

**Universidad Cardenal Herrera-CEU**

**Departamento de Medicina y Cirugía Animal**



# Trasplante de Precursores Neurales derivados de Médula Espinal Adulta en el Rescate Funcional de Lesiones Medulares Crónicas

TESIS DOCTORAL

Presentada por:  
Viviana Bisbal Velasco

Dirigida por:  
Dra. Victoria Moreno  
Manzano

VALENCIA  
2014



# Índice

<b>RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>1. SISTEMA NERVIOSO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. ANATOMÍA FUNCIONAL DE LA MÉDULA ESPINAL.....</b>	<b>14</b>
1.1.1. SUSTANCIA GRIS.....	15
1.1.2. SUSTANCIA BLANCA.....	18
<b>1.2. CITOLOGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO.....</b>	<b>21</b>
1.2.1. NEURONA.....	22
1.2.2. MORFOLOGÍA DE LA SINAPISIS.....	24
1.2.3. NEUROGLÍA.....	25
<b>1.3. MENINGES.....</b>	<b>27</b>
<b>2. LESIÓN MEDULAR TRAUMÁTICA.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN MEDULAR.....</b>	<b>30</b>
2.1.1. DAÑO PRIMARIO.....	30
2.1.2. DAÑO SECUNDARIO.....	32
2.1.2.1. Respuesta Inmunomediada.....	32
2.1.2.2. Daño oxidativo.....	33
2.1.2.3. Excitotoxicidad.....	33
2.1.2.4. Apoptosis.....	34
2.1.2.5. Trastornos vasculares.....	34
2.1.2.6. Shock Neurogénico.....	35
2.1.2.7. Factor de Necrosis TNF- $\alpha$ .....	35
2.1.2.8. Cavitación.....	35
2.1.3. MOLÉCULAS INHIBITORIAS DEL CRECIMIENTO.....	36
2.1.3.1. Proteína Nogo-a .....	36
2.1.3.2. Glicoproteína asociada a mielina (MAG).....	36
<b>2.1.3.3. Proteoglicanos .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2. FASES.....</b>	<b>39</b>
2.2.1. AGUDA.....	39
2.2.2. SUBAGUDA.....	40
2.2.3. CRÓNICA.....	40
<b>3. MODELOS ANIMALES DE LESIÓN MEDULAR.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. MODELOS FÍSICOS.....</b>	<b>42</b>
3.1.1. TRANSECCIÓN.....	42
3.1.2. COMPRESIÓN.....	42
3.1.3. CONTUSION.....	43
<b>3.2. MODELOS QUÍMICOS.....</b>	<b>44</b>
<b>4. REHABILITACIÓN/ACTIVACIÓN DE LA PLASTICIDAD.....</b>	<b>45</b>

<b>5. TESTS DE EVALUACIÓN DE FUNCIONALIDAD.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1. TESTS LOCOMOTORES.....</b>	<b>48</b>
5.1.1. TEST DE CAMPO ABIERTO.....	49
5.1.2. BBB TEST.....	49
5.1.3. TEST DE LA PISADA.....	51
5.1.4. TEST AUTOMATIZADO DE LA PISADA.....	51
5.1.5. ANÁLISIS CINEMÁTICO.....	52
5.1.6. TEST DE PESO TORACOLUMBAR.....	53
<b>5.2. TESTS MOTORES.....</b>	<b>53</b>
5.2.1. PLANO INCLINADO.....	53
5.2.2. LIMB HANGING.....	54
<b>5.3. TESTS MOTO-SENSORIALES.....</b>	<b>54</b>
5.3.1. ROPE WALK TEST.....	54
5.3.2. NARROW BEAM TEST.....	54
5.3.3. GRID-WALKING TEST.....	55
<b>5.4. TESTS SENSORIALES.....</b>	<b>55</b>
<b>6. ANTECEDENTES DE LA TERAPIA CELULAR EN REGENERACIÓN NEURAL:</b>	
<b>TERAPIA CELULAR.....</b>	<b>56</b>
<b>6.1. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES .....</b>	<b>57</b>
6.1.1. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS (ESCS).....	57
6.1.2. CÉLULAS MADRE INDUCIDAS (IPSCS).....	58
<b>6.2. CÉLULAS MADRE MULTIPOTENTES (ADULTAS Y FETALES).....</b>	<b>59</b>
6.2.1. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCS).....	59
6.2.2. CÉLULAS OLFATORIAS (OECS).....	60
6.2.3. CÉLULAS DE SCHWANN.....	61
6.2.4. MACRÓFAGOS ACTIVADOS.....	62
6.2.5. CÉLULAS MADRE NEURALES /PRECURSORES NEURALES (NPCS).....	62
6.2.5.1. Neurogénesis.....	64
6.2.5.2. Diferenciación .....	66
<b>HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>68</b>
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>72</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>74</b>
<b>1. GENERACIÓN DEL MODELO ANIMAL DE LESIÓN MEDULAR CRÓNICO.....</b>	<b>74</b>
1.1. LESIÓN MEDULAR TRAUMÁTICA.....	74
1.2. VALORACIÓN FUNCIONAL DE LA ACTIVIDAD MOTORA.....	79
<b>2. OBTENCIÓN CÉLULAS MADRE EPENDIMARIAS (EPSPCS).....</b>	<b>80</b>
<b>3. TRASPLANTE INTRAMEDULAR DE EPSPCS.....</b>	<b>83</b>
<b>4. CUIDADOS ASOCIADOS AL MODELO ANIMAL.....</b>	<b>85</b>

<b>5. REHABILITACIÓN.....</b>	<b>85</b>
<b>6. VALORACIÓN DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA: BBB, CATWALK.....</b>	<b>87</b>
<b>7. VALORACIÓN DE REGENERACIÓN AXONAL: BIOTINILATED AMINE DEXTRANE....</b>	<b>89</b>
<b>8. ESTUDIO HISTOLÓGICO: NEUROANATÓMICOS; INMUNOHISTOQUÍMICOS.....</b>	<b>91</b>
8.1. ESTUDIO NEUROANATÓMICO.....	94
8.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	96
<b>9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>98</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>100</b>
<b>1. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MOTORA POR TRASPLANTE DE EPSPCI EN UNA LM CRÓNICA.....</b>	<b>100</b>
<b>2. ESTUDIO HISTOLÓGICO Y ESTRUCTURAL DE LA MÉDULA ESPINAL TRAS LESION CRÓNICA.....</b>	<b>109</b>
<b>2.1. ESTUDIO MACROSCÓPICO.....</b>	<b>110</b>
<b>2.2. ESTUDIOS MICROSCÓPICOS.....</b>	<b>111</b>
2.2.1. Estudio del espesor de la Medula Espinal.....	111
2.2.2. Estudio de la arquitectura estructural.....	114
2.2.3. Estudio de la morfología bajo microscopía electrónica.....	115
<b>3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE MARCADORES CELULARES.....</b>	<b>121</b>
<b>3.1. ANALISIS DE LA EXTENSIÓN DE LA CICATRIZ GLIAL.....</b>	<b>121</b>
<b>3.2. TRAZADO DE LA MIGRACIÓN DEL TRASPLANTE.....</b>	<b>122</b>
<b>3.3. CUANTIFICACIÓN DE LA EXTENSIÓN DE FIBRAS NERVIOSAS EN LA ZONA DE LA LESIÓN.....</b>	<b>123</b>
<b>3.4. VALORACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL TRASPLANTE EN LA INDUCCIÓN DE REGENERACIÓN ENDÓGENA.....</b>	<b>125</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>129</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>143</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>145</b>

# Abreviaturas

## **ABREVIATURAS**

SN: Sistema Nervioso

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

ME: Médula Espinal

IL-6: Interleuquina 6

IL-1 $\beta$ : Interleuquina 1 $\beta$

IM: Intramedular

TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$

ROS: Espécies reactivas de oxígeno

RNS: Espécies reactivas de nitrógeno

Nogo-A: Proteína asociada a mielina con efecto inhibitorio del SNC

NgR1: Proteína Reguladora del Crecimiento negativo 1

NgR2: Proteína Reguladora del Crecimiento negativo 2

MAG: Glicoproteína asociada a mielina

HSPGs: Heparan Sulfato Proteoglicanos

DSPGs: Dermatan Sulfato Proteoglicanos

KSPGs: Keratan Sulfato Proteoglicanos

CSPGs: Condroitín sulfato Proteoglicanos

NG2: Proteoglicano Neural 2

GFAP: Proteína Fibrilar ácida de la glía

GABA: Ácido gamma-animobutírico

BBB: Basso, Beattie y Bresnahan

ESCs: Células Madre Embrionarias

IPSCs: Células Madre Inducidas

MSCs: Células Madre Mesenquimales



BMSCs: Células Madre Mesenquimales derivadas de Medula Ósea

OECs: Celulas derivadas de bulbo olfatorio

NSCs: Células Madre Neurales

epSPCs: Células Madre Neurales procedentes de células endimarias

OPCs: Oligodendrocitos prediferenciados

NGF: Factor de Crecimiento Nervioso

BDNF: Factor Neurotrófico derivado de cerebro

GDNF: Factor Neurotrófico derivado de glía

NT3: Neurotrofina 3

CNTF: Factor Neurotrófico Ciliar

FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos

BrdU: Bromodesoxiuridina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

bHLH: Factor de transcripción hélix-loop-helix

LIF: Factor inhibidor de leucemia

BMP-2: Proteína morfogénica ósea 2

PDGFR $\alpha$ : Factor de crecimiento  $\alpha$  derivado de plaquetas

GFP: Proteína Verde Fluorescente

LM: Lesión Medular

# Resumen

La incidencia anual de lesiones en la médula espinal en los países desarrollados es de entre un 11,5 y un 53,4 por millón de habitantes, encontrándose entre las principales causas los accidentes de trabajo, los deportes y actividades de aventura, accidentes de trabajo, caídas domésticas y violencia [1]. El paciente presenta parálisis motora y pérdida de la sensibilidad de los segmentos corporales por debajo de la zona de la lesión que se cronifica en el tiempo.

La lesión medular provoca la muerte de neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y precursores neurales y provoca también, la formación de cavidades que interrumpen los tractos axonales. Todo ello acompañado de mecanismos secundarios que culminan en la formación de una cicatriz glial impenetrable para los axones.

A pesar de ello, existe una recuperación espontánea tras la lesión medular debida a la plasticidad de la médula espinal acompañada de la proliferación de nuevos precursores neurales en la médula espinal procedente del canal ependimario, con potencial reparador. Sin embargo, la reparación espontánea es incompleta y se requiere intervención terapéutica.

Estudios previos demuestran que la activación de dichas células ependimarias tras una lesión medular (epSPCi) hace que proliferen 10 veces más rápido in vitro y su trasplante en lesión medular aguda es capaz de obtener una recuperación funcional importante.

En el modelo de lesión medular crónica, la aplicación de una terapia celular de administración única, por inyección de epSPCi vía intramedular ha revelado una mejoría funcional significativa tras 4 meses de estudio en lesiones severas. Este rescate de la función locomotriz está acompañado de una mejor distribución en el espesor medular en el epicentro de la lesión con abundantes oligodendrocitos activamente produciendo envolturas nuevas de mielina y una mayor reorganización de la misma en comparación con aquellos animales no trasplantados.

El trasplante de células ependimarias ha migrado y se ha mantenido residente en la zona de la lesión, incluida la cicatriz glial, favoreciendo un mayor número de fibras nerviosas dentro de la misma.

La terapia celular por lo tanto, resulta efectiva en el rescate de la función neuronal en una lesión crónica, con una cicatriz glial ya establecida. Sin embargo, y a pesar de que el rescate de la función es muy rápido tras el trasplante, la regeneración no es completa, por lo que intervenciones múltiples, con trasplantes seriados y/o combinación de terapias serán necesarias para mejorar las expectativas de éxito.

# Summary

Spinal Cord injuries shows an annual incidence between 11.5 and 53.4 million people. The main causes are sports and adventure activities, work accidents, domestic incidents and falls [5]. The patient develops a motor paralysis and loss of sensation of body segments below the site of injury that becomes chronic in time.

Spinal cord injury provokes the death of neurons, oligodendrocytes, astrocytes and neural precursors and also causes the formation of cavities which disrupt axonal tracts. All accompanied by secondary mechanisms that culminate in the formation of a glial scar impenetrable for axons.

However, there is a spontaneous recovery after spinal cord injury due to spinal cord plasticity accompanied by the proliferation of new neural precursors from the ependymal canal. However, the spontaneous repair is incomplete and additional therapeutic intervention are required.

Previous studies demonstrate that activation of these ependymal cells after spinal cord injury (epSPCi) inducing 10 times faster proliferative activity, moreover, epSPCi transplantation in acute spinal cord injury rescue lost locomotion activity.

In the model of chronic spinal cord injury, the application of a single cell therapy administration of epSPCis via intramedullary injection in severe injury revealed significant functional improvement after four months of study. This rescue of locomotor function is accompanied by a better distribution in the thickness of the epicenter of lesion with abundant oligodendrocytes actively producing new myelin sheaths and a major reorganization.

In addition, transplantation of ependymal cells migrated and remained resident in the area of the injury, including the glial scar, favoring a greater number of nerve fibers within it.

Therefore, this cell therapy is effective in the rescue of neuronal function in a chronic injury with a glial scar already established. However, despite the recovery of the function is very fast after transplantation, regeneration is not complete, so multiple interventions, with serial transplants and / or combination of therapies are needed to improve the success.

# Introducción

## 1. SISTEMA NERVIOSO

### 1.1. ANATOMÍA FUNCIONAL DE LA MÉDULA ESPINAL

La médula espinal (ME) es la porción elongada del sistema nervioso central, de forma aproximadamente cilíndrica, que ocupa la mayor parte del conducto raquídeo. Está encerrada en tres membranas o meninges, duramadre, aracnoides y piamadre, separadas por los espacios subdural y subaracnoideo. Cranealmente se continúa con el bulbo raquídeo, y caudalmente se estrecha progresivamente para terminar en una punta o *cono medular*.

Del vértice del cono medular sale el *filum terminale*, un filamento de tejido conectivo que llega hasta el dorso del primer segmento coccígeo. El *filum terminale internum* está constituido por una extensión de la aracnoides y la duramadre, y el *filum terminale externum*, íntimamente unido a duramadre.

La anchura transversal de la médula espinal varía de unos niveles a otros, presentando dos engrosamientos a nivel cervical y lumbar. El *engrosamiento cervical* es el más grande de los dos y corresponde con el origen de los grandes nervios espinales del miembro superior. De modo análogo, el *engrosamiento lumbar* corresponde con la inervación del miembro posterior.

Las *fisuras* y los *surcos* marcan la superficie externa de la médula espinal en casi toda su longitud. Una *fisura mediana anterior* y un *surco y tabique medianos posteriores* la dividen casi completamente en porciones simétricas, que se unen en la línea media por una banda de tejido nervioso, en el cual se encuentra el *conducto central*. A cada lado del surco mediano posterior se encuentra un *surco posterolateral*, a través del cual penetran las raíces posteriores espinales. Las regiones de la médula espinal comprendidas entre estas fisuras y surcos forman los *cordones anteriores y posteriores* de sustancia blanca [2] (Imagen 1).

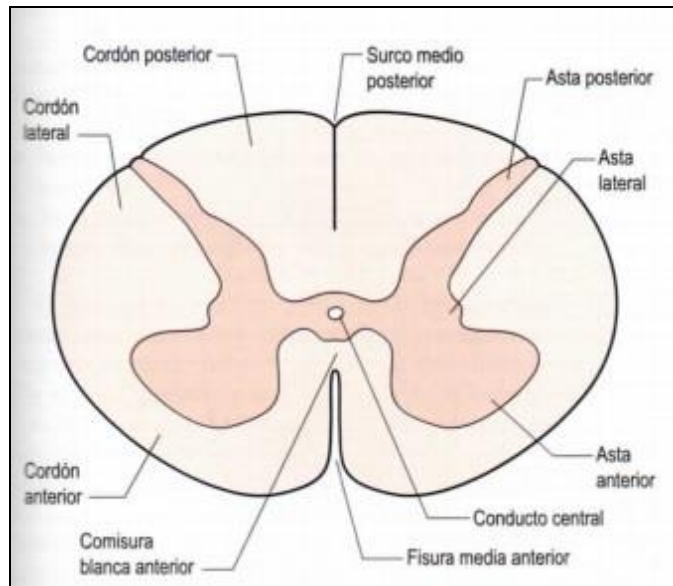


Imagen 1: Esquema de una sección trasversal de la médula espinal que muestra la disposición de la sustancia gris y la sustancia blanca, así como los cordones, surcos y fisuras [2].

### 1.1.1. SUSTANCIA GRIS

La sustancia gris de la médula espinal tiene una situación central y se encuentra constituyendo una columna aplanada que recorre la médula en toda su longitud y que se modifica en el punto en el que continua con el bulbo y en el cono medular.

En la sección transversal, está constituida por dos masas paralelas con forma de coma conectadas por una comisura transversal de sustancia gris, dando una imagen de H. La comisura está atravesada por el conducto central. Cada una de las masas laterales tiene una concavidad lateral y reciben el nombre de columnas anteriores y posteriores o raíces dorsales y ventrales. A su vez, en la sección transversal son llamadas "astas" [2]. Los axones sensoriales de las neuronas de los ganglios dorsales penetran en la ME por las raíces dorsales, mientras que los axones motores y autónomos procedentes de las neuronas espinales, salen de la ME por las raíces ventrales para inervar respectivamente la musculatura y los órganos internos del cuerpo[3].

El *conducto central o del epidídimo* existe a lo largo de toda la médula espinal y se ensancha en el interior de la mitad caudal del bulbo. En la porción caudal del cono medular se expande formando un ventrículo terminal de sección triangular y base ventral. En los niveles torácico y cervical el conducto es ligeramente ventral al punto medio de la médula; es ventral en la médula lumbar y deposición dorsal en el cono medular. Este conducto contiene líquido cefalorraquídeo y está recubierto por epitelio columnar ciliado, el epidídimo, que a su vez está revestido por una zona de células



gliales pero que también contiene alguna pequeña neurona y fibra nerviosa, la *sustancia gelatinosa central*. La sustancia gris que rodea al conducto central por fuera de la comisura gelatinosa es la *comisura gris*. Ventral a la comisura gris se extiende una delgada lámina de fibras blancas, la *comisura blanca ventral*. También existe una *comisura blanca dorsal* [2].

La descripción anatómica de la organización de la médula espinal ha sido considerablemente ampliada, comentada y, en bastantes aspectos, modificada tras intensos estudios neuroanatómicos y neurofisiológicos.

Por una parte, encontramos nomenclatura arbitraria como las columnas dorsales, laterales y ventrales, consistentes en base y cabeza o base, cabeza, cuello y vértice. Así, podemos hablar de La *columna gris anterior o ventral* que se proyecta ventralmente y lateralmente con respecto a la comisura; La *columna gris posterior o dorsal* que se proyecta dorsolateralmente, y en contraste con la columna anterior es transversalmente estrecha y se prolonga hasta la superficie medular, y la *columna gris lateral*, un saliente angular pequeño que se extiende desde el segundo segmento torácico hasta el primero lumbar de la médula, no existiendo en otros niveles.

Posteriormente, tras diferentes estudios y con el apoyo de observaciones sobre el tamaño, la forma, la densidad de concentración y características citológicas de las neuronas en diferentes regiones se establecieron 10 capas o **láminas de células**, que son aproximadamente paralelas a las superficies dorsales y ventrales de la sustancia gris y recorren toda la médula espinal. Se llamaron las láminas de Rexed (Imagen 2) y son las siguientes[2, 3]:

- La lámina I es la más dorsal y presenta un aspecto reticular por la presencia de muchos paquetes de fibras nerviosas gruesas y finas que se entrecruzan. Las neuronas de esta lámina proyectan sus axones al tronco cerebral, al hipotálamo y principalmente al tálamo, formando parte del fascículo espinotalámico y transportando información de dolor y temperatura.
- La lámina II o sustancia gelatinosa de Rolando consiste en pequeñas células de tamaño uniforme y un neuropilo muy empaquetado. Las células de esta lámina envían sus axones a la formación reticular del bulbo raquídeo, al tálamo y al tronco del encéfalo. Los dos tercios más externos de esta lámina lo forman células que responden a estímulos cutáneos nociceptivos mientras que las de la parte más interna responden sólo a estímulos inocuos.
- La lámina III está formada por somas neuronales más grandes y pleomórficos que los de la lámina II, además de estar menos empaquetadas. Sus neuronas proyectan sus axones a otras regiones del mismo segmento medular, a la médula cervical, al bulbo raquídeo y al tálamo, y responden a estímulos mecánicos ligeros.

- La lámina IV, más gruesa que las capas precedentes, tiene neuronas muy heterogéneas. Sus neuronas proyectan localmente dentro de la ME, al núcleo cervical lateral, al núcleo de la columna dorsal y al tálamo. Algunas de ellas responden solo a estímulos mecánicos suaves y otras son específicamente nociceptivas. Las láminas anteriormente descritas son curvas y concéntricas, con su lado convexo orientado dorsalmente.
- La lámina V forma el límite inferior del asta dorsal y tiene un aspecto reticular. Sus neuronas proyectan al núcleo cervical lateral, al núcleo de la columna dorsal, a la formación reticular del tronco del encéfalo, al cerebro medio, al cerebelo, al tálamo y a otras partes de la ME, y responden tanto a estímulos nociceptivos como a estímulos mecánicos suaves.
- La lámina VI, más fácilmente reconocible en los engrosamientos medulares correspondientes a los miembros y no existe en la región torácica. Está formada por un tercio de células pequeñas empaquetadas y dos tercios en posición lateral de células grandes triangulares y más holgadamente empaquetadas.
- La lámina VII corresponde a una gran parte de la columna o zona gris intermedia de anteriores autores. En sus confines incluye las células prominentes del núcleo torácico (columna de Clarke) y las columnas de células intermediales. Las neuronas envían sus axones al cerebelo, a otras partes de la ME, a la formación reticular del tronco del encéfalo y al tálamo. Estas neuronas reciben aferencias viscerales.
- La lámina VIII constituye la mayoría del asta ventral y tiene células de diferentes tamaños que proyectan a la formación reticular del tronco del encéfalo, al tálamo y al mismo segmento medular u otros más distales.
- La lámina IX se trata de columnas de motoneuronas que incluyen los cuerpos de las neuronas motoras  $\alpha$  y numerosas células más pequeñas. Estas motoneuronas proyectan sus axones a través de las raíces ventrales, las columnas más mediales inervan la musculatura axial y las laterales la musculatura de las extremidades.
- La lámina X constituye la comisura gris, que es la porción de sustancia gris que une las astas dorsales y ventrales de cada lado. En el centro de la comisura gris se encuentra el canal central que divide la comisura en dorsal y ventral. A sus neuronas llegan aferencias viscerales y haces reticuloespinales, y responden a estímulos nociceptivos. Proyectan al tronco del encéfalo, al tálamo y al hipotálamo[3].

Hay que resaltar que este esquema es principalmente aplicable al gato, modelo animal sobre el que se realizó el estudio, pero los mismos principios de organización laminar se consideran aplicables a la médula espinal de otros mamíferos superiores [2].

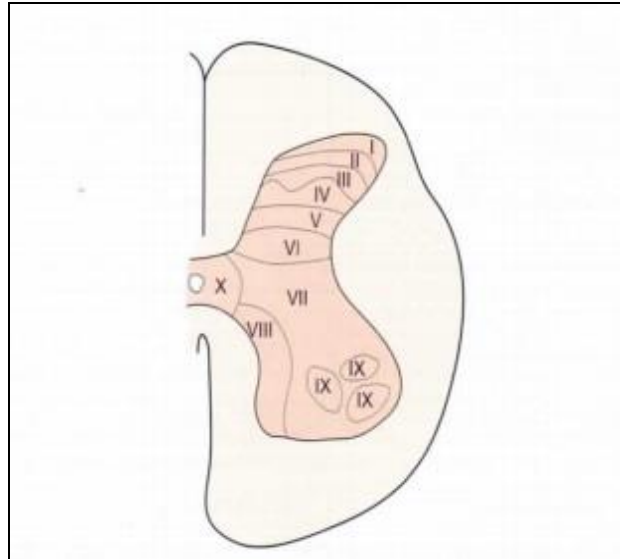


Imagen 2: Láminas de la sustancia gris espinal (Láminas de Rexed)[2].

### 1.1.2. SUSTANCIA BLANCA

Está constituida por fibras nerviosas, neuroglia y vasos sanguíneos. Rodea las columnas de sustancia gris y su blancura se debe a la alta proporción de fibras mielinizadas. Puede dividirse topográficamente en tres cordones: dorsal o posterior, lateral y ventral o anterior. Estos están formados por los axones que conectan distintas zonas de la ME entre sí y la sustancia gris de la ME con centros nerviosos superiores. Así pues, en los cordones pueden distinguirse vías descendentes, ascendentes y locales [2, 3].

Encontramos las siguientes **vías descendentes** (Imagen 3):

- Tracto Corticoespinal:

Se extiende por casi toda la longitud de la médula espinal. La porción del cordón anterior varía en tamaño inversamente a como lo hace la porción del cordón lateral. Las fibras descienden por la cápsula interna del cerebro, atraviesan el pedúnculo cerebral y la protuberancia y entran en las pirámides del bulbo, finalizando en todas las láminas contralaterales, presentando una mayor concentración de terminaciones en las láminas de la III a la VII y una menor concentración en el asta ventral.

Su principal función es el control del movimiento a través de sus terminaciones en la sustancia gris del asta ventral. Este control lo lleva a cabo principalmente mediante interneuronas, aunque también existen algunos axones corticoespinales que hacen contactos sinápticos directos con motoneuronas.

- Tracto Rubroespinal:

Está compuesto por fibras nerviosas de diámetro variable, que descienden de grandes y pequeñas células situadas en el núcleo rojo. Posteriormente se entrecruzan y en el cordón lateral forman una compacta ventral al tracto corticoespinal lateral. Las fibras procedentes de las células nerviosas más pequeñas del núcleo rojo alcanzan los segmentos más caudales de la médula. La distribución de las terminaciones es similar a las del haz corticoespinal, principalmente a las láminas V-VII, a excepción de que las terminaciones rubroespinales no se extienden tanto ventralmente y ninguna alcanza las neuronas motoras.

Su principal contribución es al mantenimiento de la postura y al control motor durante la locomoción simple.

- Tracto Reticuloespinal:

Las fibras reticulospinales están ampliamente distribuidas por el cordón anterior y lateral, originándose en la formación reticular del mesencéfalo, la protuberancia anular y bulbo raquídeo y finalizando en las láminas de la III a la X.

Juega un papel importante en la iniciación de la actividad locomotora y en el mantenimiento de la postura, entre otras funciones.

- Tracto Rafespinal:

Las fibras se originan en los núcleos del rafe magnus, rafe obscurus y rafe pallidus situados en la línea media a lo largo del tronco del encéfalo y descienden por el cordón dorsolateral de la ME. Los del rafe obscurus y pallidus descienden por la sustancia blanca ventrolateral. Hacen sinapsis principalmente con neuronas del asta dorsal, con algunas terminaciones más dispersas también en el asta ventral. Los del rafe pallidus y obscurus terminan en el asta ventral, haciendo sinapsis con motoneuronas somáticas de la lámina 9, y también con neuronas preganglionares simpáticas en el núcleo intermediolateral.

La principal implicación de la transmisión originada en el rafe magno la realizan en el control descendente del dolor, mientras la originada en el rafe pallidus y obscurus son responsables de efectos neuromoduladores de funciones motoras como la facilitación de la actividad locomotora rítmica.

- Tracto Vestibuloespinal:

Procede principalmente de las células grandes y pequeñas del núcleo vestibular situado en la protuberancia anular y el bulbo raquídeo. La mayoría de axones que llegan hasta la región medular lumbosacra tienen su origen en el núcleo vestibular lateral, y los que llegan a la región torácica media nacen en el núcleo vestibular medial. Las fibras de ambos haces terminan en la parte interna de la sustancia gris, en las láminas VII y VIII, y actúan sobre dos tipos de neuronas motoras,  $\alpha$  y  $\gamma$ .

En las ratas están involucrados en el equilibrio postural y la locomoción.

- Tracto Coeruleoespinal:

Lo originan las neuronas noradrenérgicas situadas en la parte posterior y externa de la sustancia gris que rodea el acueducto y cuarto ventrículo (Locus Coeruleus) y descienden por el cordón ventral de la ME haciendo sinapsis con las neuronas de las láminas de la VII a la X, incluyendo las motoneuronas de la lámina IX.

Participan en la modulación de la actividad de las motoneuronas espinales, y están implicados, junto con el sistema simpático, en ofrecer una adaptación rápida a estímulos urgentes

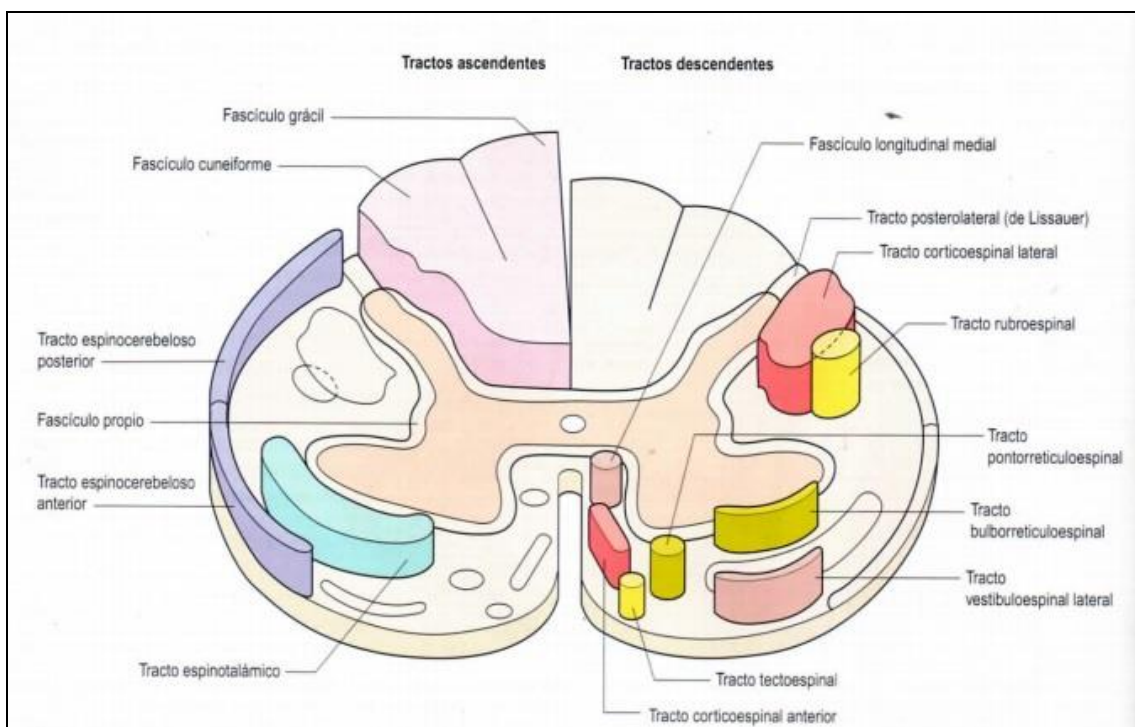


Imagen 3: Tractos ascendentes y descendentes de la médula espinal. Todos los tractos son bilaterales. En la imagen todos los tractos ascendentes se representan en el lado izquierdo y los descendentes en el lado derecho[2].

A su vez, las **vías ascendentes (Imagen 3)** se organizan de la siguiente manera. En función de su área de terminación, los tractos ascendentes del cordón ventrolateral se agrupan en tres sistemas: Los espinotalámicos, que se originan en las láminas de la II a la VI y que terminan en el tálamo, los espinoreticulares, con origen en las láminas I, V,

VI, VII y VIII y principalmente X de la ME y que finalizan en la formación reticular del tronco del encéfalo y los espinocerebelosos que se originan en las láminas de la V a la VII y que terminan en el cerebelo y en núcleos relacionados con él [3].

Las células de las láminas I y V corresponden a estímulos nocivos mecánicos o térmicos aplicados a la piel y algunas de las neuronas de la lámina V están asociadas con estímulos cutáneos de carácter no dañino. Las láminas VII y VIII están relacionadas con receptores musculares y articulares y algunas exhiben respuestas a la estimulación cutánea [2].

Las vías del cordón dorsal contienen aferencias primarias de las raíces dorsales y axones de neuronas espinales. Las primeras forman la vía directa de los cordones dorsales que acaban en los núcleos Gracilis y Cuneatus del bulbo raquídeo. Desde aquí se proyectan axones al tálamo, donde hacen relevo para finalizar en la corteza somatosensorial. Las fibras del fascículo Gracilis se originan en los niveles sacro, lumbar, y torácico bajo (por debajo de T6); las del fascículo Cuneatus se originan en niveles torácicos altos (por encima de T6) y niveles cervicales, ambas vías se originan en las láminas de la III a la VII. Por esta vía se transmite información propioceptiva, así como la implicada en el procesamiento complejo como la discriminación táctil entre dos puntos (epicrítica), la vibración o la intensidad de la presión. Las fibras que proceden de las neuronas propioespinales forman la vía postsináptica del cordón dorsal, y en función de su localización medular sus axones hacen sinapsis con las neuronas del núcleo Gracilis (en los segmentos lumbares), y con las del núcleo Cuneatus (en el engrosamiento cervical). En la rata la mayoría de las neuronas espinales que dan origen a esta vía se localizan en la lámina IV. Finalmente, las neuronas situadas en estos dos núcleos hacen sinapsis con los núcleos del tálamo. Por esta vía se procesa información nociceptiva y de tacto discriminativo [3].

## **1.2. CITOLOGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO**

Diferentes tipos celulares integran el funcionamiento normal del sistema nervioso. La neurona, una célula de comunicación, y otros subtipos celulares están conectados unos a otros a través de diferentes conexiones sinápticas.

La fisiología neuronal se mantiene y apoya en las células neurogliales, las cuales tienen muchas funciones entre las que se encuentran la mielinización, la secreción de factores tróficos, el mantenimiento de la matriz extracelular o la recogida de desechos celulares y moleculares. Las células gliales también participan en la formación y el mantenimiento de la barrera hematoencefálica [4].

### 1.2.1. NEURONA

Las neuronas son un tipo celular altamente especializado y componente esencial del Sistema Nervioso Central (SNC).

Pueden ser clasificadas de acuerdo a su tamaño, su forma, sus características neuroquímicas, localización y conectividad, los cuales son características determinantes de la función neuronal. A su vez, las neuronas forman circuitos, estructura básica de la función cerebral. Estos circuitos pueden ser macrocircuitos cuando afectan a una población de neuronas de regiones nerviosas diferentes, y microcircuitos cuando la conexión se realiza célula-célula en la misma región.

En líneas generales, podemos hablar de cinco tipos de neuronas [4]:

- Neuronas inhibitoras (contacto local) como las interneuronas GABAérgicas
- Neuronas inhibitoras (contacto distante) como las células de Purkinje
- Neuronas excitadoras (contacto local) como las neuronas espinales del cortex cerebral
- Neuronas excitadoras (contacto distante) como las neuronas piramidales del cortex cerebral
- Neuronas neuromoduladoras que intervienen en la neurotransmisión incluso a largas distancias.

Las neuronas son células altamente polarizadas en las que se pueden distinguir tres regiones específicas (Imagen 4) [2, 4]:

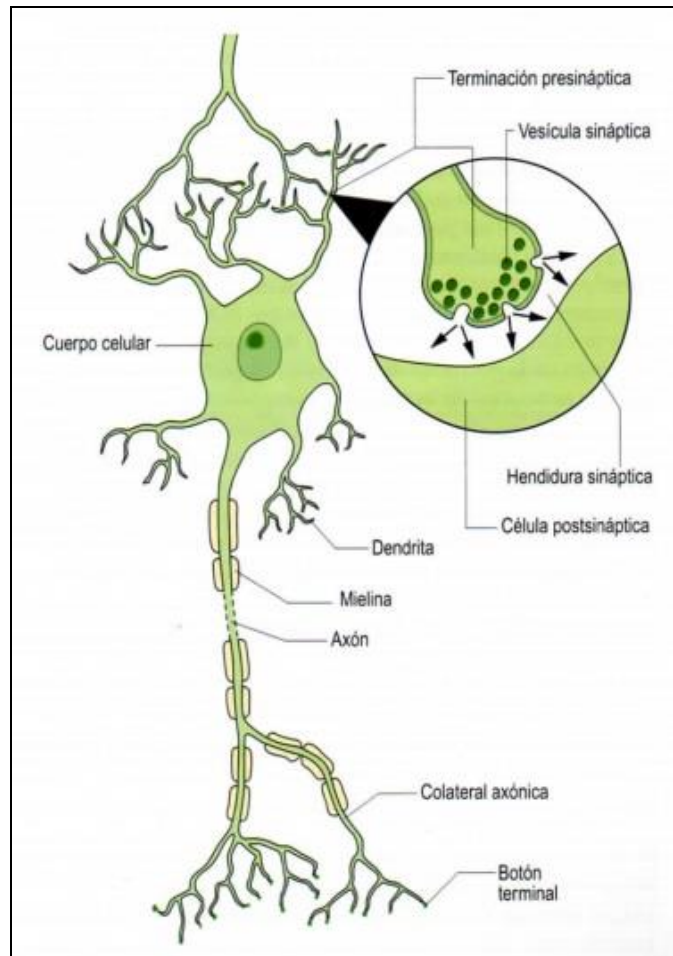


Imagen 4: Representación esquemática de la estructura básica de la neurona y la sinapsis [2]

- Cuerpo o Soma, que contiene el núcleo y la mayoría de las organelas citoplasmáticas.

El Soma suele tener morfología angular y el saliente del que se origina el axón se llama *cono axonal*. El núcleo suele ser grande, redondo y pálido con uno, o más, nucléolos prominentes. El citoplasma está constituido por retículo endoplásmico liso y rugoso con polirribosomas que a menudo forman grandes agregados. Son visibles al microscopio como gránulos basófilos y se llaman *cuerpos de Nissl*. También es posible observar otro tipo de pigmentos como la sustancia negra, rica en neuromelanina, o sustancia amarillenta como la lipofucsina.

- Dendritas (prolongaciones receptoras), en número y forma variable en función del tipo neuronal. Tienen muchas de las características del soma, por ello contienen mitocondrias, microtúbulos, microfilamentos,... y constituyen el *árbol dendrítico*.
- Axón (prolongación efectora), un único axón que se extiende más lejos que el conjunto de dendritas y que puede tener ramas laterales. En su terminación se rompe en una serie de finas ramas, telodendritas, que terminarán sobre otras neuronas para formar parte de la sinapsis.



En animales vertebrados, muchos axones están rodeados por una capa de mielina que facilita y favorece el impulso nervioso. La morfología de la región terminal del axón que contacta con otras células depende de su función en el sistema nervioso central y periférico. Ambas, la red dendrítica y la distribución terminal del axón confieren a la neurona un alto nivel de especificidad.

### 1.2.2. MORFOLOGÍA DE LA SINAPSIS

El tipo más corriente de sinapsis es el que tiene lugar entre un axón y una dendrita o un soma, en el que la fibra aferente se expande para formar un pequeño abultamiento o *botón*. También puede ser una expansión terminal de una rama axonal (botón terminal), o una de una serie de expansiones que constituyen una especie de rosario o cadena de terminaciones (botones de pasaje). El patrón de terminaciones axonales en diferentes poblaciones neuronales varía en función del tipo celular, por ejemplo, en la fibras trepadoras del cerebelo un único axón contacta directamente con una neurona, con una célula de Purkinje [2].

Las dendritas y otras partes del soma presentan *espinas sinápticas*, que suelen ser los puntos de contacto de la mayoría de los botones eferentes y pueden adoptar diferentes formas: cortas, rechonchas, ramificadas o bulbosas.

Por otra parte, podemos clasificar las sinapsis en función del tipo de prolongación implicada y de la dirección de la transmisión. Así, las sinapsis pueden ser axodendríticas y axosomáticas, las más corrientes, y menos habitualmente, axoaxónicas, dendroaxónicas, dendrodendríticas, somatodendríticas o somatosomáticas.

La sinapsis axodendrítica se caracteriza por tres zonas y/o componentes: zona o componente presináptico (botón o copa sináptica), un espacio o hendidura sináptica y una zona o componente postsináptico. El espacio sináptico muestra indicios de la existencia de finos filamentos transversos y la expansión presináptica está caracterizada por la existencia de múltiples y pequeñas vesículas sinápticas agrupadas en acúmulos situados al borde del espacio sináptico. Parece que este complejo de estructuras acerca los neurotransmisores a la membrana presináptica, lugar al que se unen y fusionan para liberar luego su contenido en la hendidura sináptica, cuando el botón es despolarizado. En el lado postsináptico, suelen encontrarse estructuras membranosas que constituyen el aparato espinoso de las espinas dendríticas de algunos mamíferos. Las prolongaciones gliales suelen envolver estas estructuras pero no penetran en el espacio sináptico.[2]

Edward George Gray clasificó la sinapsis en dos tipos:

- Sinapsis Gray tipo 1: las sinapsis son simétricas y tienen variabilidad de vesículas pleomórficas
- Sinapsis Gray tipo 2: las sinapsis son asimétricas y las vesículas son redondas.

La importancia de esta distinción radica en que las Gray tipo 1 tienden a ser inhibitoras mientras que las Gray tipo 2 tienden a ser excitatorias. [4] De todas formas, la forma en la que los pies sinápticos afectan a las neuronas es parcialmente dependiente de las características de su distribución sobre la superficie celular. En la sinapsis en serie, los botones eferentes terminan sobre otro botón afectan su capacidad para responder a una oleada aferente de impulsos, lo que podría ser la base de la inhibición presináptica como ocurre a nivel espinal, aunque también puede serlo de la facilitación presináptica, dependiendo del tipo de terminación que se trate[2].

### 1.2.3. NEUROGLÍA

Son un conjunto de células no excitables que se relacionan con las neuronas y constituyen gran parte de la masa total. Sus principales funciones, aunque el papel preciso aún no está claro, son el sostén, el metabolismo y la protección de las neuronas.

En el SNC podemos encontrar diferentes tipos celulares: macroglía y microglía. Dentro de las células de la macroglía podemos diferenciar astrocitos y oligodendrocitos.

En el Sistema Nervioso Periférico el mayor componente glial son las células de Schwann.

Los **oligodendrocitos** y las **células de Schwann** son las células encargadas de sintetizar la mielina, en el SNC y en el Sistema Nervioso Periférico (SNP), respectivamente. La mayoría de las funciones cerebrales dependen de la rápida comunicación entre circuitos neuronales. Por ello, los organismos han desarrollado sistemas para acelerar dicha comunicación. En animales invertebrados, la longitud del axón favorece dicha rapidez, pero en animales vertebrados es la mielina la principal encargada de ello.

La mielina está compuesta por membrana plasmática de los oligodendrocitos, una capa rica en lípidos y con capacidad como aislante eléctrico lo que favorece la transmisión de altas intensidades. La mielina rodea los segmentos axonales y al final de

cada segmento de mielina, también llamado internodo, se encuentra el nódulo de Ranvier.

Cada oligodendrocito es responsable de la construcción y el mantenimiento de muchas vainas de mielina, reduciendo así el número de células necesarias. No ocurre así en el SNP, donde las células de Schwann producen la mielina formando un único internodo y generan una mielina de composición diferente a la producida por el Sistema Nervioso Central.

A diferencia de los oligodendrocitos, las células de Schwann secretan muchos componentes de matriz extracelular y producen una “cubierta” basal que recorre los axones mielinizados. Las células de Schwann tienen una respuesta vigorosa tras una lesión, al igual que los astrocitos, mientras los oligodendrocitos no la tienen.

La función de la “cubierta” basal y la secreción del factor de crecimiento de las células de Schwann son los responsables de la excepcional capacidad de regeneración del Sistema Nervioso Periférico frente al SNC [2, 4, 5].

Los **astrocitos** constituyen entre un 20 y un 50 % del volumen de muchas áreas cerebrales y presentan dos formas principales: los protoplásmicos y los fibrosos, predominantes en la materia gris y la materia blanca, respectivamente [2, 4].

Originariamente los astrocitos provienen de las células gliales radiales, las cuales sirven de soporte para la migración de neuronas y juegan un papel importante en la definición de la arquitectura celular del SNC. Posteriormente, las células gliales maduran y actúan de progenitores de los astrocitos, pero en el cerebelo adulto y en la retina se pueden encontrar algunas de ellas, como las células gliales de Bergmann en el cerebelo y las de Müller en la retina. Los astrocitos cercan o encierran a las neuronas y a los oligodendrocitos. Consiguen aislar el parénquima cerebral a través de la piamadre y el parénquima cubriendo la superficie de los capilares y generando un “puño” o cobertura sobre los nódulos de Ranvier. Este proceso también afecta a las sinapsis y a las dendritas, lo que indica que la presencia de astrocitos en los procesos sinápticos juega un papel importante en la regulación de la neurotransmisión.

Por otra parte, los astrocitos son una fuente importante de proteínas de matriz extracelular y moléculas de adhesión del SNC, como laminina, fibronectina, citotactina, entre otros. Producen una gran cantidad de factores de crecimiento, los cuales intervienen solos o en combinación entre ellos en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las diferentes poblaciones neuronales, lo que está directamente relacionado con la capacidad regenerativa del SNC [4].

Las células de la **microglía** son las más pequeñas de las células gliales, con un contorno aplanado y delgado, y cortas prolongaciones tipo dendrita que se colocan

entre las neuronas o se aplican a la pared externa de los capilares. Ultraestructuralmente tienen un núcleo denso, aplanado y dentado, y gran cantidad de lisosomas. Estas características son idénticas a los macrófagos del tejido conectivo lo que hizo pensar que eran como tal [2].

### 1.3. MENINGES

El sistema nervioso central está protegido por una estructura ósea, ya sea el cerebro o la médula espinal, pero además existen unas membranas de tejido conectivo que lo protegen y le aportan soporte nutricional. Se conocen como meninges y, de la más externa a la más interna, se les llama: Duramadre, Aracnoides y Piamadre (Imagen 5).

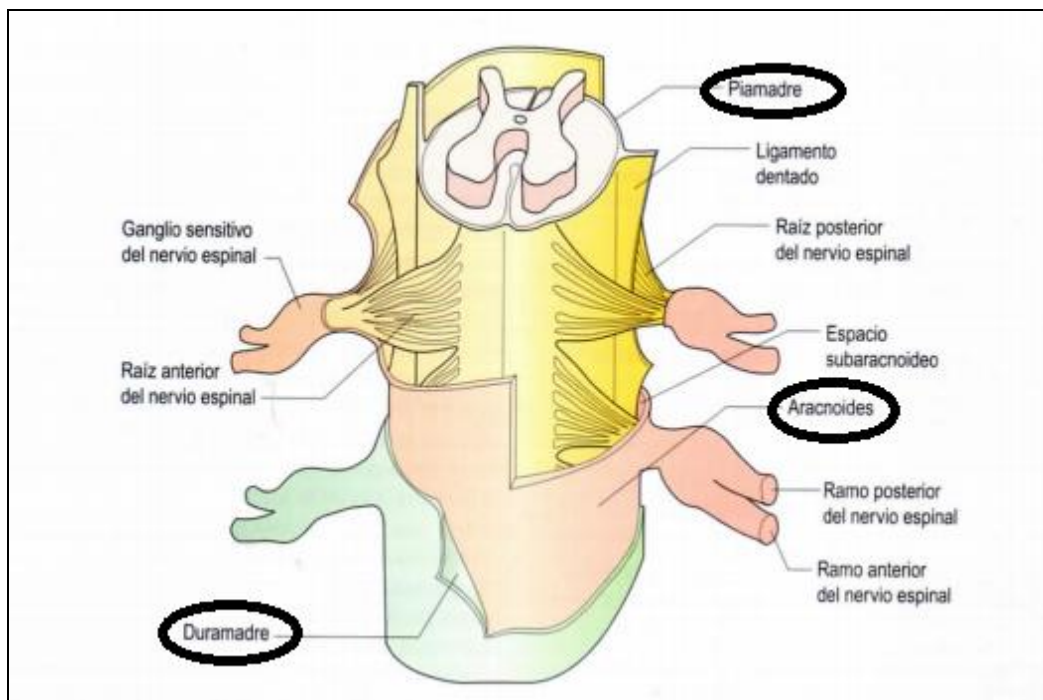


Imagen 5: Representación esquemática de las envolturas meníngeas de la médula espinal [2]

La **duramadre** es la capa más externa y contacta con la superficie ósea. Está compuesta principalmente por una densa capa de tejido conectivo. La duramadre craneal o encefálica es una estructura de doble capa. La capa más externa, la capa perióstica, se adhiere cubriendo la superficie interna del cráneo y continúa con el periostio sobre la parte exterior de los huesos del cráneo, mientras que la capa más interna, la capa meníngea, es más fina y cubre el cerebro continuando a través del agujero occipital con la duramadre de la médula espinal. La duramadre espinal no tiene doble capa y es muy parecida a la capa meníngea que rodea el cerebro.

A nivel cerebral, la capa meníngea envía hacia el interior unos tabiques que dividen la cavidad en espacios que se comunican libremente y cuya función es la de limitar el desplazamiento del encéfalo asociado con los movimientos de aceleración y deceleración cuando se mueve la cabeza. Ambas capas de duramadre están unidas pero en ocasiones se separan generando los *senos duros*, cuya principal función es recibir sangre del encéfalo y líquido cerebroespinal y drenarlo en las venas yugulares internas. Los principales senos venosos son:

- Seno sagital superior
- Seno sagital inferior
- Seno recto
- Senos transversos
- Senos sigmoideos
- Seno occipital
- Senos cavernosos
- Senos petrosos superior e inferior

La duramadre espinal forma una vaina dural dura y tubular que rodea a la médula espinal a lo largo del canal vertebral terminando en el filum terminale a nivel del margen inferior de la segunda vértebra sacra. Se extiende a lo largo de cada raíz nerviosa y se continúa con el tejido conectivo que rodea cada nervio espinal (epineuro).

La **aracnoides** es la capa intermedia de las tres meninges, ubicándose entre la piamadre por dentro y la duramadre por fuera. Se extiende por todo el sistema nervioso central aunque no se introduce dentro de las fisuras del cerebro.

Está separada de la duramadre por el *Espacio Subdural* (a nivel encefálico y espinal) o *Epidural* (solo existe a nivel espinal entre la duramadre y la superficie interna de las vértebras) y de la piamadre por el *Espacio Subaracnoideo*.

El *espacio epidural* es aproximadamente de unos 3 mm de espesor y contiene tejido adiposo (grasa fluida) y vasos sanguíneos mientras el *espacio subaracnoideo* contiene el líquido cefalorraquídeo. El fluido cerebroespinal es un fluido claro que funciona como amortiguador hidráulico para el sistema nervioso central. Circula a través de varios ventrículos del cerebro y del canal central de la médula espinal y drena al sistema circulatorio a través de Arachnoid Villi.

La aracnoides se separa de la piamadre en las cisuras, surcos y hendiduras generando unas hendiduras llamadas *Cisternas*, entre las cuales se encuentran: la *Cisterna Cerebelosa Magna*, la *Cisterna del Surco lateral del cerebro*, la *Cisterna Quiasmática* y la *Cisterna Interpeduncular*.

Finalmente, la capa más interna se llama **piamadre** y se encuentra fuertemente adherida a las convoluciones del cerebro y al contorno irregular de la médula espinal.

Es una capa muy vascular cubierta de células mesoteliales aplanadas que funciona de soporte a los vasos sanguíneos que nutren las células del cerebro y la médula espinal. También se sitúa sobre las raíces de los ventrículos, donde forma el *plexo coroideo* junto con la Aracnoides. Extensiones laterales de la piamadre sobre la médula espinal forman el *ligamento dentado*, que sujeta la médula espinal a la duramadre.

## 2. LESIÓN MEDULAR TRAUMÁTICA

La incidencia anual de lesiones en la médula espinal en los países desarrollados es de entre un 11,5 y un 53,4 por millón de habitantes, encontrándose entre las principales causas los accidentes de trabajo, los deportes y actividades de aventura, accidentes de trabajo, caídas domésticas y violencia [1]. El paciente presenta parálisis motora y pérdida de la sensibilidad de los segmentos corporales por debajo de la zona de la lesión así como disfunción intestinal, urinaria y sexual entre otras.

La lesión medular traumática puede ser producida por varios mecanismos de lesión primaria, siendo los tres principales los siguientes:

- Contusión: Compresión aguda y transitoria de la médula espinal.
- Compresión masiva o maceración: La compresión persiste en el tiempo.
- Laceración: La sección o el daño ocurren por la intrusión en la médula de cuerpos extraños o fragmentos óseos.

Las lesiones pueden ser completas o incompletas siendo el más común la combinación de un impacto seguido de una compresión. Normalmente este tipo de combinación de fuerzas se produce en las fracturas bruscas, dislocaciones con fractura y en roturas de disco.

## **2.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN MEDULAR**

La fisiopatología de la lesión medular traumática, sea la causa endógena o exógena, comprende mecanismos de daño primario y mecanismos de daño secundarios, debidos, principalmente a efectos vasculares, celulares y bioquímicos [6].

Se sabe que la gravedad del daño primario determina, en gran medida, el grado de afección neurológica del paciente y, a su vez, es un importante indicador del pronóstico.

### **2.1.1. DAÑO PRIMARIO**

La lesión medular traumática puede generarse por cuatro mecanismos que condicionan el daño primario, como son el impacto con compresión persistente, el impacto con compresión transitoria, la distracción y la laceración/transección [7]. El mecanismo más habitual es el provocado por una compresión con presión persistente. Dicha compresión puede ser provocada por un fragmento de hueso o por el propio hematoma generado por el impacto.

Se producen eventos sistémicos y locales, en los que se incluyen hipotensión sistémica, shock espinal, vasoespasmo, isquemia, trastornos homeostáticos y acumulación de transmisores entre otros fenómenos [8]. El proceso se inicia con una hemorragia local seguida de una interrupción del flujo sanguíneo, lo que provoca un infarto debido a la hipoxia y a la isquemia secundaria. Este hecho daña gravemente la materia gris debido a sus altas necesidades metabólicas. A su vez, la transmisión nerviosa es interrumpida por microhemorragias o edema cercano a la zona de la lesión [7].

Parte de estos eventos tienen lugar en las diferentes fases de la lesión medular traumática (Tabla 1):

<b>AGUDA</b>	<b>SUBAGUDA</b>	<b>CRÓNICA</b>
<b>Hipotensión sistémica</b>		
<b>Vasoespasmó</b>	<b>Vasoespasmó</b>	
<b>Muerte celular</b>	<b>Muerte celular</b>	
<b>Isquemia</b>	<b>Isquemia</b>	
<b>Edema</b>	<b>Edema</b>	
<b>Alteración homeostasis</b>	<b>Alteración homeostasis</b>	
<b>Acumulación de neurotransmisores</b>	<b>Acumulación de neurotransmisores</b>	
<b>Compromiso de membranas plasmáticas</b>	<b>Compromiso de membranas plasmáticas</b>	
	<b>Producción de radicales libres</b>	
	<b>Peroxidación lipídica</b>	
	<b>Exceso de óxido nítrico</b>	
	<b>Exceso de noradrenalina</b>	
	<b>Descenso de ATP</b>	
	<b>Invasión células inflamatorias</b>	
	<b>Factores inhibitorios de crecimiento neuronal</b>	
	<b>Compresión vertebral/ Inestabilidad columna</b>	
	<b>Desmielinización axones vivos</b>	<b>Desmielinización axones vivos</b>
	<b>Apoptosis</b>	<b>Apoptosis</b>
	<b>Inicio de cavitación central</b>	<b>Inicio de cavitación central</b>
	<b>Formación cicatriz glial</b>	<b>Formación cicatriz glial</b>
		<b>Alteración canales iónicos y receptores</b>
		<b>Procesos regenerativos</b>
		<b>Neurocircuitos alterados</b>
		<b>Siringomelia</b>

Rectángulo superior: Eventos comunes en las fases aguda y subaguda (marcado en el mismo tono de azul).

Rectángulo inferior: Eventos comunes en las fases subaguda y crónica (marcado en el mismo tono de azul).

Tabla 1: Fenómenos que tienen lugar en las diferentes fases de la lesión medular traumática. Versión adaptada Oyino, CA (2011) [8].



## 2.1.2. DAÑO SECUNDARIO

### 2.1.2.1. Respuesta Inmunomediada

La inflamación, evento clave en la cascada del daño secundario, ocurre inmediatamente y persiste durante semanas incluso meses después de la lesión medular[9].

Se secretan citoquinas proinflamatorias, incluyendo interleuquina (IL)-1 $\beta$ , interleuquina-6, y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que aumentan la inflamación. La respuesta inflamatoria es crítica para la eliminación de los restos celulares, que pueden prevenir la regeneración de las neuronas supervivientes. De tos formas, la sobreactivación de la respuesta inflamatoria puede dañar el tejido sano y exacerbar la lesión[8].

La inflamación producida tras la lesión atrae cuatro grandes categorías de células inflamatorias: neutrófilos, monocitos, microglía y linfocitos T[10].

Se producen dos fases en la respuesta leucocítica. Inicialmente, se produce una infiltración de neutrófilos. Los neutrófilos en el tejido espinal, elimina restos de tejido y también libera citoquiinas, proteasas y radicales libres, los cuales activan otras células inflamatorias y gliales dentro de la cascada inflamatoria que finalmente pueden provocar daño neuronal o la muerte[11].

Tras la lesión también se produce una infiltración de monocitos en la médula espinal y su diferenciación a macrófagos. Los macrófagos y la células gliales residentes activadas secretan numerosas citoquinas, radicales libres y factores de crecimiento que pueden afectar de forma positiva y negativa. Mientras los factores de crecimiento son críticos ara la supervivencia de las neuronas, los radicales libres y las citoquinas pro-inflamatorias contribuyen a la expansión de la lesión [8]. A su vez, el rol de los linfocitos es controvertido. Existen argumentos de que algunos tipos de linfocitos, como los linfocitos T reactivos, incrementan el daño en los axones e inducen desmielinización debido a la isquemia[12]. Otros argumentos indican que los linfocitos no son patológicos sino que proporcionan protección a las neuronas aisladas de la mielina[13].

Así, se confirma la existencia de diferentes efectos del sistema inmunitario en la lesión medular de forma que su control o modulación se puede considerar como potencial diana terapéutica para disminuir el daño secundario de la lesión medular.

### **2.1.2.2. Daño oxidativo**

Muchos de los mecanismos secundarios afectan a la mitocondria. La mitocondria tiene un papel muy importante en el metabolismo cerebral y en el mantenimiento de la homeostasis del calcio celular[7].

El daño en el sistema nervioso central altera la habilidad de la mitocondria en la respiración celular y la fosforilación oxidativa. Se debe a la aparición de oxígeno reactivo (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), evento que ocurre de forma temprana tras la lesión medular[14] y que produce un aumento del calcio intracelular, disfunción mitocondrial, descomposición del ácido araquidónico y la activación de la óxido nítrico sintasa. ROS y RNS producen, también, peroxidación lipídica y daño en proteínas y ácidos nucleicos[15]. A su vez, los radicales libres generan daño en el citoesqueleto y las organelas mitocondriales. Además, el daño oxidativo incrementa la disfunción mitocondrial y contribuye al aumento del calcio intracelular que activan las proteasas, que también dañan las proteínas del citoesqueleto [14].

El daño provocado por ROS y RNS es amplio y puede ser una causa principal de muerte celular y pérdida funcional tras la lesión medular.

De esta forma, ROS y RNS podrían ser dianas potenciales, así como el Calcio, de forma que inhibiéndolo tendríamos un efecto neuroprotector como ocurre cuando se utilizan la ciclosporina A, capaz de inhibir el calcio inducido por los cambios de permeabilidad mitocondrial[16].

### **2.1.2.3. Excitotoxicidad**

La lesión medular provoca una liberación excesiva de glutamato, el mayor neurotransmisor excitador del SNC. El aumento del glutamato provoca un daño directo en la médula y un daño indirecto en la producción de oxígeno reactivo y especies de nitrógeno así como en alteraciones en la microcirculación e isquemia secundaria[7].

Olney introdujo el término “excitotoxicidad” para describir estos procesos producto de la excesiva activación del glutamato que generaban daño neuronal. La excitotoxicidad asume un papel central en la descripción de mecanismos de daño del SNC[17]. La activación del receptor del glutamato resulta en la temprana acumulación de sodio intracelular con su consecuente edema citotóxico y acidosis intracelular[7].

Las neuronas y los oligodendrocitos son particularmente vulnerables a la excitotoxicidad del glutamato porque expresan una gama completa de receptores del glutamato. El daño excitotóxico sobre los oligodendrocitos y neuronas provoca una desmielinización de los axones y una pérdida de neuronas entorno a la lesión, provocando una drástica reducción de la transmisión axonal[8].

#### **2.1.2.4. Apoptosis**

En la fase aguda de la lesión medular, el daño mecánico provoca la muerte instantánea de células por necrosis, que finaliza con la ruptura de la membrana celular. Tras unas horas, otro tipo de muerte celular se inicia[8]. La apoptosis no provoca una inflamación asociada a la muerte celular, sino que provoca la fragmentación celular mediante una vía programada que necesita energía y síntesis de proteínas[11]. Se sabe que esta vía programada de muertes neuronal está implicada en la fisiopatología de multitud de desórdenes neurológicos incluida la lesión medular [7].

La cascada apoptótica se activa en neuronas, oligodendrocitos, microglía y, quizá, astrocitos[18]. El mayor detonante parece ser el daño inducido por el calcio intracelular. Activa enzimas proteolíticas como caspasa y calpaina, que rompen las proteínas del citoesqueleto desencadenando la muerte celular[14, 19].

#### **2.1.2.5. Trastornos vasculares**

Los mecanismos vasculares que tienen lugar tras la lesión medular incluyen: isquemia/reperfusión, hipotensión sistémica (shock neurogénico), hemorragia (principalmente en materia gris) y trastornos microcirculatorios[8]. Se producen graves hemorragias tras la lesión principalmente en la materia gris, provocando una necrosis hemorrágica y la consecuente mielomalacia en la zona de la lesión[20].

Inmediatamente después de la lesión se produce una reducción del flujo sanguíneo. Esta isquemia empeora con el paso de las horas. Los mecanismos no están claros pero se asocian a vasoespasmo secundario al daño mecánico o a aminas vasoactivas. La isquemia está, a su vez, implicada en la formación de edema local lo que incrementa el daño medular. La pérdida de microcirculación, la interrupción directa de los pequeños vasos y la hemorragia provocan un fallo en la autorregulación[8, 15]. La isquemia y reperfusión producidas inducen daño endotelial mediado por radicales libres y la producción de productos tóxicos[21]. La producción de radicales libres se produce principalmente en el momento de reperfusión e incluye: superóxido, radicales hidroxilo, óxido nítrico y otros oxidantes de alta energía.

Estas especies altamente reactivas contribuyen al estrés oxidativo, mecanismo patológico que contribuye al daño secundario de la lesión medular.

En definitiva, el estrés oxidativo resultante de los compromisos en la microcirculación contribuyen a la lesión medular y están íntimamente relacionados con otros mediadores de daño secundario[8].

#### **2.1.2.6. Shock Neurogénico**

El shock neurogénico se caracteriza por la triada hipotensión, bradicardia e hipotermia. Se sabe que la lesión medular causa hipotensión por la pérdida de tono simpático y la disminución de la resistencia periférica[8]. La bradicardia ocurre sin oposición vagal debido a la interrupción simpática que nutre al corazón[22].

Sin tratamiento, la cascada neurogénica exagera el daño del tejido nervioso y favorece la morbilidad y la mortalidad[22].

#### **2.1.2.7. Factor de Necrosis tnf- $\alpha$**

El factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) es una de las citoquinas más caracterizadas. Diferentes estudios sugieren que la producción del TNF- $\alpha$  en la zona de la lesión medular está involucrada en el daño secundario que se produce al tejido neural[23].

Contrario a muchos artículos, hay evidencias de mejora en la lesión del SNC [24]. Chi et al. describieron en 2010 como la sobreexpresión en la fase aguda era perjudicial pero, a la vez, beneficiosa en la fase crónica [8].

Una de las principales contribuciones del TNF- $\alpha$  al daño secundario es la activación directa de los neutrófilos[23], los cuales se adhieren a la superficie de las células endoteliales. Su inhibición se ha visto que reduce el daño de la lesión medular inducida por trauma compresivo. Así, además del daño directo que provoca el TNF- $\alpha$ , estas observaciones indican que la interacción de los neutrófilos con la pared de las células endoteliales es un hecho importante en el daño tisular secundario[8]

#### **2.1.2.8. Cavitación**

Un fenómeno que se añade a la complejidad de la regeneración es la progresión de una cavitación central en la cual, desde días hasta meses, la lesión medular puede expandirse y generar una cicatriz glial mucho mayor que en el momento inicial[25].

Varios estudios sugieren que la cavitación está relacionada con procesos de isquemia, hemorragias, actividad de las lisozimas, infiltración de macrófagos e inflamación[8].

El ambiente influencia el crecimiento intrínseco de una neurona lesionada. Durante la lesión numerosas moléculas actúan con efecto inhibitor en la regeneración axonal. Después de la lesión, la interrupción de axones mielinizados y la muerte de los oligodendrocitos, resulta en numerosos restos de mielina [26].

### 2.1.3. MOLÉCULAS INHIBITORIAS DEL CRECIMIENTO

#### 2.1.3.1. Proteína Nogo-a

Es una proteína de membrana expresada por oligodendrocitos y algunas neuronas, que causa inhibición del crecimiento y colapso del cono de crecimiento cuando se une con su receptor en la membrana neuronal. La identificación del receptor Nogo-A, llamado NgR1, permitió el desarrollo de avances terapéuticos dirigidos a bloquear dicho receptor. De todas formas, su bloqueo no supuso una mayor regeneración axonal in vitro ni in vivo, por lo que se asume que existen mecanismos secundarios compensatorios [26]

#### 2.1.3.2. Glicoproteína asociada a mielina (MAG)

Siguiendo el patrón de Nogo-A, MAG se produce por oligodendrocitos y se distribuye por la mielina. MAG es también uno de los mayores inhibidores de regeneración de materia blanca y se ha comprobado en multitud de estudios in vitro e in vivo [27, 28].

Se ha visto que NgR1 y NgR2 actúan como receptores de MAG, igual que Nogo-A, lo que sugiere que el mecanismo intracelular por el que diversos inhibidores de mielina están funcionando es el mismo. De hecho, diferentes laboratorios han demostrado que las proteínas inhibitorias del crecimiento comparten una vía común de señalización común en neuronas y que el componente clave implicado es la molécula Rho [29]. Rho es una pequeña trifosfato guanosa (GTPasa) conocida por su efecto en el citoesqueleto de la actina y la regulación de la motilidad celular.

#### 2.1.3.3. Proteoglicanos

Son el segundo mayor grupo de moléculas que presentan perfil inhibitorio después de la lesión medular.

Son principalmente expresados por astrocitos, precursores de oligodendrocitos y células meníngeas y están altamente implicados en la formación de la cicatriz glial [30]. Hay cuatro tipos de proteoglicanos:

- Heparan sulfato proteoglicanos (HSPGs)
- Dermatan sulfato proteoglicanos (DSPGs)
- Keratan sulfato proteoglicanos (KSPGs)
- Condroitín sulfato proteoglicanos (CSPGs)

Los CSPGs están formados por diferentes proteoglicanos como aggrecan, brevican, neurocan, NG2, fosfacan y versican. Se sabe que los CSPGs limitan el crecimiento axonal y que aumentan considerablemente después de la lesión y entorno a la zona de la lesión, principalmente en la cicatriz glial.

A pesar de que muchos estudios demuestran el efecto perjudicial de la cicatriz glial, otros han demostrado un efecto beneficioso durante la fase aguda (1-2 semanas) de la lesión medular. La eliminación de astrocitos reactivos o la prevención de su migración, y la formación de la cicatriz resultarían en un fallo en la reparación de la barrera hematoencefálica acompañada de una masiva infiltración de células inflamatorias y un aumento de la pérdida de oligodendrocitos y neuronas [31].

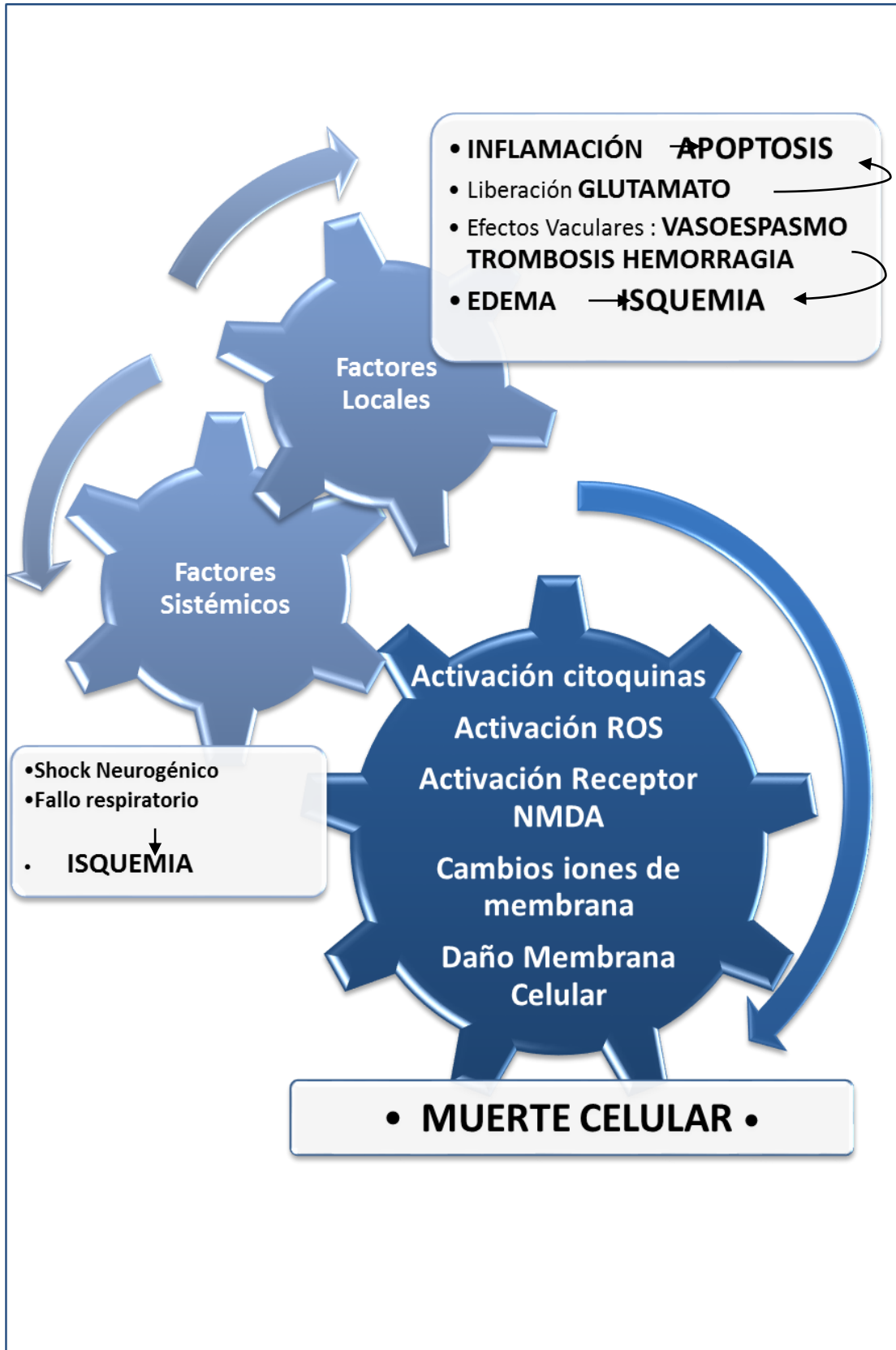


Imagen 6: Principales eventos de daño secundario producido tras la lesión medular

## **2.2. FASES**

En la médula espinal dañada por compresión o traumatismo, la secuencia temporal de los cambios anatomopatológicos tras una lesión se compone de tres etapas: aguda, subaguda y crónica[32].

### **2.2.1. AGUDA**

La fase aguda tiene lugar en las primeras horas tras la lesión. Inmediatamente tras el trauma se produce una ruptura de la barrera hematoencefálica y los vasos sanguíneos locales, ocasionando una alteración de la microvasculatura e induciendo hemorragias petequiales. Se genera un edema y la destrucción de los capilares provoca isquemia, anoxia e hipoglucemia. Debido al reducido flujo sanguíneo durante estas primeras horas, se producen cambios necróticos en la sustancia gris que afectan tanto a las neuronas como a la glía [32, 33]

La necrosis y la degeneración de la mielina de los axones sigue 8-24 horas más tarde y después de 48 horas los macrófagos acuden para eliminar la mielina generada y los restos celulares. Además, sustancias como los tromboxanos, los leucotrienos, el factor activador de plaquetas, la serotonina y los opioides endógenos, contribuyen a reducir el flujo microcirculatorio.

Entre las cuatro y las 24 horas siguientes el rango metabólico aumenta y se inicia un metabolismo oxidativo en el tejido originando una acidosis láctica. Por otra parte, el edema generado por la interrupción del flujo sanguíneo es máximo en los primeros días tras la lesión afectando inicialmente a la porción central del cordón espinal y de forma centrífuga a la sustancia blanca. Este ambiente induce liberación de bradicininas, citoquinas, histaminas y óxido nítrico que, a su vez, contribuyen a aumentar la permeabilidad vascular. Todo ello afecta a las concentraciones de iones, perturbando la excitabilidad y la transmisión sináptica. Esto provoca una acumulación de calcio intraaxonal y una disminución de calcio extracelular. La concentración total de calcio alcanza sus valores máximos ocho horas tras la lesión permaneciendo elevado durante una semana. Se sabe que el exceso de calcio tiene un efecto nocivo sobre las neuronas y que la activación de las fosfolipasas dependientes de calcio, como la fosfolipasa C y A2, provocan una alteración de la membrana celular y la producción de diferentes compuestos como los tromboxanos y los leucotrienos entre otros, que promueven el daño tisular y la inflamación. A su vez, la elevación del calcio intracelular estimula la liberación de aminoácidos excitatorios como el glutamato y el aspartato, cuya concentración máxima ocurre minutos después de la lesión, siendo muy tóxicos para las neuronas que no sufrieron daño[32].



### 2.2.2. SUBAGUDA

En esta fase tiene lugar la activación de las células gliales como consecuencia de la necrosis, la hemorragia e isquemia local posteriores al trauma. Durante la primera semana se forman las áreas isquémicas que darán lugar a cavidades y quistes durante la fase crónica. Los quistes se forman principalmente de microglía y astrocitos. De hecho, la “cicatriz glial” consiste en una acumulación de astrocitos fibrosos hipertróficos en la superficie de la lesión, llamados astrocitos reactivos.

Estos astrocitos muestran incremento en la expresión de filamentos intermedios que son reconocidos por anticuerpos contra la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP). Esta respuesta alcanza un máximo a los 14 días de la lesión, pero permanece hasta 28 días después. La cicatriz glial constituye uno de los mayores obstáculos para la restitución de las conexiones lesionadas, ya que la superficie de los astrocitos reactivos cambia debido a la expresión de proteoglicanos inhibidores de la iniciación, adhesión, crecimiento y orientación de las neuritas. Se produce una infiltración de células inflamatorias. Primero se infiltran los granulocitos polimorfonucleares en función de la hemorragia producida durante la lesión ya que se producen fuertes quimioatrayentes y posteriormente los monocitos-macrófagos que fagocitan el tejido muerto. Otros tipos celulares que se infiltran son las células de Schwann, células meníngeas y fibroblastos, implicándose en procesos de proliferación de fibroblastos y angiogénesis [32, 33].

### 2.2.3. CRÓNICA

Tanto la fase aguda como la subaguda son etapas muy inestables, en las que los cambios moleculares y celulares son continuos. Se considera fase crónica al estado de la lesión más estable, en el cual no se espera observar grandes cambios histológicos ni funcionales en el individuo lesionado. El intervalo de tiempo a partir del cual una lesión alcanza su estado crónico depende del tipo de lesión y del propio individuo [33].

Aun así, el proceso degenerativo de la médula espinal continua. El tejido neural cercano al área de lesión presenta actividad eléctrica y actividad funcional deprimidas y evoluciona a lo que se conoce como lesión secundaria y posiblemente es responsable de la pérdida de función neuronal. Las neuronas muertas no son reemplazadas, los axones lesionados no se regeneran y los trastornos funcionales son permanentes [32].

La pérdida de mielina es dependiente del tiempo y empieza a las 24 horas de la lesión. A los siete días, los axones ya no poseen protección de mielina y la desmielinización aumenta después de dos semanas debido a que las células inflamatorias inician un estado de inflamación secundario. A las tres semanas, algunas fibras presentan degeneración walleriana y pérdida del diámetro axonal. En zonas

adyacentes a la lesión medular se encuentran formas inmaduras de oligodendrocitos no dañadas, que al madurar son capaces de remielinizar algunos axones. Se ha detectado remielinización por células de Schwann en lesiones con una gran degeneración walleriana. Lo que indica que las neurotrofinas, debidas a las células de Schwann o las administradas de forma exógena, pueden inducir regeneración axonal [32]. A nivel macroscópico, se produce un considerable adelgazamiento dorsoventral de la zona de la lesión[33].

### **3. MODELOS ANIMALES DE LESIÓN MEDULAR**

Los modelos animales son un elemento crítico para el desarrollo de terapias experimentales en la reparación de la lesión medular. Diversas especies han sido y son utilizadas como modelo de lesión medular [34-36]. Sin embargo, la rata es la especie más utilizada, principalmente por su coste, accesibilidad, facilidad de cuidados y la existencia de técnicas de análisis funcional bien establecidas, aunque los ratones también son ampliamente utilizados por la habilidad de modificar su genoma[37].

Por otra parte, cada modelo presenta sus propias limitaciones partiendo de la base de que ningún modelo animal expresará exactamente las mismas condiciones que tienen lugar en la clínica habitual. Los modelos de transección son difíciles de estandarizar y la lesión provocada requiere unos cuidados intensivos que dificultan dicha estandarización, los modelos de contusión controlada permiten reproducir los experimentos pero son caros y la lesión que generan dificulta la diferenciación entre axones regenerados y axones respuestos y los modelos fotoquímicos no unifican la extensión del área afectada.

Otro elemento a tener en cuenta es localización de la lesión ya que generar un modelo de lesión cervical es muy complejo dadas las complicaciones que pueda presentar al verse afectada la inervación cardiorrespiratoria, a pesar de ser la lesión más habitual en humanos. No hay que olvidar el abordaje necesario para muchos modelos y la anestesia empleada. La realización de una laminectomía tiene un impacto a nivel fisiopatológico mayor que aquellos métodos, como la compresión por balón, que no la realizan por la afección de tejido que conlleva la propia técnica. A su vez, la anestesia puede afectar a la presión sanguínea, la frecuencia respiratoria, el metabolismo del animal, ... [38].

### **3.1. MODELOS FÍSICOS**

#### **3.1.1. TRANSECCIÓN**

El modelo de transección se basa en la sección de la médula espinal mediante laminectomía dorsal y apertura de la duramadre. Habitualmente se refleja una lesión medular completa que raramente es vista en clínica, pero a pesar de ello se ha utilizado ampliamente puesto que existe una desconexión de las vías axonales ascendentes y descendentes lo que permite el estudio de mecanismos que controlan la inhibición de la regeneración [39, 40].

Uno de los principales síndromes que tienen lugar en el modelo de lesión completa o incompleta es la disreflexia autómica. Uno de los principales desencadenantes de este desorden hipertensivo es la dolorosa distensión vesical e intestinal. En el modelo de hemisección lateral se preserva un lateral de la médula espinal de forma que se mantiene la función intestinal y vesical favoreciendo la supervivencia del animal y reduciendo los intensos cuidados postoperatorios necesarios [26]. Este modelo ha sido y es ampliamente utilizado en modelos de dolor, si bien es cierto que la reproducibilidad del modelo incompleto es en cierto modo inconsistente.

El modelo de transección se está utilizando para la valoración de diferentes estructuras de soporte (scaffolds) y biomateriales en la regeneración axonal tras la lesión medular. Por ejemplo, en el estudio de un scaffold con células madre procedentes de médula ósea se ha utilizado para promover la plasticidad [41]. Terapias combinatorias combinando factores neurotróficos con biomateriales se han utilizado en modelos animales de lesión medular completa [42]. También se ha utilizado en el estudio de la terapia combinatoria de factores de crecimiento y proteína soluble Nogo66 junto con células madre neurales [43].

#### **3.1.2. COMPRESIÓN**

El modelo de compresión fue introducido por Rivlin y Tator en 1978 [44]. Con la intención de evitar el problema del tamaño del animal para el modelo de contusión de la pesa e intentando acercarse a la compresión ventral que tiene lugar en la clínica, se utilizaron clips de aneurisma Kerr-Lougheed modificados [40]. Los clips son calibrados para aportar una fuerza específica. Normalmente una fuerza de 50g genera una respuesta severa sobre la médula espinal y una fuerza de 35g genera una respuesta moderada. El clip se mantiene durante un minuto permitiendo así, un control preciso del tiempo y la fuerza aplicada.

Otro método de compresión es método del Balón, descrito en 1953 por Tarlov y modificado desde entonces. Utiliza diferentes volúmenes de insuflación y diferentes tiempos [45]. En la descripción inicial del modelo, un catéter de embolectomía se introducía a través de una laminectomía en el espacio epidural y se inflaba causando compresión directa sobre la médula espinal. El método se fue modificando hasta no ser necesaria la laminectomía y acceder a través del espacio lumbosacro. Se ha utilizado en variedad de especies, desde perros hasta monos[38].

El modelo imita los efectos fisiopatológicos que ocurren en el humano: se inicia con una fase de necrosis hemorrágica y edema, evolucionando a una fase de reparación parcial y terminando en una fase crónica con formación de quistes, atrofia axonal y cicatriz glial [26].

Por ello, es un modelo que ha sido utilizado a nivel cervical y a nivel torácico para el estudio de diferentes antagonistas y factores de crecimiento en la recuperación funcional de la lesión espinal[38, 40].

### 3.1.3. CONTUSION

La mayoría de las lesiones medulares son causadas por accidentes de coche, caídas o accidentes deportivos resultando una repentina compresión por la invasión del canal medular, ya sea por el disco intervertebral o por el hueso.

El modelo de contusión es el modelo animal más ampliamente utilizado, cuya base radica en el impacto realizado a través de una máquina directamente sobre la médula espinal, como la caída de una pesa con un peso específico, conocido como New York University Impactor. El impacto variará en función de la distancia de la pesa y de su peso. El primer modelo de contusión controlado fue descrito por Allen en 1911 en el cual la caída de la pesa liberaba una cantidad definida de energía sobre la medula espinal expuesta, provocando una compresión y un desplazamiento de la médula[38].

Más tarde, Noyes (1997) describió un modelo de impacto electromecánico, ahora conocido como Ohio State University (OSU) Impactor. Este modelo se basa en la utilización de un solenoide montado sobre un marco rígido con una punta que impacta directamente sobre la médula espinal expuesta siendo la médula firmemente sujeta. Un estudio demuestra la existencia de 3 diferentes niveles de lesión siguiendo la escala de Tarlov [46]. Tal y como sucede con el modelo de la pesa, los déficits funcionales aparecen inmediatamente y se observa una mejoría que presenta un plato a las 2-3 semanas tras la lesión. Estudios describen déficits motores y de recuperación valorados con el plano inclinado, el test grid-walking así como el análisis de la pisada o la escala BBB. El sistema OSU proporciona un buen control de los aspectos

biomecánicos del método como velocidad, profundidad de compresión y fuerza [40, 47].

En 2003 surgió un método similar al OSU que utiliza la fuerza en lugar del desplazamiento del tejido para lesionar la médula espinal de la rata [48]. También requiere la exposición de la médula espinal y una rígida estabilización de la columna vertebral. Una principal característica de este Impactor, producido por primera vez por Infinity Horizon (IH), es la habilidad de producir lesiones reproducibles sin tocar o manipular la médula antes del impacto. La lesión generada imita fielmente la lesión vista en humanos mejor que el modelo de transección.

El modelo IH se sitúa sobre la superficie expuesta de la médula espinal y desplaza la médula hasta aplicar la fuerza predeterminada, a partir de la cual el Impactor se retira.

Una ventaja de este sistema es la monitorización de varios parámetros biomecánicos como velocidad, fuerza, compresión/desplazamiento del tejido, y eso permite la rápida eliminación del estudio de animales que no cumplan estándares establecidos. Aunque, por otra parte y en comparación con el modelo de transección es más difícil distinguir entre tejido repuesto y tejido regenerado [26, 40].

### **3.2. MODELOS QUÍMICOS**

Los procesos químicos producidos tras la lesión medular también pueden ser modelos específicos para el estudio de los diferentes aspectos que incluye la cascada de daño secundario que tiene lugar tras la lesión. Al contrario que los modelos anteriormente descritos, los modelos químicamente inducidos no contemplan todos los componentes de la lesión medular traumática pero los resultados de los estudios que evalúan tratamientos debe tenerse en cuenta [40].

El daño vascular que tiene lugar después de la lesión provoca hemorragia, reducción del flujo sanguíneo e isquemia, lo que disminuye el aporte de oxígeno y nutrientes a los tejidos. Se sabe que la isquemia provoca daño en la médula espinal y disfunción en humanos y ratas tras la oclusión de la aorta descendente toracoabdominal [49]. Otros métodos para producir isquemia son la administración intravenosa de tinción rosa bengala o eritrosina B con irradiación de la estructura vertebral para provocar trombosis. El tiempo de irradiación aplicado asegura un déficit en la función motora y la conducción axonal [40, 50, 51].

Las concentraciones de aminoácidos excitatorios se incrementan rápidamente hasta alcanzar niveles tóxicos tras la lesión medular, por lo que la resultante excitotoxicidad juega un importante papel en la patología espinal. El modelo de excitotoxicidad puede ser inducido vía intraespinal/intratecal mediante excitotoxinas como el ácido

quiscólico, que ha sido utilizado en diferentes estudios demostrando cambio patológicos correlacionados con la clínica del daño medular, como pérdida neuronal, hemorragia y cavitación [52]. Otros posibles compuestos utilizados para este modelo son el glutamato, glutamato y aspartato, N-Methyl-D-Aspartato (NMDA) o el kainato [5, 15]. El uso de excitotoxinas produce dolor espontaneo de larga duración, hiperalgesia termal y alodinia mecánica, pero también producen formación de quistes, pérdida neuronal y cicatriz astrocítica. La ventaja de este modelo es la habilidad de relacionar las áreas específicas de daño tisular con los cambios de comportamiento [38].

La inflamación es otro efecto secundario a la lesión medular que puede ser inducida con la microinyección de Zymosan, un compuesto de levadura que activa los macrófagos y la microglía presentes causando inflamación como la que se observa tras la lesión medular [53]. La infiltración de Fosfolipasa-A<sub>2</sub>, una familia de enzimas involucradas en la formación de precursores inflamatorios, tiene un efecto dosis dependiente en la generación de hemorragia, infiltración de células inflamatorias y déficits motores y en la conducción axonal [54].

La degeneración de oligodendrocitos y demielinización que son el distintivo de la lesión medular pueden generarse con la microinyección intraespinal de diferentes compuestos como la lisolecitina, L-alfa-lisofosfatidil colina, bromuro de etidio solo en combinación con irradiación. Se ha comprobado que la degeneración de oligodendrocitos y la demielinización generadas producen déficits motores en las extremidades posteriores y en la conducción axonal[40].

#### **4. REHABILITACIÓN/ACTIVACIÓN DE LA PLASTICIDAD**

Existe un conocimiento cada vez mayor de que las neuronas y los axones mantienen la capacidad de regenerarse incluso en la madurez. Bajo estas premisas, la manipulación del ambiente de una neurona o axón lesionado previene la muerte celular e induce el crecimiento axonal. Actualmente, incluso sin tratamiento, se ha visto recuperación de la funcionalidad en el 40% de pacientes con lesión medular, igual que se ha visto en modelos animales. Por ello, se sabe que además de las estrategias de comportamiento compensatorio, una reorganización espontánea (plasticidad) tras la lesión puede ocurrir en médulas adultas, lo que contribuye en parte a la recuperación funcional[55].

Los procesos de plasticidad consisten en cambios en los patrones de activación tanto de la estructura como de la función modificando las conexiones existentes y generando otras nuevas. En las situaciones crónicas, no solo aquellas provocadas por

lesión medular, tiene lugar una insuficiencia vascular con la consiguiente hipoxia, isquemia o hemorragia. La gravedad de los síntomas irá directamente relacionada con el nivel al que se produzca el daño y con el tipo de fibras nerviosas afectadas, pero aun así una reorganización cortical estructural y funcional se ha observado tanto en estudios animales como humanos [55].

Muchos de los estudios de plasticidad se han centrado en la corteza somatosensorial [56, 57]. Algunos de los estudios más completos se han centrado en el estudio de lesiones cervicales en primates, en los que tras ocho meses de una lesión incompleta se ha visto reactivación en las áreas corticales que controlan la mano [58]. La organización topográfica de la corteza motora primaria no es estática. De hecho, muchos estudios la reflejan tras lesiones de nervio periférico o amputación de extremidades en ratas y primates. Aunque también se ha visto esta plasticidad en infartos focales en primates adultos y en ratas tras lesión medular [59, 60].

A nivel celular, el daño primario provoca la muerte celular mientras el secundario parece favorecer la extensión del daño. En la columna dorsal y otras regiones espinales, la lesión medular crónica se caracteriza por degeneración, apoptosis, atrofia y cambios transneurales. Por ejemplo, estudios en ratas y primates han visto como se produce una apoptosis de neuronas y células gliales que perdura durante semanas. Además de existir un importante componente inflamatorio resultante del daño a la barrera hematoencefálica, la activación microglial y la liberación de citoquinas [55, 61, 62]. Aunque los efectos del daño crónico se aprecian durante semanas, la disfunción sensorial y las sensaciones anormales suelen aparecer durante las primeras horas. De hecho, estas sensaciones anormales suelen ser provocadas por una reorganización aguda de las funciones cerebrales [55].

Se ha estudiado esta plasticidad cortical en estudios experimentales agudos y se ha visto que la contribución de la columna anterolateral, incluyendo el tracto espinotalámico, contribuye a la plasticidad. El concepto de "neuroplasticidad aguda" se apoya en diversos estudios realizados con potenciales evocados que indican que la lesión medular cambia rápidamente las interacciones en las conexiones ascendentes [63].

Por otra parte, en un estudio realizado en primates sobre sección completa e incompleta se observan las principales diferencias referentes a la plasticidad [58]. Se observa como tras la lesión incompleta de la columna dorsal en la que se mantiene cierta corriente o conexión con los dedos de la mano, las pocas conexiones existentes son capaces de activar conexiones de forma que tras unas semanas las manos solían mejorar pareciendo funcionar como una mano de un primate normal, mientras en la sección completa esto no tenía lugar, no presentando respuesta a estímulos táctiles debido a la ausencia de respuesta del sistema espinotalámico.

Pero los cambios en la función cortical es solo un componente de una larga combinación de cambios funcionales, estructurales y neuroquímicos que suceden. Los cambios plásticos a cada nivel se basan en cambios a nivel celular. Además de la muerte celular que tiene lugar y la activación del sistema inmunitario, un gran número de citoquinas, factores de crecimiento y factores neurotróficos inducidos por la lesión medular pueden continuar contribuyendo a la muerte celular o a la regeneración de los estratos espinales.

Se ha comprobado que la barrera hematoencefálica y la barrera de la médula espinal son permeables de forma selectiva al factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$ , lo que puede facilitar la recuperación funcional tras la lesión medular. También se ha comprobado que la modulación de la inhibición GABAérgica también juega un papel importante en la plasticidad cortical. Además, la diferenciación de la corteza somatosensorial o visual se caracteriza por una reducción de las neuronas que contienen GABA o la síntesis de su enzima, haciendo que estas áreas adquieran más plasticidad [55].

Por otra parte se ha comprobado, a través de diversos estudios, que la rehabilitación tras una lesión medular puede afectar dicha plasticidad comentada a diferentes niveles[64]:

Comportamiento: Se recupera la función sensorial, motora y la función autónoma.

Fisiológico: Se normalizan los reflejos y la fuerza de los potenciales evocados.

Estructural: Aumenta el crecimiento axonal y neuronal, neurogénesis.

Celular: Aumenta la formación de sinapsis.

Molecular: Se incrementan los neurotransmisores y los factores neurotróficos.

Uno de los abordajes para activar el sistema nervioso, particularmente en el contexto del sistema sensorial y motor, es el uso de terapias de rehabilitación que incluyan la estimulación de las vías sensoriales aferentes y que activen los movimientos funcionales. En este sentido, las principales terapias que favorecen la plasticidad y la recuperación son el ejercicio pasivo, el ejercicio activo y el uso de neuroprotesis para la activación eléctrica.

El ejercicio pasivo induce cambios funcionales en el movimiento de las articulaciones y un feedback sensorial que mantiene y mejora la función neuromuscular. Una de las principales ventajas de esta terapia es que no son necesarios movimientos voluntarios y puede iniciarse muy tempranamente tras la lesión. Tras la lesión, el control supraespinal está dañado y los circuitos espinales quedan bajo el control del sistema periférico lo que suele generar espasticidad y un



tono muscular anormal. El movimiento de la musculatura activa el reflejo H a través de vías aferentes. De esta forma, los movimientos pasivos activan este reflejo H y tras la repetición del entrenamiento parece que se produce una normalización de los reflejos espinales específicos en ausencia del control supraespinal [64].

Otra estrategia rehabilitadora es la rehabilitación activa. El ejercicio activo voluntario refuerza la plasticidad observada tras la rehabilitación pasiva aportándole más beneficios, ya que no solo se producen cambios en la movilidad articular sino también a nivel muscular y de las vías aferentes. En roedores, se ha visto una recuperación parcial de la locomoción del tercio posterior tras ejercicio en cinta andadora [65]. También se han visto cambios a nivel celular caracterizados por una disminución de moléculas inhibitoras, un aumento en la expresión de factores neurotróficos y una mejora en la actividad electrofisiológica [66, 67]. Uno de los inconvenientes de esta terapia es la necesidad de cierto grado de recuperación funcional que permita el movimiento voluntario.

Por otra parte y basado en estudios en modelos animales, se propone un posible mecanismo molecular para la neuroplasticidad. El factor neurotrófico derivado de cerebro, más conocido como BDNF y su receptor, la tirosinaquinasa B, pueden ser los principales moduladores de la cascada bioquímica de la neuroplasticidad. La función del BDNF es sintetizar y fosforilar la sinaptosina 1, una fosfoproteína responsable de la liberación de neurotransmisores y del crecimiento axonal. En roedores se ha visto como estas tres moléculas aumentaban tras la lesión secundaria y permaneciendo durante la fase crónica tras el ejercicio voluntario[64].

## **5. TESTS DE EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD**

### **5.1. TESTS LOCOMOTORES**

Los test locomotores son habitualmente tests en campo abierto en los que se evalúa el aparato locomotor, principalmente las extremidades anteriores, posteriores y la musculatura de la cola. Además de la función muscular, la locomoción también necesita coordinación y fuerza de la musculatura implicada. La recuperación locomotora se reconoce como una de las importantes modalidades de valoración en pacientes con lesión medular [68].

Uno de los principales puntos para la locomoción es el soporte de peso del cual dependen los pasos de las extremidades posteriores adecuados. Las lesiones experimentales se realizan habitualmente en la porción media a nivel torácico, por lo que solo la musculatura de las extremidades posteriores y de la cola se ven afectadas. Lesiones superiores a la quinta vértebra cervical (C5) no se suelen realizar para evitar el compromiso del nervio frénico que controla la respiración.

#### 5.1.1. TEST DE CAMPO ABIERTO

El Test de Valoración en Campo Abierto fue uno de los primeros tests que se aplicaron para el estudio de la locomoción en animales lesionados. Es fácil, reproducible y no requiere mucho equipamiento.

Se desarrollaron unas escalas en base a los movimientos de las extremidades, reflejando la activación de las redes espinales. Originariamente se utilizaba el Test de Campo Abierto de Tarlov en el que se establecía una escala de movimientos y soporte de peso en cinco categorías [69]. Este test era válido para valorar principalmente aquellos animales capaces de soportar peso en las extremidades posteriores [70].

Posteriormente se modificó generando el Test Modificado de Tarlov en el que se establecía una escala del 0 (parálisis completa) al 6 (locomoción completa). Otras modificaciones establecieron diferentes escalas de valoración, pero ninguna de estas escalas es realmente sensible por lo que los investigadores ampliaron el número de categorías lo que dio lugar a la escala BBB de Basso, Beattie y Bresnahan en 1995.

En 1996 Bignami [71] describió el Test de Actividad en Campo Abierto en el cual se testaba a las ratas en un campo abierto dividido en 9 campos. Los animales eran observados durante 5 minutos y se contabilizaba el número de campos cruzados y se valoraba en base al ratio de animales. Una característica a tener en cuenta acerca de este test es la actividad exploratoria espontánea puede estar influenciada por la ansiedad y el estrés, así como por la habituación y el aprendizaje del test [68].

#### 5.1.2. BBB TEST

El test BBB es probablemente el test más utilizado para la valoración de la función locomotora en ratas con lesión medular. Se basa en una modificación del Test de Campo Abierto en el que se establece una escala más amplia de categorías establecidas desde el 0 (sin actividad locomotora) hasta el 21 (movimiento normal, coordinación y posición plantar paralela) (Tabla 2).

BBB SCALE	
0	No se observa movimientos extremidades posteriores (Hind limbs HL)
1	Movimiento ligero (menos de la mitad del rango) de una o dos articulaciones, normalmente cadera y/o rodilla
2	Movimiento extenso (mas de la mitad del rango) de una art o movimiento extenso de una art y parcial de la otra
3	Movimiento extenso de dos articulaciones
4	Movimiento ligero de las tres articulaciones de la HL
5	Movimiento ligero de dos art y extenso de la tercera
6	Movimiento extenso de dos art y ligero de la tercera
7	Movimiento extenso de las 3 articulaciones
8	"sweeping (movimiento hacia delante y detrás)" sin soporte peso o posición plantar de la pata sin soporte de peso
9	Posición plantar de la pata con soporte de peso sólo en fase de apoyo o stepping dorsal ocasional, frecuente, o consistente(andan con la Superficie dorsal de la pata)con soporte peso y no stepping plantar
10	Pasos con soporte peso plantar ocasional: no hay coordinación FL (fore limbs)-HL
11	Frecuente- consistente soporte peso y pasos plantares y no coordinación FL-HL
12	Frecuente- consistente soporte peso y pasos plantares y ocasional coordinación FL_HL
13	Frecuente- consistente soporte peso y pasos plantares y frecuente coordinación FL_HL
14	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistente y la posición durante la locomoción de la pata es rotada (interna o externa) cuando se hace el contacto inicial con la superficie y también cuando empieza la fase de oscilación al final del apoyo; o stepping plantar frecuente, consistente coordinación FL_HL y ocasional stepping dorsal.
15	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistente no hay clearance de los dedos o es ocasional durante el avance de la extremidad; La posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el contacto inicial
16	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistente, hay clearance de los dedos frecuente durante el avance de la extremidad, la posición predominante de la pata al contacto inicial es en paralelo y rotada a inicio de la oscilación
17	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistente, hay clearance de los dedos frecuente durante el avance de la extremidad, la posición predominante de la pata al contacto inicial y al comienzo de la fase de oscilación es en paralelo.
18	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistente, hay clearance de los dedos consistente durante el avance de la extremidad, la posición predominante de la pata al contacto inicial es en paralelo y rotada en la oscilación.
19	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistente, hay clearance de los dedos frecuente durante el avance de la extremidad, la posición predominante de la pata al contacto inicial y al comienzo de la fase de oscilación es en paralelo. La cola esta abajo casi todo el tiempo.
20	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistente, hay clearance de los dedos frecuente durante el avance de la extremidad, la posición predominante de la pata al contacto inicial y al comienzo de la fase de oscilación es en paralelo. Inestabilidad en el tronco; cola arriba consistentemente
21	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistente, hay clearance de los dedos frecuente durante el avance de la extremidad, la posición predominante de la pata al contacto inicial y al comienzo de la fase de oscilación es en paralelo. Estabilidad en el tronco; cola arriba consistentemente

Tabla 2: Tabla de valoración BBB. Adaptada de Basso, Beattie, Bresnahan.[72].

Por debajo de los 7 puntos se indica que existen movimientos aislados de la cadera, la rodilla o el tobillo. Entre 8 y 13 puntos se recupera la posición plantar y aparecen movimientos coordinados. Finalmente, entre los 14 y 21 puntos el animal muestra espacio libre entre los dedos al caminar, una posición de la extremidad adecuada y estabilidad en el tronco y en la cola [72]. En la puntuación también se valora si dichos movimientos son ocasionales, consistentes o frecuentes. Se recomienda realizar el test con observadores ya que valorar la coordinación puede ser complicado incluso para observadores expertos. La utilización de una cámara facilita la evaluación de aquellos parámetros difíciles de valorar y la evaluación por observadores diferentes.

Se ha utilizado principalmente en modelos de lesión por contusión, pero también funciona con otros modelos como la compresión por balón o la hemisección [70].

Una de las principales limitaciones del test radica en el hecho de que la escala BBB no es lineal; las valoraciones del último tercio de la tabla incluyen aspectos importante de locomoción mientras las valoraciones iniciales solo incluyen ligeros movimientos de articulaciones que influyen discretamente en la habilidad locomotora del animal [70].

A pesar de ello, ha demostrado que los resultados obtenidos son reproducibles por ello se mantiene como el patrón de oro en la valoración locomotora.

A raíz de dicha limitación, surgieron diferentes modificaciones y mejoras [70, 73], llamadas BBB-subscore de forma que se mejorara la sensibilidad de la escala BBB original.

#### 5.1.3. TEST DE LA PISADA

Uno de los primeros test de análisis de la pisada descritos fue publicado por Medinaceli y cols. en 1982 [68]. Posteriormente se realizaron diferentes modificaciones siguiendo la base inicial del test que consiste en el análisis de la pisada a través de una estrecha barra de madera cubierta de papel sobre la que permanecen impresas las pisadas de la rata. Para poder distinguir entre ellas, las extremidades anteriores se pintan de color diferente a las posteriores.

Se evalúa la distancia entre pasos, la habilidad de las patas de soportar el peso del animal y el ángulo de la pata, como indicador de estabilidad al caminar [68, 70]. Uno de los inconvenientes de este test es la influencia de la motivación del animal en los resultados. Además, en aquellos animales que tengan soporte parcial de peso, las medidas del ángulo y la distancia entre pasos pueden ser muy difícil de cuantificar.

Se considera un test adecuado en aquellos casos en los que se necesario refinar la valoración del sistema locomotor realizada con el test BBB o con otros test que valoren soporte de peso, estabilidad del tronco y posición plantar [68].

#### 5.1.4. TEST AUTOMATIZADO DE LA PISADA

En 2001 se desarrolló un sistema automatizado de análisis de la pisada (Catwalk®) [74], que consiste en un pasillo con superficie de plexiglass transparente en la base y opaca en las paredes bajo la cual se sitúa una cámara que registra los pasos de la rata durante la carrera. Se trabaja en una sala oscura puesto que el Catwalk registra la intensidad de la pisada efectuada por el animal, a la vez que valora la coordinación entre extremidades, también llamado Regularity Index (RI), la superficie total de contacto de la pata (área de impresión), distancia entre las extremidades posteriores (soporte), duración de la pisada y presión de la pisada [68].

La principal ventaja de este test es que permite el análisis de todas las fases de movimiento, especialmente de la coordinación, que suele estar muy limitada con otros tests como el BBB. Otra ventaja radica en la gran cantidad de datos que se recogen y que permite un análisis más minucioso de los diferentes patrones locomotores. Un aspecto interesante es el hecho de que determinadas medidas se ha visto que son sensitivas para diferentes modelos de lesión medular. Por ejemplo, el RI refleja la mejora neurológica en los modelos de sección completa y contusión, pero falla en los modelos de sección dorsal [75].

Una limitación que presenta el test es la imposibilidad de análisis para aquellos casos en los que la recuperación funcional no incluya soporte de peso o pasos plantares, tal y como sucede con el análisis de la pisada tradicional.

#### 5.1.5. ANÁLISIS CINEMÁTICO

El análisis cinemático fue desarrollado para el análisis de una extremidad posterior en animales que previamente son capaces de dar pasos plantares en una cinta para correr o treadmill.

Los animales son rasurados y marcados con tinta a nivel de la cadera, cresta iliaca, trocánter mayor, maléolo lateral y la quinta unión metatarsofalangea. La posición de la rodilla se calcula mediante las posiciones de la cadera y la rodilla y las medidas individuales del largo del fémur y de la tibia ya que la articulación de la rodilla está cubierta por pelo difícil de eliminar [70].

Los animales son entrenados en un treadmill y grabados con cámara antes de ser operados. Se analizan los movimientos de las extremidades de 5 pasos completos analizando fotograma a fotograma (50 fotogramas/seg) y haciendo un promedio. Se mide la flexión y extensión de las articulaciones en las diferentes fases de la marcha, es decir, al inicio y a mitad del balanceo, cuando la pata inicia el contacto con la superficie y cuando finaliza.

Una ventaja de este método es que permite detectar déficits discretos en el paso y puede ser utilizado tanto en marcha normal como en treadmill. Además, completa la información obtenida con el BBB o el análisis de la pisada con datos sobre la duración de los pasos principalmente. Por otra parte, aquellos animales que no sean capaces de soportar peso y realizar pasos no podrán ser evaluados por este test [68].

#### 5.1.6. TEST DE PESO TORACOLUMBAR

Fue desarrollado por Meent y colaboradores en 1996 [68] con la intención de valorar diferencias en los patrones de soporte de peso parcial y total. Se basa en la idea de que la altura de la cifosis toracolumbar depende de la habilidad de la rata para soportar peso en las extremidades posteriores.

Antes de iniciar el test, se marca con tinta la altura máxima de la cifosis de la columna para tener un dato basal. El animal se coloca en un pasillo transparente y la marca es monitorizada con una cámara de video mientras el animal recorre el pasillo. La cámara está conectada a un ordenador que debe tener el software desarrollado por el laboratorio de Frank Hamers para poder analizar los resultados. De esta forma, la posición de la columna se determina 50 veces por segundo y se archiva para posteriores análisis.

Se sabe que es un test más sensitivo que el Test de Campo Abierto de Tarlov y se presupone que también aporta datos únicos a la valoración con el test BBB, pero en aquellos casos en los que existe daño medular moderado o severo su utilidad es muy limitada [68].

### 5.2. TESTS MOTORES

Este tipo de test de comportamiento analiza la función muscular esquelética no principalmente envuelta en la locomoción.

#### 5.2.1. PLANO INCLINADO

El plano inclinado es una superficie de 28 x 30 cm aproximadamente con una superficie de goma estriada. Este test evalúa la habilidad del animal a mantener la posición del cuerpo en planos elevados aumentando los ángulos.

La rata se posiciona en el plano inclinado con la cabeza abajo, arriba, derecha o izquierda. También se puede colocar perpendicular a la superficie, pero habitualmente con dos posiciones es suficiente [47]. Se registra el máximo ángulo en el que la rata es capaz de aguantar durante al menos 5 segundos.

El plano inclinado está directamente relacionado con la integridad del tracto rubroespinal y otras vías no piramidales tras la lesión medular [76].

### 5.2.2. LIMB HANGING

Este test aprovecha la capacidad natural de agarre de la pata para evaluar las extremidades anteriores o posteriores, aunque se utiliza principalmente para valorar la musculatura de las extremidades anteriores en animales con lesión cervical [47].

El animal se cuelga de una cuerda metálica de unos 12 cm de longitud y unos 1.8mm de grosor, con o sin superficie estriada y se contabiliza el tiempo en segundos que permanece sujeto. El test se repite habitualmente 5 veces y se obtiene una media.

Posteriormente, surgió una modificación que incluía una valoración de la fuerza aplicada por el animal sobre la barra, con la intención de valorar la función neuromuscular. Para poder valorarlo es necesario un aparataje específico llamado Medidor de Fuerza construido con las bases del Método Meyer [77]

## 5.3. TESTS MOTO-SENSORIALES

### 5.3.1. ROPE WALK TEST

Este test consiste hacer que el animal de estudio cruce 3 veces por una cuerda de 125cm de largo y 4 cm de diámetro situada entre dos plataformas y se registran los resbalones y las caídas.

La superación de este test requiere soporte de peso en las extremidades posteriores, posicionamiento preciso de la pata, postura balanceada y coordinación.

Es un test muy sensible para lesiones unilaterales como las hemisecciones pero su principal limitación es que requiere al menos 5 semanas de pre-entrenamiento [78]

### 5.3.2. NARROW BEAM TEST

Fue descrito en 1975 por Hicks y D'Amato [79] e incluía 3 tipos de barra en función de la anchura: una rectangular de unos 2.3 cm, una rectangular de 1.2cm y una redonda de 2.5 cm de diámetro. Todas medían un metro de largo y se situaban 30 cm por encima del suelo.

Era y es necesario un entrenamiento previo en el que las ratas deben ser capaces de pasar la barra con menos de 3 caídas y se utiliza un sistema de puntos para su valoración otorgando la mayor puntuación cuando el animal camina con soporte de peso y apoyo preciso de la extremidad [70].

### 5.3.3. GRID-WALKING TEST

Es un test muy sensible para evaluar la coordinación sensorial y motora de las extremidades anteriores y posteriores y el control motor descendente sobre las vías motoras de las extremidades.

Consiste en una larga cuadrícula de 1 metro aproximadamente con huecos irregulares de entre 0.5-5 cm de diámetro sobre la que se coloca el animal y sobre la que se contabilizan los desplazamientos de la extremidad y el número de resbalones de las patas en el intento de atravesar la superficie en 3 ocasiones. Los datos se recogen y se obtiene una media.

Para atravesar satisfactoriamente la cuadrícula el animal debe coordinar sus pasos entre extremidades anteriores y posteriores, acción mediada por los tractos ventrolaterales y el sistema rubroespinal y, por otra parte, el control voluntario del movimiento, mediado predominantemente por los sistemas corticoespinal y rubroespinal en la rata [68, 70]

### 5.4. TESTS SENSORIALES

Los métodos sensoriales no evalúan la recuperación de la funcionalidad tras una lesión medular pero se incluyen dentro de los estudios comportamentales con la intención de valorar la hiperactividad (hipersensibilidad, alodinia) o la hipoactividad (disminución de las funciones sensoriales) en respuesta al frío, al calor o la presión, valorando principalmente las vías sensoriales y las vías nociceptivas.

Uno de los problemas de estos test es que no siempre es posible establecer una separación entre las vías motoras sensoriales y la respuesta al dolor. Por ejemplo, en los test basados en la aplicación de calor, la extremidad puede ser retirada por la sensación de calor o por la estimulación de receptores nociceptivos.

Entre los principales tests encontramos el Hot-Plate Test, Plantar Test, los filamentos de Von Frey, el test de Compresión de la pata o los reflejos de retirada [68].



## **6. ANTECEDENTES DE LA TERAPIA CELULAR EN REGENERACIÓN NEURAL: TERAPIA CELULAR**

Existen 4 objetivos fundamentales en el tratamiento de la lesión medular. El primero es la reducción del daño secundario como la inflamación, el edema y la formación de la cicatriz glial, los cuales interfieren en la regeneración axonal. El segundo sería regenerar los axones dañados y la mielina, seguido de la reconexión de las diferentes vías aferentes y eferentes esenciales para las funciones motoras y sensitivas. Y por último, la regeneración de las neuronas dañadas de la materia gris.

Muchas de las intervenciones a estos niveles son efectivas en situaciones agudas y subagudas pero la densa cicatriz glial del estadio crónico no es fácilmente eliminada lo que dificulta mucho los tratamientos[80]. De hecho, los tratamientos en agudo y subagudo deben ir focalizados a la neuroprotección mientras los tratamientos en fase crónica deben ir dirigidos en la neurorestauración [81].

Los tratamientos de neuroprotección deben iniciarse en las primeras horas para prevenir el daño secundario. Ambos, fármacos antiinflamatorios y factores neurotróficos se ha comprobado que tienen efectos positivos in vivo. Por otra parte, el trasplante celular no es el tratamiento más apropiado en el estadio agudo inflamatorio ya que, al parecer, las citoquinas inflamatorias disminuyen la supervivencia y la diferenciación de las células trasplantadas [82].

Por otra parte, las estrategias de neurorestauración son muy importantes puesto que la mayoría de los pacientes con lesión medular se encuentran actualmente en estadios crónicos. Cuando hablamos de restaurar neuronas receptoras debemos tener en cuenta la supresión de los factores de inhibición, la necesidad de factores de crecimiento, para el recrecimiento de las neuritas y la plasticidad sináptica, y de células gliales para la remielinización de los axones [80].

Aun así, no hay tratamiento para la lesión medular y aunque ensayos clínicos en terapias celulares han aportado información sobre la regeneración neuronal y la protección del daño adicional, la principal opción de tratamiento en humanos es el tratamiento farmacológico. El primer ensayo clínico con trasplante de células madre fue publicado en el 2006 [83], y posteriormente muchos otros ensayos clínicos se han llevado a cabo con diferentes tipos celulares. La mayoría de estas células eran células madre derivadas de médula ósea autóloga (BMSCs), y aunque los efectos fueron seguros el efecto era limitado. También se han realizado trasplantes con células procedentes del bulbo olfatorio, células de Schwann y macrófagos, aunque el objetivo de la mayoría de estos estudios era comprobar su seguridad más que su efecto terapéutico. Además, algunos de ellos tenían problemas de estadísticos como el

número de animales o que no introducían grupo placebo lo que es importante para valorar los estudios clínicos [80].

Estudios sobre células madre neurales han demostrado su presencia en el cerebro adulto abriendo la posibilidad de estudio sobre ello y estableciendo dos posibles estrategias: la estimulación de progenitores o células madre neurales endógenas y el trasplante de dichos progenitores y células madre derivados de forma exógena [84].

Las células madre son consideradas progenitores de más de 200 tipos celulares del organismo adulto siendo células indiferenciadas que mantienen la habilidad de dividirse a lo largo de la vida y especializarse reponiendo así las células perdidas o muertas. Esta propiedad implica que tengan dos características fundamentales: autorenovación y potencia ilimitada. La autorenovación indica la habilidad de mantener su estado indiferenciado incluso a través de ciclos de división celular, mientras la potencia ilimitada se refiere a la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular maduro, de esta forma, las células madre totipotentes y pluripotentes. Podemos hablar de dos grupos de células madre, las embrionarias derivadas de blastocistos y cuya función principal en el embrión en desarrollo es diferenciarse hacia un tejido embrionario especializado, y las células madre adultas que se localizan en el tejido adulto y cuya función principal es la reposición de células especializadas dañadas [85].

## **6.1. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES**

### **6.1.1. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS (ESCS)**

Las células embrionarias son células pluripotentes derivadas de los blastocistos. Derivan de embriones en desarrollo antes del momento de la implantación en el útero. Tras la fecundación las células inician su división llegando al estadio de blastocisto antes de la implantación. Estas células tienen la capacidad de renovarse de forma indefinida y diferenciarse en células de las tres capas germinales [86].

Las células embrionarias ofrecen un apoyo importante en el estudio de la diferenciación de los tejidos así como de soporte para el estudio inicial de la eficacia y la seguridad de nuevos fármacos.

Otro potencial de las células embrionarias es su uso en trasplantes para el tratamiento de patologías degenerativas. Algunas patologías degenerativas están causadas por la muerte o ausencia de un tipo celular concreto, como por ejemplo, las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson. Así, la reposición de dichas células supondría una posibilidad terapéutica. Aun así, estas células no son trasplantadas directamente en modelos animales, sino que son prediferenciadas in

vitro hacia la población deseada. Algunos investigadores prediferenciaron células embrionarias de ratón en neuronas y oligodendrocitos y demostraron una remielinización y recuperación funcional en un modelo de lesión medular por contusión en ratón [87].

Aun así, existen muchos aspectos controvertidos en su uso, principalmente, aspectos éticos en los que se incluyen el uso de embriones humanos para poder aislar sus células embrionarias. Por otra parte, en cultivos prolongados se han visto posibles anormalidades cromosómicas, formación de teratomas debido al mantenimiento como células indiferenciadas y rechazo de injerto tras el trasplante de células embrionarias entre pacientes diferentes [88].

La compañía americana de biotecnología Geron inició en 2010 un test de seguridad en pacientes con lesión medular en el que se utilizan oligodendrocitos prediferenciados de células embrionarias. En 2011 presentó los primeros resultados de su ensayo clínico en el que las células habían sido bien toleradas por los pacientes, sin grandes efectos adversos pero en el que a su vez no se habían observado mejorías neurológicas [26].

Debido a estas controversias es más habitual el uso de otros tipo celulares en terapias regenerativas [26].

#### 6.1.2. CÉLULAS MADRE INDUCIDAS (iPSCS)

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) fueron generadas en 2006 por Takahashi y Yamanaka [89], tras la modificación genética de fibroblastos mediante retrovirus para obtener células somáticas reprogramadas. Se obtuvieron células que presentaban capacidad proliferativa y de diferenciación similar a la que presentan las células embrionarias, pudiendo diferenciarse en células de las tres capas germinales. Posteriormente se indujeron células sin la necesidad de utilizar vectores virales peligrosos mediante la utilización de químicos y otras moléculas [90, 91].

Se piensa que las iPSCs serán una solución a los problemas éticos y de rechazo inmunitario, ya que las células se obtienen de células somáticas de cada paciente. Por otra parte, las células inducidas pueden presentar una alta capacidad tumorigénica, incluso mayor que las células embrionarias, debido a la introducción de dichos genes en los cromosomas y a que es posible que el proceso de reprogramación no se haya terminado [48, 92, 93].

Son capaces de diferenciarse a los diversos tipos de células neurales como neuronas, glía, precursores neurales y motoneuronas [94], aunque se ha visto que en

función del origen somático de las células inducidas, pueden ser más o menos seguras y su diferenciación a células neurales también puede verse influida. Estudios de citometría de flujo comprobaron que neuroesferas de diversas líneas de células inducidas, presentaban diferencias en la proporción de diversos factores de transcripción dependiendo de las células somáticas de las que hubieran sido obtenidas [95]. Por otra parte, fibroblastos embrionarios procedentes de células inducidas mostraron una menor diferenciación que las células embrionarias, y a su vez, la formación de teratomas fue menor que en el grupo en el que se habían trasplantado neuroesferas de células embrionarias. Sin embargo, las neuroesferas obtenidas de dos líneas celulares de células de epitelio gástrico adulto no formaron teratomas tras 16 semanas de observación.

El número de estudios en lesión medular con células inducidas se ha incrementado en los últimos años. Dos estudios del laboratorio de Okano han demostrado que precursores neurales obtenidos de células inducidas trasplantados en un modelo de contusión en animales inmunodeficientes han conseguido diferenciación neural, recuperación funcional y no han generado tumor [26]. Aun así, se necesitan más estudios para confirmar la seguridad y la viabilidad de las células iPSC antes de alcanzar los ensayos clínicos.

## **6.2. CÉLULAS MADRE MULTIPOTENTES (ADULTAS Y FETALES)**

Existen diversos tipos celulares multipotentes de los que podemos destacar los siguientes:

### **6.2.1. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCS)**

Las células madre mesenquimales procedentes de médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical y otros, sean adultos o post-natales, son otra alternativa para aplicaciones regenerativas ya que son fácilmente accesibles y su uso no presenta problemas éticos. De hecho, su facilidad de aislamiento y expansión, y la ausencia de aspectos éticos que la limiten, hace que sean muy atractivas para las terapias. Poseen también otras características que favorecen su uso como que su escasa inmunogenicidad, su efecto antiinflamatorio e inmunosupresor y no forman tumores [62]. Las células mesenquimales derivadas de médula ósea (BMSCs) son, quizá, las más utilizadas en estudios celulares de lesión medular.

Tezlaff realizó un estudio en 2010 en el que el 50% de los estudios que utilizaba células mesenquimales de médula ósea como terapia celular en el tratamiento de lesión medular obtenían una mejoría motora [96]. Algunos de los estudios aplicaban

las células dentro o cerca de la lesión, mientras otros lo hacían de forma intratecal e incluso intravenosa [1, 63] aunque un estudio de Callera [80] en el que el trasplante se hizo vía intratecal, no localizó células trasplantadas en líquido cefalorraquídeo tan solo 7 días después del trasplante.

Otros estudios en los que se transplantaron BMSCs autóloga tras sección completa de médula espinal en las diferentes fases, aguda, subaguda y crónica, registraron que al menos el 20% de los pacientes presentaban dolor neurótico tras el trasplante aunque sin diferencias estadísticas con el grupo control [84].

Desde un punto de vista traslacional, los ensayos clínicos en los que se han utilizado BMSCs en el tratamiento de pacientes con lesión medular no han obtenido una mejoría motora después de un año tras la cirugía. De todas formas, estos estudios incluían pocos pacientes, por lo que es necesaria una validación clínica. Actualmente existen al menos 4 ensayos clínicos con BMSCs en activo [26]

En realidad, se piensa que las células mesenquimales tienen un efecto mayoritariamente neuroprotector ya que secretan factores neurotróficos más que un efecto regenerador por diferenciación a células neuronales o gliales y aunque su mecanismo de acción no es exactamente conocido se ha visto que su efecto sobre la diferenciación es muy pequeño. Así, se podría decir que las células madre neurales o pluripotentes son más apropiadas que las células mesenquimales para la restauración neural y el reemplazo de neuronas y células gliales dañadas[80].

#### 6.2.2. CÉLULAS OLFATORIAS (OECS)

Las células olfatorias son células gliales que juegan un papel importante en la capacidad de regeneración neural de las neuronas olfatorias. La continua reposición de los axones del sistema nervioso periférico (la mucosa olfatoria) y el crecimiento en el sistema nervioso central (el bulbo olfatorio) está dirigida por estas células [97]. En este sentido, este tipo celular puede ser importante en el tratamiento de lesiones medulares donde es necesaria un microambiente adecuado para la regeneración axonal. Pueden ser obtenidas a través de biopsias nasales e implantadas directamente con matriz celular o diferenciadas y cultivadas hasta obtener un número adecuado de células [98].

Se han realizado diversos estudios en lesión medular con este tipo celular. En 1998 ya se demostró la regeneración de axones corticoespinales y la mejoría funcional en animales [99], y posteriormente también se demostró en modelos crónicos de lesión medular [100].

Los mecanismos de actuación aún están en debate. Se ha demostrado que estas células son capaces de migrar a través de la cicatriz glial de la lesión medular pero no

se ha demostrado si la migración interviene en la regeneración axonal o previene a los axones de las señales inhibitorias. Lo que si se ha demostrado es que las OECs disminuyen la respuesta astrocítica y la expresión de condroproteoglicanos [101], y que son capaces de secretar factores neurotróficos [102].

Tanto los datos preclínicos como la posibilidad de trasplantes autólogos hacen que estas células sean atractivas para estudios traslacionales. De hecho, más de 400 pacientes con lesión medular han sido ya trasplantados con estas células. Aun así, son necesarios más datos preclínicos, sobretodo en modelos de contusión y compresión, con el objetivo de establecer mejor las condiciones bajo las que estas células promueven la plasticidad, la neuroprotección y la recuperación funcional [26].

### 6.2.3. CÉLULAS DE SCHWANN

Son las células encargadas de la formación de mielina que rodea los axones en el sistema nervioso periférico. Además, tras una lesión del sistema nervioso periférico, las células de Schwann juegan un papel importante en tres aspectos [87, 103]:

- Secreción de factores de crecimiento: NGF, BDNF, NT3, CNTF, GDNF Y FGF
- Expresión sobre la membrana celular de moléculas adhesivas (L1 y N-CAM) que mantienen el crecimiento axonal.
- Producción de moléculas de matriz extracelular que intervienen en el crecimiento axonal, como laminectina, fibronectina y colágeno.

Estas tres características hicieron que estas células fueran candidatos potenciales para la reparación de la lesión medular. De hecho, el primer experimento se realizó en 1981 [104], y desde entonces han sido ampliamente estudiadas. Por ejemplo, Takami demostró que una reducción de la cavitación y un incremento de axones sensoriales y espinales en los injertos, muchos de ellos mielinizados [101].

Por otra parte, se ha visto que las células de Schwann necesitan de la combinación con otros tratamientos como agentes neuroprotectores o bloqueantes de la inhibición para que tenga lugar su migración y favorezca su acción sobre los axones [85, 105].

No hay muchos estudios traslacionales aunque recientemente se ha iniciado en Miami la fase I de un ensayo clínico en la utilización de células de Schwann en pacientes con lesión medular subaguda. Los resultados deben estar disponibles a partir de Noviembre del 2015.

#### 6.2.4. MACRÓFAGOS ACTIVADOS

Se sabe que la activación intrínseca de macrófagos tras una contusión medular junto con micro-inyección de agentes proinflamatorios tiene efectos negativos sobre la recuperación funcional. De hecho, la reducción de los macrófagos parece generar una mejoría funcional significativa [53, 73].

Así, una adecuada activación de los macrófagos podría favorecer la recuperación. La activación clásica, como tras una activación bacteriana, los transformaría en células potentes encargadas de matar microorganismos y células tumorales, pero la activación “alternativa”, es capaz de producir factores de crecimiento y eliminar neurotoxinas como las cantidades excesivas de glutamato[60].

En estudios preclínicos de sección medular se ha visto una recuperación de la funcionalidad del tercio posterior al trasplantar macrófagos activados [101]. Esto ha permitido el inicio de diversos ensayos clínicos.

#### 6.2.5. CÉLULAS MADRE NEURALES /PRECURSORES NEURALES (NSCS)

Las células madre neurales (NSCs) son células multipotentes con la habilidad de diferenciarse a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Poseen una elevada capacidad de autorenovación siendo capaces de renovar las neuronas dañadas y remielinizar axones desmielinizados pero dicha capacidad no es suficiente para restaurar una lesión medular [80]. Debido a estas cualidades, son células candidatas a ser empleadas en la reparación de la lesión medular, de hecho ya se han iniciado algunos estudios traslacionales con ellas, sea su origen cerebral o espinal [26].

Sus características difieren según su origen sea la médula espinal o el cerebro [106]. En el adulto se localizan principalmente en el tejido adyacente a los ventrículos, aunque también se ha comprobado que el canal central de la médula espinal, el *canal ependimario*, es fuente de precursores neurales capaces de diferenciarse [107, 108].

Estas células pueden ser aisladas y expandidas in vitro, habitualmente como neuroesferas. Su principal uso en lesión medular está focalizado en el reemplazo de tejido, principalmente neuronas y oligodendrocitos, así como la provisión de factores tróficos que apoyen la supervivencia del tejido neuronal. De hecho, se ha demostrado que las NSCs son capaces de secretar diversos factores como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el derivado cerebral (BDNF) y el glial (GDNF), in vitro e in vivo [26, 109].

El crecimiento en condiciones in vitro de las NSCs muestra que son capaces de mantener su capacidad de autorenovación tras varios pases y que son capaces de secretar factores neurotróficos [86, 97], aunque una desventaja del uso de estos

precursores cultivados in vitro para diversas terapias es la disminución de su potencial de diferenciación tras varios pases.

Hay pocos estudios que traten sobre la integración de las NSCs y su mecanismo para promover la recuperación funcional[110], pero sí se ha comprobado que la manipulación y tratamiento in vitro previo al trasplante es crucial para la supervivencia y la integración celular [98, 104]. Por ejemplo, el cultivo celular en monocapa mejora la proliferación de las NSCs multipotentes, mientras el cultivo de neuroesferas es más restrictivo. Interesantemente, los cultivos en monocapa y de neuroesferas no se comportan igual tras el trasplante [90, 91].

Investigadores como Shihabunndi y Lu demostraron que la diferenciación in vivo de las NSCs estaba muy relacionada con el ambiente. Las células trasplantadas en el hipocampo se diferenciaron a neuronas mientras que las trasplantadas en la médula espinal lesionada solo a células gliales[67], aunque otros estudios han conseguido que la diferenciación se produzca tanto a células gliales (31.2% de astrocitos y 50% de oligodendrocitos) como a neuronas (1%), aunque en menor proporción [111].

Por otra parte, diversos estudios de trasplante de NSCs en medula espinal lesionada observan resultados beneficiosos en la recuperación funcional en modelos experimentales pero su mecanismo aún no se conoce bien [106, 112].

Como hemos comentado, el canal endimario posee también una fuente de precursores neurales. *Las células endimarias* ciliadas no existen a lo largo del tubo neural inmaduro, y conforme las células de la zona ventricular y las células gliales radiales retroceden, el canal central y los ventrículos son gradualmente cubiertos por epéndimo ciliado [113]. En 1992, Sarnat describió las funciones secretoras de las células endimarias fetales pero ya indicó que el epéndimo de cerebro adulto tenía funciones a definir. Indicó que la superficie basal de las células endimarias expresa proteínas de matriz extracelular que funciona como guía para los axones, al menos en invertebrados [114]. También se ha definido una actividad importante a los cilios endimales, los cuales, crean un diferencias de gradiente en el líquido cefalorraquídeo que sirve para la migración de los neuroblastos [115].

En los últimos años han surgido evidencias que sugieren que un pequeño grupo de células endimarias en el polo dorsal del canal central de la médula espinal de ratones adultos, distinto a las células de la zona ventricular, que pueden tener potencial como célula madre tras una lesión medular [112, 116] . Además son capaces de responder al EGF y FGF2 [117].

En una médula no lesionada, los astrocitos y las células endimarias proliferan para mantener la población mientras los progenitores de oligodendrocitos se autorenewan y generan más oligodendrocitos maduros. Tras una lesión medular las



células endimarias o epSPC aumentan y se diferencian [118] y, de hecho, constituyen la principal población celular en la médula espinal intacta con propiedades in vitro de células madre neurales[119], pero el origen del incremento de células madre neurales que se produce tras la lesión es desconocido. Este incremento, se ha comprobado mediante cultivo de células endimarias de animales con y sin lesión tras una semana de la misma y se observó que la proliferación in vitro fue 10 veces mayor en los cultivos de epSPCs de animales lesionados que de animales sin lesión, junto con un incremento de células apoptóticas en el grupo sin lesión. Además, el trasplante de estas células endimarias “activadas” mediante lesión provocó una temprana mejoría de la funcionalidad motora [112].

A su vez, las células madre endimarias son capaces de migrar a la zona de la lesión. Muestran inmunoreactividad a Sox9 y vimentina en su mayoría, aunque una pequeña población expresa Olig2, marcador de oligodendrocitos inmaduros.

En nuestro grupo de investigación hemos demostrado que el trasplante de células madre neurales, células endimarias (epSPCs) y oligodendrocitos prediferenciados (OPCs) de una rata lesionada provoca una recuperación de la función motora cuando son trasplantadas en fase aguda, inmediatamente tras lesión [112].

El tipo de modelo animal, el momento del trasplante y el tipo de lesión también afectan a la recuperación, y aunque la comunidad científica apuesta por las NSCs considerando su efectividad y su menor capacidad de generar tumores en comparación con las células embrionarias, una caracterización de las NSCs adultas y su aplicación en las diferentes lesiones espinales son necesarios para incrementar los estudios traslacionales [26].

En mamíferos superiores, incluidos los humanos, la proliferación de dichas células tiene lugar principalmente en el periodo embrionario y post-natal [120] pero la presencia de epSPCs en la médula adulta sugiere que los mecanismos endógenos pueden ser empleados en la reparación de lesiones medulares también en el individuo adulto.

#### **6.2.5.1. Neurogénesis**

Durante el desarrollo embrionario, las células neuroepiteliales que están conectadas con el lumen del tubo neural (zona ventricular germinal) inician la diferenciación y migración en el sistema nervioso central [121]. En el sistema nervioso del ratón, la mayoría de las neuronas se forman entre los estadios embrionarios E10 y E13. El destino neural es promovido por ciertos factores de transcripción básicos hélix-loop-helix (bHLH) que activan la cascada de los genes neuronales que mantienen el ciclo celular de la gliogénesis [122].

En el cerebro adulto la neurogénesis ocurre principalmente en dos regiones: en el giro dentado del hipocampo y en la zona subventricular. La neurogénesis implica a un pequeño número de células, particularmente del giro dentado, y puede ser modulado por estímulos ambientales, factores tróficos, tratamientos farmacológicos y varias condiciones fisiopatológicas como enfermedades neurológicas. La existencia de células madre en el cerebro adulto sugiere que existe un potencial para la autoreparación y que las células neurales recién nacidas contribuyen al funcionamiento del sistema nervioso central [56, 57].

La neurogénesis adulta está muy relacionada, tanto en pacientes como modelos animales, con patologías neurológicas como depresión, epilepsia, enfermedad de Parkinson o de Huntington [123]. Aun así, existen muchas controversias y debates sobre la regulación de la neurogénesis adulta en enfermedades neurológicas, particularmente en estudios en los que se utiliza el marcador BrdU para estudiar la neurogénesis. El BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora al ADN de las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular y se utiliza como marcador de la proliferación. Resulta ser un compuesto tóxico que produce muerte celular, formación de teratomas, altera la estabilidad del ADN, alarga el ciclo celular y posee efectos mitogénicos. Así, el BrdU podría ser utilizado como marcador de síntesis de ADN pero no como marcador de proliferación celular [59].

Otro factor a tener en cuenta y común a muchas de las patologías neurológicas comentadas es la neuroinflamación. Las moléculas liberadas por las células inmunitarias, como las interleuquinas o el óxido nítrico, regulan negativamente la neurogénesis adulta y forman parte de la base de los mecanismos moleculares de las reacciones inflamatorias en la neurogénesis adulta. Por tanto, la regulación de la neurogénesis adulta durante el proceso inflamatorio puede contribuir con la actividad de las enfermedades neurológicas.

Por otra parte, las células madre y los progenitores neurales expresan receptores y responden a factores tróficos y citoquinas. De esta forma, el momento del trasplante en enfermedades cerebrales o tras un daño es crítico para el éxito de la terapia celular. Estudios revelan que las células madre y los progenitores neurales promueven la neuroprotección mediante un mecanismo inmunomodulador [124]. Y, por otra parte, la interacción de dicha células con el sistema inmune sugiere que los estudios preclínicos no deberían realizarse en modelos animales inmunodeprimidos [58].

### 6.2.5.2. Diferenciación

La diferenciación de las células del sistema nervioso es un proceso con diversos pasos en el que se incluye la proliferación, la migración y la finalización. La formación de nuevas neuronas (neurogénesis) conlleva el crecimiento de neuritas, la formación de la sinapsis y la apoptosis. Se estima que el sistema nervioso humano tiene cientos de neuronas diferentes pero las células gliales como los astrocitos y los oligodendrocitos mielinizantes o las células de Schwann en el sistema nervioso periférico siguen siendo las células más abundantes en el sistema nervioso adulto [122].

Uno de los factores de transcripción esenciales en la diferenciación neural tanto del sistema nervioso central como el sistema nervioso periférico es Mash1 [81]. Otro importante grupo de factores neurogénicos son Ngn1 y Ngn2, que definen las distintas poblaciones progenitoras. De hecho, ambos en conjunto, son suficientes para iniciar la diferenciación celular [125], aunque son muchos los factores implicados en la diferenciación, por ello nos centraremos en la diferenciación en astrocitos y en oligodendrocitos.

La mayoría de los astrocitos son producidos en segundo lugar durante el periodo E12 y P0 del ratón. Tanto astrocitos como oligodendrocitos provienen de los mismos progenitores que son progresivamente restringidos. Los progenitores gliales restringidos (GRP) surgen directamente de las NSCs y pueden generar dos tipos diferentes de astrocitos y los oligodendrocitos [82].

En el Sistema Nervioso Central, factores como Notch, CNFT, LIF y BMP-2 intervienen en las decisiones gliales. Notch promueve el mantenimiento de las NSCs y la gliogénesis activando diferentes factores de transcripción, mientras BMP-2 y LIF inducen la diferenciación astrocítica activando otros factores de transcripción. También se ha visto que Ids previene la diferenciación prematura de neuronas y oligodendrocitos pero no la diferenciación astrocítica [88] [89].

Por otra parte, la formación de los oligodendrocitos ocurre tarde en el desarrollo iniciándose a los 16 días de la gestación y finalizando después del nacimiento, cuando las conexiones sinápticas están establecidas. De todas formas, progenitores de oligodendrocitos pueden ser encontrados a los 11 días de gestación en el ratón [102].

Los precursores de oligodendrocitos son los primeros localizados en la parte ventral del tubo neural en desarrollo y se ha visto que expresan factores de crecimiento  $\alpha$  derivados de plaquetas (PDGFR $\alpha$ ) y posteriormente expresan NG2 seguido de Olig 2 y un antígeno de oligodendrocito inmaduro O4. El factor de transcripción SOX10 está implicado en la diferenciación oligodendrocítica y se expresa en los precursores y durante todo el desarrollo [103].

# Hipótesis y Objetivos

La lesión medular es la principal causa de parálisis, estimándose unos 2,5 millones de personas afectadas, con más de 130.000 casos cada año en todo el mundo. Hasta el momento no hay terapias efectivas [108].

La lesión medular se caracteriza por ser un proceso heterogéneo tanto en su causa como en su desarrollo, pudiendo ser provocada por contusión, compresión, penetración o, incluso, maceración de la médula espinal. Los accidentes de tráfico son las causas más habituales, y habitualmente es la contusión la forma en la que más comúnmente se producen [26].

Los procesos que tienen lugar tras la lesión incluyen la muerte de neuronas, oligodendrocitos, astrocitos, así como la formación de cavidades que pueden interrumpir las vías axonales ascendentes y descendentes. A su vez, los efectos secundarios a la lesión, con un componente inflamatorio muy agresivo, provocan apoptosis de oligodendrocitos, demielinización o citotoxicidad por exceso de neurotransmisores, entre otros, culminando el proceso en la formación de una cicatriz glial que resulta ser impenetrable para los axones y que, además, contiene inhibidores moleculares del crecimiento axonal [32].

A pesar de estos efectos, existe cierta recuperación espontánea debida a la proliferación de nuevos precursores neurales en el canal ependimario, células ependimarias (epSPC), de la médula espinal. Como hemos comentado en la introducción, las epSPC, rápidamente proliferan, migran y se diferencian para regenerar la actividad neuronal en vertebrados inferiores tras una lesión medular[126], por ello la presencia de epSPCs en la médula adulta sugiere que los mecanismos endógenos pueden ser empleados en la reparación de lesiones medulares también en el individuo adulto.

Estudios previos, en un modelo de roedor, de lesión medular aguda, muestran que el trasplante de esta población mejora significativamente la recuperación de la función motora. Estos datos demuestran que la modulación de epSPCs endógenas representa una estrategia viable para la recuperación funcional en pacientes con daño medular[112].

Sin embargo, los estadios crónicos de una lesión medular, con recuperaciones espontáneas muy limitadas, resultan un problema clínico sin resolver.

Esta tesis explora el potencial regenerador del trasplante de epSPC en un modelo de lesión medular crónico en rata adulta, ofreciendo una alternativa terapéutica al escenario menos favorecedor, y menos explorado por la comunidad científica.

Para la consecución de esta hipótesis de trabajo, se definieron los siguientes objetivos:

1. Desarrollar un modelo de lesión medular crónica por contusión traumática severa en rata adulta:

Es necesario un modelo consistente y reproducible que permita comparar las distintas variables en los tratamientos a estudiar, con una depurada técnica quirúrgica y un seguimiento comportamental de la actividad locomotriz y reflejos neurológicos desde el momento de la lesión hasta que se haya establecido el proceso de cronicidad de la lesión.

Con el objeto de mejorar el conocimiento en los procesos histológicos, celulares y moleculares que concurren en el estado crónico de la lesión medular, es necesario el estudio exhaustivo a nivel histológico e inmunohistoquímico a diferentes estadios tras la lesión medular.

Estos estudios permitirán establecer los tiempos óptimos de intervención así como pronosticar su evolución y a diseñar sucesivas estrategias terapéuticas.

2. Trasplante de precursores neurales adultos de origen endimario (epSPC) en el modelo de lesión medular crónica:

Por una parte, valorando la eficiencia funcional del trasplante intramedular de epSPCs activadas (desde donantes con lesión medular) en lesiones medulares cronificadas. Incluyendo, como parte del tratamiento coadyuvante, sesiones de rehabilitación, pasiva y activa (treadmill y piscina).

Y por otra, valorando la regeneración de vías axonales largas. Estudiando, a su vez, la actividad locomotriz como fiel reflejo de la actividad neuronal durante tiempo suficiente como para garantizar la valoración de actividad funcional regeneradora.

3. Análisis de los mecanismos de acción celular y molecular del trasplante post-mortem, con estudios:

-Estudios Histológicos: Con el fin de evaluar en el modelo de lesión crónica, la extensión de la degeneración del tejido medular y la pérdida de la arquitectura normal del cordón medular, en el grupo control y el grupo trasplante.

-Estudios Inmunohistoquímicos:

i) analizando la extensión de la cicatriz glial;

ii) valorando la proyección y/o degeneración de tractos neuronales;

iii) identificando la invasión y proceso lesivo de células inflamatorias;

iv) estudiando la capacidad de invasión, migración y supervivencia del trasplante;

v) describiendo el comportamiento fenotípico, frente al trasplante, de poblaciones endógenas (oligodendrocitos, precursores neurales, astrocitos, microglía y neuronas)

# Estrategia Experimental



## **Generación del Modelo Animal**

- 40 Ratas SD
- Lesión medular por contusión (IH Impactor)
- Valoración funcional (BBB test)
- Duración: 6 semanas

## **Trasplante epSPCi**

- Obtención epSPCis
- Trasplante epSPCis IM
- Valoración funcional (BBB test y Catwalk)
- Rehabilitación activa y pasiva diaria
- Duración: 16 semanas

## **Estudios funcionales y moleculares**

- Estudio de la función locomotora
- Estudio macroscópico y estructural de la médula espinal
- Estudio inmunohistoquímico de actividad celular
- Estudio de la regeneración axonal

# Material y Métodos

## **1. GENERACIÓN DEL MODELO ANIMAL DE LESIÓN MEDULAR CRÓNICO**

Se utilizaron 40 hembras Sprague-Dawley de 150-190gr para generar el modelo animal de lesión crónica. Todos los animales procedían de un centro de cría autorizado y su control sanitario fue negativo a todos los patógenos siguiendo las recomendaciones de FELASA (Federation of Laboratory Animal Science Associations).

El procedimiento fue aprobado por el Comité de Ética y Experimentación Animal del CIPF siguiendo la normativa vigente. Todos los animales fueron alojados en condiciones de estabulación SPF (Specific Pathogen Free) en la que fueron mantenidos en racks ventilados con alimentación y bebida autoclavada, y condiciones de iluminación y ventilación controladas.

### **1.1. LESIÓN MEDULAR TRAUMÁTICA:**

La lesión medular fue generada por contusión mediante el uso de un contusor con software incorporado (Infinity Horizon Spinal Cord Impactor®, Precision Systems Instrumentation, Burke, USA) según se describe en A Alastrue y colaboradores [127]. Los animales fueron premedicados con 2.5mg/kg morfina (Cloruro Mórfico 2%®, BBraun Medical, Barcelona, España) administrada por vía subcutánea (SC). La anestesia se realizó por vía inhalatoria, tanto inducción como mantenimiento, con Isoflurano (IsoVet®, BBraun VetCare, Barcelona, España). Se previno la aparición de úlceras corneales mediante la aplicación de gel oftálmico (Lipolac, Angelini Farmacéutica, Barcelona, España) y se preparó el campo quirúrgico desinfectando la superficie con solución antiséptica de clorhexidina digluconato al 5% (Desinclor Solución, AGB, Madrid, España). Se realizó un abordaje dorsal a la columna vertebral a nivel torácico para obtener un campo quirúrgico entre la vertebras T7 y T10, permitiéndonos abordar la médula espinal mediante una laminectomía entre T8-T9 (Imagen 7).

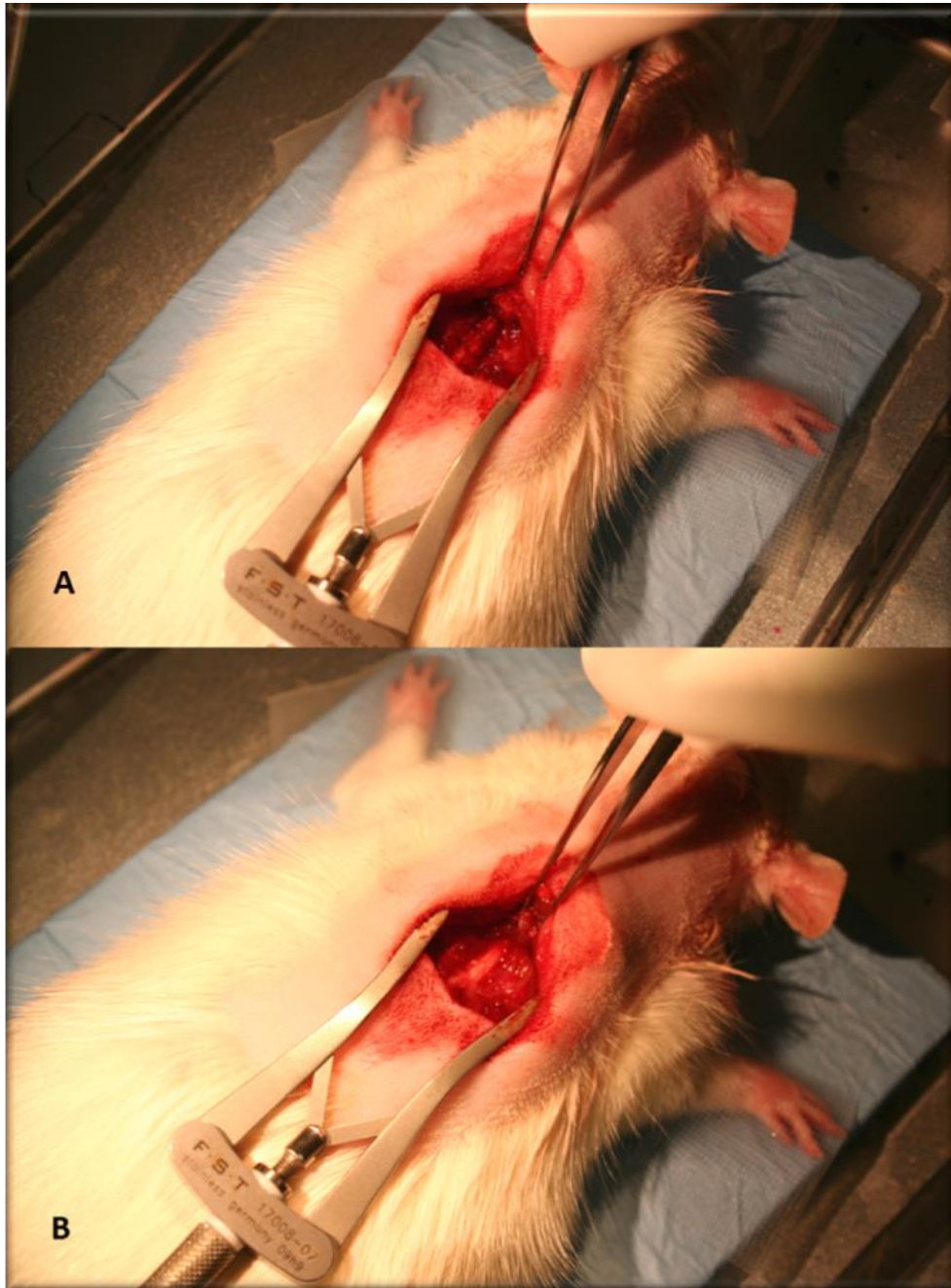


Imagen 7: Abordaje dorsal a la médula espinal (A) y laminectomía realizada para exponer la médula espinal (B)

Una vez expuesta la vértebra T8, se sometió al impacto de 250 kdyn programado con el IH Spinal Cord Impactor (Imagen 8). Para ello, se procedió a la sujeción de la columna vertebral fijando la T9 y la T7 con unas pinzas Adson con dientes incluidas en los brazos articulados del IH Impactor tal y como se describe en la imagen 9. De esta forma, se evita la oscilación y la variabilidad asociada al movimiento de la columna en el impacto y se estandariza la contusión. Una vez fijada, se procedió al impacto controlado por el software del sistema fijado en una fuerza de contusión tras choque con tejido blando de 250 kdyn.

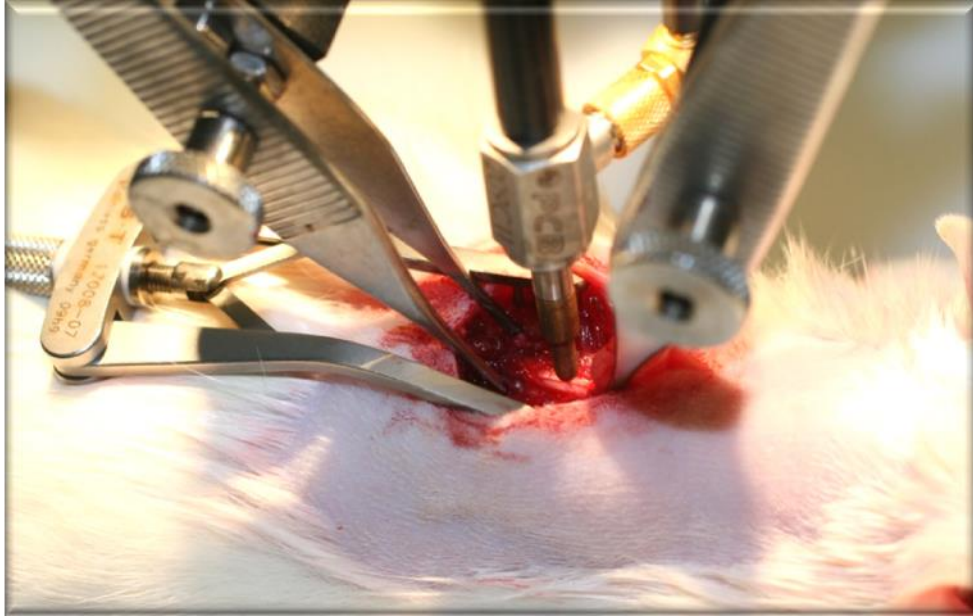


Imagen 8. Exposición de la médula espinal tras laminectomía dorsal T7-T10 y sujeción por el sistema del IH Spinal Cord Impactor.

Tras el impacto de la pesa se observó la aparición de un hematoma transversal confirmando así, una lesión medular severa (según experiencia previa). A su vez, se comprobaron y se registraron las gráficas de desplazamiento y fuerza producidas por el software del IH Spinal Cord Impactor, confirmando la fuerza y el desplazamiento real de la pesa generado para cada caso (Imagen 10).

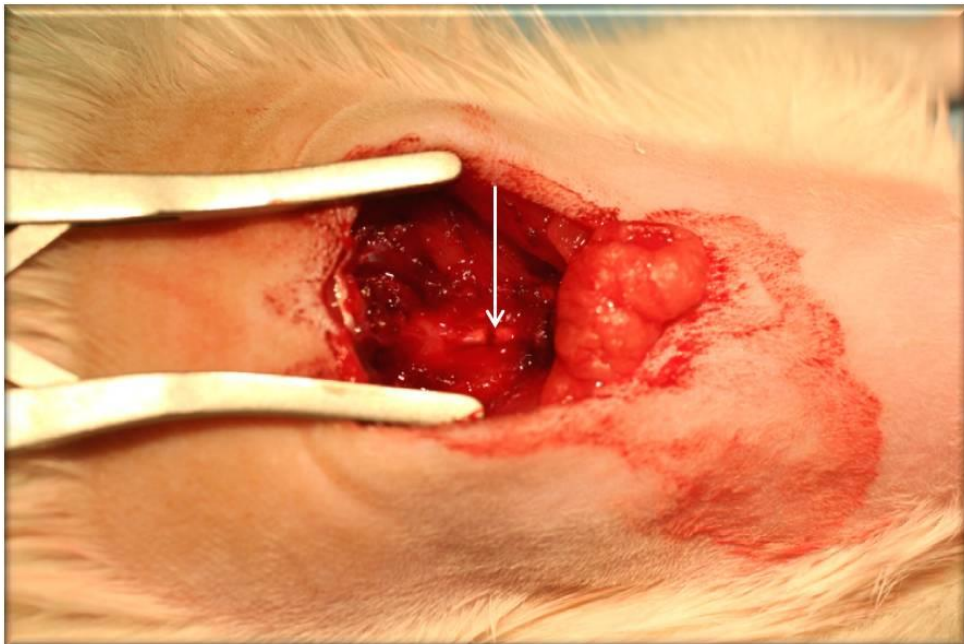


Imagen 9: Hematoma transversal tras la contusión.

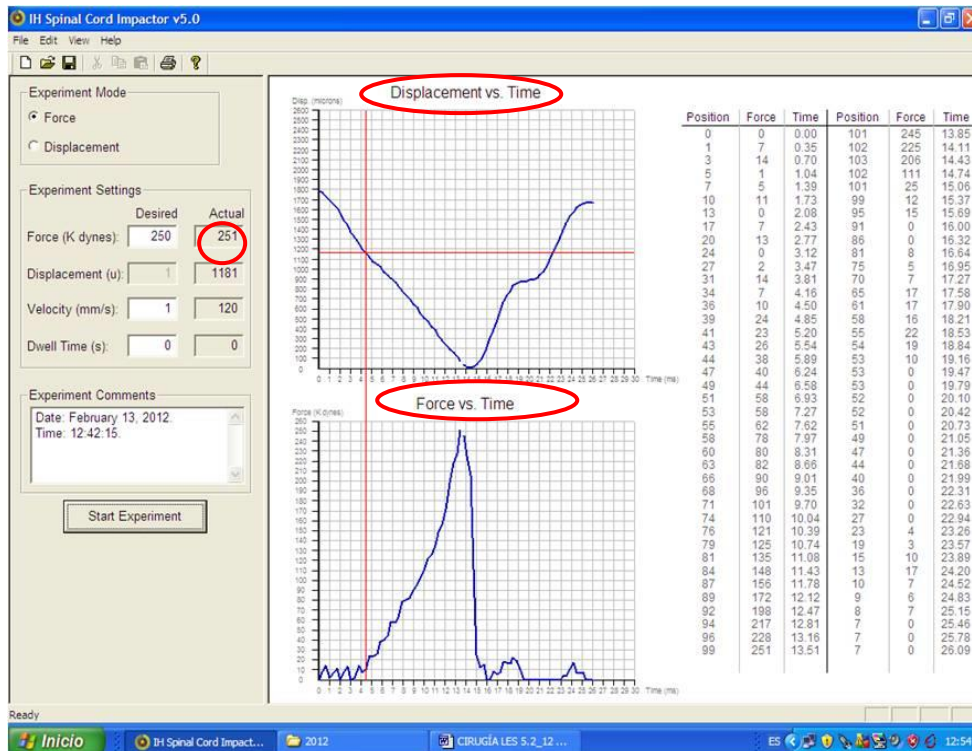


Imagen 10: Graficas de desplazamiento y fuerza obtenidas tras realizar la contusión con el IH Spinal Cord Impactor.

Previo cierre por planos se colocó un sustituto de duramadre, Goretex (Gorepreclude® Dura Substitute, GoreMedical, Putzbrunn, Deutschland) (Imagen 11) para proteger la médula de posibles adherencias debidas a la ausencia de las apófisis espinosas de T8 y T9 tras laminectomía, aunque en ningún caso se rompió duramadre. La musculatura y el tejido subcutáneo se cerró con sutura reabsorbible de 4/0 (Monosyn®, BBraun VetCare, Barcelona, España) y la piel con pegamento quirúrgico (Histoacryl®, BBraun Aesculap, Tuttlingen, Alemania).





Imagen 11: Colocación del sustituto de duramadre tras la lesión.

Posteriormente, se mantuvieron en la cámara de recuperación con temperatura controlada hasta su total recuperación anestésica.

Se les administró 0.1 mg/kg de buprenorfina (Buprex®, RB Pharmaceuticals Limited, Berkshire, UK) SC dos veces al día durante días y 5mg/kg de enrofloxacin (Alsir®2.5%, Esteve Veterinaria, Barcelona, España) SC 1 vez al día durante una semana. También se les administró un suplemento vitamínico (Glucolyte®, BBraun VetCare, Barcelona, España) diluido en el agua de bebida con el fin de favorecer la recuperación en el postoperatorio.

A su vez, se sometió a los animales a la maniobra de Credé [128] para el vaciado vesical dos veces al día hasta la recuperación del reflejo de vaciado (generalmente entre la segunda y tercera semana tras la lesión medular). La maniobra consiste en un vaciado manual aplicando presión abdominal en dirección caudal para facilitar el vaciado. En ese proceso es muy importante controlar la presión ejercida con el fin de evitar mayores lesiones que compliquen el postoperatorio y el estado del animal.

Durante los primeros días de postoperatorio, los animales se estabularon de forma individual y en parejas o tríos durante el resto del estudio facilitando su interacción y el enriquecimiento ambiental entre ellas.

## 1.2. VALORACIÓN FUNCIONAL DE LA ACTIVIDAD MOTORA:

Finalizado el periodo postoperatorio, habitualmente una semana, los animales fueron valorados mediante la escala BBB [72] desarrollada con el objetivo de estudiar la secuencia de los patrones de recuperación de actividad locomotora. De esta forma, se valoraba el grado de severidad de la lesión generada y la evolución de la misma.

Así, todos los animales fueron valorados en campo abierto siguiendo las directrices publicadas en 1995 para estudiar la secuencia de los patrones de recuperación de la actividad locomotora [72]. Esta valoración consiste en la utilización de la escala BBB compuesta por 21 graduaciones (Tabla 3).

BBB SCALE	
0	No se observa movimientos extremidades posteriores (Hind limbs HL)
1	Movimiento ligero (menos de la mitad del rango) de una o dos articulaciones, normalmente cadera y/o rodilla
2	Movimiento extenso (mas de la mitad del rango) de una art o movimiento extenso de una art y parcial de la otra
3	Movimiento extenso de dos articulaciones
4	Movimiento ligero de las tres articulaciones de la HL
5	Movimiento ligero de dos art y extenso de la tercera
6	Movimiento extenso de dos art y ligero de la tercera
7	Movimiento extenso de las 3 articulaciones
8	"sweeping (movimiento hacia delante y detrás)" sin soporte peso o posición plantar de la pata sin soporte de peso
9	Posición plantar de la pata con soporte de peso sólo en fase de apoyo o stepping dorsal ocasional, frecuente, o consistente (andan con la Superficie dorsal de la pata) con soporte peso y no stepping plantar
10	Pasos con soporte peso plantar ocasional: no hay coordinación FL (fore limbs)-HL
11	Frecuente- consistente soporte peso y pasos plantares y no coordinación FL-HL
12	Frecuente- consistente soporte peso y pasos plantares y ocasional coordinación FL_HL
13	Frecuente- consistente soporte peso y pasos plantares y frecuente coordinación FL_HL
14	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistente y la posición durante la locomoción de la pata es rotada (interna o externa) cuando se hace el contacto inicial con la superficie y también cuando empieza la fase de oscilación al final del apoyo; o stepping plantar frecuente, consistente coordinación FL_HL y ocasional stepping dorsal.
15	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistente no hay clearance de los dedos o es ocasional durante el avance de la extremidad; La posición predominante de la pata es paralela al cuerpo en el contacto inicial
16	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistent, hay clearance de los dedos frecuente durante el avance de la extremidad, la posición predominante de la pata al contacto inicial es en paralelo y rotada a inicio de la oscilación
17	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistent, hay clearance de los dedos frecuente durante el avance de la extremidad, la posición predominante de la pata al contacto inicial y al comienzo de la fase de oscilación es en paralelo.
18	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistent, hay clearance de los dedos consistente durante el avance de la extremidad, la posición predominante de la pata al contacto inicial es en paralelo y rotada en la oscilación.
19	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistent, hay clearance de los dedos frecuente durante el avance de la extremidad, la posición predominante de la pata al contacto inicial y al comienzo de la fase de oscilación es en paralelo. La cola esta abajo casi todo el tiempo.
20	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistent, hay clearance de los dedos frecuente durante el avance de la extremidad, la posición predominante de la pata al contacto inicial y al comienzo de la fase de oscilación es en paralelo. Inestabilidad en el tronco; cola arriba consistentemente
21	Pasos plantares consistentes, coordinación FL_HL consistent, hay clearance de los dedos frecuente durante el avance de la extremidad, la posición predominante de la pata al contacto inicial y al comienzo de la fase de oscilación es en paralelo. Estabilidad en el tronco; cola arriba consistentemente

Tabla 3: Tabla de valoración BBB. Adaptada de Basso, Beattie, Bresnahan [72].



La puntuación en la escala BBB se evaluó una vez por semana durante todo el procedimiento. Los animales eran colocados en la plataforma de campo abierto, dejando que los animales pudieran moverse libremente y fueron grabados durante 5 minutos por un observador (Imagen 11).



Imagen 11: Estructura de campo abierto utilizada para valoración de la escala BBB.

Posteriormente eran evaluados por otro observador, siendo este observador el mismo durante todo el procedimiento minimizando, así, la variabilidad del análisis y siendo éste de doble ciego. De forma aleatoria y en aquellos casos en los que la valoración podría conducir a confusión debido a la sutileza de los cambios en el rango de puntuación de la tabla de BBB, un tercer observador se incluyó en el análisis.

## **2. OBTENCIÓN CÉLULAS MADRE EPENDIMARIAS (EPSPCI) ACTIVADAS**

Las células madre endimarias del trasplante se obtuvieron de ratas SD-Tg (GFP) 2BaIRrc adultas y homocigotas para el transgen GFP. Se emplearon un total de 4 hembras donantes. La utilización de esta cepa transgénica, con expresión ubicua de la proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein o GFP) facilita el seguimiento y la localización de las células trasplantadas tras la finalización del estudio in vivo. Para inducir la activación de las epSPC [112] las ratas donantes fueron sometidas a cirugía para generar la lesión medular siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, incluidos el protocolo anestésico y analgésico. Los cuidados postoperatorios se mantuvieron durante 1 semana, periodo tras el cual los animales fueron sacrificados por inhalación de CO<sub>2</sub> para proceder con la disección de la médula espinal lesionada

donante y aislar y amplificar las células endimarias activadas (epSPCi) con expresión de GFP. El protocolo utilizado para la obtención y purificación de las células desde la médula espinal diseccionada fue el siguiente (descrito en[112]):

- Manteniendo la médula en solución de lavado (DMEM/F12 c.s.p., Hepes 1M 0.39%, NaHCO<sub>3</sub> 7.5% al 0.05%, Glucosa 30% al 0.09%, P/S 100x al 0.5X):
- Eliminación de las meninges. Con el fin de evitar la contaminación de fibroblastos en el cultivo se eliminaron las meninges, para lo que se utilizó una lupa asegurando la correcta realización de la técnica.
- Corte de la médula en tres secciones de 1 cm aproximadamente. Separando las tres secciones: Sección craneal a la lesión, sección lesión y sección caudal a la lesión. El cultivo de las diferentes secciones se realiza por separado.
- Manteniendo la médula en solución de lavado, se procede a su digestión de forma mecánica cortando la médula en segmentos de alrededor de 1mm<sup>3</sup>.
- Incubación durante 10 min a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
- Centrifugado a 1200rpm durante 5 minutos. Posteriormente se peletea el producto de la digestión mecánica y se lava en sucesivas centrifugaciones.
- Homogeneizado mecánico con punta de pipeta azul, pipeteando repetidamente 20 veces, con medio completo (DMEM/F12 c.s.p., Hepes 1M 5mM, NaHCO<sub>3</sub> 7.5% al 0.1%, Glucosa 30% al 0.6%, P/S 100X a 1X, L-Glutamina 100X a 1X, Hormona Mix (DMEM/F12 c.s.p., Hepes 1M a 4mM, NaHCO<sub>3</sub> 7.5% a 0.09%, Glucosa 30% a 0.5%, Progesterona 2mM a 0.6nM, Holo-Transferrina a 0.8mg/ml, Putrestina 0.5M a 90 µg/ml, 100x), 10%, Insulina 10mg/µl, BSA2g/10ml a 4mg/ml, Heparina 375UI/ml a 0.7UI/ml).
- Centrifugado a 1200rpm durante 5 minutos. Se repite el proceso de homogeneizado dos veces más.
- Sembrado e incubación a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad durante 1 semana en placas de cultivo cargadas, para facilitar la adhesión a la placa de astrocitos, microglía y fibroblastos. Una semana después, en el cultivo se han formado neuroesferas, como resultado de la amplificación de los precursores neurales. Estos precursores se traspasan a placas de baja adherencia para facilitar su crecimiento en flotación. Durante dos semanas el cultivo se refresca de medio cada tres días, y por centrifugación se elimina secuencialmente los restos de debris procedentes del cultivo primario.

Las células son revisadas y lavadas de forma periódica para valorar su evolución y comprobar la ausencia de contaminación hasta el momento del trasplante (Imagen 12).

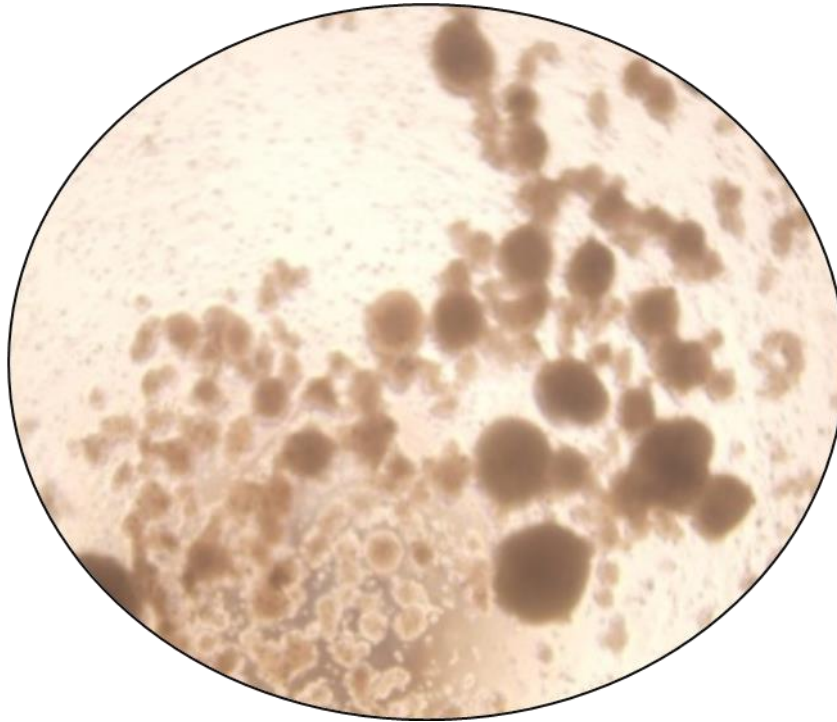


Imagen12: Neuroesferas en cultivo vistas al microscopio.

Las referencias de los productos utilizados en el cultivo fueron las siguientes:

REFERENCIA		
<b>DMEM</b>	L0090-500	Biowest
<b>Hepes</b>	H4034-5006	Sigma-Aldrich
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	55761	Sigma-Aldrich
<b>Glucosa</b>	67021	Sigma-Aldrich
<b>L-Glutamina</b>	BE17-605E	Lonza
<b>Hormona Mix</b>	59133	Sigma-Aldrich
<b>Insulina</b>	79278	Sigma-Aldrich
<b>BSA</b>	10735078001	Roche
<b>Heparina</b>	6286692	Hospira
<b>Progesterona</b>	P6149	Sigma-Aldrich
<b>Holo- Transferrina</b>	T0665	Sigma-Aldrich
<b>Putrestina</b>	P7505	Sigma-Aldrich

### 3. TRASPLANTE INTRAMEDULAR DE EPSPCI

Para la realización del trasplante, entre 5 y 6 semanas tras la cirugía de lesión medular, los animales fueron anestesiados siguiendo el mismo protocolo descrito en la cirugía de lesión medular.

Se realizó un abordaje dorsal a la columna en la misma zona donde se había realizado la lesión (T7-T10). En el abordaje nos encontramos adherencias musculares y neoformación ósea que dificultó el acceso para el trasplante intramedular (Imagen 13).

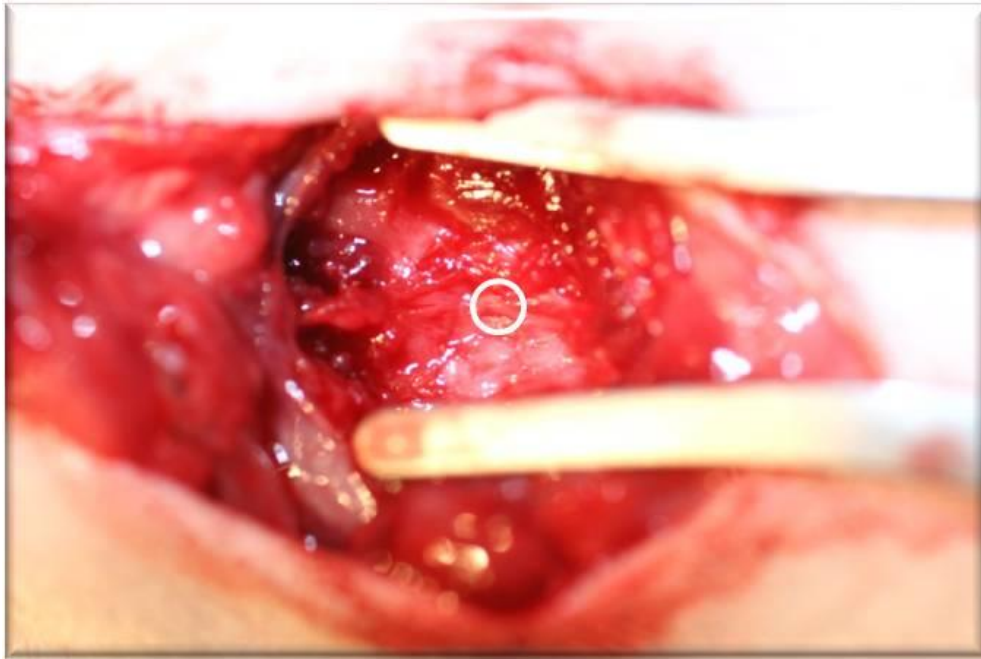


Imagen 13. Abordaje dorsal T7-T10 mes y medio tras la lesión. Obsérvese las adherencias y neoformación ósea.

Localizado el acceso a la zona de la lesión medular, y ayudados por la localización del sustituto de la duramadre colocado en la cirugía de lesión, se procedió al trasplante intramedular. El grupo control recibió 10  $\mu$ l de medio de cultivo, mientras al grupo trasplante se le administró  $10^6$  epSPCi a una concentración de  $10^5/\mu$ l.

Para ello se utilizó una jeringa Hamilton de 25  $\mu$ l (Hamilton Company, Bonaduz, Switzerland) a la que se le acopló una punta de vidrio siliconada con un diámetro de 80  $\mu$ m en la punta. La jeringa Hamilton se coloca en un soporte del sistema estereotáxico unido a un infusor (Pump 11 Nanomite Infusion®, Harvard Apparatus, Holliston, USA) que administrará el volumen final de 10  $\mu$ l a una velocidad de 2  $\mu$ l/min (Imágenes 14 y 15).

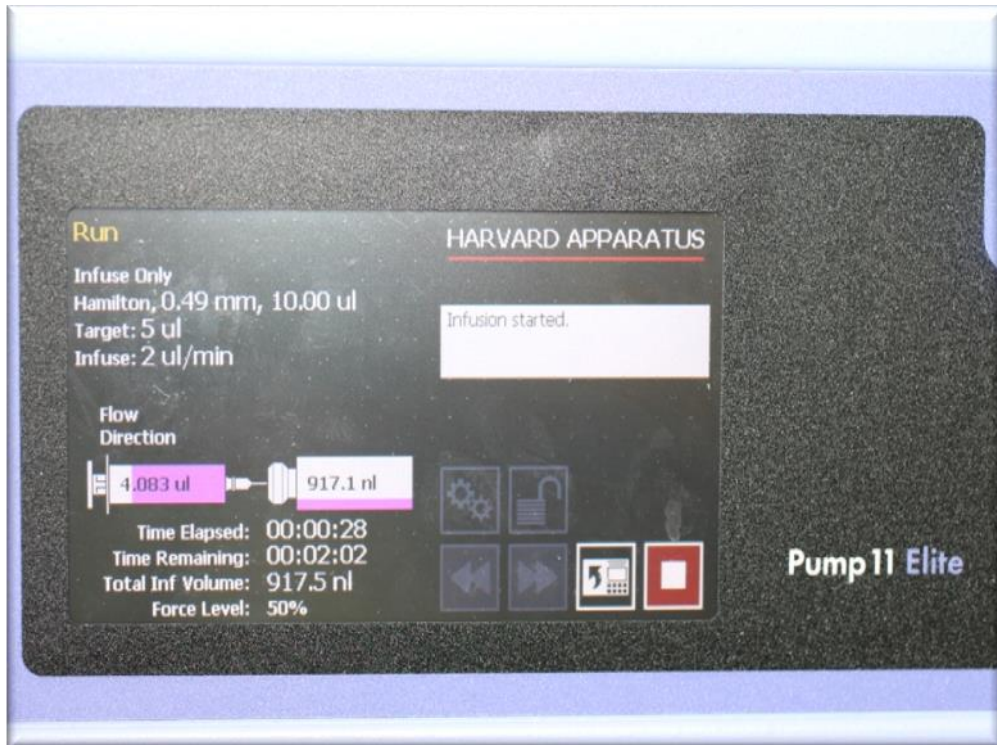


Imagen 14: Infusor utilizado para administrar el volumen adecuado a la velocidad establecida de 2µl/min

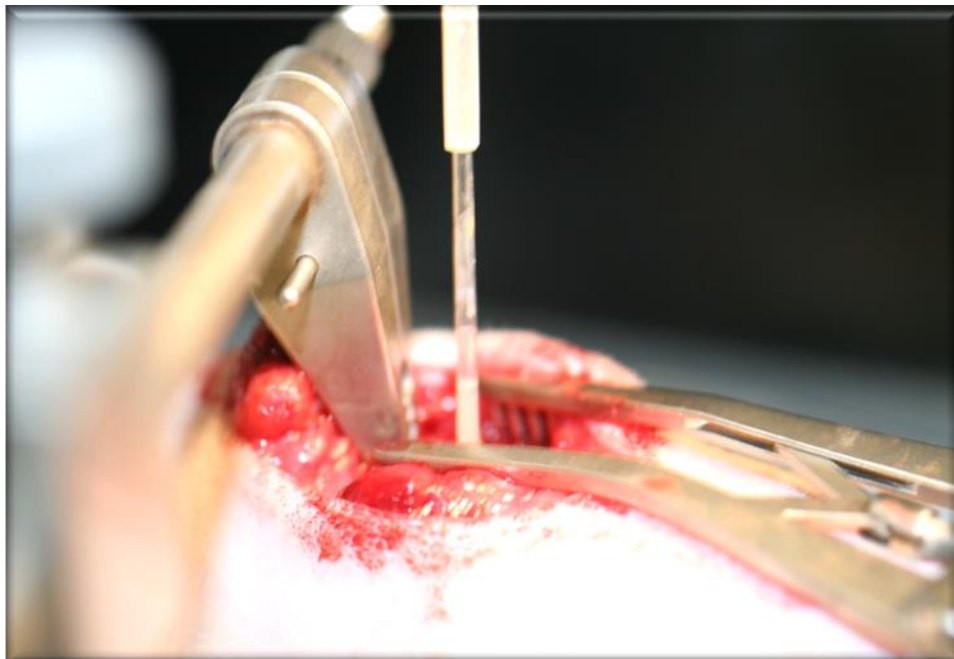


Imagen 15: Trasplante intramedular realizado con punta de vidrio siliconada.

Administradas las células se procedió al cierre por planos del campo quirúrgico siguiendo el mismo protocolo que en la cirugía de lesión medular. La musculatura y el tejido subcutáneo se cerró con sutura reabsorbible de 4/0 (Monosyn®, BBraun VetCare, Barcelona, España) y la piel con pegamento quirúrgico (Histoacryl®, BBraun Aesculap, Tuttlingen, Alemania).

#### **4. CUIDADOS ASOCIADOS AL MODELO ANIMAL**

Todos los animales operados fueron mantenidos en la cámara de recuperación con la temperatura controlada hasta la total reversión de la anestesia.

Se les administró 0.1 mg/kg de buprenorfina (Buprex®, RB Pharmaceuticals Limited, Berkshire, UK) SC dos veces al día durante 3 días y 5mg/kg de enrofloxacin (Alsir®2.5%, Esteve Veterinaria, Barcelona, España) SC 1 vez al día durante una semana.

A su vez, se sometió a los animales a la maniobra de Credé [128] para el vaciado vesical dos veces al día hasta la recuperación del reflejo de vaciado. Esta maniobra no fue necesaria tras el trasplante celular.

A lo largo del estudio algunos animales presentaron erosiones cutáneas e incluso alguna úlcera por presión al encontrarse el tercio posterior lateralizado. En estos casos, los animales fueron tratados con soluciones de clorhexidina (Desinclor Solución, AGB, Madrid, España) y pomada antibiótica y cicatrizante (Blastoestimulina®, Almirall, Barcelona, España) hasta su recuperación.

Cuatro animales se automutilaron las extremidades y/o el abdomen sin mantener un patrón en cuanto al momento de aparición o al grupo al que pertenecían. La gravedad de sus lesiones se consideró un criterio de punto final y fueron eliminados del experimento por medio de inhalación de CO<sub>2</sub>. Estos comportamientos no han podido ser valorados en detalle pero dada la severidad y cronicidad de la lesión generada se sospecha que son debidos a la aparición de dolor neurótico que debería ser estudiado en profundidad en siguientes estudios.

#### **5. REHABILITACIÓN**

Una vez establecido el modelo de lesión medular crónico y realizado el trasplante medular, los animales fueron sometidos a rehabilitación pasiva y activa durante todo el procedimiento.

El Sistema Nervioso de los mamíferos tiene una plasticidad estructural y funcional espontánea, promovida y mejorada por terapias físicas [64] lo que a su vez se asocia con una mejora en la efectividad clínica con reducción del dolor y como consecuencia una mejora en la calidad de vida al reducir el dolor neurótico[129].



La rehabilitación pasiva ejercida en los animales lesionados consistió en la movilización manual de las articulaciones del tercio posterior de ambas extremidades durante 15 minutos 3 veces por semana. Estos movimientos consistieron en la flexión, extensión y rotación interna y externa de las diferentes articulaciones del tercio posterior incluyendo movimientos de aducción y abducción de la articulación de la cadera.

Posteriormente, todos los animales realizaban una movilización activa mediante cinta andadora o Treadmill iniciando la velocidad en 8cm/seg y aumentando hasta 15 cm/seg a lo largo de la progresión del estudio y en función del estado del animal. Los animales lo utilizaron durante 5 minutos en cada sesión de rehabilitación (Imagen 16).



Imagen 16: Rehabilitación activa en treadmill.

También realizaban rehabilitación activa en piscina, dejando nadar libremente a cada animal en agua tibia entre 2-4 minutos (Imagen 17). La rehabilitación activa también se realizó 3 veces por semana.



Imagen 17: Rehabilitación activa en piscina.

## **6. VALORACIÓN DE LA FUNCIÓN LOCOMOTORA TRAS EL TRASPLANTE (EPSPCS/CONTROL): BBB, CATWALK**

Los estudios de valoración de la actividad locomotriz según el test BBB se han comentado ya en apartados anteriores.

También se utilizó el test de la pisada automatizado (Catwalk®, Noldus, Netherlands) para valorar la coordinación de aquellos animales cuya recuperación funcional lo permitía. Es decir, que daban pasos plantares que permitían el uso de este test y en los que, a su vez, el uso de la escala BBB resultaba muy compleja por la sutileza de los detalles valorados.

El Catwalk consiste en un pasillo de plexiglás y paredes oscuras en el que se coloca al animal y donde hacemos que cada animal realice 3 carreras consecutivas a lo largo del pasillo siempre en la misma dirección. Una cámara situada bajo el pasillo graba las pisadas de los animales en cada carrera para ser después analizadas. La grabación se realizaba a oscuras para permitir visualizar los píxeles de las pisadas de los animales.

Se tomaron valores una vez por semana desde el momento del trasplante con el fin de evaluar el proceso de recuperación funcional, aunque muchos animales no alcanzaron la recuperación funcional necesaria para poder realizar dicho test de forma efectiva (Imágenes 18, 19 y 20).





Imagen 18: Imagen ilustrativa del sistema automatizado de la pisada (Catwalk) <http://www.noldus.com/CatWalk-XT/specifications>.

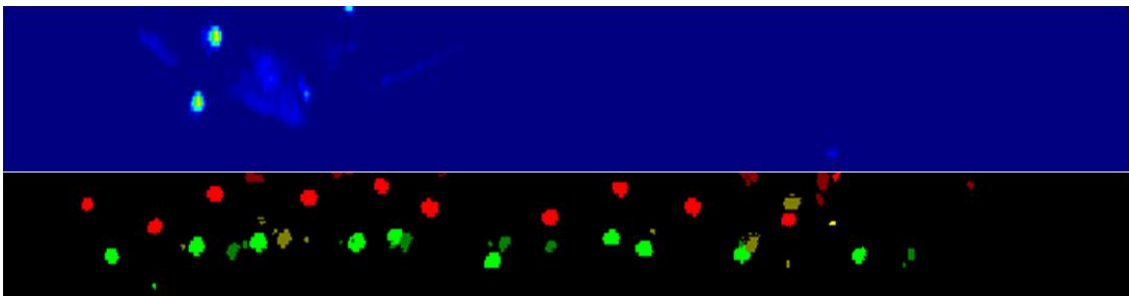


Imagen 19: Imagen obtenida al analizar la pisada de un animal capaz de caminar con recuperación funcional adecuada. En la imagen superior se observa una vista desde debajo de la superficie sobre la que camina el animal. Obsérvense las extremidades anteriores en verde y el cuerpo sombreado en azul. En la imagen inferior se aprecia cómo se desplaza con las cuatro extremidades sin apoyar otras estructuras.

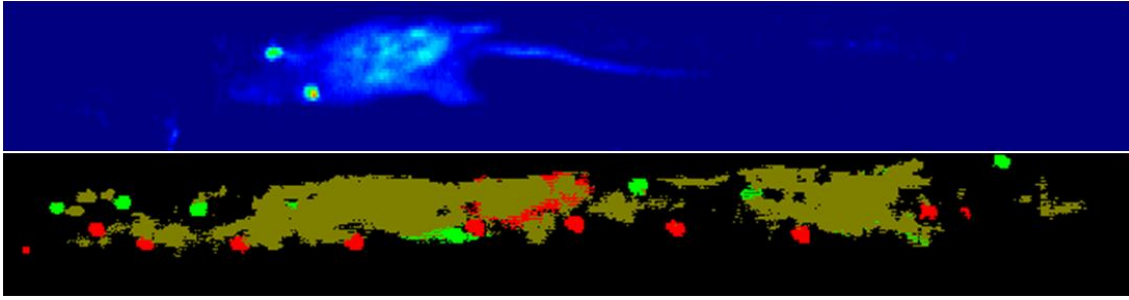


Imagen 20: Imagen obtenida al analizar la pisada de un animal con recuperación funcional insuficiente. En la imagen superior se observa una vista desde debajo de la superficie sobre la que camina el animal. Obsérvense las extremidades anteriores en verde y el cuerpo sombreado en azul con un apoyo en la zona central donde se localiza el abdomen. En la imagen inferior se aprecia cómo se desplaza con las cuatro extremidades apoyando otras estructuras, principalmente el abdomen y la cola, y sin apoyo de las extremidades posteriores.

Se valoró la utilización de otros test de comportamiento para valorar la recuperación funcional como grid-walking, narrow beam y el plano inclinado, pero el grado de afección de los animales y la falta de entrenamiento previo no permitió realizarlos.

## **7. VALORACIÓN DE REGENERACIÓN AXONAL (BIOTINILATED AMINE DEXTRAN)**

Una semana antes de la finalización de la fase in vivo, una semana antes de los cuatro meses tras el trasplante, se inyectó el trazador axonal Biotinilated Amino Dextran (BDA) para poder detectar el trazado axonal presente y valorar así la potencial regeneración axonal en los animales control versus animales trasplantados.

Los animales fueron anestesiados siguiendo el mismo protocolo utilizado en las anteriores cirugías. Igualmente fueron mantenidos en la cámara de recuperación con la temperatura controlada hasta la total reversión de la anestesia y recibieron los oportunos cuidados postoperatorios y analgésicos. Se les administró 0.1 mg/kg de buprenorfina (Buprex®, RB Pharmaceuticals Limited, Berkshire, UK) SC dos veces al día durante 3 días.

Se realizó un abordaje a la corteza cerebral accediendo por la línea media y tomando como referencia el bregma (Imagen 21).

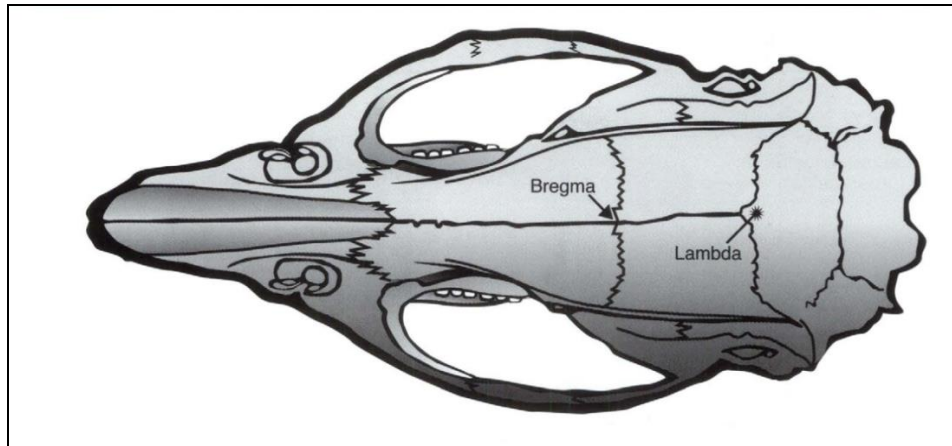


Imagen 21: Vista dorsal del cráneo de una rata adulta de unos 290 gr[3].

Posteriormente se realizaron 4 trepanaciones en la corteza motora con las coordenadas siguientes:

	Craneal	Lateral
+	1.5	2
-	1.5	1.5

Seguidamente se inyectaron 0,5  $\mu$ l BDA (Biotinilated Amino Dextran) al 10% (10.000MW, Invitrogen) a 5mm de profundidad con una jeringa Hamilton (Hamilton Company, Bonaduz, Switzerland) de 30G y un infusor automático (Pump 11 Nanomite Infusion<sup>®</sup>, Harvard Apparatus, Holliston, USA) a una velocidad de 2  $\mu$ l/min.

Posteriormente, se cerró la piel con sutura reabsorbible de 4/0 (Monosyn<sup>®</sup>, BBraun VetCare, Barcelona, España).

La imagen 22 muestra las señales obtenidas tras el revelado del trazador en un animal control. La marca encontrada mostró una amplia zona de no marcaje, identificando una extensa área de interrupción en el transporte axonal y con gran dispersión interindividuo. El número de animales destinados a este estudio neuroanatómico resultó insuficiente, debido a la gran dispersión obtenida, como para realizar comparaciones entre grupos, quedando esta parte del análisis pendiente de mejorar en próximos experimentos.

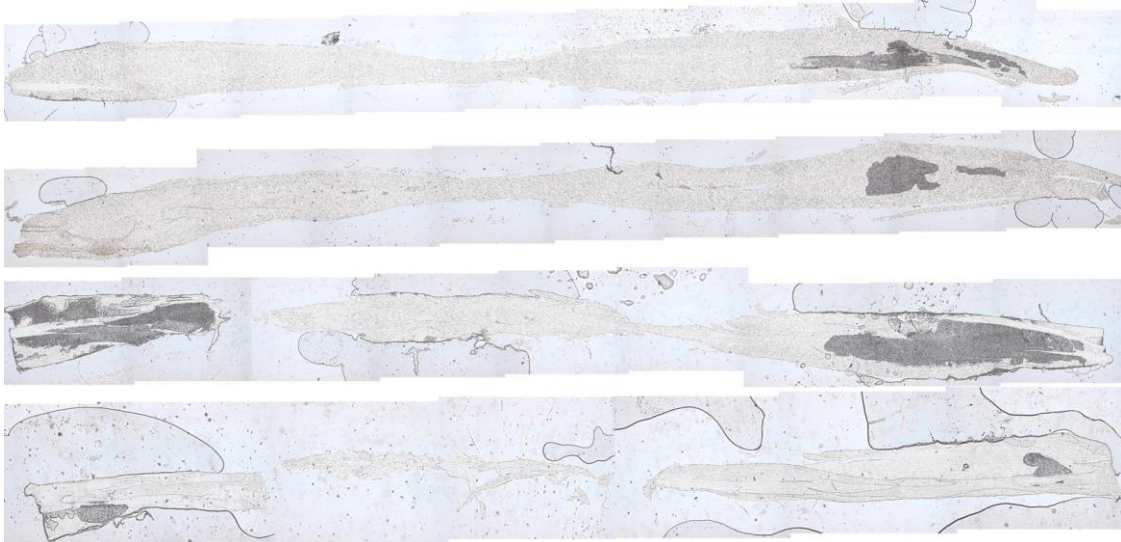


Imagen 22: Secciones longitudinales con marcación del trazador BDA. Obsérvese en gris los depósitos de níquel que identifican tejido axonal.

## 8. ESTUDIO HISTOLÓGICO: NEUROANATÓMICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS

El estudio histológico implicó la obtención de muestras por diferentes métodos.

Para los estudios histológicos en los que se realizó un estudio macroscópico de la estructura con la tinción Hematoxilina/Eosina y un estudio inmunohistoquímico de las propias células trasplantadas, así como de indicadores de regeneración o diferenciación, los tejidos fueron fijados mediante perfusión con paraformaldehído (PFA) al 4%.

Para los estudios de microscopía electrónica los tejidos se fijaron mediante perfusión con glutaraldehído al 2%.

Las muestras obtenidas tras perfusión de tejidos se obtuvieron siguiendo el protocolo siguiente:

- Se anestesian los animales con 80 mg/kg de pentobarbital (Dolethal®, Vetoquinol, Lure, Francia) y 0.05mg/kg de fentanilo (Fentanest®, KernPharma, Barcelona, España) administrados de forma intaperitoneal.
- Se realiza un abordaje torácico y se expone el corazón.
- Se coloca una palomilla (Venofix®, BBraun VetCare, Barcelona, España) de 25 G en el ventrículo izquierdo y se incide la aurícula derecha para facilitar la salida de los fluidos.
- Se administra solución salina al 0,9% o PBS 1X. La velocidad de perfusión de los líquidos de lavado influirá en la correcta fijación de los órganos

estimándose un tiempo mínimo de 10 a 30 minutos. El volumen aproximado son 250 ml.

- Administración de PFA al 4% o Glutaraldehído al 2% en función de las técnicas a realizar posteriormente. Se estima mismo tiempo mínimo (20 minutos) y mismo volumen de administración.

Para la administración de las diferentes soluciones se utiliza una bomba de infusión que facilite la entrada de líquidos.

Las médulas obtenidas por perfusión de PFA 4% fueron neuroprotegidas previa congelación en medio OCT (Optimum Cutting Temperature) (Tissue-Tek® OCT, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, The Netherlands) siguiendo el siguiente protocolo:

- Mantenimiento en PFA (Millipore) 4% a 4°C durante 24h
- Eliminación de las meninges
- Mantenimiento en Sucrosa(Sigma-Aldrich) 10% a 4% durante 24h
- Mantenimiento en Sucrosa 20% a 4% durante 24h
- Mantenimiento en Sucrosa 30% a 4% durante 24h
- Inclusión en matriz criopreservante, OCT formando un bloque a -20°C
- Conservación a -80°C

Para la inclusión en OCT las médulas fueron seccionadas reduciendo su tamaño a unos 2 cm de forma que se incluyera la zona de la lesión, una zona craneal y una zona caudal a la misma.

Se utilizó un criostato (HM505E, Microm, Walldorf, Germany) para cortar las muestras. Los cortes se realizaron de forma longitudinal a 10µm de espesor, siguiendo un patrón de series para poder rastrear gran parte de la médula en un solo portaobjetos. De esta forma, se realizaron 5 series de cortes consecutivos incluyendo en cada porta 4 cortes de tejido, hasta finalizar todo el tejido (Imagen 23):

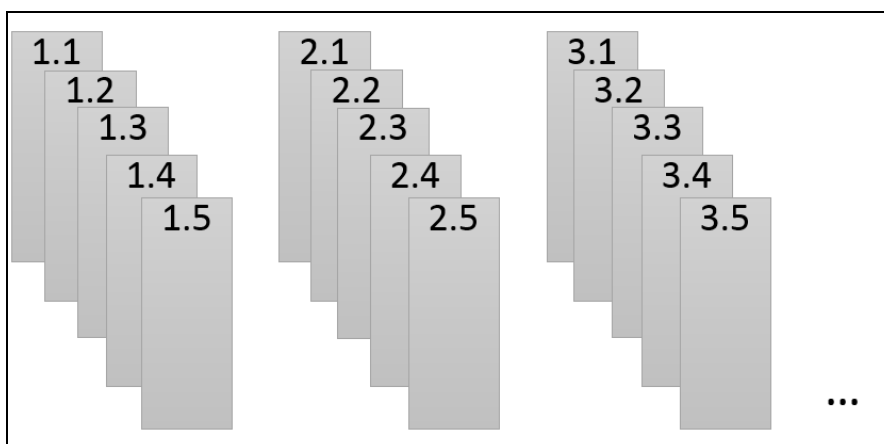


Imagen 23: Esquema ilustrativo de las series de cortes realizadas para rastrear la médula espinal de estudio.

Las médulas obtenidas por perfusión de glutaraldehído al 2% fueron incluidas en bloques de araldita, siguiendo el protocolo de inclusión habitual del Servicio de Microscopía electrónica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia):

- Lavado con PB0.1 M.

- Añadir Tetraóxido de Osmio (2%) en PB 0.1M. Para ello se mezcla el Osmio al 4 % (solución stock) con PB 0.2 M en relación 1:1. Dejar entre 1- 1:30 h en oscuridad a temperatura ambiente.

- Preparar la araldita (Durcupan ACM®, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA). Las cantidades de cada componente son las siguientes:

Componente A → 10 ml

Componente B → 10 ml

Componente D → 0.4 ml

Componente C → 0.4 ml

De este momento en adelante, los baños se realizan en nevera a 4 °C:

- Lavar con H<sub>2</sub>O → 3 x 5´

- EtOH 30° → 1 x 5´

- EtOH 50 → 1 x 5´

- EtOH 70° → 2 x 5´

- Añadir Acetato de Uranilo 2% en EtOH 70°. Disolver con ultrasonidos. → 2 h  
30´ Mantener en nevera y en oscuridad.

- EtOH 70° → 2 x 5´

- EtOH 96° → 2 x 10´

- EtOH 100° → 2 x 10´

- EtOH 100° (purísimo) → 1 x 10´

- Oxido propileno → 2 x 10´

- Pasar las muestras a moldes de papel de plata con araldita y dejar toda la noche en agitación a Tª ambiente.

- Al día siguiente por la mañana (no dejar más tiempo porque la araldita comienza a polimerizar) se pasan las muestras a los moldes definitivos y se ponen en la estufa a 70°C durante al menos 2 días.

## 8.1. ESTUDIO NEUROANATÓMICO

Las tinciones histológicas para valorar estructura se realizaron con Hematoxilina/Eosina (Panreac Química, Barcelona, España) siguiendo el siguiente protocolo:

- Tinción Hematoxilina durante 5 minutos
- Lavado con agua corriente 5 minutos
- Tinción Eosina durante 3 minutos
- Lavado con agua destilada
- Deshidratar y montar
  - o Alcohol 96º 5-6 segundos
  - o Alcohol 98% 5-6 segundos
  - o Alcohol 100% 5-6 segundos
  - o Xilol 5-6 segundos
  - o Xilol
- Montar portas con medio de montaje para microscopía (EuKitt Mounting®, Applichem, Darmstadt, Germany).

Las muestras teñidas con H/E fueron sometidas a un estudio estructural en el que se valoró el espesor que presentaban dichas muestras, así como el área desestructurada, es decir, la homogeneidad de la arquitectura normal de los segmentos medulares, con alteración de la distribución normal de la sustancia blanca y la sustancia gris. Una vez teñidas las muestras, se realizó un escaneado de los portas mediante el programa Pannoramic 250 Flash II (3DHISTEC), el cual permite escanear 60 portaobjetos/hora.

Para el montaje de los cortes y la cuantificación del espesor se utilizó el programa Adobe PS2. De esta forma, todos los cortes de la médula de estudio se incluyeron en un nuevo archivo de PS2, de forma que se encontraran todas las médulas alineadas en un mismo documento con la misma resolución y tamaño. Posteriormente se trazaron 8 líneas a través de todas las médulas. Las líneas de medida se trazaron atravesando la zona de la lesión cada 0,5 mm tomando como punto 0 el epicentro de la lesión (Imagen 24):

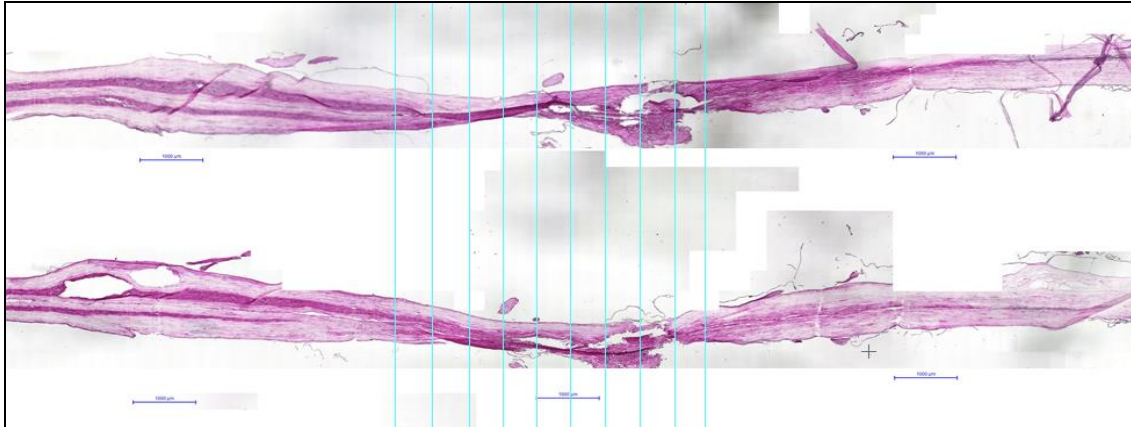


Imagen 24: Imagen ilustrativa de la técnica empleada para la medición del espesor de la médula espinal.

Una vez registradas todas las medidas realizadas a las secciones medulares, se obtuvieron los datos medios para cada uno de los 8 puntos medidos, y posteriormente se normalizaron los datos para obtener la medida real. Para ello, se utilizó la barra de medida proporcionada por el programa Panoramic Viewer.

Para el estudio del área desestructurada se utilizó el mismo montaje de los cortes aplicado para la obtención del espesor, en el que las secciones están alineadas con una misma resolución y tamaño pero en este caso las líneas de medida se trazaron de forma horizontal, sobre cada uno de los cortes abarcando solo la extensión de tejido desestructurado o anormal. Posteriormente, se obtuvieron las medias de los valores obtenidos. En la imagen 25, se observa un ejemplo de la pérdida de anatomía normal de la médula espinal.

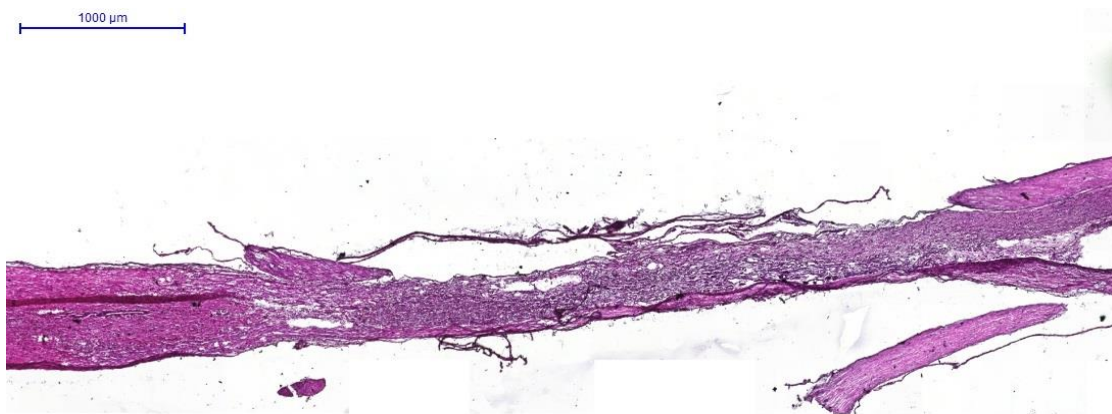


Imagen 25: Tinción H/E obtenida con el programa Panoramic Viewer en la que se aprecia la pérdida de la arquitectura normal de la médula espinal en la zona de la lesión.

Por otra parte, se realizó un estudio de valoración de vasos sanguíneos en cortes transversales. Para ello las muestras fueron cortadas a 1,5  $\mu\text{m}$  y teñidas con Azul de Toluidina al 1% durante 1-2 minutos en función de la inclusión realizada y sobre una plancha caliente a 60°C.



La cuantificación de los mismos se realizó por conteo directo a través de un microscopio Leyca a 60X, tomando datos de 3 muestras controles y 3 muestras trasplante.

Posteriormente, de los semifinos de 1,5  $\mu\text{m}$  se obtuvieron ultrafinos de 70-90 nm. Posteriormente fueron teñidas con la tinción de Reynolds para su posterior visualización en el microscopio electrónico (Tecnai Spirit Biotwin, FEI, Oregon, USA). Las imágenes se tomaron con la cámara digital de Olympus, Soft Image System.

## 8.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- Atemperación de las muestras
- Fijación con PFA 4% durante 5 minutos
- Lavado con Phosphate Buffer Saline (PBS) durante 5 minutos (3 veces)
- Permeabilización y Bloqueo Inespecífico 30 minutos a temperatura ambiente con solución de bloqueo: PBS +0,5%Triton + 2% Fetal Bovine Serum (FBS)
- Incubación en solución de bloqueo con anticuerpo (Ac) primario seleccionado durante toda la noche a 4°C
- Lavado con PBS durante 5 minutos (3 veces)
- Incubación en solución de bloqueo con Ac secundario conjugado con un fluorocromo diluido en solución de bloqueo durante 45 minutos a temperatura ambiente
- Lavado con PBS durante 5 minutos (3 veces)
- Tinción de núcleos con Hoechst (1mg/ml) (Cuando no se utiliza un conjugado azul como secundario)
- Lavado con PBS durante 5 minutos (3 veces)
- Montaje: se utilizó medio de montaje específico para fluorescencia (Fluorosave Reagent®, Merck Millipore, Darmstadt, Germany)
- Sellado con pintañas transparente para fijar el montaje entre cubre y portaobjetos.

Finalizado el protocolo las muestras se guardaron a 4°C en ausencia de luz hasta su análisis al microscopio.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

- Anti-beta Tubulin antibody (Chemicon, MAB1637) Ms-monoclonal [1/400]. Neurofilamento, específico de haces neuronales

- Anti-GFAP antibody Rb-polyclonal (Chemicon, AB5804) [1/400]. Marcador de astrocitos
- Anti-SOX2 antibody Rb-polyclonal (Abcam, ab53728) [1/100]. Marcador de precursores neurales.
- Anti-RIP antibody Ms-monoclonal (Chemicon, MAB1580) [1/200]. Marcador de oligodendrocitos maduros.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

- Alexa 633 Ms (Invitrogen, A21422)
- Alexa 647 Rb (Invitrogen, A21244)
- Pacific blue Ms (Invitrogen, A011008)
- Oregon Green Ms (Invitrogen, O 6380)

Posteriormente, las imágenes fueron obtenidas con el microscopio Leyca DM6000 con cámara DC500 y con el microscopio confocal invertido Leica TCS-SP2-AOBS (Leica Microsystems, Madrid, España). El revelado inmunohistoquímico del trazador axonal BDA se realizó mediante el siguiente protocolo (Vector Laboratories, Burlingame, USA):

- Deshidratación
- Fijación en PFA 4% durante 5 minutos
- Lavado Phosphate Buffer Saline (PBS) durante 5 minutos (3 veces)
- Incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 % en metanol durante 30 minutos.
- Lavado Phosphate Buffer Saline (PBS) durante 5 minutos
- Incubación con Vectastain AB (ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Lavado Phosphate Buffer Saline (PBS) durante 5 minutos
- Incubación con DAB (DAB Substrate, Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Lavado con agua corriente
- Montaje: se utilizó medio de montaje específico para fluorescencia (Fluoromount Reagent®, Merck Millipore, Darmstadt, Germany)
- Sellado con pintauñas transparente.

Posteriormente, el montaje de las imágenes obtenidas se realizó utilizando los programas Adobe PhotoShop® v.2. y Leica LAS AF Lite®. A su vez, la cuantificación de los resultados inmunohistoquímicos se realizaron a través del programa de gestión de imágenes Adobe PhotoShop® v.2.

Se realizaron cuantificaciones de los diferentes anticuerpos. Se cuantificó el área GFAP para poder valorar el tamaño de la cicatriz glial entre grupos, así como el porcentaje de fibras nerviosas (b-tubulina) y el porcentaje de precursores neurales endógenos (SOX2). A su vez, se rastrearon las células epSPCis trasplantadas y se valoró su colocalización con oligodendrocitos (RIP), lo que indicaría una diferenciación de las mismas.

Para la cuantificación se utilizó el programa Adobe PhotoShop® v.2, a través del cual delimitamos un área de estudio, de la misma extensión para todas las muestras, y valoramos la cantidad de píxeles positivos para cada inmunoreacción.

Se analizó el estudio realizado con el trazador axonal BDA pero no dio resultados cuantificables por lo que se decidió no seguir con el análisis en el resto de animales. Estos datos podrían ser debidos por una no adecuada administración del mismo o por un mal protocolo de revelado.

## **9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico GraphPad®.

En primer lugar se realizó un estudio descriptivo de los datos recogidos en el estudio funcional (BBB y Catwalk) y el estudio histológico (macroscópico y microscópico). Las variables ordinales (parámetros utilizados para el estudio macroscópico, microscópico y valoración Catwalk) se expresaron en datos de frecuencia, mientras que las variables continuas (valores obtenidos al valorar la evolución motora con la escala BBB) se mostraron como media  $\pm$  error típico.

A continuación, se hizo una comparativa de los valores obtenidos para cada protocolo para cada uno de los tiempos estudiados (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 semanas postrasplante).

Las puntuaciones de las variables ordinales fueron analizadas usando el test de Mann-Whitney con un nivel de significancia del 95%.

También se realizó un estudio de correlación entre la variable BBB y el espesor medular, y la variable BBB y el número de fibras nerviosas.

En todos los análisis se consideraron diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

# Resultados

## 1. RESCATE DE LA FUNCIÓN MOTORA POR TRASPLANTE DE EPSPCI EN UNA LM CRÓNICA:

Ratas hembras adultas de entre 160 a 200 gramos fueron sometidas a una contusión medular traumática severa, con una fuerza de 250 kdyn en T8 (descrito en detalle en Material y Métodos). Desde el momento de la lesión hasta pasados 4 meses después del trasplante, se valoró la función motora mediante el test BBB [72].

La valoración previa al trasplante en la función motora basada en el test BBB permitió agrupar a los animales en dos grupos, que incluirían a su vez un grupo control y un grupo trasplante. Así, los grupos establecidos y el número de animales por grupo fueron los siguientes:

- **Grupo LM severa:** Compuesto por 18 animales y dividido en dos subgrupos:
  - **Control:** 7 animales
  - **Trasplante epSPCis:** 11 animales
- **Grupo LM leve:** Compuesto por 16 animales y dividido en dos subgrupos:
  - **Control:** 6 animales
  - **Trasplante epSPCis:** 10 animales

Durante la fase de estudio previa al trasplante celular, en la que se genera la cronicidad de la lesión medular severa, se observa una recuperación funcional, asociada a una regeneración espontánea en la médula espinal. En esta fase pre-trasplante, los animales con un valor medio en la escala BBB de 0 y 1 tras la LM, en las que no hay movimiento alguno de las extremidades, se asocian con valoraciones medias de 6 y 7 a las pocas semanas tras el trasplante, es decir, con movilidad en al menos 2 o 3 articulaciones de las extremidades posteriores sin apoyo de la extremidad, e incluso con valores de 9, en los que muestran que son capaces de apoyar las extremidades posteriores e incluso, en algún caso, soportar peso del tercio posterior (Figura 1).

Los grupos se diferencian en el grado de recuperación funcional espontánea, previa al trasplante, mostrando en definitiva diferentes grados de lesión medular crónica, grave (A) y leve (B) (Figura 1). A pesar de realizar la cirugía en todos los animales en condiciones comparables y aplicando la misma fuerza (250 kdyn) de contusión para inducir la LM, se genera una heterogeneidad significativa entre las lesiones con recuperaciones espontáneas significativamente diferente. En base a estos resultados los animales fueron agrupados según el grado de lesión medular crónica antes del trasplante para su posterior estudio.

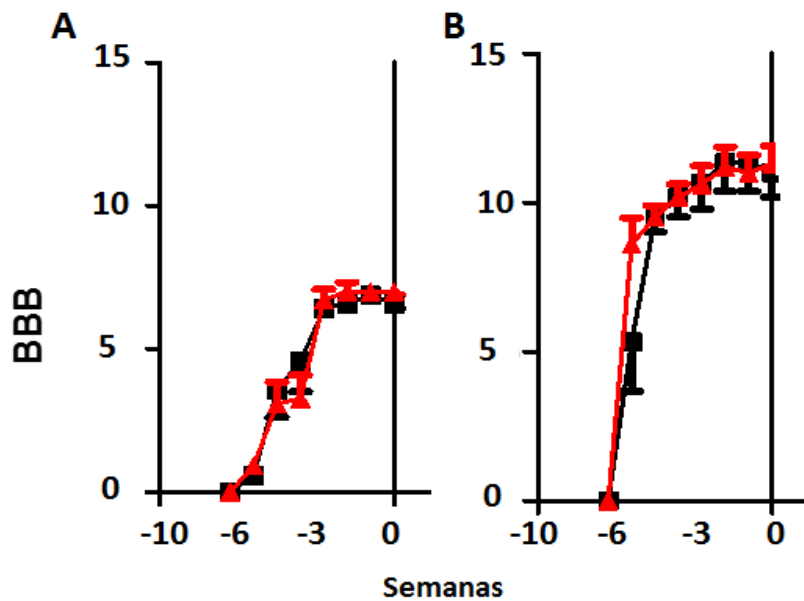
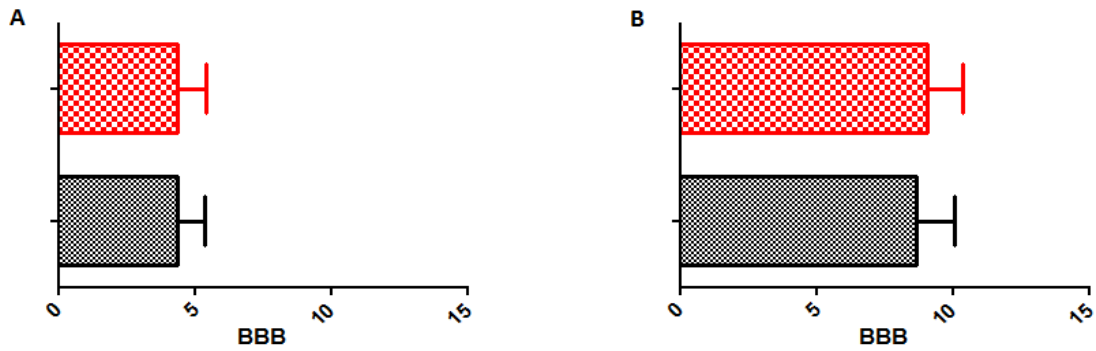


Figura 1: Valoración de la recuperación funcional a lo largo de la cronificación de la lesión medular. A: Grupos con lesión medular severa. B: Grupos con lesión medular leve. Obsérvese en la gráfica A como los valores alcanzados en la valoración BBB se encuentran entre 6 y 7 mientras que la gráfica B muestra valores superiores, indicando una lesión medular más leve. ▲: Grupo epSPCs. ■: Grupo control.

Se realizó un estudio de distribución de frecuencias en esta fase pretrasplante entre aquellos grupos de estudio en lesión leve y lesión severa, destinados a ser controles o trasplantes. Tal y como se refleja en los histogramas y tabla numérica de la Figura 2. El estudio estadístico entre grupos con igual grado de lesión medular en el pretrasplante, no presenta diferencias estadísticas mostrando un p value de 0,59 y 0,91 respectivamente tras ser analizados con un test no paramétrico de Mann-Whitney.



	Control Severo	Trasplante Severo	Control Leve	Trasplante Leve
<b>Media</b>	4,39	4,37	8,66	9,05
<b>Error Std.</b>	0,98	1,41	1,41	1,33

Figura 2: Representación de los valores medios del BBB antes del trasplante. A: Lesión severa. B: Lesión leve. En rojo se representan los grupos destinados a trasplante y en negro los grupos destinados a control.

Sin embargo, el estudio entre grupos con igual grado de lesión medular tras el trasplante, Control Severo vs Trasplante Severo y Control Leve vs Trasplante Leve, sí muestra diferencias significativas entre los grupos. Así, existen diferencias entre grupos con igual grado de lesión medular, siendo el p value de los grupos con lesión medular severa  $< 0.0001$  y  $0.0002$  en los grupos con lesión medular leve. (Figura 3).

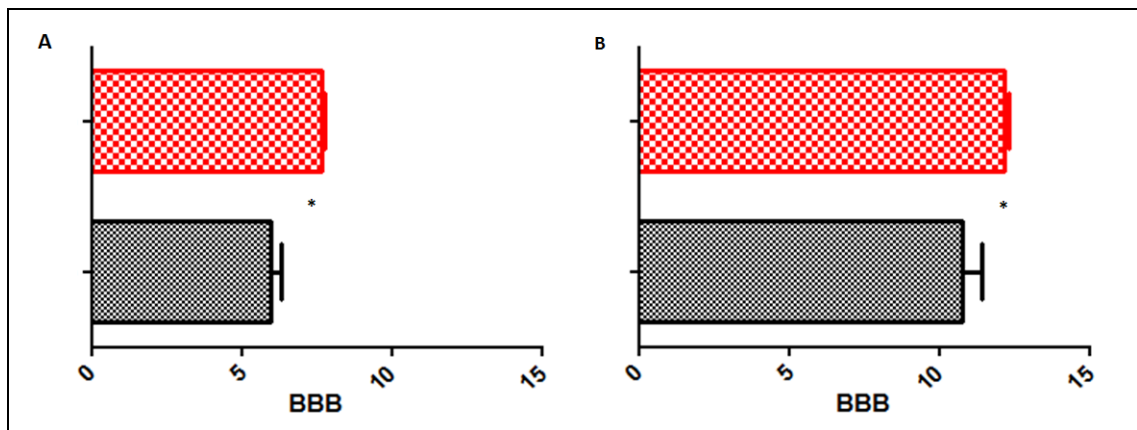


Figura 3: Imagen representativa de los valores medios del BBB tras el trasplante. A: Lesión severa. B: Lesión leve. En rojo se representan los grupos trasplante y en negro los grupos control.

El estudio funcional de la actividad motora resulta del seguimiento en el tiempo de las valoraciones del BBB, siendo los valores medios los representados en la Figura 4. Así, en la segunda fase del estudio, una vez realizado el trasplante, se observó una recuperación funcional en los grupos trasplantados dependiente en el tiempo.

Por otra parte y tal y como se puede observar en la Figura 4, en el grupo experimental de lesión severa (A), ambos grupos, control y trasplante, mejoran de forma paralela y espontáneamente su actividad locomotriz tras la lesión medular y antes de la intervención celular como hemos comentado anteriormente en la figura 1. Entre la quinta y sexta semana tras LM la recuperación funcional espontánea se estabiliza sin mostrar mejoras reflejadas en la escala de BBB durante tres semanas más. Esta estabilización del BBB nos permite considerar la lesión medular ya cronicada. Cuando se realiza el trasplante, en la semana 0, se observa una pequeña depresión en la función locomotriz en ambos grupos, en la primera semana tras trasplante con epSPCi o inyección de medio en el caso del grupo control, presumiblemente por la nueva intervención quirúrgica en ambos grupos. El grupo control se recupera del orden de un grado en la escala BBB y se mantiene de media en ese nivel durante las 16 semanas posteriores de estudio. Sin embargo, el grupo trasplante mejora significativamente en la escala de valoración funcional en comparación con el grupo control hasta el final del ensayo (Figura 4A). Animales con una valoración de 6 en el BBB en el momento del trasplante fueron capaces de alcanzar valores de 8 y 9 en dos semanas, pasando de un estado en el que únicamente pueden movilizar dos o tres articulaciones a otro en el que posicionan la extremidad en posición plantar e incluso cargan peso. En el grupo experimental de lesión leve (Figura 4B), los grupos en los que ya parten de un estado con apoyo plantar (valoración 8 y 9 del BBB), los animales son capaces de alcanzar estados en los que hay soporte de peso y coordinación en el movimiento (valoración 14-15). Sin embargo, y a pesar de que la tendencia en los animales trasplantados muestra mejor recuperación funcional, en este grupo experimental, de lesión leve, la dispersión interindividuo es mayor, resultando no significativa la diferencia entre ambos grupos, control y trasplantado.



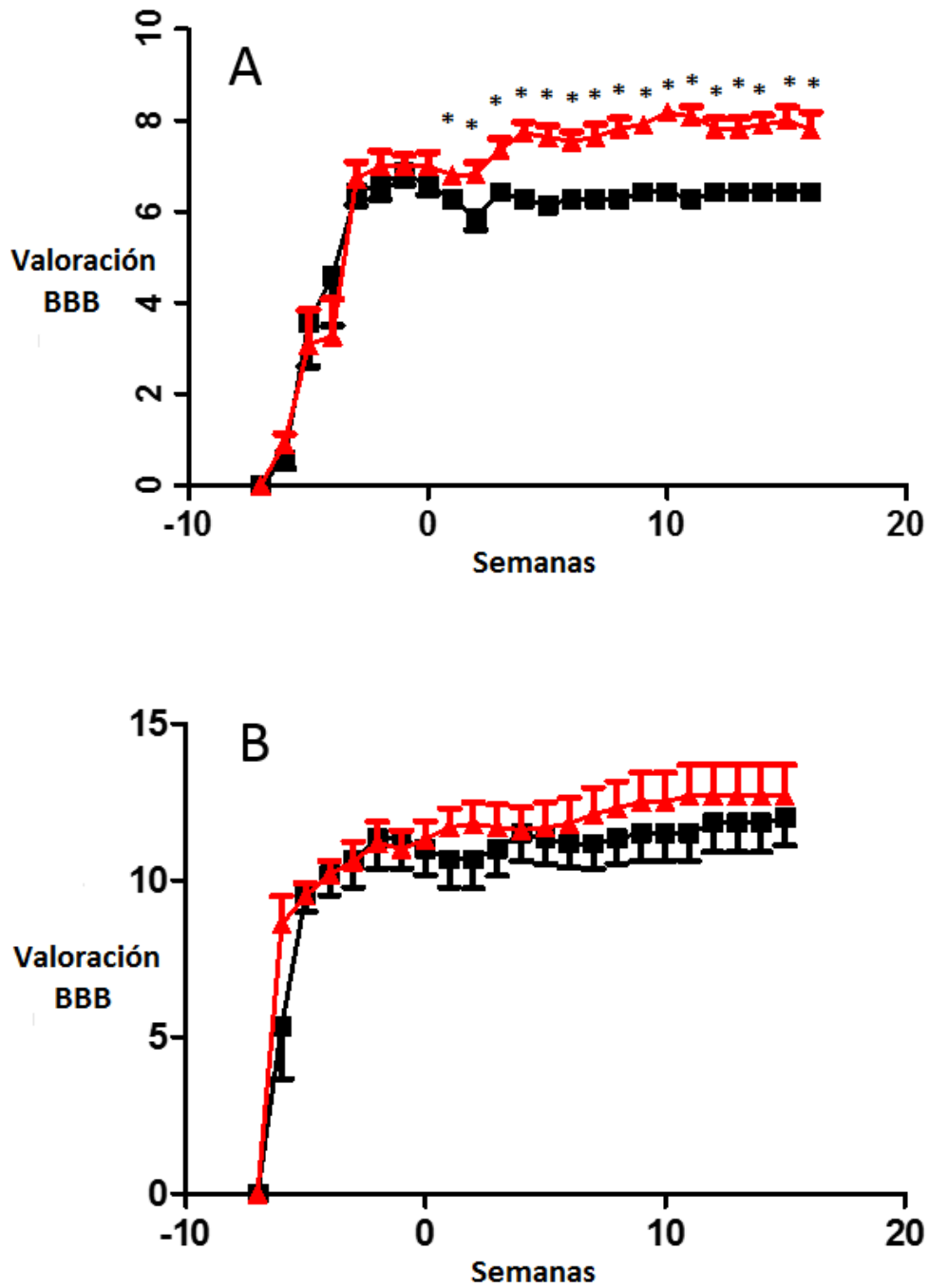


Figura 4: Valoración de la función motora empleando la escala del test BBB a lo largo de todo el estudio. En la imagen A se encuentran las valoraciones del grupo de lesión medular grave y en la gráfica B las valoraciones de los grupos con lesión medular leve. ▲: Grupo epSPCs. ■: Grupo control. En la gráfica A se representan con asterisco los tiempos en los que existen diferencias entre el grupo control y el grupo trasplante. En la gráfica B no se observan dichas diferencias.

De forma complementaria, se realizó otra valoración de la función motora también mediante el test automático de la pisada también llamado Catwalk®. Dicho test se realizó en animales con diferente grado de lesión medular, sin embargo, su análisis sólo se pudo llevar a cabo en aquel grupo de animales que presentaban a partir de un grado 8 en la escala BBB, con posición plantar y cierto soporte de peso.

Las Figuras 5 y 6 muestran, respectivamente, un ejemplo de un animal lesionado y trasplantado con epSPCi y un animal control, con lesión medular crónica sin trasplante. El primero con una valoración en el BBB de 6 y el segundo de 7, ambos por debajo de 8 y sin capacidad de mostrar la pisada de las extremidades posteriores. Esas imágenes muestran como, teniendo valores de BBB diferente presentan el mismo patrón en el análisis de la pisada en este test, lo que hace que el Catwalk no sea un test válido para valorar su recuperación funcional. Obsérvese las pisadas obtenidas y representadas como pixeles verdes (extremidad anterior derecha) y pixeles rojos (extremidad anterior izquierda). En las imágenes también se puede observar la fuerza o la presión que ejercen en la pisada con diferentes grados de intensidad mostrados en azul. Obsérvese como solo se realiza presión en el desplazamiento sobre las extremidades anteriores (front paw) no existiendo apoyo en las posteriores (hind paw).

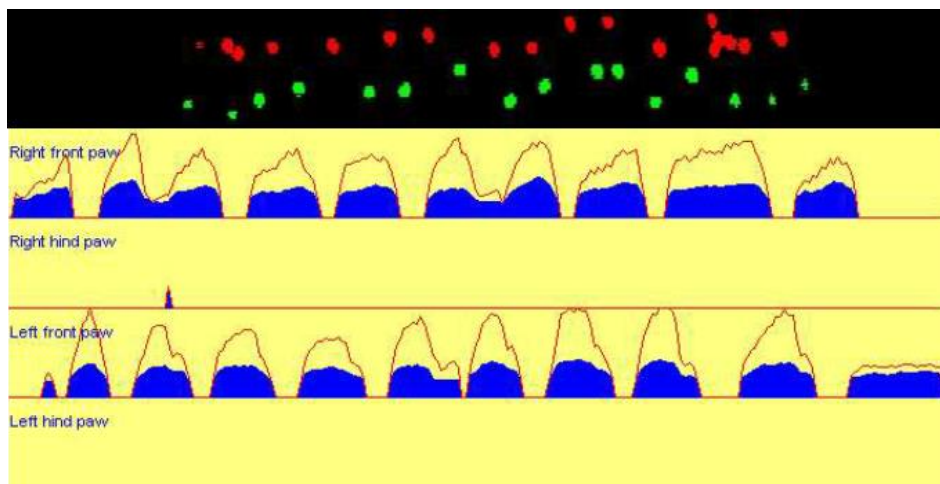


Figura 5: Resultados del análisis del test Catwalk en un animal trasplantado con epSPCi del grupo experimental de lesiones severas. Obsérvese como únicamente utiliza las extremidades anteriores para caminar. No existen registros de las extremidades posteriores. Las extremidades anteriores derecha e izquierda se representan en verde y rojo, respectivamente. Secuencia obtenida en la semana 14 tras el trasplante

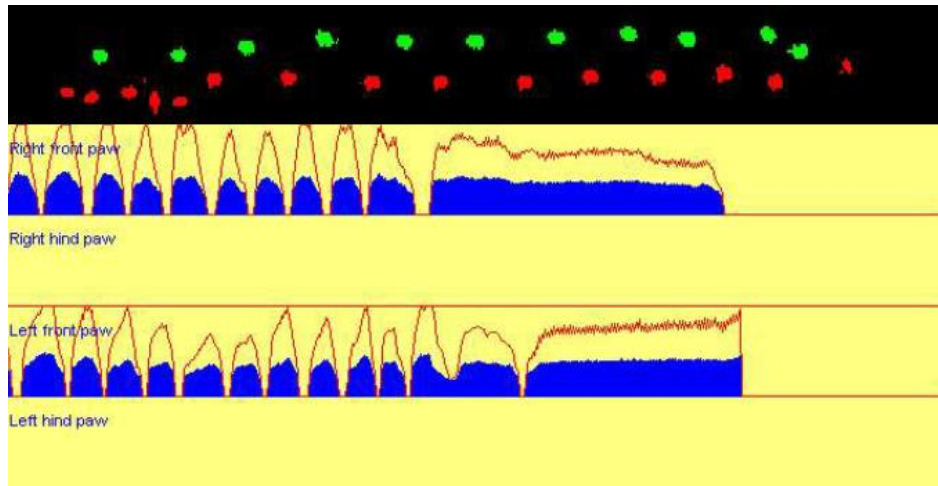


Figura 6: Resultados del análisis del test Catwalk en un animal control del grupo experimental de lesiones severas. Obsérvese como únicamente utiliza las extremidades anteriores para caminar. No existen registros de las extremidades posteriores. Las extremidades derecha e izquierda se representan en verde y rojo, respectivamente. Secuencia obtenida en la semana 14 tras el trasplante.

Por otra parte, los animales con una valoración del BBB superior a 8, con capacidad de realizar posición plantar en las extremidades posteriores, sí permiten el uso e interpretación de los resultados de este test (Figuras 7 y 8). Este test permite valorar la pisada y la calidad de las mismas de ambas extremidades, traseras y delanteras, con valoración de la coordinación en el desplazamiento, y además permite valorar el uso de otras estructuras que no intervienen directamente en el marcha pero que resultan indicativos de la recuperación funcional, como son el arrastre de las rodillas, las caderas, el abdomen, la cola o incluso la nariz.

En la Figura 7 se muestra un ejemplo de un registro en la semana 14 post trasplante de un animal trasplantado con epSPCi, con un valor en la escala BBB de 17. El registro y posterior análisis de la pisada muestra que este animal utiliza las extremidades anteriores y posteriores siguiendo un patrón aparentemente normal en la marcha como puede observarse en la imagen donde las extremidades aparecen representadas por colores. Las extremidades anteriores derecha e izquierda se representan en verde y rojo, respectivamente. Las extremidades posteriores en la misma gama de colores pero con mayor intensidad. Se ha indicado, también, con las letras A, B, C y D. En la imagen central, obsérvese que no existe contacto de otras estructuras como las rodillas, las caderas, la cola o la nariz.

Sin embargo en la Figura 8 se muestra el resultado del análisis del Catwalk en un animal control con 13 en la valoración BBB, también en la semana 14 post trasplante. Obsérvese como utiliza las extremidades anteriores y posteriores siguiendo un patrón aparentemente normal en la marcha. Las extremidades derecha e izquierda se representan en verde y rojo, respectivamente. Las extremidades posteriores en la

misma gama de colores pero con mayor intensidad. En la imagen central, obsérvese como existe un arrastre del abdomen (se indica en azul en la imagen), principalmente, y de otras estructuras como las rodillas

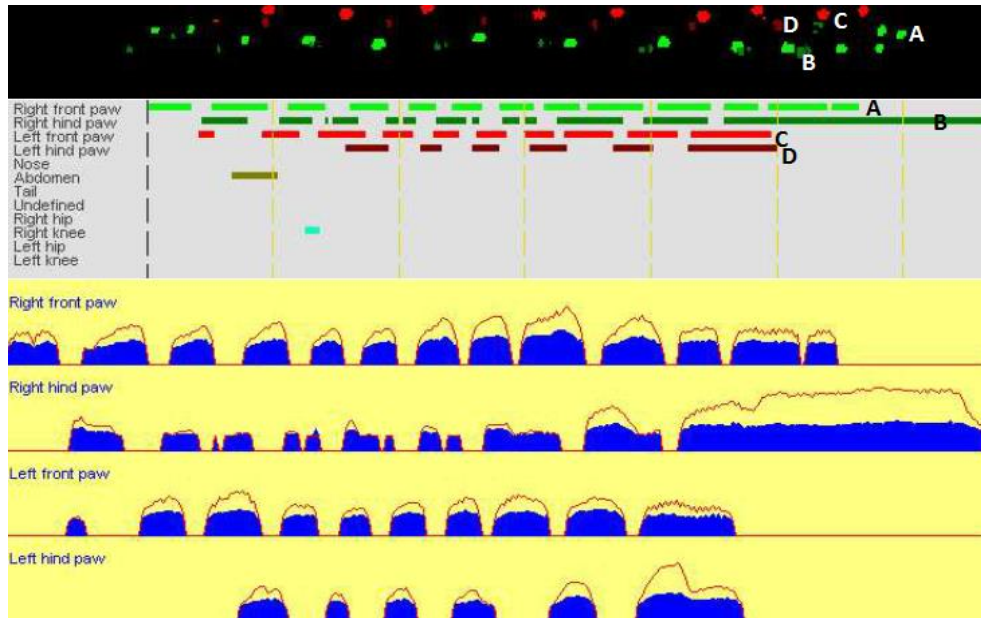


Figura 7: Resultados del análisis del test Catwalk en un animal trasplantado con epSPCi del grupo experimental de lesiones leves

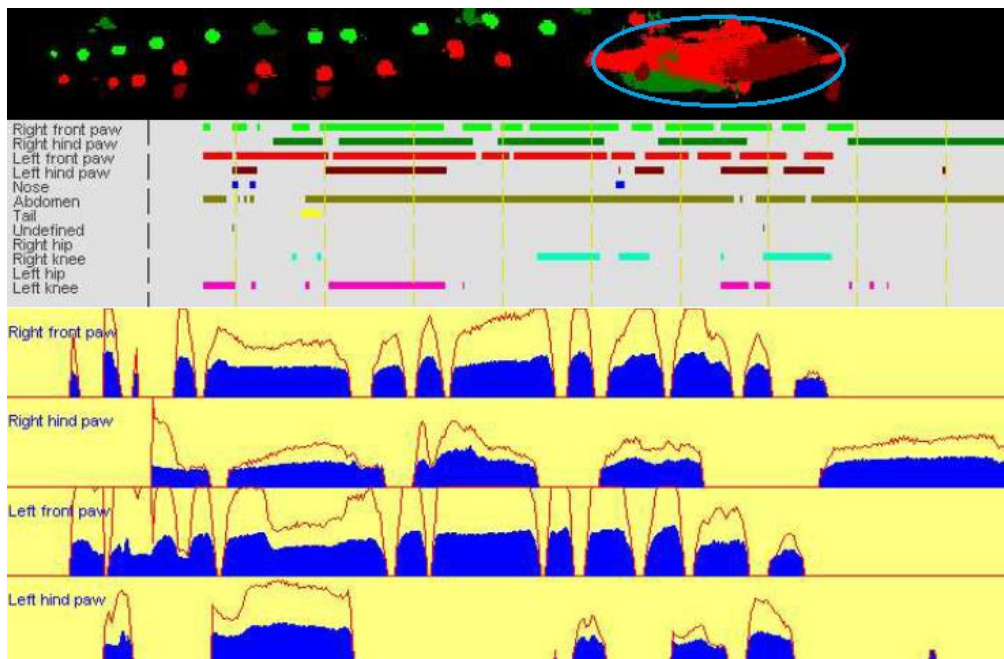


Figura 8: Resultados del análisis del test Catwalk en un animal control del grupo experimental de lesiones leves

El área de la pisada de cada una de las extremidades, anteriores y posteriores así como los contactos más habituales de otras estructuras, como el abdomen y la cola, se resumen en la Figura 9:

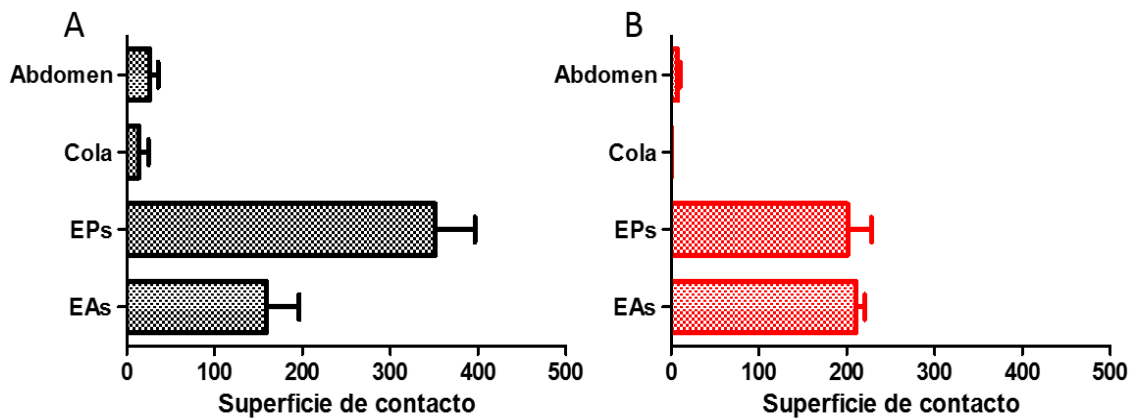


Figura 9: Uso y contacto de estructuras en la marcha. Superficie de contacto expresada como píxeles. A más píxeles, más contacto y por tanto más arrastre. EPs: Extremidades Posteriores. EAs: Extremidades Anteriores. A: Grupo Control lesión leve. B: Grupo Trasplante lesión leve. En la tabla adjunta los resultados del estudio de distribución de frecuencias.

En la figura 10 se observan comparativamente los resultados anteriores, mostrando las diferencias entre el grupo trasplante y control, presentando un mayor contacto, y por tanto un mayor arrastre de las extremidades posteriores en el grupo control lo que indica que estos animales utilizan menos las extremidades posteriores en la marcha, y por tanto, la mejoría es menor. Obsérvese como el grupo trasplante realiza un uso similar de las extremidades anteriores y posteriores lo que indicaría una actividad similar de las cuatro extremidades. El estudio estadístico revela diferencias entre el grupo control y el grupo trasplante en la utilización de las extremidades posteriores con una  $p=0,019$ , mientras el estudio de las extremidades anteriores y el abdomen no presenta diferencias ( $p=0,95$  y  $p=0,14$ , respectivamente).

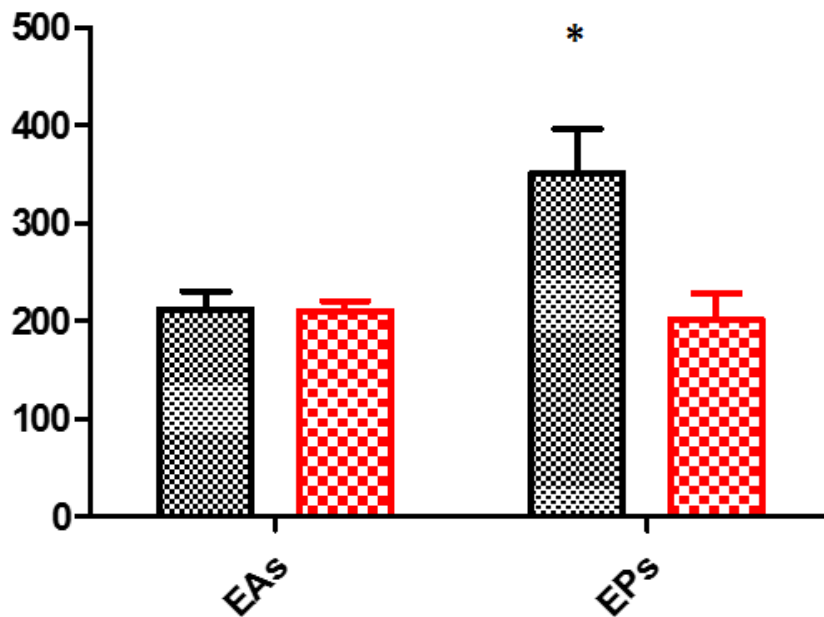


Figura 10: Análisis del área de pisada y/o arrastre de las extremidades anteriores y posteriores respectivamente en ambos grupos de lesión leve, control (negro) y trasplantados con epSPCi (rojo).

## 2. ESTUDIO HISTOLÓGICO Y ESTRUCTURAL DE LA MÉDULA ESPINAL TRAS LESIÓN CRÓNICA

Una vez concluido el estudio funcional in vivo de la actividad motora, en la semana 16 tras el trasplante, todos los animales fueron eutanasiados. Para ello, y tras ser administrada la anestesia inyectable con pentobarbital (Dolethal®, Vetoquinol, Madrid, España) y analgesia con fentanilo (Fentanest®, KernPharma, Barcelona, España), los animales fueron perfundidos con solución salina y posteriormente con para-formaldehído al 4% para fijar los tejidos. Una vez extraídas y diseccionadas las médulas espinales, se realizó un estudio macroscópico y microscópico de la morfología que presentaban las médulas de los grupos trasplante y control (en ambos grupos experimentales, leve y severa).

## 2.1. ESTUDIO MACROSCÓPICO

Macroscópicamente se valoraron de forma semicuantitativa diferentes parámetros, valorando la coloración que presentaban las médulas, si era una coloración compatible con la de una médula sana y si presentaba un aspecto brillante también típico de médulas sanas, y por otra parte si existían pigmentos o depósitos en la zona de lesión, así como si era friable o consistente. En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos tras realizar el estudio en las médulas de todos los animales. El 100% representa al total de animales, de forma que todos los animales trasplantados presentaron coloraciones compatibles con médula sana mientras del grupo control la presentaron un 90%. Por otra parte, un 90% de los animales trasplantados presentaban mayor consistencia en la médula mientras en el grupo control solo la presentaban un 66%. A su vez, del 63% de animales trasplantados que presentaban pigmentos, ninguno los presentó en el área de lesión, mientras en el grupo control donde se observaron pigmentos en el 44% de los animales, el 11% los presentó en el área de lesión. La imagen 25 muestra un ejemplo del aspecto macroscópico que presentaban las médulas tras su extracción.

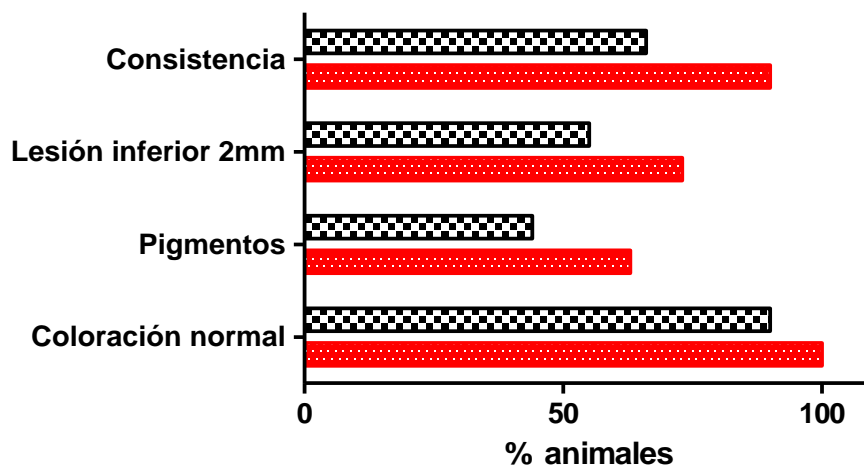


Figura11: Resultados de la valoración macroscópica de la médula espinal. Los resultados muestran el porcentaje de animales que presentan dichas características. En rojo se representa el grupo trasplante y en negro el grupo control.



Imagen 25: Imagen macroscópica de la médula espinal 6 meses después de la lesión de una médula del grupo trasplante +epSPCs (arriba) y una médula de grupo control (abajo). En rojo se encuentran indicados los pigmentos.

## 2.2. ESTUDIOS MICROSCÓPICOS

El estudio microscópico incluye el análisis del espesor que presentaban las médulas en la zona de la lesión, así como el área que abarca la arquitectura o anatomía desestructurada en la zona de lesión. También se realizó un estudio más detallado de la morfología bajo microscopía electrónica.

### 2.2.1. Estudio del espesor de la médula espinal

En primer lugar se muestran los resultados del estudio de espesor en el grupo de lesión severa (Figura 12). En las figuras 12 A1 y A2 se puede apreciar el sistema de medida utilizado (detallado en Material y Métodos). Como se puede observar, el grupo trasplante epSPCs aun presentando espesores completos inferiores al grupo control, presenta mayor uniformidad a lo largo de toda la zona de la lesión, mientras el grupo control muestra un descenso importante en el epicentro. Se realizó un test Mann-Whitney para el análisis estadístico entre grupos, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p=0,002$ ).

A su vez se hizo un estudio en cada uno de los puntos estudiados para cada grupo con respecto al otro. En la Figura 12B, se indican con un asterisco aquellos puntos en los que hay diferencias entre grupos.



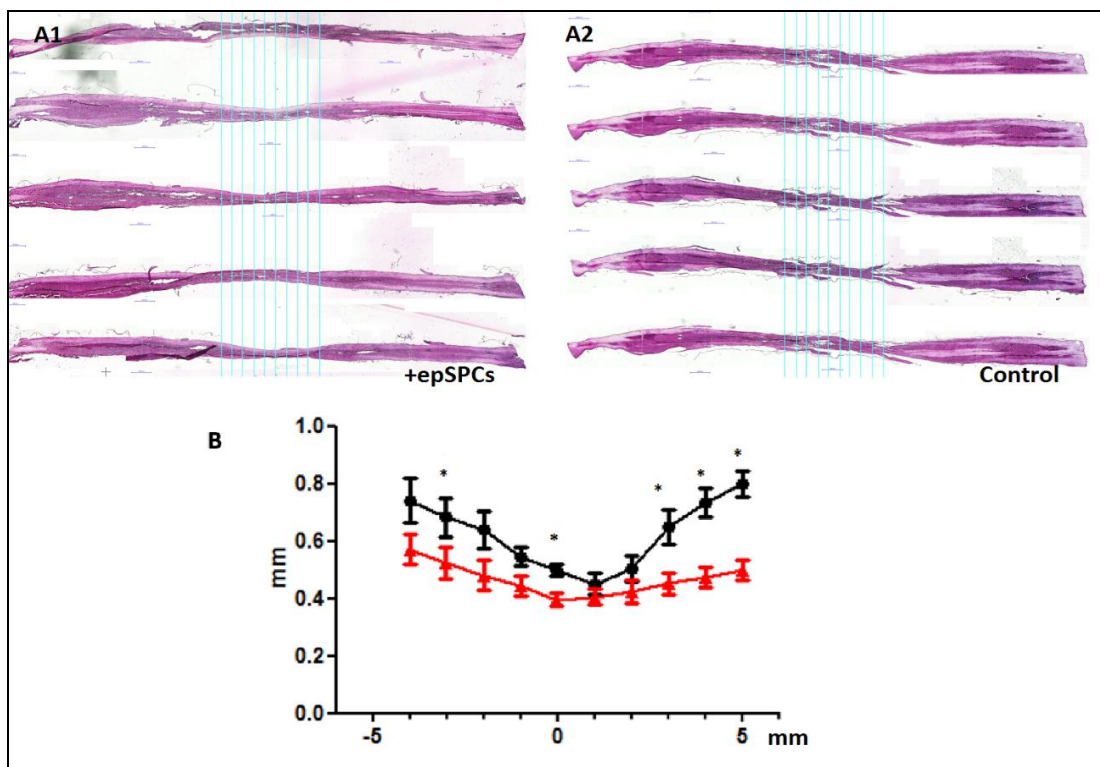


Figura 12: A: Secciones longitudinales de médula espinal tras tinción con H/E. A1: Trasplante. A2: Control. La disposición de las médulas se utilizó para realizar el cálculo del espesor mediante el Adobe PS2. B: Resultados en mm del espesor de las médulas de los grupos control y trasplante con lesión severa. Ambos grupos presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,002$ ). ▲: Grupo epSPCs. ■: Grupo control.  $p$  value $<0.05$  comparando con el grupo trasplante (+epSPC).

Sin embargo, con el objetivo de valorar una posible regeneración entorno al epicentro de la lesión se realizó un estudio analizando las diferencias de espesores con respecto al epicentro de la lesión para cada grupo. La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

GRUPO TRASPLANTE										
mm	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5
	b	b	a	a		a	a	a	a	b
GRUPO CONTROL										
mm	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5
	b	b	a	a		a	a	b	b	b

Tabla 4: Resultados estadísticos en el estudio comparativo con respecto al epicentro de la lesión. Los puntos con diferencias respecto al epicentro comparados dentro de cada grupo se indican con la letra b. los puntos similares al epicentro se indican con la letra a. Se considera significativo si  $p<0.05$ .

Estos datos indican que la degeneración en el epicentro de la lesión es más evidente y más brusca en el grupo control que en el grupo trasplante, puesto que existen más puntos sin diferencias con respecto al epicentro y, por tanto, los espesores son respecto al epicentro son más similares a él.

El estudio del espesor realizado en los grupos con lesión leve sin embargo no muestra diferencias significativas ya que nuevamente, las muestras de este grupo presentan una elevada dispersión interindividuo (Figura 13):

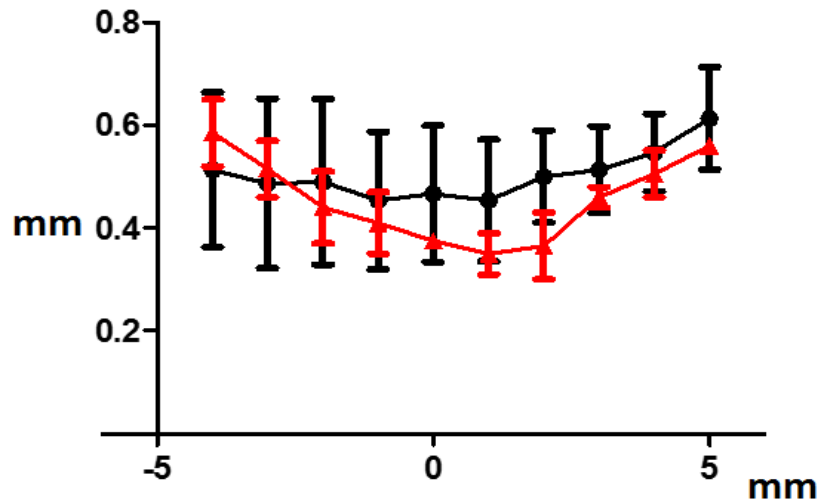


Figura 13: Resultados en mm del espesor de las médulas de los grupos control y trasplante con lesión leve. ▲: Grupo epSPCs. ■: Grupo control.

Los resultados del estudio de distribución de frecuencias, incluidos todos los valores, para ambos grupos, se muestran en la siguiente tabla:

	Control Severo	Trasplante Severo	Control Leve	Trasplante Leve
<b>Media</b>	0,6238	0,4664	0,50366	0,4565
<b>Desviación Std.</b>	0,1192	0,05427	0,04829	0,0828
<b>Error Std.</b>	0,03769	0,01716	0,01527	0,0262

Tabla 5: Datos medios obtenidos en el estudio de espesores.

### 2.2.2. Estudio de la arquitectura estructural

El análisis microscópico de la estructura también incluyó una valoración del área desestructurada, es decir, una valoración de la pérdida de la arquitectura o anatomía normal del tejido medular, con pérdida de la distribución normal de la sustancia blanca y sustancia gris desde el tejido medular en secciones longitudinales, incluyendo la zona de lesión, teñidas con hematoxilina/eosina (tal y como se describe en Material y Métodos). En la Figura 14 se puede observar la pérdida de anatomía en la zona de lesión.

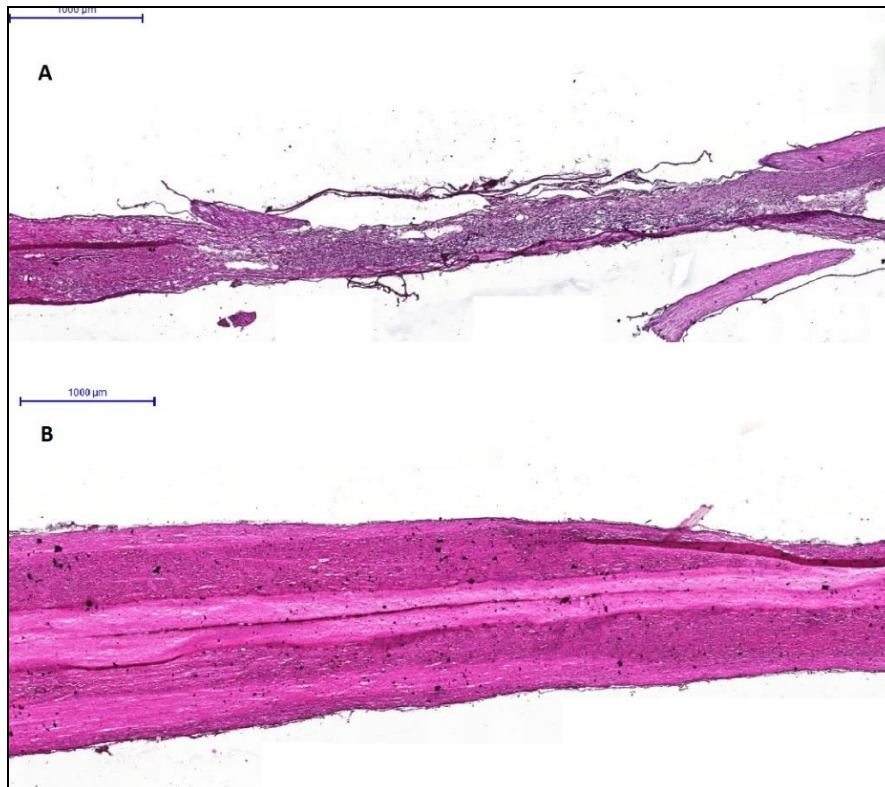


Figura 14: Cortes longitudinales de médula espinal tras tinción con H/E. En la imagen A puede observarse la desestructuración de la morfología normal de la médula espinal en la zona de lesión. En la imagen B se observa la morfología normal de la médula espinal en la zona craneal a la lesión.

El estudio estadístico del área desestructurada realizado mediante el test Mann-Whitney tras analizar el tejido de ambos grupos experimentales revela que no existen diferencias entre las medias (Figura 15):

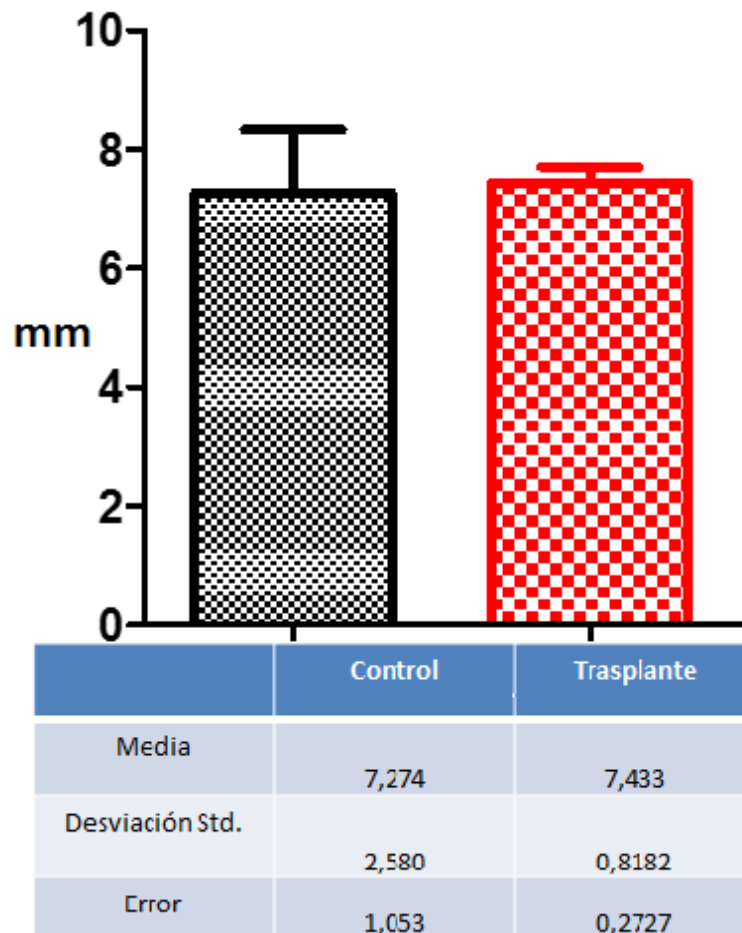


Figura 15: Representación de los valores obtenidos al valorar la desestructuración de las médulas en los grupos control (negro) y en los grupos trasplante (rojo) ( $p=0,223$ ). Se incluyen los resultados del estudio de distribución de frecuencias obtenidos.

### 2.2.3. Estudio de la morfología bajo microscopia electrónica

Empleando cortes transversales del epicentro de la lesión, teñidos con Azul de Toluidina, se realizó un estudio cuantitativo, con el objeto de valorar la cantidad de estructuras compatibles con vasos sanguíneos en ambos grupos, y las medias obtenidas fueron  $77 \pm 9,24$  para el grupo control y  $143 \pm 17,16$  para el grupo trasplante. En esta valoración las muestras utilizadas pertenecían al grupo de lesión leve (Figura 16 y 17)

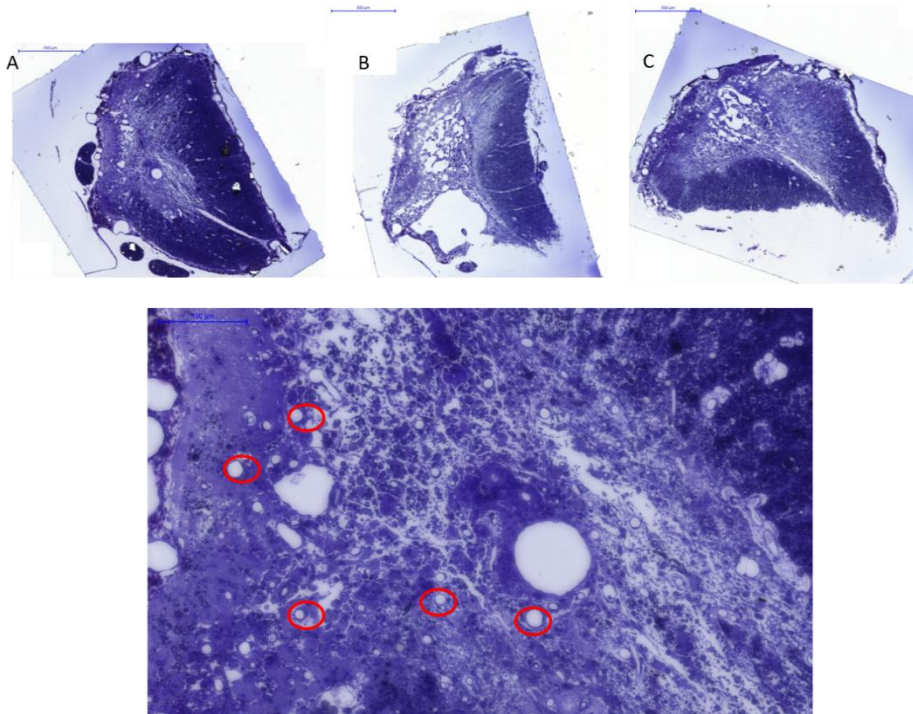


Figura 16: Cortes transversales de la médula espinal del grupo control. A: zona craneal a la lesión. B. Zona de lesión. C. Zona caudal a la lesión. En rojo se encuentran marcados algunos vasos sanguíneos presentes en la estructura.

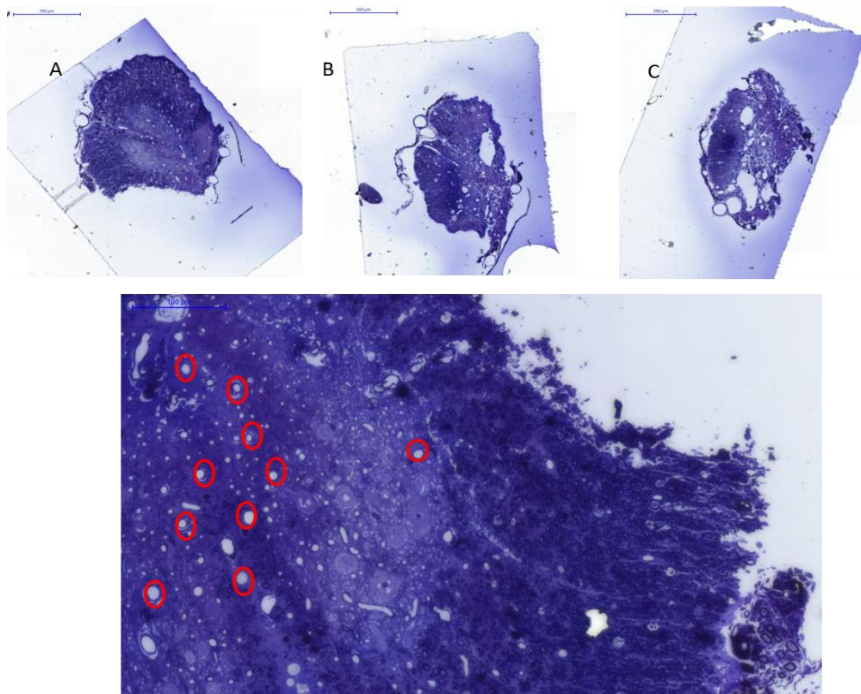


Figura 17: Cortes transversales de la médula espinal del grupo trasplante. A: zona craneal a la lesión. B. Zona de lesión. C. Zona caudal a la lesión. En rojo se encuentran marcados algunos vasos sanguíneos presentes en la estructura.

Para finalizar el estudio ultraestructural se realizaron cortes ultrafinos de sección transversal con el fin de detectar a través del detalle ultraestructural el proceso de remielinización incipiente en ambos grupos, control y trasplantado con epSPCi (Figuras 18-19). En los animales trasplantados se observaron axones mielínicos valorados de forma cualitativa en mayor cantidad que en los controles. A su vez, las vainas de mielina presentes en el área de lesión de los animales trasplantados estaba mejor organizada, con menor deformidad y se observaron numerosos de oligodendrocitos activos produciendo En los controles se encontraron abundantes astrocitos reactivos que se localizaban principalmente formando la barrera en la zona cicatricial, entre la lesión y el tejido externo (Figura20).

Se observaron estructuras compatibles con células fagocíticas llenas de material de desecho, tanto en el control como en el trasplante. Valorando de forma cualitativamente, estas estructuras resultan mayoritarias en el control que en el trasplante (Figura 21).



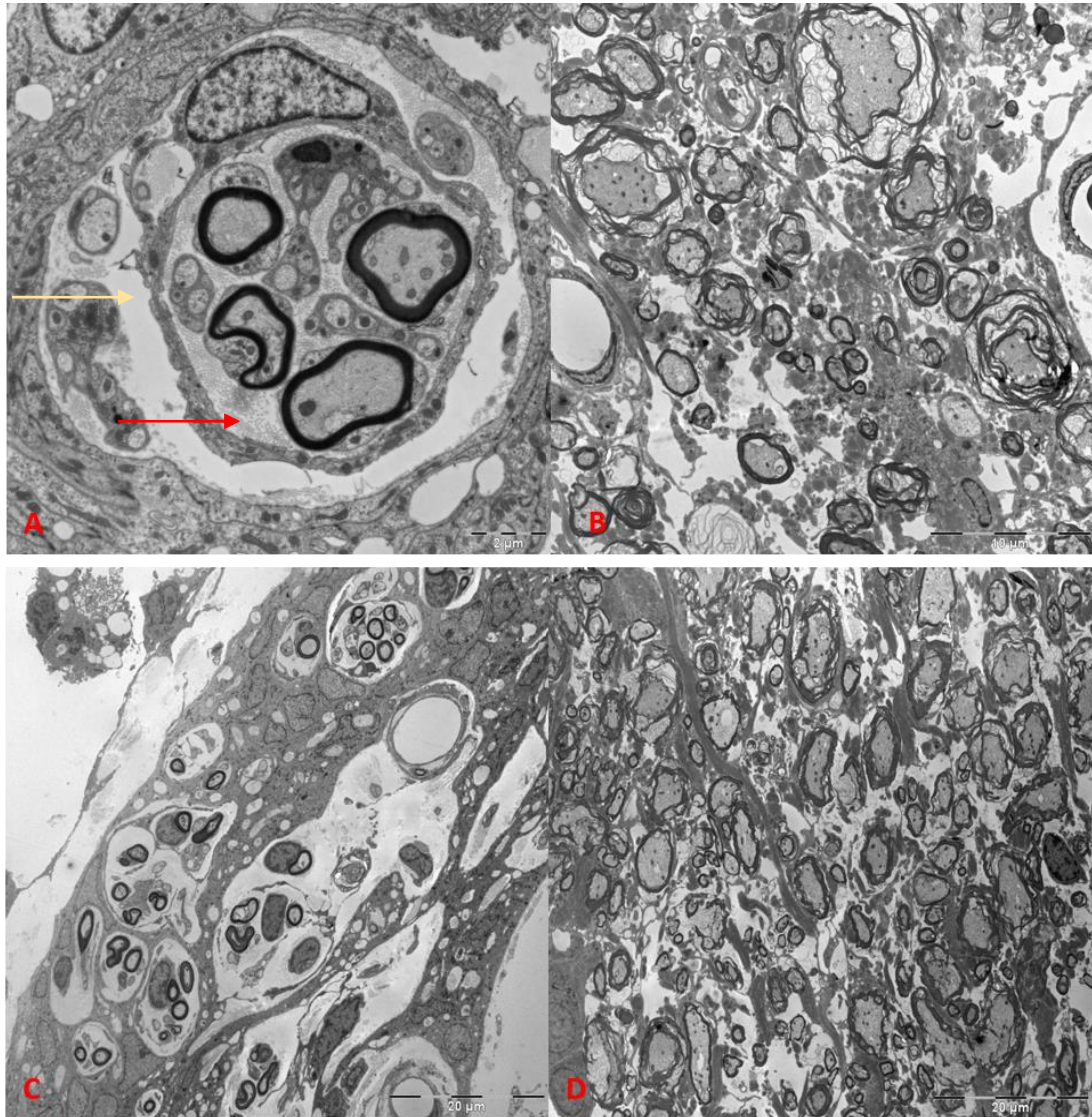


Figura 18: Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión. A y B: Imágenes de animales control. C y D: Imágenes de animales trasplantados. A: Axones mielínicos (señalados en rojo) y amielínicos (señalados en amarillo), estos últimos en gran cantidad. B: Axones mielínicos de la zona externa a la lesión. Obsérvese la deformidad de las vainas de mielina. C: Axones amielínicos y oligodendrocitos produciendo mielina en la zona de la lesión. D: Axones mielínicos de la zona externa a la lesión con morfología similar a la normalidad.

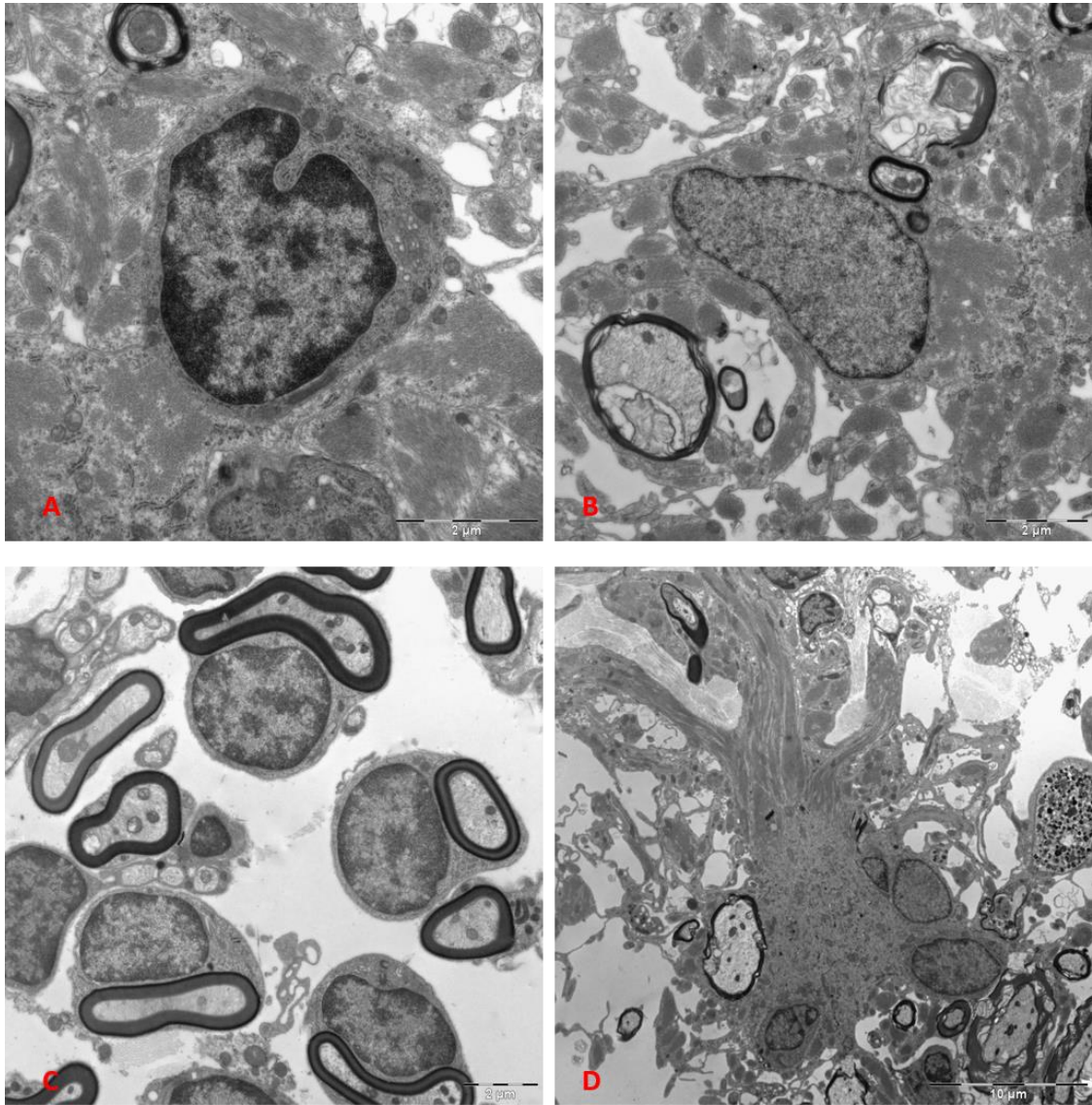


Figura 19: Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión. A y B: Imágenes de animales control. C y D: Imágenes de animales trasplante. A: Célula anormal compatible con oligodendrocito. B: Célula anormal compatible con astrocito reactivo. C: Oligodendrocitos activos produciendo vainas de mielina. D: Astrocito y extensiones astrocíticas.



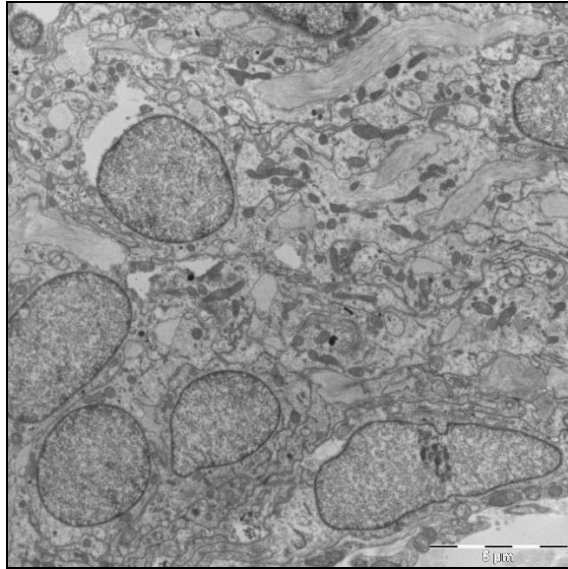


Figura 20: Imagen de microscopía electrónica. Astrocitos reactivos formando la cicatriz glial.

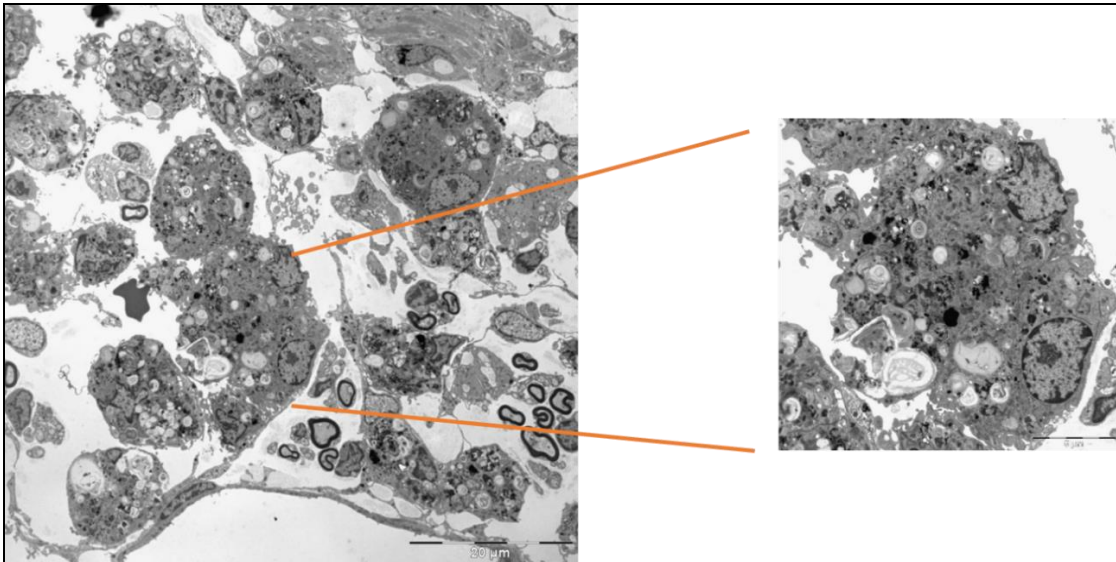


Figura 21: Imagen de microscopía electrónica. Células fagocíticas llenas de debris celular.

### 3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE MARCADORES CELULAR

#### 3.1. ANALISIS DE LA EXTENSIÓN DE LA CICATRIZ GLIAL

Mediante técnicas inmunohistoquímicas se evaluó la extensión de la cicatriz glial, compatible con el área de lesión en los diferentes grupos. Para ello se utilizó el marcador de astrocitos GFAP, de forma que se delimitara la barrera astrocítica que forma la cicatriz glial (Figura 22):

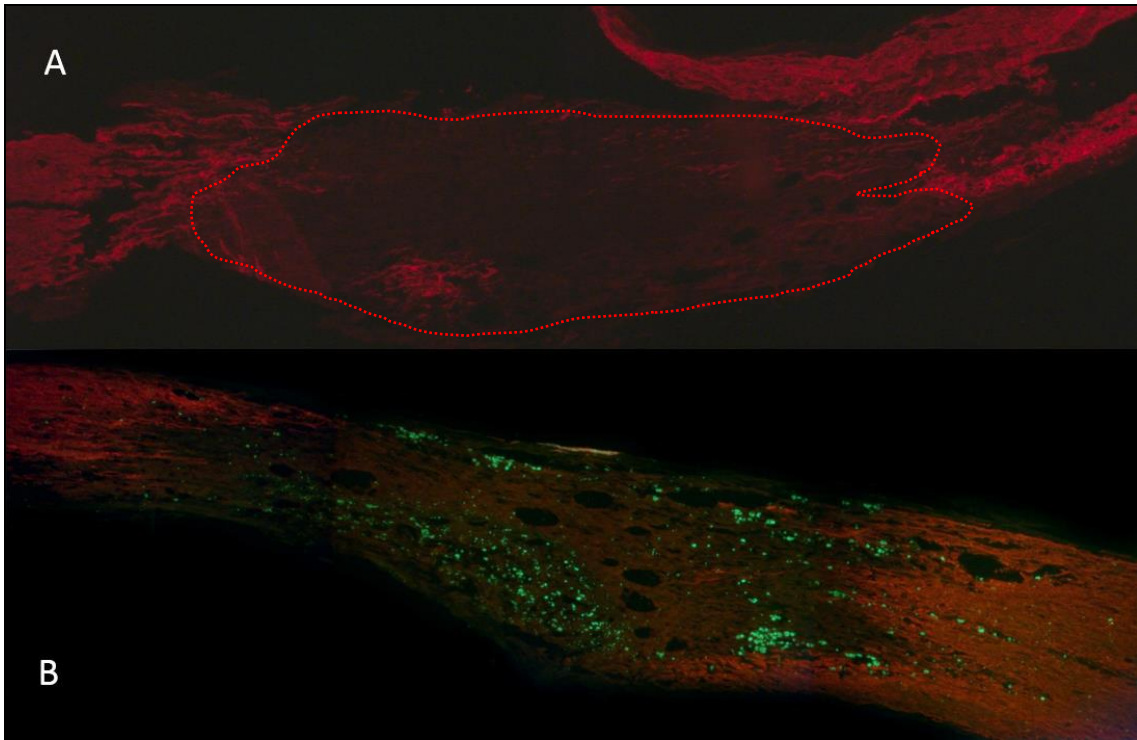


Figura 22: Imagen inmunohistoquímica del estudio del área cicatricial. A: Animal Control. B: Animal trasplante. Se observan en verde las células trasplantadas. En ambas imágenes, se observa el área GFAP negativa que delimita el área cicatricial (área delimitada por la línea discontinua roja).

Se realizó un estudio comparativo cuantificando la extensión de la cicatriz glial (según se detalla en Material y Métodos), delimitada por la reactividad de GFAP como marcador astrocitario, entre ambos grupos, control y trasplante. El estudio estadístico reveló que no existían diferencias entre las medias de ambos grupos siendo el valor  $p$  0,76. (Figura 23).

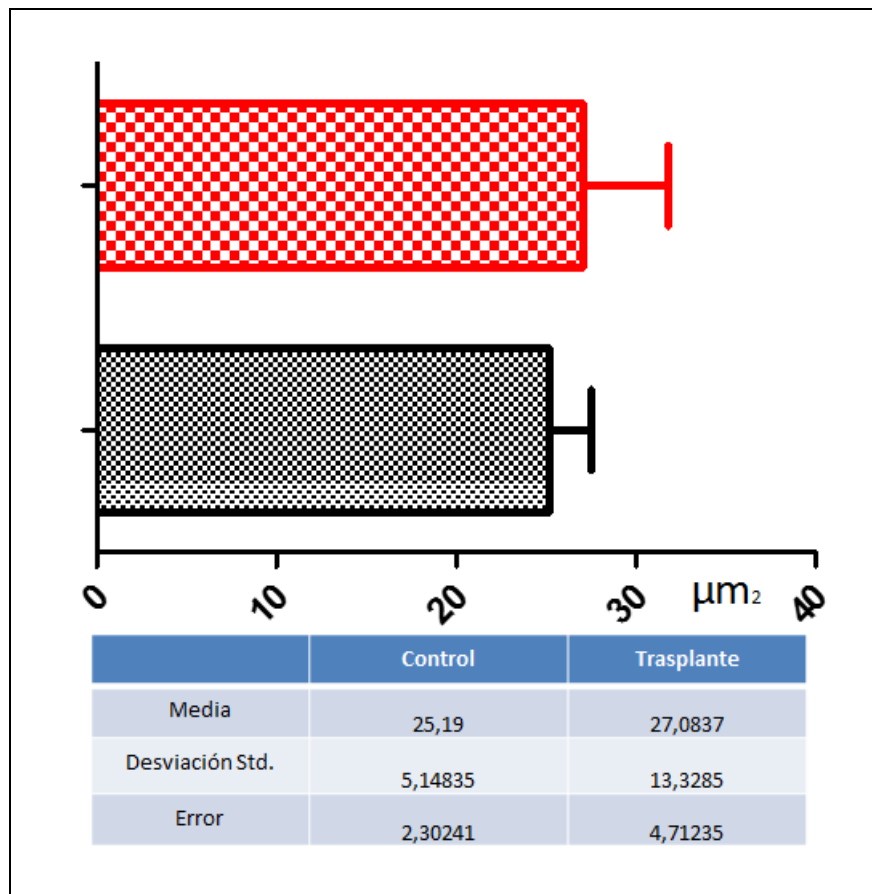


Figura 23: Representación gráfica del área de lesión en el grupo control (negro) y en el grupo trasplante (rojo). Se indican los resultados del estudio de distribución de frecuencias obtenidos.

### 3.2. TRAZADO DE LA MIGRACIÓN DEL TRASPLANTE

Establecida el área de lesión se localizaron las células trasplantadas con el fin de comprobar si habían sido capaces de migrar desde el punto de inyección y se observó como las células epSPCi, GFP positivas, trasplantadas habían sido capaces no solo de migrar sino de atravesar e incluso permanecer en la zona cicatricial de la lesión (Figura 24; epSPC marcadas en verde, )

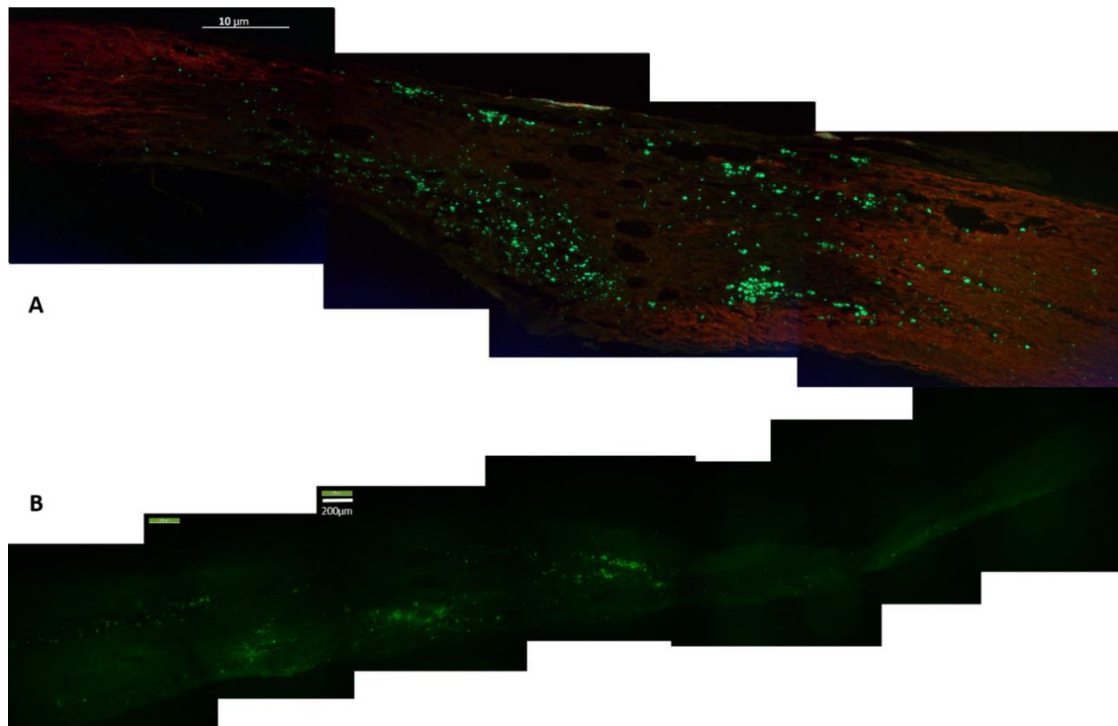


Figura 24: Imagen inmunohistoquímica que muestra las células GFP trasplantadas. A: epSPCs trasplantadas dentro del área de lesión 4 meses después del trasplante (en rojo se marca GFAP, delimitando la zona de la cicatriz glial). B: Migración de las epSPCs a través de la médula, dentro y fuera de la lesión. Obsérvese la extensión de la imagen B donde la barra de medida indica 200 µm.

### 3.3. CUANTIFICACIÓN DE LA EXTENSIÓN DE FIBRAS NERVIOSAS EN LA ZONA DE LA LESIÓN

El estudio inmunohistoquímico con el marcador de fibras nerviosas, neurofilamento tubulina III o TUJ1, muestra como las fibras nerviosas atraviesan el área de lesión (Figuras 25 y 26). Se realizó un estudio cuantitativo de las mismas en relación al área de cicatriz, área GFAP negativa. (Figuras 27).

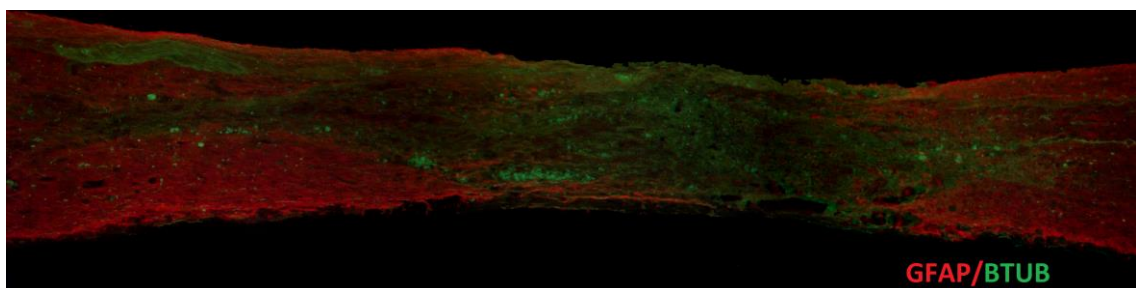


Figura 25: Imagen inmunohistoquímica que muestra el paso de fibras nerviosas (naranja) por la zona de la lesión (zona GFAP negativa) en un animal control, en menor proporción que en el caso del grupo trasplante.

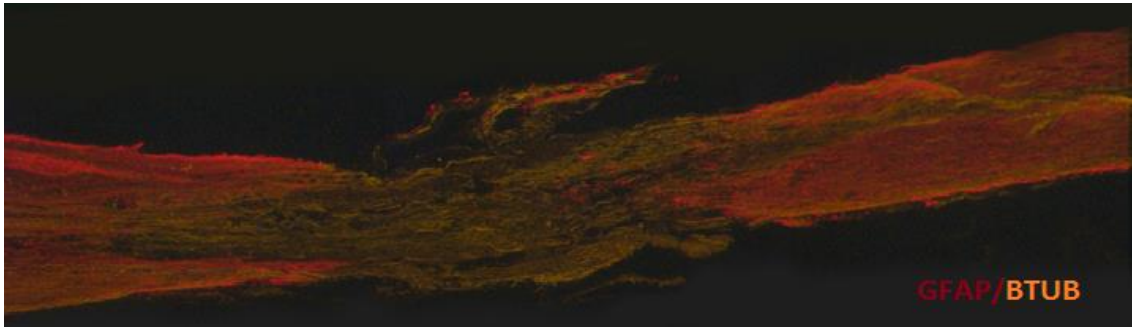


Figura 26: Imagen inmunohistoquímica que muestra el paso de fibras nerviosas (naranja) por la zona de la lesión (zona GFAP negativa) en un animal trasplante.

Se cuantificaron las fibras nerviosas presentes dentro de las áreas cicatriciales, dentro de las áreas GFAP negativas. El estudio estadístico revela que existen diferencias entre los grupos con un valor  $p < 0,0001$  con un incremento en la extensión de fibras nerviosas en el grupo con trasplante de epSPCi en comparación con el grupo control.

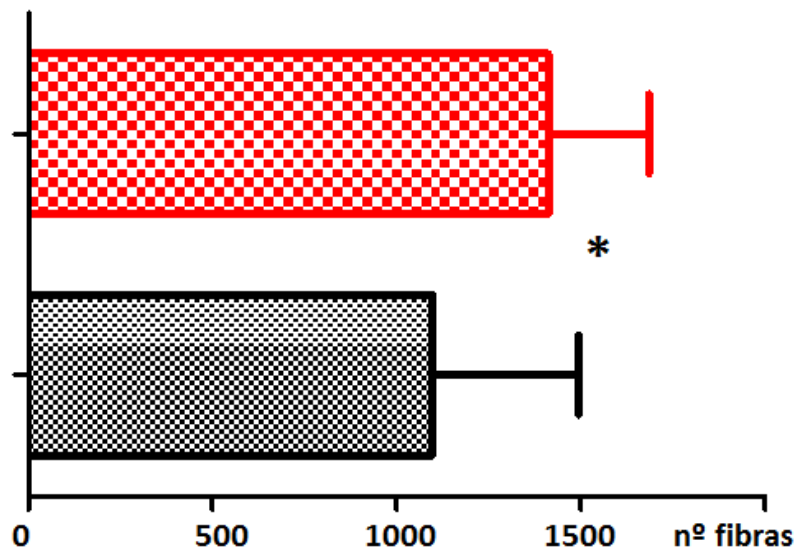


Figura 27: Grafica representativa de las medias obtenidas al analizar las fibras nerviosas presentes dentro del área cicatricial. En rojo el grupo trasplante. En negro el grupo control.

### 3.4. VALORACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL TRASPLANTE EN LA INDUCCIÓN DE REGENERACIÓN ENDÓGENA

Con el objetivo de valorar si el trasplante de epSPCi intervino en la inducción de la regeneración endógena, mediada por precursores neurales endógenos, incluso en el estadio crónico, estudiamos la expresión de SOX2, marcador de precursor neural como marcador del proceso de regeneración endógena (Figuras 28-30):

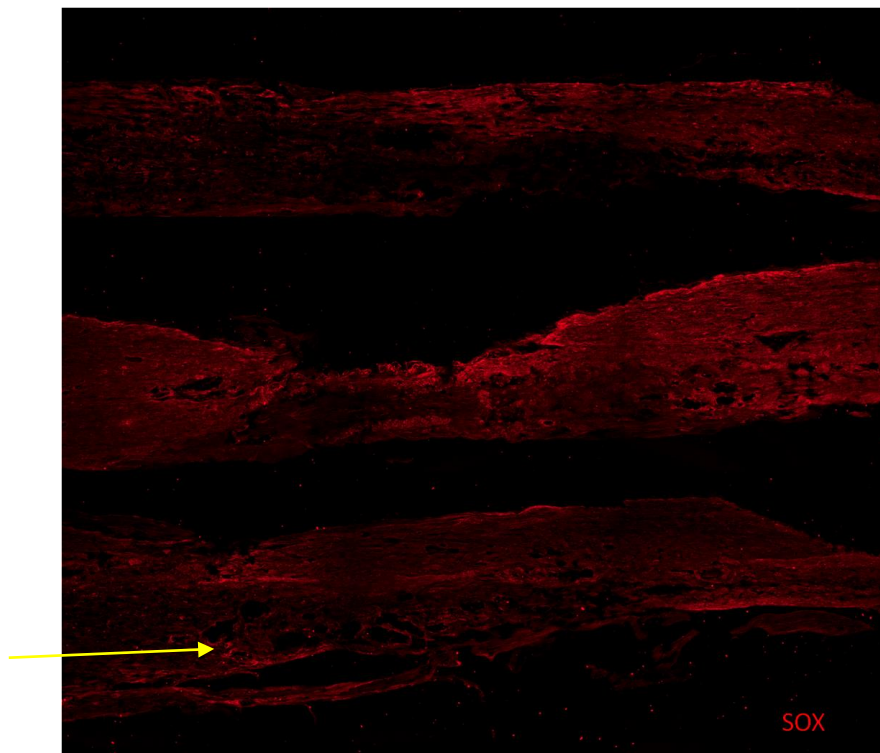


Figura 28: Imágenes inmunohistoquímicas representativas, para Sox2 de un animal control. La flecha amarilla señala un núcleo positivo.



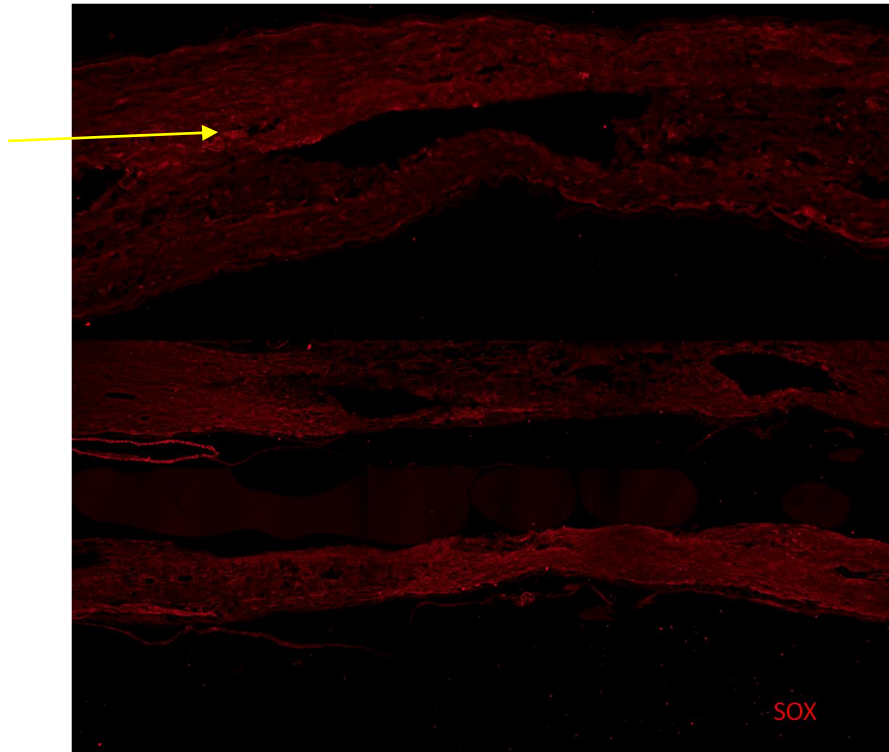


Figura 29: Imágenes inmunohistoquímicas representativas, para Sox2, de un animal con trasplante. La flecha amarilla señala un núcleo positivo.

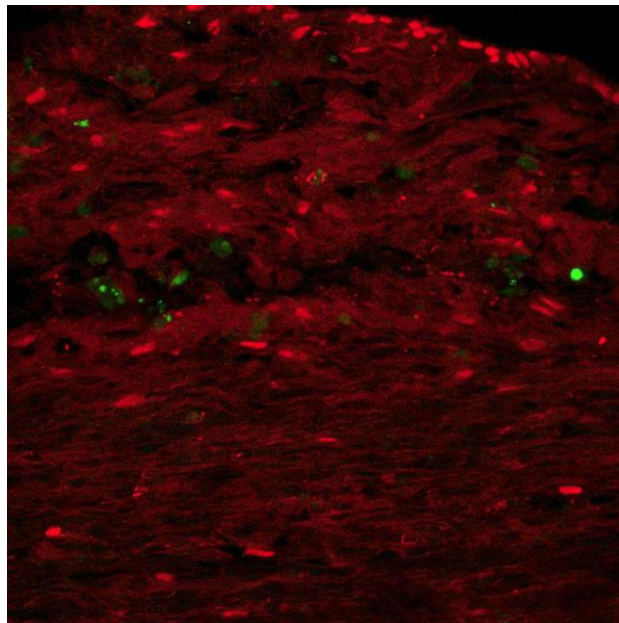


Figura 30: Imagen inmunohistoquímica representativa para SOX2 de un animal con trasplante. Obsérvense las células GFP en verde.

Se cuantificaron aquellas células, con núcleos positivos para la inmunodetección de Sox2 (factor de transcripción de expresión nuclear) en ambos grupos, control y trasplante. El estudio revela que no existen diferencias significativas entre los grupos siendo las medias obtenidas  $19643,9 \pm 6936,41$  en el grupo control y  $17924 \pm 7180,29$  en el grupo trasplante. Se obtuvo un valor  $p= 0'88$ .



# Discusión

Los estudios sobre la respuesta a la terapia celular en la lesión medular en humanos, ya sea aguda o crónica, están muy limitados debido a las complicaciones técnicas, las urgencias médicas y la disponibilidad de tejido, entre otros. Por ello, los modelos animales forman parte de la base de nuestro conocimiento sobre cómo las diferentes estrategias terapéuticas actúan en la lesión [130].

Por ello, uno de los objetivos de este estudio ha sido generar un modelo animal de lesión medular crónica adecuado y reproducible. Para ello nos apoyamos en la bibliografía existente a la hora de valorar la especie animal a utilizar así como el método más adecuado para generar la lesión medular crónica.

Los roedores son los mamíferos más utilizados en estudios experimentales de lesión medular [93]. El uso de otras especies como perro, gato o cerdo es menor debido a los requerimientos de mantenimiento así como las consideraciones éticas [39]. La elección de la rata como modelo animal de lesión medular crónica se basó, no solo por la previa existencia de diversos estudios de lesión medular, sino también en el hecho que de las técnicas de análisis funcional en esta especie están muy bien establecidas [37]. Las hembras son menos agresivas y su peso se mantiene más estable a lo largo de su edad adulta, facilitando su manejo. Los machos resultan menos apropiados como modelo de estudio en lesión medular por la complejidad anatómica en su sistema reproductor ya que dificulta y genera mayores complicaciones durante el proceso de vaciado de vejigas tras pérdida del reflejo vesical autónomo. Además, las hembras presentan el efecto Lee-Boot de forma que cuando son alojadas sin contacto con machos entran en una fase de anestro anulando las posibles variaciones hormonales [131].

Otro aspecto a valorar al generar el modelo, es el método utilizado para ello. El método utilizado, la contusión controlada, es de los métodos que más fielmente imita la lesión observada en humanos tras una contusión como las que tienen lugar en los accidentes de tráfico, una de las principales causas de lesión medular [40]. A su vez, el método por contusión a través de un sistema controlado como el que utiliza el IH Impactor, permite el control de diversos parámetros biomecánicos y la reproducibilidad de los mismos [38], lo que hace de este método un método preciso en el que se evitan las variaciones en el desplazamiento del tejido que pueden tener lugar con otros métodos [48].

Por otra parte, el modelo crónico se basa también en la temporalidad de la lesión. Tras el daño primario provocado por la lesión, tiene lugar una cascada de daños secundarios que culminan con la formación de una cicatriz glial que dificulta y limita el paso de axones a través de la zona de lesión [32]. Para establecer el periodo tras el cual la cascada de efectos secundarios se estabiliza y se establece el estadio crónico, nos basamos en la evolución de la escala del BBB, reflejo de la actividad motora autónoma evaluada en el tiempo, permitiendo el seguimiento del desarrollo de la

recuperación locomotriz espontánea y evidenciando que la cronicidad puede abarcar desde días a semanas [132]. De esta forma, la estabilización de los valores indicaba un estancamiento de la recuperación funcional asegurando así, la cronicidad de la misma. Parr y colaboradores establecieron una cronicidad más temprana. De esta forma, identificaron la fase subaguda a los 9 días y la crónica a los 28 días post lesión, en base a que la aplicación de terapias tardías proporcionaba condiciones más permisivas para la supervivencia de las células trasplantadas [111, 133], posiblemente debido a la disminución de la inflamación, así como de los mediadores inflamatorios a los 9 días tras la lesión comparados con la fase aguda[111]. Sin embargo, Beck y colaboradores fueron capaces de detectar infiltración de células inflamatorias en la médula espinal desde el día 1 hasta el día 42 tras la lesión [134].

Diferentes estrategias de terapias celulares han mostrado capacidad de neuroprotección y/o neurorestauración [80, 85, 120], pero la presencia de células madre endimarias (epSPCs) en médula espinal adulta y con capacidad de división y diferenciación a estirpes neurales y gliales sugiere que existen mecanismos endógenos celulares que deberían ser estudiados para reparar las lesiones medulares. Por este motivo decidimos estudiarlas en el modelo animal que mejor refleja la situación clínica real, el modelo animal de lesión crónica.

La terapia celular empleada se basó en el uso de células madre endimarias activadas (epSPCi). La médula espinal adulta posee células con potencial reparador, descrito en ensayos in vitro e in vivo en modelos experimentales, de célula madre neural, confirmado con estudios genéticos [119]. Las células endimarias proliferan, migran y se diferencian rápidamente en la médula espinal en mamíferos inferiores tras una lesión medular[126]. A pesar de que la mayoría de las células endimarias disminuyen significativamente en el periodo postnatal[97, 120], se ha observado la proliferación de estas células en diferentes traumas, incluyendo compresión, contusión, incisión y transección [107, 135-137]. De hecho, tras una contusión, cerca de dos millones de células son producidas en la zona de la lesión en menos de un mes, con el pico a los 3-7 días después de la lesión[138]. En la imagen 26 se puede observar el incremento de precursores neurales producidos tras la lesión medular.

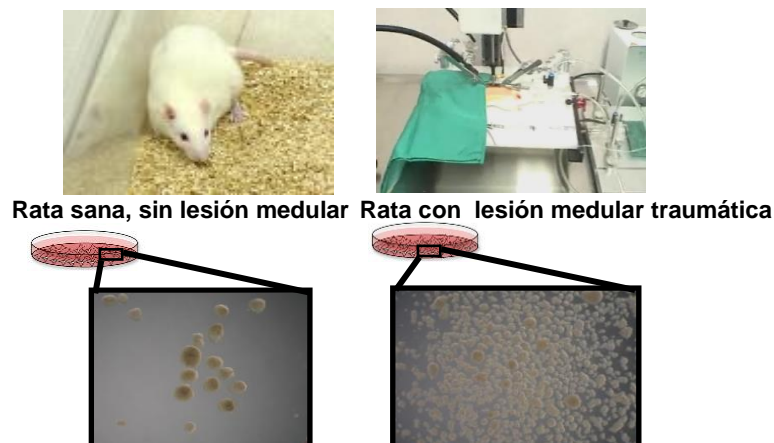


Imagen 26: Precursores neurales en la médula espinal de una rata adulta sin lesión medular (izquierda) y con lesión medular (derecha). Obsérvese el incremento de crecimiento de precursores en el animal lesionado [112]

Las células ependimarias trasplantadas fueron obtenidas de ratas SD-Tg (GFP) 2BalRrrc con sobreexpresión ubicua de la proteína fluorescente verde (GFP) para facilitar su identificación posterior en un recipiente ausente de esta proteína [137]. Con objeto de mejorar la eficiencia de la terapia celular se emplearon epSCP<sub>i</sub>, células ependimarias activadas tras lesión medular. Antecedentes previos del grupo describen en Moreno y cols. [112] que el proceso de lesión medular, con un importante proceso inflamatorio, induce la proliferación y diferenciación de los precursores neurales, epSPC. Las células ependimarias procedentes de animales con una lesión medular proliferan 10 veces más rápido in vitro que aquellas procedentes de animales sanos. Además, este proceso de activación mejora los rendimientos en los procesos de diferenciación dirigida a oligodendrocitos y a motoneuronas [112]. En definitiva, ambos procesos están asociados a la capacidad de regeneración de epSPC<sub>i</sub> de la función motora perdida tras la lesión medular. Otro aspecto importante es el método de trasplante utilizado. En nuestro estudio utilizamos el método intramedular con el fin de estudiar la supervivencia y capacidad de migración y diferenciación de las células en un estadio crónico. Diferentes estudios realizados en la fase aguda y subaguda han utilizado este método de trasplante celular [112, 139-142]. Si bien es cierto que se han estudiado otros métodos de trasplante más traslacionales a la clínica habitual, como son la vía intratecal o intravenosa [133, 143, 144]. Kim y colaboradores obtuvieron un rendimiento mayor en términos de migración e integración en el tejido de células mesenquimales de médula ósea (BMSC trasplantadas de forma intramedular frente al intravenoso [145]. Los ensayos clínicos realizados de trasplante celular en lesión medular, incluyen mayoritariamente un abordaje de inyección intramedular [84, 111, 146-148]. Sin embargo, este abordaje implica un nuevo acceso quirúrgico a la zona de lesión que en algunos casos es difícil de abordar en la clínica debido a las estructuras de estabilización vertebral en ocasiones permanentemente fijadas tras la

descompresión primaria, inmediatamente tras lesión medular. Por ello, se hace necesario el desarrollo de técnicas de trasplante alternativas más compatibles con su traslación a la realidad clínica.

Un hecho a tener en cuenta en el modelo de lesión crónica es la aparición de tejido cicatricial entorno a la zona de la lesión que nos encontramos 6 semanas después, lo que dificultó en gran medida el acceso para el trasplante intramedular. Estos hallazgos dan soporte al hecho de que esta aproximación quirúrgica de administración celular no es la más adecuada, principalmente si trasladamos estos hallazgos a la clínica habitual en medicina humana, donde también es importante tener en cuenta la propia heterogeneidad de los individuos en la evolución de las lesiones provocando una variabilidad en la degeneración y extensión de la lesión.

Para que esta técnica fuera más traslacional a la clínica, habría que refinar la técnica de administración apoyándose en otras técnicas como la resonancia magnética que facilitara la estrategia de inyección en las zonas inmediatamente colindantes a la cicatriz para garantizar mejores tasas de supervivencia del trasplante y acelerar su potencial regenerador sobre áreas de recrecimiento axonal. También se ha demostrado que la administración de precursores neurales 8 semanas tras el trasplante limita su supervivencia, siendo necesaria una neutralización de los factores inhibidores presentes en la lesión medular crónica [149].

Antes de analizar los datos funcionales obtenidos es importante conocer las limitaciones propias de los tests utilizados.

Se utilizaron la escala de recuperación funcional BBB y el análisis automatizado de la pisada. Ambos tests son eficaces en la valoración de la función locomotora pero existen también otros tests como el grid-walking o el narrow beam aplicables para valorar la recuperación funcional[49, 51], si bien es cierto que la mayoría de estos tests requieren de un aprendizaje previo y en nuestro ensayo, el tiempo de latencia entre la lesión y la aplicación del tratamiento era demasiado largo como para asegurar un buen entrenamiento previo en los animales en estos tests. Además, decidimos no realizar dicho aprendizaje previo a priori con el fin de no interferir en la evolución de la cronicidad de la lesión ya que uno de nuestros objetivos era establecer un modelo animal de lesión medular crónica adecuado. De todas formas, sí que consideramos interesante valorar otros test de comportamiento que aporten más información al respecto.

De todas formas, una de las principales desventajas de la valoración BBB es su no linealidad en la escala que la constituye, es decir, no tiene la misma importancia el salto de un número a otro si nos encontramos en los números más bajos o en los más altos de la tabla. De esta forma, no tiene la misma importancia funcional el hecho de

movilizar tres articulaciones, rotar la extremidad en la marcha o ser capaz de dar un paso con soporte plantar. Diversos grupos han empleado un “subscore” para facilitar el análisis en determinados puntos de la escala[70, 73, 150]. Los subscores revisados valoran principalmente la posición de la cola, elevada o arrastrada, la posición de los dedos de la extremidad, y el espacio entre ellos. En nuestro estudio no se consideró adecuado debido a que los animales que podrían haber sido candidatos, aquellos con 7 y 8 en el BBB, no presentaban un patrón homogéneo que nos permitiera aplicar un subscore. En la escala del BBB, las valoraciones del 7 y el 8 indican que los animales son capaces de movilizar la tres articulaciones, tobillo, rodilla y cadera, y además son capaces de posicionar la pata en posición plantar sin soportar apoyo de peso. Valorar en estos animales la posición de los dedos así como el espacio entre ellos era de gran dificultad, además de que en muchas ocasiones ambas extremidades del mismo animal no se comportaban igual.

Por otra parte, el análisis automatizado de la pisada solo puede ser realizado en aquellos animales que presenten cierta recuperación funcional puesto que este test registra los píxeles que genera cualquier superficie del animal al entrar en contacto con la superficie sobre la que se desplaza durante la marcha, por lo que aquellos animales que arrastren el abdomen o no sean capaces de apoyar las extremidades posteriores no podrán ser evaluados adecuadamente por este test. En este caso, los animales con lesión medular severa no pudieron ser estudiados en este marco.

Revisados los test aplicados pasamos a analizar los resultados obtenidos en la valoración de la función motora, la cual puede ser estudiada en dos fases, previa al trasplante y tras el trasplante.

En el pretrasplante, durante la propia evolución de la cronicidad de la lesión, se observaron diferentes evoluciones a pesar de haber realizado la misma cirugía en todos los animales. Todos los animales recibieron un impacto de 250 kdyn, pero un grupo no desarrolló el mismo grado de lesión ya que las valoraciones del BBB mostraban diferencias locomotoras importantes. Los animales afectados pertenecían a un mismo grupo de trabajo por lo que, a pesar de haber recibido la misma intensidad de impacto que el resto de animales. Cabe pensar en dos posibilidades, una es la existencia de un factor que alteró el impacto y generó una lesión más leve y otra es una evolución de regeneración espontánea diferente entre los animales. En todos los animales se evidenció el hematoma transversal indicativo de lesión medular severa, si bien es cierto que en algunos animales se tuvo que impactar entre dos y tres veces para obtener el hematoma transversal que confirmara la lesión severa, sin embargo tras el primer impacto se generó un edema que probablemente amortiguó el impacto recibido por la médula, a pesar de observarse en el ordenador gráficas de fuerza y desplazamiento adecuadas. Estudios previos confirman que un incremento en la fuerza de contusión se corresponde con una disminución de la función locomotora, de forma

que en dicho estudio los mayores déficits fueron observados al administrar 200kdyn frente al grupo que recibió 100 kdyn [48]. Por lo que, asumimos que los animales con BBB más altos y que fueron operados en 3 días consecutivos bajo las mismas condiciones del aparataje y por el mismo cirujano que había operado a los otros grupos, recibió una menor fuerza de impacto.

Por otra parte, se observa como todos los animales, incluso con diferente grado de afección medular presentan una mejoría intrínseca (Figura 1 y 4), es decir, una recuperación funcional no asociada al tratamiento. Hay que destacar que durante este periodo de cronificación no se realizaron terapias rehabilitadoras que podrían haber alterado o favorecido la propia plasticidad de la médula espinal. Las terapias de rehabilitación activa tras la lesión medular favorecen la recuperación de la función sensorial, motora y autónoma, así como la normalización de reflejos, el crecimiento axonal y neuronal, e incluso la formación de sinapsis [74].

En este caso, la recuperación funcional observada está directamente relacionada con la regeneración espontánea (plasticidad) que tiene lugar tras la propia lesión medular. De hecho, en el 40 % de pacientes con lesión medular, así como en modelos animales sin tratamiento e incluso ante la presencia de moléculas inhibitoras en la zona de la lesión. Esto se debe a la habilidad neuronal de reorganizar su conectividad anatómica y funcional en respuesta a la nueva condición ambiental [151]. Esta misma regeneración espontánea se observa en nuestros animales del estudio, los cuales son capaces de pasar de un estadio en el que no presentan ninguna movilidad de las extremidades posteriores, valoración 0 en el BBB, a un estadio en el que son capaces de movilizar entre 2 y 3 articulaciones cuando la lesión es severa, e incluso posicionar la extremidad de forma adecuada para iniciar el paso, en lesiones más leves.

Se confirma, así, la existencia de regeneración espontánea tras una lesión medular, apoyando el concepto de “neuroplasticidad aguda” ya valorado en otros estudios con potenciales evocados que indican que la lesión medular cambia rápidamente las interacciones en las conexiones ascendentes[152]. El cuerpo y la corteza cerebral están en constante e íntima interacción, pero los cambios corticales son solo un componente de una combinación de cambios moleculares, estructurales y funcionales a distintos niveles de la corteza somatosensorial [152]. Mientras crecen nuevas conexiones se producen diversos mecanismos como cambios en la excitabilidad de la membrana neuronal, la eliminación de la inhibición local y cambios en la eficacia sináptica [153].

A su vez y como ya hemos comentado anteriormente tras la lesión medular tiene lugar una división celular endógena importante incluyendo el aumento por activación de la población de células ependimarias, células precursoras, y la inducción de una subpoblación de nuevas células en división que desarrollan marcadores de oligodendrocitos maduros en zonas de desmielinización acompañado además de

nuevos astrocitos, un fenómeno importante para reestablecer la estabilidad del parénquima y la barrera hematoencefálica tras la lesión [31, 154].

Estos hechos que reflejan la plasticidad medular y la regeneración endógena que tiene lugar tras una lesión medular, justificarían la recuperación funcional que presentan nuestros animales de estudio en la fase aguda de la lesión medular, antes de estabilizarse y alcanzar el estadio crónico. Dicho estadio que se produce sin alcanzar una recuperación funcional completa, evidencia la necesidad de terapias o estrategias que modulen la plasticidad y favorezcan la recuperación funcional. La regeneración endógena

Otro aspecto importante es la no existencia de diferencias entre los grupos de estudio con igual grado de lesión medular en esta fase. De esta forma, podemos decir que los animales de estudio, controles o trasplantes, inician la fase postrasplante en las mismas condiciones locomotoras habiéndose comportado de igual forma durante la cronificación y sin presentar diferencias entre sí. Este hecho ocurre en ambos grados de lesión medular, confirmando que la regeneración endógena tiene lugar de igual forma sea cual sea el grado de lesión

Valorando la eficacia de las células endimarias en la recuperación de la función locomotora, tanto en la lesión severa como en la lesión leve, los estudios estadísticos confirman que las diferencias entre las medias de los grupos son significativas, es decir, que la utilización de dichas células (grupos trasplante) frente a la no utilización (grupos control) sí que es efectiva para la recuperación de la función locomotora.

La reorganización cortical y la recuperación funcional pueden tener lugar en estadios crónicos tanto en animales como en humanos [55], tal y como ocurre en los grupos control, tanto de una lesión severa como de una lesión leve, hasta un estado crónico donde la recuperación espontánea se enlentece significativamente, haciéndose necesaria una intervención terapéutica adicional, como es el trasplante de epSPCi, que mejora significativamente la recuperación en el grupo trasplantado versus su correspondiente grupo control. Si bien es cierto, que la terapia llega a una meseta en la evolución de la función locomotora, no consiguiendo una recuperación funcional completa. Esto podría deberse a una acción inhibitoria del crecimiento axonal por parte de los proteoglicanos presentes en la cicatriz glial, claramente instaurada tras 6 meses de la lesión. Los glicosaminoglicanos presentes en los CSPG que se localizan en la cicatriz glial inhiben el crecimiento de las neuritas. En mamíferos adultos, los CSPGs se secretan rápidamente tras la lesión, en menos de 24 horas, y son capaces de persistir durante meses [155-157]. Por otra parte, es importante valorar la supervivencia celular, pues es posible que las células mueran a las semanas de la administración, lo que podría implicar la estabilización de la recuperación funcional. La hipoxia, la isquemia, la necrosis tisular, los radicales libre, las células inflamatorias y las



sustancias citotóxicas pueden favorecer la no supervivencia celular [12, 158]. De esta forma, serían necesarios estudios a diferentes tiempos para valorar la viabilidad, así como establecer posibles pautas de dosificación, siendo necesarios varios trasplantes.

Esta estabilización resalta la complejidad de la lesión medular y la necesidad de estudiar terapias combinatorias que ejerzan un efecto sinérgico en la recuperación funcional. Tras el trasplante todos los animales fueron sometidos a terapias de rehabilitación, tanto pasiva como activa, con el fin de favorecer la plasticidad y la recuperación funcional [74]. Estudios previos ya han comprobado la importancia y la eficacia de terapias rehabilitadoras en el modelo animal, observándose una recuperación parcial de la locomoción del tercio posterior tras ejercicio en cinta andadora [65]. Recientemente, de hecho se describe una relación directa entre la mejora de la supervivencia del trasplante cuando los animales son rehabilitados activamente [159]. De hecho, en los animales control del grupo de lesión medular leve observamos cierta recuperación parcial de la locomoción que podría deberse a la aplicación de estas terapias, puesto que en el momento del trasplante la recuperación funcional está estabilizada. A pesar de ello, los controles de la lesión severa no consiguen mejorar significativamente los valores de BBB, lo que indicaría que la rehabilitación es capaz de favorecer e inducir dicha recuperación parcial en los casos en los que el grado de lesión no es severo. Sin embargo, cuando se trasplantan las células sí se consiguen valores de BBB mayores, pudiendo existir una sinergia entre la rehabilitación y el uso de esta terapia celular. Estudios de terapias físicas describen cambios a nivel celular caracterizados por una disminución de moléculas inhibitoras, un aumento en la expresión de factores neurotróficos y una mejora en la actividad electrofisiológica [66, 67], lo que junto con la capacidad de proliferación y diferenciación de las células ependimarias [119], podría justificar nuestros buenos resultados.

Estas diferencias observadas entre grupos, sea la lesión severa o leve, confirman que el uso de células ependimarias mejora significativamente la recuperación de la función motora.

Los resultados obtenidos en el estudio funcional con el análisis automatizado de la pisada (Figura 6 y 7) revelan la existencia de diferencias en el uso de las extremidades posteriores entre animales control y animales trasplantados. En el modelo de lesión medular, el test automático de la pisada es útil, principalmente, en la valoración del uso de las extremidades. De esta forma, el test mide las superficies de contacto en la marcha, reflejando mayores superficies de contacto, ya sean las extremidades, el abdomen o la cola, cuanto más arrastran los animales, y por tanto, cuanto peor caminan. Los resultados se muestran en píxeles como superficie de contacto, de tal forma que los animales trasplante muestran menor superficie de contacto, y por tanto una mejor locomoción que los animales control. A su vez, estos resultados indican que

hay un mejor soporte de peso, importante para desarrollar un buen patrón en la marcha. También se valoran otras superficies importantes para una marcha correcta, como son el contacto del abdomen, que indicaría soporte de peso, y el contacto de la cola, que podría interferir en el equilibrio. Los resultados muestran una mejoría en la locomoción así como en el soporte de peso en los animales trasplantados, corroborando resultados observados en estudios previos en fase aguda [112]. Estas diferencias confirman de nuevo la recuperación funcional en el grupo trasplantado.

El estudio macroscópico realizado a las médulas una vez extraídas revela que el tejido medular de las médulas que habían recibido el trasplante presentaba una consistencia similar a una médula sana, eran más consistentes que las médulas que habían sido lesionadas y no trasplantadas. Así, un 90% de los animales trasplantados presentaban la médula con consistencia similar a la médula sin lesión, frente un 66% en los animales control. El grupo trasplantado podría haber intervenido en la remodelación del parénquima recuperando “consistencias” similares a las de médulas sanas tal y como de hecho se describe en otros estudios de trasplante celular tras lesión medular [31, 154]. Otro dato a comentar es la extensión de la zona de lesión, siendo inferior a 2 mm en un 70% de los animales trasplantados, frente al 55% de los animales control.

A su vez, es importante estudiar el espesor medular ya que puede alterarse debido a la degeneración del tejido neural, la formación de la cicatriz glial y la pérdida importante de células [32], permitiéndonos valorar cuantitativamente si el trasplante de epSPCis favorece un enlentecimiento y/o retracción de la degeneración crónica del tejido medular. Así, el estudio de espesor del epicentro de la lesión y adyacentes se realizó en los cortes longitudinales de todo el cordón medular.

El grupo de los animales trasplantados, a pesar de tener un espesor inferior a los animales controles, presentan una estructura significativamente más uniforme, observándose además menor diferencia en el espesor en la zona de la lesión. No ocurre así en los animales controles, en los que se aprecia una disminución del espesor total en la zona donde se recibió el impacto, con una marcada pérdida de masa medular restringida al epicentro de lesión. Whang y cols. en el 2009 obtuvieron resultados similares. Utilizaron una terapia diferente en un modelo de lesión medular completa, sin embargo, al valorar el tejido repuesto en la zona de la lesión describieron un menor espesor de tejido en los animales controles. Estos resultados podrían estar en concordancia con los nuestros ya que el menor espesor en la zona de lesión que observamos en nuestros controles podría estar justificado por esa menor reposición de tejido, o lo que es lo mismo, una menor regeneración en la zona de lesión.

El hecho de que las médulas trasplantadas tengan de forma uniforme un espesor menor podría estar debido a una modificación en la morfología cilíndrica de la misma,

de forma que se produjera una modificación estructural que provocara una morfología elipsoidal. Este fenómeno lo hemos observado y cuantificado en estudios similares, en trasplante de epSPCi en el modelo de lesión en fase aguda (resultados pendientes de publicar).

En los grupos con lesión medular leve, sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos. En este caso, la degeneración global era menor que en el grupo de lesión severa.

Posteriormente, en el estudio del área desestructurada o pérdida de la estructura anatómica normal no se revelaron cambios significativos entre grupos. En la lesión crónica, la desorganización y desestructuración funcional es muy extensa [8, 32, 108, 134, 160] y a pesar de que los animales tras el trasplante muestran homogeneidad a lo largo del epicentro de la lesión en su espesor medular, esto no es debido a una mejora en la reestructuración de las áreas bien conformadas de sustancia blanca y gris en la región de la lesión. El estudio de espesores y el estudio de fibras nerviosas, que posteriormente comentaremos, indican que sí que hay una regeneración del tejido, pero el tejido no es capaz de adoptar una estructura normal.

Los estudios de microscopía electrónica confirman que continúan existiendo grandes cúmulos de células fagocíticas en la zona de lesión, intentando eliminar los restos de células muertas. A pesar de existir datos que afirman que la inflamación temprana, entorno a los 14-28 días tras la lesión, modulan favorablemente la mielinización de la médula espinal lesionada, la reposición de mielina dañada es un proceso bifásico en el que primero se deben eliminar los restos de mielina y posteriormente remielinizar. Así, la degradación de mielina que tiene lugar tras la lesión medular se localiza en torno al área de lesión, y parece que inhibe incluso la maduración de precursores de oligodendrocitos [161, 162] A su vez, se produce una infiltración de macrófagos en el tejido para eliminar los restos de mielina y células muertas [8]

Tras realizar una valoración semicuantitativa a nivel de ultraestructura, se observaron un mayor número de estructuras compatibles con mielina desorganizada en los animales control comparativamente con rete de respecto a aquellos que recibieron el trasplante, en el epicentro de la lesión. En aquellos animales con trasplante de epSPCi se observan más axones mielinizados y oligodendrocitos en el trasplante que en el control. Estudios en conejos revelaron un incremento del índice mitótico en la capa endimaria asociada a un incremento en el diámetro del canal central en el epicentro de la lesión [163]. En nuestro caso, el diámetro del canal no se pudo valorar puesto que el tejido estaba completamente desestructurado.

Existe una sostenida relación entre aquellas terapias que han mostrado recuperación funcional locomotriz y aumento significativo en la regeneración de novo del sistema vascular [159]. Por otra parte, encontramos un incremento cualitativo de estructuras compatibles con vasos sanguíneos en el grupo trasplante frente al grupo control.

La cicatriz glial está formada principalmente por una acumulación de astrocitos fibrosos hipertróficos conocidos como astrocitos reactivos que, unido a los efectos de las moléculas inhibitoras como la proteína Nogo-A, MAG o a la extensa distribución de proteoglicanos, hace que la cicatriz se convierta en una estructura muy difícil de penetrar [27, 28] [30].

Diversos estudios han mostrado que las células endimarias son capaces de proliferar tras la lesión medular e inducir la formación de otras células nerviosas favoreciendo así la recuperación funcional sin contribuir a la formación de la cicatriz glial. [111, 112, 118]. Sin embargo, no existen evidencias claras que documenten el control o retracción de dicha cicatriz glial tras trasplante de precursores adultos en una lesión crónica.

La delimitación del área cicatricial con el marcador GFAP se realizó con el objetivo de valorar la extensión de la cicatriz formada en los animales control en comparación con los animales trasplantados. Los resultados obtenidos muestran que las células no son capaces de modificar el tamaño cicatricial establecido lo suficiente como para generar diferencias entre ambos grupos. Además en este caso, encontramos una gran heterogeneidad en la extensión de la cicatriz entre los diferentes grupos. Así, aun habiendo diferencias entre grupos en cuanto a la recuperación funcional y en cuanto al espesor total de la médula, el tamaño de la cicatriz parece mantenerse estable.

En definitiva, resulta difícil, retraer la extensión de una cicatriz ya formada y establecida en un estado crónico. Sin embargo, encontramos gran parte del trasplante de epSPCi alojado en la propia cicatriz, lo que favorecerá un ambiente más propicio y menos inhibitorio para la regeneración axonal a pesar de permanecer constante la extensión de la zona cicatricial. De hecho, un estudio con BMSCs en lesión medular crónica observó un marcaje GFAP entorno a la zona de lesión e incluso 800µm alrededor de la lesión, tres meses después de haberse producido la lesión medular [160].

Diversos estudios han confirmado la reducción del área cicatricial junto con una recuperación funcional tras el empleo de moléculas que actúan directamente sobre los inhibidores del crecimiento axonal como la condroitinasa, que junto con el TPA consiguen reducir significativamente el tamaño de la cicatriz glial, así como favorecer la regeneración axonal [164]. Otros, utilizan estas moléculas deglicosiladoras de los proteoglicanos junto con terapias celulares. En ellos, se ha confirmado la recuperación

funcional y la regeneración axonal, así como la reducción de la cicatriz glial, combinándolos con células de Schwann y con células mesenquimales [165, 166]).

A su vez, y a pesar de no haberse reducido la cicatriz, las células trasplantadas en fase crónica han sido capaces de migrar a lo largo de la médula espinal e incluso, atravesar la cicatriz glial, tal y como se muestra en la figura 22. Estudios demuestran que a pesar de existir una importante reducción de la señalización celular en el estadio crónico, existen evidencias de su existencia y actividad. De esta forma, Parr y colaboradores mostraron como precursores neurales eran capaces de migrar a la zona de la lesión ya fueran trasplantados por abordaje intramedular rostral o caudal a la lesión [111].

No se ha realizado un estudio de supervivencia celular semicuantitativo, con marcadores específicos de muerte celular, sin embargo se observa como las células trasplantadas 4 meses antes del estudio histológico se encuentran mayoritariamente agregadas, condensadas y con morfología asociada con células apoptóticas. En futuros ensayos, realizaremos estudios histológicos a tiempos más cortos tras el trasplante con el objeto de describir el comportamiento de migración y supervivencia del mismo. Ya que, tal y como hemos mostrado en el grupo trasplante, las células han provocado una mejoría en la función locomotora, asociado con cambios significativos en el estudio histológico e inmunohistoquímico. Probablemente el trasplante celular es extemporáneo y su viabilidad es limitada aunque eficiente durante las primeras semanas postrasplante. Estudios en los que se ha realizado el trasplante en fase aguda han mostrado supervivencia de las células trasplantadas en diferentes grados [111, 112], mientras uno de ellos en los que su aplicación se realizó en los diferentes estadios, obtuvo tasas de supervivencia menores en las fases subaguda y crónica, las cuales, a su vez no presentaban diferencias entre sí, lo que indicaba que la muerte celular tenía lugar principalmente en la fase aguda, en la que existe una infiltración masiva de células inflamatorias que afecta directamente a la supervivencia celular.

La baja supervivencia de las células trasplantadas podría explicarse por la existencia de una escasez de señales tróficas en la zona de lesión o una disminución de la red vascular en el momento de su administración y durante los 4 meses de estudio. El trasplante se realizó directamente sobre la zona de lesión, en el área compatible con la cicatriz glial, en un tejido atrófico [111], con un microambiente muy tóxico. Estrategias futuras encaminadas a mejorar la supervivencia del trasplante incluirían la inyección de las células más alejadas de la zona de la cicatriz.

El estudio inmunohistoquímico, del marcaje con el neurofilamento Tubulina III donde se valoran las fibras nerviosas presentes dentro del área de lesión (y de la cicatriz glial, delimitado por la expresión de GFAP) muestra que existen más fibras en el grupo trasplantado que en el control, a pesar de nuevo, de la gran heterogeneidad

interindividuo existente en ambos grupos. Por una parte, confirmamos que los animales trasplantados con epSPCi presentan un mayor número de fibras nerviosas en concordancia con la mejora observada en su actividad locomotora. Y por otra, confirmamos que el paso de fibras nerviosas no está condicionado a la reducción de la extensión de la cicatriz glial. De hecho, un estudio realizado por Lu y colaboradores en el 2006 ya demostró que los axones eran capaces de atravesar la cicatriz glial e incluso crecer hasta rellenar las cavidades generadas por la lesión en un estudio de lesión medular crónica [160].

Este hecho junto con la presencia de células procedentes del trasplante en el área de lesión hace pensar que se genera un ambiente más favorecedor para la supervivencia celular con mayor número de fibras nerviosas atravesando la cicatriz asociadas, además, a la presencia de células endimarias trasplantadas. Se ha demostrado que las NSCs son capaces de secretar diversos factores como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el derivado cerebral (BDNF) y el glial (GDNF), in vitro e in vivo [26, 109]. Resultados previos del laboratorio demuestran que las epSPCi secretan significativamente más GDNF que aquellas epSPC procedentes de animales sanos. La actividad paracrina del trasplante, con secreción de factores neurotróficos, es una de las hipótesis más relevantes que justificaría el aumento de las fibras nerviosas en la zona de lesión en los animales trasplantados con epSPCi.

Otra potencial hipótesis que manejamos fue el hecho de que el trasplante podría inducir de forma significativa una reactivación de precursores endógenos, marcados con el factor de transcripción de células precursoras Sox2. Sin embargo, la cuantificación, en el momento del sacrificio, cuatro meses tras el trasplante, no reveló cambios significativos en la población Sox2 positiva ente ambos grupos. Sin embargo, aún no descartamos esta posibilidad. Para poder revelar si los cambios funcionales inducidos tras el trasplante fueron acompañados de una inducción en la plasticidad y capacidad de regeneración endógena, nuevos ensayos con análisis a tiempos más cortos tras el trasplante serán necesarios.

Por otra parte, tras realizar un estudio de correlación entre diversas variables, comparando los resultados obtenidos en el test BBB y la cuantificación del espesor del tejido medular, así como el BBB y el número de fibras nerviosas, se encontraron tendencias paralelas aunque no llegó a ser en ningún caso una correlación estadísticamente relevante.

# Conclusiones

1. El modelo de contusión traumática inducido con el Impactor Infinity Horizon en ratas Sprague-Dawley adultas permite generar un modelo de lesión medular crónica, severa o leve, para el estudio funcional e histopatológico consecuente con la lesión así como para el estudio y aplicación de diferentes terapias.
2. Tras la lesión medular en rata se produce una regeneración espontánea, debida en gran parte por la plasticidad intrínseca de la médula espinal. Sin embargo, dicha plasticidad mejora la función locomotora alcanzando un límite máximo.
3. El trasplante de células endimarias activadas, procedentes de donantes que han sufrido una lesión medular, epSPCi, mejora significativamente la función locomotora de animales con lesiones medulares severas y crónicas.
4. El trasplante de epSPCi rescata la función locomotriz de forma rápida pero limitada, siendo necesarias otras terapias coadyuvantes o sinérgicas que permitan rescatar en mayor grado la actividad neuronal perdida.
5. El trasplante de epSPCi en una lesión medular crónica conduce a una mejor y más uniforme distribución anatómica, en relación al tejido sano, en el espesor medular en el epicentro de la lesión
6. El trasplante de células endimarias por inyección intramedular tiene capacidad de migrar y mantenerse residente en la zona de la lesión y de la cicatriz glial hasta cuatro meses tras el trasplante.
7. El trasplante de epSPCi no redujo la extensión de la cicatriz glial con respecto al grupo de animales sin trasplante.
8. El trasplante de epSPCi favorece una mayor presencia de fibras nerviosas, cruzando la cicatriz glial
9. El grupo de animales trasplantados con epSPCi presentan abundantes oligodendrocitos produciendo envolturas nuevas de mielina así como un mayor número de nuevos vasos sanguíneos



# Bibliografía

1. Urdzikova, L., et al., *Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats*. J Neurotrauma, 2006. **23**(9): p. 1379-91.
2. Williams, P.L.a.W.P., *Neurología*, in *Gray's Anatomy*, C. Livingstone, Editor. 1996: Edimburgo.
3. Paxinos, G., *The rat nervous system*. 1995, Australia: Academic Press.
4. Squire, L.B., D; Bloom, F; du Lac, S; Ghosh, A; Spitzer, N., *Cellular Components of Nervous Tissue*, in *Fundamental Neuroscience*, E. Inc., Editor. 2008, Elsevier Inc. p. 41-53.
5. Liu, D., *An experimental model combining microdialysis with electrophysiology, histology, and neurochemistry for studying excitotoxicity in spinal cord injury. Effect of NMDA and kainate*. Mol Chem Neuropathol, 1994. **23**(2-3): p. 77-92.
6. Ray, S.K., C.E. Dixon, and N.L. Banik, *Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury*. Histol Histopathol, 2002. **17**(4): p. 1137-52.
7. Dumont, R.J., et al., *Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms*. Clin Neuropharmacol, 2001. **24**(5): p. 254-64.
8. Oyinbo, C.A., *Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2011. **71**(2): p. 281-99.
9. Fehlings, M.G. and D.H. Nguyen, *Immunoglobulin G: a potential treatment to attenuate neuroinflammation following spinal cord injury*. J Clin Immunol, 2010. **30 Suppl 1**: p. S109-12.
10. Bareyre, F.M. and M.E. Schwab, *Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays*. Trends Neurosci, 2003. **26**(10): p. 555-63.
11. Catherine T. Liverman, *Spinal Cord Injury: progress, promise and priorities*. 2005, Washington, DC: The National Academy Press
12. Popovich, P.G. and T.B. Jones, *Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics*. Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(1): p. 13-7.
13. Schwartz, M. and J. Kipnis, *Protective autoimmunity: regulation and prospects for vaccination after brain and spinal cord injuries*. Trends Mol Med, 2001. **7**(6): p. 252-8.
14. Xiong, Y., A.G. Rabchevsky, and E.D. Hall, *Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury*. J Neurochem, 2007. **100**(3): p. 639-49.
15. Xu, W., et al., *Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury*. Spinal Cord, 2005. **43**(4): p. 204-13.
16. Sullivan, P.G., M.B. Thompson, and S.W. Scheff, *Cyclosporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury*. Exp Neurol, 1999. **160**(1): p. 226-34.

17. JW, O., *Neurotoxicity of excitatory amino acids*, in *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. 1976, Raven Press: New York.
18. Beattie, M.S., A.A. Farooqui, and J.C. Bresnahan, *Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury*. *J Neurotrauma*, 2000. **17**(10): p. 915-25.
19. Ray, S.K., E.L. Hogan, and N.L. Banik, *Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2003. **42**(2): p. 169-85.
20. Sekhon, L.H. and M.G. Fehlings, *Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2001. **26**(24 Suppl): p. S2-12.
21. Cuzzocrea, S., et al., *Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury*. *Pharmacol Rev*, 2001. **53**(1): p. 135-59.
22. Guly, H.R., O. Bouamra, and F.E. Lecky, *The incidence of neurogenic shock in patients with isolated spinal cord injury in the emergency department*. *Resuscitation*, 2008. **76**(1): p. 57-62.
23. Paterniti, I., et al., *Treatment with green tea extract attenuates secondary inflammatory response in an experimental model of spinal cord trauma*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2009. **380**(2): p. 179-92.
24. Pradillo, J.M., et al., *TNFR1 upregulation mediates tolerance after brain ischemic preconditioning*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005. **25**(2): p. 193-203.
25. Rossignol, S., et al., *Spinal cord injury: time to move?* *J Neurosci*, 2007. **27**(44): p. 11782-92.
26. Silva, N.A., et al., *From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury*. *Prog Neurobiol*, 2014. **114**: p. 25-57.
27. Domeniconi, M., et al., *Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth*. *Neuron*, 2002. **35**(2): p. 283-90.
28. Fouad, K., V. Dietz, and M.E. Schwab, *Improving axonal growth and functional recovery after experimental spinal cord injury by neutralizing myelin associated inhibitors*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001. **36**(2-3): p. 204-12.
29. Vinson, M., et al., *Myelin-associated glycoprotein interacts with ganglioside GT1b. A mechanism for neurite outgrowth inhibition*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(23): p. 20280-5.
30. Fawcett, J.W. and R.A. Asher, *The glial scar and central nervous system repair*. *Brain Res Bull*, 1999. **49**(6): p. 377-91.
31. Faulkner, J.R., et al., *Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury*. *J Neurosci*, 2004. **24**(9): p. 2143-55.
32. Caballero, S.N.-S., M., *Fisiopatología de la lesión medular. Revision de literatura*. *Vet. Mex*, 2005. **36**(1): p. 75-86.
33. Muñoz Quiles, C., *Trasplante de glía envolvente olfatoria para reparar lesiones crónicas de la médula espinal de ratas adultas: de roedores a primates in Instituto de Biomedicina*. 2007, Universidad de Valencia: Valencia. p. 316.
34. Blight, A.R., et al., *The effects of 4-aminopyridine on neurological deficits in chronic cases of traumatic spinal cord injury in dogs: a phase I clinical trial*. *J Neurotrauma*, 1991. **8**(2): p. 103-19.

35. Crowe, M.J., et al., *Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys*. Nat Med, 1997. **3**(1): p. 73-6.
36. Wells, J.E., et al., *Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice*. Brain, 2003. **126**(Pt 7): p. 1628-37.
37. Jakeman, L., Ma, M., Stokes, B., *Considerins the use of transgenic mice in spinal cord research*, in *Traumatic CNS Injury*, P. Press, Editor. 2001. p. 180-201.
38. Kundi, S., R. Bicknell, and Z. Ahmed, *The role of angiogenic and wound-healing factors after spinal cord injury in mammals*. Neurosci Res, 2013. **76**(1-2): p. 1-9.
39. Talac, R., et al., *Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies*. Biomaterials, 2004. **25**(9): p. 1505-10.
40. Onifer, S.M., A.G. Rabchevsky, and S.W. Scheff, *Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery*. ILAR J, 2007. **48**(4): p. 385-95.
41. Kang, K.N., et al., *Regeneration of completely transected spinal cord using scaffold of poly(D,L-lactide-co-glycolide)/small intestinal submucosa seeded with rat bone marrow stem cells*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(17-18): p. 2143-52.
42. Fan, J., et al., *Neural regrowth induced by PLGA nerve conduits and neurotrophin-3 in rats with complete spinal cord transection*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2011. **97**(2): p. 271-7.
43. Guo, X., et al., *The effect of growth factors and soluble Nogo-66 receptor protein on transplanted neural stem/progenitor survival and axonal regeneration after complete transection of rat spinal cord*. Cell Transplant, 2012. **21**(6): p. 1177-97.
44. Rivlin, A.S. and C.H. Tator, *Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat*. Surg Neurol, 1978. **10**(1): p. 38-43.
45. Lim, J.H., et al., *Establishment of a canine spinal cord injury model induced by epidural balloon compression*. J Vet Sci, 2007. **8**(1): p. 89-94.
46. Somerson, S.K. and B.T. Stokes, *Functional analysis of an electromechanical spinal cord injury device*. Exp Neurol, 1987. **96**(1): p. 82-96.
47. Pearse, D.D., et al., *Histopathological and behavioral characterization of a novel cervical spinal cord displacement contusion injury in the rat*. J Neurotrauma, 2005. **22**(6): p. 680-702.
48. Scheff, S.W., et al., *Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device*. J Neurotrauma, 2003. **20**(2): p. 179-93.
49. Zhang, P., et al., *Hyperthermic preconditioning protects against spinal cord ischemic injury*. Ann Thorac Surg, 2000. **70**(5): p. 1490-5.
50. Watson, B.D., et al., *Photochemically induced spinal cord injury in the rat*. Brain Res, 1986. **367**(1-2): p. 296-300.
51. Cameron, T., et al., *Photochemically induced cystic lesion in the rat spinal cord. I. Behavioral and morphological analysis*. Exp Neurol, 1990. **109**(2): p. 214-23.
52. Berens, S.A., et al., *Evaluation of the pathologic characteristics of excitotoxic spinal cord injury with MR imaging*. AJNR Am J Neuroradiol, 2005. **26**(7): p. 1612-22.

53. Popovich, P.G., et al., *The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(7): p. 623-33.
54. Liu, N.K., et al., *A novel role of phospholipase A2 in mediating spinal cord secondary injury*. Ann Neurol, 2006. **59**(4): p. 606-19.
55. Ding, Y., A.J. Kastin, and W. Pan, *Neural plasticity after spinal cord injury*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(11): p. 1441-50.
56. Taupin, P., *Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system: functionality and potential clinical interest*. Med Sci Monit, 2005. **11**(7): p. RA247-252.
57. Taupin, P., *Adult neurogenesis in mammals*. Curr Opin Mol Ther, 2006. **8**(4): p. 345-51.
58. Taupin, P., *HuCNS-SC (StemCells)*. Curr Opin Mol Ther, 2006. **8**(2): p. 156-63.
59. Taupin, P., *BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation*. Brain Res Rev, 2007. **53**(1): p. 198-214.
60. Butovsky, O., et al., *Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective*. Mol Cell Neurosci, 2005. **29**(3): p. 381-93.
61. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
62. Fehlings, M.G. and R. Vawda, *Cellular treatments for spinal cord injury: the time is right for clinical trials*. Neurotherapeutics, 2011. **8**(4): p. 704-20.
63. Ohta, M., et al., *Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation*. Exp Neurol, 2004. **187**(2): p. 266-78.
64. Lynskey, J.V., A. Belanger, and R. Jung, *Activity-dependent plasticity in spinal cord injury*. J Rehabil Res Dev, 2008. **45**(2): p. 229-40.
65. Van Meeteren, N.L., et al., *Locomotor recovery after spinal cord contusion injury in rats is improved by spontaneous exercise*. J Neurotrauma, 2003. **20**(10): p. 1029-37.
66. Hutchinson, K.J., et al., *Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats*. Brain, 2004. **127**(Pt 6): p. 1403-14.
67. Shihabuddin, L.S., et al., *Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus*. J Neurosci, 2000. **20**(23): p. 8727-35.
68. Sedy, J., et al., *Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats*. Neurosci Biobehav Rev, 2008. **32**(3): p. 550-80.
69. Tarlov, I.M., *Spinal cord compression studies. III. Time limits for recovery after gradual compression in dogs*. AMA Arch Neurol Psychiatry, 1954. **71**(5): p. 588-97.
70. Metz, G.A., et al., *Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats*. Brain Res, 2000. **883**(2): p. 165-77.
71. Bignami, G., *Economical test methods for developmental neurobehavioral toxicity*. Environ Health Perspect, 1996. **104 Suppl 2**: p. 285-98.

72. Basso, D.M., M.S. Beattie, and J.C. Bresnahan, *A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats*. J Neurotrauma, 1995. **12**(1): p. 1-21.
73. Popovich, P.G., et al., *Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury*. Exp Neurol, 1999. **158**(2): p. 351-65.
74. Hamers, F.P., et al., *Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries*. J Neurotrauma, 2001. **18**(2): p. 187-201.
75. Hamers, F.P., G.C. Koopmans, and E.A. Joosten, *CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury*. J Neurotrauma, 2006. **23**(3-4): p. 537-48.
76. Fehlings, M.G. and C.H. Tator, *The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury*. Exp Neurol, 1995. **132**(2): p. 220-8.
77. Meyer, O.A., et al., *A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice*. Neurobehav Toxicol, 1979. **1**(3): p. 233-6.
78. Kim, D., et al., *Transplantation of genetically modified fibroblasts expressing BDNF in adult rats with a subtotal hemisection improves specific motor and sensory functions*. Neurorehabil Neural Repair, 2001. **15**(2): p. 141-50.
79. Hicks, S.P. and C.J. D'Amato, *Motor-sensory cortex-corticospinal system and developing locomotion and placing in rats*. Am J Anat, 1975. **143**(1): p. 1-42.
80. Hyun, J.K. and H.W. Kim, *Clinical and experimental advances in regeneration of spinal cord injury*. J Tissue Eng, 2010. **2010**: p. 650857.
81. Porteus, M.H., et al., *DLX-2, MASH-1, and MAP-2 expression and bromodeoxyuridine incorporation define molecularly distinct cell populations in the embryonic mouse forebrain*. J Neurosci, 1994. **14**(11 Pt 1): p. 6370-83.
82. Herrera, J., et al., *Embryonic-derived glial-restricted precursor cells (GRP cells) can differentiate into astrocytes and oligodendrocytes in vivo*. Exp Neurol, 2001. **171**(1): p. 11-21.
83. Zurita, M. and J. Vaquero, *Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation*. Neurosci Lett, 2006. **402**(1-2): p. 51-6.
84. Yoon, S.H., et al., *Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial*. Stem Cells, 2007. **25**(8): p. 2066-73.
85. Avasthi, S., Srivastav, R.N. and cols, *Stem Cell: Past, Present and Future- A Review Article* Internet Journal of Medical Update, 2008. **3**(1): p. 22-30.
86. Coutts, M. and H.S. Keirstead, *Stem cells for the treatment of spinal cord injury*. Exp Neurol, 2008. **209**(2): p. 368-77.
87. McDonald, J.W., et al., *Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord*. Nat Med, 1999. **5**(12): p. 1410-2.
88. Ross, S.E., M.E. Greenberg, and C.D. Stiles, *Basic helix-loop-helix factors in cortical development*. Neuron, 2003. **39**(1): p. 13-25.

89. Piltti, K., *FROM NEURAL STEM CELLS TO PRECURSORS - MOLECULAR REGULATION OF SELF-RENEWAL AND DIFFERENTIATION* in *Institute of Biomedicine Medical Biochemistry and Developmental Biology University of Helsinki and Department of Biological and Environmental Sciences Division of Physiology Faculty of Biosciences University of Helsinki* 2009, Helsinki University: Helsinki.
90. Kim, H.T., et al., *Human neurospheres derived from the fetal central nervous system are regionally and temporally specified but are not committed.* *Exp Neurol*, 2006. **199**(1): p. 222-35.
91. Pollard, S.M., et al., *Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain.* *Cereb Cortex*, 2006. **16 Suppl 1**: p. i112-20.
92. Nakamura, M. and H. Okano, *Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on induced pluripotent stem cells.* *Cell Res*, 2013. **23**(1): p. 70-80.
93. Sharif-Alhoseini, M.a.R.-M., W., *Animal Models in Traumatic Spinal Cord Injury*, in *Topics in Paraplegia*. 2014, Yannis Dionyssiotis (Ed.), ISBN: 978-953-51-1621-9, InTech, DOI: 10.5772/57189. Available from: <http://www.intechopen.com/books/topics-in-paraplegia/animal-models-in-traumatic-spinal-cord-injury>.
94. Ronaghi, M., et al., *Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells?* *Stem Cells*, 2010. **28**(1): p. 93-9.
95. Ikegami, T., et al., *Chondroitinase ABC combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances graft cell migration and outgrowth of growth-associated protein-43-positive fibers after rat spinal cord injury.* *Eur J Neurosci*, 2005. **22**(12): p. 3036-46.
96. Tetzlaff, W., et al., *A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury.* *J Neurotrauma*, 2011. **28**(8): p. 1611-82.
97. Llado, J., et al., *Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors.* *Mol Cell Neurosci*, 2004. **27**(3): p. 322-31.
98. Hooshmand, M.J., et al., *Analysis of host-mediated repair mechanisms after human CNS-stem cell transplantation for spinal cord injury: correlation of engraftment with recovery.* *PLoS One*, 2009. **4**(6): p. e5871.
99. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.* *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-76.
100. Keyvan-Fouladi, N., G. Raisman, and Y. Li, *Functional repair of the corticospinal tract by delayed transplantation of olfactory ensheathing cells in adult rats.* *J Neurosci*, 2003. **23**(28): p. 9428-34.
101. Rapalino, O., et al., *Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats.* *Nat Med*, 1998. **4**(7): p. 814-21.
102. Thomas, J.L., et al., *Spatiotemporal development of oligodendrocytes in the embryonic brain.* *J Neurosci Res*, 2000. **59**(4): p. 471-6.
103. Nishiyama, A., et al., *Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity.* *Nat Rev Neurosci*, 2009. **10**(1): p. 9-22.

104. Cummings, B.J., et al., *Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 14069-74.
105. Pinzon, A., et al., *Conduction of impulses by axons regenerated in a Schwann cell graft in the transected adult rat thoracic spinal cord*. J Neurosci Res, 2001. **64**(5): p. 533-41.
106. Barnabe-Heider, F. and J. Frisen, *Stem cells for spinal cord repair*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(1): p. 16-24.
107. Johansson, C.B., et al., *Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system*. Cell, 1999. **96**(1): p. 25-34.
108. Thuret, S., L.D. Moon, and F.H. Gage, *Therapeutic interventions after spinal cord injury*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(8): p. 628-43.
109. Lu, P., et al., *Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury*. Exp Neurol, 2003. **181**(2): p. 115-29.
110. Erceg, S., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells to regional specific neural precursors in chemically defined medium conditions*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2122.
111. Parr, A.M., I. Kulbatski, and C.H. Tator, *Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury*. J Neurotrauma, 2007. **24**(5): p. 835-45.
112. Moreno-Manzano, V., et al., *Activated spinal cord ependymal stem cells rescue neurological function*. Stem Cells, 2009. **27**(3): p. 733-43.
113. Tramontin, A.D., et al., *Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment*. Cereb Cortex, 2003. **13**(6): p. 580-7.
114. Sarnat, H.B., *Role of human fetal ependyma*. Pediatr Neurol, 1992. **8**(3): p. 163-78.
115. Sawamoto, K., et al., *New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain*. Science, 2006. **311**(5761): p. 629-32.
116. Hamilton, L.K., et al., *Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord*. Neuroscience, 2009. **164**(3): p. 1044-56.
117. Kojima, A. and C.H. Tator, *Epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 cause proliferation of ependymal precursor cells in the adult rat spinal cord in vivo*. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. **59**(8): p. 687-97.
118. Barnabe-Heider, F., et al., *Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(4): p. 470-82.
119. Meletis, K., et al., *Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells*. PLoS Biol, 2008. **6**(7): p. e182.
120. Bruni, J.E., *Ependymal development, proliferation, and functions: a review*. Microsc Res Tech, 1998. **41**(1): p. 2-13.
121. Chenn, A. and S.K. McConnell, *Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis*. Cell, 1995. **82**(4): p. 631-41.



122. Erlandsson, A., *Neural Stem Cell Differentiation and Migration*, in *Department of Medical Biochemistry and Microbiology*. 2003, Uppsala University: Uppsala. p. 73.
123. Taupin, P. and F.H. Gage, *Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals*. *J Neurosci Res*, 2002. **69**(6): p. 745-9.
124. Pluchino, S., et al., *Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism*. *Nature*, 2005. **436**(7048): p. 266-71.
125. Farah, M.H., et al., *Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells*. *Development*, 2000. **127**(4): p. 693-702.
126. Beattie, M.S., J.C. Bresnahan, and G. Lopate, *Metamorphosis alters the response to spinal cord transection in *Xenopus laevis* frogs*. *J Neurobiol*, 1990. **21**(7): p. 1108-22.
127. Alastrue-Agudo, A., Erceg, S., Cases-Villar, M., Bisbal-Velasco, V., Griffith, R.J., Rodriguez-Jimenez, F.J., Moreno-Manzano, V., *Experimental cell transplantation for traumatic spinal cord injury regeneration: intramedullar or intrathecal administration.*, in *Stem Cells and Tissue Repair*, C. Kioussi, Editor. 2014, Springer New York. p. 23-35.
128. *Bladder management for adults with spinal cord injury: a clinical practice guideline for health-care providers*. *J Spinal Cord Med*, 2006. **29**(5): p. 527-73.
129. Santos, F.M., et al., *Neural mobilization reverses behavioral and cellular changes that characterize neuropathic pain in rats*. *Mol Pain*, 2012. **8**: p. 57.
130. McDonough, A. and V. Martinez-Cerdeno, *Endogenous proliferation after spinal cord injury in animal models*. *Stem Cells Int*, 2012. **2012**: p. 387513.
131. Lhomiller JJ, S.S., *Reproduction and breeding*. , in *The Laboratory Rat*. , W.S. Suckow MA, Franklin CL and (Ed.). Editors. 2006, Academic Press.: New York,. p. 147-162.
132. Hill, C.E., M.S. Beattie, and J.C. Bresnahan, *Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat*. *Exp Neurol*, 2001. **171**(1): p. 153-69.
133. Ogawa, Y., et al., *Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats*. *J Neurosci Res*, 2002. **69**(6): p. 925-33.
134. Beck, K.D., et al., *Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment*. *Brain*, 2010. **133**(Pt 2): p. 433-47.
135. Wallace, M.C., C.H. Tator, and A.J. Lewis, *Chronic regenerative changes in the spinal cord after cord compression injury in rats*. *Surg Neurol*, 1987. **27**(3): p. 209-19.
136. Beattie, M.S., et al., *Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat*. *Exp Neurol*, 1997. **148**(2): p. 453-63.
137. Matthews, M.A., et al., *Spinal cord transection: a quantitative analysis of elements of the connective tissue matrix formed within the site of lesion following administration of piromen, cytoxan or trypsin*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1979. **5**(3): p. 161-80.

138. Mikami, Y., et al., *Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery*. J Neurosci Res, 2004. **76**(4): p. 453-65.
139. Parr, A.M., et al., *Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury*. Neuroscience, 2008. **155**(3): p. 760-70.
140. Kimura, A., et al., *Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury*. Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 115-24.
141. Hofstetter, C.P., et al., *Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome*. Nat Neurosci, 2005. **8**(3): p. 346-53.
142. Pfeifer, K., et al., *Autologous adult rodent neural progenitor cell transplantation represents a feasible strategy to promote structural repair in the chronically injured spinal cord*. Regen Med, 2006. **1**(2): p. 255-66.
143. Wu, S., et al., *New method for transplantation of neurosphere cells into injured spinal cord through cerebrospinal fluid in rat*. Neurosci Lett, 2002. **318**(2): p. 81-4.
144. Takeuchi, H., et al., *Intravenously transplanted human neural stem cells migrate to the injured spinal cord in adult mice in an SDF-1- and HGF-dependent manner*. Neurosci Lett, 2007. **426**(2): p. 69-74.
145. Kim, J.W., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for chronic spinal cord injury in rats: comparative study between intraslesional and intravenous transplantation*. Spine (Phila Pa 1976), 2013. **38**(17): p. E1065-74.
146. Lima, C., et al., *Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury*. Neurorehabil Neural Repair, 2010. **24**(1): p. 10-22.
147. Mackay-Sim, A., et al., *Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial*. Brain, 2008. **131**(Pt 9): p. 2376-86.
148. Foundation, O.C., I.S.d.E.S.M.e.F. Limitada, and H. Espanhol, *Phase 1 Study of Autologous Bone Marrow Stem Cell Transplantation in Patients With Spinal Cord Injury*. 2014, clinicaltrials.gov.
149. Karimi-Abdolrezaee, S., et al., *Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury*. J Neurosci, 2006. **26**(13): p. 3377-89.
150. Koopmans, G.C., et al., *The assessment of locomotor function in spinal cord injured rats: the importance of objective analysis of coordination*. J Neurotrauma, 2005. **22**(2): p. 214-25.
151. Dunlop, S.A., *Activity-dependent plasticity: implications for recovery after spinal cord injury*. Trends Neurosci, 2008. **31**(8): p. 410-8.
152. Wall, J.T., J. Xu, and X. Wang, *Human brain plasticity: an emerging view of the multiple substrates and mechanisms that cause cortical changes and related sensory dysfunctions after injuries of sensory inputs from the body*. Brain Res Brain Res Rev, 2002. **39**(2-3): p. 181-215.

153. Ziemann, U., M. Hallett, and L.G. Cohen, *Mechanisms of deafferentation-induced plasticity in human motor cortex*. J Neurosci, 1998. **18**(17): p. 7000-7.
154. Sofroniew, M.V., *Astrocyte failure as a cause of CNS dysfunction*. Mol Psychiatry, 2000. **5**(3): p. 230-2.
155. Silver, J. and J.H. Miller, *Regeneration beyond the glial scar*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(2): p. 146-56.
156. Tang, X., J.E. Davies, and S.J. Davies, *Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue*. J Neurosci Res, 2003. **71**(3): p. 427-44.
157. McKeon, R.J., M.J. Jurynek, and C.R. Buck, *The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar*. J Neurosci, 1999. **19**(24): p. 10778-88.
158. Han, X., et al., *Simvastatin mobilizes bone marrow stromal cells migrating to injured areas and promotes functional recovery after spinal cord injury in the rat*. Neurosci Lett, 2012. **521**(2): p. 136-41.
159. Hwang, D.H., et al., *Survival of neural stem cell grafts in the lesioned spinal cord is enhanced by a combination of treadmill locomotor training via insulin-like growth factor-1 signaling*. J Neurosci, 2014. **34**(38): p. 12788-800.
160. Lu, P., L.L. Jones, and M.H. Tuszynski, *Axon regeneration through scars and into sites of chronic spinal cord injury*. Exp Neurol, 2007. **203**(1): p. 8-21.
161. Robinson, S. and R.H. Miller, *Contact with central nervous system myelin inhibits oligodendrocyte progenitor maturation*. Dev Biol, 1999. **216**(1): p. 359-68.
162. Kotter, M.R., et al., *Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation*. J Neurosci, 2006. **26**(1): p. 328-32.
163. Vaquero, J., et al., *Ependymal cell proliferation after spinal cord injury*. Surg Neurol, 1987. **28**(5): p. 401.
164. Bukhari, N., et al., *Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system*. J Neurosci, 2011. **31**(42): p. 14931-43.
165. Zhang, S.X., et al., *Tail nerve electrical stimulation combined with scar ablation and neural transplantation promotes locomotor recovery in rats with chronically contused spinal cord*. Brain Res, 2012. **1456**: p. 22-35.
166. Kanno, H., et al., *Combination of engineered Schwann cell grafts to secrete neurotrophin and chondroitinase promotes axonal regeneration and locomotion after spinal cord injury*. J Neurosci, 2014. **34**(5): p. 1838-55.