thermo Fisher Scientific*)
- ◆ DMEM 1g glc/L (Gibco 31885) suplementado con 10% de SBF y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen)
- ◆ Medio de diferenciación adipogénica, Adipodiff (Lonza): medio de inducción *Adipogenic Induction SingleQuots* y medio de mantenimiento *Adipogenic Maintenance SingleQuots*
- ◆ Tinción de trabajo de Oil-Red-O (2 mL H₂O destilada + 3 mL tinción Oil-Red-O Stock (*Merck KGaA*) (al 5% en isopropanol)) filtrado a 0,22 µm
- ◆ Medio de Montaje *Vectashield H1000* (*Vector Laboratories*)
- ◆ Microscopio óptico (*Olympus BX41*)

Para poner de manifiesto la capacidad de diferenciación de las MSC a adipocitos, éstas se sembraron a razón de $2 \cdot 10^5$ células/cm² en placas de 9 cm² Nunc con el medio de expansión DMEM y se mantuvieron a 37°C con 90% humedad y 5% de CO₂. Cuando el cultivo llegó al 100% de confluencia, se cambió el medio DMEM por el medio de diferenciación a adipocitos (Adipodiff) como se observa en la Figura 15. Dos veces por semana se cambió el medio, alternando el medio de inducción y el de mantenimiento durante 21 días de cultivo. A continuación, las células se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 30-45 minutos y se llevó a cabo la tinción con el colorante Oil-Red-O. Para ello, se filtró la solución de trabajo de Oil-Red-O por un filtro de 0,22 µm y se dejó actuar durante 30-45 minutos a RT. Finalmente, a la placa Nunc se añadió el medio de montaje para sellar el cubre. La diferenciación a adipocitos se determinó mediante la apariencia morfológica de gotas o vacuolas lipídicas teñidas con una tonalidad rojiza-anaranjada brillante. Estas vacuolas se observaron y fotografiaron utilizando el microscopio óptico.



Figura 15. Representación esquemática del cultivo de MSC hasta la tinción de Oil-Red-O para evaluar la capacidad de diferenciación de las MSC a adipocitos.

Diferenciación osteogénica

Los materiales y reactivos utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Placas Nunc de 9 cm² (*Thermo Fisher Scientific*)
- ◆ DMEM 1g glc/L (Gibco 31885) suplementado con 10% de SBF y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen)
- ◆ Medio de diferenciación osteogénica, *NH Osteodiff Medium* (Miltenyi Biotec)
- ◆ Solución NBT/BCIP (*Roche Diagnostics*) a -20°C (se añade 3,75 µL BCIP y 50 µL NBT por cada 1 mL PBS)
- ◆ PBS 1x (SIGMA)
- ◆ Hematoxilina comercial (SIGMA)
- ◆ Medio de Montaje *Vectashield H1000* (*Vector Laboratories*)
- ◆ Microscopio óptico (*Olympus BX41*)

Con el fin de evaluar la capacidad de diferenciación de las MSC a osteoblastos, las MSC se sembraron a razón de $3 \cdot 10^4$ células/cm² en placas de 9 cm² Nunc por duplicado, una para el control y otra para la muestra, con el medio de expansión DMEM y se mantuvieron a 37°C con 90% humedad y 5% de CO₂. Cuando el cultivo llegó al 30-40% de confluencia, en el caso de los controles se mantuvo el medio DMEM, mientras que en las muestras el medio DMEM se cambió por el medio de diferenciación a osteoblastos (Osteodiff) como se observa en la Figura 16. En ambos casos, los medios se cambiaron dos veces por semana durante 10 días.

Tras el décimo día de cultivo, se realizó la tinción de la fosfatasa alcalina. Para ello, se retiró el medio de diferenciación o el medio DMEM, se lavó con PBS 1x y se añadió metanol a -20°C durante 5 minutos para fijar las células. Posteriormente, se lavó con PBS 1x y se tiñó la fosfatasa alcalina mediante la solución NBT/BCIP, la cual se dejó actuar en agitación y RT hasta ver una tinción marrón. Se lavó con PBS 1x y se contrastaron los núcleos con hematoxilina incubando las células durante 1 minuto. Finalmente, se lavó con agua y se añadieron unas gotas del medio de montaje para colocar y sellar el cubre. La diferenciación a osteoblastos se observó mediante la morfología poligonal y la tinción con un tono morado oscuro, mientras que el fondo de la tinción era de una tonalidad lila. Estas características se observaron y fotografiaron utilizando el microscopio óptico.

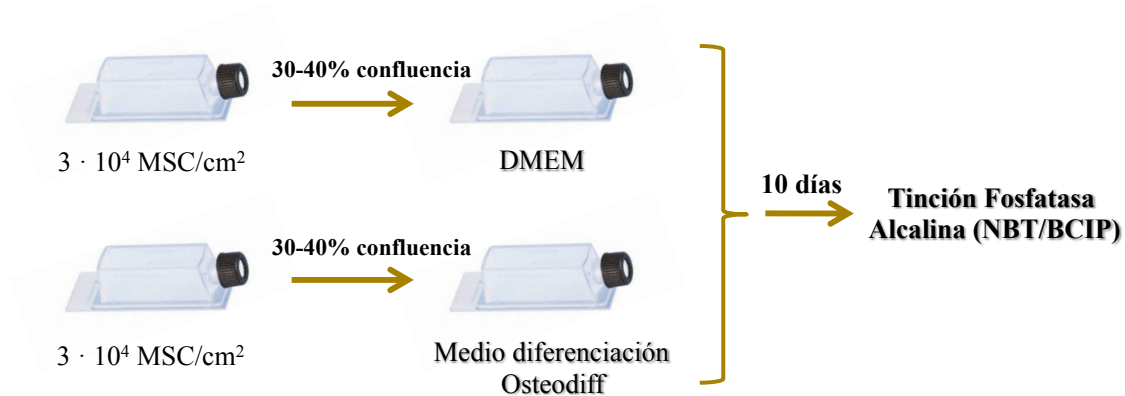


Figura 16. Representación esquemática del cultivo de MSC hasta la tinción de Fosfatasa Alcalina para evaluar la capacidad de diferenciación de las MSC a osteoblastos.

3.2. Aislamiento y marcaje de vesículas extracelulares de MSC

Los medios utilizados fueron los siguientes:

- ◆ PBS 1x (SIGMA)
- ◆ RPMI 1640 (Gibco 21875)
- ◆ Antibiótico (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, Gibco)
- ◆ DMSO (WAK-Chemie Medical)
- ◆ Colorante rojo *Fluorescent Dye Vybrant Dil* (Life Technology V22885)
- ◆ Tubos de ultracentrífuga de policarbonato de 26,3 mL de capacidad con tapón (*Beckman Coulter*)
- ◆ Rotor tipo 70 Ti de titanio con ángulo fijo (*Beckman*)
- ◆ Ultracentrífuga (*Beckman Coulter*)

Para el aislamiento de VE, las MSC se expandieron desde el P3 hasta el P6 con el fin de obtener un número de células suficiente. Cuando las MSC presentaron una confluencia de 50-60%, se lavaron con PBS y se añadió RPMI con antibiótico sin SBF. La privación de SBF se llevó a cabo con la finalidad de que las MSC liberen una mayor cantidad de VE al sobrenadante. Se incubaron ON a 37°C con 90% humedad y 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 3000 g durante 20 minutos para eliminar las células y restos celulares. El sobrenadante se ultracentrifugó a 39000 rpm durante 70 minutos a 4°C para recolectar las VE, siguiendo el protocolo de Théry et al (2006) (177). Para la ultracentrifugación se utilizó un rotor tipo 70 Ti de titanio de ángulo fijo y tubos estériles de ultracentrífuga de policarbonato de 26,3 mL de capacidad con tapón, en los que se aislaron las VE de las MSC. Las

VE se resuspendieron en 150 μ L de RPMI con 1% de dimetil sulfóxido (DMSO) y finalmente, se congelaron a -80°C (Fig. 17).

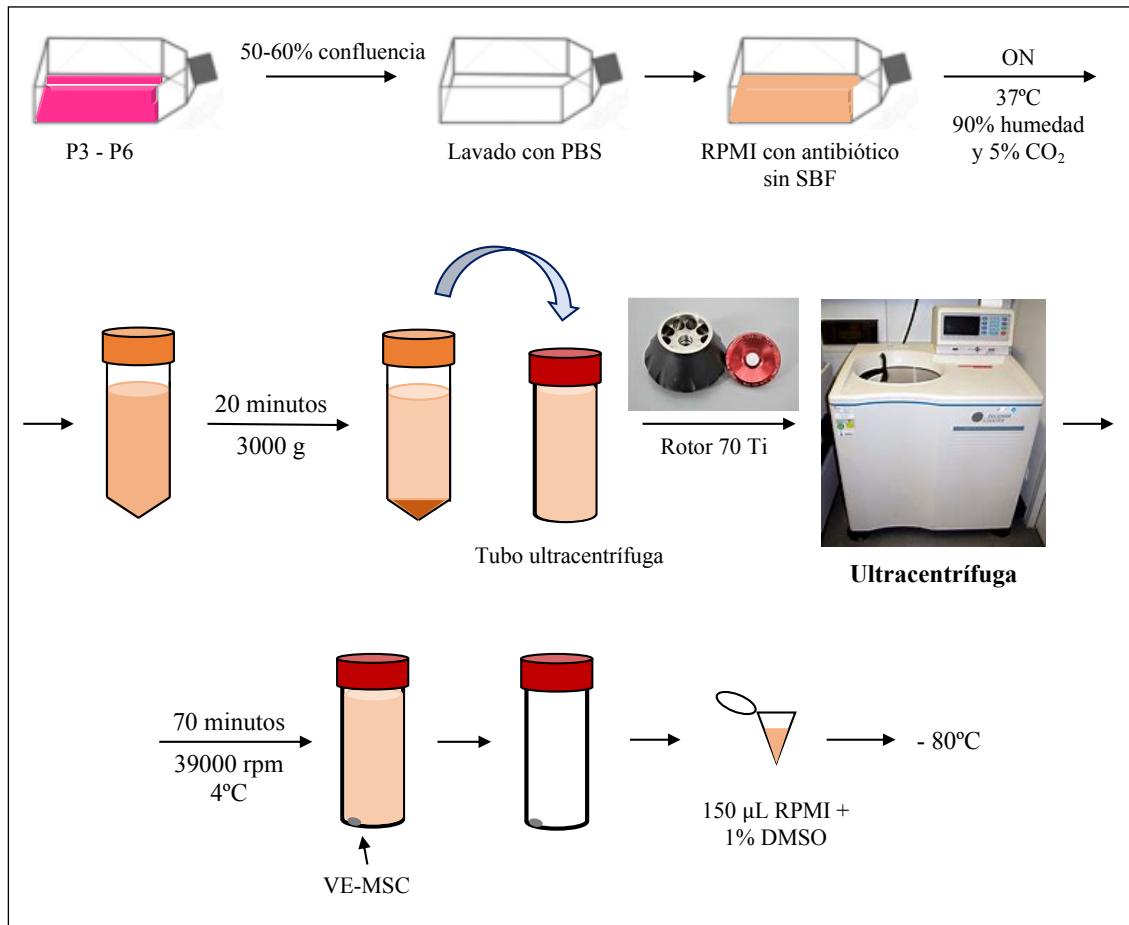


Figura 17. Representación esquemática del procedimiento de aislamiento de las VE-MSC mediante ultracentrifugación.

Con la finalidad de analizar su incorporación en los cardiomiocitos, las VE se marcaron con un colorante fluorescente. Para ello, se añadió dicho colorante (*Vybrant Dil*) al pellet de las VE obtenidas en la primera ultracentrifugación. Nuevamente, se centrifugó en las mismas condiciones, se retiró el sobrenadante y se ultracentrifugó con PBS con el fin de eliminar el exceso de *Vybrant Dil*. Como control se ultracentrifugó un tubo con RPMI y *Vybrant Dil* sin VE. Los pellets finales se resuspendieron en 150 μ L de RPMI con 1% DMSO y se guardaron a -80°C hasta su uso (Fig. 18).

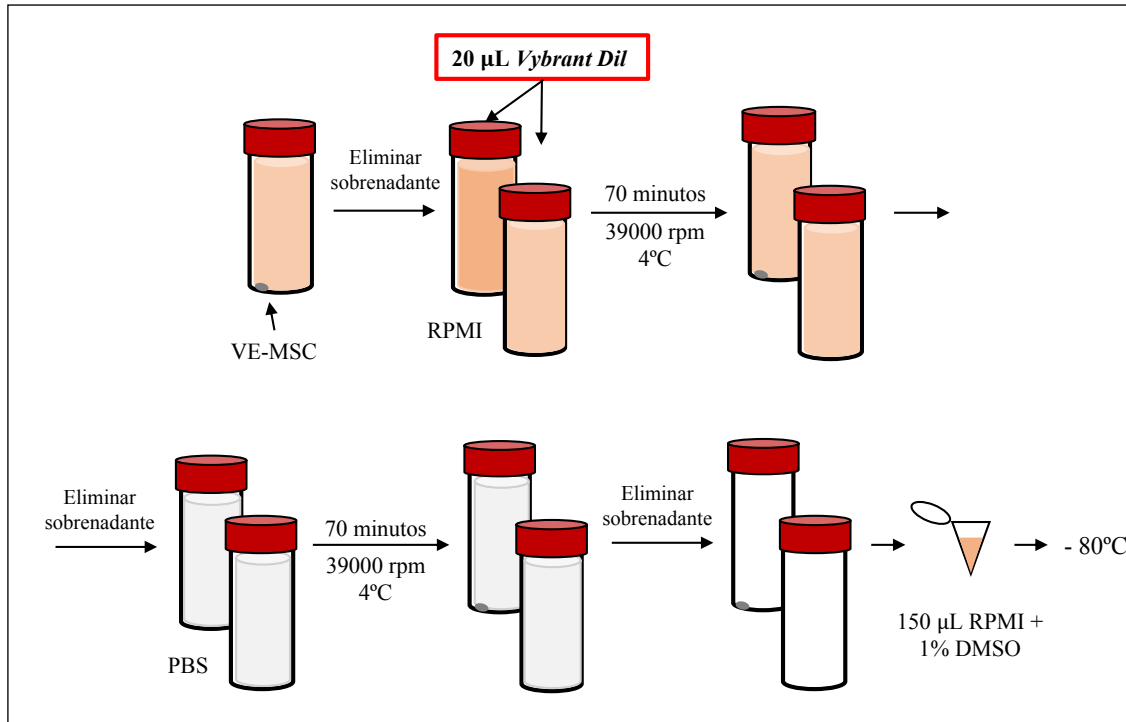


Figura 18. Representación esquemática del procedimiento de marcaje de las VE-MSC mediante el colorante rojo *Vybrant Dil*.

3.3. Caracterización de las vesículas extracelulares procedentes de las MSC

3.3.1. Microscopía Electrónica de Trasmisión (MET)

Con el objetivo de caracterizar las VE procedentes de MSC, las VE se lavaron con PBS doblemente filtrado y se resuspendieron en 50 µL de PBS. Posteriormente, se fijaron en 2% de paraformaldehído y 1% de glutaraldehído y se contrastaron con solución de uranil oxalato. Las imágenes fueron capturadas usando un microscopio de transmisión de electrones (*FEITecnai G2 spirit BioTwin*) asociado a una cámara digital (*Soft Imaging Syste, Olympus*). Este protocolo fue realizado por la Universidad Autónoma de Madrid.

3.3.2. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

La tecnología NTA se utiliza para visualizar, analizar y calcular la concentración y dimensiones de nanopartículas aproximadamente de entre 10 nm y 2 µm de diámetro suspendidas en líquidos, ya que relaciona la velocidad del movimiento browniano con el tamaño de las partículas.

Por ello, con el fin de evaluar la cantidad de partículas/mL y la distribución de tamaños de dichas partículas, el pellet de las VE se diluyó en 1 mL de suero fisiológico y se envió al Servicio Científico-Técnico de “Materiales Blandos” del Instituto de Barcelona (ICMAB-CSIC), para realizar las medidas correspondientes. La dilución de la muestra fue de 1:100. La adquisición se llevó a cabo a una temperatura de 23,4 – 23,6°C y viscosidad de 0,918 – 0,923 cP. Se realizaron 25 imágenes/segundo durante 1 minuto, estableciendo el umbral en 5. Se hicieron triplicados de las muestras y se calculó la media de éstos $\pm$ la desviación estándar. Este análisis se llevó a cabo usando un equipo *NanoSight NS300* (*NanoSight Ltd, UK*) acoplado a una cámara sCMOS y el *software* de análisis NTA 3.1.

3.4. Estudio de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos primarios murinos

Con el objetivo de estudiar la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos y determinar el tiempo óptimo de su incorporación, llevamos a cabo co-cultivos. Para ello, se sembraron $7,5 \cdot 10^4$ cardiomiocitos en placas de 24 pocillos y se mantuvieron con medio para cardiomiocitos. Posteriormente, se co-cultivaron directamente con 30-50 μ g de VE-MSC marcadas con el colorante *Vybrant Dil*, como se observa en la Figura 19, y se estudió la incorporación de las VE mediante citometría de flujo a diferentes tiempos (1, 3, 6 y 24 horas) e inmunofluorescencia a las 24 horas.

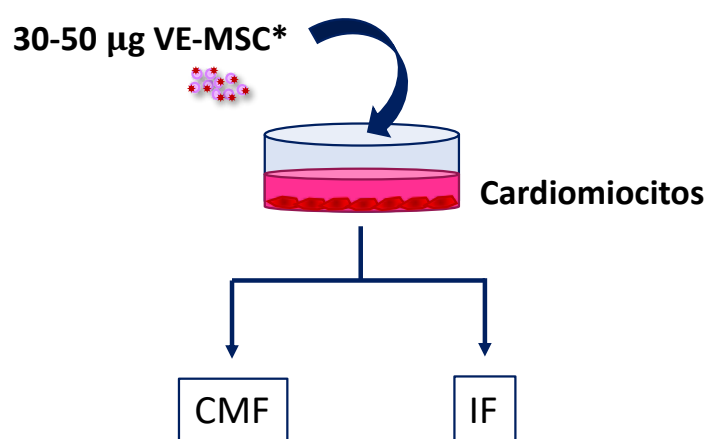


Figura 19. Esquema de los co-cultivos de cardiomiocitos primarios murinos y VE-MSC marcadas con el colorante *Vybrant Dil* así como de los estudios realizados para evaluar la incorporación de las VE-MSC y determinar el tiempo óptimo de estudio.

Materiales y métodos

3.4.1. Determinación del tiempo óptimo de incorporación de las VE-MSD en los cardiomiocitos mediante Citometría de flujo

Los reactivos y material utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Kit de permeabilización celular *Fix&Perm (An Der Grub)*
- ◆ Anticuerpo monoclonal recombinante de humano IgG1 anti- α -actinina (*Immunostep*, 1:10) en FITC
- ◆ PBS para citometría (*BD FACSTFlow™*)
- ◆ Citómetro de flujo *FACSCalibur (BD Bioscience)*
- ◆ *Software Infinicyt (Cytognos, Salamanca, España)*

Con el objetivo de evaluar la incorporación de las VE en los cardiomiocitos murinos y determinar el tiempo óptimo de incorporación, realizamos estudios por citometría de flujo. Los cardiomiocitos se co-cultivaron durante diferentes tiempos (1, 3, 6 y 24 horas) en tres condiciones diferentes:

- Cardiomiocitos solos (tubos 1 y 2)
- Cardiomiocitos con RPMI teñido con el colorante *Vybrant Dil* (control) (tubos 3 y 4)
- Cardiomiocitos con 30-50 μ g de VE marcadas con *Vybrant Dil* (tubos 5 y 6).

Transcurridos los tiempos, los cardiomiocitos se recogieron para su posterior fijación y permeabilización. A continuación, se marcaron con el anticuerpo monoclonal recombinante de humano IgG1 FITC anti- α -actinina sarcomérica durante 15 minutos a RT en oscuridad. Finalmente, se lavaron con PBS a 2000 rpm durante 5 minutos y se adquirieron 20.000 eventos por el citómetro de flujo *FACSCalibur*. Los datos fueron analizados a través del *software Infinicyt*. El análisis se realizó corrigiendo al valor del porcentaje de incorporación de las VE en los cardiomiocitos el valor de la señal de los cardiomiocitos cultivados con medio y con RPMI teñido.

El diseño del marcaje se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 4. Panel de citometría para evaluar el tiempo óptimo de incorporación de las VE en los cardiomiocitos murinos en las diferentes condiciones de estudio.

		FITC	PE	PerCP	APC
Cardiomiocitos	Tubo 1	-	-	-	-

	Tubo 2	α -actinina	-	-	-
Cardiomiocitos con RPMI teñido	Tubo 3	-	<i>Vybrant Dil</i>	-	-
	Tubo 4	α -actinina	<i>Vybrant Dil</i>	-	-
Cardiomiocitos con VE-MSc marcadas con <i>Vybrant Dil</i>	Tubo 5	-	<i>Vybrant Dil</i>	-	-
	Tubo 6	α -actinina	<i>Vybrant Dil</i>	-	-

3.4.2. Inmunofluorescencia de los cardiomiocitos primarios que han incorporado VE

Los reactivos y material utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Solución de bloqueo (5% suero de mono, 5% BSA y 0,2% tritón, resuspendidos en PBS)
- ◆ PBS 1x (SIGMA)
- ◆ Anticuerpo primario monoclonal anti- α -actinina sarcomérica (Abcam, 1:100)
- ◆ Anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con *Alexa Fluor 488* (Life Technologies, 1:500)
- ◆ DAPI (Life Technologies, 1:1000)
- ◆ Portaobjetos “Leica BOND Plus” (Leica Biosystems)
- ◆ Medio de Montaje *Vectashield H1000* (Vector Laboratories)
- ◆ Microscopio confocal de escaneo láser TCS SP5 (Leica Microsystems)

La inmunofluorescencia se realizó con el fin de estudiar la incorporación en los cardiomiocitos murinos tras 24 horas de co-cultivo con VE procedentes de MSC teñidas con el colorante *Vybrant Dil*. El procedimiento llevado a cabo para realizar la inmunofluorescencia, así como el diseño del marcaje se describen en el apartado de caracterización de los cardiomiocitos 1.2.2.

4. Estudios funcionales de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos primarios para la prevención de la cardiotoxicidad

Con el objetivo de evaluar la incorporación de las VE-MSC en la prevención del daño sobre los cardiomiocitos primarios tratados con doxorubicina, se co-cultivaron $5 \cdot 10^4$ cardiomiocitos por con 30 μ g VE-MSC. Una vez adheridos al plástico, los cardiomiocitos se trataron con 1 μ M de doxorubicina en presencia o ausencia de VE-MSC y se llevaron a cabo los respectivos estudios tras los tiempos de tratamiento mencionados en la Figura 20.

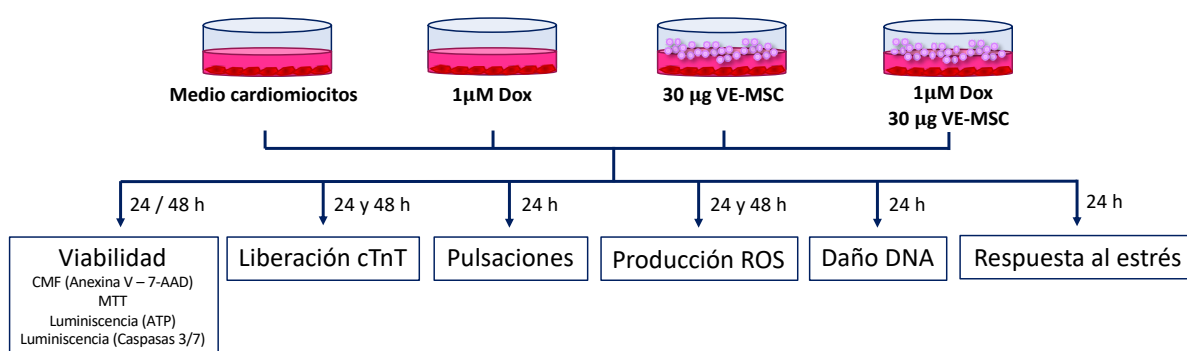


Figura 20. Representación esquemática de los diferentes estudios realizados para la evaluación funcional de la incorporación de las VE-MSC en la prevención de la cardiotoxicidad inducida por la doxorubicina sobre los cardiomiocitos primarios murinos *in vitro*.

4.1. Viabilidad y muerte celular

4.1.1. Estudio de la muerte y viabilidad celular mediante Citometría de flujo

Los reactivos y material utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Kit de detección de apoptosis con PE anti-Anexina V (*BD Bioscience*)
- ◆ Citómetro de flujo *FACSCalibur* (*BD Bioscience*)
- ◆ *Software Infinicyt* (*Cytognos*, Salamanca, España)

El estudio de la apoptosis, necrosis y viabilidad se realizó 24 y 48 horas post-tratamientos. Para ello, se siguieron los pasos descritos en el apartado 2.1. usando el kit de detección de apoptosis con PE anti-Anexina V. Los datos se expresaron como porcentaje de Anexina V⁺ (células

apoptóticas en fase temprana), porcentaje de Anexina V⁺/7-AAD⁺ (células apoptóticas en fase tardía), porcentaje de Anexina V⁺ + porcentaje de Anexina V⁺/7-AAD⁺ (apoptosis total), porcentaje de 7-AAD⁺ (células necróticas) y porcentaje de viabilidad (diferencia del conjunto de apoptosis total y necrosis).

4.1.2. Estudio de la viabilidad celular mediante MTT

Los reactivos y material utilizados fueron los siguientes:

- ◆ 50 mg MTT (SIGMA)
- ◆ 10% Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)
- ◆ Espectrofotómetro (Tecan)

Se realizaron estudios de viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este ensayo permite evaluar la actividad metabólica de las células a través de la actividad de las enzimas oxidoreductasas mitocondriales dependientes de NAD(P)H que reducen el MTT a un compuesto colorado de color púrpura (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. De esta manera, la cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células vivas.

Transcurrido el tiempo de tratamiento, se añadieron 20 μ L/pocillo de MTT, se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas en oscuridad con el fin de permitir la formación de cristales de formazán y se añadieron 200 μ L/pocillo de SDS al 10% para romper las células y disolver los cristales de formazán. Pasadas 24 horas, se cuantificó la viabilidad celular en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570-630 nm (Fig. 21). Las curvas de proliferación se realizaron corrigiendo al valor de absorbancia de las células el valor de absorbancia del medio de cultivo.

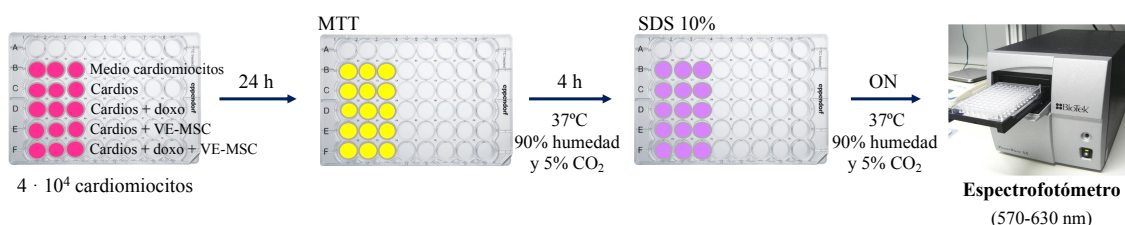


Figura 21. Representación esquemática del procedimiento del estudio de la viabilidad mediante MTT.

Materiales y métodos

4.1.3. Estudio de la viabilidad celular mediante Luminiscencia

Los reactivos y material utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Kit de luminiscencia de viabilidad celular *CellTiter-Glo*[®] (Promega)
- ◆ Placas opacas de 96 pocillos (Corning)
- ◆ Luminómetro Synergy 4 (*Biotec*)

El ensayo de luminiscencia, se basa en cuantificar, a través de una luciferasa termoestable (*Ultra-Glo*[™] *Recombinant Luciferase*), la cantidad de ATP presente, ya que, al ser directamente proporcional a la cantidad de células presentes, indica la cantidad de células metabólicamente activas. La luciferasa genera una señal de luminiscencia estable con una vida media mayor a 5 horas.

Tras el tratamiento durante 24 y 48 horas, se añadió el reactivo *CellTiter-Glo*[®] *Reagent*. Se agitó la placa durante 2 minutos y posteriormente se incubó durante 10 minutos a RT en oscuridad, tras los cuales se leyó la luminiscencia a una longitud de onda de 560 nm, medida en unidades relativas de luz (RLU), en el luminómetro Synergy 4 (Fig. 22). Los valores de todas las condiciones se corrigieron restando la luminiscencia del medio de cultivo sin células.

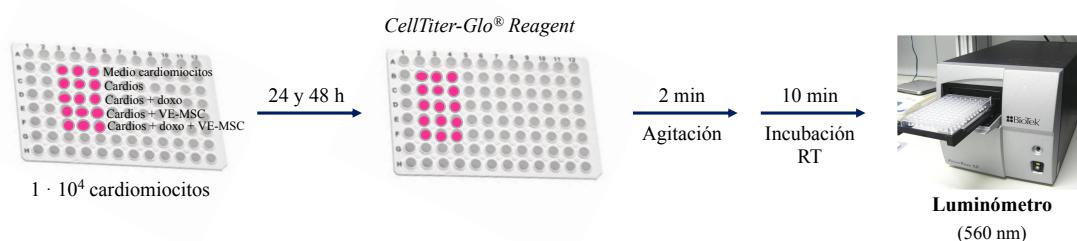


Figura 22. Representación esquemática del procedimiento del estudio de la viabilidad mediante un ensayo de luminiscencia.

4.1.4. Estudio de la apoptosis mediante medición de caspasas

Los reactivos y material utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Kit de *Caspase-Glo*[®] 3/7 *Assay* (Promega)
- ◆ Placas opacas de 96 pocillos (Corning)
- ◆ Luminómetro Synergy 4 (*Biotec*)

Con el fin de evaluar la apoptosis mediante la actividad de las caspasas 3/7, se empleó el kit de detección de luminiscencia para las caspasas 3/7. Este ensayo se basa en la generación de un

sustrato fluorescente a través de las actividades de las caspasas 3 y 7, de manera que la cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a las actividades de las caspasas 3 y 7.

Para llevar a cabo este ensayo, los cardiomiocitos se trataron con 1 μ M de doxorubicina y con o sin VE durante 24 horas. Tras este tiempo, se añadió el reactivo *Caspase-Glo® 3/7 Reagent*, se agitó la placa durante 30 segundos y se incubó a RT durante 30 minutos en oscuridad, tras los cuales se leyó la luminiscencia a una longitud de onda de 510-570 nm, expresada en unidades relativas de luz (RLU), en el luminómetro Synergy 4 (Fig. 23). Los valores de todas las condiciones se corrigieron restando la luminiscencia del medio de cultivo sin células.

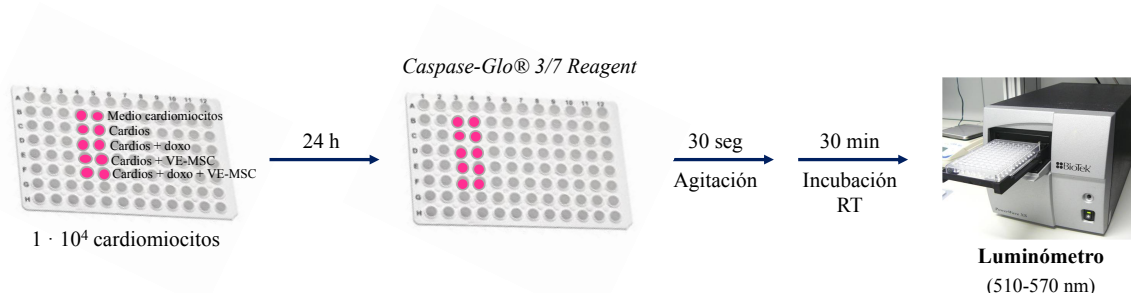


Figura 23. Representación esquemática del procedimiento del estudio de la apoptosis mediante un ensayo de luminiscencia.

4.2. Medida de las pulsaciones de los cardiomiocitos primarios

El material utilizado fue el siguiente:

- ◆ Microscopio óptico
- ◆ Cronómetro

Los latidos por minuto se contaron de manera manual en todas las condiciones: cardiomiocitos sin tratar, tratados con 1 μ M de doxorubicina, tratados con VE-MSC y tratados con ambos, doxorubicina y VE-MSC.

4.3. Liberación de troponina T cardíaca

Los reactivos y material utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Test Elecsys Troponin T hs STAT (*Roche Diagnostics*)
- ◆ Analizador automático *Cobas e 601* (*Roche Diagnostics*)

Materiales y métodos

La cuantificación de los niveles de cTnT en el medio de cultivo se llevó a cabo siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 2.2. En este caso los grupos de tratamiento fueron los siguientes:

- Cardiomiocitos sin tratamiento
- Cardiomiocitos tratados con 1 μ M de doxorubicina
- Cardiomiocitos tratados con VE-MS
- Cardiomiocitos tratados con doxorubicina y VE-MS

4.4. Detección de los niveles intracelulares de ROS

Los reactivos y material utilizados fueron los siguientes:

- ◆ H₂DCF-DA (Sigma-Aldrich)
- ◆ Citómetro de flujo *FACSCalibur* (BD Bioscience)
- ◆ *Software Infinicyt* (Cytognos, Salamanca, España)

Uno de los principales mecanismos de cardiotoxicidad que provoca la doxorubicina es la sobreproducción de ROS, la cual causa un elevado nivel de estrés oxidativo en las células del tejido muscular cardíaco.

Para estudiar el daño producido por el estrés oxidativo, se analizó mediante el agente permeabilizante diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF-DA), un colorante fluorogénico que mide actividades de hidroxilos, peroxilos y otras especies reactivas al oxígeno (anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogeno (H₂O₂), radicales hidroxilos (HO[•]) y oxígeno molecular (O₂)) presentes en las células. Después de difundir en la célula, los grupos acetilos de H₂DCF-DA se escinden por la acción de esterasas intracelulares para producir un compuesto no fluorescente que se oxida rápidamente por ROS a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), un compuesto altamente fluorescente. De esta manera, la intensidad de fluorescencia es proporcional a los niveles intracelulares de ROS y se puede detectar mediante citometría de flujo.

Tras el tratamiento de los cardiomiocitos, se añadió 10 μ M de H₂DCF-DA a los cardiomiocitos, y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en 90% humedad y 5% de CO₂ en oscuridad (Fig. 24). La generación de ROS se detectó a través de la señal de fluorescencia en FITC y se midió mediante citometría de flujo usando un citómetro *FACSCalibur*, a través del cual se adquirieron 20.000 células por muestra. Los datos se analizaron a través del programa *Infinicyt* y los valores se expresaron en Intensidad Media de Fluorescencia (MFI).

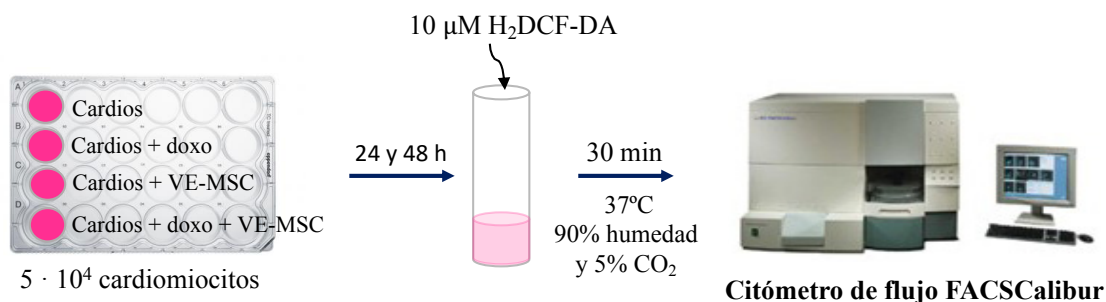


Figura 24. Representación esquemática del procedimiento para la detección de los niveles intracelulares de ROS.

4.5. Ensayo de daño en el DNA

Los reactivos y material utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Kit DNA MultiColor Muse™ (Millipore)
- ◆ Citómetro Muse (Millipore)

Como la formación de niveles elevados de estrés oxidativo y el aumento del daño en el DNA están directamente relacionados, ya que una mayor producción de ROS provoca un aumento en el daño del DNA y viceversa, decidimos estudiar el daño en el DNA.

Para ello, se empleó el kit de daño en el DNA *MultiColor Muse™*. Cuando las células presentan roturas de doble hebra en el DNA se activa la quinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM) y desencadena la activación de p53 y de la histona H2A.X, entre otros factores. A medida que el daño en el DNA incrementa, los niveles de la histona H2A.X fosforilada aumentan y se acumula en el sitio del daño, de manera que es un indicador de los niveles de daño en el DNA presente en la célula. Este ensayo permite medir de manera específica la activación por fosforilación de ambas proteínas, la ATM (fosforilada en la Ser1981) en PE y la histona H2A.X (fosforilada en la Ser139, γ -H2A.X) en PECy5.

Para la detección del daño en el DNA, los cardiomiocitos se tripsinizaron, se fijaron y permeabilizaron durante 10 minutos en hielo, y finalmente, se marcaron con ambos anticuerpos, el anticuerpo PE anti-fosfo-ATM(S1981) y el PECy5 anti- γ -H2A.X(S139) y se incubaron durante 30 minutos a RT en oscuridad (Fig. 25). Las muestras fueron adquiridas en el citómetro Muse siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos fueron generados a través del programa *MultiColor DNA Damage*, el cual proporciona los valores estadísticos midiendo el porcentaje de

Materiales y métodos

células negativas (sin daño), el porcentaje de células con la quinasa ATM activada, el porcentaje de células con la histona H2A.X activada y el porcentaje de roturas dobles en el DNA (activación dual de ATM y H2A.X) y el porcentaje de daño total en el DNA.

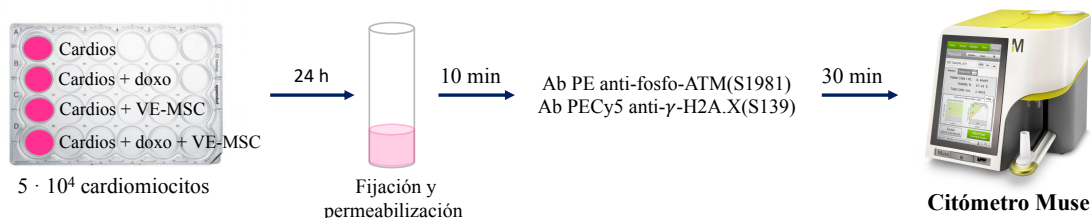


Figura 25. Representación esquemática del procedimiento para la detección de los niveles de daño en el DNA.

4.6. Análisis de expresión génica de p21 mediante RT-PCR

Los reactivos y material utilizados fueron los siguientes:

- ◆ Trizol (Invitrogen)
- ◆ *Nanodrop ND-1000* (*Thermo Fisher*)
- ◆ *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*)
- ◆ *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix(2x), No AmpErase™* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*)
- ◆ *Primers* de los genes p21 y β -actina (*Thermo Fisher*)
- ◆ Termociclador PCR (*Eppendorf*)
- ◆ Termociclador *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*)

Para evaluar los niveles de expresión del gen p21, relacionado con la respuesta celular al estrés, se aisló y cuantificó el RNA de cardiomiocitos co-cultivados en las diferentes condiciones y se realizó una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa a tiempo real (RT-PCR) (Fig. 26).

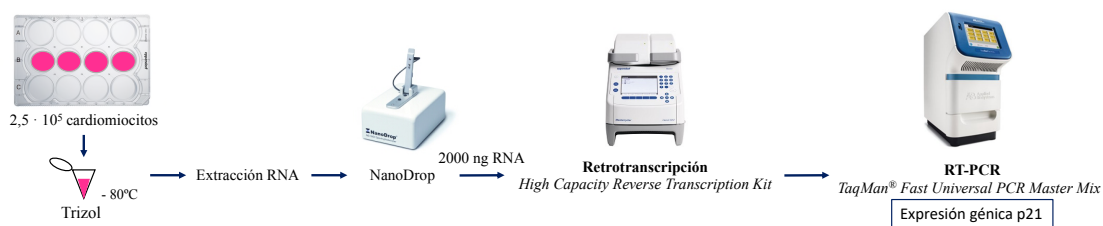


Figura 26. Representación esquemática del proceso de análisis de la expresión génica de p21 mediante RT-PCR.

Para aislar el RNA de los cardiomiocitos, se resuspendieron en 500 μ L de Trizol y se guardaron a -80°C. El RNA total se extrajo mediante el método tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (178) y se midió la concentración de RNA en cada muestra a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (*Nanodrop ND-1000*).

A continuación, se realizó la retro-transcripción (179). Para ello, se utilizaron 2000 ng de RNA total empleando el kit *High Capacity Reverse Transcription Kit* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción se preparó con los reactivos referidos en la siguiente tabla:

Tabla 5. Reactivos del kit *High Capacity Reverse Transcription*.

Reactivos	Volumen (x1)
H ₂ O destilada	3,2 μ L
Buffer	2 μ L
Primers inespecíficos	2 μ L
dNTP 100mM	0,8 μ L
Retro-transcriptasa	1 μ L
RNAasa inhibidora	1 μ L
VOLUMEN TOTAL	10 μ L

Seguidamente, se añadieron los 2000 ng de RNA (10 μ L) y se llevó a cabo la reacción de retro-transcripción. En este punto, las muestras de cDNA pueden ser guardadas a -20°C o a 4°C si van a utilizarse próximamente.

Finalmente, se amplificó el cDNA utilizando el kit *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix* y se cuantificó la expresión génica de p21 y β -actina (este último como gen control para la normalización de los datos). Para llevar a cabo la reacción se utilizaron los reactivos enumerados en la siguiente tabla:

Tabla 6. Reactivos necesarios para llevar a cabo la RT-PCR.

Reactivos	Volumen (x1)
<i>TaqMan</i>	5 µL
Primer específico	0,5 µL
H ₂ O destilada	2,5 µL
cDNA	2 µL
VOLUMEN TOTAL	10 µL

La reacción se llevó a cabo en un termociclador *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* con el siguiente programa: un ciclo a 95°C durante 15 segundos, 50 ciclos a 95°C durante 1 segundo y finalmente un ciclo a 60°C durante 20 segundos. La expresión génica se cuantificó usando la fórmula $2^{-\Delta Ct}$ donde $\Delta Ct = Ct_{p21} - Ct_{\beta\text{-actina}}$.

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el GraphPad Prism 8.4 (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA). Se utilizó el test no-paramétrico de U de Mann-Whitney para analizar las diferencias entre las muestras pequeñas no pareadas. En estos datos se presenta la mediana $\pm$ SEM. Se consideró que había diferencias estadísticamente significativas cuando se dieron valores de $P < 0.05$.

RESULTADOS

1. Caracterización de los cardiomiocitos primarios murinos

1.1. Marcadores de caracterización de los cardiomiocitos murinos

1.1.1. Estudio de la caracterización mediante Citometría de flujo

Se evaluó la pureza de los cardiomiocitos dentro de la población celular del ventrículo mediante citometría de flujo. Tras 24 horas de cultivo, se marcaron las células con anticuerpos monoclonales específicos de cardiomiocitos como α -actinina, troponina T y CD309 (VEGFR-2), para confirmar su linaje celular tras las 24 horas en cultivo *in vitro* (Fig. 27A), evaluando además la viabilidad celular de esta población celular con 7-AAD. La viabilidad mediana fue del 94,3% $\pm$ 4,4% (Fig. 27B).

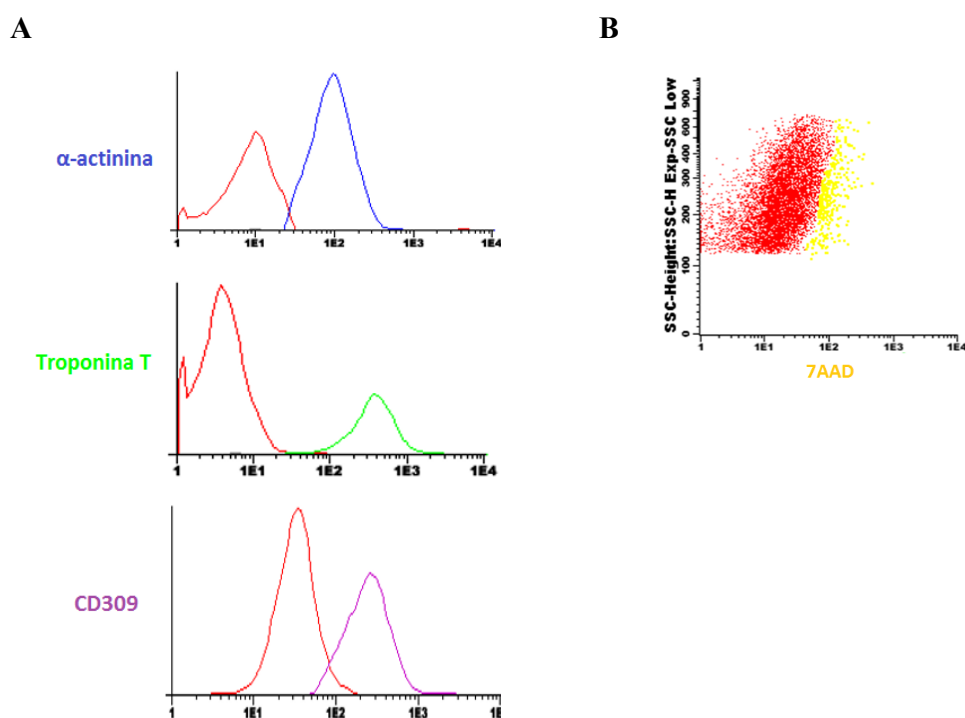


Figura 27. Marcadores de caracterización de los cardiomiocitos primarios murinos mediante citometría de flujo. (A) Análisis inmunofenotípico de los cardiomiocitos tras 24 horas en cultivo. La población celular negativa se sitúa a la izquierda (línea roja) y la positiva (que corresponde a los cardiomiocitos) a la derecha: α -actinina en azul, troponina T en verde y CD309 en morado. (B) Análisis de viabilidad celular con 7-AAD por citometría de flujo. En amarillo se representa la población celular 7-AAD positiva (células apoptóticas).

Resultados

1.1.2. Estudio de la caracterización de cardiomiocitos mediante inmunofluorescencia

Los cardiomiocitos se tiñeron con α -actinina como proteína intracelular específica de células cardíacas y se visualizaron utilizando un microscopio confocal. Tal y como se observa en la imagen (Fig. 28), la α -actinina se encuentra de manera específica en el citosol de los cardiomiocitos.

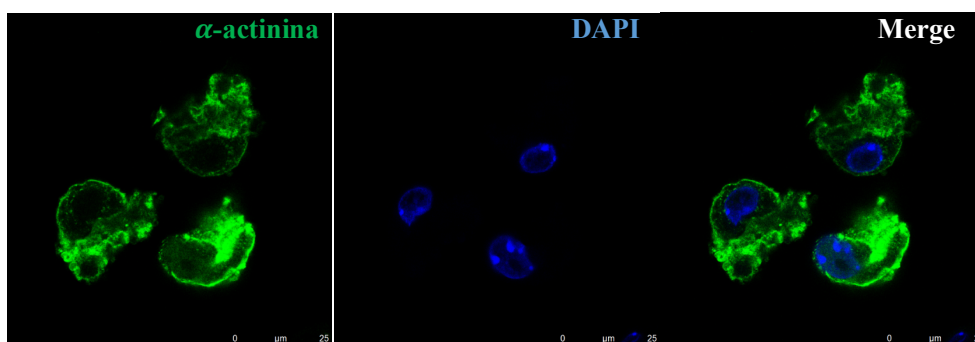


Figura 28. Imágenes de inmunofluorescencia representativas de cardiomiocitos primarios murinos. Cardiomiocitos marcados con α -actinina (en verde) y DAPI (en azul), visualizados mediante microscopía confocal.

2. Establecimiento del modelo de daño por doxorubicina *in vitro*

2.1. Viabilidad celular mediante Citometría de flujo

En primer lugar, se realizaron estudios de tiempo-respuesta con 1 μ M de doxorubicina. Se evaluó la viabilidad de los cardiomiocitos primarios con el fin de testar la respuesta diferencial a diferentes tiempos (1, 3, 6, 12 y 24 horas) y así poder elegir el tiempo en el que disminuye la viabilidad para realizar los experimentos posteriores de co-cultivo con vesículas extracelulares.

Como se observa en la gráfica, la viabilidad de los cardiomiocitos tratados con 1 μ M de doxorubicina disminuye de manera tiempo-dependiente (Fig. 29), produciéndose la mayor reducción a las 24 horas en comparación con los cardiomiocitos control no tratados ($76,4\% \pm 8,6$ de viabilidad versus 100%, respectivamente), que fue el tiempo seleccionado para los siguientes experimentos.

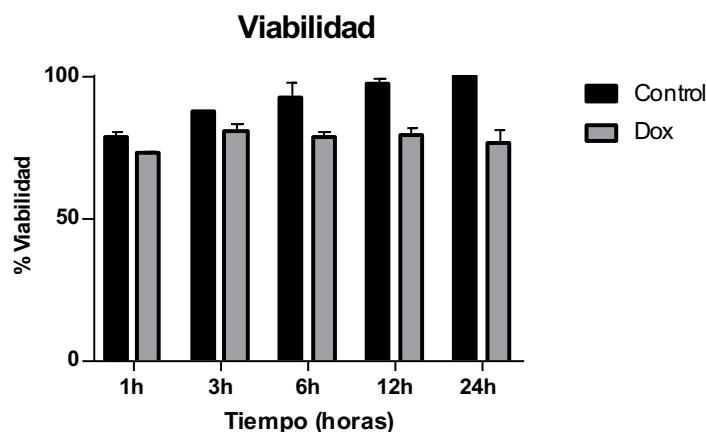


Figura 29. Viabilidad de cardiomiocitos murinos primarios tratados con doxorubicina. Representación de la viabilidad de los cardiomiocitos no tratados (barras negras) y los tratados con 1 μ M de doxorubicina (barras grises) a diferentes tiempos (1, 3, 6, 12 y 24 horas) evaluado por citometría de flujo (n=2 en todos los casos).

2.2. Liberación de la troponina T cardíaca

La liberación de troponina T al medio de cultivo por los cardiomiocitos tratados con 1 μ M de doxorubicina se evaluó tras 1, 3, 6, 12 y 24 horas post-inducción del daño.

Como se observa en la gráfica, no hay diferencias en la liberación de troponina T tras el tratamiento con doxorubicina salvo a las 24 horas post-tratamiento ($p=0.0122$).

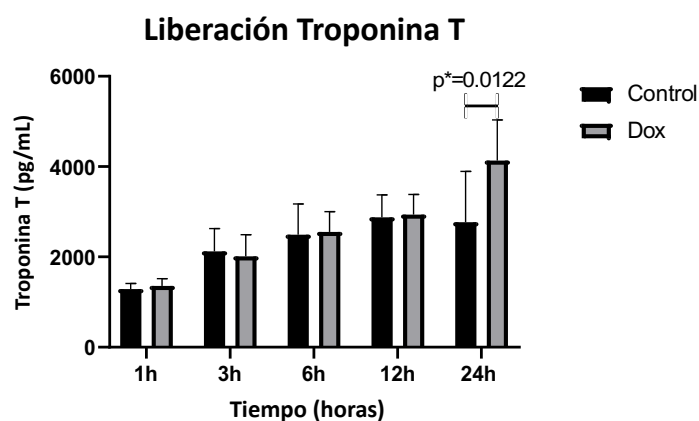


Figura 30. Liberación de troponina T cardíaca por los cardiomiocitos primarios murinos tras el tratamiento con 1 μ M de doxorubicina durante diferentes tiempos. Se representan los niveles de TnT liberada por los cardiomiocitos, en pg/mL, tras 1, 3, 6, 12 y 24 horas de cultivo con tratamiento (barras grises) y sin tratamiento (barras negras) (1h, 3h, 6h y 12h n=6; 24h n=14).

Resultados

2.3. Cuantificación de las pulsaciones de los cardiomiocitos primarios

A las 24 horas tras el tratamiento con doxorubicina, se observó una reducción significativa de las pulsaciones/min medias con respecto a los cardiomiocitos basales ($42 \pm 8,7$ vs $85 \pm 13,8$; $p < 0.0001$), (Fig. 31).

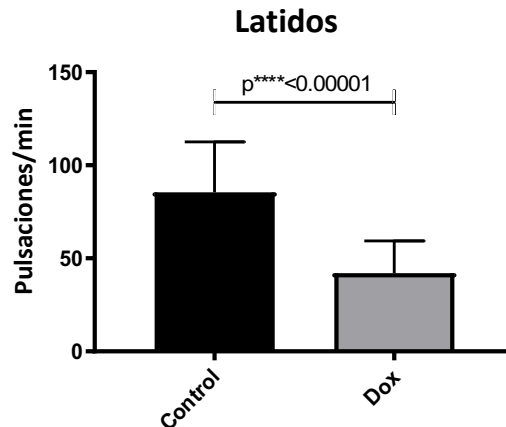


Figura 31. Pulsaciones/minuto de los cardiomiocitos primarios *in vitro*. Se representan los latidos de los cardiomiocitos basales (sin tratar) y de los tratados con 1 μ M de doxorubicina durante 24 horas (n=15 en ambos casos).

3. Caracterización e incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos primarios murinos

3.1. Cultivo de MSC procedentes de médula ósea

3.1.1. Aislamiento y expansión de las MSC

Las MSC se expandieron hasta el P6. En la imagen se visualizan MSC en cultivo en P3, adheridas a una superficie de plástico con una morfología característica de fibroblastos, de acuerdo con los criterios definitorios de la ISCT (10) (Fig. 32).

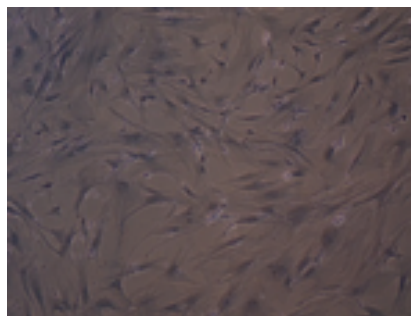
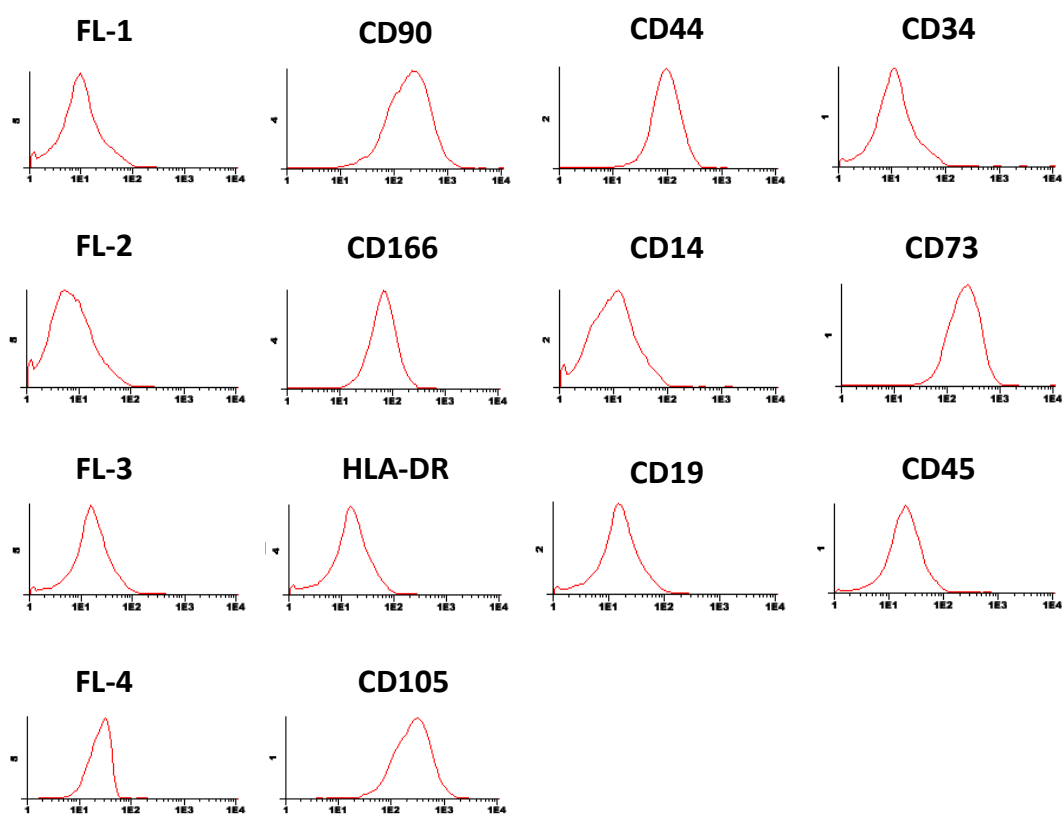


Figura 32. Imagen representativa de MSC procedentes de médula ósea en cultivo. La imagen muestra la morfología fibroblástica característica de las MSC y la capacidad de adhesión al plástico *in vitro*.

3.1.2. Caracterización de MSC

3.1.2.1. Caracterización de MSC mediante Citometría de flujo

El análisis inmunofenotípico mediante citometría de flujo mostró que las MSC expresaban CD73, CD90, CD105, CD44 y CD166 y que eran negativas para CD14, CD19, 34, CD45 y HLA-DR (Fig. 33), de acuerdo con los criterios de la ISCT.



Resultados

Figura 33. Caracterización de MSC de médula ósea. Análisis inmunofenotípico de las MSC estudiando la expresión de diferentes marcadores celulares de superficie (CD90, CD44, CD34, CD166, CD14, CD73, HLA-DR, CD19, CD45 y CD105) analizados mediante citometría de flujo. FL1, FL-2, FL-3 y FL-4 son las expresiones del control de MSC no marcadas en cada canal de fluorescencia.

3.1.2.2. Diferenciaciones de MSC *in vitro*

En todos los casos, las MSC se diferenciaron a línea osteoblástica tras su cultivo en medio específico, observándose una morfología poligonal y positividad tras el marcaje citoquímico de fosfatasa alcalina e igualmente se diferenciaron a línea adipogénica, formando las vacuolas lipídicas teñidas mediante colorante Oil-Red-O (Fig. 34), también de acuerdo con los criterios de la ISCT.



Figura 34. Diferenciaciones *in vitro* de MSC. Imágenes representativas de la capacidad de diferenciación de las MSC (ii) a osteoblastos detectada mediante la tinción de fosfatasa alcalina tras 10 días de cultivo o (iii) a adipocitos detectada mediante la tinción con Oil-Red-O tras 21 días de cultivo. (i) MSC tras 10 días de cultivo (control).

3.2. Caracterización de las VE procedentes de las MSC

Posteriormente, purificamos las VE liberadas al medio de cultivo mediante ultracentrifugación y las identificamos y caracterizamos por microscopía electrónica de transmisión y *nanoparticle-tracking analysis* (NTA).

Las VE-MSC mostraron en todos los casos morfología redondeada y un tamaño característico (Fig. 35A), determinado mediante NTA con una media de 215 nm de diámetro y una concentración media de $1,05 \cdot 10^6$ partículas/mL (Fig. 35B).

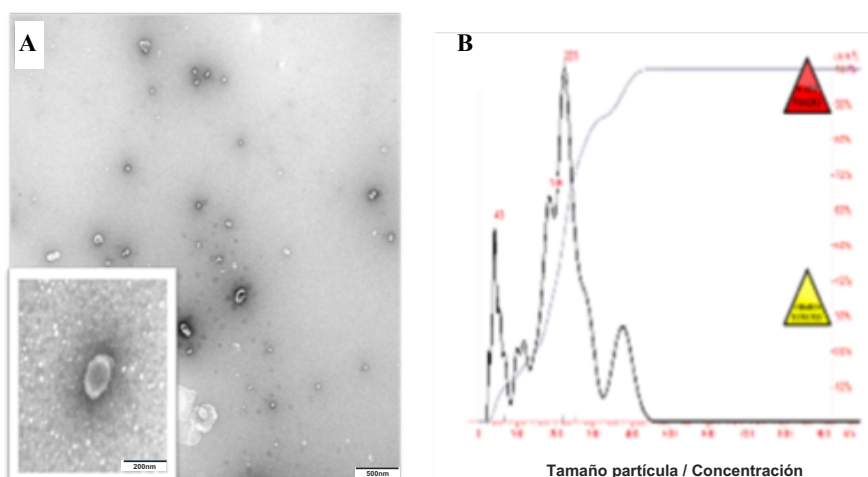
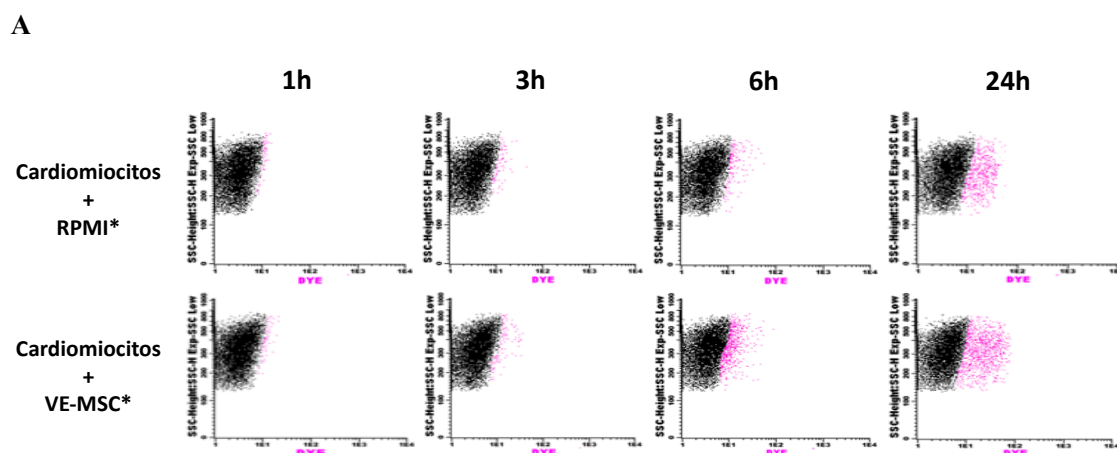


Figura 35. Caracterización de VE-MSC. (A) Imagen de las VE mediante microscopía electrónica de transmisión. (B) Relación de tamaño-concentración de las VE-MSC, evaluada por NTA.

3.3. Incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos primarios murinos

3.3.1. Determinación del tiempo óptimo de incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos mediante Citometría de flujo

El análisis de citometría de flujo mostró que las VE se incorporaban a los cardiomiocitos murinos desde la primera hora de co-cultivo (0,61%) y que la incorporación se incrementaba progresivamente siendo máxima a las 24 horas (momento en el que un $21,5\% \pm 8,3$ de los cardiomiocitos las habían incorporado) (Fig. 36A y B).



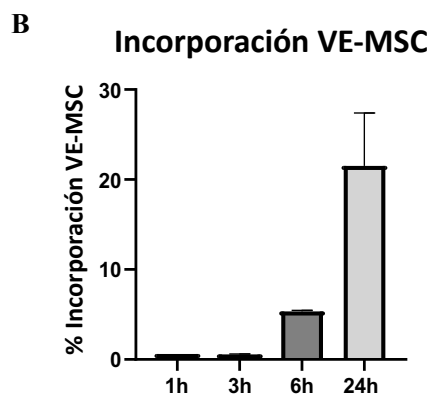


Figura 36. Incorporación de las VE-MSC en cardiomiocitos primarios murinos. (A) Dotplots representativos de la incorporación de las VE-MSC marcadas con Vybrant Dil en cardiomiocitos murinos tras diferentes tiempos (1, 3, 6 y 24 horas) en co-cultivo, analizada mediante citometría de flujo. Se representa la población de cardiomiocitos Vybrant Dil negativa (en negro) y los cardiomiocitos que han incorporado las VE-MSC marcadas (en fucsia). (B) Gráfica representativa del porcentaje de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos murinos tras 1, 3, 6 y 24 horas de co-cultivo, analizada por citometría de flujo.

3.3.2. Análisis de la incorporación de VE a los cardiomiocitos mediante Inmunofluorescencia

Se confirmó la incorporación de las VE-MSC a los cardiomiocitos murinos primarios después de 24 horas también mediante microscopía confocal (Fig. 37).

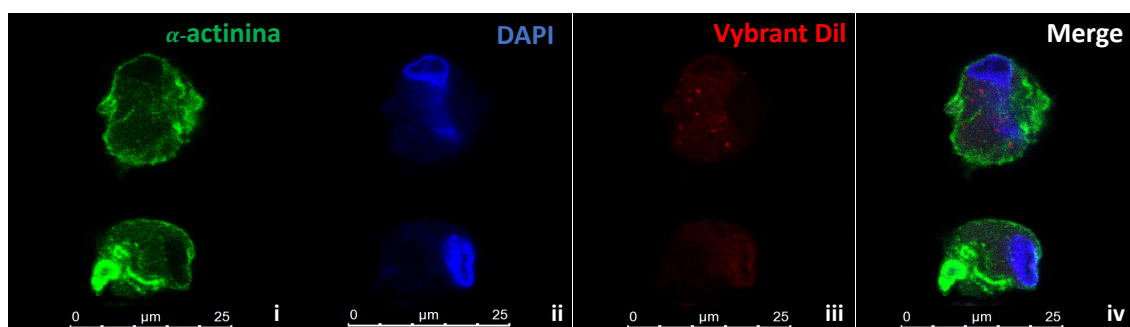


Figura 37. Imágenes representativas de la incorporación de las VE-MSC en cardiomiocitos primarios murinos. Imágenes de inmunofluorescencia en las que se representa la incorporación de VE-MSC marcadas con el colorante rojo *Vybrant Dil* en cardiomiocitos marcados con α -actinina, co-cultivados durante 24 horas. (i) Cardiomiocitos solos teñidos con α -actinina en verde, (ii) marcados con DAPI en azul, (iii) VE-MSC teñidas con *Vybrant Dil* en rojo y (iv) cardiomiocitos marcados con α -actinina que han incorporado VE-MSC teñidas con *Vybrant Dil*.

4. Estudios funcionales de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos primarios para la prevención de la cardiotoxicidad

4.1. Estudios de viabilidad y muerte de los cardiomiocitos primarios

4.1.1. Estudio de la muerte y viabilidad celular mediante Citometría de flujo

El tratamiento con doxorubicina durante 24 horas (Fig. 38A) y también a las 48 horas (Fig. 38B) disminuyó la viabilidad de los cardiomiocitos murinos de forma estadísticamente significativa. La presencia de VE no revierte este efecto deletéreo en la viabilidad inducido por doxorubicina.

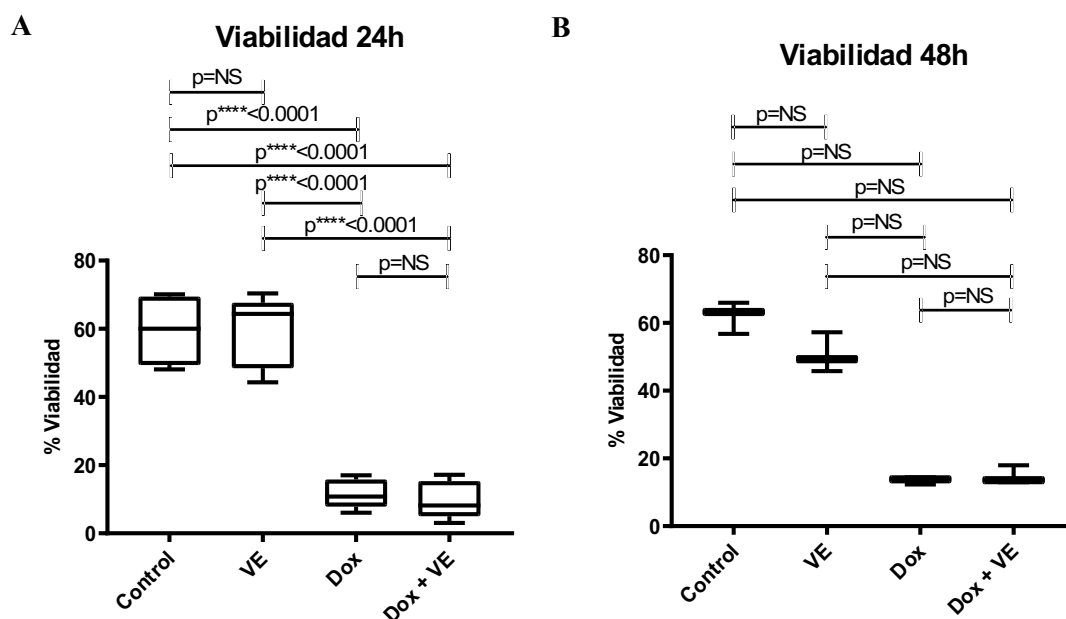
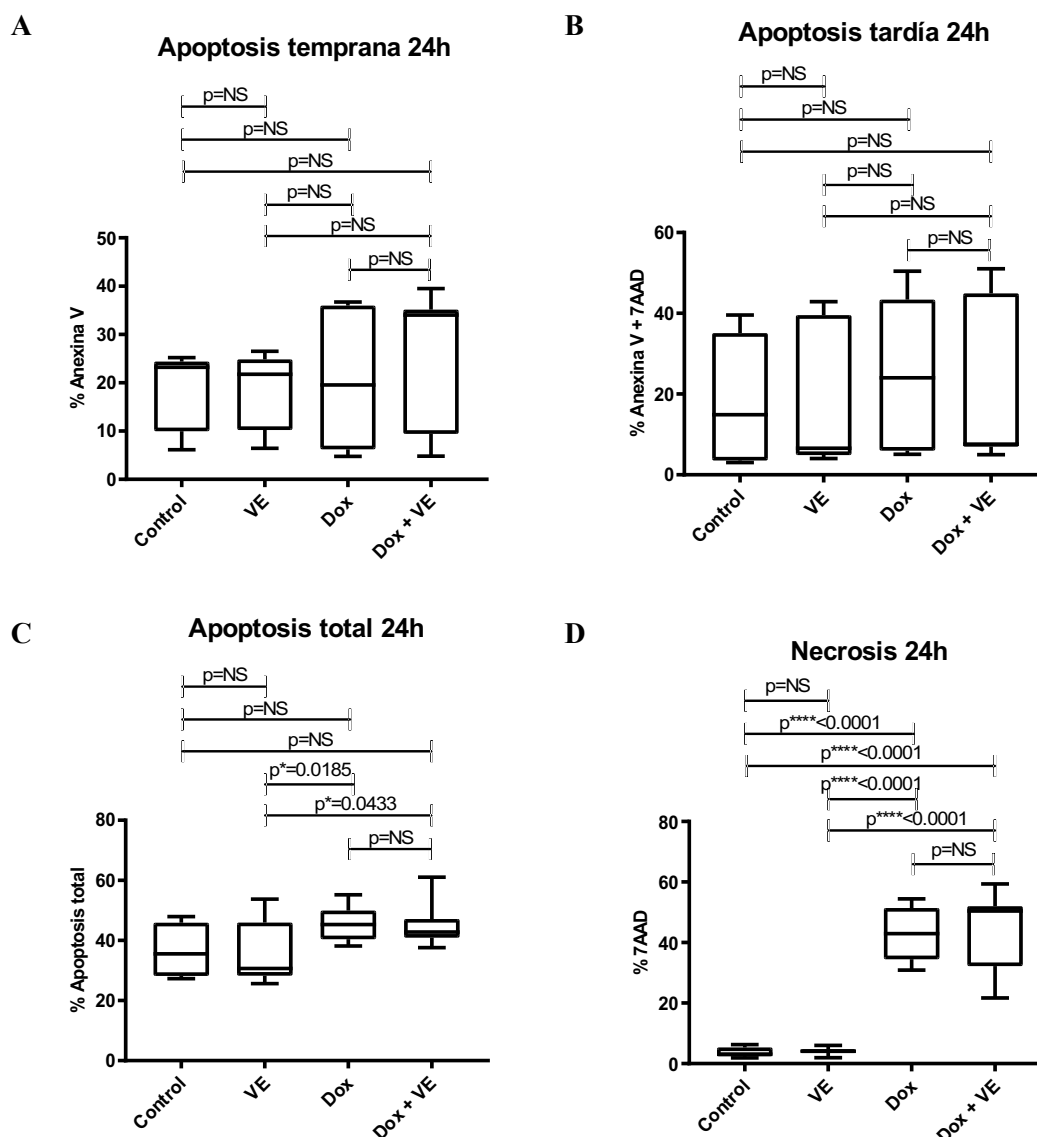


Figura 38. Efectos de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos murinos sobre la viabilidad inducida por doxorubicina mediante citometría de flujo. (A) Viabilidad de los cardiomiocitos tras 24 horas de tratamiento con doxorubicina y/o VE-MSC evaluada por citometría de flujo (n=10 en todos los casos). (B) Viabilidad de los cardiomiocitos tratados con doxorubicina y/o VE-MSC durante 48 horas cuantificada mediante citometría de flujo (n=3 en todos los casos). Los datos numéricos se resumen en los “dotplots”. NS = no significativo.

Resultados

Analizando estos datos desde el punto de vista de la apoptosis (temprana y tardía) y necrosis, los resultados muestran que el tratamiento con 1 μ M de doxorubicina durante 24 horas no aumenta de manera significativa la apoptosis, ni temprana ni tardía (Fig. 39A y B, respectivamente), y tampoco la apoptosis total (Fig. 39C), mientras que sí se induce un aumento significativo de la necrosis ($p < 0.0001$) (Fig. 39D). La incorporación de las VE a cardiomiocitos basales (sin tratamiento cardiotoxico) no provocó cambios significativos ni en la apoptosis ni en la necrosis. La incorporación de VE a cardiomiocitos tratados no revierte los efectos inducidos por doxorubicina en la apoptosis ni en la necrosis.

Con respecto a los datos a las 48 horas tras doxorubicina, el dato más relevante es que la incorporación de VE a los cardiomiocitos dañados con doxorubicina sí disminuye de forma significativa la necrosis celular (Fig. 39H), sin cambios relevantes en los otros parámetros, que son similares a los cambios observados a las 24 horas.



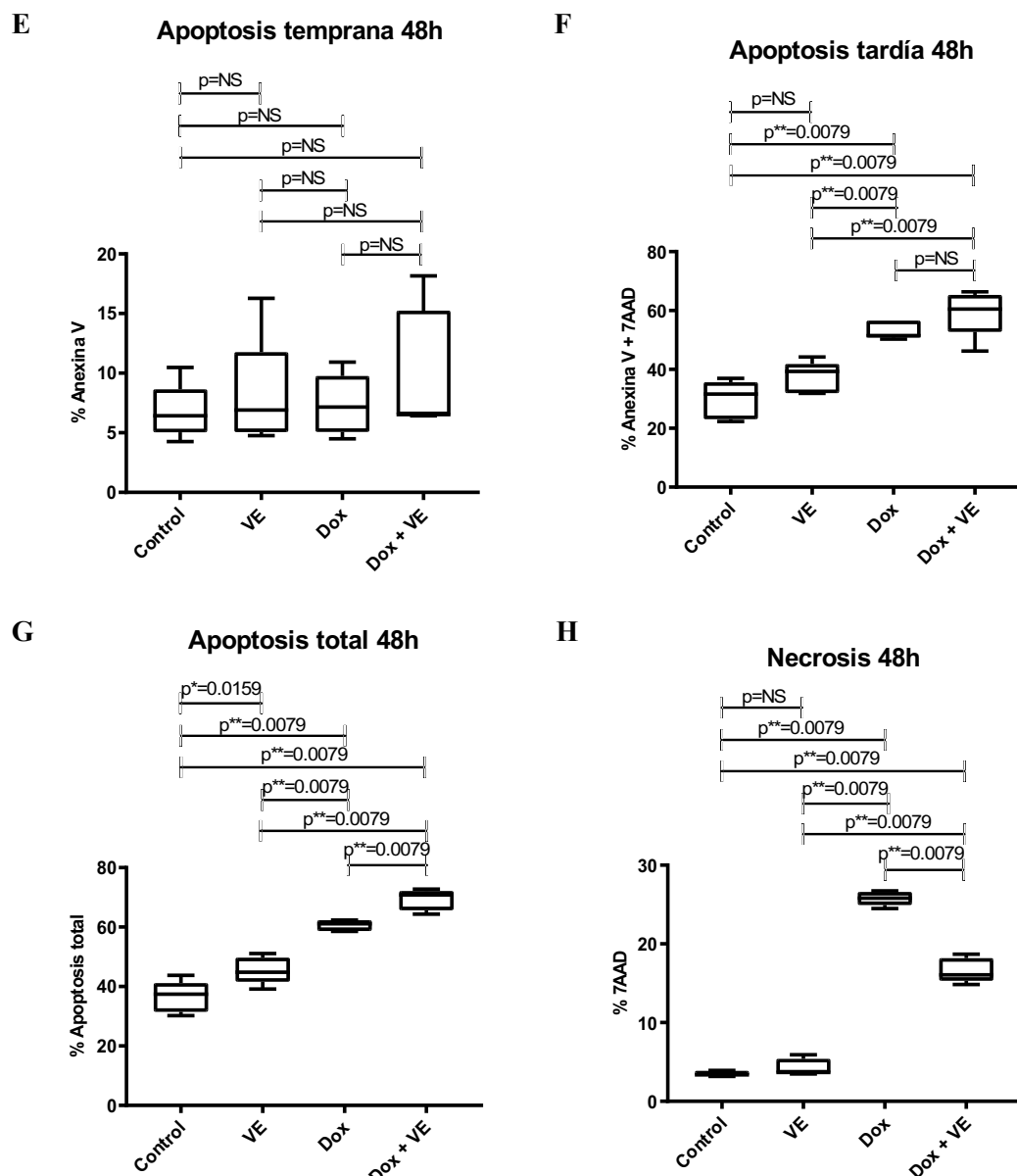


Figura 39. Efectos de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos murinos sobre la muerte celular inducida por doxorubicina mediante CMF. Datos a las 24 horas: (A) Representación de la apoptosis temprana (Anexina V positiva), tras el tratamiento con doxorubicina con/sin VE-MSC; (B) Apoptosis tardía (porcentaje de Anexina V y 7-AAD positivo); (C) Apoptosis total (temprana+tardía); (D) Necrosis (cardiomiocitos 7-AAD positivos), n=10. Datos a las 48 horas: (E) Representación de la apoptosis temprana (Anexina V positiva), tras el tratamiento con doxorubicina con/sin VE-MSC; (F) Apoptosis tardía (porcentaje de Anexina V y 7-AAD positivo); (G) Apoptosis total (temprana+tardía) y (H) Necrosis (cardiomiocitos 7-AAD positivos), n=5. NS = no significativo.

Resultados

4.1.2. Estudio de la viabilidad celular mediante MTT

En el estudio de la viabilidad celular mediante MTT, se observa igualmente que la incorporación de VE a cardiomiocitos dañados con doxorubicina no revierte la reducción en la viabilidad celular inducida por el fármaco (Fig. 40).

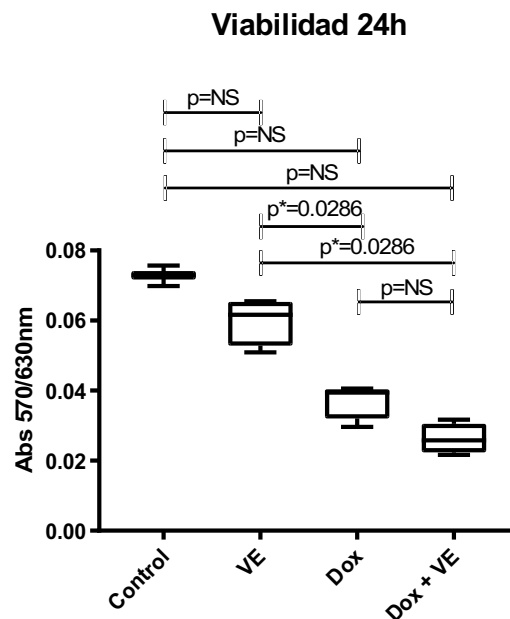


Figura 40. Efectos de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos murinos sobre la viabilidad inducida por doxorubicina mediante MTT. Viabilidad medida mediante MTT tras 24 horas de tratamiento con doxorubicina y/o VE-MSC (Control n=3; VE, Dox y Dox+VE n=4). NS = no significativo.

4.1.3. Estudio de la viabilidad celular mediante Luminiscencia

Mediante la cuantificación de la cantidad intracelular de ATP presente en los cardiomiocitos, se observó nuevamente que la incorporación de VE a cardiomiocitos dañados con doxorubicina no revierte la disminución de la viabilidad de éstos ni a 24 horas ni a 48 horas, como se muestra en la Figura 41.

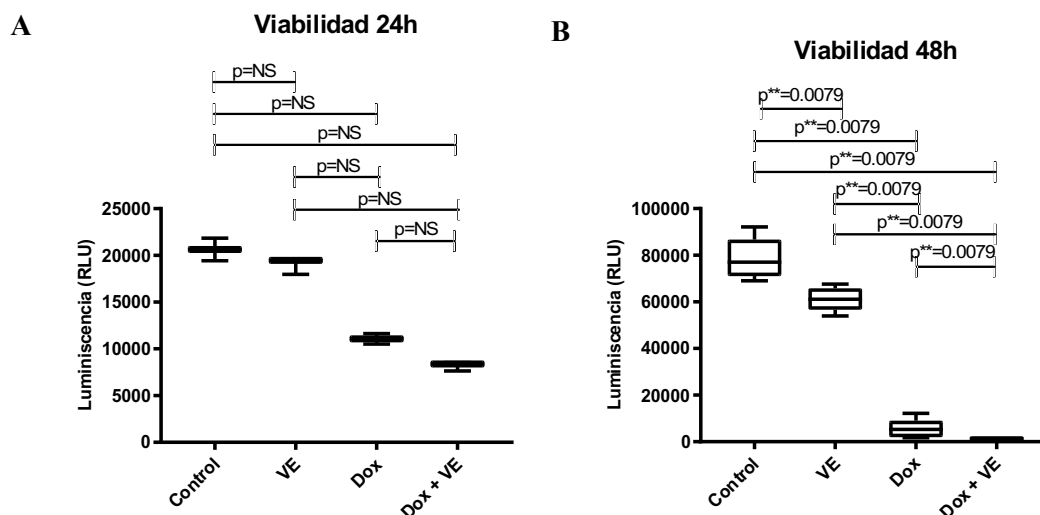
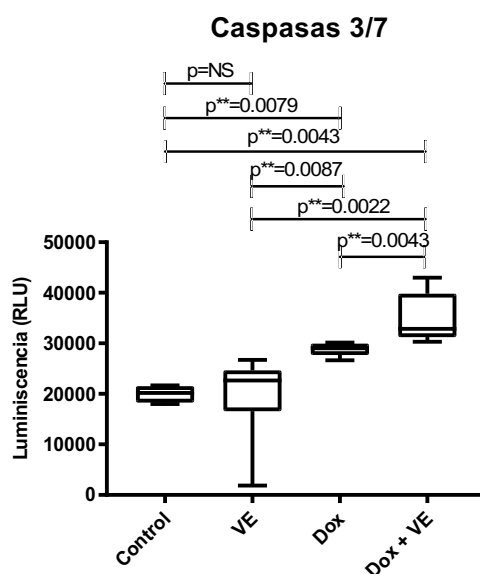


Figura 41. Efectos de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos murinos sobre la viabilidad inducida por doxorubicina mediante actividad ATP. Viabilidad de los cardiomiocitos tratados con doxorubicina y/o VE-MSC cuantificada mediante ensayo de luminiscencia tras 24 horas (A) y 48 horas (B) Datos a las 24 horas: Control y Dox n=2; VE y Dox+VE n=3). Datos a las 48 horas: n=5. NS = no significativo.

4.1.4. Estudio de la apoptosis mediante caspasas 3/7

Tras 24 horas de tratamiento con doxorubicina se detecta una activación significativa de las caspasas 3/7 con respecto los cardiomiocitos basales ($p=0.0079$) y la incorporación de VE procedentes de MSC a los cardiomiocitos tratados con doxorubicina no revierte este efecto (Fig. 42).



Resultados

Figura 42. Efectos de la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos murinos sobre la muerte celular inducida por doxorubicina mediante estudio de la activación de caspasas. Activación de las caspasas 3/7 tras el tratamiento con 1 μ M de doxorubicina durante 24 horas con/sin 30 μ g de VE-MSC (Control y Dox n=5; VE y Dox+VE n=6). NS = no significativo.

4.2. Liberación de la troponina T cardíaca

Tanto a las 24 horas como a las 48 horas tras tratamiento con 1 μ M de doxorubicina, se producía un aumento significativo de la liberación de TnT cardíaca al medio de cultivo ($p=0.0281$ y $p=0.0286$, respectivamente) (Fig. 43A y B). La adición de las VE-MSC simultáneamente con el fármaco redujo de manera significativa esta liberación de TnT cardíaca en ambos tiempos ($p<0.0001$ y $p=0.004$, respectivamente), alcanzando incluso valores similares a los de las células no dañadas.

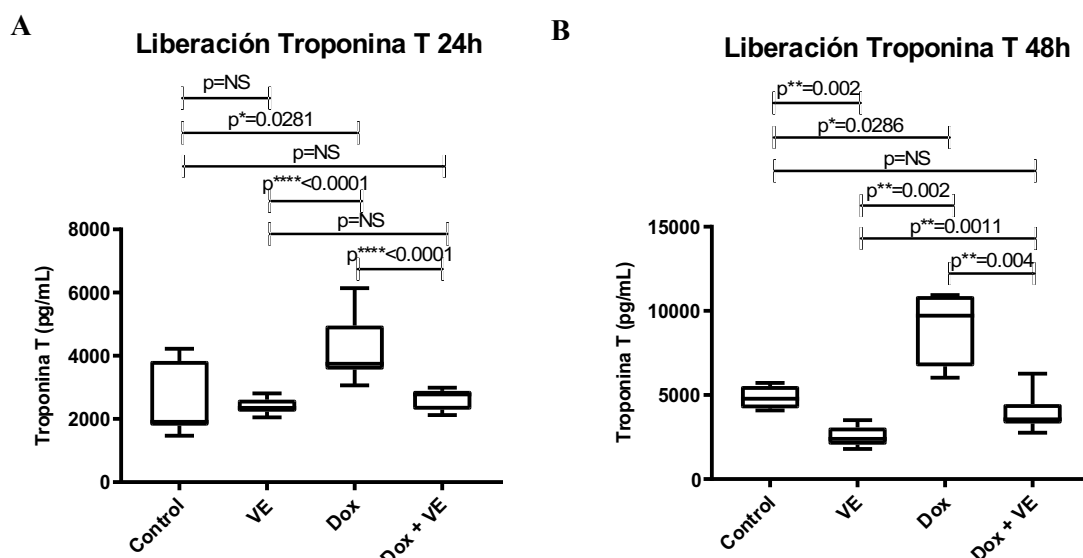


Figura 43. Efectos de la incorporación de las VE-MSC en la liberación de TnT cardíaca al medio inducida por la doxorubicina. Liberación de TnT tras el tratamiento de los cardiomiocitos murinos con 1 μ M de doxorubicina durante 24 horas (A) (Control y Dox n=11; VE y Dox+VE n=10), y tras 48 horas de tratamiento con 1 μ M de doxorubicina y/o VE-MSC (B) (Control y Dox n=4; VE y Dox+VE n=10). NS = no significativo.

4.3. Cuantificación de las pulsaciones de los cardiomiocitos primarios

En los cardiomiocitos en condiciones basales, el valor medio de pulsaciones/min *in vitro* fue de $85,5 \pm 13,8$, observándose una reducción significativa en las células tratadas durante 24 horas con doxorubicina ($42 \pm 8,7$ pulsaciones/min; $p < 0.0001$).

La incorporación de las VE a cardiomiocitos dañados revierte este efecto de forma significativa ($p = 0.0004$) (Fig. 44).

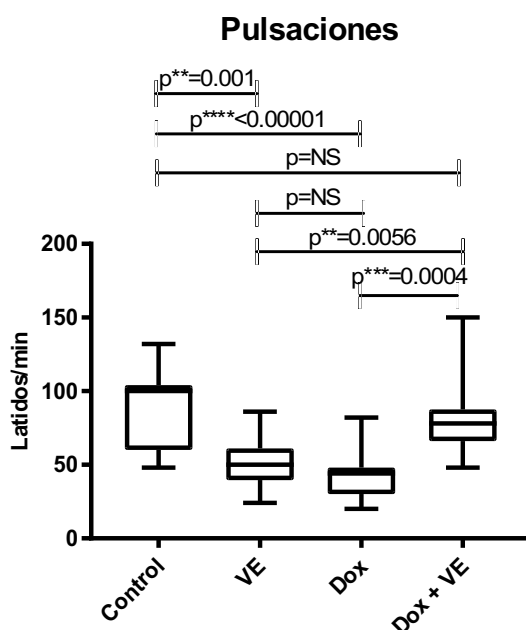


Figura 44. Efectos de la doxorubicina y de las VE-MSC sobre las pulsaciones de los cardiomiocitos primarios murinos. Pulsaciones por minuto de los cardiomiocitos tratados con 1 μ M de doxorubicina y/o VE-MSC durante 24 horas (Control y Dox n=15; VE n=12; y Dox+VE n=8). NS = no significativo.

4.4. Niveles intracelulares de ROS

Tras cuantificar los niveles intracelulares de ROS, observamos que el daño inducido en los cardiomiocitos por la doxorubicina induce un aumento significativo de los niveles de ROS tras 24 horas de tratamiento ($p = 0.0083$), y la incorporación de VE a las células dañadas revierte el efecto, disminuyendo significativamente los niveles intracelulares de ROS ($p = 0.0004$) (Figura 45).

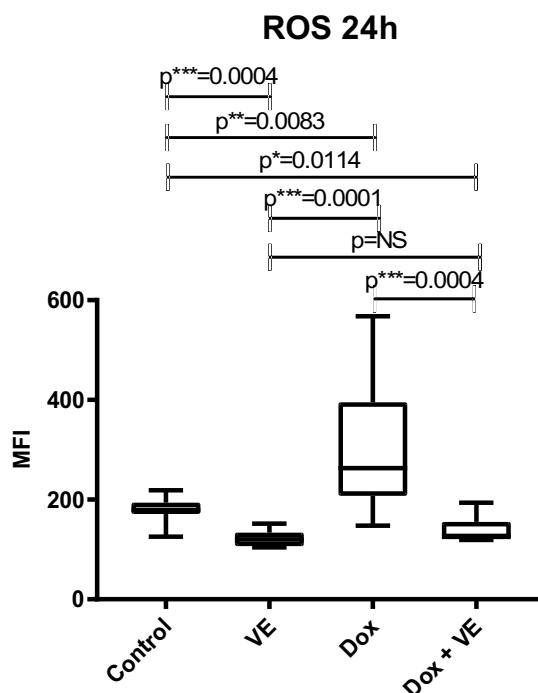


Figura 45. Efectos de la doxorubicina y de las VE-MSC sobre el estrés oxidativo de los cardiomiocitos murinos. Niveles de especies reactivas al oxígeno post-tratamiento con 1 μ M de doxorubicina y/o VE-MSC durante 24 horas (Control y Dox n=11; VE y Dox+VE n=10). NS = no significativo.

4.5. Análisis del daño en el DNA

En condiciones basales, los cardiomiocitos presentan porcentajes bajos de roturas de doble hebra en el DNA (Fig. 46A). El tratamiento con doxorubicina provoca un aumento significativo de las roturas en el DNA ($p<0.0001$), que se revierte de forma significativa tras la incorporación de las VE-MSC junto con el fármaco ($p=0,0052$).

La doxorubicina induce un aumento significativo del daño total en el DNA ($p<0.0001$) y la incorporación de VE-MSC disminuye significativamente el daño al DNA a las 24 horas ($p=0.0059$) (Fig. 46B).

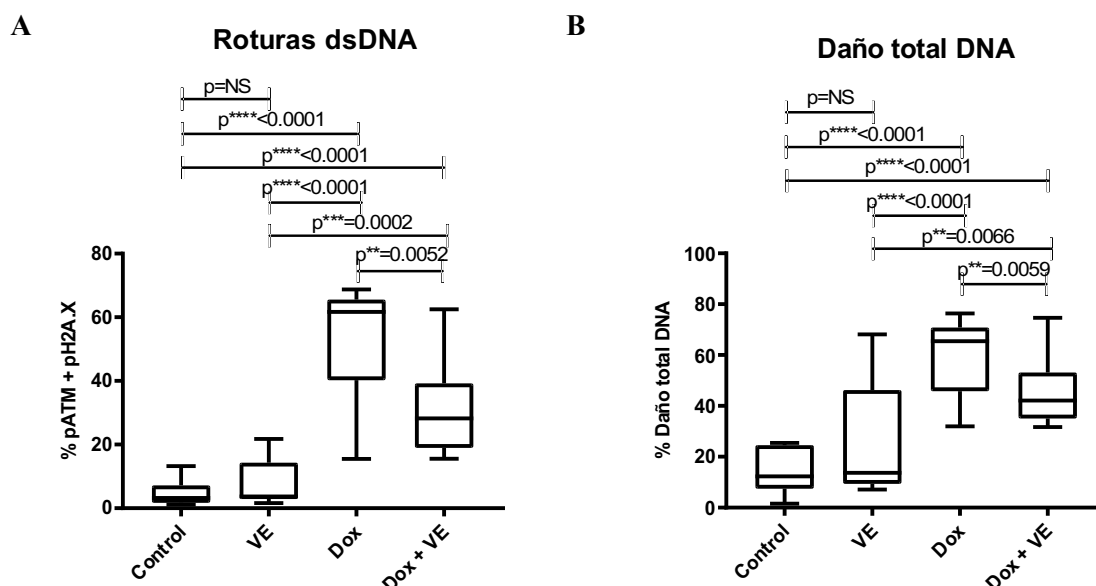


Figura 46. Efectos de la doxorubicina y de las VE-MSC sobre el daño en el DNA en los cardiomiocitos murinos. (A) Representación del porcentaje de las roturas de doble hebra en el DNA de los cardiomiocitos controles y tratados con 1 μ M de doxorubicina y/o VE-MSC (Control n=7; Dox, VE y Dox+VE n=11). (B) Porcentaje del daño total en el DNA de los cardiomiocitos primarios tras 24 horas de tratamiento con doxorubicina con y sin VE-MSC (Control n=7; Dox n=13; y VE y Dox+VE n=11). NS = no significativo.

4.6. Expresión génica de p21

Al evaluar la expresión de p21, los resultados muestran que el tratamiento con 1 μ M de doxorubicina estimula dicha expresión, y que la incorporación de las VE-MSC en los cardiomiocitos dañados no induce cambios significativos (Fig. 47).

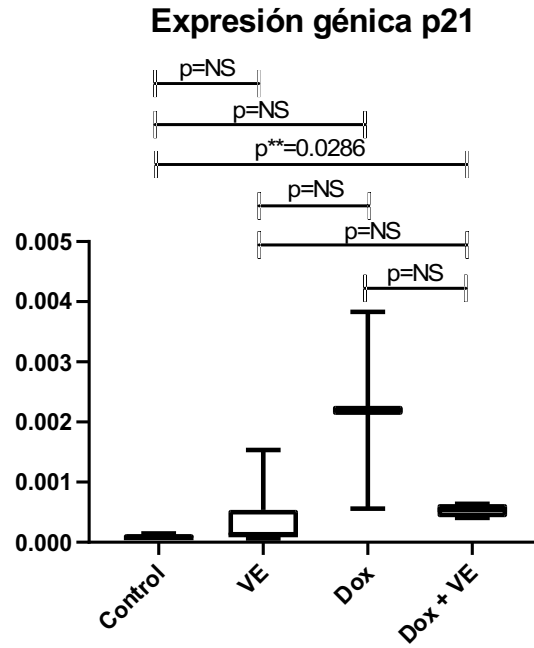


Figura 47. Efectos de la doxorubicina y de las VE-MSC sobre la respuesta al estrés de los cardiomiocitos murinos. Representación de la expresión génica de p21 tras 24 horas de tratamiento con 1 μ M de doxorubicina y/o VE-MSC, evaluada por RT-PCR (Control n=4; VE n=6; Dox n=2 y Dox+VE n=4). NS = no significativo

DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis doctoral aborda un tema de notable interés clínico como es la cardiotoxicidad, desarrollando un nuevo modelo experimental para analizarla *in vitro*, y explorando el potencial rol de las vesículas extracelulares de células mesenquimales para prevenir el daño inducido por uno de los agentes quimioterápicos más estudiados, como es la doxorubicina.

Los resultados de nuestro estudio muestran que la incubación con 1 μM de doxorubicina induce toxicidad en cardiomiocitos murinos primarios *in vitro*, provocando una disminución en la viabilidad celular y en las pulsaciones cardíacas, aumentando así la liberación de cTnT, la muerte por apoptosis y necrosis, la producción de ROS y por tanto el daño en el DNA y las roturas de doble hebra.

La cardiotoxicidad inducida por la doxorubicina es dosis dependiente, resultando en la pérdida de cardiomiocitos, cardiomiopatías y finalmente fallo cardíaco en un elevado número de pacientes. En un intento de reducir los efectos secundarios, la pauta posológica más común en monoterapia es la administración intravenosa de 60-75 mg/m^2 cada 3 semanas durante 30-60 minutos de perfusión. Según estudios farmacocinéticos de la doxorubicina, la vida media de la doxorubicina en el plasma es de 20 – 48 horas y el aclaramiento plasmático de la doxorubicina es rápido (176), pero la concentración en los tejidos es elevada debido a su acumulación intracelular, lo cual aumenta su toxicidad celular. La concentración de doxorubicina máxima en los tejidos tras una única infusión es de 2 μM . La concentración utilizada en este estudio (1 μM) se encuentra en el rango de los perfiles de concentración de la doxorubicina y es comparable con las dosis utilizadas en la clínica, de manera que reflejaría la acción del fármaco *in vivo*.

Del mismo modo, otros grupos han utilizado esta misma dosis para realizar estudios *in vitro* (42, 180-184). Existen numerosos trabajos que han evaluado los principales mecanismos de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina: viabilidad y muerte celular (36, 184), expresión génica de las troponinas cardíacas (185), homeostasis del Ca^{2+} (186), generación de estrés oxidativo (180), fibrosis e inflamación (187, 188), ciclo celular (189), actividad mitocondrial (42) y daño en el DNA (190) tras el tratamiento con doxorubicina tanto *in vivo* como *in vitro*, así como la liberación de TnT cardíaca en modelos *in vivo* (9, 191). En nuestro estudio evaluamos la liberación de TnT cardíaca y la medición de las pulsaciones de los cardiomiocitos en un modelo murino *in vitro* tras la incubación con doxorubicina. Otra de las originalidades de nuestro trabajo es el hecho de que hemos evaluado los efectos de la doxorubicina sobre cardiomiocitos primarios murinos, mientras que la mayoría de los estudios *in vitro* publicados se evalúan sobre líneas celulares cardíacas como H9c2 (42, 182, 192) y Sol8 (193), en fibroblastos cardíacos (194), células endoteliales (195) o cardiomiocitos derivados de iPSC (36, 190).

Discusión

El desarrollo de la cardiotoxicidad aguda y crónica tiene lugar mediante diferentes mecanismos (192, 196). Tras el tratamiento agudo con una única dosis, los principales efectos de la doxorubicina durante las primeras horas son la fragmentación del DNA y la producción de estrés oxidativo, que conducen a la muerte celular, mientras que, tras el daño crónico con múltiples dosis, la necrosis se produce de manera progresiva a pesar de que el daño en el DNA se vea disminuido y se produzca un incremento en los antioxidantes cardíacos (192). Las lesiones en el mtDNA debidas al tratamiento crónico causan defectos en la cadena respiratoria mitocondrial, haciendo que el efecto nocivo de la doxorubicina dure tras cesar el tratamiento (memoria de dosis). Por ello, hay que tener en cuenta el protocolo de estudio y separar de manera adecuada los efectos cardiotóxicos agudos y crónicos. Concretamente, en este trabajo hemos estudiado los potenciales efectos terapéuticos de las VE-ESC sobre la cardiotoxicidad aguda causada por doxorubicina.

La regeneración cardíaca que tiene lugar tras una lesión aguda es limitada y muchas veces insuficiente, por lo que las propiedades de auto-renovación del corazón generalmente no son suficientes para compensar la pérdida de cardiomiocitos. Como alternativa, la terapia celular con células madre es una de las áreas de mayor interés científico para su uso en enfermedades, especialmente en aquellas sin un tratamiento efectivo hasta la fecha. En concreto, las ESC poseen numerosas propiedades: habilidad de evadir el rechazo (197, 198), inhibir respuestas inflamatorias (199), capacidad de injerto (200), potencial de diferenciación a miocitos (126) y liberación de citoquinas y factores de crecimiento que estimulan mecanismos de reparación endógenos (121, 122). Hasta la fecha, se han registrado centenares de ensayos clínicos para evaluar la administración de ESC derivadas de diferentes fuentes (médula ósea, tejido adiposo, sangre de cordón, entre otros) en la medicina regenerativa (96, 113-115). Aunque existen datos pre-clínicos prometedores del uso de ESC en modelos de infarto de miocardio y cardiomiopatía isquémica (121, 201, 202), su eficacia clínica es limitada en muchos ensayos (203-206) y se reduce solo a unos pocos ensayos clínicos (207-209). Se ha reportado que las mejoras funcionales tras su trasplante no se correlacionan únicamente con el injerto o diferenciación de éstas, sino también con la secreción de las ESC (168, 210) y más en concreto con las VE (131, 211).

La terapia con VE posee una serie de potenciales ventajas frente a la terapia celular. Las VE no están sujetas a las normas de la FDA que regulan la administración de células vivas, pues no poseen capacidad de auto-replicación y no se ha demostrado hasta la fecha que tengan potencial carcinogénico por sí mismas. Las VE son muy estables y se almacenan fácilmente por congelación para su uso a largo plazo. Además, no tienen riesgo de sufrir anomalías cromosómicas y, debido a su pequeño tamaño, pueden cruzar la barrera hemato-encefálica (212).

Al internalizarse en las células diana, las VE secretan moléculas bioactivas que producen cambios en el transcriptoma y proteoma de estas células (172). Por ello, están suscitando un elevado interés y están siendo actualmente investigadas para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas las cardiovasculares. En el presente estudio comprobamos, mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia, que las VE-MSc son capaces de internalizarse, de manera tiempo dependiente, en los cardiomiocitos primarios murinos *in vitro*. De este modo, pueden modular las características de los cardiomiocitos y alterar así los mecanismos y las vías de señalización por las que la doxorubicina ejerce su efecto cardiotóxico. Liu et al. han corroborado recientemente estos resultados mostrando que los exosomas procedentes de BM-MSc se incorporan en el citoplasma de cardiomiocitos murinos primarios tras 24 horas de co-cultivo (175). También se demostró la internalización de los exosomas procedentes de BM-MSc en el citoplasma de células madre cardíacas tras 24 horas de co-cultivo (213). Eguchi et al. estudiaron también la incorporación de exosomas procedentes de MSC derivadas de tejido adiposo en cardiomiocitos murinos adultos en condiciones de hipoxia y normoxia *in vitro*, y demostraron que los exosomas de MSC procedentes de tejido adiposo, tras 1-2 horas de co-cultivo, eran capaces de incorporarse en el citoplasma de los cardiomiocitos mediante endocitosis dependiente de clatrina, siendo esta incorporación mayor bajo condiciones de cultivo hipóxicas (214).

Gnecchi et al. evidenciaron por primera vez que la secreción celular de las MSC por sí sola mejora la función cardíaca al reducir el tamaño de infarto en un modelo animal de infarto agudo de miocardio (168). Del mismo modo que las MSC, el uso de los exosomas de MSC podría modular de manera positiva el ambiente isquémico e inflamatorio del tejido cardíaco y ayudar a la recuperación de los cardiomiocitos dañados, reparando y revirtiendo las consecuencias de la inflamación (171). La mejora del microambiente inflamatorio del miocardio podría deberse a que los exosomas procedentes de MSC promueven la conversión de los macrófagos pro- a anti-inflamatorios en el tejido cardíaco, a la vez que reducen el estrés oxidativo de los cardiomiocitos, reducen los niveles de citoquinas inflamatorias del plasma y mejoran la función contráctil (mayor grosor miocárdico y menor diámetro de las cámaras cardíacas) en un modelo murino de cardiomiopatía dilatada (171). A través de su contenido, las VE estimulan o activan vías de señalización de cardioprotección y reparación endógena en enfermedades cardíacas, mediando acciones pro-angiogénicas, proliferativas, de diferenciación, anti-oxidativas, anti-apoptóticas, anti-fibróticas, anti-inmunogénicas y anti-inflamatorias (172).

En nuestro modelo de cardiotoxicidad *in vitro*, el tratamiento agudo con doxorubicina provoca aumentos en la apoptosis (temprana y tardía) y necrosis y la incorporación de VE no revierte los efectos inducidos por doxorubicina tras 24 horas de tratamiento. Sin embargo, a las 48 horas, el dato más relevante es que la incorporación de VE a cardiomiocitos dañados con doxorubicina sí

Discusión

disminuye de forma significativa la necrosis celular. Las mejoras promovidas por la incorporación de las VE no son suficientes para prevenir la apoptosis inducida por la doxorubicina, y vías pro-apoptóticas como la de las caspasas 3/7 permanecen activas, y desencadenan la muerte celular. No obstante, las VE sí son capaces de reducir la necrosis.

En nuestro estudio las VE-MSC se administraron junto con el fármaco con el objetivo de evaluar la potencial capacidad de prevención de la cardiotoxicidad, a diferencia de los estudios que evalúan el efecto terapéutico de éstas para revertir el daño causado por doxorubicina una vez ha sido inducido (171), pues son muchos los estudios que evalúan el efecto dañino de la administración del fármaco días o incluso semanas después (175, 186, 215). Yang et al. evaluaron también el efecto protector de los exosomas procedentes de BM-MSC pre-tratando las células madre cardíacas durante 24 horas antes de inducir estrés oxidativo por H₂O₂ (213).

Existe controversia en la literatura con respecto a la prevención de la apoptosis en los cardiomiocitos utilizando VE-MSC. Nuestros resultados sugieren que las VE-MSC no previenen de la apoptosis a corto plazo a los cardiomiocitos tratados de manera aguda con doxorubicina. Sin embargo, si observamos efecto en cuanto a la muerte por necrosis. De la misma forma, Sun et al. mostraron que, en un modelo de cardiomiopatía dilatada, los exosomas derivados de MSC pueden retrasar la progresión de la enfermedad inhibiendo ambos, la apoptosis tardía y la necrosis de los cardiomiocitos (171).

Uno de los principales marcadores de la cardiotoxicidad aguda es la cTnT. La medida de la cTnT se ha descrito como un buen indicador de la disminución en la contractilidad del ventrículo izquierdo y su incremento temprano es predictivo del grado y severidad de la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina. Se libera de los cardiomiocitos tras sufrir estrés o daño, aunque también se libera debido a diferentes causas como la regeneración del tejido *in vivo* (la vida media de las proteínas de las miofibrillas es de 5 días – 2 semanas). Por lo tanto, no necesariamente ha de producirse un daño para que aumenten los niveles de cTnT en el suero. En nuestros modelos *in vitro* los cardiomiocitos liberan cTnT al medio. Tras la exposición al fármaco, los niveles de cTnT aumentan de manera significativa ya que la doxorubicina provoca daño celular y podría causar la degradación o disociación de los filamentos de actina en los que se encuentra la cTnT, además de liberarse debido al aumento de la muerte celular. En nuestros resultados vemos que la liberación de la cTnT *in vitro* aumenta de manera tiempo dependiente con el tratamiento de 1 μ M doxorubicina. Estos resultados concuerdan con los descritos por Adamcová et al. en los que se vio que la cTnT de cardiomiocitos primarios de rata aumenta de manera dosis y tiempo dependiente en respuesta a la doxorubicina *in vitro* debido a que el daño acumulativo producido por el fármaco es mayor (9). Nuestros resultados sugieren que la doxorubicina empieza a provocar

un daño celular evidente y a ejercer un efecto cardiotóxico agudo sobre los cardiomiocitos *in vitro* a partir de las 24 horas.

La adición de las VE-MSD junto con la doxorubicina previene el aumento de la cTnT en nuestro modelo *in vitro*. Esto nos lleva a pensar que el contenido de estas VE frena los mecanismos que promueven la liberación de la cTnT causada por el tratamiento con la doxorubicina. Por lo tanto, además de reducir la necrosis como hemos discutido anteriormente, las VE también podrían estar contribuyendo a la disminución de la liberación de la troponina al reducir su disociación de los miofilamentos, o disminuir la liberación de macromoléculas intracelulares a través de la membrana plasmática (49). Debido a que este es el primer estudio que analiza los efectos de las VE-MSD sobre la liberación de cTnT, se necesitarían otros estudios para profundizar y discernir cuáles son los procesos implicados en la liberación de la cTnT que se ven alterados tras la adición de las VE-MSD.

In vivo, los efectos tóxicos se detectan en evaluaciones clínicas tempranas, como describimos en los resultados, pero es la dosis acumulativa el principal factor de riesgo de disfunción ventricular y fallo cardíaco que produce la cardiotoxicidad causada por doxorubicina, pues la administración reiterada de diferentes dosis de doxorubicina de manera crónica produce aumentos de cTnT de manera dosis y tiempo dependiente en diferentes modelos *in vivo* (9, 183, 191, 216). Sin embargo, Adamcová et al. detectaron aumentos en la liberación de cTnT en conejos tratados de forma aguda con 3 mg/kg de doxorubicina, alcanzando los niveles máximos a las 4-6 horas post-tratamiento y siendo a las 24 horas ligeramente superiores respecto a los niveles basales (50).

De acuerdo con un estudio reciente en el que evalúan la actividad pulsátil *in vitro* en cardiomiocitos murinos adultos (183) e *in vivo* en ratones (183, 186), mostramos que la exposición aguda a la doxorubicina altera la contractilidad de los cardiomiocitos reduciendo el número de pulsaciones. Alteraciones similares en la función contráctil de los cardiomiocitos, debidas a variaciones en los niveles intracelulares de calcio, se detectaron también tras dosis acumulativas de doxorubicina en un modelo murino (186). La función contráctil es un mecanismo dependiente de ATP y Ca^{2+} . La regulación de las concentraciones intracelulares de ATP y Ca^{2+} es esencial para mantener la función mitocondrial y la supervivencia celular. Por un lado, el desacoplamiento de la cadena respiratoria causada por la doxorubicina provoca la disfunción metabólica de las mitocondrias cardíacas, la disminución de la producción de ATP y la activación de la apoptosis (32). Tarpey et al. reportaron que la doxorubicina causa alteraciones en la respiración mitocondrial, en concreto en la cadena de transporte de electrones, sin verse alterada a nivel de la sintasa de ATP (217). También se ha visto que la doxorubicina inhibe la actividad de la AMPK, una Ser/Thr quinasa con importante actividad reguladora de la actividad

Discusión

mitocondrial y del metabolismo energético, y de PGC-1 α , crítico en mantener la producción de ATP y la función mitocondrial (42).

Por otro lado, también se ha evidenciado que la doxorubicina provoca una menor recepción de Ca²⁺ en el retículo sarcoplásmico y altera la contractilidad, al disminuir los niveles de expresión génica de la ATPasa SERCA (183, 186). Del mismo modo, el aumento de Ca²⁺ en el citosol y la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial causa la desregulación de la homeostasis del Ca²⁺, disfunción cardíaca y fallo cardíaco. Teniendo en cuenta que uno de los mecanismos de la doxorubicina es la desregulación de la mitocondria, en nuestro modelo podría aumentar la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial que provoca disfunción de la contractilidad, de manera simultánea a la alteración del metabolismo mitocondrial y la homeostasis energética de los cardiomiocitos primarios.

Estos mecanismos podrían hacer que el número de pulsaciones disminuya *in vitro* al tratar los cardiomiocitos murinos con doxorubicina tal y como observamos en nuestros resultados. En nuestro trabajo no hemos evaluado la producción de ATP ni la función mitocondrial, pero este tipo de estudios tienen interés para profundizar en el mecanismo de la cardiotoxicidad en nuestro modelo.

La adición de las VE-MSC en nuestro trabajo permite la recuperación del número de las pulsaciones de los cardiomiocitos *in vitro*. Arslan et al. demostraron que el tratamiento con exosomas derivados de MSC permiten la restauración de la homeostasis energética en un modelo murino de daño miocárdico por isquemia-reperfusión, incrementando los niveles de ATP y de NADH (169). Esto se debió a la presencia en estos exosomas de los cinco enzimas encargados de la generación de ATP en la glicólisis (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglucomutasa, enolasa y piruvato quinasa) (169, 218).

Además, se ha descrito que las VE-MSC, a través del miR-214, inhiben la expresión de CaMKII y protegen a las CSC de la alteración de la homeostasis del Ca²⁺ que se da en el infarto de miocardio (213). Luongo et al. detectaron aumentos en la expresión de NCLX, uno de los intercambiadores de Na⁺/Ca²⁺ más importantes, cuya expresión incrementada en ratones protege de la necrosis y del fallo cardíaco, al expulsar la sobrecarga de Ca²⁺ de la mitocondria y regular del flujo de Ca²⁺ (41). Finalmente, el aumento de expresión de proteínas del retículo sarcoplásmico responsables del transporte de Ca²⁺ podría ser otro posible efecto regulatorio de las VE.

Se sabe que la homeostasis redox es de gran importancia para el mantenimiento de la salud cardiovascular y que los niveles fisiológicos de ROS son fundamentales para regular muchas funciones celulares. La mitocondria es la principal fuente de ROS (superóxido (O₂⁻), radicales

hidroxilos (OH[•]), peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y oxígeno singlete (¹O₂) tras la exposición a doxorubicina. La sobreproducción de estos ROS en las mitocondrias cardíacas inducida por la doxorubicina es un evento temprano y la causante del estrés redox que directa o indirectamente induce daño cardíaco: peroxidación lipídica y daño oxidativo en el mtDNA y proteínas, que finalmente provocan una mayor inhibición de la cadena de transporte de electrones (principalmente de los complejos I y III), pérdida de los niveles de adenosina trifosfato (ATP), peroxidación de la cardiolipina y una mayor permeabilidad de la membrana mitocondrial (42, 44, 219). Cuando la doxorubicina se metaboliza genera grandes cantidades de ROS que causan toxicidad debido mayoritariamente a que las actividades anti-oxidantes de ciertas enzimas (catalasa, GPx y SOD2) en los cardiomiocitos son menores respecto a otros tejidos y que además disminuyen tras la exposición a la doxorubicina (180). Esto hace que los cardiomiocitos sean particularmente vulnerables al daño por estrés oxidativo y que a través de múltiples mecanismos esta sobreproducción de ROS desencadene la muerte celular.

La disminución de dicha sobre-producción de ROS inducida por la doxorubicina puede prevenir la disfunción y la pérdida del músculo cardíaco (220).

En nuestro trabajo, observamos que la administración de VE-MSC previene la producción de ROS inducida por doxorubicina *in vitro*, aunque los mecanismos moleculares específicos por los que las VE-MSC reducen la producción de ROS no se conocen. Recientemente, se ha visto que los exosomas derivados de CPC contienen diferentes proteínas involucradas en procesos redox, entre ellas SOD2 y Col1A1, capaces de inhibir los niveles de ROS y prevenir la disfunción cardíaca y la cardiotoxicidad producidos por el tratamiento combinado de doxorubicina junto con trastuzumab (188). Cole et al. mostraron que la sobreexpresión de SOD2 es suficiente para proteger contra la disfunción mitocondrial inducida por doxorubicina tras el tratamiento agudo *in vivo* (221), por lo que la reducción que observamos en la producción de ROS podría ser debida a un aumento en la expresión de SOD2 mediada por las VE-MSC. La administración intravenosa de exosomas procedentes de MSC disminuye el estrés oxidativo de los cardiomiocitos en un modelo murino de cardiomiopatía dilatada y en otro de infarto agudo de miocardio (170, 171), modulando de manera positiva el ambiente isquémico del tejido cardíaco y ayudando a la recuperación de los cardiomiocitos dañados, reparando y revirtiendo las consecuencias de la inflamación causada por el estrés oxidativo. Las VE procedentes de MSC causan, *in vivo*, aumentos de las ratios ATP/ADP y NADH/NAD⁺ y reducciones de la inflamación sistémica, lo cual reduce el estrés oxidativo vía PI3K/Akt y estimula la viabilidad miocárdica (169).

Otro de los mecanismos por los que la doxorubicina provoca cardiotoxicidad es a través del daño en el DNA. De acuerdo con estudios previos en los que analizaron este mecanismo tras la exposición aguda al fármaco, vemos que la doxorubicina causa un aumento significativo de las

Discusión

roturas de doble hebra. Del mismo modo, L'ecuyer et al. mostraron que la doxorubicina aumentaba el daño en el DNA de los cardiomiocitos de manera temprana (196). El daño en el DNA puede deberse a la generación de estrés oxidativo, así como a las uniones de la doxorubicina con el DNA y con la TopIIb. Zhang et al. demostraron que la unión TopIIb-doxorubicina es el principal mecanismo responsable de iniciar los efectos cardiotóxicos (222). El complejo doxorubicina-TopIIb suprime PPAR, un regulador del metabolismo oxidativo, y permite la activación y alteración de la vía de p53, la alteración de la conducción del Ca^{2+} , la disfunción mitocondrial y un aumento de la apoptosis.

La administración de las VE reduce el daño en el DNA causado por la doxorubicina. Esta disminución del daño en el DNA puede ser consecuencia de la ausencia de sobreproducción de radicales libres y moléculas en la célula capaces de provocar daño oxidativo sobre el DNA. Dado que nuestro estudio es el primero en analizar los efectos de las VE-MSc en cardiomiocitos sobre el daño en el DNA, son necesarios más estudios que nos permitan entender los mecanismos que se alteran tras la adición de las VE-MSc.

Además, el aumento en la expresión de p21 indica la respuesta al estrés de los cardiomiocitos en un intento de reparar los daños ocasionados tras el tratamiento con doxorubicina. Se ha descrito que tanto la doxorubicina como la sobreexpresión de p21 detienen el ciclo en la fase G2/M (194). Esta parada permite que se activen las vías de reparación del DNA en un intento de permitir la supervivencia celular. La administración de las VE reduce la expresión de p21, aunque de manera no significativa debido al reducido número de la muestra.

Finalmente, hemos de indicar que existen controversias en cuanto a las moléculas fisiológicamente activas de las VE que median el potencial terapéutico en las células o tejidos diana. Los miRNAs controlan procesos como la angiogénesis, la inmunomodulación, la apoptosis y la fibrosis (223, 224), pero en las dosis terapéuticas de VE utilizadas, los miRNAs no se encuentran normalmente en la configuración adecuada y concentración suficiente para ser funcionales y llevar a cabo una respuesta biológicamente relevante (225, 226), aunque numerosos estudios han demostrado resultados controvertidos (188, 213, 214, 223). Son diversos los estudios que muestran que más que los miRNAs, son las proteínas fisiológicamente activas las que ejercen el principal papel de las VE-MSc en regular muchos procesos biológicos involucrados en la patogénesis de enfermedades o en la reparación y regeneración tisular (218). Diferentes estudios proteómicos de los exosomas procedentes de las MSC han mostrado que contienen proteínas que favorecen la regulación de vías involucradas en la proliferación de células inmunes, en la formación y función del músculo y en la angiogénesis, mientras que otras reducen los procesos involucrados en el tamaño de infarto y degeneración de órganos (169, 172, 227). Por ello se ha postulado que, basándose en la dosis terapéutica usada de VE, las proteínas con actividad

catalítica podrían ser las principales responsables de la actividad terapéutica de las VE procedentes de MSC.

CONCLUSIONES

Regarding the development of an in vitro model of doxorubicin-induced cardiotoxicity:

1. The addition of doxorubicin (1 μ M of doxorubicin for 24 hours) in the culture media containing neonatal murine cardiomyocytes induces acute cardiotoxicity in vitro decreasing viability and contractility and increasing cTnT release to the supernatant. This in vitro model may be employed to analyze drug-induced cardiotoxicity.

Regarding the incorporation of BM-MSC-EV into doxorubicin-damaged cardiomyocytes:

2. BM-MSC-EV are able to incorporate into murine primary cardiomyocytes in a time dependent manner, with higher efficiency after 24 hours of incubation.

Regarding the effects of EV incorporation into cardiomyocytes damaged by doxorubicin and the mechanisms by which these effects could be induced:

3. BM-MSC-EV incorporation do not prevent cell death and are insufficient to compensate for the loss of cardiomyocytes occurring during acute injury at 24 hours, while they do decrease necrosis after 48 hours of doxorubicin treatment.
4. Nevertheless, BM-MSC-EV incorporation contributes to reduce chemotherapy-induced cardiotoxicity by decreasing cTnT release and ROS production, improving cardiomyocytes' contractility and attenuating DNA damage in our in vitro model.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kremer LC, van Dalen EC, Offringa M, Ottenkamp J, Voûte PA. Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: long-term follow-up study. *J Clin Oncol*. 2001;19(1):191-6.
2. Blum RH, Carter SK. Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Intern Med*. 1974;80(2):249-59.
3. Kim J, Shapiro L, Flynn A. The clinical application of mesenchymal stem cells and cardiac stem cells as a therapy for cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*. 2015;151:8-15.
4. Suncion VY, Ghersin E, Fishman JE, Zambrano JP, Karantalis V, Mandel N, et al. Does transendocardial injection of mesenchymal stem cells improve myocardial function locally or globally?: An analysis from the Percutaneous Stem Cell Injection Delivery Effects on Neomyogenesis (POSEIDON) randomized trial. *Circ Res*. 2014;114(8):1292-301.
5. Lai RC, Arslan F, Tan SS, Tan B, Choo A, Lee MM, et al. Derivation and characterization of human fetal MSCs: an alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(6):1215-24.
6. Teng X, Chen L, Chen W, Yang J, Yang Z, Shen Z. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Improve the Microenvironment of Infarcted Myocardium Contributing to Angiogenesis and Anti-Inflammation. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(6):2415-24.
7. Wang Y, Zhang L, Li Y, Chen L, Wang X, Guo W, et al. Exosomes/microvesicles from induced pluripotent stem cells deliver cardioprotective miRNAs and prevent cardiomyocyte apoptosis in the ischemic myocardium. *Int J Cardiol*. 2015;192:61-9.
8. DeSantiago J, Bare DJ, Semenov I, Minshall RD, Geenen DL, Wolska BM, et al. Excitation-contraction coupling in ventricular myocytes is enhanced by paracrine signaling from mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52(6):1249-56.
9. Adamcová M, Šimůnek T, Kaiserová H, Popelová O, Štěrbá M, Potáčová A, et al. In vitro and in vivo examination of cardiac troponins as biochemical markers of drug-induced cardiotoxicity. *Toxicology*. 2007;237(1-3):218-28.
10. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
11. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750.
12. Chen F, De Diego C, Chang MG, McHarg JL, John S, Klitzner TS, et al. Atrioventricular conduction and arrhythmias at the initiation of beating in embryonic mouse hearts. *Dev Dyn*. 2010;239(7):1941-9.
13. Andrés-Delgado L, Mercader N. Interplay between cardiac function and heart development. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(7 Pt B):1707-16.
14. Lozyk MD, Papp S, Zhang X, Nakamura K, Michalak M, Opas M. Ultrastructural analysis of development of myocardium in calreticulin-deficient mice. *BMC Dev Biol*. 2006;6:54.
15. Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol*. 1996;271(5 Pt 2):H2183-9.

Bibliografia

16. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*. 2011;331(6020):1078-80.
17. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410(6829):701-5.
18. Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Veglia F, et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation*. 2015;131(22):1981-8.
19. Dolci A, Dominici R, Cardinale D, Sandri MT, Panteghini M. Biochemical markers for prediction of chemotherapy-induced cardiotoxicity: systematic review of the literature and recommendations for use. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(5):688-95.
20. Licata S, Saponiero A, Mordente A, Minotti G. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem Res Toxicol*. 2000;13(5):414-20.
21. Wenningmann N, Knapp M, Ande A, Vaidya TR, Ait-Oudhia S. Insights into Doxorubicin-induced Cardiotoxicity: Molecular Mechanisms, Preventive Strategies, and Early Monitoring. *Mol Pharmacol*. 2019.
22. Bonadonna G, Monfardini S, De Lena M, Fossati-Bellani F, Beretta G. Phase I and preliminary phase II evaluation of adriamycin (NSC 123127). *Cancer Res*. 1970;30(10):2572-82.
23. Salazar-Mendiguchía J, González-Costello J, Roca J, Ariza-Solé A, Manito N, Cequier A. Anthracycline-mediated cardiomyopathy: basic molecular knowledge for the cardiologist. *Arch Cardiol Mex*. 2014;84(3):218-23.
24. Ewer MS, Vooletich MT, Durand JB, Woods ML, Davis JR, Valero V, et al. Reversibility of trastuzumab-related cardiotoxicity: new insights based on clinical course and response to medical treatment. *J Clin Oncol*. 2005;23(31):7820-6.
25. Pacciarini MA, Barbieri B, Colombo T, Broggin M, Garattini S, Donelli MG. Distribution and antitumor activity of adriamycin given in a high-dose and a repeated low-dose schedule to mice. *Cancer Treat Rep*. 1978;62(5):791-800.
26. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*. 2003;97(11):2869-79.
27. Mulrooney DA, Yeazel MW, Kawashima T, Mertens AC, Mitby P, Stovall M, et al. Cardiac outcomes in a cohort of adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *BMJ*. 2009;339:b4606.
28. Bristow MR, Mason JW, Billingham ME, Daniels JR. Doxorubicin cardiomyopathy: evaluation by phonocardiography, endomyocardial biopsy, and cardiac catheterization. *Ann Intern Med*. 1978;88(2):168-75.
29. Rochette L, Guenancia C, Gudjoncik A, Hachet O, Zeller M, Cottin Y, et al. Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(6):326-48.
30. de Oliveira BL, Niederer S. A Biophysical Systems Approach to Identifying the Pathways of Acute and Chronic Doxorubicin Mitochondrial Cardiotoxicity. *PLoS Comput Biol*. 2016;12(11):e1005214.
31. Goormaghtigh E, Huart P, Brasseur R, Ruysschaert JM. Mechanism of inhibition of mitochondrial enzymatic complex I-III by adriamycin derivatives. *Biochim Biophys Acta*. 1986;861(1):83-94.

32. Pointon AV, Walker TM, Phillips KM, Luo J, Riley J, Zhang SD, et al. Doxorubicin in vivo rapidly alters expression and translation of myocardial electron transport chain genes, leads to ATP loss and caspase 3 activation. *PLoS One*. 2010;5(9):e12733.
33. Delemasure S, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Rochette L. [Preventing the cardiotoxic effects of anthracyclins. From basic concepts to clinical data]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2006;55(2):104-12.
34. Garner AP, Paine MJ, Rodriguez-Crespo I, Chinje EC, Ortiz De Montellano P, Stratford IJ, et al. Nitric oxide synthases catalyze the activation of redox cycling and bioelectroactive anticancer agents. *Cancer Res*. 1999;59(8):1929-34.
35. Pironti G, Ivarsson N, Yang J, Farinotti AB, Jonsson W, Zhang SJ, et al. Dietary nitrate improves cardiac contractility via enhanced cellular Ca^{2+} signaling. *Basic Res Cardiol*. 2016;111(3):34.
36. Zhao L, Zhang B. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Sci Rep*. 2017;7:44735.
37. Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res*. 2000;60(7):1789-92.
38. Hanna AD, Lam A, Tham S, Dulhunty AF, Beard NA. Adverse effects of doxorubicin and its metabolic product on cardiac RyR2 and SERCA2A. *Mol Pharmacol*. 2014;86(4):438-49.
39. Sag CM, Köhler AC, Anderson ME, Backs J, Maier LS. CaMKII-dependent SR Ca leak contributes to doxorubicin-induced impaired Ca handling in isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51(5):749-59.
40. Kalivendi SV, Konorev EA, Cunningham S, Vanamala SK, Kaji EH, Joseph J, et al. Doxorubicin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium. *Biochem J*. 2005;389(Pt 2):527-39.
41. Luongo TS, Lambert JP, Gross P, Nwokedi M, Lombardi AA, Shanmughapriya S, et al. The mitochondrial Na. *Nature*. 2017;545(7652):93-7.
42. Liu D, Ma Z, Xu L, Zhang X, Qiao S, Yuan J. PGC1 α activation by pterostilbene ameliorates acute doxorubicin cardiotoxicity by reducing oxidative stress via enhancing AMPK and SIRT1 cascades. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(22):10061-73.
43. Pawlinski R, Tencati M, Hampton CR, Shishido T, Bullard TA, Casey LM, et al. Protease-activated receptor-1 contributes to cardiac remodeling and hypertrophy. *Circulation*. 2007;116(20):2298-306.
44. Cheung KG, Cole LK, Xiang B, Chen K, Ma X, Myal Y, et al. Sirtuin-3 (SIRT3) Protein Attenuates Doxorubicin-induced Oxidative Stress and Improves Mitochondrial Respiration in H9c2 Cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2015;290(17):10981-93.
45. Ni C, Ma P, Wang R, Lou X, Liu X, Qin Y, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity involves IFN γ -mediated metabolic reprogramming in cardiomyocytes. *J Pathol*. 2019;247(3):320-32.
46. Ma Y, Zhang X, Bao H, Mi S, Cai W, Yan H, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 differentially regulate doxorubicin induced cardiomyopathy in mice. *PLoS One*. 2012;7(7):e40763.
47. Herman EH, Lipshultz SE, Rifai N, Zhang J, Papoian T, Yu ZX, et al. Use of cardiac troponin T levels as an indicator of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Res*. 1998;58(2):195-7.

48. Fink FM, Genser N, Fink C, Falk M, Mair J, Maurer-Dengg K, et al. Cardiac troponin T and creatine kinase MB mass concentrations in children receiving anthracycline chemotherapy. *Med Pediatr Oncol*. 1995;25(3):185-9.
49. Mair J, Lindahl B, Hammarsten O, Müller C, Giannitsis E, Huber K, et al. How is cardiac troponin released from injured myocardium? *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2018;7(6):553-60.
50. Adamcova M, Lencova-Popelova O, Jirkovsky E, Mazurova Y, Palicka V, Simko F, et al. Experimental determination of diagnostic window of cardiac troponins in the development of chronic anthracycline cardiotoxicity and estimation of its predictive value. *Int J Cardiol*. 2015;201:358-67.
51. Lauer B, Niederau C, Kühl U, Schannwell M, Pauschinger M, Strauer BE, et al. [Cardiac troponin T in the diagnosis and follow up of suspected myocarditis]. *Dtsch Med Wochenschr*. 1998;123(14):409-17.
52. Swaanenburg JC, Klaase JM, DeJongste MJ, Zimmerman KW, ten Duis HJ. Troponin I, troponin T, CKMB-activity and CKMB-mass as markers for the detection of myocardial contusion in patients who experienced blunt trauma. *Clin Chim Acta*. 1998;272(2):171-81.
53. Giannitsis E, Müller-Bardorff M, Kurowski V, Weidtmann B, Wiegand U, Kampmann M, et al. Independent prognostic value of cardiac troponin T in patients with confirmed pulmonary embolism. *Circulation*. 2000;102(2):211-7.
54. Yeung TK, Chakrabarti K, Wilding D, Hopewell JW. Modification of doxorubicin-induced cardiotoxicity: manipulation of the dosage schedule. *Hum Exp Toxicol*. 2002;21(11):607-14.
55. Lum BL, Svec JM, Torti FM. Doxorubicin: alteration of dose scheduling as a means of reducing cardiotoxicity. *Drug Intell Clin Pharm*. 1985;19(4):259-64.
56. Legha SS, Benjamin RS, Mackay B, Ewer M, Wallace S, Valdivieso M, et al. Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Ann Intern Med*. 1982;96(2):133-9.
57. Hortobagyi GN, Frye D, Buzdar AU, Ewer MS, Fraschini G, Hug V, et al. Decreased cardiac toxicity of doxorubicin administered by continuous intravenous infusion in combination chemotherapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 1989;63(1):37-45.
58. Lipshultz SE, Giantris AL, Lipsitz SR, Kimball Dalton V, Asselin BL, Barr RD, et al. Doxorubicin administration by continuous infusion is not cardioprotective: the Dana-Farber 91-01 Acute Lymphoblastic Leukemia protocol. *J Clin Oncol*. 2002;20(6):1677-82.
59. Working PK, Newman MS, Sullivan T, Yarrington J. Reduction of the cardiotoxicity of doxorubicin in rabbits and dogs by encapsulation in long-circulating, pegylated liposomes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;289(2):1128-33.
60. Schindler C, Collinson A, Matthews C, Pointon A, Jenkinson L, Minter RR, et al. Exosomal delivery of doxorubicin enables rapid cell entry and enhanced in vitro potency. *PLoS One*. 2019;14(3):e0214545.
61. Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, Anderson GJ, et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*. 2014;35(7):2383-90.
62. Yong T, Zhang X, Bie N, Zhang H, Li F, Hakeem A, et al. Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy. *Nat Commun*. 2019;10(1):3838.

63. Zhen J, Yu H, Ji H, Cai L, Leng J, Keller BB. Neonatal murine engineered cardiac tissue toxicology model: Impact of dexrazoxane on doxorubicin induced injury. *Life Sci.* 2019;239:117070.
64. Lipshultz SE, Scully RE, Lipsitz SR, Sallan SE, Silverman LB, Miller TL, et al. Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(10):950-61.
65. Schloemer NJ, Brickler M, Hoffmann R, Pan A, Simpson P, McFadden V, et al. Administration of Dexrazoxane Improves Cardiac Indices in Children and Young Adults With Acute Myeloid Leukemia (AML) While Maintaining Survival Outcomes. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2017;39(5):e254-e8.
66. Tahover E, Segal A, Isacson R, Rosengarten O, Grenader T, Gips M, et al. Dexrazoxane added to doxorubicin-based adjuvant chemotherapy of breast cancer: a retrospective cohort study with a comparative analysis of toxicity and survival. *Anticancer Drugs.* 2017;28(7):787-94.
67. Spalato Ceruso M, Napolitano A, Silletta M, Mazzocca A, Valeri S, Improta L, et al. Use of Cardioprotective Dexrazoxane Is Associated with Increased Myelotoxicity in Anthracycline-Treated Soft-Tissue Sarcoma Patients. *Chemotherapy.* 2019;64(2):105-9.
68. Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, et al. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation.* 2006;113(4):535-43.
69. Ammar HI, Saba S, Ammar RI, Elsayed LA, Ghaly WB, Dhingra S. Erythropoietin protects against doxorubicin-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(6):H2413-21.
70. Cui L, Guo J, Zhang Q, Yin J, Li J, Zhou W, et al. Erythropoietin activates SIRT1 to protect human cardiomyocytes against doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction and toxicity. *Toxicol Lett.* 2017;275:28-38.
71. Chan KY, Xiang P, Zhou L, Li K, Ng PC, Wang CC, et al. Thrombopoietin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy, improves cardiac function, and reversely alters specific signalling networks. *Eur J Heart Fail.* 2011;13(4):366-76.
72. Ludke A, Akolkar G, Ayyappan P, Sharma AK, Singal PK. Time course of changes in oxidative stress and stress-induced proteins in cardiomyocytes exposed to doxorubicin and prevention by vitamin C. *PLoS One.* 2017;12(7):e0179452.
73. Fayez AM, Zaafan MA. Eicosapentaenoic Acid and Vitamin E Against Doxorubicin Induced Cardiac and Renal Damages: Role of Cytochrome c and iNOS. *Arch Iran Med.* 2018;21(11):502-8.
74. Potemski P, Polakowski P, Wiktorowska-Owczarek AK, Owczarek J, Płużańska A, Orszulak-Michalak D. Amifostine improves hemodynamic parameters in doxorubicin-pretreated rabbits. *Pharmacol Rep.* 2006;58(6):966-72.
75. Nabati M, Janbabai G, Baghyari S, Esmaili K, Yazdani J. Cardioprotective Effects of Carvedilol in Inhibiting Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2017;69(5):279-85.
76. Tashakori Beheshti A, Mostafavi Toroghi H, Hosseini G, Zarifian A, Homaei Shandiz F, Fazlinezhad A. Carvedilol Administration Can Prevent Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Double-Blind Randomized Trial. *Cardiology.* 2016;134(1):47-53.

77. Kaya MG, Ozkan M, Gunebakmaz O, Akkaya H, Kaya EG, Akpek M, et al. Protective effects of nebivolol against anthracycline-induced cardiomyopathy: a randomized control study. *Int J Cardiol.* 2013;167(5):2306-10.
78. Morikawa Y, Zhang M, Heallen T, Leach J, Tao G, Xiao Y, et al. Actin cytoskeletal remodeling with protrusion formation is essential for heart regeneration in Hippo-deficient mice. *Sci Signal.* 2015;8(375):ra41.
79. Bargehr J, Ong LP, Colzani M, Davaapil H, Hofsteen P, Bhandari S, et al. Epicardial cells derived from human embryonic stem cells augment cardiomyocyte-driven heart regeneration. *Nat Biotechnol.* 2019;37(8):895-906.
80. Wang J, Cao J, Dickson AL, Poss KD. Epicardial regeneration is guided by cardiac outflow tract and Hedgehog signalling. *Nature.* 2015;522(7555):226-30.
81. He L, Huang X, Kanisicak O, Li Y, Wang Y, Pu W, et al. Preexisting endothelial cells mediate cardiac neovascularization after injury. *J Clin Invest.* 2017;127(8):2968-81.
82. Yadav SK, Mishra PK. Isolation, Characterization, and Differentiation of Cardiac Stem Cells from the Adult Mouse Heart. *J Vis Exp.* 2019(143).
83. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114(6):763-76.
84. Lushaj EB, Anstadt E, Haworth R, Roenneburg D, Kim J, Hematti P, et al. Mesenchymal stromal cells are present in the heart and promote growth of adult stem cells in vitro. *Cytotherapy.* 2011;13(4):400-6.
85. Thier MC, Hommerding O, Panten J, Pinna R, García-González D, Berger T, et al. Identification of Embryonic Neural Plate Border Stem Cells and Their Generation by Direct Reprogramming from Adult Human Blood Cells. *Cell Stem Cell.* 2019;24(1):166-82.e13.
86. Zhai Q, Dong Z, Wang W, Li B, Jin Y. Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Front Med.* 2019;13(2):152-9.
87. Scalise M, Marino F, Cianflone E, Mancuso T, Marotta P, Aquila I, et al. Heterogeneity of Adult Cardiac Stem Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1169:141-78.
88. Nadal-Ginard B, Ellison GM, Torella D. The cardiac stem cell compartment is indispensable for myocardial cell homeostasis, repair and regeneration in the adult. *Stem Cell Res.* 2014;13(3 Pt B):615-30.
89. Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell.* 2016;167(4):897-914.
90. Lim M, Wang W, Liang L, Han ZB, Li Z, Geng J, et al. Intravenous injection of allogeneic umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells reduces the infarct area and ameliorates cardiac function in a porcine model of acute myocardial infarction. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):129.
91. Balbi C, Bollini S. Fetal and perinatal stem cells in cardiac regeneration: Moving forward to the paracrine era. *Placenta.* 2017;59:96-106.
92. Yoon J, Min BG, Kim YH, Shim WJ, Ro YM, Lim DS. Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model. *Acta Cardiol.* 2005;60(3):277-84.
93. Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Magotani H, Onoe H, Hayashi T, et al. Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature.* 2017;548(7669):592-6.

94. Yan Y, Ma T, Gong K, Ao Q, Zhang X, Gong Y. Adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes adult neurogenesis in the brains of Alzheimer's disease mice. *Neural Regen Res*. 2014;9(8):798-805.
95. Harris VK, Stark J, Vyshkina T, Blackshear L, Joo G, Stefanova V, et al. Phase I Trial of Intrathecal Mesenchymal Stem Cell-derived Neural Progenitors in Progressive Multiple Sclerosis. *EBioMedicine*. 2018;29:23-30.
96. Wu H, Mahato RI. Mesenchymal stem cell-based therapy for type 1 diabetes. *Discov Med*. 2014;17(93):139-43.
97. García-Castro J, Singeç I. Prospects of Pluripotent and Adult Stem Cells for Rare Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1031:371-86.
98. Lerman DA, Alotti N, Ume KL, Péault B. Cardiac Repair and Regeneration: The Value of Cell Therapies. *Eur Cardiol*. 2016;11(1):43-8.
99. Dixit P, Katare R. Challenges in identifying the best source of stem cells for cardiac regeneration therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:26.
100. Nelson TJ, Ge ZD, Van Orman J, Barron M, Rudy-Reil D, Hacker TA, et al. Improved cardiac function in infarcted mice after treatment with pluripotent embryonic stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2006;288(11):1216-24.
101. Goldfracht I, Efraim Y, Shinnawi R, Kovalev E, Huber I, Gepstein A, et al. Engineered heart tissue models from hiPSC-derived cardiomyocytes and cardiac ECM for disease modeling and drug testing applications. *Acta Biomater*. 2019;92:145-59.
102. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*. 2012;485(7400):593-8.
103. Ye L, Haider HKh, Sim EK. Adult stem cells for cardiac repair: a choice between skeletal myoblasts and bone marrow stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231(1):8-19.
104. Shen WC, Chou YH, Huang HP, Sheen JF, Hung SC, Chen HF. Induced pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells attenuate ischemic acute kidney injury and cardiac dysfunction. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):344.
105. Noiseux N, Ghecchi M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther*. 2006;14(6):840-50.
106. Ciuffreda MC, Malpasso G, Musarò P, Turco V, Ghecchi M. Protocols for in vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic, Chondrogenic and Adipogenic Lineages. *Methods Mol Biol*. 2016;1416:149-58.
107. Szaraz P, Gratch YS, Iqbal F, Librach CL. In Vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Functional Cardiomyocyte-like Cells. *J Vis Exp*. 2017(126).
108. Beeravolu N, McKee C, Alamri A, Mikhael S, Brown C, Perez-Cruet M, et al. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord and Fetal Placenta. *J Vis Exp*. 2017(122).
109. Rolandsson Enes S, Andersson Sjöland A, Skog I, Hansson L, Larsson H, Le Blanc K, et al. MSC from fetal and adult lungs possess lung-specific properties compared to bone marrow-derived MSC. *Sci Rep*. 2016;6:29160.
110. Huang S, Xu L, Zhang Y, Sun Y, Li G. Systemic and Local Administration of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promotes Fracture Healing in Rats. *Cell Transplant*. 2015;24(12):2643-55.

111. Shabbir A, Zisa D, Leiker M, Johnston C, Lin H, Lee T. Muscular dystrophy therapy by nonautologous mesenchymal stem cells: muscle regeneration without immunosuppression and inflammation. *Transplantation*. 2009;87(9):1275-82.
112. Thomson AL, Berent AC, Weisse C, Langston CE. Intra-arterial renal infusion of autologous mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: Phase I clinical trial. *J Vet Intern Med*. 2019;33(3):1353-61.
113. Matthay MA, Calfee CS, Zhuo H, Thompson BT, Wilson JG, Levitt JE, et al. Treatment with allogeneic mesenchymal stromal cells for moderate to severe acute respiratory distress syndrome (START study): a randomised phase 2a safety trial. *Lancet Respir Med*. 2019;7(2):154-62.
114. Bonig H, Kuçi Z, Kuçi S, Bakhtiar S, Basu O, Bug G, et al. Children and Adults with Refractory Acute Graft-versus-Host Disease Respond to Treatment with the Mesenchymal Stromal Cell Preparation "MSC-FFM"-Outcome Report of 92 Patients. *Cells*. 2019;8(12).
115. Uccelli A, Laroni A, Brundin L, Clanet M, Fernandez O, Nabavi SM, et al. MEsenchymal StEm cells for Multiple Sclerosis (MESEMS): a randomized, double blind, cross-over phase I/II clinical trial with autologous mesenchymal stem cells for the therapy of multiple sclerosis. *Trials*. 2019;20(1):263.
116. De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med*. 2012;12(5):574-91.
117. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105(10):4120-6.
118. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008;111(3):1327-33.
119. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F, et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp Hematol*. 2009;37(5):604-15.
120. Baberg F, Geyh S, Waldera-Lupa D, Stefanski A, Zilkens C, Haas R, et al. Secretome analysis of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2019;1867(4):434-41.
121. Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept*. 2004;117(1):3-10.
122. Kucia M, Dawn B, Hunt G, Guo Y, Wysoczynski M, Majka M, et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res*. 2004;95(12):1191-9.
123. Mathur A, Arnold R, Assmus B, Bartunek J, Belmans A, Bönig H, et al. The effect of intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells on all-cause mortality in acute myocardial infarction: rationale and design of the BAMi trial. *Eur J Heart Fail*. 2017;19(11):1545-50.
124. Tompkins BA, Rieger AC, Florea V, Banerjee MN, Natsumeda M, Nigh ED, et al. Comparison of Mesenchymal Stem Cell Efficacy in Ischemic Versus Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(14).

125. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995;18(12):1417-26.
126. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103(5):697-705.
127. Yang W, Zheng H, Wang Y, Lian F, Hu Z, Xue S. Nesprin-1 has key roles in the process of mesenchymal stem cell differentiation into cardiomyocyte-like cells in vivo and in vitro. *Mol Med Rep*. 2015;11(1):133-42.
128. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-8.
129. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(32):11474-9.
130. Feygin J, Mansoor A, Eckman P, Swingen C, Zhang J. Functional and bioenergetic modulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(3):H1772-80.
131. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*. 2010;4(3):214-22.
132. Zhang Y, Liang X, Liao S, Wang W, Wang J, Li X, et al. Potent Paracrine Effects of human induced Pluripotent Stem Cell-derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Doxorubicin-induced Cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2015;5:11235.
133. Pérez-González R, Gauthier SA, Kumar A, Saito M, Levy E. A Method for Isolation of Extracellular Vesicles and Characterization of Exosomes from Brain Extracellular Space. *Methods Mol Biol*. 2017;1545:139-51.
134. Liu Z, Cauvi DM, Bernardino EMA, Lara B, Lizardo RE, Hawisher D, et al. Isolation and characterization of human urine extracellular vesicles. *Cell Stress Chaperones*. 2018;23(5):943-53.
135. Blans K, Hansen MS, Sørensen LV, Hvam ML, Howard KA, Möller A, et al. Pellet-free isolation of human and bovine milk extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1):1294340.
136. Sun Y, Huo C, Qiao Z, Shang Z, Uzzaman A, Liu S, et al. Comparative Proteomic Analysis of Exosomes and Microvesicles in Human Saliva for Lung Cancer. *J Proteome Res*. 2018;17(3):1101-7.
137. Juan T, Fürthauer M. Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;74:66-77.
138. Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*. 2017;8(4):220-32.
139. El Harane N, Kervadec A, Bellamy V, Pidial L, Neametalla HJ, Perier MC, et al. Acellular therapeutic approach for heart failure: in vitro production of extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors. *Eur Heart J*. 2018;39(20):1835-47.
140. Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, Verweij FJ, Pérez Lanzón M, Zini N, et al. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:127.
141. Zhou J, Li X, Wu X, Zhang T, Zhu Q, Wang X, et al. Exosomes Released from Tumor-Associated Macrophages Transfer miRNAs That Induce a Treg/Th17 Cell Imbalance in Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Immunol Res*. 2018;6(12):1578-92.

142. Nakano M, Nagaishi K, Konari N, Saito Y, Chikenji T, Mizue Y, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetes-induced cognitive impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes. *Sci Rep*. 2016;6:24805.
143. Freeman DW, Noren Hooten N, Eitan E, Green J, Mode NA, Bodogai M, et al. Altered Extracellular Vesicle Concentration, Cargo, and Function in Diabetes. *Diabetes*. 2018;67(11):2377-88.
144. Huang T, Song C, Zheng L, Xia L, Li Y, Zhou Y. The roles of extracellular vesicles in gastric cancer development, microenvironment, anti-cancer drug resistance, and therapy. *Mol Cancer*. 2019;18(1):62.
145. Wortzel I, Dror S, Kenific CM, Lyden D. Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance. *Dev Cell*. 2019;49(3):347-60.
146. Park JE, Tan HS, Datta A, Lai RC, Zhang H, Meng W, et al. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(6):1085-99.
147. Kanemoto S, Nitani R, Murakami T, Kaneko M, Asada R, Matsuhisa K, et al. Multivesicular body formation enhancement and exosome release during endoplasmic reticulum stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;480(2):166-72.
148. Malik ZA, Kott KS, Poe AJ, Kuo T, Chen L, Ferrara KW, et al. Cardiac myocyte exosomes: stability, HSP60, and proteomics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304(7):H954-65.
149. Gupta S, Knowlton AA. HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(6):H3052-6.
150. Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem*. 2009;284(49):34211-22.
151. Savina A, Furlán M, Vidal M, Colombo MI. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem*. 2003;278(22):20083-90.
152. Patel DB, Gray KM, Santharam Y, Lamichhane TN, Stroka KM, Jay SM. Impact of cell culture parameters on production and vascularization bioactivity of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Bioeng Transl Med*. 2017;2(2):170-9.
153. Terlecki-Zaniewicz L, Lämmermann I, Latreille J, Bobbili MR, Pils V, Schosserer M, et al. Small extracellular vesicles and their miRNA cargo are anti-apoptotic members of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(5):1103-32.
154. Gray WD, French KM, Ghosh-Choudhary S, Maxwell JT, Brown ME, Platt MO, et al. Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia-treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology. *Circ Res*. 2015;116(2):255-63.
155. Sluijter JPG, Davidson SM, Boulanger CM, Buzás EI, de Kleijn DPV, Engel FB, et al. Extracellular vesicles in diagnostics and therapy of the ischaemic heart: Position Paper from the Working Group on Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res*. 2018;114(1):19-34.
156. Boulanger CM, Loyer X, Rautou PE, Amabile N. Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(5):259-72.
157. Zhang Q, Shang M, Zhang M, Wang Y, Chen Y, Wu Y, et al. Microvesicles derived from hypoxia/reoxygenation-treated human umbilical vein endothelial cells promote apoptosis and oxidative stress in H9c2 cardiomyocytes. *BMC Cell Biol*. 2016;17(1):25.

158. Emam SE, Ando H, Abu Lila AS, Kobayashi S, Shimizu T, Okuhira K, et al. Doxorubicin Expands in Vivo Secretion of Circulating Exosome in Mice. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(7):1078-83.
159. Yarana C, Carroll D, Chen J, Chaiswing L, Zhao Y, Noel T, et al. Extracellular Vesicles Released by Cardiomyocytes in a Doxorubicin-Induced Cardiac Injury Mouse Model Contain Protein Biomarkers of Early Cardiac Injury. *Clin Cancer Res.* 2018;24(7):1644-53.
160. Ohmichi T, Mitsuhashi M, Tatebe H, Kasai T, Ali El-Agnaf OM, Tokuda T. Quantification of brain-derived extracellular vesicles in plasma as a biomarker to diagnose Parkinson's and related diseases. *Parkinsonism Relat Disord.* 2019;61:82-7.
161. Nassar W, El-Ansary M, Sabry D, Mostafa MA, Fayad T, Kotb E, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases. *Biomater Res.* 2016;20:21.
162. Chen L, Wang Y, Pan Y, Zhang L, Shen C, Qin G, et al. Cardiac progenitor-derived exosomes protect ischemic myocardium from acute ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;431(3):566-71.
163. Chen CW, Wang LL, Zaman S, Gordon J, Arisi MF, Venkataraman CM, et al. Sustained release of endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles from shear-thinning hydrogels improves angiogenesis and promotes function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2018;114(7):1029-40.
164. Zhao Y, Sun X, Cao W, Ma J, Sun L, Qian H, et al. Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Relieve Acute Myocardial Ischemic Injury. *Stem Cells Int.* 2015;2015:761643.
165. Zhang B, Wu X, Zhang X, Sun Y, Yan Y, Shi H, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/ β -catenin pathway. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(5):513-22.
166. Vicencio JM, Yellon DM, Sivaraman V, Das D, Boi-Doku C, Arjun S, et al. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(15):1525-36.
167. Vandergriff AC, de Andrade JB, Tang J, Hensley MT, Piedrahita JA, Caranasos TG, et al. Intravenous Cardiac Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorate Cardiac Dysfunction in Doxorubicin Induced Dilated Cardiomyopathy. *Stem Cells Int.* 2015;2015:960926.
168. Gneccchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* 2006;20(6):661-9.
169. Arslan F, Lai RC, Smeets MB, Akeroyd L, Choo A, Aguor EN, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 2013;10(3):301-12.
170. Huang P, Wang L, Li Q, Xu J, Xiong Y, Chen G, et al. Combinatorial treatment of acute myocardial infarction using stem cells and their derived exosomes resulted in improved heart performance. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):300.
171. Sun X, Shan A, Wei Z, Xu B. Intravenous mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate myocardial inflammation in the dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(4):2611-8.

172. Kore RA, Henson JC, Hamzah RN, Griffin RJ, Tackett AJ, Ding Z, et al. Molecular events in MSC exosome mediated cytoprotection in cardiomyocytes. *Sci Rep*. 2019;9(1):19276.
173. Zhang Z, Yang J, Yan W, Li Y, Shen Z, Asahara T. Pretreatment of Cardiac Stem Cells With Exosomes Derived From Mesenchymal Stem Cells Enhances Myocardial Repair. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(1).
174. Ma J, Zhao Y, Sun L, Sun X, Zhao X, Qian H, et al. Exosomes Derived from Akt-Modified Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve Cardiac Regeneration and Promote Angiogenesis via Activating Platelet-Derived Growth Factor D. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(1):51-9.
175. Liu X, Li X, Zhu W, Zhang Y, Hong Y, Liang X, et al. Exosomes from mesenchymal stem cells overexpressing MIF enhance myocardial repair. *J Cell Physiol*. 2020.
176. Barpe DR, Rosa DD, Froehlich PE. Pharmacokinetic evaluation of doxorubicin plasma levels in normal and overweight patients with breast cancer and simulation of dose adjustment by different indexes of body mass. *Eur J Pharm Sci*. 2010;41(3-4):458-63.
177. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006;Chapter 3:Unit 3.22.
178. López Guerrero JA, Bolufer P, Barragán E, Sanz Alonso M, Palau J, Sempere A, et al. [Levels of cytokeratin CK19 expression in mononuclear blood cells evaluated using a reverse PCR (RT-PCR)]. *Sangre (Barc)*. 1996;41(6):441-6.
179. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13(12):1901-28.
180. Chen X, Peng X, Luo Y, You J, Yin D, Xu Q, et al. Quercetin protects cardiomyocytes against doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress and improving mitochondrial function via 14-3-3 γ . *Toxicol Mech Methods*. 2019;29(5):344-54.
181. Xu C, Liu CH, Zhang DL. MicroRNA-22 inhibition prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity via upregulating SIRT1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;521(2):485-91.
182. Lan Y, Wang Y, Huang K, Zeng Q. Heat Shock Protein 22 Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Front Pharmacol*. 2020;11:257.
183. Zhang H, Tian Y, Liang D, Fu Q, Jia L, Wu D, et al. The Effects of Inhibition of MicroRNA-375 in a Mouse Model of Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity. *Med Sci Monit*. 2020;26:e920557.
184. Cunha-Oliveira T, Ferreira LL, Coelho AR, Deus CM, Oliveira PJ. Doxorubicin triggers bioenergetic failure and p53 activation in mouse stem cell-derived cardiomyocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;348:1-13.
185. Adamcova M, Skarkova V, Seifertova J, Rudolf E. Cardiac Troponins are Among Targets of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in hiPCS-CMs. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11).
186. Llach A, Mazevet M, Mateo P, Villejouvert O, Ridoux A, Rucker-Martin C, et al. Progression of excitation-contraction coupling defects in doxorubicin cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;126:129-39.

187. Narikawa M, Umemura M, Tanaka R, Hikichi M, Nagasako A, Fujita T, et al. Doxorubicin induces trans-differentiation and MMP1 expression in cardiac fibroblasts via cell death-independent pathways. *PLoS One*. 2019;14(9):e0221940.
188. Milano G, Biemmi V, Lazzarini E, Balbi C, Ciullo A, Bolis S, et al. Intravenous administration of cardiac progenitor cell-derived exosomes protects against doxorubicin/trastuzumab-induced cardiac toxicity. *Cardiovasc Res*. 2020;116(2):383-92.
189. Doroshov JH, Esworthy RS, Chu FF. Control of doxorubicin-induced, reactive oxygen-related apoptosis by glutathione peroxidase 1 in cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res*. 2020;21:100709.
190. Reyes ME, Ma J, Grove ML, Ater JL, Morrison AC, Hildebrandt MAT. RNA sequence analysis of inducible pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals altered expression of DNA damage and cell cycle genes in response to doxorubicin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;356:44-53.
191. Reagan WJ, York M, Berridge B, Schultze E, Walker D, Pettit S. Comparison of cardiac troponin I and T, including the evaluation of an ultrasensitive assay, as indicators of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Pathol*. 2013;41(8):1146-58.
192. Segredo MP, Salvadori DM, Rocha NS, Moretto FC, Correa CR, Camargo EA, et al. Oxidative stress on cardiotoxicity after treatment with single and multiple doses of doxorubicin. *Hum Exp Toxicol*. 2014;33(7):748-60.
193. Tavakoli Dargani Z, Singla R, Johnson T, Kukreja R, Singla DK. Exosomes derived from embryonic stem cells inhibit doxorubicin and inflammation-induced pyroptosis in muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018;96(3):304-7.
194. Venkatakrishnan CD, Dunsmore K, Wong H, Roy S, Sen CK, Wani A, et al. HSP27 regulates p53 transcriptional activity in doxorubicin-treated fibroblasts and cardiac H9c2 cells: p21 upregulation and G2/M phase cell cycle arrest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(4):H1736-44.
195. Jahn SK, Hennicke T, Kassack MU, Drews L, Reichert AS, Fritz G. Distinct influence of the anthracycline derivative doxorubicin on the differentiation efficacy of mESC-derived endothelial progenitor cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020;1867(7):118711.
196. L'Ecuyer T, Sanjeev S, Thomas R, Novak R, Das L, Campbell W, et al. DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(3):H1273-80.
197. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002;30(1):42-8.
198. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75(3):389-97.
199. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-43.
200. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.

201. Wehman B, Sharma S, Pietris N, Mishra R, Siddiqui OT, Bigham G, et al. Mesenchymal stem cells preserve neonatal right ventricular function in a porcine model of pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(11):H1816-26.
202. Mias C, Lairez O, Trouche E, Roncalli J, Calise D, Seguelas MH, et al. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. *Stem Cells*. 2009;27(11):2734-43.
203. Heldman AW, DiFede DL, Fishman JE, Zambrano JP, Trachtenberg BH, Karantalis V, et al. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA*. 2014;311(1):62-73.
204. Chullikana A, Majumdar AS, Gottipamula S, Krishnamurthy S, Kumar AS, Prakash VS, et al. Randomized, double-blind, phase I/II study of intravenous allogeneic mesenchymal stromal cells in acute myocardial infarction. *Cytotherapy*. 2015;17(3):250-61.
205. Gao LR, Pei XT, Ding QA, Chen Y, Zhang NK, Chen HY, et al. A critical challenge: dosage-related efficacy and acute complication intracoronary injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2013;168(4):3191-9.
206. Wang JA, Xie XJ, He H, Sun Y, Jiang J, Luo RH, et al. [A prospective, randomized, controlled trial of autologous mesenchymal stem cells transplantation for dilated cardiomyopathy]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2006;34(2):107-10.
207. Karantalis V, DiFede DL, Gerstenblith G, Pham S, Symes J, Zambrano JP, et al. Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion, and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting: The Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS) trial. *Circ Res*. 2014;114(8):1302-10.
208. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow–derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*. 2012;308(22):2369-79.
209. Mathiasen AB, Qayyum AA, Jørgensen E, Helqvist S, Fischer-Nielsen A, Kofoed KF, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial). *Eur Heart J*. 2015;36(27):1744-53.
210. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004;109(12):1543-9.
211. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(5):1053-67.
212. Sharma J, Hampton JM, Valiente GR, Wada T, Steigelman H, Young MC, et al. Therapeutic Development of Mesenchymal Stem Cells or Their Extracellular Vesicles to Inhibit Autoimmune-Mediated Inflammatory Processes in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*. 2017;8:526.
213. Wang Y, Zhao R, Liu D, Deng W, Xu G, Liu W, et al. Exosomes Derived from miR-214-Enriched Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Regulate Oxidative

- Damage in Cardiac Stem Cells by Targeting CaMKII. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:4971261.
214. Eguchi S, Takefuji M, Sakaguchi T, Ishihama S, Mori Y, Tsuda T, et al. Cardiomyocytes capture stem cell-derived, anti-apoptotic microRNA-214 via clathrin-mediated endocytosis in acute myocardial infarction. *J Biol Chem*. 2019;294(31):11665-74.
215. Zhou S, Starkov A, Froberg MK, Leino RL, Wallace KB. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res*. 2001;61(2):771-7.
216. Desai VG, Herman EH, Moland CL, Branham WS, Lewis SM, Davis KJ, et al. Development of doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity in the B6C3F1 mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;266(1):109-21.
217. Tarpey MD, Amorese AJ, Balestrieri NP, Fisher-Wellman KH, Spangenburg EE. Doxorubicin causes lesions in the electron transport system of skeletal muscle mitochondria that are associated with a loss of contractile function. *J Biol Chem*. 2019;294(51):19709-22.
218. Toh WS, Lai RC, Zhang B, Lim SK. MSC exosome works through a protein-based mechanism of action. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(4):843-53.
219. Lebrecht D, Setzer B, Ketelsen UP, Haberstroh J, Walker UA. Time-dependent and tissue-specific accumulation of mtDNA and respiratory chain defects in chronic doxorubicin cardiomyopathy. *Circulation*. 2003;108(19):2423-9.
220. Montalvo RN, Doerr V, Min K, Szeto HH, Smuder AJ. Doxorubicin-induced oxidative stress differentially regulates proteolytic signaling in cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2020;318(2):R227-R33.
221. Cole MP, Chaiswing L, Oberley TD, Edelmann SE, Piascik MT, Lin SM, et al. The protective roles of nitric oxide and superoxide dismutase in adriamycin-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Res*. 2006;69(1):186-97.
222. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*. 2012;18(11):1639-42.
223. Desai VG, C Kwekel J, Vijay V, Moland CL, Herman EH, Lee T, et al. Early biomarkers of doxorubicin-induced heart injury in a mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;281(2):221-9.
224. Beaumier A, Robinson SR, Robinson N, Lopez KE, Meola DM, Barber LG, et al. Extracellular vesicular microRNAs as potential biomarker for early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Vet Intern Med*. 2020.
225. Lai RC, Tan SS, Yeo RW, Choo AB, Reiner AT, Su Y, et al. MSC secretes at least 3 EV types each with a unique permutation of membrane lipid, protein and RNA. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:29828.
226. Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, et al. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(41):14888-93.
227. Lai RC, Tan SS, Teh BJ, Sze SK, Arslan F, de Kleijn DP, et al. Proteolytic Potential of the MSC Exosome Proteome: Implications for an Exosome-Mediated Delivery of Therapeutic Proteasome. *Int J Proteomics*. 2012;2012:971907.

