

Universidad Cardenal Herrera-CEU
Departamento de Ciencias Biomédicas



Nanomedicina y Terapia Celular en
un modelo de Lesión Medular:
Estudio del potencial de la
Curcumina y de los Precursores
Neurales Adultos

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Marta Cases Villar

Dirigida por: Victoria Moreno Manzano

Valencia
2014

ÍNDICE

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	10
1.1. ANATOMÍA Y FUNCIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL	11
1.1.1. Anatomía de la médula espinal	11
1.1.2. Unidades funcionales de la médula espinal	13
1.2. LESIÓN MEDULAR	20
1.2.1. Epidemiología	20
1.2.2. Patología de la LM	23
1.3. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LESIÓN MEDULAR	28
1.3.1. Terapias celulares	29
1.3.2. Importancia del uso de las células endimarias (epSPC) en terapia celular	32
1.3.3. Trasplante de epSPCi tras Lesión Medular	35
1.3.4. Terapias farmacológicas tras Lesión Medular	36
1.4. ESTRATEGIAS EN LA MEJORA DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO DE LA LM MEDIANTE POLÍMEROS TERAPÉUTICOS: LA CURCUMINA	36
1.4.1. Introducción a la curcumina	36
1.4.2. La curcumina en el tratamiento de Lesión Medular	38
1.4.3. Nanomedicina: conjugación química con Polietilenglicol-Poliacetal	38
Capítulo 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	40
HIPÓTESIS	41
OBJETIVOS	41
Capítulo 3: MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS	44
3.1.1. Animales	44
3.1.2. Genotipado	44
3.1.3. Grupos experimentales	46
3.1.4. Procedimiento quirúrgico de contusión de la médula espinal en rata	46
3.1.5. Inoculación intratecal en fase aguda	54
3.1.6. Toma de imágenes en el IVIS Spectrum	57
3.1.7. Cultivo primario de células endimarias (epSPCi)	58
3.1.8. Trasplante intramedular de células endimarias (epSPCi) en modelo de lesión sub-agudo	60
3.1.9. Cuidados post-operatorios	62
3.1.10. Rehabilitación pasiva	66

3.1.11. Rehabilitación activa	67
3.1.12. Test de comportamiento BBB	67
3.2. HISTOLOGÍA	68
3.2.1. Perfusión	68
3.2.2. Extracción de la médula espinal	70
3.2.3. Procesamiento de muestras en el criostato	71
3.3 SÍNTESIS DEL COMPUESTO PEG-PA_CURCUMINA	71
3.3.1. Compuesto 1: PEG-PA-Curcumina	72
3.3.2. Compuesto 2: PEG-PA_Curcumina-serinol	73
3.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO	74
3.4.1. Tinción neuroanatómica con hematoxilina-eosina (H-E)	74
3.4.2. Cuantificación del área de quistes sobre el área total de la médula	75
3.4.3. Cuantificación del espesor del epicentro de la lesión	76
3.5. ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA	77
3.6. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR	79
3.7. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS: ANÁLISIS DE INMUNOTRANSFERENCIA-WESTERN BLOTTING	80
3.7.1. Obtención y cuantificación de proteínas	80
3.7.2. Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE)	81
3.7.3. Análisis por densitometría	83
3.8. ANÁLISIS DE ARN Y MICROARRAYS DE EXPRESIÓN	83
3.8.1. Extracción y cuantificación de ARN	83
3.8.2. Transcripción reversa (RT) y PCR a tiempo real	84
3.8.3. Microarrays de expresión	86
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	87
 Capítulo 4: RESULTADOS	 88
<u>NANOMEDICINA EN LESIÓN MEDULAR:</u>	
4.1. ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE NANOCONJUGADOS DE CURCUMINA Y POLIETILENGLICOL-POLIACETAL (PEG-PA)	89
4.2. ADMINISTRACIÓN <i>IN VIVO</i> DE PEG-PA_CURCUMINA EN UN MODELO DE LESIÓN MEDULAR	91
4.2.1. Monitorización de la biodistribución del conjugado polimérico PEG-PA-Cyanine_Curcumina	92
4.2.2. Análisis de la recuperación funcional locomotriz	93
4.2.3. Estudios morfológicos	95
4.3. LA ADMINISTRACIÓN INTRATECAL DE PEG-PA_CURCUMINA TRAS LESIÓN MEDULAR INDUCE NEUROPROTECCIÓN	98

4.4. LA ADMINISTRACIÓN INTRATECAL DE PEG-PA_CURCUMINA TRAS LESIÓN MEDULAR REDUCE LA APOPTOSIS	105
4.5. LA ADMINISTRACIÓN INTRATECAL DE PEG-PA_CURCUMINA TRAS LESIÓN MEDULAR REDUCE EL COMPONENTE INFLAMATORIO	108
 <u>TERAPIA CELULAR EN LESIÓN MEDULAR:</u>	
4.6. EL TRASPLANTE SUB-AGUDO DE epSPCi TRAS LESIÓN MEDULAR FAVORECE LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL	111
4.6.1. Trasplante de epSPCi en un modelo de Lesión Medular sub-aguda	112
4.6.2. Cambios morfológicos	113
4.6.3. Análisis inmunohistoquímico	116
4.7. EL TRASPLANTE SUB-AGUDO DE epSPCi TRAS LESIÓN MEDULAR PRODUCE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA	118
4.7.1. Estudio comparativo a nivel transcripcional en el modelo de trasplante agudo y sub-agudo	118
4.7.2. Análisis de los procesos de apoptosis y autofagia	119
 Capítulo 5: DISCUSIÓN	122
 Capítulo 6: CONCLUSIONES	130
 Capítulo 7: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNc: ARN complementario

ARNm: Ácido ribonucleico de tipo mensajero

ASIA: *American Spinal Injury Association*, Asociación Americana de Lesión Medular

ATP: Adenosina tri-fosfato

ATPasa: enzima que hidroliza el ATP

BBB: Test de Basso, Beattie y Bresnahan

bFGF: *basic Fibroblast Growth Factor*, factor de crecimiento básico de fibroblastos

BHE: Barrera hematoencefálica

BO: Bulbo olfatorio

BSA: *Bovine serum albumin*, suero de albúmina bovina

°C: Grados centígrados

C1: Vértebra cervical número 1

Ca²⁺: Calcio

CEBA: Comité ético de bienestar animal

cf: Concentración final

cm: Centímetros

CMR: corriente migratoria rostral

CO₂: Dióxido de carbono

DM: Dexametasona

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*, medio celular base para realizar el medio celular completo

DMSO: Dimetil sulfóxido

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: *Ependymal Growth Factor*, factor de crecimiento de células endimarias

epSPC: Células endimarias derivadas de médula espinal

epSPCi: Células endimarias derivadas de una médula espinal previamente lesionada

FDA: Organización Americana de Administración de Alimentos y Medicamentos

G: Gauge

GAM: Glicoproteína asociada a la mielina

GAMO: Glicoproteína asociada a la mielina de oligodendrocito
GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (control de carga)
GFAP: Proteína ácida fibrilar de la glía
GFP: *Green Fluorescent Protein*, Proteína Fluorescente Verde
GM-1: Monosialotetrahexosilgangliósido
gr: Gramos
GTP: Guanosín trifosfato
GTPasa: Enzima guanosina trifosfatasa que hidroliza el GTP
h: Horas
HCl: Ácido clorhídrico
H-E: Hematoxilina-eosina
HRP: Peroxidasa de rábano
Ig: Inmunoglobulinas
K⁺: Potasio
Kg: Kilo
KDynes: Kilodyne
IL-6: Interleuquina de tipo 6
L: Litros
L1: Vértebra lumbar número 1
LCR: Líquido cefalorraquídeo
LM: Lesión medular
LMA: Lesión medular aguda
LSE: Lámina sub-ependimaria
M: Molar
mA: miliamperios
MAM: Moléculas asociadas a mielina
MCC: Medio de cultivo completo
ME: Médula espinal
min: Minutos
mg: Miligramos
mL: Mililitros
mm: Milímetros
mM: Milimolar
MP: Metilprednisolona
µL: Micrólitros

μM: Micromolar
μm: Micrómetros
N: Newton
Na⁺: Sodio
NaHCO₃: Bicarbonato cálcico
ng: Nanogramos
nm: Nanómetros
OCT: Optimum Cutting Temperature Compound
OMS: Organización Mundial de la Salud
PCS: Proteoglicano condroitín sulfato
P100: Placa de cultivo de 100mm de diámetro
P6: Placa de cultivo de baja adherencia de 6 pocillos
P60: Placa de cultivo de 60mm de diámetro
P96: Placa de cultivo de 96 pocillos
pb: pares de bases
PBS: Tampón fosfato salino
PCR: *Polymerase chain reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa
PEG-PA: Polietilenglicol-Poliacetal 4000/2000
PEG-PA_Curcumina: Curcumina 3,8% w/w conjugada con Polietilenglicol-Poliacetal
PFA: Paraformaldehído
P/S: Penicilina/Estreptomina
px: Píxeles
qPCR: PCR cuantitativa
ROCK: Kinasa asociada a Rho
ROS: Especies reactivas de oxígeno
rpm: Revoluciones por minuto
RT: *Reverse Transcription*, Transcripción Reversa
s: Segundo
S1: Vértebra sacra número 1
S/D: Sprague-Dawley
sbc: Subcutáneo
SD: *Standard deviation*, desviación estándar
SDS: Dodecil sulfato sódico
SDS-page: SDS-electroforesis en geles de acrilamida
SFB: Suero fetal bovino

SNC: Sistema nervioso central
SNP: Sistema nervioso periférico
SSF: Suero salino fisiológico
T7: Vértebra torácica número 7
TBS: Tampón tris salino
THR: Hormona liberadora de tirotropina
TNF: Factor de necrosis tumoral
U: Unidades Internacionales
Und: Unidades
V: Voltios
v/v: Volumen/volumen
w/w: Peso/peso
ZSG: zona sub-granular
ZSV: Zona sub-ventricular

1- INTRODUCCIÓN

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

1.1. ANATOMÍA Y FUNCIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL

1.1.1. Anatomía de la médula espinal

La médula espinal (ME) constituye junto al encéfalo el sistema nervioso central (SNC). Debido a su fragilidad e importancia de su función, la ME se encuentra rodeada a su vez por tejido óseo, las vértebras. Las vértebras constituyen las unidades óseas de la columna vertebral, se componen del cuerpo vertebral, atravesado por el orificio vertebral a través del que discurre la ME, dos apófisis transversas a ambos lados del cuerpo vertebral y una apófisis espinosa dorsal. La unión entre los cuerpos de dos vértebras se realiza principalmente a través del disco vertebral, compuesto por un anillo fibroso cartilaginoso y un núcleo pulposo central semigelatinoso. Las vértebras articulan entre sí mediante las apófisis articulares, salientes óseos a cada lado del orificio vertebral. En la unión de las vértebras se forma un orificio intervertebral a través del cual emanan los nervios espinales originados en la ME (**Figura 1**).

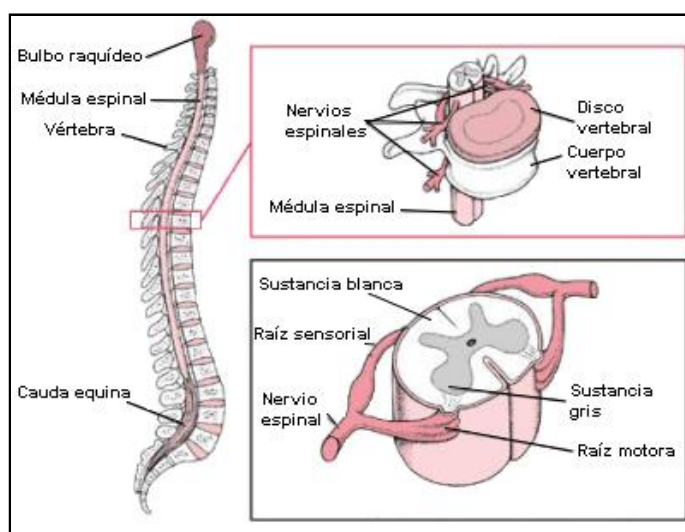


Figura 1. Anatomía del cuerpo vertebral (www.biology.about.com).

ME está protegida por 3 capas de meninges: la piamadre (la capa más interna y altamente vascularizada), el aracnoides y la duramadre que es la membrana más externa (**Figura 2**).

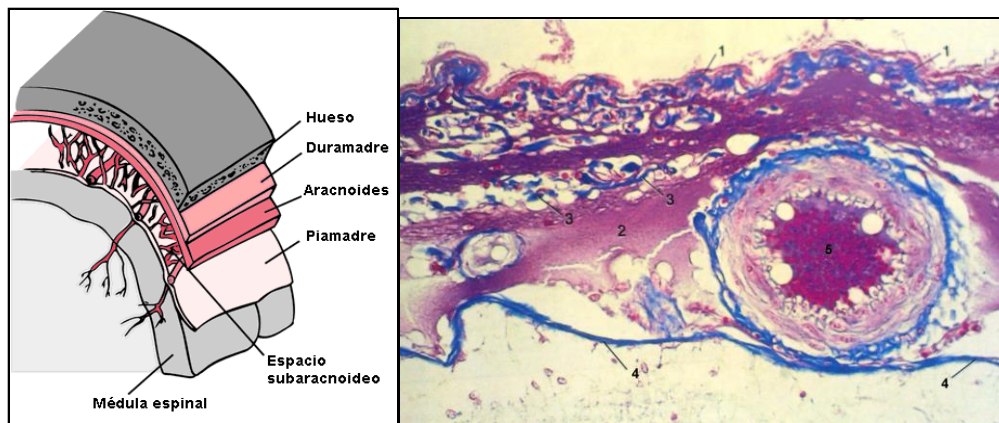


Figura 2. a) distribución de las meninges en la ME (Keane M. and O'Toole M.T., 2003), **b) corte histológico con tinción tricrómica de Mallory de las meninges.** 1 aracnoides, 2 líquido cefalorraquídeo, 3 fibra colágena, 4 piamadre y 5 arteriola. (Bacha W.J. and Bacha L.M., 2001).

El líquido cefalorraquídeo (LCR) riega el SNC a través de las cavidades de los órganos (ventrículos encefálicos y canal epidural de la médula espinal, rico en células endoteliales (Hamilton L.K. et al., (2009) y Hugnot J.P. and Franzen R. (2011)). El LCR actúa en el mantenimiento del equilibrio iónico del SNC, en la eliminación de residuos y como transportador de determinadas sustancias al SNC como la glucosa desde los capilares que rodean las meninges. La barrera hematoencefálica (BHE) es un mecanismo que controla el paso de sustancias desde el torrente sanguíneo hasta el líquido cefalorraquídeo (LCR), y por tanto hasta el SNC, manteniendo la homeostasis en el SNC. La BHE permite el paso de sustancias tales como el oxígeno o la glucosa, pero bloquea la entrada a moléculas mayores a 500 Daltons, es decir, desde hormonas hasta fármacos, resultando el acceso de compuestos por vía sistémica limitado. Las células endoteliales forman la pared de los capilares a nivel de la BHE, poseen uniones estrechas entre sí haciendo inaccesible el acceso a la BHE a través de ellas: las moléculas deben atravesar la membrana celular de las células endoteliales para atravesar la BHE. Las células endoteliales interactúan con la lámina basal, el pie terminal de los astrocitos, interneuronas y pericitos para formar la BHE funcional (Abbott N.J. et al., 2006) (**Figura 3**).

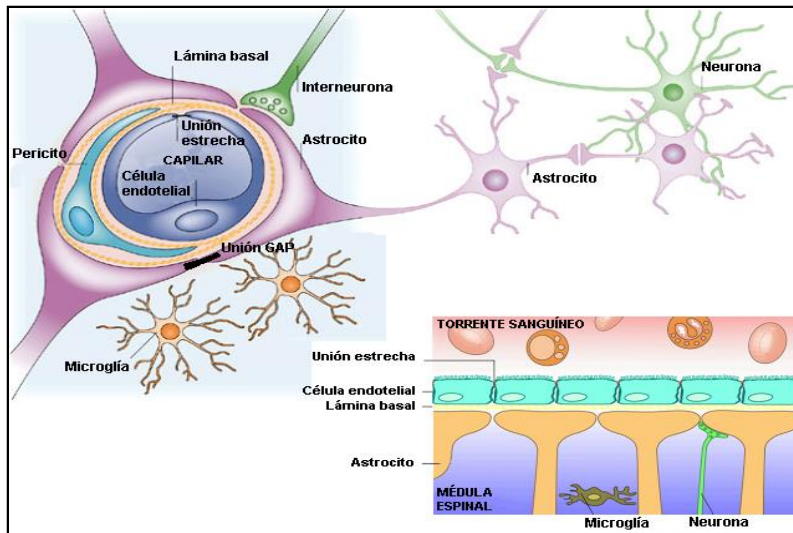


Figura 3. Organización de la BHE (Abbott N.J. et al., 2006).

1.1.2. Unidades funcionales de la médula espinal

La ME se organiza en cordones que componen la sustancia blanca y en las astas dorsales y ventrales de la sustancia gris (**Figura 4**).

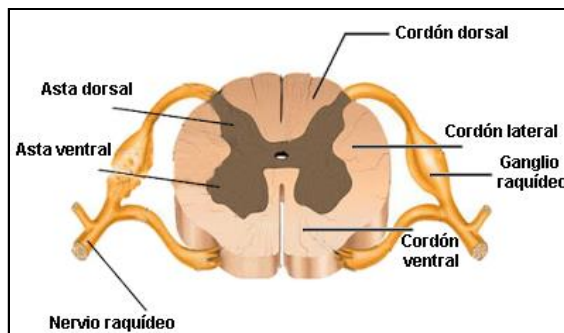


Figura 4. Distribución de los distintos cordones y astas en la ME.

Las neuronas y las células de la glía son las unidades funcionales del SNC (**Figura 5**).

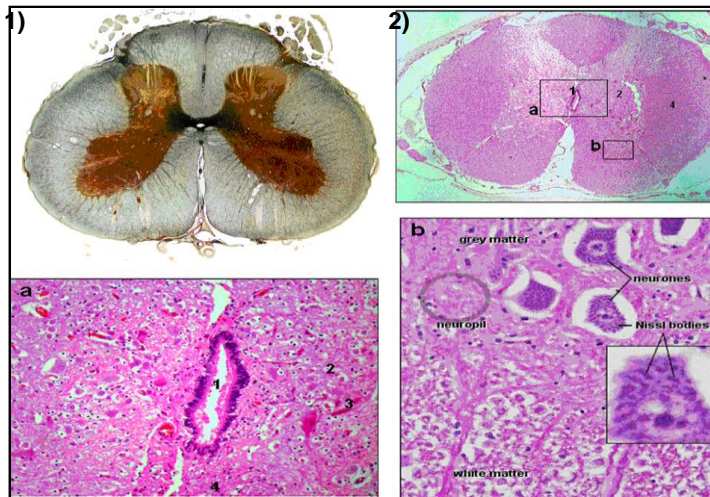


Figura 5. 1) Corte histológico de médula espinal (16x) con tinción argéntica. Se evidencia la separación entre la sustancia blanca (externamente) y la sustancia gris (centralmente). 2) Corte histológico de médula espinal con tinción de Hematoxilina-Eosina (10x) con ampliaciones (a y b) del centro de la muestra a 26x. 1 canal endimario, 2 sustancia gris, 3 neurona multipolar, 4 sustancia blanca (1- www.uaz.edu.mx y 2- www.webs.ulpgc.es).

- Glía

Las células de la glía constituyen las células de soporte que confieren estructura al SNC, rodeando los cuerpos neuronales, axones y dendritas neuronales. Están divididas en la microglía y la macroglía. La macroglía incluye los oligodendrocitos, y los astrocitos.

En la materia blanca del SNC, los oligodendrocitos se encargan de la producción de mielina alrededor de los axones, son capaces de envolver varios internodos al mismo tiempo (**Figura 6**).

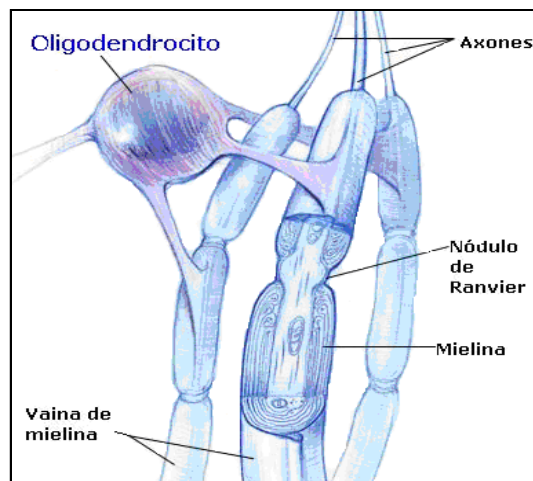


Figura 6. Oligodendrocito (www.neurocirugiacontemporanea.com).

Los astrocitos son las células gliales más abundantes y participan en la impermeabilización de la BHE y en la nutrición de las células nerviosas (**Figura 3**). Además, y entre otros, contribuyen al mantenimiento de los correctos niveles de potasio extracelular y la regulación de de los neurotransmisores liberados en los botones sinápticos.

- Neuronas

Las neuronas se componen del soma neuronal, las dendritas, el axón y los terminales presinápticos. Las dendritas se encargan de recibir las señales nerviosas mientras que el axón es la unidad conductora de señales a otras neuronas (**Figura 7**). Las señales eléctricas que transmiten los axones se denominan potenciales de acción. Para incrementar la velocidad de transmisión de los potenciales de acción, los axones se encuentran envueltos en vainas de mielina intercaladas por nódulos de Ranvier, donde el potencial de acción se regenera.

La sinapsis es la comunicación que existe entre dos neuronas y ocurre en la hendidura sináptica. Las sinapsis se dan entre las dendritas postsinápticas de una neurona y los terminales presinápticos de otra que pueden ser el soma o incluso el axón de la célula receptora.

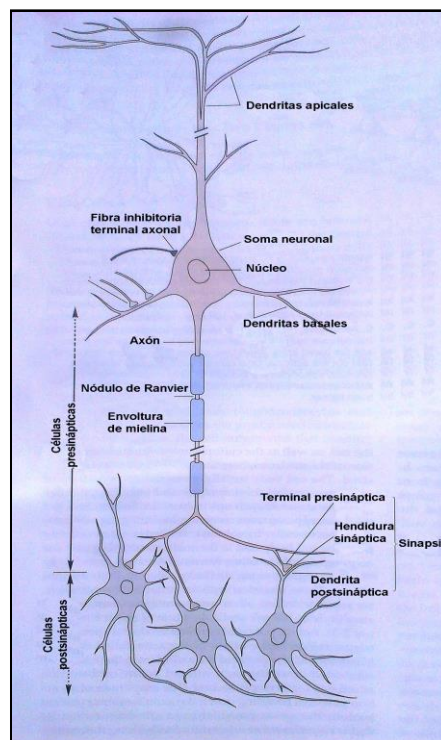


Figura 7. Estructura y organización de las neuronas (Kandel E.R. et al., 2000).

Las neuronas pueden ser de tres tipos: sensoriales, motoras e interneuronas. Las neuronas sensoriales o aferentes son las encargadas de transportar la información desde los órganos hasta el SNC para su percepción o coordinación motora. Las neuronas motoras (eferentes) transmiten la información desde el cerebro o la médula espinal a los órganos o glándulas diana. Las interneuronas son aquellas células neuronales que no ejercen actividad aferente o eferente. Son interneuronas de proyección aquellas que transmiten señales a lo largo de grandes distancias e interneuronas locales las que procesan información dentro de los circuitos locales.

Todas las neuronas poseen distinto potencial eléctrico a cada lado de la membrana plasmática en reposo, en el medio extracelular se concentran iones con carga positiva y en el interior de la célula iones negativos. Cuando se reduce el potencial de membrana se genera una despolarización en la membrana celular, haciendo la célula más permeable al sodio (Na^+) que al potasio (K^+). Este flujo de iones de Na^+ al interior celular a través de los canales iónicos de la membrana neutraliza la carga negativa reduciendo el potencial de membrana y generando el potencial de acción.

Para producir un movimiento, todas las neuronas aferentes y eferentes generan 4 tipos de señales: de entrada, integración, conducción y salida. El potencial receptor (potencial de acción que entra en la célula neuronal tras una señal sensorial) se extiende a lo largo de la neurona hasta el primer nódulo de Ranvier donde dispara el potencial de acción que se propaga activamente a lo largo del axón hasta su región terminal donde se liberarán neurotransmisores en la hendidura sináptica. Tras las señales motoras y musculares se produce un potencial sináptico: el potencial de acción en la neurona sensorial libera neurotransmisores en la hendidura sináptica que son captados por la neurona motora, esta carga química se traduce en energía eléctrica que altera el potencial de membrana de la célula motora activando el potencial de acción (**Figura 8**).

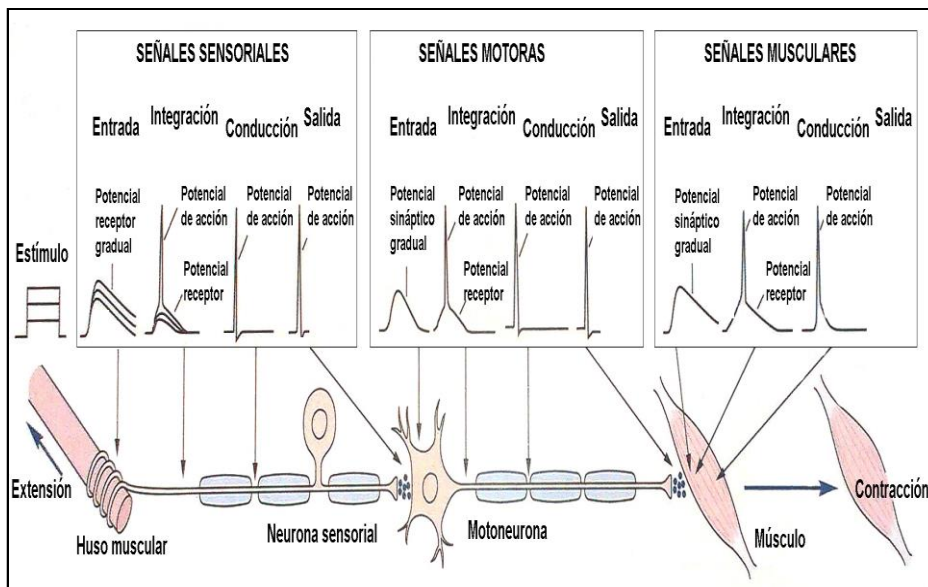


Figura 8. Secuencia de señales que ocurren tras generar movimiento (Kandel E.R. et al., 2000).

- **Neuronas aferentes**

- Fascículo de Goll y Burdach:

Estos fascículos transcurren por el cordón posterior de la ME, situándose el fascículo de Burdach más dorsalmente. Como ocurre en todas las neuronas sensoriales, el núcleo se encuentra en el ganglio espinal. Éste asciende hasta el asta dorsal a nivel del bulbo encefálico donde se encuentran los núcleos de Gracilis y Cuneatus (que se corresponden con el fascículo de Goll y Burdach, respectivamente). Los axones se cruzan tras esta sinapsis al lado contralateral (decusación) hasta llegar al tálamo y posteriormente a la corteza cerebral. Estos fascículos se encargan de transmitir la sensación de tacto fino y presión leve, la cinestesia (capacidad de reconocer la ubicación de cualquier parte del cuerpo espacialmente sin visualizarlo) y la estereognosia (capacidad de reconocer un objeto mediante el tacto).

- Haces Espinotalámicos anterior y lateral:

Estos haces discurren por el cordón anterolateral de la ME, el anterior medialmente y el lateral lateralmente. Estos axones son cortos y realizan sinapsis en el asta dorsal en el núcleo de Waldeyer. Desde aquí se proyectan axones que se decusan al lado opuesto de la médula hasta llegar al cordón anterolateral. El haz anterior asciende por el Lemnisco Medial con los fascículos de Goll y Burdach y el haz lateral asciende por el Lemnisco Lateral junto al haz de Gowers y el Rubroespinal hasta el tálamo. La función del haz espinotalámico anterior se encarga de transmitir la sensación de tacto protopático (tacto

firme), mientras que el lateral transmite la sensibilidad termoalgésica (en relación con la temperatura y el dolor).

- Haces Espinocerebelosos Directo (Flechsig) y Cruzado (Gowers):

Su núcleo se sitúa en el ganglio de la raíz posterior haciendo sinapsis en el asta dorsal originando el núcleo torácico, desde donde se originan los haces Dorsal Directo y Cruzado. Estos haces ascienden por el cordón medular lateral, el Directo como su nombre indica por el lado homolateral y el Cruzado por el lado opuesto hasta el cerebelo. Se encargan de transmitir la sensibilidad propioceptiva hasta el cerebelo, por lo que al dañarse originan incoordinación y trastornos en el tono muscular.

- Fascículo Espinotectal:

Desde su núcleo en el mismo ganglio en que se originan los haces Espinocerebelosos, el fascículo Espinotectal cruza al lado contralateral ascendiendo por el cordón anterolateral junto a los haces espinotalámicos hasta el mesencéfalo. Está implicado en la fisiología del dolor y la analgesia.

- Fascículo Espinolivario:

La sinapsis desde el ganglio de la raíz posterior se realiza en la sustancia gris intermedia de la ME donde los axones se decusan al lado contralateral ascendiendo por el cordón anterolateral junto al fascículo Espinocerebeloso Directo terminando en la oliva bulbar, originando el fascículo olivocerebeloso que transmite impulsos cutáneos y propioceptivos hasta la corteza cerebelar.

- **Neuronas eferentes**

- Vías piramidales:

La vía piramidal es la encargada de controlar la motilidad consciente. Se localiza en la corteza cerebral y recibe información desde la corteza motora y la corteza sensitiva primaria, las cuales forman el haz piramidal que dará lugar al haz Corticoespinal y al haz Corticonuclear (que se distribuyen en todos los núcleos motores de los pares craneales). El primero se proyecta por el cordón lateral de la ME hasta unirse con el segundo a nivel del cordón anterior en el bulbo encefálico formando las pirámides bulbares. A partir de este punto, la mayoría de las fibras se decusan al lado opuesto y descienden en el cordón lateral como el tracto Corticoespinal Lateral, y el resto desciende por el cordón anterior del mismo lado como el tracto Corticoespinal Anterior.

- Vías extrapiramidales:

Las vías extrapiramidales comprenden todos los tractos eferentes no corticoespinales que influyen en la actividad somatomotora de los músculos estriados.

- *Fascículos Reticuloespinales*: se originan en la corteza motora cerebral y descienden por el cordón anterolateral junto al tracto Corticoespinal hasta los núcleos reticulares del bulbo encefálico. Están implicados en el control del tono muscular, regulación de los movimientos respiratorios y regulación de la respuesta cardiovascular.

- *Fascículos Rubroespinales*: se origina en la corteza motora cerebral y termina en el núcleo rojo del mesencéfalo. Se distribuyen en el cordón lateral de la ME y transmiten impulsos desde el núcleo rojo, el cerebelo o el cuerpo estriado.

- *Fascículo Tectoespinal*: sus fibras se originan en el mesencéfalo y se decusa en el tronco encefálico. A partir de aquí se distribuye por el cordón anterior de la ME y está relacionado con los movimientos posturales reflejos en respuesta a estímulos visuales.

- *Fascículos Vestibuloespinales*: discurre por el cordón anterior desde el núcleo vestibular lateral del bulbo encefálico, recibiendo información a través del nervio vestibular y el cerebelo. Las fibras sinaptan en el asta ventral con motoneuronas de músculos extensores, haciendo que estos fascículos estén implicados en el mantenimiento del tono muscular y la postura (Noback C. et al., 1966).

Las vías aferentes y eferentes que componen la ME se presentan en la **Figura 9**:

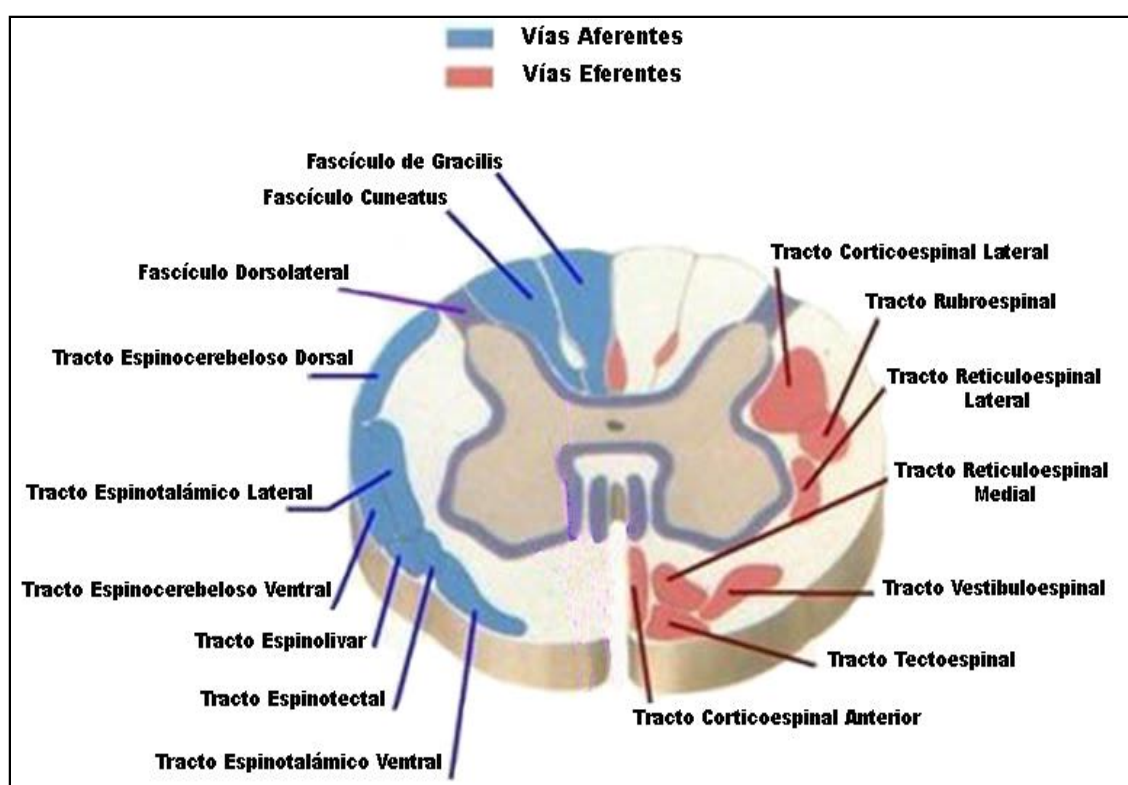


Figura 9. Vías aferentes y eferentes de la ME (www.uaa.mx)

1.2. LESIÓN MEDULAR

La estructura fisiológica de una médula espinal está representada en la **Figura 10**:

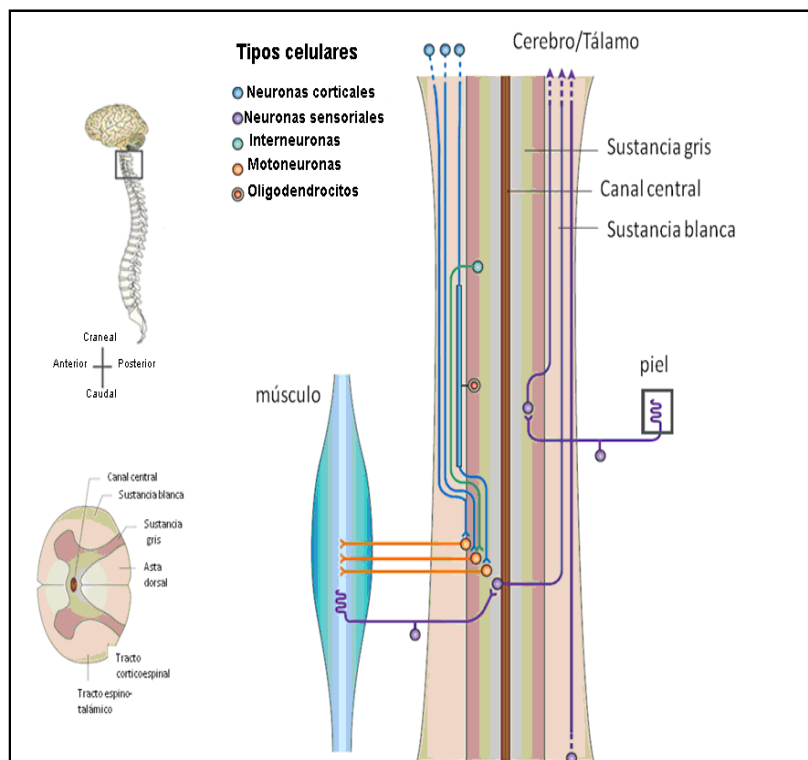


Figura 10. Anatomía de la médula espinal sana (Gage F.H. et al., 2006).

En condiciones fisiológicas, los tractos aferentes y eferentes discurren a lo largo de la ME desde el encéfalo hasta los órganos diana y viceversa sin ningún tipo de interrupción en sus proyecciones.

1.2.1. Epidemiología

La lesión medular (LM) es considerada la principal causa de parálisis. La parálisis se define como la pérdida total o parcial de la motricidad o actividad de determinados músculos, unilateral o bilateralmente, derivando en paraplejía (parálisis de los miembros inferiores o tracto posterior) (www.nlm.nih.gov). Según los datos clínicos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, www.who.int) las cifras de incidencia oscilan actualmente entre 40 y 80 casos por millón de habitantes, con casi el 20% de ellas con

resultados de tetraplejía (parálisis de las cuatro extremidades). Las principales causas de LM son las enfermedades neurodegenerativas y los traumatismos, representando esta última el 90% de los casos. Esta distribución hace que la prevalencia de las lesiones medulares se localice en los grupos poblacionales de adultos jóvenes con más tendencia a sufrir LM traumáticas derivadas de accidentes y en personas geriátricas LM neurodegenerativas.

Los axones forman pares de nervios que conexionan la ME con el resto del cuerpo (**Figura 11**).

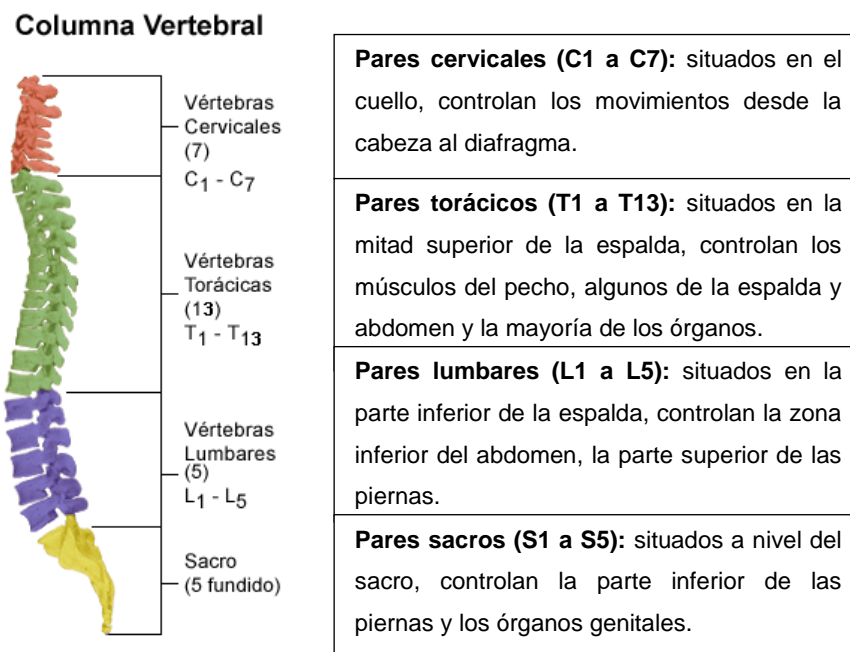


Figura 11. Distribución de los pares de nervios en la columna vertebral.

La gravedad de la LM depende del nivel en el que la lesión ocurre y si se trata de una lesión completa (pérdida de conexión total entre el SNC y los órganos) o incompleta (se conserva parte de esta conexión). Actualmente se emplea la escala ASIA (American Spinal Injury Association) para estimar el grado de discapacidad tras LM (*National Institute of Neurological Disorders and Stroke*, www.ninds.nih.gov y *Dvorak M.F. et al, 2014*). La categorización se divide en 5 niveles (A a E), en orden decreciente de gravedad:

- **A:** LM completa. No existe función sensorial o motora por debajo del nivel de la lesión, incluidos los segmentos sacros.
- **B:** LM incompleta. Existe función sensorial, pero no motora, por debajo del nivel de LM, persiste alguna sensación a nivel de los segmentos S4 y S5.

- **C:** LM incompleta. La función motora se conserva por debajo del nivel de LM, aunque más de la mitad de los músculos afectados no son capaces de ejercer movimiento contra la fuerza de la gravedad.
- **D:** LM incompleta. La función motora se conserva por debajo del nivel de LM, al menos la mitad de los músculos afectados pueden moverse contra la fuerza de la gravedad.
- **E:** Normal. Las funciones motora y sensorial son fisiológicas.

Las lesiones medulares más graves afectan al sistema nervioso autónomo parasimpático, encargado de la regulación a sus niveles fisiológicos de las funciones vitales involuntarias como la actividad gastrointestinal, genitourinaria, respiratoria y cardiovascular (**Figura 12**).

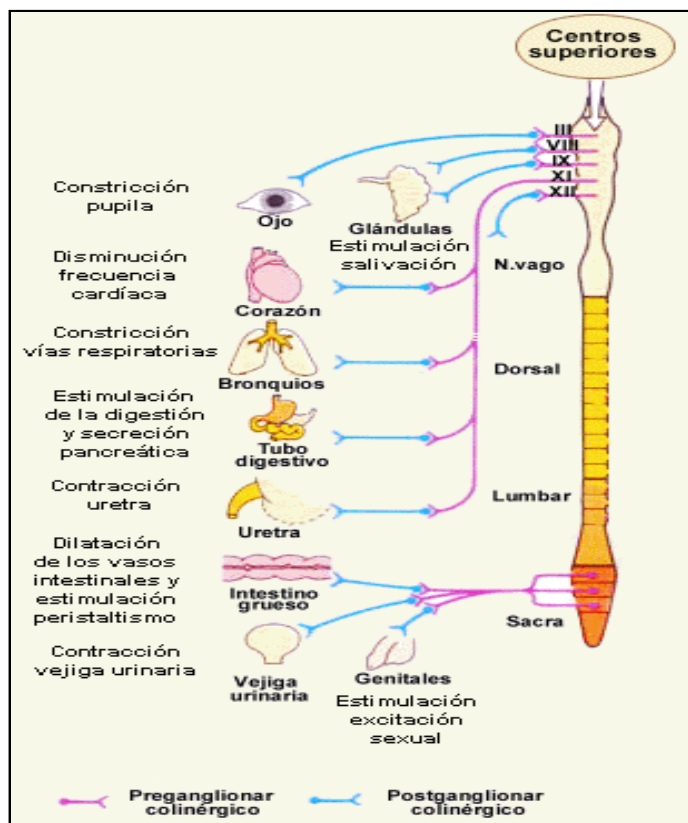


Figura 12. Esquema del Sistema Nervioso Autónomo Parasimpático (www.mecd.gob.es).

La tasa de mortalidad alcanza su nivel máximo en el primer año tras la lesión y la probabilidad de muerte prematura en pacientes con LM es de 5 veces mayor que en la población sana, dependiendo de la localización y gravedad de la lesión (OMS, www.who.int). Esto se debe al desarrollo de diversas enfermedades secundarias que

pueden comprometer órganos y sistemas vitales como el sistema cardiovascular o el respiratorio, sin olvidar que la mayoría de las personas con lesiones medulares sufren dolor crónico (Richards J.S., 1992; Zanca J. et al., 2009; Krames E.S., 2014 and Tanabe M., 2014), prurito (Ross S.E., 2011; Oaklander A.L., 2012) y depresión (Bombardier C.H. et al., 2014; Franzblau L. and Chung K.C., 2014) que repercuten en su calidad de vida. Los servicios de atención a pacientes con LM aguda (Mousavi M.E. et al., 2013; Cameron I.D. et al., 2014; Sadeghi M. and Sawatzky B., 2014), la rehabilitación pasiva y activa y el mantenimiento del bienestar de estos pacientes se tornan indispensables para garantizar la prevención y tratamiento de estas afecciones.

1.2.2. Patología de la LM

En la literatura científica pueden encontrarse en la actualidad más de 50.000 referencias bibliográficas vinculadas a estudios realizados sobre LM (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez). A pesar de que muchos de estos trabajos han mostrado en más o menos medida una recuperación significativa en este tipo de lesión empleando diversas estrategias experimentales, la realidad clínica es que aún no existe un tratamiento eficaz para curar las graves consecuencias originadas por una LM. La LM generada tras un proceso traumático es muy compleja, implica múltiples eventos, y para poder diseñar estrategias terapéuticas antes debemos conocer la secuencia de eventos que concurren en este proceso patológico:

a. Daño primario

La LM compromete la estructura funcional de la médula espinal y conlleva la muerte celular de distintos tipos celulares que se encuentran en la médula. Esto conlleva a un aumento en la proliferación celular seguido de un reclutamiento de células endimarias (epSPC) al lugar de la lesión (Barnabé-Heider F. et al., 2010 y Göritz C. et al., 2011) que ocurre en los 3 días siguientes a la LM (Johansson C.B. et al., 1999).

Esta barrera de astrocitos resulta impermeable e impenetrable para la proyección de los tractos axonales ascendentes y descendentes, por lo que a la vez que aísla el tejido sano impide la regeneración (**Figura 13**).

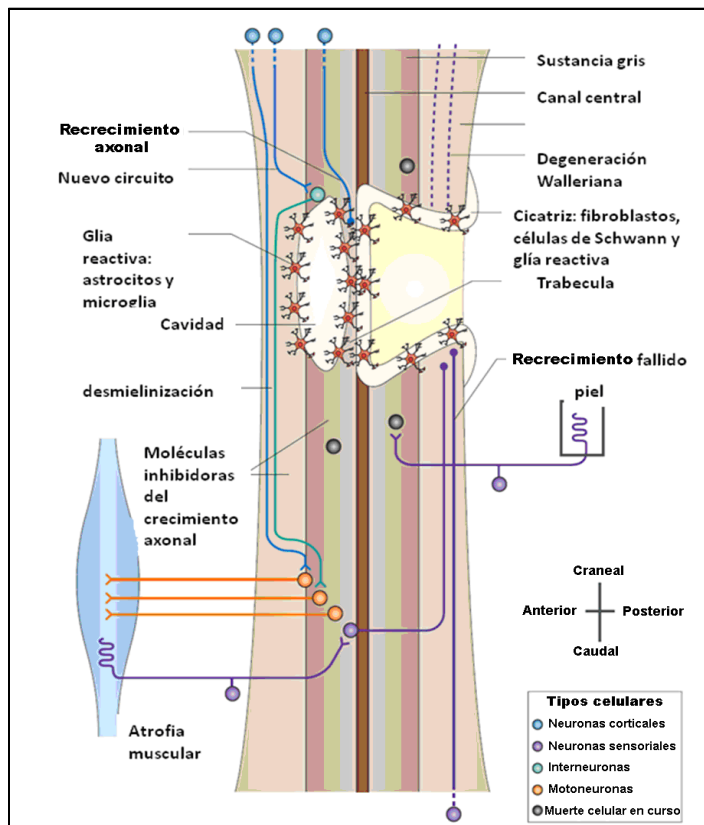


Figura 13. Lesión medular y daño primario (Gage F.H. et al., 2006).

b. Daño secundario

Tras este primer episodio de eventos que ocurre durante las primeras horas tras el traumatismo medular, comienza un daño secundario (Oyinbo C.A., 2011; Silva N.A. et al., 2014) que implica la activación de múltiples eventos que promueven el daño neuronal iniciado (Viscomi M.T. and Molinari M., 2014):

- Activación de programas de muerte celular por apoptosis (Lu X.M. et al., Hou H. et al. y Ma L. et al., 2014) que afectan muy activamente a las neuronas, microglía y oligodendrocitos supervivientes a la fase de daño primario. La muerte de este último tipo celular en la materia blanca medular se prolonga durante semanas y provoca la pérdida de las envolturas de mielina alrededor de los axones (desmielinización), interrumpiendo la progresión del impulso nervioso y en definitiva la actividad neuronal (Crowe M.J. et al., 1997). Teniendo en cuenta que un sólo oligodendrocito es capaz de generar envolturas hasta en 50 axones distintos, el proceso de desmielinización es muy rápido, y de hecho este efecto neurotóxico se prolonga durante muchos meses. Según los resultados de Tator C.H. et al. (1991), la desmielinización de las fibras afectadas por la lesión medular activa la producción de células de Schwann por parte de las células precursoras de oligodendrocitos (Nguyen P.D. et al., 2014), así como la producción de algunos astrocitos.

- Desequilibrio en el balance iónico de potasio (K^+), sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) (Lemke M. et al., 1990) que conlleva a la despolarización de las membranas celulares, fallo de la actividad ATPasa e incremento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , que a su vez promueven la muerte celular.

- Liberación exacerbada de glutamato (Kuncl R.W. et al., 1992) que induce también la muerte neuronal.

- Masiva peroxidación lipídica (Smith J.A. et al. y Scheid T. et al., 2013). Tras la muerte celular se forman radicales libres que causan la muerte oxidativa de neuronas rompiendo la estructura de fosfolípidos de la membrana celular, y comprometen el flujo sanguíneo provocando edema, isquemia local y la activación de la respuesta inflamatoria (Tator C.H. and Fehlings M.G., 1991).

- Inmediatamente después del trauma se produce una interrupción de la barrera hematoencefálica (Kuvacheva N.V. et al., 2013) con la consecuente activación de las células de la microglía e infiltrado de células del sistema inmune. Los leucocitos comienzan a liberar un gran número de citoquinas y especies reactivas de oxígeno (ROS) que permiten una mayor extravasación de leucocitos y un mayor daño neuronal (Taoka Y. et al., 1997). Sin embargo, la inflamación posee un papel importante en la reparación del tejido neuronal (Donnelly D.J. and Popovich P.G., 2008), **Figura 14:**

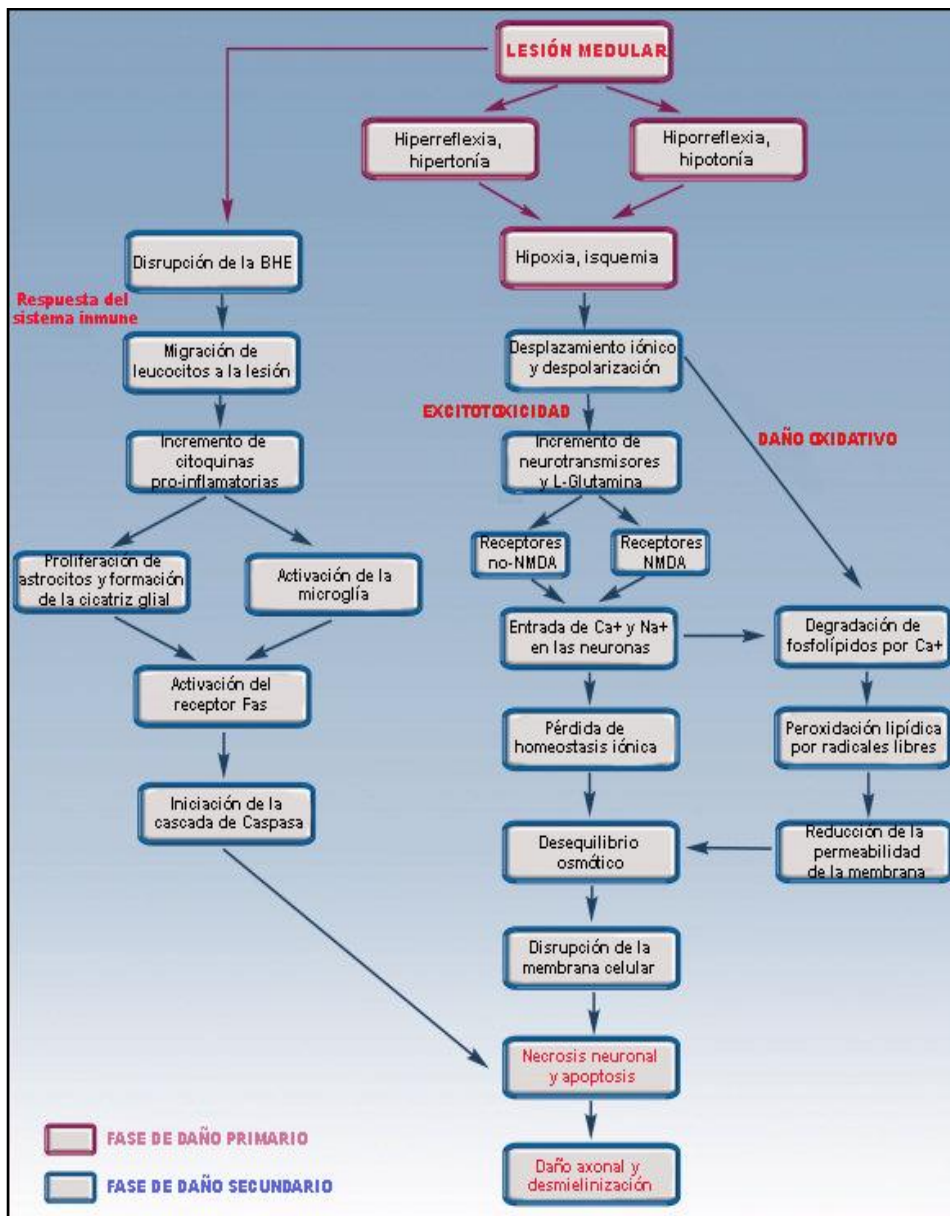


Figura 14. Resumen de los eventos fisiopatológicos que siguen a la lesión en la médula espinal (Ronaghi M. et al., 2010). Estos eventos pueden dividirse en dos fases: primaria y secundaria. Las casillas rojas son indicativas de la lesión primaria mientras que las azules se refieren a la segunda fase.

Tras la LM, los inhibidores presentes en los debris de mielina, las envolturas intactas de mielina y la matriz extracelular de la LM y de la cicatriz glial inhiben el recrecimiento de las neuritas. Entre estos inhibidores se encuentran el grupo de moléculas asociadas a la mielina (MAM) y el grupo de proteoglicanos:

En el grupo de MAM se encuentran la glicoproteína asociada a mielina (GAM), la glicoproteína asociada a mielina de oligodendrocito (GAMO) y la proteína de membrana Nogo-A, presente en oligodendrocitos y neuronas, que provocan la inhibición del

crecimiento neuronal al unirse a su receptor en la membrana neuronal NgR1 (Schwab M.E., 2004). La glicoproteína asociada a mielina (GAM) se encuentra en la vaina de mielina axonal y supone uno de los mayores inhibidores de la regeneración axonal en la materia blanca medular (Domeniconi M. et al., 2002). Lehmann M. et al., 1999, demostraron que el complejo de proteínas inhibitorias de la regeneración neuronal comparten una cascada de señalización común: la cascada de señalización Rho. Rho es una GTPasa implicada en la regulación de la motilidad celular a través del citoesqueleto de actina. McKerracher L. and Winton M.J., 2002, sugirieron que el complejo de señalización NgR está relacionado con la cascada de señalización Rho: la unión de ligandos inhibitorios de mielina a NgR provoca la activación de Rho que a su vez activa la quinasa asociada a Rho (ROCK), la cual bloquea el recrecimiento de neuritas (Bito H. et al., 2000; Dergham P. et al., 2002; Tönges L., et al., 2011). La cascada de activación de la proteína ROCK se representa en la **Figura 15**:

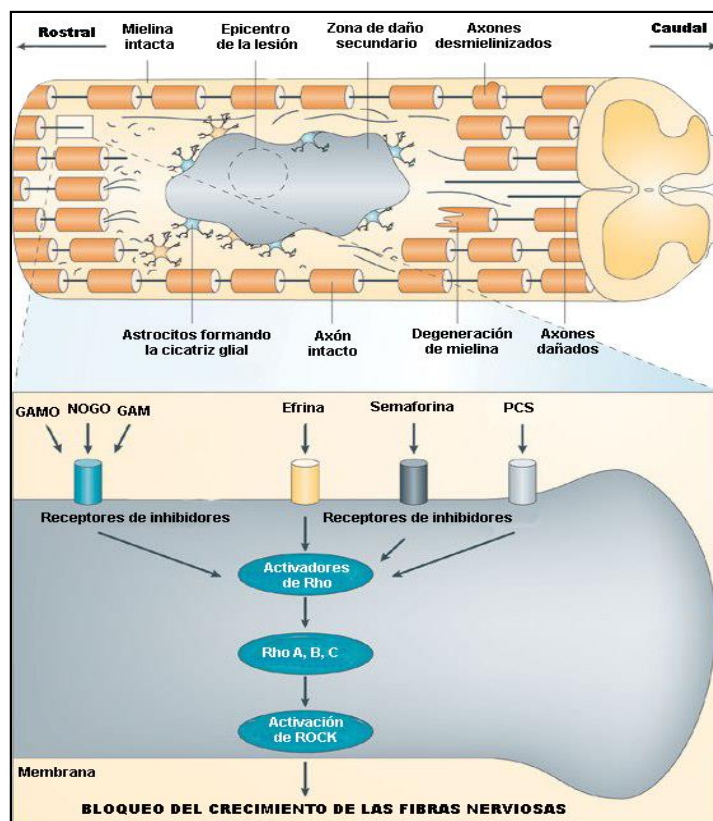


Figura 15. Esquema de la activación de ROCK tras LM (Mueller K. et al., 2005).

Los proteoglicanos se expresan fundamentalmente en los astrocitos y precursores de oligodendrocitos, juegan un importante papel en la formación de la cicatriz glial (Fawcett J.W. and Asher R.A., 1999). El proteoglicano condroitín sulfato (PCS) está

implicado en el desarrollo y su acción inhibitoria posee un rol fundamental en el diseño del patrón neural así como en limitar la plasticidad neuronal (Corvetti L. and Rossi F., 2005). La expresión de PCS aumenta tras LM alrededor del epicentro de la lesión y las neuronas se unen a este a través de los receptores NgR1 y NgR3 (Dickendesher T.L. et al., 2012), por lo que PCS podría estar relacionado con el mismo mecanismo a través del cual las MAM bloquean la regeneración axonal.

1.3. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LESIÓN MEDULAR

La lesión progresa y se expande durante meses afectando de hecho a más de un segmento medular, por todo esto los esfuerzos en favorecer la regeneración de la función neurológica han de ejecutarse con premura y han de centrarse sobre múltiples frentes con diversidad de intervenciones:

- Neuroprotección: para minimizar el daño secundario y mejorar la tasa de supervivencia de los axones/neuronas que han sobrevivido a la lesión y de aquellas zonas que aunque hayan sido axotomizadas puedan regenerar y evitar además su degeneración total.

- Inducir/favorecer el crecimiento axonal: en este caso, tanto potenciando aquellos mediadores que lo favorecen (ej. aumentando la disponibilidad de AMPc), como inhibiendo aquello que lo impide (ej. bloqueando el efecto de los agentes inhibitorios procedentes de las envolturas de mielina o productos generados por la cicatriz o los productos derivados de la inflamación crónica).

- Restablecer/favorecer la conducción del impulso eléctrico: (ej. con el uso de antagonistas específicos de canales iónicos o nuevamente aumentando la disponibilidad de AMPc), que a su vez tendría un efecto redundante sobre los puntos anteriores, evitando la degeneración axonal y favoreciendo su regeneración.

- Inducir/favorecer plasticidad: la ejecución de los puntos anteriores son de hecho estímulos directos en la regeneración de nuevas rutas/alternativas neuronales.

En concomitancia con estos eventos destructivos también existen signos de reparación espontánea, lo que denominamos plasticidad. El término plasticidad se extiende a la generación de nuevos circuitos neuronales partiendo de los ya existentes, pero desconectados por la LM, así como aquellos de nueva generación por proliferación y

diferenciación de células precursoras como parte del proceso de neurogénesis (generación de nuevas neuronas y células gliales).

1.3.1. Terapias celulares

a. Precursores neurales embrionarios o fetales

Durante la fase de gastrulación del período de desarrollo embrionario se forman 3 capas de células germinales que fueron descritas por primera vez por Heinz Christian Pander en 1817, a partir de las cuales se originarán los tejidos y órganos del animal adulto (**Figura 16**). La capa más interna se denomina endodermo, y dará lugar al intestino, hígado, páncreas y pulmones. El mesodermo es la capa intermedia y a partir de la cual se origina el esqueleto, el tejido muscular y los sistemas circulatorio y reproductor. La capa más externa, el ectodermo, es el origen del sistema nervioso, las vías respiratorias altas, el tubo digestivo, la epidermis y las glándulas mamarias.

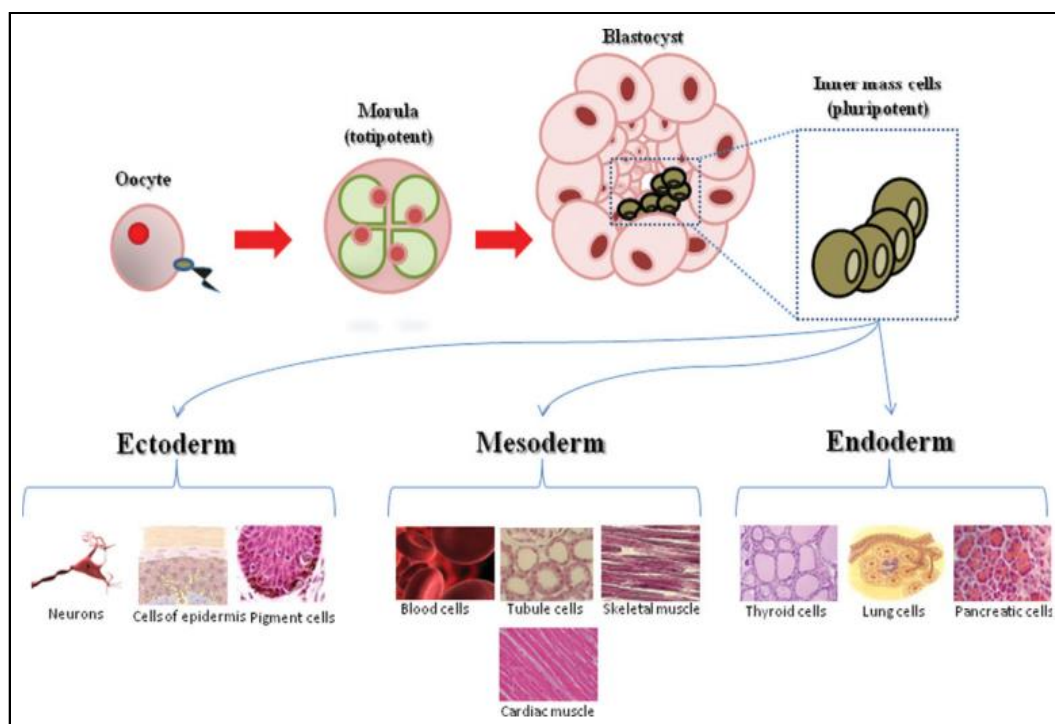


Figura 16. Gastrulación: desarrollo de las capas germinales y origen de los distintos tejidos y órganos (Salem H.K. and Thiemermann C., 2010).

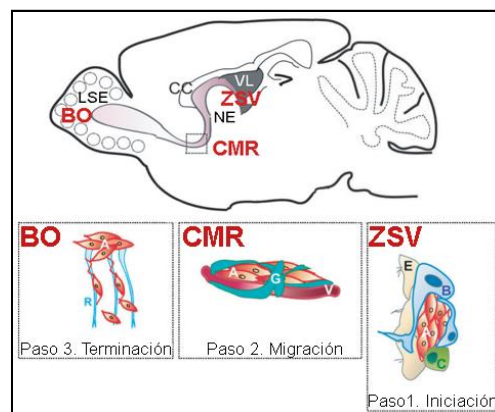
El empleo de precursores neurales de origen embrionario ha supuesto una nueva ventana en el tratamiento de lesiones medulares. La capacidad multipotente de este tipo celular ha impulsado diversos grupos de investigación a establecer protocolos de diferenciación celular específicos de un tipo de célula nerviosa (Erceg S. et al., 2008) y posteriormente de establecer terapias de trasplante celular como aproximación

terapéutica al rescate funcional tanto de células de origen animal (Konig N. et al., 2014; García-Bennett A.E. et al., 2014) como de origen humano (Ronaghi M. et al., 2010; Monni E. et al., 2014).

b. Precursores neurales adultos

- Precursores neurales cerebrales:

La primera evidencia de neurogénesis (generación de nuevas neuronas) en el córtex cerebral de mamífero adulto fue presentada por Joseph Altman en 1962 (Altman J., 1962), oponiéndose a la teoría todavía entonces asentada sobre la incapacidad de regeneración del SNC formulada años antes por Santiago Ramón y Cajal. Un año más tarde, Altman demostraba la capacidad de neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo (Altman J., 1963). Estudios actuales (Mirzadeh Z. et al., 2010; Ihrie R.A. et al., 2011; Rojczyk-Gotebiewska E. et al., 2014 ; Nogueira A.B. et al., 2014; Tong C.K. et al., 2014) sitúan los fenómenos de neurogénesis en mamífero adulto en la zona sub-granular (ZSG) del giro dentado y en la zona sub-ventricular (ZSV) que linda con los ventrículos cerebrales laterales y desde la que los neuroblastos migran hasta la lámina sub-ependimaria (LSE) del bulbo olfatorio (BO) a través de la corriente migratoria rostral (CMR) (**Figura 17**):



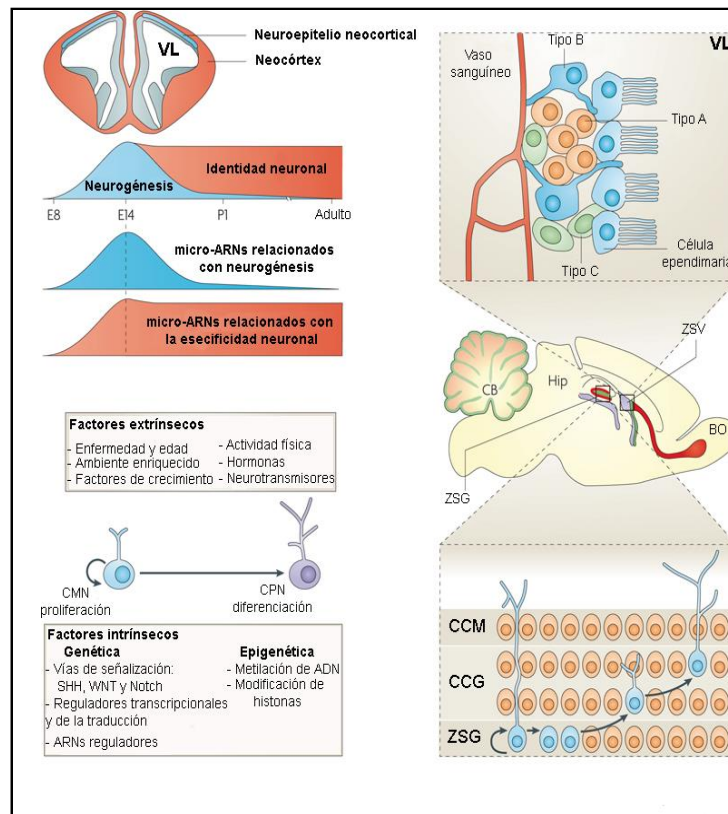


Figura 17. Neurogénesis embrionaria y adulta (Li X. y Jin P., 2010) y detalle de la Corriente Migratoria Rostral en el ratón adulto (Sun W. et al., 2010): E8 y E14 (días Embrionarios 8 y 14), P1 (día Post-natal 1), CMN (Célula Madre Neural), CPN (Célula Progenitora Neural), BO (Bulbo Olfatorio), CB (Cerebelo), Hip (Hipocampo), CCM (Capa Celular Molecular), CCG (Capa Celular Granular), ZSG (Zona Sub-Granular), CMR (Corriente Migratoria Rostral), ZSV (Zona Sub-Ventricular), LSE (Lámina Sub-Ependimaria), CC (Cuerpo Calloso), NE (Núcleo Estriado), VL (Ventrículo Lateral), A (Neuroblastos inmaduros tipo A), B (Precursores neurales tipo B o astrocitos), C (Células de amplificación del tránsito o precursores inmaduros), E (Células Ependimarias), G (Tubo Glial), R (Células Radiales) y V (Vasos sanguíneos).

- Precursores neurales medulares:

Diversos tipos celulares presentes en el SNC adulto actúan como precursores neurales generando nuevas células tanto en condiciones patológicas como fisiológicas (Barnabé-Heider F. et al., 2010, **Figura 18**). Tras LM, se activan los procesos de regeneración celular dando lugar a distintos grupos celulares (Sabelström H. et al., 2013; Guérout N. et al., 2014).

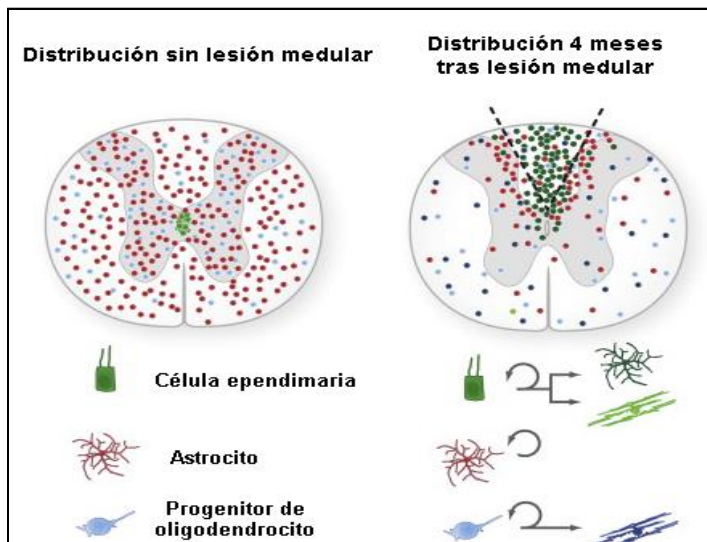


Figura 18. Generación de nuevas células gliales a partir de células endimarias, astrocitos y progenitores de oligodendrocitos en la ME adulta (Barnabé-Heider F. et al., 2010).

- Precusores neurales endimarios:

Las células madre endimarias o epSPC están situadas a lo largo del canal endimario en la médula espinal adulta (Alfaro-Cervello C. et al., 2014). En nuestro grupo de investigación se ha apostado por activar el programa de reparación endógena a partir de las epSPC para establecer aproximaciones terapéuticas en el tratamiento de la LM. Entre los propios antecedentes del grupo (Moreno-Manzano V. et al., 2009) se evidencia el incremento de esta capacidad de regeneración tras LM frente a condiciones fisiológicas: las epSPC proliferan a un ritmo 10 veces superior a sus homólogas no lesionadas (epSPC) *in vitro*. Esta estrategia de regeneración endógena funciona eficientemente en los vertebrados inferiores, como ocurre en los anfibios y reptiles que regeneran espontáneamente la función neuronal tras una lesión medular por intervención de las células endimarias residentes (Samson S. et al., 2012; Zhou Y. et al., 2013). Sin embargo, aunque en vertebrados inferiores resulta ser el mecanismo responsable en la regeneración del tejido medular, en mamíferos por sí solo resulta insuficiente.

1.3.2. Importancia del uso de las células endimarias (epSPC) en terapia celular

Dado que la capacidad de neurogénesis en mamíferos en edad adulta es insuficiente en la regeneración del tejido nervioso dañado tras LM, es necesario implantar terapias adicionales que contribuyan a la regeneración del tejido. La descripción más detallada hasta el momento de lo que denominamos “maquinaria de regeneración endógena” en la médula espinal sana adulta así como su comportamiento y capacidad

regeneradora tras LM la encontramos en nuestros propios resultados de laboratorio (Moreno-Manzano V. et al., 2009).

Los precursores neurales que en el tejido sano se mantienen alineados en el canal endimario, proliferan y se amplifican significativamente migrando e invadiendo la zona de lesión tras LM. Al realizar una disección post-mortem del tejido medular de un animal de laboratorio sano y de otro animal una semana después de haber sufrido una lesión medular traumática observamos una evidente diferencia en la cantidad de precursores neurales (células madre) presentes en cada condición experimental (**Figura 19**).

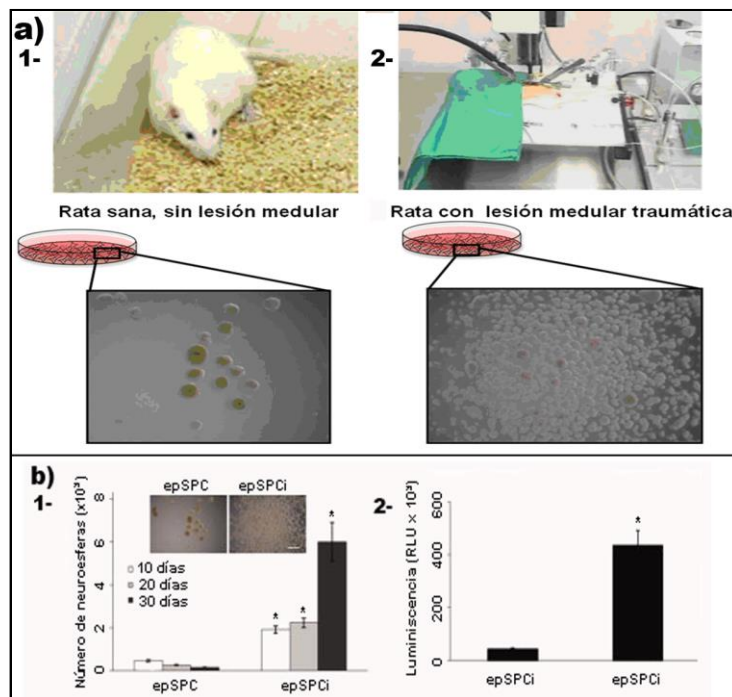


Figura 19. *epSPCi* poseen una mayor tasa de proliferación y mejor auto-renovación.

a) Tejido medular de un animal sano (1) y un animal con LM (2) y **b)** micrografía de contraste de epSPC y epSPCi 10 días tras el cultivo celular (la cuantificación de neuroesferas derivada de epSPCi resulta significativa con $P < 0,5$ en comparación con epSPC) (1) y cuantificación de ATP intracelular (la medición de la actividad de proliferación tras 10 días de cultivo en epSPCi es significativamente superior a epSPC ($P < 0,5$)) (2). (Moreno-Manzano V. et al., 2009).

Este mismo fenómeno que se observa en la placa de cultivo, favoreciendo de forma selectiva el crecimiento de estas células madre, puede observarse en el tejido medular *in vivo*. La **Figura 18** representa de forma más esquemática las células endimarias (en verde) (y también los oligodendrocitos inmaduros del parénquima, en azul) que proliferan abundantemente y migran hacia la zona afectada por la lesión.

Para evidenciar si esta población celular que se genera y amplifica rápidamente tras la lesión todavía mantiene las características propias de una célula madre, se realizan distintos ensayos en el laboratorio. Cuando se induce de forma forzada y dirigida la diferenciación de células madre extraídas de animales sanos (epSPC) o lesionados (epSPCi), no encontramos diferencias en los porcentajes de diferenciación, es decir, que ambas poblaciones mantienen su capacidad multipotente, pudiendo producir *in vitro* astrocitos, oligodendrocitos o neuronas motoras. Sin embargo, sí es evidente que el rendimiento en la producción de estas células diferenciadas siempre es mayor en los cultivos procedentes de animales con LM. Este hecho se explica en gran medida por su mayor vida media y capacidad de crecimiento en cultivo.

La **Figura 20** presenta un ensayo representativo de este tipo de diferenciación dirigida, primero, en los paneles superiores, para la generación de oligodendrocitos, y en los paneles inferiores para la generación *in vitro* de motoneuronas:

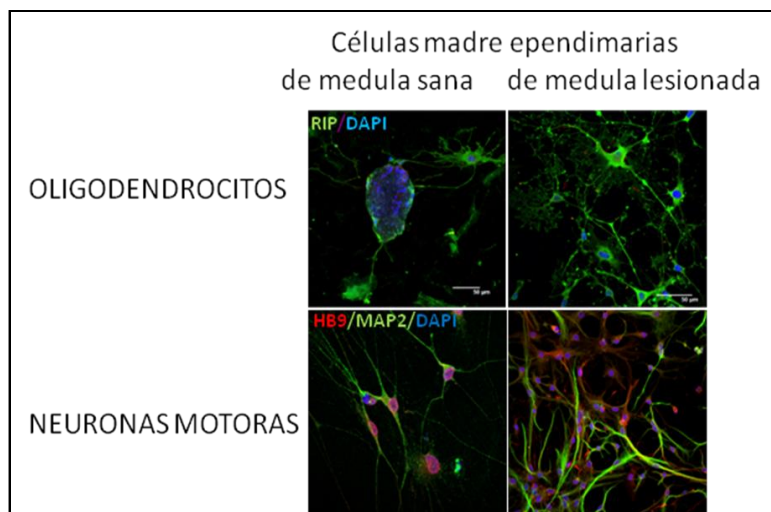


Figura 20. Células madre endimarias de médula espinal sana (izq.) y tras LM (dcha.).

Sin embargo, y a pesar de su probado potencial multipotente, *in vitro* no existen evidencias de diferenciación neuronal o incluso glial maduro (evento con gran relevancia en los procesos de remielinización y enriquecimiento de nuevas redes neuronales en el proceso de regeneración funcional) tras el proceso traumático *in vivo*. Esta deficiencia o bloqueo de la diferenciación de las células madre, ya sean aquellas residentes o las trasplantadas de forma ectópica, es un fenómeno claramente influenciado por el microambiente (revisado por Willerth S.M. and Sakiyama S.E., 2008; Rossi S.L. and Keirstead H.S., 2009 y Ronaghi M. and Erceg S. et al., 2010).

1.3.3. Trasplante de epSPCi tras LM

La prueba definitiva para mostrar la capacidad terapéutica de estas células es su uso en el tratamiento *in vivo* en un modelo de lesión medular. Nuestros antecedentes (Moreno V. et al., 2009) describen un modelo de terapia celular mediante trasplante intramedular de epSPCi en fase aguda (inmediatamente tras la LM). Los experimentos se realizan en un modelo de roedor (*Rattus norvegicus*), donde es posible ensayar mayor número de individuos y distintas condiciones experimentales.

Los resultados mostraron que tras el trasplante agudo de epSPCi, los animales evidenciaban una mejoría significativa ($P < 0,05$) desde la primera semana post-trasplante frente a los animales no trasplantados (sólo lesionados) y que esa diferencia significativa se mantenía a lo largo de las 8 semanas en que los animales fueron evaluados mediante el test de comportamiento BBB. Por otra parte, tras los análisis histológicos se observó que en la ME de los animales que fueron trasplantados el tejido medular estaba mejor preservado (presentaba menor área de quistes) que los animales control. Los estudios de inmunohistoquímica evidenciaron que las células trasplantadas migraron al epicentro de la lesión atravesando la cicatriz glial.

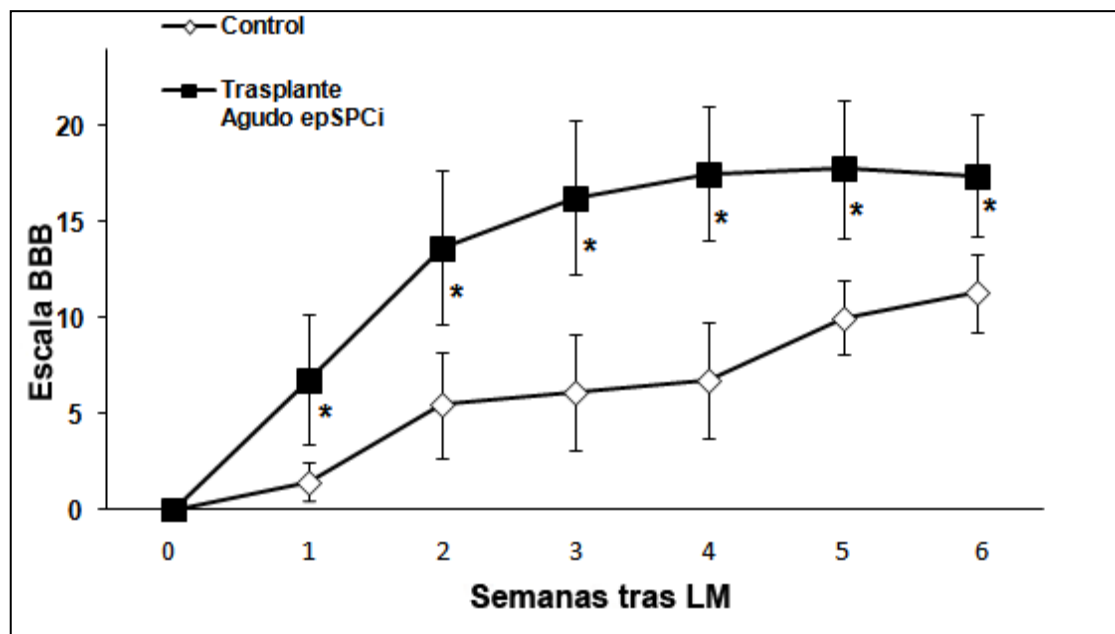


Figura 21. Test BBB (Moreno V. et al., 2009).

1.3.4. Terapias farmacológicas tras LM

Dada la capacidad anti-edematosa de los glucocorticoides (en especial de la dexametasona (DM) y metilprednisolona (MP)), en la década de 1970 su utilización se disparó para el tratamiento de LM (Bracken M.B. et al., 1984; Hall E.D. and Braughler J.M., 1984). Posteriormente, en la década de los 80, se profundizó en la importancia de combatir la peroxidación lipídica generada tras LM y así establecer terapias antioxidantes, concluyendo que dentro del grupo de los corticoides, si bien la DM poseía más potencia anti-edematosa, la capacidad antioxidante de la MP era superior a la DM (Braughler J.M., 1985). A pesar de las ventajas de su administración, las limitaciones en el empleo de glucocorticoides para el tratamiento de LM eran mayores. Entre ellas destacan infecciones por su efecto inmunosupresor, inhibición de la regeneración axonal y plasticidad neuronal (Scheff S.W. and Dekosky S.T., 1989).

Otros compuestos farmacológicos como monosialotetrahexosilgangliósido (GM-1) también han sido estudiados como terapia para la LM. El GM-1 es un compuesto presente en la membrana celular, especialmente abundante en las del SNC, aportando neuroprotección y favoreciendo la regeneración axonal (Kreutz F. et al., 2013). La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) ha sido empleada en el tratamiento de LM ya que antagoniza diversos mediadores del daño secundario como aminoácidos excitotóxicos (Daimon C.M. et al., 2013). La naloxona, antagonista opiáceo, ha sido empleado por su efecto neuroprotector (Hsu Y.Y. et al., 2014).

Desafortunadamente, ninguno de los compuestos empleados hasta el momento en el tratamiento de LM ha demostrado eficacia clínica. E.D. Hall and J.E. Springer revisaron en 2004 los tratamientos farmacológicos actuales empleados en la neuroprotección tras LM aguda, defendiendo la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para tratar esta patología. La importancia en conocer los mecanismos fisiopatológicos implicados en LM para poder desarrollar terapias moleculares focalizadas en reducir al máximo el daño secundario y promover la máxima regeneración axonal y neuronal tras LM resulta indispensable.

1.4. ESTRATEGIAS EN LA MEJORA DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO DE LA LM MEDIANTE POLÍMEROS TERAPÉUTICOS: LA CURCUMINA

1.4.1. Introducción a la curcumina

Numerosos estudios revelan la eficacia de la curcumina en diversas aplicaciones terapéuticas que incluyen procesos inflamatorios, autoinmunes, enfermedades crónicas o neoplasias. Tras la LM la vascularización de la zona lesionada se ve comprometida, se produce edema y pérdida de la barrera hematoencefálica, por lo que la administración sistémica de compuestos se torna muy limitada, haciéndose necesaria la administración local. La administración local única, además, evita mantener catéteres en el espacio intratecal de forma crónica que pudieran generar lesiones adicionales. En las fases aguda y sub-aguda de LM, el medio extracelular experimenta una acidificación debido a la liberación de radicales libres procedentes de las células dañadas y la elevada concentración de iones provenientes de los axones lacerados.

La curcumina es un colorante natural procedente de la cúrcuma, especia que se obtiene a partir del rizoma de la misma planta (*Curcuma longa*), planta herbácea de la familia de las zingiberáceas (**Figura 22**).



Figura 22. *Curcuma longa* y cúrcuma extraída de su rizoma (Hsu H.Y. and Hsu C.S., 1980).

La cúrcuma fue empleada por primera vez en India entre 610 a.C. y 320 a.C. como colorante textil, aunque hoy en día es más conocida por su utilización en la cocina hindú como especia. La estructura química de la curcumina fue descrita por primera vez en 1910 por Miłobędzka J., Kostanecki S. y Lampe W. y constituye el principal curcuminoides de la cúrcuma. Los otros dos curcuminoides derivados de la cúrcuma que se conocen son el desmetoxicurcumin y bis-desmetoxicurcumin. Los curcuminoides son fenoles naturales, en este caso polifenoles, que confieren a la cúrcuma su color amarillo característico. La curcumina, también conocida como diferuloilmetano ((1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxy-3-metoxifenil)-1,6-heptadiene-3,5-dione), es el principio activo de la cúrcuma (Aggarwal B.B. et al., 2007). Existen dos formas de la curcumina: la forma “ceto”, sólida y soluble en etanol, y la forma “enol” más estable y que se encuentra en estado líquido (Herebian D. et

al., 2009). En los experimentos *in vitro* de este estudio se emplea la forma “ceto” de la curcumina como curcumina libre (**Figura 23**).

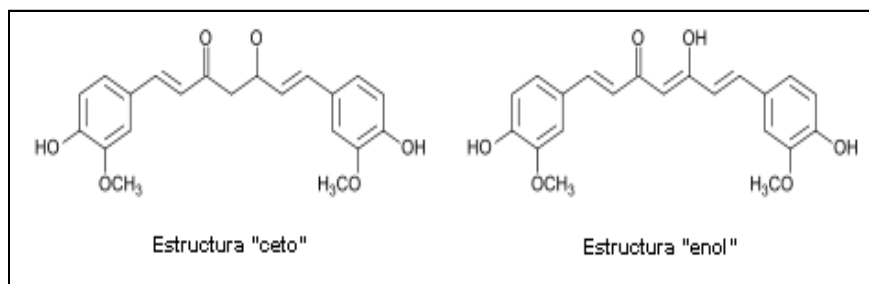


Figura 23. Formas “ceto” y “enol” de la curcumina.

La cúrcuma es ampliamente conocida por su poder antitumoral por su capacidad de inducir apoptosis en células cancerígenas sin efectos citotóxicos en células sanas, antioxidante, antiinflamatorio y en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Zhao L.N. et al., 2012). En los últimos años se han estudiado las actividades biológicas y farmacológicas de la cúrcuma para tratar de esclarecer sus mecanismos de acción (Aggarwal B.B. and Shishodia S., 2004). La curcumina es una molécula pleiotrópica, es decir, con influencia sobre distintos rasgos fenotípicos, capaz de interaccionar con dianas moleculares implicadas en diversas rutas. Se ha demostrado que *in vivo* e *in vitro* la curcumina modula la respuesta inflamatoria limitando la actividad de la ciclooxigenasa-2 y lipooxigenasa (Rastogi M. et al., 2008).

1.4.2. La curcumina en el tratamiento de LM

Entre la literatura científica se encuentran numerosos ejemplos que defienden el poder anticancerígeno de la curcumina (Aggarwal B.B. and Harikumar K.B., 2009; Bar-Sela G. et al., 2010; Basnel P. and Skalko-Basnel N., 2011; Gryniewicz G. and Ślifirski P., 2012), su poder cicatricial (Gopinath D. et al., 2004; Panchatcharam L. et al., 2006), antiinflamatorio (Ormond D.R. et al., 2012; Li Y. et al., 2013; Chhunchha B. et al., 2013), antioxidante (Hall E.D. et al., 2011; Sahin H. et al., 2011; Doggui S. et al., 2013) y neuroprotector (Lin M.S. et al., 2011; Holly L.T. et al., 2012; Thapa A. et al., 2013; Hoppe J.B. et al., 2013; Kurt G. et al., 2014; Kim K.T. et al., 2014). Cemil B. et al. (2010), entre otros, cita el papel neuroprotector de la curcumina tras una LM aguda (LMA).

1.4.3. Nanomedicina: conjugación química con Polietilenglicol-Poliacetal

Actualmente la nanomedicina juega un papel fundamental en el diseño de nuevas terapias farmacológicas aumentando la efectividad de los tratamientos y reduciendo los

efectos adversos. La nanomedicina ha experimentado un auge exponencial en los últimos años (especialmente en el campo de la oncología) en el que se establecen estrategias terapéuticas que visualizan incrementar la biodisponibilidad de los principios activos mediante cinéticas de liberación controlada (Punfa W. et al., 2012; Reddy C.A. et al., 2014; Chen D. et al., 2014; Song Z. et al., 2014) y mediante mejoras en su metabolización y estabilidad (Yallapu M.M. et al., 2010; Manju S. et al., 2011; Dey S. et al., 2014).

La curcumina posee baja absorción y biodisponibilidad, por ello actualmente se estudian métodos para incrementar la absorción del compuesto y su biodisponibilidad sistémica mediante la combinación con piperina (compuesto derivado de la pimienta negra: Srinivas P.S. et al., 1998) y el flavonoide quercetina (Shehzad A. et al., 2010). Por otro lado, se trata de un compuesto seguro con baja toxicidad (Hasima N. and Aggarwal B.B. et al., 2012). El empleo de poliacetales en la conjugación de nanopartículas para establecer polímeros terapéuticos es ampliamente conocido (Tomlinson R. et al., 2003). Recientemente numerosos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en la obtención de un polímero terapéutico basado en el principio activo de la curcumina (Sahu A. et al., 2008; Konwarh R. et al., 2010; Kim C.Y. et al., 2011).

2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Capítulo 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La lesión medular supone la principal causa de parálisis, sin embargo en la actualidad no existen terapias efectivas para curar las graves consecuencias que esta origina.

Resultados previos obtenidos tanto en nuestro laboratorio como en otros grupos evidencian la importancia de las células ependimarias neurales como tratamiento de la lesión medular. Sin embargo, los estudios realizados sugieren la necesidad de potenciar este tratamiento, por ejemplo con el uso combinado de fármacos.

Evidencias en los últimos años demuestran el poder antioxidante y antiinflamatorio, entre otros, de la curcumina (derivado de la Cúrcuma, *Curcuma longa*) mostrando capacidad neuroprotectora por administración sistémica. Sin embargo, la cúrcuma posee una baja hidrosolubilidad, lo que además reduce su biodisponibilidad con una rápida metabolización. Además, inherente al proceso de LM, en la zona lesionada y a tratar, se genera un gran edema y pérdida de la BHE, dificultando una buena difusión de los fármacos administrados por vía sistémica, incluida la curcumina.

Es por todo ello que en este trabajo, empleando un modelo de rata con lesión medular por contusión severa, se propone la aplicación de estrategias terapéuticas más efectivas que por una lado, 1) mejoren la efectividad del tratamiento farmacológico por aplicación de la nanomedicina, con conjugación directa de curcumina a polímeros terapéuticos, y 2) aplicando la terapia celular en aquella fase clínica más probable, el estado sub-agudo.

OBJETIVOS

Los objetivos concretos propuestos para este trabajo son:

- 1- Investigar la capacidad de la curcumina como posible agente neuroprotector *in vitro* e *in vivo* administrada de forma local por vía intratecal:**
 - 1.1. Conjugación de curcumina con el polímero terapéutico Polietilenglicolpoliacetilado (PEG-PA).**

- 1.2. Determinación de la actividad de la curcumina libre o conjugada (PEG-PA_Curcumina) sobre la viabilidad celular de epSPCi como modelo *in vitro*.
- 1.3. Caracterización de la efectividad de curcumina conjugada como tratamiento farmacológico en la recuperación funcional en un modelo *in vivo* de lesión medular aguda.
- 1.4. Análisis morfológico e histopatológico de los tejidos empleando marcadores específicos para el estudio de regeneración neuronal, apoptosis y procesos inflamatorios.
- 1.5. Estudio bioquímico de los tejidos medulares derivados del modelo *in vivo* para el estudio de expresión.

2- Estudio de la capacidad del rescate funcional locomotriz del trasplante de epSPCi tras LM en fase sub-aguda:

- 2.1. Evaluación de la capacidad locomotora mediante tests de comportamiento.
- 2.2. Análisis morfológico e histopatológico de los tejidos empleando marcadores específicos de regeneración neuronal y procesos inflamatorios.
- 2.3. Estudio del perfil transcripcional de los fenómenos de apoptosis y autofagia del tejido medular lesionado en comparación con aquel procedente de animales lesionados y trasplantados a distintos tiempos tras la lesión.

3- MATERIAL Y MÉTODOS

Capítulo 3: MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

3.1.1. Animales

Ratas hembras Sprague-Dawley (S/D)-OFA y S/D-eGFPp/p (S/D-Tq(GFP)2BalRrrc) que expresan de forma ubicua la proteína fluorescente verde eGFP (Charles River, France, www.criver.com), con un peso inicial de 125gr, criadas y estabuladas en perfectas condiciones de higiene en condiciones libres de patógenos específicos (SPF), climatización ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$), humedad (60%) y con ciclos de luz/oscuridad (12h/12h) hasta alcanzar aproximadamente 180-200gr de peso en el momento de la cirugía. Los animales reciben comida sólida en forma de pellets y agua *ad libitum* durante toda la duración del experimento.

El manejo y utilización de todos los animales se realiza acorde a lo establecido por el Real Decreto 1201/2005 del Ministerio de Presidencia y el Comité Ético de Bienestar Animal (CEBA) del Centro de Investigación Príncipe Felipe, con referencia CEBA 12/0237.

3.1.2. Genotipado

Las ratas hembra S/D-eGFPp/p (S/D-Tq(GFP)2BalRrrc) que expresan la proteína fluorescente eGFP se emplean como donantes en los cultivos primarios de células endimarias. Los diferentes genotipos, Wild-Type, heterocigoto y homocigoto se analizan mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) semicuantitativa. Se obtiene una muestra de tejido de la cola de las crías en el momento del destete (1 mes post-natal) de aproximadamente 3-5mm. A continuación se procede a la extracción y posterior amplificación del ADN genómico utilizando el kit Maxwell 16 Mouse Tail DNA Purification (Promega, ref. AS1120), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Se realiza una solución madre que contiene todos los componentes necesarios para realizar la PCR proporcionados en el kit (GoTaq DNA Polymerase, Promega, ref. 9PIM300) y a la que se añade $1\mu\text{g}$ del ADN extraído. Las reacciones de PCR se realizan en el termociclador (Eppendorf, Mastercycler ep) siguiendo el protocolo que aparece en la **Tabla 1**:

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
PREINCUBACIÓN	94°C	5 min	1
AMPLIFICACIÓN	94°C	30 seg	35
	60°C	30 seg	
	72°C	1min 15seg	
EXTENSIÓN	72°C	7 min	1
REFRIGERACIÓN	4°C	continuo	1

Tabla 1. Protocolo de la PCR.

Para realizar el análisis del genotipo se emplean los primers int52 Forward y Reverse indicados en la **Tabla 2**:

Primers	
int52 Forward	5'- AGC AAT GAA TAG CCT CTC TCC T- 3'
int52 Reverse	5'- CCC ATA TGT GCC AAG CAC TTT ACC- 3'
U3r-0	5'- GTC TGA AGG GAT GGT TGT AGC TGT- 3'

Tabla 2. Primers int52 (Forward y Reverse) y U3r-0 empleados en el genotipado.

Como resultado de la amplificación o ausencia de esta para el transgén GFP, se obtiene un producto de PCR de 799 pares de bases (bp) para el genotipo Wild-Type, una banda de 1050bp para el genotipo homocigoto y ambas bandas para el genotipo heterocigoto (**Figura 24**).

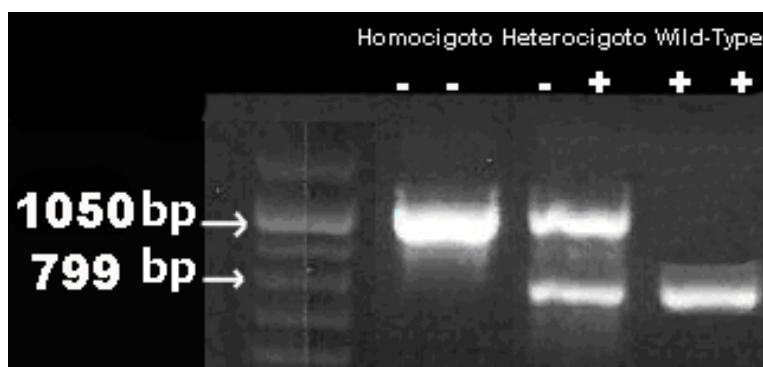


Figura 24. Producto de la PCR. Se observan los genotipos homocigoto (en 1050bp), heterocigoto (una banda de 1050 bp y otra de 799bp) y Wild Type.

3.1.3. Grupos experimentales

GRUPOS EXPERIMENTALES DEL OBJETIVO 1:

En este procedimiento se estudia la actividad del polímero de curcumina conjugada con polietilenglicol-poliacetal (PEG-PA) ligado al fluoróforo Cyanine para el estudio de su actividad.

1. PEG-PA (Control): LM por contusión severa (250KDynes) y posterior administración intratecal del vehículo (PEG-PA).

2. PEG-PA Curcumina: LM por contusión severa (250KDynes), seguida de cateterización intratecal del compuesto PEG-PA_Curcumina-Cyanine.

GRUPOS EXPERIMENTALES DEL OBJETIVO 2 (parte 1):

1. Lesión medular (Control): LM por contusión severa (250KDynes) y 1 semana post-cirugía administración intramedular de medio de cultivo.

2. Trasplante sub-agudo de epSPCi tras LM: LM por contusión severa (250KDynes) y 1 semana post-cirugía trasplante intramedular de células endimarias derivadas de una médula lesionada previamente (epSPCi).

En ambos experimentos se destina el 50% de los animales para el análisis histológico del tejido medular y 50% para su análisis molecular.

GRUPOS EXPERIMENTALES DEL OBJETIVO 2 (parte 2):

Se establecen 5 grupos de animales, cada uno con (n=4) para el estudio del perfil transcripcional del tejido medular mediante análisis de arrays de DNA:

- T0: sin lesión, condiciones fisiológicas.
- T1: 1 semana post-LM (fase aguda).
- T2: 2 semanas post-LM (fase sub-aguda).
- T4: 4 semanas post-LM (fase crónica).
- T8: 8 semanas post-Lm (fase crónica).

3.1.4. Procedimiento quirúrgico de contusión de la medula espinal en rata

La inducción anestésica de los animales, la preparación del campo quirúrgico y la cirugía se realizan en el quirófano en condiciones de esterilidad. En la mesa auxiliar de quirófano se administra a los animales por vía subcutánea morfina como analgesia a

razón de 2,5mg/Kg (Braun Medical Inc., Bethlehem, PA, www.bbraunusa.com), 30 minutos antes de comenzar la cirugía y el antibiótico Baytril (enrofloxacin, 5 mg/kg, Bayer, Leverkusen, Germany, www.bayer.com). Pasado ese tiempo, se les induce la anestesia inhalatoria mediante Isoflurano (Braun Medical Inc.) a 2,5-3% en cámara de inducción (**Figura 25**) y posteriormente se mantiene a través de la mascarilla a 2-2,5% con un flujo de oxígeno constante al 2%.



Figura 25. Animal en cámara de inducción anestésica.

Una vez inducido en un plano anestésico profundo (ausencia de reflejo palpebral), se rasura el campo quirúrgico mediante una peladora automática y se desinfecta el campo quirúrgico con Desinclor (solución de digluconato de clorhexidina de uso tópico diluída al 5%, clorhexidina 1%, 500mL). A continuación se traslada a la mesa de cirugía donde se coloca en decúbito prono sobre una placa térmica colocada sobre la unidad espinal, para prevenir la hipotermia derivada de la anestesia (**Figura 26**).

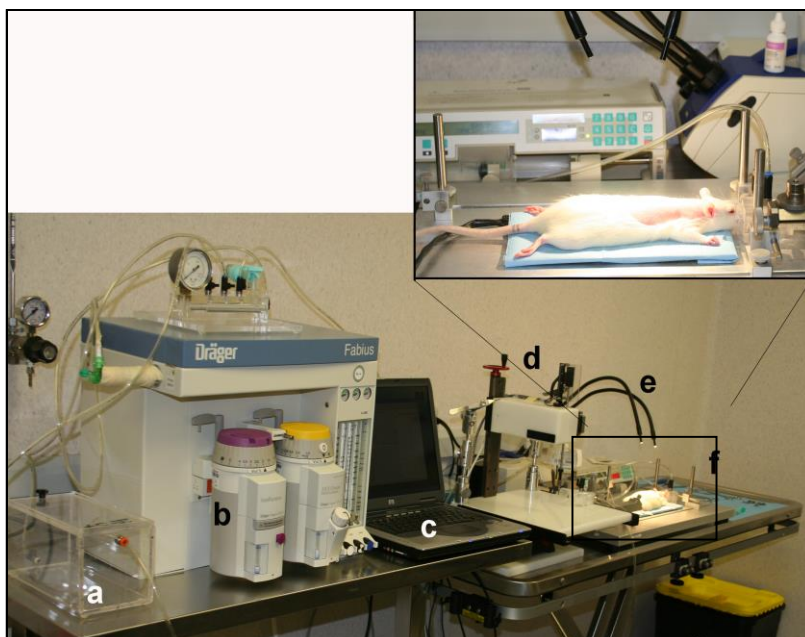


Figura 26. Vista panorámica de la mesa de quirófano y ampliación del animal sobre placa térmica durante el mantenimiento de la anestesia a través de mascarilla. Cámara de inducción (a) junto al vaporizador de la máquina anestésica (b), ordenador portátil para manejar el software del impactor (c), Infinitive Horizon Impactor (d), fuente de luz fría (e, Leica, ref. KL 1500 LCD) y animal sobre la placa térmica en la unidad espinal (f).

Para evitar la deshidratación ocular, se administra Lipolac (Angelini, Lipolac Gel Oftálmico, Carbómero, 10g, www.angelini.es), lágrima ocular viscosa.

Todo el material quirúrgico empleado está previamente esterilizado tras un ciclo en un autoclave de vapor (**Tabla 3**).

Material quirúrgico
1. Bisturí #3 (No. 10003-12, FST, USA)
2. Hojas de bisturí (No. 1011-00, FST, USA)
3. Tijeras de Metzemaum (No. 14078-10, FST, USA)
4. Tijeras de mayo (No. 14028-10, FST, USA)
5. Pinzas serradas Adson (No. 11006-12, FST, USA) (2x)
6. Pinzas con dientes finos afiladas Adson Graefe (No. 11030-12, FST, USA)
7. Gubia Fridman-Person (Streight, No.16220-14, FST, USA)
8. Desperiostizador (No. 10097-16, FST, USA)
9. Tijeras de irisdectomía, superficie de corte 8mm (No.15024-10, FST, USA)
10. Retractor (No. 17008-07, FST, USA) (2x)
11. Porta agujas (No. 12502-12, FST, USA)
12. Clamp Verterbal 986B (Rat) (David Kopf Instruments)
13. Micro-Mosquito recto (No. 13010-12, FST, USA) (2x)
14. Micro-Mosquito curvo (No. 13011-12, FST, USA)
15. Micro-spatula doble (No. 10091-12, FST, USA)
16. Cera ósea hemostática (No. 19009-00, FST, USA)
17. Sutura Monosyn violet 4/0 HR26 (Reabsorbible, Ref: G0022024, BBraun,

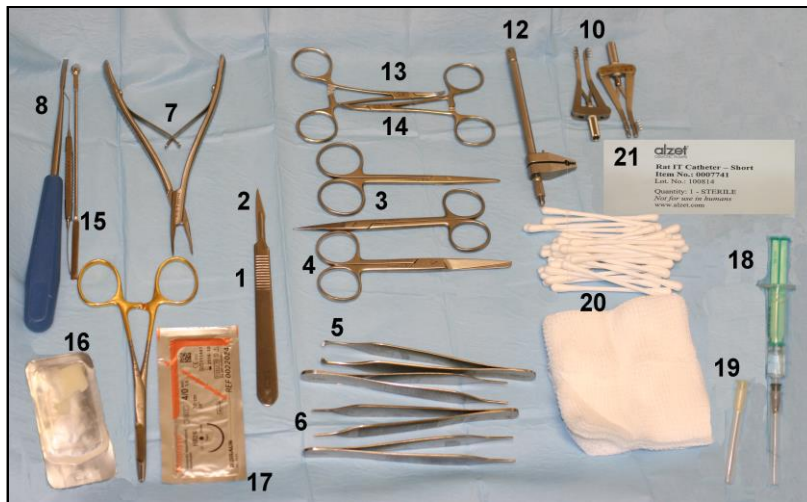


Tabla 3 y Figura 27. Lista y foto del material quirúrgico.

Se realiza una incisión de aproximadamente 2cm a nivel de T7 a T10 con el bisturí, tomando como referencia mediante palpación externa el final de las escápulas y la zona de la última costilla. A continuación, con las tijeras de disección, se disecciona el tejido subcutáneo adyacente y la musculatura hasta llegar al nivel de las vértebras T7-T10 donde se va desinsertando la musculatura paravertebral hasta visualizar las apófisis espinosas. Se puede tomar como punto de referencia la rama de la arteria toracodorsal que discurre por encima de T6, con precaución de no dañarla. Tomando como referencia las apófisis espinosas de las vértebras, siendo característico el patrón anatómico de las apófisis espinosas de T8 y T9, perpendiculares al cuerpo vertebral (**Figura 28**).

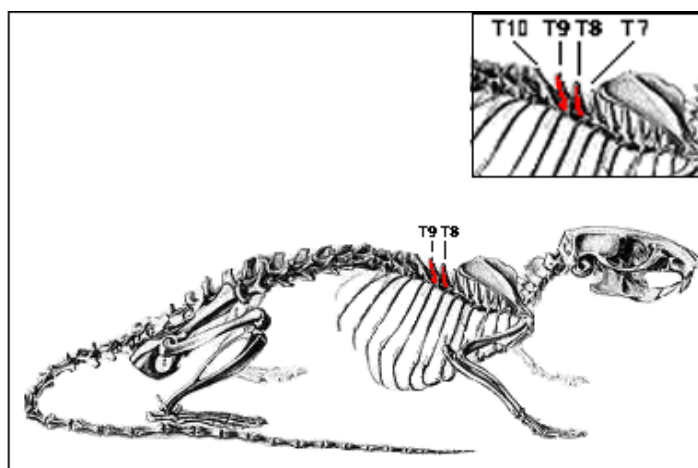


Figura 28. Esqueleto de rata. Las vértebras T8 y T9, marcadas en rojo, son laminectomizadas. El cuerpo de la vértebra T7, situada justo detrás de las escápulas.

Se realizan de nuevo con el bisturí dos incisiones de aproximadamente 1cm a ambos lados de las apófisis espinosas de T7-T10 para proceder a la desinserción de los músculos paravertebrales. Se coloca el separador entre las incisiones para ampliar el campo y de esta manera exponer las vértebras T7 a T10 (**Figura 29**). Se utiliza el desperiostizador para eliminar todo resto de músculo adherido a las vértebras T8 y T9 y permitir una mejor visualización de las mismas.

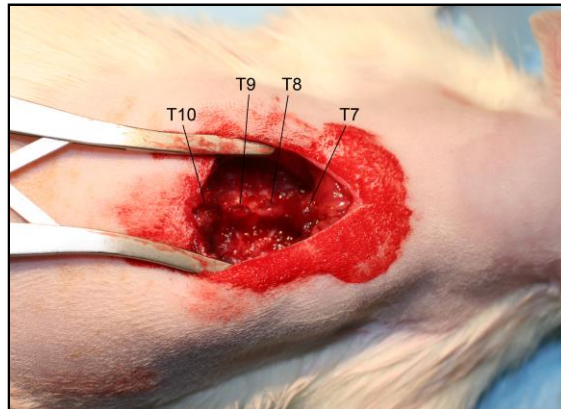


Figura 29. Visualización de las apófisis espinosas de las vértebras T7 a T10 tras la desinserción de los músculos paravertebrales.

A continuación se separan cuidadosamente las uniones entre las vértebras T7-T10 con precaución de no dañar las raíces dorsales. Una vez diseccionado y expuesto correctamente el campo, se procede a cortar la apófisis espinosa de las vértebras T8 y T9 mediante la gubia. Los cuerpos vertebrales de T7 y T10 van sujetos a las pinzas del impactor para asegurar la inmovilización del animal y limitar las variaciones entre impactos. Por ello es importante preservar las apófisis espinosas de estas vértebras que van a facilitar la manipulación en el anclaje al impactor. Se realiza una laminectomía a nivel de T8 y T9 visualizando la médula con la duramadre y comprobando que no quede ninguna esquirla de hueso que pueda dañar la médula ni con el cual el contusor pueda chocar al realizar el impacto (**Figura 30**).

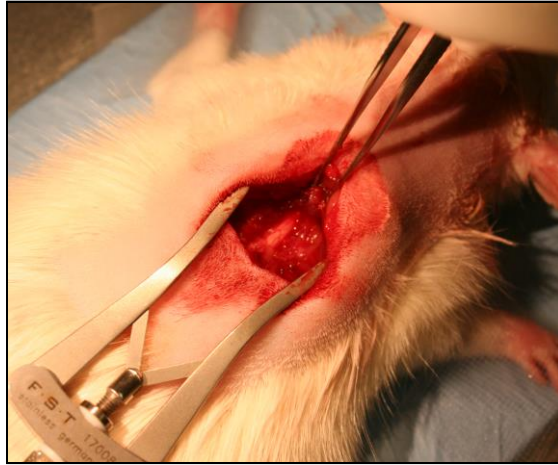


Figura 30. Laminectomía de las vértebras T8 y T9. Se observa la médula espinal expuesta. Las pinzas sujetan la apófisis espinosa de la vértebra T7.

El animal se coloca sobre la plataforma del “Infinite Horizon Impactor” (IHI; Precision Systems, Kentucky, IL, www.presysin.com) provista de mascarilla anestésica auxiliar y sujetamos con sus pinzas articuladas los cuerpos vertebrales T7 y T10, asegurándonos de dejar el campo de T8 y T9 despejado manteniendo el tejido medular descubierto, paralelo y fuertemente fijado pero no tenso para mejorar la reproducibilidad de los impactos (***Figura 31***).

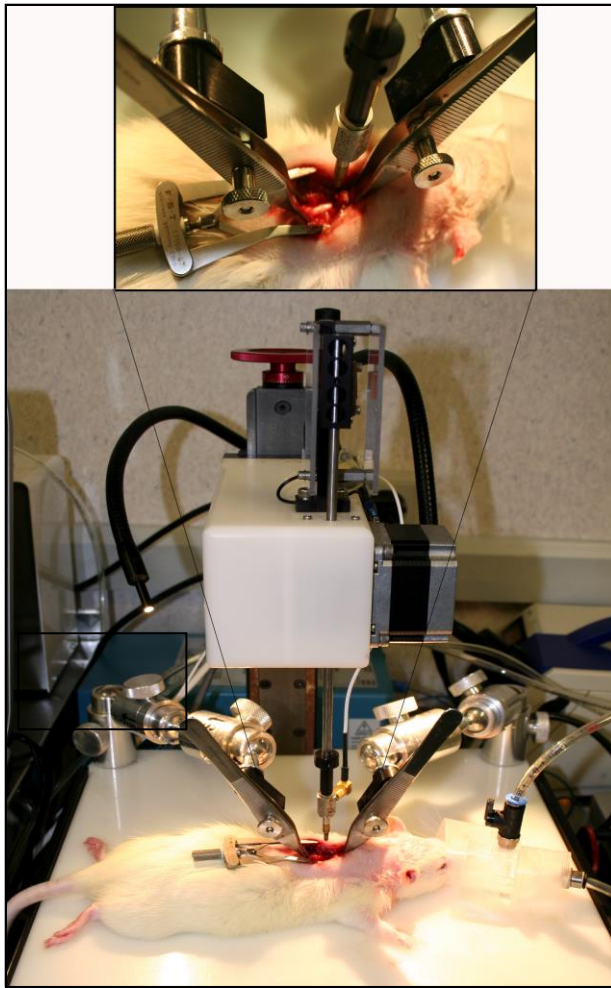


Figura 31. Pinzas del “Infinite Horizon Impactor” sujetando los cuerpos vertebrales de T7 y T10.

Se sitúa la pesa del contusor 5mm por encima del tejido blando y se aplica una contusión severa de una fuerza de 250KDynes, equivalentes a 2,5N (controlado por el sensor de la sonda que controla mecánicamente la contusión) (**Figura 32**). Los registros de la magnitud de los impactos y el desplazamiento del tejido no muestran diferencias significativas entre los parámetros analizados de los distintos animales, por lo que los impactos se consideran homogéneos entre todos los animales, en caso contrario los animales se descartan del estudio.

localiza la última costilla y la vértebra T13 por palpación externa y se realiza una incisión longitudinal de aproximadamente 5mm a este nivel. Se desinserta la musculatura vertebral hasta visualizar la apófisis espinosa, la cual tomamos como referencia para realizar una nueva incisión por encima de esta y proceder a la desinserción de los músculos paravertebrales y exposición de la vértebra. Una vez diseccionado el campo, se secciona la apófisis espinosa de T13 y con la gubia se procede a su laminectomía, visualizando la médula con la duramadre intacta. Se mide el recorrido del catéter colocando el catéter externamente sobre el animal desde la incisión a nivel de T13 hasta la zona de lesión. A continuación se dobla el extremo biselado de una aguja de 22G y se incide la duramadre en un ángulo aproximado de 75°. Se introduce en el espacio subaracnoideo a través de la incisión un catéter de poliuretano con fiador para facilitar su introducción (Alzet, Catéter Intratecal de Ratón, Poliuretano, ref 0007743: 2,5 cm 32G (0,23mm OD x 0,09mm ID) que previamente se purga con suero Salino Fisiológico al 0,9% (SSF 0,9%) (Braun FisiVet, cloruro de sodio 0,9%, 250mL, ref. 472778, www.bbraun-vetcare.es) para no introducir aire durante la inoculación. El catéter está previamente cargado con el compuesto a inyectar, PEG-PA_Curcumina o PEG-PA (vehículo). Una vez introducido, se retrae el fiador para que quede dentro del tubo y no dañe el tejido medular. A continuación se avanza el catéter hasta alcanzar la zona de la lesión en T8, manteniendo siempre en ángulo la parte terminal del tubo para crear el mayor espacio posible entre la médula y la duramadre.

Durante el avance puede haber resistencias u observar contracciones musculares debidas a la estimulación de los nervios espinales. En este caso se retrocede hasta 1cm y se gira el catéter apartándolo de la zona estimulada e introduciéndolo nuevamente siempre lentamente hasta no encontrar resistencias. Los principales signos fisiológicos indicativos de que el catéter está situado en el espacio intratecal son los movimientos rápidos e involuntarios de la cola (Veitenheimer B. and Osborn J.W., 2011; Lee H., 2013). Se retira el fiador totalmente y la parte más ancha del catéter que ha quedado en el exterior se acopla a una jeringuilla Hamilton de 25µL (Hamilton, Jeringas Microliter serie 700, 25µL 702, ref. HA-80400, Modelo 702N, aguja cementada 22s ga, estilo de punta 2) previamente colocada en una bomba de infusión Nanomite (Harvard apparatus, Bomba de infusión programable Elite 11 Nanomite, ref. 704507, www.harvardapparatus.com) (**Figura 34**). Se inocula la droga a una velocidad de 2µL/min, se observa que el émbolo de la jeringuilla se desplaza normalmente y no existen obstrucciones.

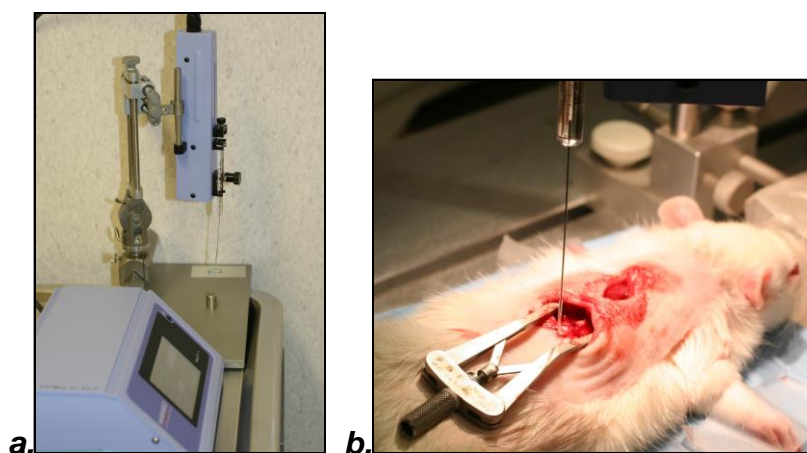


Figura 34. (a) *Jeringa Hamilton de 25 μ L acoplada al Nanomite (Harvard apparatus) e (b) inoculación intratecal de compuestos mediante catéter (en la imagen aparece la parte exteriorizada del catéter acoplada a una jeringuilla Hamilton de 25 μ L, a través de los cuales se inoculan los compuestos).*

Al finalizar todo el procedimiento y antes de suturar ambas incisiones, se coloca un pequeño colgajo de tejido graso del animal extraído del cojinete graso que poseen a nivel cervical sobre la zona laminectomizada para protegerla de posibles adherencias. La sutura se realiza en varios planos: los paquetes musculares se suturan mediante una sutura continua utilizando la sutura monofilamento de gluconato reabsorbible Monosyn 4/0 1.5 (Braun, Monosyn 4/0 1.5 DS19 (M), 70cm, ref. C0023404, www.bbraun.com). La incisión realizada en la piel se cierra mediante pegamento quirúrgico Histoacryl (Braun, Histoacryl Blue Tissue Adhesive 0,5mL, ref. 1050052, www.bbraun.com). Una vez finalizada la cirugía se coloca el animal en una cámara de recuperación equipada con manta eléctrica para combatir el riesgo de hipotermia tras la cirugía. Una vez el animal está recuperado se vacía su vejiga mediante la técnica de Credé antes de depositarlo en su jaula. Así mismo, se administra una dosis de buprenorfina (0,1mg/Kg SC) durante los 4 días posteriores a la intervención cada 12 horas. En la **Tabla 4** se resume el protocolo farmacológico aplicado en todo el procedimiento quirúrgico:

FASE	EFECTO		FÁRMACO	CASA COMERCIAL	DOSIS	VÍA	
PRE QUIRÚRGICA	Analgesia		Morfina	Braun	2.5 mg/kg	sbc	
	Antibioterapia		Enrofloxacino	Bayer	5 mg/kg	sbc	
INTRA QUIRÚRGICA	Anestesia general	Inducción	Isoflurano	Braun	2,5-3%	inhal	
		Mantenimiento	Isoflurano	Braun	2-2,5%	inhal	
	Lubricación ocular		Lipolac	Angellini	1 gota / ojo	tópica	
POSTQUIRÚRGICA	Analgesia		Buprenorfina	Schering Plough	0.1 mg/kg	Sbc 4 d	
	Antibioterapia		Enrofloxacino	Bayer	5 mg/kg	Sbc 7 d	
	Hidratación		Solid drink ®	Harvard Apparatus	1 sobre/ animal	oral 7 d	
			Glucolyte ®	Braun	10mL/0,5L		
			Ringer Lactato		2 mL	Sbc/IV	
	Úlceras	Prevención	Mepentol ®	Bama-Geve		tópica	
			Lactacyd ®	GSK			
			Clorhexidina 5%				
		Tratamiento	Blastoestimulina C	Almirall			tópica
			Dermisone ®	Novartis			
			Enrofloxacino	Bayer			
Favorecer el tránsito intestinal		Hodernal ®	Rottapharm Madaus	25µL / 100g	IR		

Tabla 4. Resumen del protocolo farmacológico durante la cirugía.

3.1.6. Toma de imágenes en el IVIS Spectrum

Con el fin de monitorizar la biodistribución del complejo PEG-PA_Curcumina-Cyanine una vez administrado, tomamos imágenes de los animales a distintos tiempos; inmediatamente después de la cirugía y en los días posteriores a la misma (hasta 5 días después) utilizando el IVIS (PerkinElmer, IVIS Spectrum Pre-clinical In Vivo Imaging System, ref. IVISSPE, www.perkinelmer.com). El compuesto PEG-PA_Curcumina está conjugado con Cyanine, un fluoróforo que emite señal a una longitud de onda de 555nm.

El IVIS Spectrum es un sistema de imagen *in vivo* que permite la monitorización no invasiva y a tiempo real de la distribución y disponibilidad del compuesto, así como de células (Yukawa H. et al., 2012) por el trazado de fluoróforos o sondas luminiscentes (**Figura 35**). El sistema de filtros y el espectro de algoritmos del IVIS permiten obtener análisis de epi-bioluminiscencia (iluminación incidida desde el plano superior) y fluorescencia en un amplio espectro de longitud de onda, permitiendo separar las señales obtenidas de diversos análisis del mismo animal. En primer lugar, se introduce el animal en una cámara de inducción anestésica a 2,5-3% de isoflurano. A continuación se introduce en el IVIS y se le coloca la mascarilla anestésica, el mantenimiento se realiza a 2% de isoflurano.

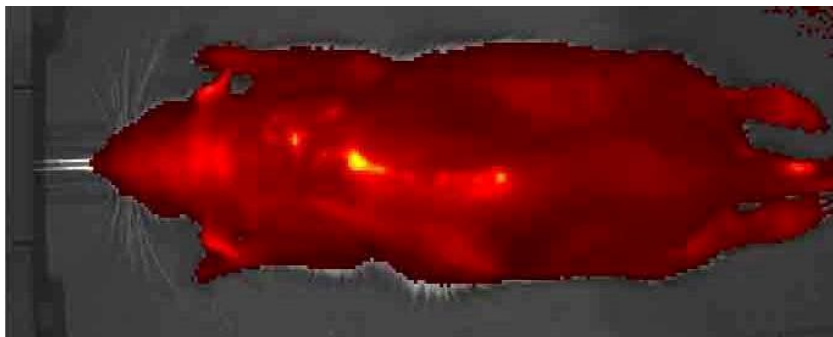


Figura 35. *Imagen de fluorescencia del IVIS. Señal fluorescente emitida por el Cyanine captada por el IVIS a una longitud de onda de 555nm 3 días tras cateterización intratecal del compuesto PEG-PA_Curcumina-Cyanine.*

Al tomar la imagen antes de cerrar la incisión en T13 se observa que la presencia de sangre interfiere en la absorbancia del Cyanine5.5, por lo que se repite la toma de imágenes con la incisión ya cerrada y sin catéter en todos los animales.

3.1.7. Cultivo primario de células endimarias (epSPCi)

El cultivo se realiza a partir de animales que previamente han sido sometidos a LM. Se sigue el procedimiento quirúrgico de contusión de la médula espinal explicado en el punto 3.1.4. Estos animales reciben los cuidados post-operatorios detallados en el punto 3.1.5. (analgesia, antibioterapia, vaciado de vejiga dos veces por día, comprobación del tránsito intestinal y rehidratación si es necesario) hasta su sacrificio, 5 días después de la cirugía de LM. Los animales se sacrifican por asfixia en cámara de CO₂ durante 5 minutos. A continuación se rasura el dorso del animal y desinfecta con alcohol 96°. Mediante las tijeras de mayo se corta la piel a nivel lumbar hasta llegar a nivel cervical y

disecionamos el músculo subcutáneo hasta exponer los paquetes musculares. Se cortan y eliminan los músculos con bisturí para acceder hasta las vértebras. Se realiza laminectomía con la gubia desde la porción más lumbar hasta la más cervical exponiendo el tejido medular, eliminando cualquier resto óseo que obstaculice su extracción. Se sujeta la médula espinal a nivel de la *Cauda equina* con las pinzas de microcirugía del 5 y mediante las tijeras de irisdectomía (ambas esterilizadas previamente 10seg a 250°C) cortamos las ramas que quedan unidas al animal. La médula a nivel caudal se mantiene sujeta con las pinzas de microcirugía a unos centímetros por encima del animal, mientras que con las tijeras de irisdectomía se cortan las ramas dorsales de los nervios hasta llegar a la región cervical. Hay que tener precaución al manipular la zona de la lesión ya que la cicatriz mesodérmica puede haber generado adherencias al hueso. Una vez se eliminan todas las ramas dorsales se corta la médula espinal por debajo del tronco del encéfalo y se extrae completamente. Se introduce rápidamente en solución de lavado (DMEM/F12 + Hepes 1M + NaHCO₃ 7,5% + Glucosa 30% + Penicilina/Estreptomicina (P/S)) y se conserva a 4°C hasta su disección y puesta en cultivo.

Una vez en campana de flujo laminar horizontal (Telstar Bio-II-A), se coloca la médula en solución de lavado en una placa P100. Con la ayuda de una lupa binocular (Leica, ref. MZ6), una fuente de luz fría y las pinzas de microcirugía del 5 y tijeras de irisdectomía (ambas también esterilizadas previamente) se eliminan las meninges desde la duramadre hasta la piamadre y las raíces de la médula espinal. Se corta la médula en 3 porciones de aproximadamente 1,5cm cada una, tal y como se indica en la **Figura 36**:

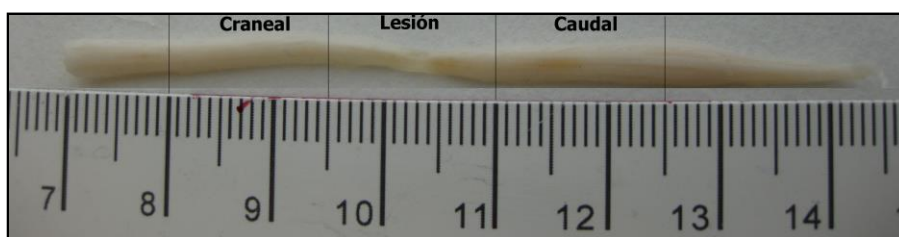


Figura 36. *Médula espinal 5 días post-LM.* La médula se corta en 3 porciones de 1,5cm aproximadamente: zona craneal, torácica conteniendo la lesión y zona caudal.

Cada porción se introduce en una placa P60 con 4mL de solución de lavado nueva y se trocea hasta conseguir trozos de 1mm³, aproximadamente. Se incuba el tejido 10min en la estufa de 37°C, 5% de CO₂ y 95% humedad. Se recoge cada placa en un tubo de 15mL y se lava con 2mL adicionales de solución de lavado para recoger la mayor cantidad de tejido posible. Se centrifugan 5min a 1000rpm. A continuación se elimina el

sobrenadante por medio de una pipeta de cristal esterilizada unida a una bomba de vacío y se vuelve a lavar con 5mL de solución de lavado y a centrifugar 5min a 1000rpm. Se elimina el sobrenadante y se añaden 200µL de medio completo (MCC: DMEM/F12 + Hepes 5mM + NaHCO₃ 0,1% + Glucosa 0,6% + P/S 1% + L-Glutamina 1% + Hormona mix 10%* + Insulina 0,02mg/mL + BSA 4mg/mL + Heparina 0,7Und/mL) con factores (Factor Básico de Crecimiento de Fibroblastos (bFGF) (Peprotech, ref. 100 18B) y Factor de Crecimiento de Células Ependimarias (EGF) (Peprotech, ref. AF 100 15) y con ayuda, primero de una pipeta P1000 y punta azul, se disgrega el tejido hasta casi su homogeneización. Después con pipeta P200 y punta amarilla se termina de homogeneizar hasta obtener una suspensión celular. Se realizan 3 lavados más con solución de lavado y centrifugación 5min a 1000rpm, pipeteando el pellet (aproximadamente 20 veces) tras cada centrifugación. A continuación se siembra cada porción celular procedente de 1,5cm de tejido medular (craneal, lesión y caudal) en placas P100 con 8mL de medio completo con factores y se incuban a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad durante 7 días para que los fibroblastos, astrocitos y microglía se adhieran a la placa mientras la mayoría de precursores forman neuroesferas en flotación.

Se recoge el cultivo y se lava tras centrifugarlo a 1000rpm 5min. Se transfiere a una placa de 6 pocillos de baja adherencia celular con un volumen final de 2mL de MCC+factores/pocillo. A partir de aquí, se realizan 2 cambios de MCC+factores semanales durante una semana más de la misma manera para eliminar los restos de células muertas, eliminados tras sucesivos lavados y centrifugación.

* *La solución de Hormona Mix contiene: DMEM/F12 + Hepes 4mM + NaHCO₃ 0,09% + Glucosa 0,5% + P/S 1% + Progesterona 0,16nM + Selenito sódico 240nM + Holo-Transferrina 0,8mg/mL + Putrescina 90µg/mL.*

3.1.8. Trasplante intramedular de células ependimarias (epSPCi) en modelo de lesión sub-agudo

Se trasplantan las células epSPCi en fase sub-aguda (una semana después de realizar la LM), por lo que es necesario someter al animal a una segunda cirugía: se accede a la zona previamente lesionada de la misma forma descrita en el protocolo quirúrgico (apartado 3.1.4.), con la diferencia de que se elimina la posible cicatriz mesodérmica sin dañar el tejido medular ni la duramadre para realizar a continuación el trasplante celular en la zona donde se ha realizado la LM. Para realizar el trasplante las células (obtenidas según protocolo anterior) son concentradas en medio de cultivo completo a concentración de 10⁶ células/µL. Para inmovilizar el tejido medular y evitar que

éste se mueva cuando el animal respira y mejorar la reproducibilidad, se sujetan las apófisis espinosas de las vértebras T9 y T10 mediante una pinza anclada a la unidad espinal (**Figura 37**).



Figura 37. Pinza sujetando las apófisis espinosas de las vértebras T9 y T10.

En quirófano, las células se cargan en una jeringa Hamilton (Hamilton, Jeringas Microliter serie 700, 25 μ L 702, ref. HA-80400, Modelo 702N, aguja cementada 22s ga, estilo de punta 2) a la cual se le acopla una aguja de vidrio siliconizada*, estrechada hasta 80 μ m en el extremo mediante un Puller (Science Products, Micropipette Puller P-97, www.science-products.com).

* *Protocolo de siliconización de pipetas: Se realiza en campana de laboratorio ya que el isopropanol contenido en la solución siliconizadora es tóxico. Primero se colocan las pipetas Pasteur con la parte estrecha hacia abajo en un vaso de precipitados. A continuación se añade la solución siliconizadora (Silicone Solution SERVA in isopropanol, SERVA, ref. 35130) progresivamente sobre las pipetas asegurándose de que toda la parte interior y exterior de la pipeta queda cubierta, ya que es la que va a estar en contacto con las células, y se deja 30min a temperatura ambiente (TA). Después se colocan en una estufa a 120°C durante 30 minutos sobre una bandeja cubierta con papel de filtro. Se repiten los dos pasos anteriores. Las pipetas se lavan con agua destilada por dentro y por fuera y se secan a 120°C en la estufa (este paso se repite mínimo 3 veces). Finalmente se lavan con agua milliQ y tras secarlas a 120°C en la estufa se autoclavan.*

La jeringa Hamilton se acopla a un estereotáxico (Bioseb, Estereotáxico de Doble Manipulador para Especies Pequeñas, Modelo 51953, www.eb-instruments.com) que se conecta a su vez al microinyector Nanomite (**Figura 34, a**). Se inyectan un total de 10 μ L de suspensión celular (10⁵ células/ μ L), o medio de cultivo en el caso de los animales

control, de craneal a caudal repartidos en 5 μ L entre ambos lados de la lesión y a 2mm del epicentro de la lesión (**Figura 38**). En cada punto de inyección, de ventral a dorsal, se deposita un volumen de 0,5 μ L repartidos en dos inyecciones de 0,25 μ L con un tiempo de espera entre ambas de 1 minuto resultando 2 minutos en cada punto. La sutura y recuperación del animal se realiza de la misma manera descrita anteriormente.

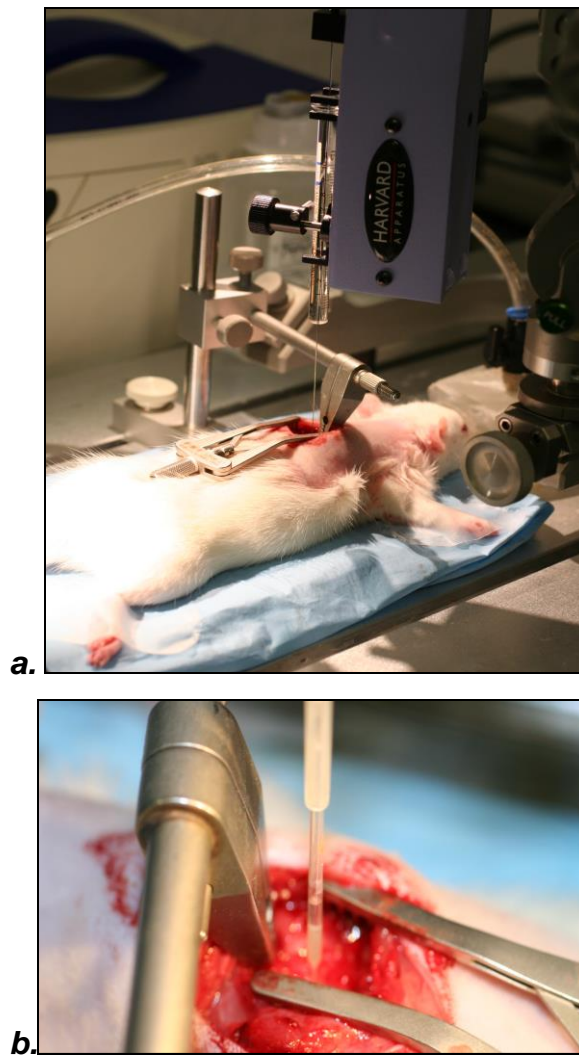


Figura 38. *Traspante intramedular de epSPCi en médula espinal en fase sub-aguda. La aguja de vidrio acoplada a la jeringa Hamilton inyecta las células intramedularmente mientras la pinza anclada a la unidad espinal sujeta las apófisis espinosas de T9 y T10 (a). Detalle del trasplante (b).*

3.1.9. Cuidados post-operatorios

Como analgesia los animales reciben 2 administraciones diarias de buprenorfina cada 12 horas durante los 4 primeros días post-quirúrgicos (Buprex 0,3mg/mL solución inyectable, Schering-Plough S.A, www.schering-plough.es) y 1 dosis del antibiótico Baytril

cada 24h durante la primera semana (enrofloxacino, 5 mg/kg, Bayer, Leverkusen, Germany, www.bayer.com) (**Tabla 5**) ya que las incisiones quirúrgicas son muy abiertas y hay mucho tejido expuesto a posibles contaminaciones.

Tras la cirugía los animales pierden el reflejo de micción, los cuidados post-operatorios incluyen el vaciado de la vejiga mediante la maniobra de Credé (Wyndaele J.J., 1987; Madersbacher G. and Oberwalder M., 1987) 3 veces al día hasta que recuperan su función autónoma que normalmente sucede en un rango de una o dos semanas tras la cirugía. La maniobra de Credé consiste en un método en el cual se aplica presión constante y sin fuerza desde el ombligo hacia la parte más baja del abdomen. La presión se aplica sólo hacia abajo, hacia la vejiga, colocando esta entre los dedos que la sujetan a modo de pinza. Durante todo el experimento y en especial durante la primera semana post-SCI en que los animales pierden el reflejo de micción, se analiza cualquier anomalía en la orina como hematuria (frecuente durante los 2 días post-cirugía) o infección urinaria, la cual es tratada con el antibiótico Baytril durante 7 días.

Durante la primera semana post-quirúrgica, es necesario comprobar si existe o no tránsito intestinal, por lo que es importante observar la presencia o ausencia de heces en el sustrato de la caja. Se realizan masajes abdominales para favorecer la evacuación fecal, y en caso de no observarse heces tras dos días post-cirugía se administra al animal agentes laxativos como la parafina líquida (Rottapharm, Hodernal parafina líquida 4g/5mL, 100L, www.rottapharm.es) 25µL/100g de peso una vez al día.

Uno de los problemas más frecuentes en animales parapléjicos son las úlceras por presión, las cuales son causadas principalmente por un aporte de riego sanguíneo deficiente en las zonas de piel cercanas a zonas de apoyo o prominencias óseas. Es importante prevenirlas, ya que una vez instauradas resultan difíciles de tratar. Para ello se realizan masajes en las zonas predispuestas a ulcerarse para favorecer la circulación y se aplica un aceite para proteger la piel (Mepentol, Bama-Geve, solución tópica 60mL, www.bamageve.es) 2 veces por día. En el caso de aparición de alguna úlcera, primero se limpia con un jabón neutro (Lactacyd derma, GSK, 1L, www.gsk.com) y a continuación se desinfecta con clorhexidina 5% y se aplica un tratamiento tópico con antibiótico como Blastoestimulina (Almirall, Blastoestimulina pomada 1%, 60g, www.almirall.es) o Dermisone (Novartis, Dermisone Tri-antibiótica con bacitracina, neomicina sulfato y polimixina B sulfato), pero si la úlcera se infecta se utilizan antibióticos por vía parenteral (enrofloxacino).

Los animales reciben durante la primera semana tras la cirugía 10mL del rehidratante Glucolyte diluído en 0,5L de agua de bebida (Braun, Glucolyte 20mL, 394858,

www.bbraun-vetcare.es) y el complemento hidratante Solid drink que contiene agua y glucosa (Harvard Apparatus, Energy Solid drink 150g Pouch, ref.340049, USA, www.harvardapparatus.com). Si el animal presenta síntomas de deshidratación, se le administra de forma subcutánea de 2 a 5mL de Ringer Lactato sbc 1 vez al día hasta la desaparición de la misma. Si la deshidratación que presenta es severa, se le administra Ringer Lactato por vía venosa, a través de la vena coccígea, a razón de 2mL/h. También es importante controlar el peso de los animales tanto durante la primera semana post-LM (ya que es normal la pérdida de peso tras la cirugía) como durante todo el experimento. Sin embargo, los animales ganan peso a lo largo del experimento al no tener movilidad en el tracto posterior y no moverse, por lo que también hay que controlar el peso hasta el final del experimento. En la **Tabla 5** se recogen los criterios de puntos final para los parámetros clave que podrían determinar incluso la eutanasia de los animales para evitar sufrimiento o malestar extremo:

PARÁMETRO		PUNTUACIÓN
APARIENCIA GENERAL	Normal	0
	Menos activa	1
	Pelaje en mal estado	2
	Deshidratación (DH) leve	5
	DH severa	7
	Moribunda o caquética	10
PÉRDIDAS DE PESO CORPORAL	Ninguna	0
	5-10% la primera semana	5
	10-25% la primera semana	8
	5-10% resto de semanas	7
	10-25% resto de semanas	9
	>25% en cualquier caso	10
HERIDAS	0-5% de superficie corporal	2
	5-10% de superficie corporal	6
	10-20% de superficie corporal	9
	>20% de superficie corporal	10
COMPORTAMIENTO ESPONTÁNEO	Normal	0
	Disminución del acicalado	2
	Inactividad	5
	Automutilación leve	8
	Chirriar de dientes	9
	Vocalizaciones	9
	Automutilación severa	10
0-5 seguimiento diario 6-9 seguimiento diario + tratamiento >9 eutanasia		

Tabla 5. Criterios de punto final. Esta tabla recoge los parámetros para evaluar el bienestar de los animales tras la cirugía el cual influye sobre los resultados del experimento. Cada condición tiene asignada una puntuación. Puntuaciones por debajo de los 5 puntos indican bienestar fisiológico del animal que sólo requiere de control diario. Puntuaciones entre 6 y 9 puntos reflejan además la necesidad de establecer un tratamiento veterinario para restablecer los valores fisiológicos aceptables. Puntuaciones por encima de los 9 puntos revelan sufrimiento del animal y por tanto alteración de los resultados en este individuo y se procede al sacrificio del mismo.

3.1.10. Rehabilitación pasiva

Desde la primera semana post-quirúrgica se somete a los animales a rehabilitación pasiva que contempla la movilización pasiva de todas las articulaciones que componen el tracto inferior del animal durante al menos 15 minutos al día para evitar la pérdida excesiva de masa muscular.

La rehabilitación pasiva de la articulación de la cadera consiste en los siguientes patrones de movimiento:

- Extensión: músculos glúteo mayor e isquiotibiales.
- Flexión: músculos recto anterior del cuádriceps, psoas ilíaco, sartorio y tensor de la fascia lata.
- Aducción: músculos aductor mayor del muslo, aductores corto y largo del muslo, músculo recto interno del muslo y pectíneo.
- Abducción: músculos glúteo mayor, medio y menor y tensor de la fascia lata.
- Rotación externa: músculos gémimo superior e inferior, obturador interno y externo, piramidal de la pelvis y cuadrado crural.
- Rotación interna: músculos tensor de la fascia lata y glúteo menor y medio.

La rehabilitación pasiva de la rodilla contempla 4 tipos de movimiento:

- Flexión: músculos isquiotibiales, poplíteo y sartorio.
- Extensión: músculo del cuádriceps.
- Rotación externa: músculos tensor de la fascia lata y bíceps femoral.
- Rotación interna: músculos sartorio, semitendinoso, semimembranoso, recto interno y poplíteo.

La rehabilitación pasiva del tobillo contempla varias articulaciones con distintos patrones de movimiento:

- Flexión dorsal: músculos tibial anterior, extensor largo de los dedos y peroneo anterior.
- Flexión plantar: músculos soleo, gastrocnemios, peroneo lateral corto y largo, tibial posterior y flexor largo de los dedos.
- Eversión e inversión: articulaciones subastragalina y calcaneoescapoides que contemplan los huesos astrágalo, calcáneo y escafoides.

También se realiza rehabilitación pasiva a nivel de las falanges con movimientos de flexión y extensión. En la articulación sacrococcígea, que une el hueso sacro con las vértebras caudales, la rehabilitación pasiva se basa en movimientos de flexión y rotación a nivel de la articulación y a lo largo de la cola del animal.

3.1.11. Rehabilitación activa

A partir de la segunda semana post-LM los animales realizan la rehabilitación activa a través de la cual se fuerza el movimiento de las articulaciones. Se estimula el movimiento de las extremidades posteriores empleando una cinta andadora automática (Bioseb, Unidad de Control y 2 cintas Treadmill para ratas, cinta 44x20, área de ejercicio 53x9,8x15, dimensiones 58x27x37, ref. LE8706, USA, www.bioseb.com) y una piscina con agua atemperada para obligarlas a nadar durante 5 minutos (**Figura 39**).

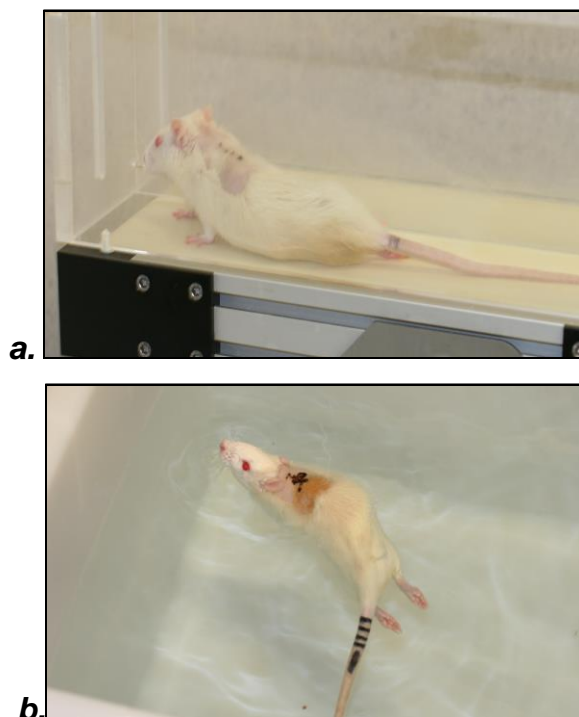


Figura 39 Rehabilitación pasiva. Treadmill (a) y piscina (b).

3.1.12. Test de comportamiento BBB

Previamente a la cirugía, los animales son entrenados durante 2 semanas para realizar el test BBB (Escala de Basso, Beattie y Bresnahan: D.M.Basso, M.S.Beattie & J.C.Bresnahan, 1995), el cual es descrito como “una medida válida y predictiva de la recuperación locomotora capaz de discernir los resultados comportamentales debidos a distintas lesiones y de predecir las alteraciones anatómicas en el centro de la lesión. La escala BBB ofrece a los investigadores una medida más discriminatoria de los resultados comportamentales para evaluar los tratamientos después de una SCI.” Los resultados se registran y se consideran como medidas basales/fisiológicas. En la primera semana post-quirúrgica, los animales comienzan a realizar los test de comportamiento a distintos intervalos de tiempo hasta la última semana del experimento.

El test BBB establece una escala de 0 a 21 puntos que permite evaluar la capacidad de actividad locomotora de los animales en un campo abierto, correspondiéndose 0 a la ausencia total de movimiento en el tracto posterior y 21 una actividad locomotora fisiológica del mismo. Se compone de un campo abierto en que los animales se desplazan libremente y son grabados durante 5 minutos aproximadamente para el posterior análisis del vídeo y asignación de puntos acorde a su movilidad (**Figura 40**). El análisis se realiza mediante doble observador ciego durante todo el experimento para contrastar los resultados. Los animales son analizados dos veces por semana hasta el final del experimento. Desde la semana en que se operan son sometidos al test, para así tener una medición a tiempo 0 y poder comprobar que la lesión se ha realizado correctamente (esperando resultados menores a 2 puntos para todos los animales).



Figura 40. Animal filmado en campo abierto.

3.2. HISTOLOGÍA

3.2.1. Perfusión

Cuatro semanas tras la cirugía, se sacrifican los animales y se procede su perfusión para la extracción de la médula espinal. Se dividen los animales en 4 grupos con el mismo número de individuos tratados con PEG-PA_Curcumina-Cyanine y PEG-PA (control) y trasplantados en fase sub-aguda y no trasplantados:

El protocolo de perfusión transcardíaca para la fijación de tejido es el siguiente (**Figura 41, Gage G.J. et al., 2012**):

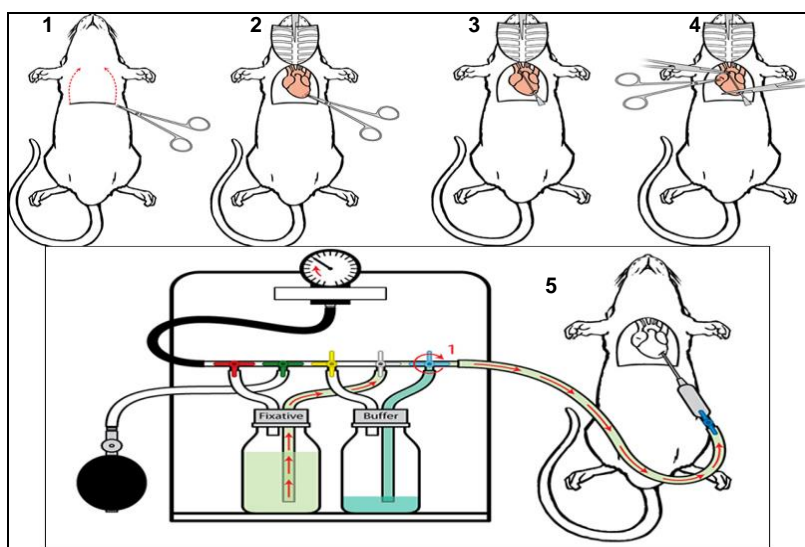


Figura 41. Protocolo de perfusión transcárdica para fijación de tejido (Gage G.J. et al., 2012).

En primer lugar se administran intraperitonealmente 0,3mL de la mezcla eutanásica (Vetoquinol, Dolethal solución inyectable 100mL, pentobarbital sódico 20g/100mL, www.vetoquinol.es) y 0,4mL de analgésico (Kern Pharma S.L., Fentanilo 0,15mg/3mL solución inyectable, www.kernpharma.es). Una vez los animales dejan de presentar reflejos de dolor profundo, se sujetan por las extremidades a un soporte inclinado 45° (1). A continuación se realiza una incisión con las tijeras de disección bajo el esternón y se continúa cortando las costillas y el diafragma hasta exponer el corazón (2). Utilizamos una bomba de perfusión y se administra aproximadamente 250mL de suero salino fisiológico al 0,9% (SSF 0,9%) a una velocidad constante a través de una aguja de 25G colocada en el ventrículo izquierdo (3) (Braun, Venofix A G25, ref. 4056370, www.bbraun.com) y que sale a través de la incisión realizada en la aurícula derecha (4). Una vez el volumen indicado de SSF 0,9% se ha perfundido y se observa que no hay más sangre periférica, se procede a perfundir la misma cantidad de paraformaldehído al 4% (PFA 4%) en PBS 1X (5) (**Figura 42**).

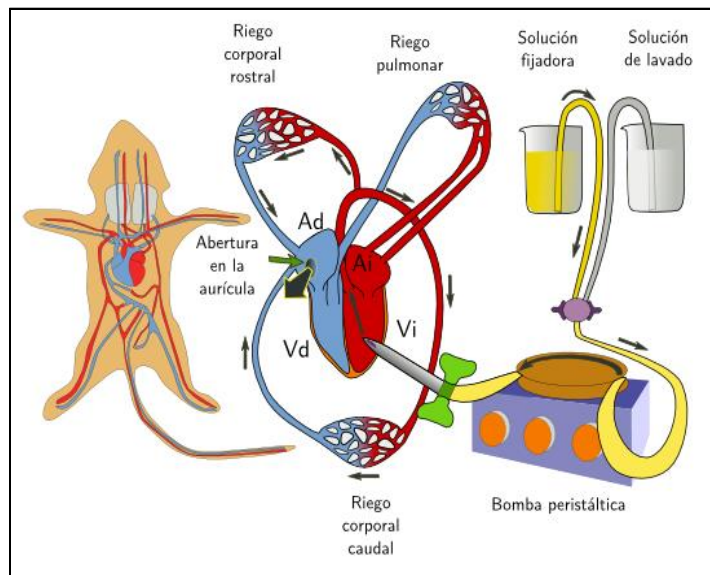


Figura 42. Esquema de perfusión transcárdica (<http://www.webs.uvigo.es>).

3.2.2. Extracción de médula espinal y criopreservación

La médula espinal se extrae conforme a lo descrito en el punto 3.1.6. Posteriormente se conserva 24h en PFA 4% horizontalmente para evitar malformaciones en la médula por mal posicionamiento. A continuación se somete a diferentes gradientes de sucrosa (10%, 20% y 30% respectivamente durante 24h cada uno) para limitar los daños físicos que ocasionan los cristales de hielo durante la criopreservación. Se corta una muestra de tejido de alrededor de 2cm conteniendo el epicentro de la lesión. Se coloca sobre hielo seco un molde de plástico con OCT (IMEB, Tissue-Tek OCT Compound Freezing Medium-Clear, ref. 4583, www.imebinc.com) y una vez se congela añadimos la médula horizontalmente y la cubrimos con OCT. Cuando el bloque de OCT se ha congelado totalmente se conserva a -20°C hasta su utilización en el criostato. Los bloques se orientan como descrito en la **Figura 43**:

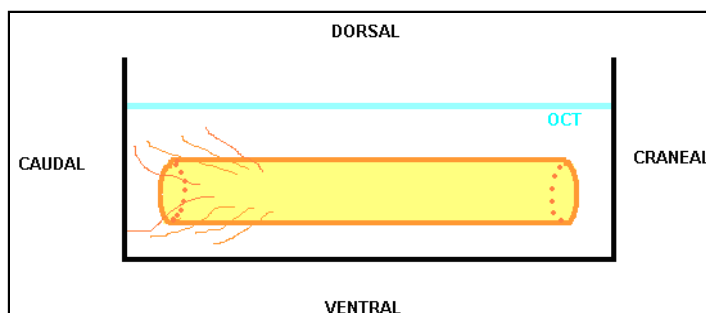


Figura 43. Esquema de un bloque de OCT. La médula se coloca horizontalmente sobre su cara ventral e identificamos los extremos craneal y caudal.

3.2.3. Procesamiento de muestras en el criostato

Las muestras incluidas en OCT se cortan longitudinalmente al criostato (Leica, Modelo CM1850, www.leica.com) con un grosor de 10 μ m. Se realizan 5 series de cortes consecutivos repartidos en varios portaobjetos/serie conteniendo cada uno 6 cortes de tejido hasta crioseccionar todo el tejido. Entre las distintas series los cortes de tejido tienen 10 μ m de diferencia de grosor y cada portaobjetos rastrea alrededor de 400 μ m (**Figura 44**). Al terminar de crioseccionar el tejido los portaobjetos con las muestras se conservan, numerados e identificados, a -20 $^{\circ}$ C hasta su utilización.

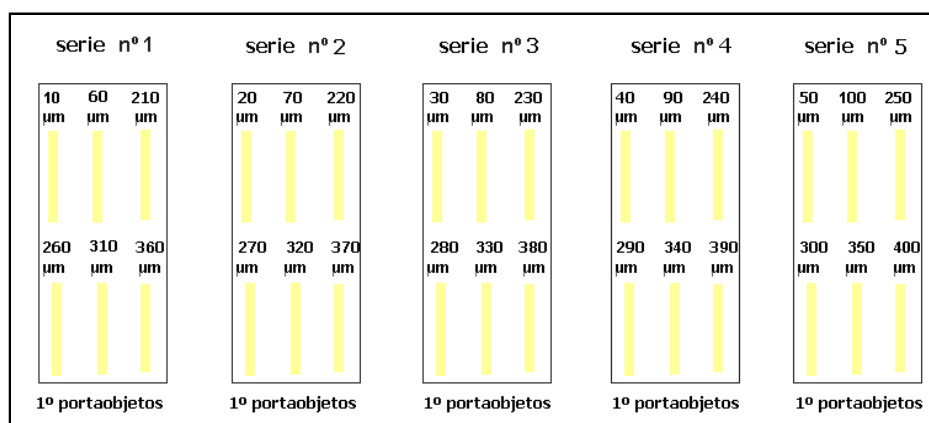


Figura 44. Esquema del primer portaobjetos de cada serie y el número de μ m correspondientes a cada corte.

Los portaobjetos utilizados se gelatinizan previamente para favorecer la adherencia de la muestra. Para realizar la gelatina de alumbre que recubre los portaobjetos, se añaden 700mg de alumbre de cromo y 2,25g de gelatina a 300mL de agua destilada y se calienta la solución (60 $^{\circ}$ C) en agitación para la total disolución de los solutos. A continuación, se agregan 100mg de ázida sódica, se enrasa con agua destilada hasta 500mL y se conserva a 4 $^{\circ}$ C. La dilución utilizada para gelatinizar los portaobjetos es de 1:5, siendo el agua destilada el solvente. Después se sumergen los portaobjetos durante 10min en la dilución y se dejan secar 1 hora en la estufa de 37 $^{\circ}$ C.

3.3. SÍNTESIS DEL COMPUESTO PEG-PA_Curcumina

El trabajo relativo a la síntesis y caracterización del conjugado PEG-PA_Curcumina ha sido realizado por completo por el laboratorio de Polimeros

Terapéuticos dirigido por la Dra. M^a Jesús Vicent en el Centro de Investigación Príncipe Felipe, con quien se ha mantenido una colaboración para su aplicación *in vivo* en los animales con LM. A continuación se hace una breve descripción del proceso de conjugación y síntesis para su mejor comprensión.

3.3.1. COMPUESTO 1: PEG-PA_Curcumina:

Se añade polietilenglicol (PEG) acorde a la concentración de polímero a obtener (Sigma-Aldrich, Bioultra 4000g/mol (para los conjugados de concentración 1,8%, 2,2% y 3,8%) y 2000g/mol (para los conjugados de concentración 4,3% y 5,7%), Poly(ethylene glycol), ref. 95904, www.sigmaaldrich.com) en un tubo Schlenk de 50mL secado en estufa en el que se ha introducido previamente un agitador magnético. Se realiza vacío del tubo a 2×10^{-3} bares de presión durante 15 minutos y después se llena con nitrógeno. Se añaden 30mL de 1,4-dioxano (Carlo Erba Reagents, 1,4-Dioxano anhidro, ref. P0361010, www.carloerbareagents.com) y el PEG se disuelve calentando la solución a 60°C. Una vez enfriado, se añade una solución de curcumina (405 mg, 1.1 mmol) (TCI Europe, curcumina sintética <97%, ref. C2302, www.tcichemicals.com) en 5mL de 1,4-dioxano y a continuación una solución 4mg de ácido p-toluenesulfónico monohidrato (TSA) (Sigma-Aldrich, p-toluenesulfonic acid monohydrate, <99%, ref. T3751, www.sigmaaldrich.com) en 1mL de 1,4-dioxano. Mientras se purga rápidamente con nitrógeno, se introducen 572 μ L (3.5 mmol) de Di-etilenglicol divinil eter (DEGDVE) (Sigma-Aldrich, Di(ethylene glycol) divinyl ether, 99%, ref. 139548, www.sigmaaldrich.com) y se sella el tubo. La reacción transcurre durante 1 hora en oscuridad (**Figura 45**).

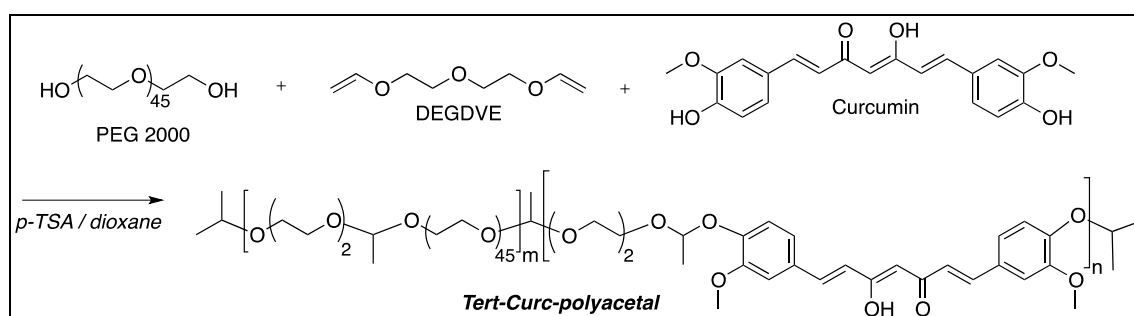


Figura 45. Reacción de síntesis de PEG-PA_Curcumina.

Un cuarto de solución se transfiere mediante una jeringuilla en otro tubo Schlenk para realizar la síntesis de PEG_Curcumina-serinol poliactal y la muestra se purifica mediante precipitaciones seriadas en éter diethexano 3x (Scharlab, Hexano de síntesis,

ref. HE0219005L, www.scharlab.com) disuelto cada vez en tetrahidrofurano (THF) (Scharlab, Tetrahidrofurano, ref. TE0219005P, www.scharlab.com). Finalmente la muestra se disuelve en 30mL de agua desionizada y es liofilizada durante 24 horas (**Figuras 46 y 47**). Cantidad producida: 3,6g / 90%, Peso Molecular (PM)=26599 – 45388g/mol.

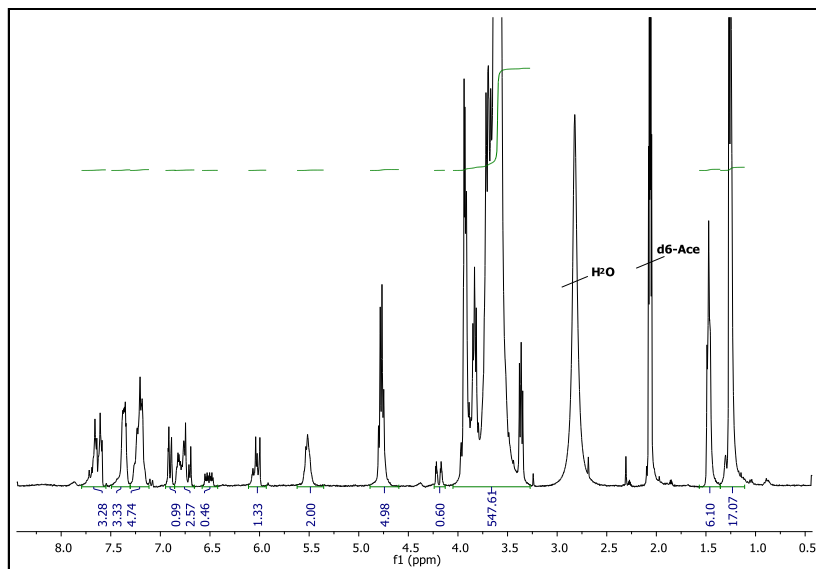


Figura 46. Espectro $^1\text{HNMR}$ (d6-Acetona, 300MHz) de PEG-PA_Curcumina. En el diagrama se muestran los picos de solvencia del agua y de d6-Acetona característicos del compuesto.

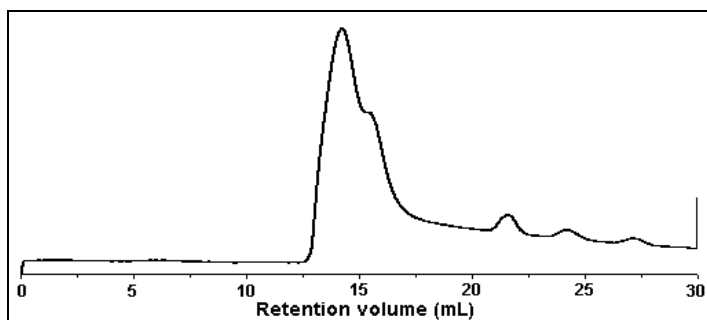


Figura 47. Cromatograma de la permeabilidad en gel (GPC) de los polímeros Poliacetal-Curcumina.

3.3.2. COMPUESTO 2: PEG-PA_Curcumina-serinol:

Un cuarto de la reacción anterior se transfiere mediante jeringuilla a un tubo Schlenk secado en estufa y purgado con nitrógeno conteniendo un agitador magnético. Se añaden 15,7mg de Fmoc-serinol (0,05mmol, sintetizado según el protocolo descrito por

Giménez V. et al., 2012) disuelto en 1mL de 1,4-dioxano y a continuación DEGVE, se deja en agitación durante 30min. Cantidad producida: 0,96g / 94%.

Eliminación de los grupos protectores Fmoc:

Los grupos protectores Fmoc se eliminan disolviendo el polímero en una solución de piperidina al 20% en THF (anhidro, 25mL), en agitación durante 30 minutos antes de precipitar en hexano (300mL). El polímero se obtiene por centrifugación y a continuación se seca mediante vacío a TA durante toda la noche.

Síntesis de PEG-PA Curcumina-Cyanine5.5:

Se añaden 40mg (0,04mmol serinol) del compuesto 2 en un matraz de pera de 5mL secado en estufa con un agitador magnético. El matraz se purga con nitrógeno durante 10min antes de añadir 3mL de N,N-Dimetilformamida (DMF) (Sigma-Aldrich, N,N-Dimethylformamide, anhidro, <99%, ref. D4551, www.sigmaaldrich.com), el compuesto se agita hasta su disolución. El pH de la reacción se ajusta a 8 añadiendo N,N-Diisopropiletilamina (Sigma-Aldrich, N,N-Diisopropylethylamine, <99%, ref. D125806, www.sigmaaldrich.com). Finalmente el se disuelven 2mg de éster NHS de Cyanine5.5 (0,0025mmol) (GE Healthcare Life Sciences, Amersham CyDye Value Packs Cy5.5 NHS Ester, ref. PA15602, www.gelifesciences.com) en 2mL de DMF, se deja en agitación toda la noche en oscuridad. El DMF se elimina mediante vacío a TA y el sólido se disuelve en 1mL de agua desionizada y purificada pasando a través de una columna de exclusión por tamaño-10 de la cual se recuperan fracciones de 0,5mL. Estas fracciones se liofilizan y el polímero que las contiene se colecta de forma que se obtiene un sólido de coloración marrón. Cantidad producida: 25mg / 60%.

3.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO

3.4.1. Tinción neuroanatómica con hematoxilina-eosina (H-E)

Se selecciona una serie de cada muestra destinada al estudio histológico y se procede a teñirla con Hematoxilina de Harris (Panreac, ref. 253949) y eosina (Sigma, 500mL, ref. HT 1100216) según el protocolo descrito en la **Tabla 6**:

Etapa	Tiempo
Tinción con hematoxilina	3 min
Lavar con agua del grifo	
Tinción con eosina	1 min
Lavar con agua destilada	
Deshidratación con alcohol 96°	5 seg
Deshidratación con alcohol 100°	5 seg
Deshidratación con alcohol 100°	5 seg
Inmersión en xilol	5 seg
Inmersión en xilol	5 seg

Tabla 6. Protocolo de tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) y deshidratación de la muestra.

Tras finalizar la tinción se montan los portas con medio de montaje Eukitt (Sigma, Eukitt medio de montaje para microscopía de rápido secado, 100mL, ref. 03989, www.sigmaaldrich.com) y se dejan secar a temperatura ambiente.

3.4.2. Cuantificación del área de quistes sobre el área total de la médula

Tras el daño secundario generado por la lesión medular se produce la formación de cavidades o quistes en el tejido nervioso con el fin de aislar el tejido afectado del tejido sano y favorecer su preservación. Estos quistes pueden ser observados tras la tinción de H-E al microscopio. El método supone, por una parte, la aplicación de la tinción de hematoxilina, que por ser básica tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como los núcleos celulares. Por otra parte, se emplea la eosina que tiñe componentes básicos (acidófilos) como el citoplasma en tonos rosáceos gracias a su naturaleza ácida.

Las muestras de tejido medular fueron capturadas para su posterior análisis a 26x mediante el scanner Panoramic 250 Flash II (3DHISTEC, www.3dhistec.com) (**Figura 48**). El scanner Panoramic 250 Flash II permite escanear las muestras a distintos aumentos a una velocidad de 3,5cm²/min (60 portaobjetos/hora) a 26x con un grosor máximo de 1,2mm. Cada muestra de tejido se guarda como imagen en formato "TIF" para mayor resolución, y posteriormente se analiza mediante el software ImageJ (www.rsb.info.nih.gov/ij/).

En primer lugar, se selecciona el área del corte de tejido medular con la herramienta del programa ImageJ que permite delimitar figuras y se obtiene el área total del corte en píxeles. Pueden aparecer artefactos por el frotamiento del tejido que formen grandes agujeros en el tejido debidos a roturas por mala criopreservación (que se diferencian de los quistes por no tener una estructura redondeada con bordes finos bien delimitados), se seleccionan con la misma herramienta con la que se ha delimitado el contorno del corte y ese dato se resta al área total. Con la misma herramienta se delimitan los contornos de todos los quistes visibles. Cada vez que se delimita el contorno de un quiste, se selecciona la herramienta que permite medir el área del mismo. De este modo se obtiene el número de quistes presentes por corte y el área de cada uno (**Figura 49**).

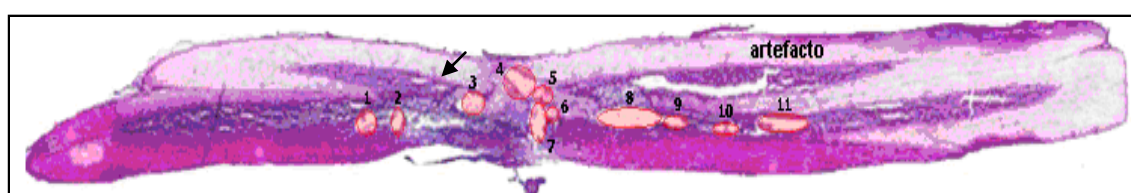


Figura 48. Cuantificación del área y número de quistes de un corte.

Una vez se obtiene el área total de quistes/corte y el área total del corte de todos los cortes que componen una misma médula, se calcula el sumatorio de todas las áreas de quistes y el sumatorio de todas las áreas totales de cortes y se obtiene el porcentaje del área de quistes de toda la médula/el área total de la médula:

$$\% = (\sum \text{área total de quistes de todas las lonchas} / \sum \text{área total de todas las lonchas}) \times 100$$

Por otro lado, teniendo en cuenta el grosor de los cortes (10µm) se calcula el grosor correspondiente a cada sección medida (remitirse a la **Figura 44**).

3.4.3. Cuantificación del espesor del epicentro de la lesión

Tras guardar cada imagen tomada en el scanner en formato "TIF", todos los cortes de una misma médula se alinean en una imagen para calcular el espesor del epicentro de la lesión a distintos grosores de corte (10µm, 60µm,...). Para calcular el espesor medular se utiliza una aplicación del programa Photoshop 2.0 (Adobe, Adobe Photoshop Elements 2.0, www.adobe.com). Se utilizan las guías graduadas horizontal y verticalmente y la herramienta de medición del programa. El espesor se mide cada 0,5mm a lo largo de

8mm tomando como epicentro de la lesión 0mm. Las dimensiones se normalizan respecto a la escala proporcionada por el microscopio en las imágenes originales tomadas a 5x (**Figura 49**).

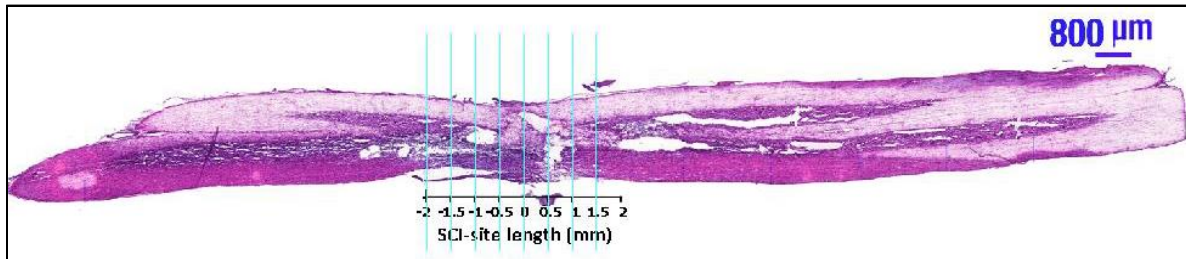


Figura 49. Medición del espesor del epicentro de la lesión cada 0,5mm a lo largo de 8mm en un corte realizado a 10μm.

Una vez obtenidas las 8 mediciones del espesor en todos los cortes de una misma médula se suman todos los valores de cada punto de la medición. A continuación, se normaliza cada valor obtenido respecto al grosor al que ha sido cortada cada loncha (10μm):

$$\text{Espesor normalizado a } 10\mu\text{m} = \Sigma \text{ de cada una de las 8 mediciones } 10\mu\text{m} \times \text{número de lonchas medidas}$$

3.5. ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA

Las muestras cortadas al criostato se dejan atemperar 10min a temperatura ambiente (TA) antes de proceder a su manipulación. En primer lugar, se fijan con PFA 4% en PBS 1X (PH 7.4) 10 minutos a TA, y después se lavan 3 veces durante 5 minutos con PBS 1X. Para realizar la permeabilización y bloqueo de uniones inespecíficas, se aplica la solución de bloqueo compuesta por : PBS 1X + 0,1% tritón X-100 (Sigma, Tritón X-114, ref. 116K0016) + SFB 4%, 30 minutos a TA. A continuación se añade el anticuerpo primario (**Tabla 7**) a la concentración indicada en la tabla diluido en solución de bloqueo y se deja incubar durante toda la noche a 4°C.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ORGANISMO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL	
GFAP β-TUBULINA III (Tuj 1) IBA 1 NESTINA NG 2 ED 1 CD68 CASPASA 9	Conejo	1 : 500	DAKO (Z 0334)	
	Ratón	1 :500	Neuromics (MO 15013)	
	Ratón	1 :500	Abcam (5076)	
	Conejo	1 :500	Chemicon (AB 5922)	
	Conejo	1 :500	Chemicon (AB 5320)	
	Rata	1 :500	Chemicon (MAB 1435)	
	Ratón	1 :500	Cell Signaling (9508 S)	
ANTICUERPOS SECUNDARIOS	ORGANISMO	DILUCIÓN	LONGITUD DE ONDA DE EMISIÓN	CASA COMERCIAL
OREGON GREEN	Ratón	1 :500	488	Invitrogen (O 6380)
ALEXA FLUOR	Ratón	1 :500	488	Invitrogen (A 11008)
ALEXA FLUOR	Conejo	1 :500	647	Invitrogen (A 21244)
ALEXA FLUOR	Ratón	1 :500	555	Invitrogen (A 21422)
ALEXA FLUOR	Rata	1 :500	555	Invitrogen (A 21434)

Tabla 7. Lista de Anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunofluorescencia.

Tras este tiempo de incubación, se lavan de nuevo 3 veces durante 5min con PBS 1X y se añade el anticuerpo secundario (**Tabla 7**) a la concentración indicada en la tabla diluido en solución de bloqueo y se incuba 45min a TA, a partir de este paso se protegen las muestras de la luz. A continuación se lavan las muestras 3 veces durante 5min con PBS 1X y se añade el contraste nuclear HOESCHT diluido en PBS 1X durante 5min (Sigma, HOESCHT Bisbenzimidazole H33342 trihydrochloride > 98% HPLC and TLC, ref. B2261, www.sigmaaldrich.com). Finalmente, se lavan 3 veces durante 5min con PBS 1X y se aplica el medio de montaje específico de fluorescencia Fluorsave (Millipore, Fluorsave Reagent 20mL, ref. 345789-20ML, www.millipore.com).

Las micrografías de todas las muestras se toman con el microscopio confocal Leica utilizando el programa Leica LAS AF Lite (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany, www.leica.com) y Photoshop 2.0.

3.6. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR

Se realiza un ensayo de viabilidad celular en un cultivo primario de epSPCi en presencia de diferentes dosis de PEG-PA_Curcumina o curcumina libre. Para analizar la viabilidad celular se disgregan las neuroesferas, que crecen en forma de agregados celulares, para poder realizar un conteo a nivel unicelular, para lo que se utilizan 200µL de acutasa que tras pipetear repetidas veces se dejan incubar 10min a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad en la estufa. Pasado este tiempo se vuelve a homogeneizar con la pipeta y se añade 1mL de MCC+factores. Se emplean 10.000 células/100µL/pocillo para realizar el ensayo de viabilidad celular. El conteo celular se realiza en una cámara de Neubauer en la que se introducen 10µL de la suspensión celular y 10µL del colorante azul tripán (0,4%) (GIBCO, ref. 15250) que teñirá las células muertas. Se cuentan las células viables (no teñidas) en la cámara de conteo Neubauer en el microscopio de contraste de fases (Leica, DMIL). Dejamos incubar 24h a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad y posteriormente administramos el tratamiento. Se analiza la viabilidad celular 24h después del tratamiento mediante la medición del contenido de adenosina tri-fosfato (ATP) con el kit CellTiter-Glo (Promega, CellTiter-Glo luminiscent cell viability kit, Madison, WI, ref. G7573, www.promega.com) que permite analizar la proliferación y viabilidad celulares en el luminómetro (Multilabel Counter VICTOR, Elmer, Waltham, MA, ref. 1420-018, www.perkinelmer.com).

Para los experimentos de viabilidad celular en presencia de curcumina se utiliza curcumina libre (SIGMA) con una concentración stock de 10mM diluída en DMSO (SIGMA, ref. D2650) dado su carácter liposoluble. En cuanto a la curcumina conjugada (PEG-PA_Curcumina) se diluye en agua para generar de nuevo una concentración stock de 10mM desde los diferentes preparados poliméricos (**Tabla 8**):

REFERENCIA	CONCENTRACIÓN DE PEG-PA	% EN PESO DE CURCUMINA/100g DE POLÍMERO
RME 1/162/1	PEG-PA 4000+Curcumina	1,8% w/w
RME 1/163/1	PEG-PA 4000+Curcumina	2,2% w/w
RME 1/151/1	PEG-PA 4000+Curcumina	3,8% w/w
RME 1/150/1	PEG-PA 2000+Curcumina	4,3% w/w
RME 1/125/1	PEG-PA 2000+Curcumina	5,7% w/w

Tabla 8. Polímeros de curcumina conjugados con Polietilenglicol (PEG-PA_Curcumina).

Para el estudio de la viabilidad/proliferación celular se establecen distintas diluciones de curcumina libre y conjugada de 0,1 μ M; 0,25 μ M; 0,5 μ M; 0,75 μ M; 1 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M y 10 μ M. Además, se incluye un gradiente de diluciones de DMSO o agua de 0,5 μ L desde 0,5 μ L a 2 μ L como los correspondientes controles de vehículo.

3.7. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS: ANÁLISIS DE INMUNOTRANSFERENCIA-WESTERN BLOTTING

3.7.1. Obtención y cuantificación de proteínas

Para la obtención de los extractos proteicos se mantienen las muestras en hielo durante todo el procedimiento a fin de evitar la desnaturalización proteica por temperatura. Se emplean las muestras de tejido fresco de médula espinal criopreservadas a -80°C (sin profundir) que se descongelan lentamente en hielo. A continuación se añaden 250 μ L de PBS 1X y se disgregan y homogeneizan por separado por un Polytron (Kinematica Polytron Homogenizers Fisher-Scientific, Polytron PT 10/35 GT 110V Poly, ref. 13-874-615, www.fishersci.com). Se lava el Polytron con jabón y etanol entre cada muestra para evitar contaminaciones cruzadas. Se destinan 125 μ L del lisado para la realización de la inmunotransferencia y los otros 125 μ L para la extracción de ARN que se conservan a -20°C. A nuestra muestra se añaden 100 μ L de tampón de lisis 1X (Tampón Tris-HCl 1M pH8 2mL * + NaCl 5M 1,2mL + 0,1% SDS 200 μ L + Nonidet P-40 Igepal 400 μ L + 0,5% Desoxicolato 200mg + agua destilada hasta 40mL) al que se añade previamente un complejo de inhibidores de proteasas (ROCHE, Complete Mini, Sample, ref. 04583973001). Se deja lisar durante 30 minutos en hielo, vorteando cada 10 minutos. Se centrifuga 5 minutos a 10.000rpm en una centrífuga refrigerada a 4°C y se recupera el sobrenadante.

** El Tampón Tris-HCl 1M PH8 contiene: Trizma base 121,1g + agua destilada hasta 800mL.*

Una vez se obtienen los extractos proteicos, se cuantifica la cantidad de proteína mediante el método colorimétrico Bradford. Se realiza una recta patrón con concentraciones conocidas de proteína usando BSA desde una concentración 2mg/mL

generando diluciones seriadas. Se utilizan placas de 96 pocillos de fondo plano en la que se añaden, por duplicado, 5µL de muestra o de dilución de proteína + 200µL de reactivo Bradford (Bio-Rad, Quick Strat Bradford 1X Dye Agent, 1L, ref. 500-0205, www.bio-rad.com). Tras 5 minutos de incubación en oscuridad a TA, se cuantifica la cantidad de proteína en un espectrofotómetro con filtro 595nm y 0,1seg (Multilabel Counter VICTOR con el programa Wallac 1420 Workstation). La concentración de las diluciones se determina según la recta patrón obtenida con BSA por extrapolación en curva de regresión lineal empleando el programa GraphPad.

3.7.2. Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis es una técnica basada en la separación de proteínas acorde a su carga eléctrica y su tamaño molecular a través de un campo eléctrico generado en una matriz porosa. Las proteínas derivadas de las muestras se cargan en el gel con SDS (dodecil sulfato sódico), un detergente que aporta carga negativa a las mismas dependiendo del tamaño molecular de cada proteína. Se utilizan geles de 1,5mm de grosor con porcentajes de acrilamida de 10% (acorde al peso molecular de las proteínas a analizar) y adicionando SDS 10%. Las muestras de proteína se llevan a un volumen final de 32µL para cargar en el gel 100µg de proteína. Después se añade a todas las muestras tampón de carga 4X (Tris-HCl 1M PH 6.8 2mL + Glicerol (cf: 40%) + SDS al 20% (cf: 8%) + Azul de Bromophenol 1mL de solución saturada (cf: 1%)) y DTT 1M (cf: 10%). Después se vortexean y se desnaturalizan a 95°C durante 5 minutos en el Termomixer (Eppendorf, ThermoStat Plus, ref. 5252000010) y se recogen en hielo.

Para la separación de proteínas por electroforesis se emplea el sistema Mini Protean Tetra Cell en un tampón compuesto por: Glicina 144g/L + TRIS 30,27g/L + agua destilada hasta 1L + SDS 5%. Como marcador de pesos moleculares se utiliza el Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare Life Sciences, ref. RPN800E, www.gelifesciences.com). La electroforesis se realiza a 90 voltios (V) hasta que las muestras pasan el gel concentrador, a partir de este momento se sube el voltaje hasta un máximo de 150V.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfieren a membranas de PVDF (Millipore, Immobilon-P Transfer Membrane, PVDF, 0.45µm, ref. IPVH00010, www.millipore.com) previamente activadas con metanol (MERCCK, ref. 1.06009.2500). La transferencia se realiza en tampón de transferencia (ácido bórico 3,1g/L + TRIS 6g/L + agua destilada hasta 1L) durante 1h30 minutos a 200 miliamperios (mA). Tras finalizar

este paso las membranas se tiñen con el colorante Rojo Ponceau S (Rojo Ponceau 1g/L + ácido acético 50mL/L + agua destilada hasta 1L) durante 5 minutos para observar los marcadores de peso molecular y los pocillos, y posteriormente se lavan 3 veces durante 5 minutos en agitación a TA con PBS-Tween (TBT: PBS 10X PH 7.4 + Tween 20 500µL/L). A continuación las membranas se incuban en leche desnatada al 5% en TBT para bloquear las uniones inespecíficas, y tras repetir los lavados se incuban toda la noche a 4°C en agitación con los correspondientes anticuerpos primarios a la concentración descrita por cada casa comercial (**Tabla 9**):

ANTICUERPOS PRIMARIOS	DILUCIÓN	ORGANISMO	KDa	CASA COMERCIAL
GFAP	1 :500	Ratón	50	BD Pharmigen
NESTINA	1 :1000	Ratón (10C2)	220/240	Chemicon
CASPASA 9	1 :1000	Ratón	37/35/47	Cell Signalling
NG2	1 :100	Conejo	270/300	Chemicon
ED1	1 :100	Ratón	90/100	Chemicon
β-TUBULINA III (Tuj1)	1 :1000	Ratón	52/56	Abcam
β-ACTINA	1 :5000	Ratón	42	Sigma

Tabla 9. Lista de anticuerpos primarios utilizados en la inmunotransferencia.

24h después se realizan 3 lavados de 10 minutos en agitación a TA con TBT, y se añaden los anticuerpos secundarios –anti IgG-conjugados con HRP (peroxidasa de rábano) que se dejan incubar durante 60 minutos a TA (**Tabla 10**). Finalmente, las membranas se vuelven a lavar, y se procede a realizar la reacción de quimioluminiscencia empleando el kit ECL-Plus (GE Healthcare Life Sciences, Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, ref. RPN2232, www.gelifesciences.com) por exposición durante 5 minutos al sustrato de la peroxidasa de rábano. Las membranas, una vez escurridas, se colocan dentro del cassette de revelado y se exponen en películas CURIX RP2 PLUS (Agfa, www.agfahealthcare.com) que son reveladas en una máquina de revelado (Agfa).

ANTICUERPOS SECUNDARIOS	DILUCIÓN	ORGANISMO	CASA COMERCIAL
ANTI-CONEJO IgG HRP	1 :5000	Conejo	Santa Cruz
ANTI-RATÓN IgG HRP	1 :5000	Ratón	BD Pharmigen

Tabla 10. Lista de anticuerpos secundarios utilizados en la inmunotransferencia

3.7.3. Análisis por densitometría

Las bandas obtenidas tras el protocolo anterior se escanean y cuantifican por densitometría mediante el programa ImageJ. Los resultados obtenidos se normalizan con la carga de proteína total por la medida de la exposición total del gen constitutivo β -Actina.

3.8. ANÁLISIS DE ARN Y MICROARRAYS DE EXPRESIÓN

3.8.1. Extracción y cuantificación de ARN

Los animales de este grupo se sacrifican y sus médulas se extraen del mismo modo descrito para los animales cuyas médulas se destinan al cultivo celular. Una vez se divide la médula en 3 porciones (craneal, torácica y caudal) se introducen en 3 criotubos distintos (Cultek, Viales con tapón sellado de bobina externa, 2mL, ref. 430289, www.cultek.com) que se conservan a -80°C hasta su utilización.

La extracción de ARN de los tejidos medulares se realiza mediante el kit RNeasy mini (Qiagen, RNeasy Mini Kit (250), ref. 74106, www.qiagen.com). Se emplean muestras de 4 animales distintos por cada condición experimental:

- T0: sin lesión, condiciones fisiológicas.
- T1: 1 semana post-LM (fase aguda).
- T2: 2 semanas post-LM (fase sub-aguda).
- T4: 4 semanas post-LM (fase crónica).
- T8: 8 semanas post-Lm (fase crónica).

En primer lugar se homogeniza y lisa una muestra de 30mg de tejido con el Polytron en 600 μL del tampón de lisis (al cual añadimos previamente 10 μL de β -Mercaptoetanol/1mL de tampón) proporcionado por el kit RNAeasy Mini Kit y se procede acorde a las instrucciones del fabricante.

La determinación de la concentración del ARN se realiza mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Se añade 1µL de la muestra en el NanoDrop y se obtiene el espectro a partir del cual se calcula la concentración total de ARN contenido en la muestra.

3.8.2. Transcripción reversa (RT) y PCR a tiempo real

La transcripción reversa (RT) consiste en el proceso de transcripción realizado inversamente: se sintetiza ADNc (ADN complementario) a partir de una muestra de ARN que actúa como molde mediante la acción de retrotranscriptasas. En primer lugar se realiza una Solución Madre a partir de los componentes del kit TaqMan reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Roche, USA), según se indica en la **Tabla 11**:

Composición solución madre RT
5µL Tampón RT 10X
10µL MgCl ₂ 2,5mM
5µL Mezcla de dNTPs 10mM
2µL Hexámeros 50µM
1µL Inhibidor de la ARNasa
1µL Transcriptasa inversa

Tabla 11. Composición de la solución madre para realizar la retrotranscripción (RT).

El Inhibidor de la ARNasa y la Transcriptasa inversa se añaden en último lugar por su naturaleza termosensible. Seguidamente en tubos distintos para cada muestra se añade 1µg de ARN a 6µL Agua DEPC/muestra con un volumen final de 20µL. Finalmente, se añaden 30µL de la Solución Madre a los 20µL de ARN+agua, resultando una solución final con un volumen de 50µL. El proceso se realiza en el termociclador (Eppendorf, Mastercycler ep) con los siguientes ciclos de incubación:

- 37°C 15min
- 90°C 10min
- 4°C hasta su utilización

La amplificación de ADNc de cada gen de interés se realiza mediante sondas SYBR Green y TaqMan (Life Technologies) utilizando el termociclador LightCycler 480 (Roche, LightCycler 480 System, ref. 05015278001, www.roche-applied-science.com). Una vez obtenido el ADNc, se amplifican secuencias específicas de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En una primera etapa, se realiza una solución que contiene 5µL de Master Mix (MM) (Life Technologies, Taqman Gene Expression Master Mix, ref. 4369016, www.lifetechnologies.com) y 0,5µL de primers o sondas TaqMan (para cada gen de interés) por muestra.

A continuación, se añaden 3,5µL de agua DEPC a 1µL de ADNc de cada muestra dispuestas en diferentes tubos. Tras vortear las muestras con agua y darles un pequeño spin (<3.000rpm), se añaden 9µL en distintos tubos nuevos junto con 11µL de la MM y se vuelve a vortearlas y darles un spin. En campana de bioseguridad se pipetea 9µL de cada muestra por pocillo en una placa de 96 pocillos con el fin de tener un duplicado de la muestra. También se realiza un control negativo que sólo contiene MM, primers o sondas TaqMan y agua DEPC. Para disminuir el error por pipeteo, se considera el volumen de la MM y las muestras para un pocillo más. Los parámetros establecidos en el termociclador son los que aparecen en la **Tabla 12**:

ETAPA	TEMPERATURA	DURACIÓN	Nº DE CICLOS
Pre-incubación	95°C	10 min	-
Amplificación	95°C	15 seg	40
	58°C	10 seg	
	72°C	20 seg	
Extensión	94°C	5 seg	1
	60°C	15 seg	
	97°C	15 seg	
Enfriamiento	4°C	10 seg	-

Tabla 12. Parámetros para la realización de la PCR.

Los resultados obtenidos se normalizan acorde a los resultados obtenidos en las amplificaciones del gen de expresión constitutiva “housekeeping” (GAPDH) empleado como control de carga. Los datos obtenidos se traducen como el incremento o reducción

de la expresión de los genes analizados. Los resultados entre los animales lesión y trasplantados, así como los lesionados y sacrificados a distintos tiempos se comparan entre sí mediante el método de comparación del umbral de ciclos (CT: *Cycle threshold*) que permite calcular la expresión relativa a cada gen. Los datos se consideran significativos cuando hay amplificación tanto en la muestra como en su duplicado y esta es inferior a variaciones de $\pm 0,5$ ciclos.

3.8.3. Microarrays de expresión

Se aísla el tejido medular de cuatro animales diferentes para cada condición experimental del Experimento 2:

- T0: sin lesión, condiciones fisiológicas.
- T1: 1 semana post-LM (fase aguda).
- T2: 2 semanas post-LM (fase sub-aguda).
- T4: 4 semanas post-LM (fase crónica).
- T8: 8 semanas post-LM (fase crónica).

La calidad del ARN se confirma mediante el Nano Bioanalyzer 6000 (Agilent Technologies, Nano Bioanalyzer 6000, www.agilent.com). Se emplean un total de 500ng para producir ARNc marcado con 3-CTP-Cyanine utilizando el kit Low RNA Input Linear Amplification (Agilente Technologies, PLUS, One-Color, ref. 5188-5339, www.agilent.com) acorde al protocolo especificado por la casa comercial.

Siguiendo el protocolo “One- Color Microarray-Based Gene Expression Analysis” Version 5.5 (Agilent p/n 5188-5977), 3 lg de ARNc señalizado se hibrida con el kit Whole Rat Genome Oligo Microarray (Agilent p/n G2519F-014879) que contiene 41,000p de genes de rata. Los arrays se escanean en el scanner Agilent Microarray Scanner (Agilent G2565BA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los datos se extraen mediante el software Agilent Feature Extraction Software 9.5.3 acorde al protocolo Agilent protocol GE1-v5_95_Feb07 y QC Metric Set GE1_QCM_Feb07. El perfil genético se clasifica acorde a los distintos niveles de expresión entre las diferentes condiciones experimentales (trasplante agudo y sub-agudo de epSPCi y sólo lesión), y se asociado en distintos perfiles acorde a funciones biológicas utilizando la aplicación FatiGO. FatiGO convierte ambas listas de genes en dos listas de términos GO utilizando la correspondiente tabla de asociación gene-GO. Posteriormente se emplea el test de Fisher para tablas de contingencia 2_2 para comprobar si existe sobre-expresión significativa de los términos GO en una de las condiciones respecto a la otra. Se emplea un test de

corrección múltiple para realizar el recuento de las diversas hipótesis analizadas (una para cada término GO).

Se emplean sondas TaqMan de 75 reacciones (Life Technologies, TaqMan PCR Master Mix, www.lifetechnologies.com) (**Tabla 13**). Todas las amplificaciones se realizan en el termociclador Light Cyclor 480 de Roche.

GEN	Forward	Reverse	pb
Bcl-2	GGTGAAGCTGGGGGAGGATTG	AGAGCGATGTTGTCCACCAG	102
LC3	ATCATCGAGCGCTACAAGGG	AGATGTCAGCGATGGGTGTG	196
Atg 5	GACCACAAGCAGCTCTGGAT	ACAGGACGGAACAGCTTCTG	169
Atg 7	TTCCTGTCAGCCTGGCATT	TCAGCAGCTTGGGTCTCTTG	169
Atg 12	AGAAACAGCCATCCCAGAGC	CAGCCTTCAGCAGGATGTCA	104

Tabla 13. *Sondas TaqMan relacionadas con fenómenos de apoptosis y autofagia, empleadas utilizando la técnica de RT y qPCR.*

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados experimentales se utiliza el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA, www.graphpad.com). Todos los datos están expresados como promedio y desviación estándar (SD). Mediante el test de Kolmogorov-Smirnov se analiza la distribución normal de las variables, y las diferencias entre los distintos grupos mediante el test t de Student. Los resultados se consideran estadísticamente significativos con $p < 0,05$ con un intervalo de confianza del 95%. En los resultados de los experimentos con los arrays de rata se emplean 4 animales por condición experimental y todas las condiciones experimentales son analizadas en un solo ensayo. Los resultados de los experimentos *in vitro* son representados por el promedio de 3 ensayos distintos.

4- RESULTADOS

Capítulo 4: RESULTADOS

NANOMEDICINA EN LESIÓN MEDULAR

4.1. ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE NANOCONJUGADOS DE CURCUMINA Y POLIETILENGLICOL-POLIACETAL (PEG-PA)

Dada la escasa biodisponibilidad de la curcumina libre (Ma Z. et al. (2007); Kurien B.T. et al. (2007); Safavy A. et al. (2007); Tsai T.H. et al. (2011)), en gran medida debido a su naturaleza hidrofóbica, estudios previos muestran diferentes técnicas de conjugación polimérica de curcumina, incluida su conjugación con polietilenglicol (PEG) (Li J. et al., 2009) o policaprolactona (Bansal S.S. et al., 2011). En este caso se muestra la actividad de curcumina conjugada con polietilenglicol-poliacetal (PEG-PA_Curcumina: síntesis y caracterización del conjugado, descrita en el Capítulo 3: Material y Métodos) que favorece su solubilidad en medio acuoso y permite una liberación controlada del principio activo en medio ligeramente ácido.

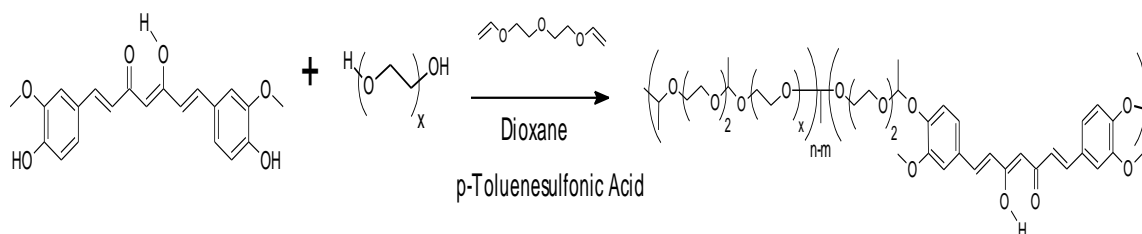
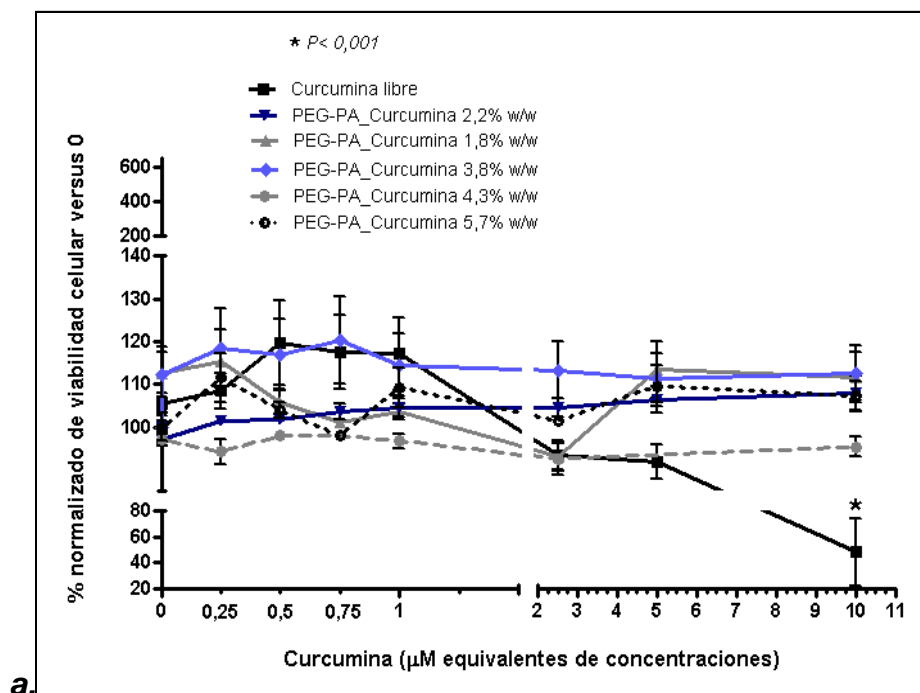


Figura 50. Síntesis química del conjugado polimérico PEG-PA_Curcumina. PEG (4000g/mol) y curcumina (1,1mmol) disueltos en 1,4-dioxano en una solución de 4mg de ácido p-toluenesulfónico monohidrato (TSA, <99%) por mL de 1,4-dioxano. Finalmente se añaden 572 μ L de di-etilenglicol divinil eter (DEGDVE, 3,5mmol) a la solución para que la reacción tenga lugar (ver Material y Métodos).

El laboratorio de Polímeros Terapéuticos, tras realizar consecutivamente diversas reacciones de síntesis (ver Capítulo tercero de Material y Métodos), se obtuvieron diversos lotes de conjugados poliméricos con diferente carga en peso de principio activo: 1,8; 2,2; 3,8; 4,3 y 5,7% de curcumina por 100 gramos de polímero (w/w).

Previo al uso de los conjugados poliméricos en el tratamiento *in vivo*, se estudia la toxicidad de los diferentes conjugados poliméricos en cultivos primarios de epSPCi. Se realiza una curva dosis-respuesta incluyendo dosis del rango micromolar: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2,5; 5 y 10 μ M en equivalencia de concentración del principio activo para cada uno de los conjugados poliméricos de PEG-PA_Curcumina (1,8; 2,2; 3,8; 4,3 y 5,7% w/w) y de curcumina libre (**Figura 51 a**). Se observa en el ensayo de viabilidad, basado en la medida del ATP intracelular total tras 24 horas de incubación, que sólo las dosis más altas de curcumina libre (10 μ M) resulta tóxica (* $P < 0,001$, **Figura 51 a y b**). Se observa, tal y como se había descrito previamente (Lin M.S. et al., 2011; Hollborn M. et al., 2013), un aumento en la viabilidad celular a concentraciones equivalentes de curcumina libre inferiores a 1 μ M. El conjugado polimérico 3,8% w/w reproduce este perfil proliferativo a bajas dosis sin inducir efectos tóxicos a altas dosis (**Figura 51 b**), de modo que este conjugado es el seleccionado para valorar su actividad *in vivo*, en el modelo de LM.



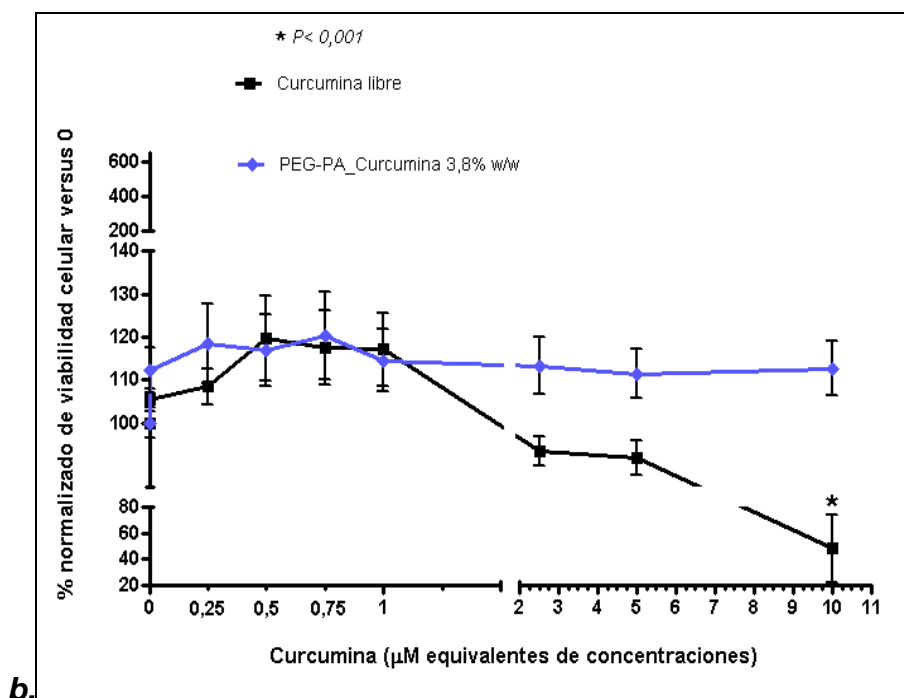


Figura 51. Viabilidad celular de epSPC en presencia de los conjugados poliméricos de PEG-PA_Curcumina o curcumina libre: a) Análisis de la viabilidad celular de epSPC frente a todos los conjugados poliméricos y curcumina libre; b) Análisis de la viabilidad de epSPC frente al conjugado de concentración 3,8% w/w y curcumina libre.

4.2. ADMINISTRACIÓN *IN VIVO* DE PEG-PA_CURCUMINA EN UN MODELO DE LESIÓN MEDULAR

Se propone utilizar el principio activo de la curcumina en el rescate de LMA en ratas adultas en conjugación con el polímero polietilenglicol-poliacetal (PEG-PA) empleando una dosis única mediante cateterización intratecal, compuesto aprobado por la organización americana de administración de alimentos y medicamentos (FDA). El interés de conjugar la curcumina con el PEG-PA radica en el mantenimiento de una cinética de liberación lenta y controlada del principio activo en la zona de la lesión. Aprovechando la formación del ambiente ácido, se diseña la conjugación polimérica de la curcumina con PEG-PA (**Figura 50**): el ambiente ácido hidroliza las uniones acetal formadas en el conjugado entre la curcumina y el PEG-PA, liberando la curcumina al medio. Así mismo, diversos componentes presentes en el medio extracelular tras la LM participan en la degradación química de estas uniones. Los procedimientos experimentales, tanto de la

inducción de LM traumática por contusión severa como el tratamiento por cateterización intratecal, se encuentran descritos en el Capítulo 3: Material y Métodos.

El experimento se llevó a cabo siguiendo el siguiente diseño experimental:

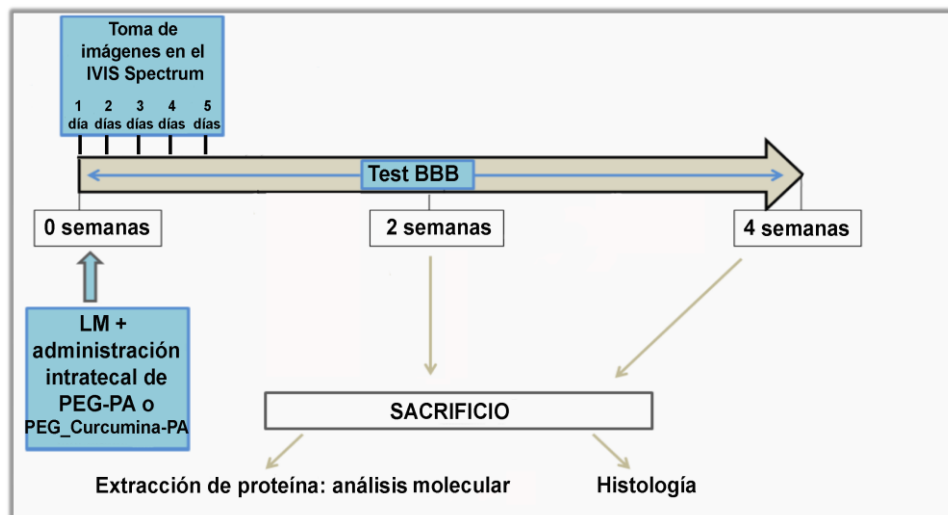


Figura 52. Procedimiento experimental de los experimentos *in vivo* sobre la administración intratecal de PEG-PA_Curcumina (grupo 1) y PEG-PA (grupo 2).

- Grupo 1: PEG-PA (Control; n=12): LM por contusión severa (250KDynes) y administración intratecal de PEG-PA.
- Grupo 2: PEG-PA_Curcumina (n=15): LM por contusión severa (250KDynes) y administración intratecal de PEG-PA_Curcumina (0,1mM).

4.2.1. Monitorización de la biodistribución del conjugado polimérico PEG-PA-Cyanine_Curcumina

La conjugación covalente del fluoróforo Cyanine 5.5 (Cy 5.5) al polímero PEG-PA_Curcumina (tal y como se describe en el Capítulo 3: Material y Métodos) permite monitorizar la biodistribución del compuesto *in vivo* mediante el dispositivo IVIS Spectrum (**Figura 53**). Se toman registros e imágenes durante los 5 días posteriores a la cirugía:

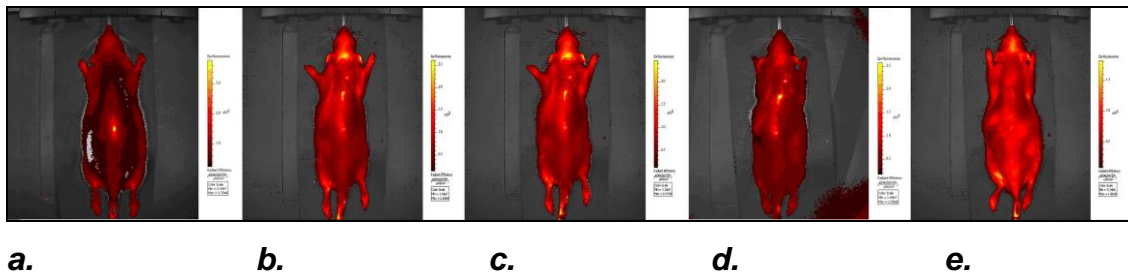


Figura 53. Toma de imágenes en el IVIS Spectrum®. **a)** Imagen de un animal a T0 (inmediatamente después de la administración de PEG-PA-Cy5.5_Curcumina). **b)** Imagen tomada a T1 (24h tras la administración del compuesto). **c)** Imagen tomada a T2 (48h post-cirugía). **d)** Imagen tomada a T3 (72h después de la administración de PEG-PA-Cy5.5_Curcumina). **e)** Imagen tomada a T4, 5 días tras la cirugía.

Todas las medidas (a tiempo 0 (T0), 24h (T1), 48h (T2), 72h (T3) o 120h (T4) tras LM y tratamiento) se toman tras retirar el catéter y con la incisión ya cerrada.

- T0: inmediatamente después de administrar el compuesto PEG-PA-Cy5.5_Curcumina intratecalmente a nivel de T13. La señal emite alta intensidad en la zona de administración a nivel de T13 (**a**).

- T1: 24h post-cirugía. Se observa que la señal emitida por el compuesto ha migrado cranealmente, diferenciándose dos puntos de alta intensidad (la zona de inoculación a nivel de T13 y la zona de lesión a nivel de T8). También se observa una señal más débil que une ambos puntos a lo largo de la médula espinal que se interpreta como los restos de fluoróforo del compuesto durante su migración hacia la zona craneal de la médula (**b**).

- T2: 48h post-cirugía. Se siguen observando los dos cúmulos de compuesto con gran intensidad en las zonas de lesión e inoculación (**c**).

- T3: 72h post-cirugía. Se observa que la intensidad de la señal en los dos cúmulos decrece (**d**) hasta desaparecer totalmente a los 5 días (T4) tras la cirugía (**e**).

4.2.2. Análisis de la recuperación funcional locomotriz.

El test BBB (D.M. Basso, M.S. Beattie and J.C. Bresnahan, 1995) es empleado extensamente en la literatura científica como escala para valorar la funcionalidad motora en campo abierto. Este test es ampliamente utilizado tras lesiones que comprometen la capacidad locomotora a nivel del sistema nervioso central (SNC) o periférico (SNP), predominando su aplicación tras lesiones medulares. Los animales se graban con una cámara de vídeo durante 5 minutos 2 veces por semana para evaluar su recuperación

funcional. Las grabaciones y su posterior análisis se realizan de forma ciega. Los resultados del presente estudio revelan que la administración intratecal de PEG-PA_Curcumina mejora significativamente ($*** < P 0,0001$) la actividad locomotora tras LM cuando se compara con la administración del vehículo (PEG-PA) desde la primera semana tras el tratamiento (**Figura 54**): Los animales tratados con PEG-PA_Curcumina (n=15), frente a los animales control (PEG-PA) (n=12) presentan una mayor recuperación funcional una semana tras la LM (8 puntos frente a 5, en promedio, respectivamente). Así mismo, los animales tratados con el compuesto PEG-PA_Curcumina muestran una mejora exponencial que llega a situarse en promedio en 12 puntos en la última semana del experimento, frente a los tratados con el vehículo que durante la segunda y tercera semana se mantienen en 6 puntos que muestra, a la cuarta semana, una tendencia en la mejora de la recuperación funcional llegando a 8 puntos.

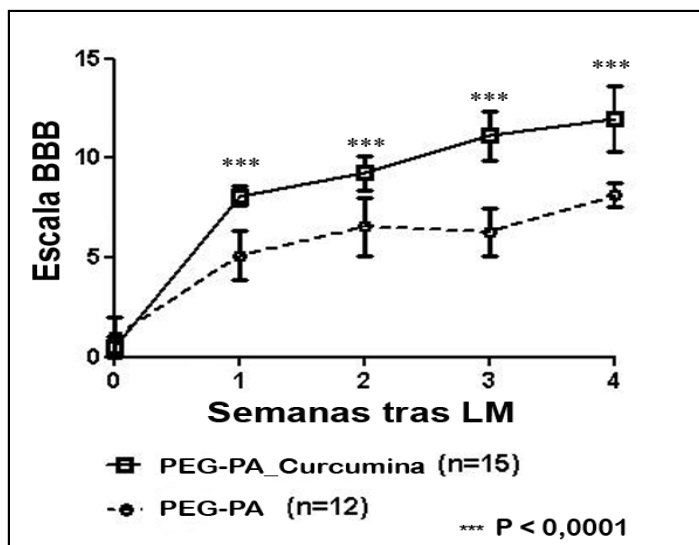


Figura 54. Test BBB. El compuesto PEG-PA_Curcumina acelera la recuperación de la actividad locomotriz tras LM.

Desde la segunda semana tras la cirugía, los animales son sometidos a rehabilitación activa 1 minuto en la cinta andadora (Treadmill) a 9cm/s de velocidad, la cual se mantiene constante durante toda la sesión de rehabilitación. A medida que la actividad locomotora de los animales mejora, se incrementa la dificultad de la prueba hasta mantener una actividad locomotora del tracto trasero constante a 11cm/s durante 3 minutos. Existe un paralelismo entre la capacidad locomotriz que presentan los animales en la cinta andadora y la recuperación funcional evaluada mediante el test BBB.

4.2.3. Estudios morfológicos.

Tras LM, se activan procesos de muerte celular en el lugar de la lesión derivados, entre otros, de la neuroinflamación que tiene lugar inmediatamente tras LM (ver Introducción). Esta muerte celular favorece la formación de cavidades/quistes en el lugar de la lesión y puede examinarse en el tejido post-mortem procesado histológicamente con tinciones neuroanatómicas del tejido medular.

Los animales destinados al estudio histológico se sacrifican mediante perfusión con PFA 4% (ver Material y Métodos) y tras la disección del tejido medular se observan diferencias macroscópicas en la zona de lesión entre ambos grupos experimentales; la zona de lesión en los animales tratados con PEG-PA_Curcumina resulta macroscópicamente más fina que la de los animales tratados con el vehículo (PEG-PA) (**Figura 55**), y sin embargo se observa un crecimiento de tejido en el epicentro de la lesión en los animales tratados con el polímero que no ocurre en las médulas de los individuos control:

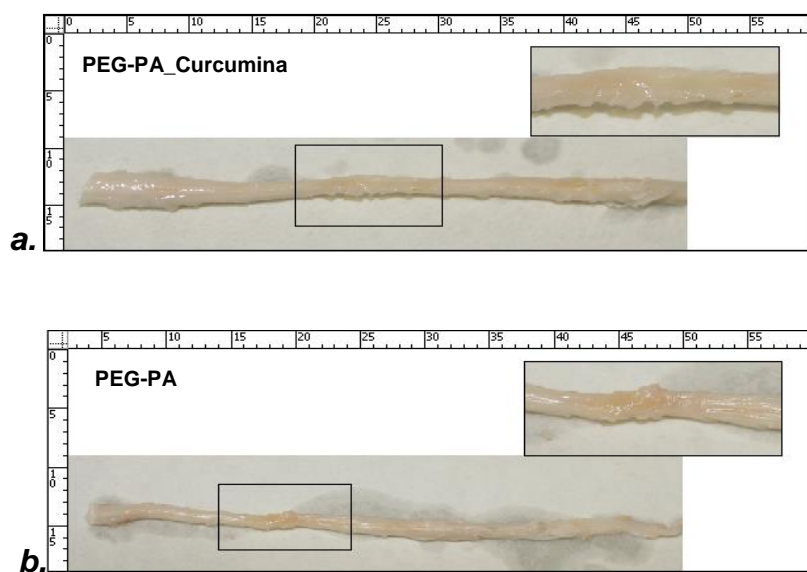
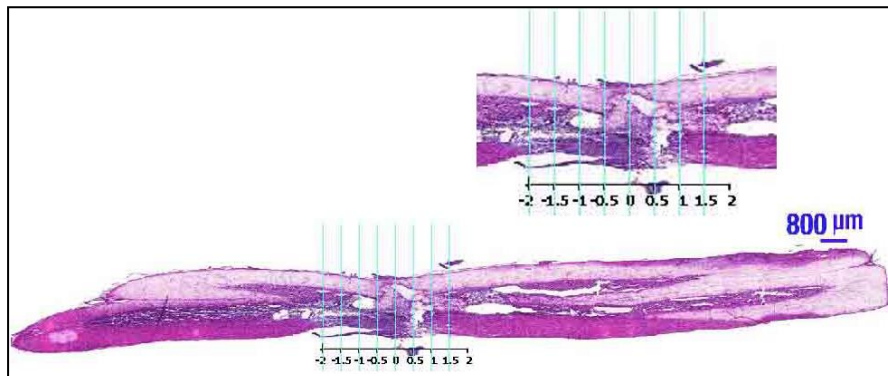
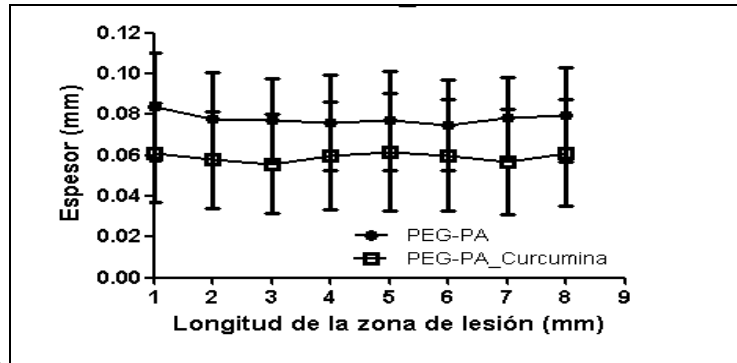


Figura 55. Análisis macroscópico: **a)** Médula representativa de las muestras de animales tratados con PEG-PA_Curcumina; **b)** Médula representativa de las muestras de animales tratados con PEG-PA.

En el estudio histológico del tejido medular se realizan 8 mediciones del espesor de este cada 0,5mm a lo largo de 8mm de tejido (ver Material y Métodos) (**Figura 56 a**). El gráfico (**Figura 56 b**) muestra una tendencia en el espesor del epicentro de la lesión de los animales tratados con el vehículo PEG-PA a ser mayor que el de los animales tratados con PEG-PA_Curcumina:



a.

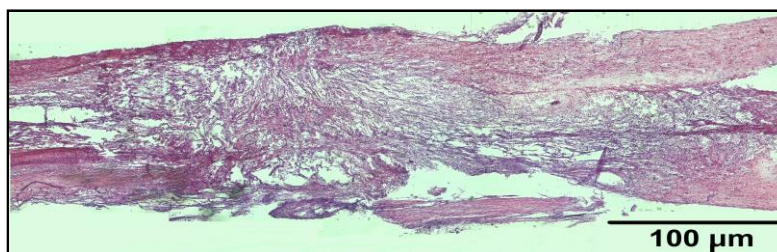


b.

Figura 56. Análisis de los espesores del epicentro de la lesión en animales PEG-PA_Curcumina y PEG-PA: a) Esquema del método de medición de los espesores medulares; b) Gráfico representativo de los espesores medulares de los animales tratados con PEG-PA_Curcumina y PEG-PA.

Tras la tinción con Hematoxilina-Eosina (4X), se observa de forma cualitativa que las muestras de los animales tratados con PEG-PA_Curcumina mantienen mejor preservado el tejido medular tras la LM y que los animales control (**Figura 57**):

PEG-PA_Curcumina



a.

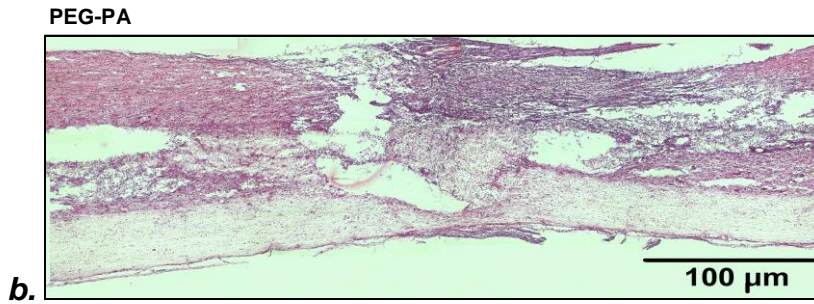


Figura 57. Tinción de Hematoxilina-Eosina del epicentro de la lesión: **a)** Muestra representativa de los animales tratados con PEG-PA_Curcumina; **b)** Muestra representativa de los animales tratados con PEG-PA.

El epicentro de la lesión de las médulas tratadas con PEG-PA_Curcumina (**Figura 58 a)** muestra una preservación significativamente mayor ($P < 0,01$) del tejido medular evidenciada por un menor número y área total de quistes que en los individuos control (**Figura 58 b y c).**

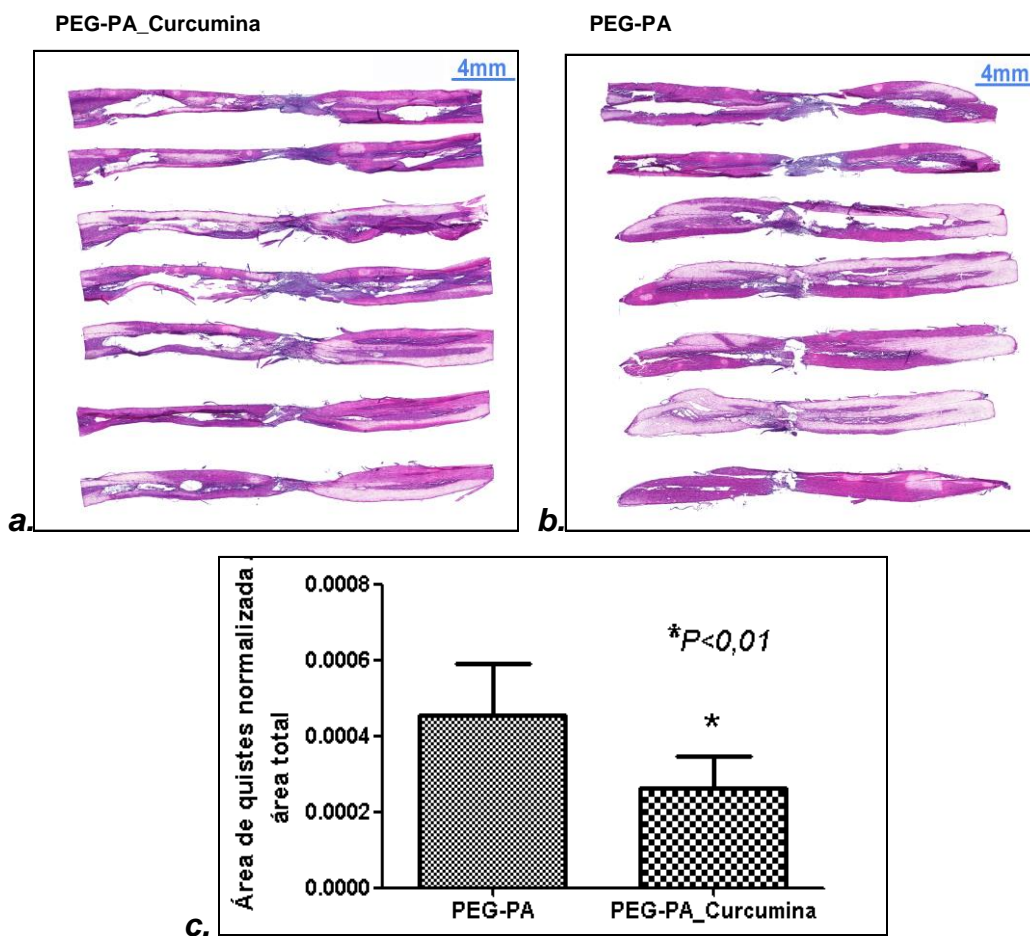
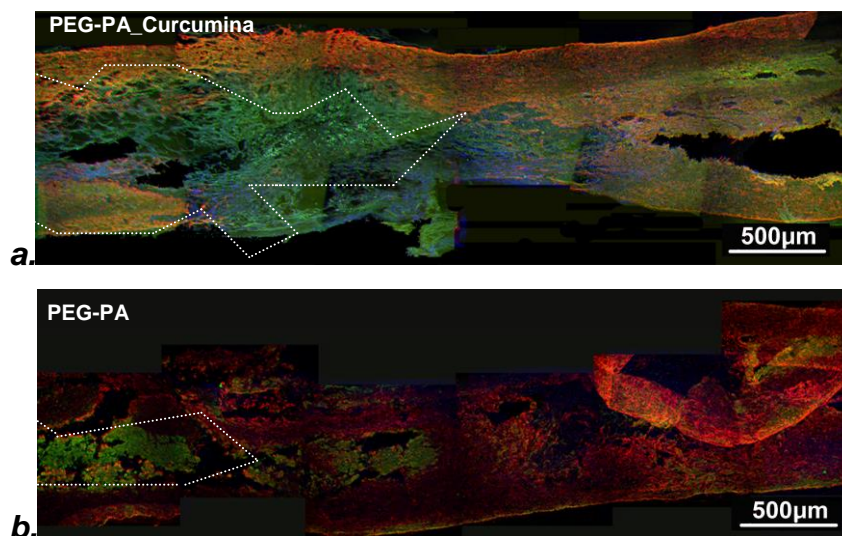


Figura 58. Cuantificación del área de quistes/cavidades tras LM: **a)** Detalle del epicentro de la lesión (10x); **b)** Representación gráfica de la cuantificación del área de quistes total.

4.3. LA ADMINISTRACIÓN INTRATECAL DE PEG-PA_CURCUMINA TRAS LM INDUCE NEUROPROTECCIÓN.

En primer lugar, se plantea investigar la capacidad neuroprotectora y reguladora de la plasticidad neuronal (Zhang L. et al., 2014) de la curcumina defendida previamente por otros autores (Wu J. et al., 2013; Liu Z. et al., 2013; Meng J. et al., 2014). Para ello se establece una valoración de los marcadores relacionados con la formación de la cicatriz glial (GFAP como marcador de astrocitos y NG2 como marcador de precursores de oligodendrocitos) y células neurales (β -Tubulina y Nestina) en muestras medulares de animales sacrificados 4 semanas tras la LM y tratamiento. Los resultados muestran que las médulas derivadas de animales tratados con el compuesto PEG-PA_Curcumina presentan una menor señal de GFAP que se traduce en una menor área de cicatriz que en los animales tratados con el vehículo y, aún más relevante, con una mayor expresión de β -Tubulina (que se interpreta como una mayor preservación del tejido neural) cuando se comparan con los animales control (PEG-PA) (**Figuras 59 a 63**).



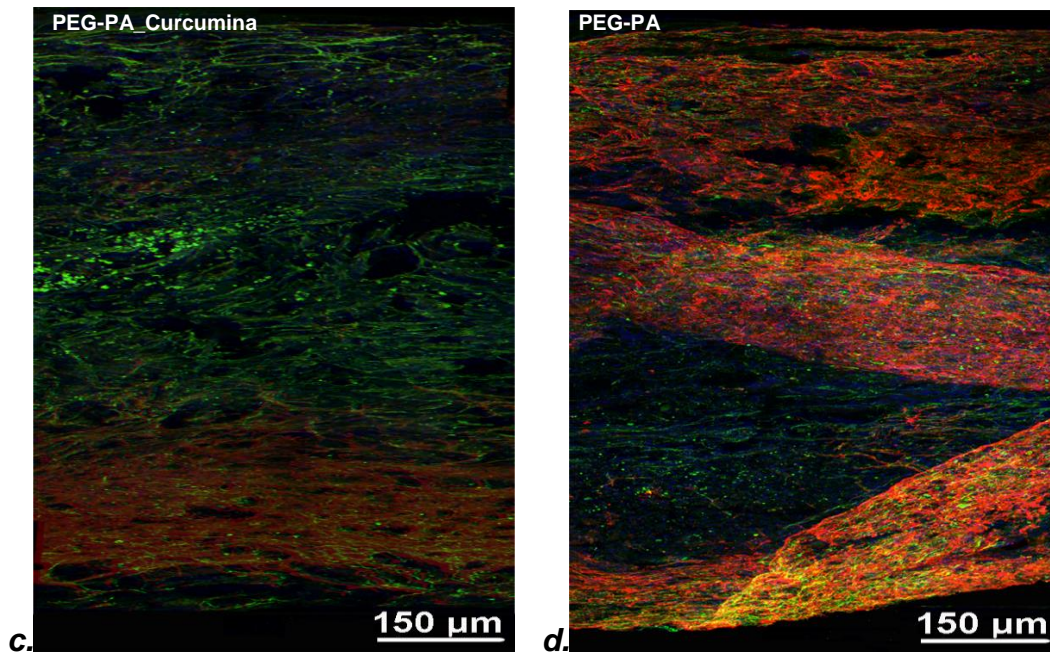


Figura 59. Análisis por inmunofluorescencia de las proteínas GFAP (rojo), β -Tubulina (verde) y DAPI (azul: marcador nuclear): **a)** Muestra representativa del grupo tratado con PEG-PA_Curcumina (10x); **b)** Muestra representativa del grupo tratado con PEG-PA (10x); **c)** Detalle de la imagen a) a 40x; **d)** Detalle de la imagen b) a 40x.

Las muestras analizadas corresponden al epicentro de la lesión de animales sacrificados 4 semanas tras LM y tratamiento de PEG-PA_Curcumina o PEG-PA. Las imágenes están tomadas al microscopio confocal (10x). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul). En la muestra representativa del grupo tratado con PEG-PA_Curcumina (**Figura 59 a**) se observa que la zona GFAP (rojo) rodea únicamente el epicentro de la lesión (delimitado por punteado blanco) donde se observa mayor número de fibras neurales marcadas con β -Tubulina (verde). Tal y como se observa en la imagen representativa del total del grupo control (**Figura 59 b**) existe más tejido cicatricial (marcado en rojo por la detección de GFAP) tanto en el epicentro como alrededor de este y el marcaje de β -Tubulina (verde) es más escaso y no se observan proyecciones neurales (el marcaje se concentra en el epicentro de la lesión, delimitado por punteado blanco), a diferencia de lo que ocurre en los animales tratados con el polímero.

El área GFAP negativa, como índice de la extensión de la cicatriz glial, de cada muestra se analiza mediante el software Image J tal y como se describe en el Capítulo 3: Material y Métodos. El gráfico **a** de la **Figura 60** representa el porcentaje del área GFAP negativa normalizada en las muestras representativas de animales tratados con PEG-

PA_Curcumina (n=11) frente a aquellos tratados con el vehículo (PEG-PA (n=12)). A pesar de que no existen diferencias significativas entre ambos grupos, los animales tratados con el vehículo muestran una tendencia a un mayor porcentaje de área GFAP negativa (11,71% \pm 5,99SD) respecto al área total de la médula frente a los animales tratados con el polímero (7,00% \pm 3,31SD), lo que se traduce en una tendencia a una mayor formación de la cicatriz glial en los animales control (PEG-PA). Por otra parte, se analiza el área β -Tubulina positiva de ambos grupos (gráfico **b**, **Figura 60**) y se observa un mayor porcentaje significativo ($P < 0,03$) de área β -Tubulina positiva en el grupo PEG-PA_Curcumina (16,95% \pm 7,13SD) que en el grupo control (9,77% \pm 6,36SD), lo que amplifica las diferencias entre ambos grupos y se interpreta como una mayor preservación del tejido neuronal y por lo tanto de la capacidad neuroprotectora del complejo PEG-PA_Curcumina.

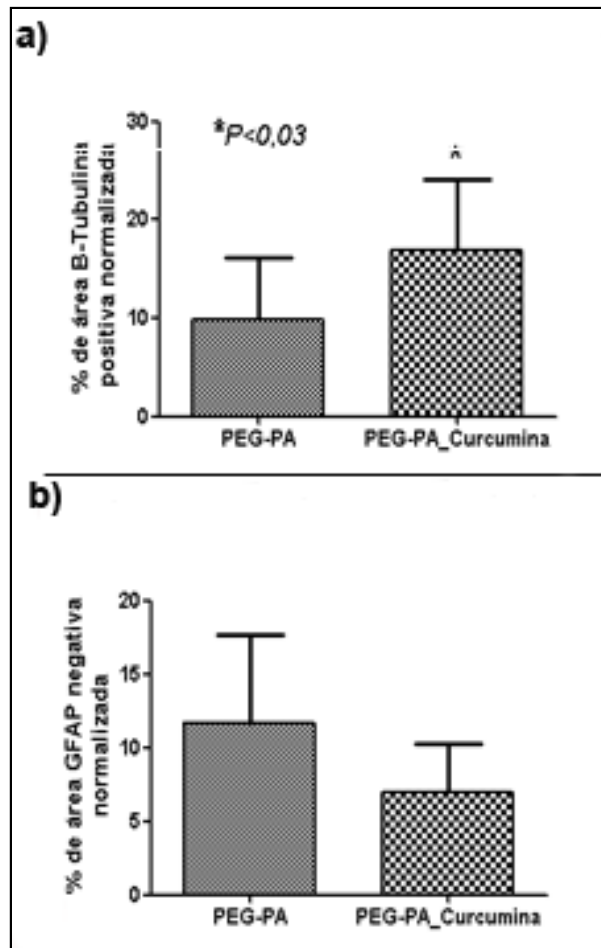


Figura 60. Representación gráfica de la cuantificación del área β -Tubulina positiva (a) y del área GFAP negativa (b) en animales tratados con PEG-PA_Curcumina y PEG-PA.

Adicionalmente al estudio inmunohistoquímico, se realiza además un análisis mediante Western Blotting de las proteínas GFAP y β -Tubulina en muestras de animales tratados con PEG-PA_Curcumina o PEG-PA y sacrificados a distintos tiempos (2 o 4 semanas tras LM para ambas condiciones experimentales) y se analiza la densitometría de las bandas correspondientes a cada proteína empleando el software Image J (**Figura 61**).

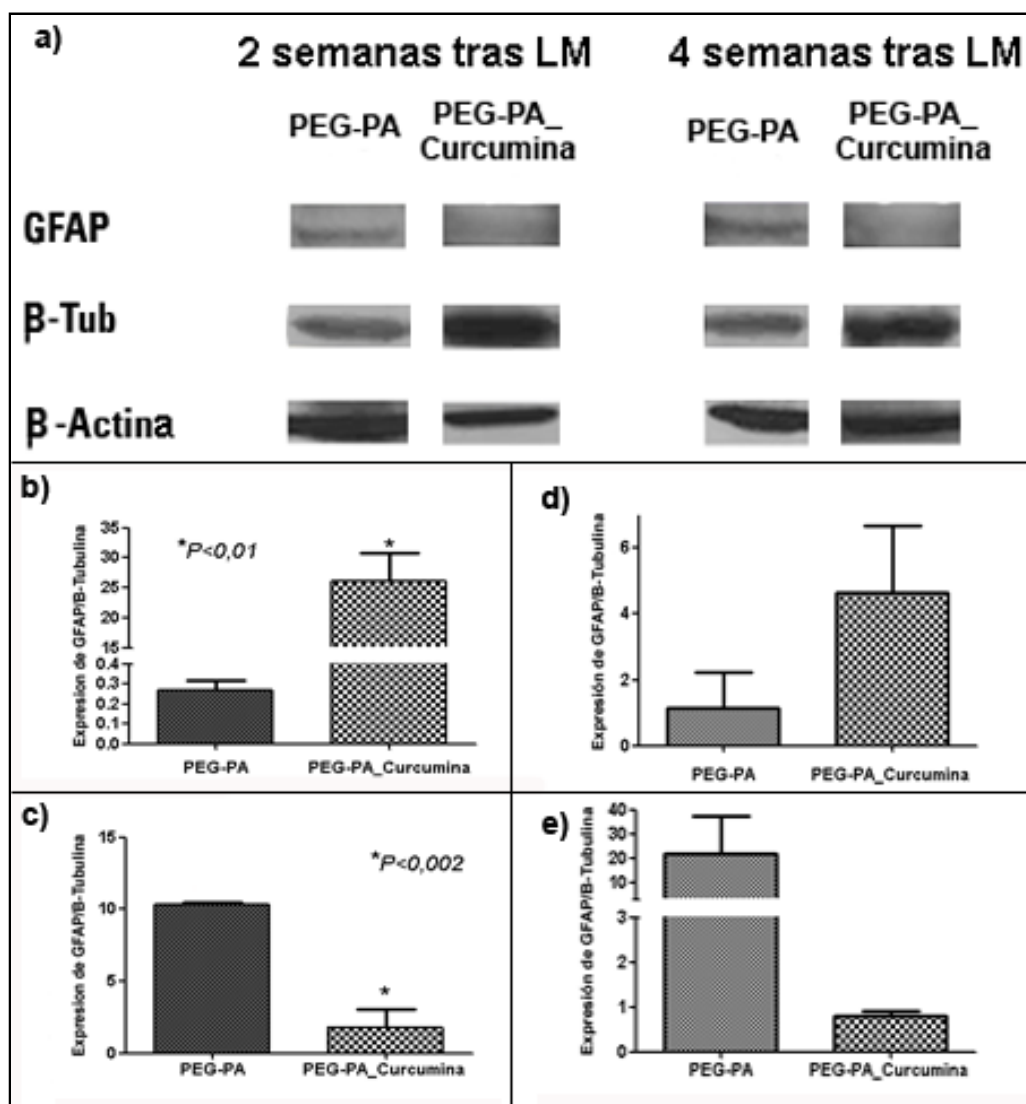


Figura 61. Análisis de la expresión de las proteínas GFAP y β -Tubulina Tubulina en animales tratados con PEG-PA_Curcumina o PEG-PA y sacrificados a 2 o 4 semanas tras LM: **a)** Imágenes representativas de ambos grupos del análisis por Western-Blotting SDS-Page de GFAP y β -Tubulina; Análisis densitométrico de las bandas obtenidas tras Western-Blotting de β -Tubulina (**b)** y GFAP (**c)** normalizadas respecto a la expresión de β -Actina en animales tratados con PEG-PA_Curcumina y PEG-PA y sacrificados a 2 semanas tras LM y 4 semanas tras LM (**d** y **e**, respectivamente).

En el análisis por Western-Blotting el control de carga se efectúa mediante el estudio de la expresión de β -Actina como gen de expresión constitutiva. Los resultados muestran que el compuesto PEG-PA_Curcumina tiene un efecto neuroprotector sobre el daño secundario derivado de la LM a partir de 2 semanas tras la LM y el tratamiento. La proteína GFAP se expresa significativamente ($P < 0,002$) más en los animales control (PEG-PA) que en los animales tratados con el polímero conjugado con curcumina 2 semanas tras la LM (**Figura 61 c**) y a 4 semanas tras LM existe una tendencia, aunque no significativa, de este resultado (**Figura 61 b**). Por otra parte, los animales tratados con PEG-PA_Curcumina muestran una expresión significativamente ($P < 0,01$) mayor de β -Tubulina que los animales control cuando son sacrificados 2 semanas tras la LM (**Figura 61 b**). A partir de 4 semanas tras la cirugía y el tratamiento, existe una tendencia a una mayor expresión de β -Tubulina entre los animales tratados con el polímero y los animales tratados con el vehículo, siendo mayor la expresión en los animales PEG-PA_Curcumina (**Figura 61 c**), hallazgo que indica la capacidad neuroprotectora del compuesto.

Además de establecer un análisis de la cicatriz glial tras LM mediante GFAP, se analiza también la expresión del proteoglicano condroitín sulfato NG2 (en amarillo) como marcador de precursores de oligodendrocitos (Mitigue D.M. et al., 2006; Botero L. et al., 2013) junto con β -Tubulina (en verde) (**Figura 62**):

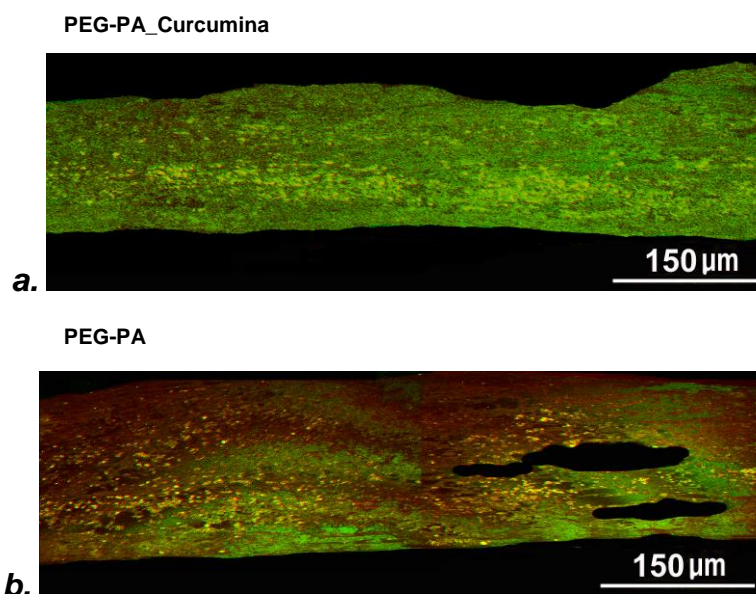
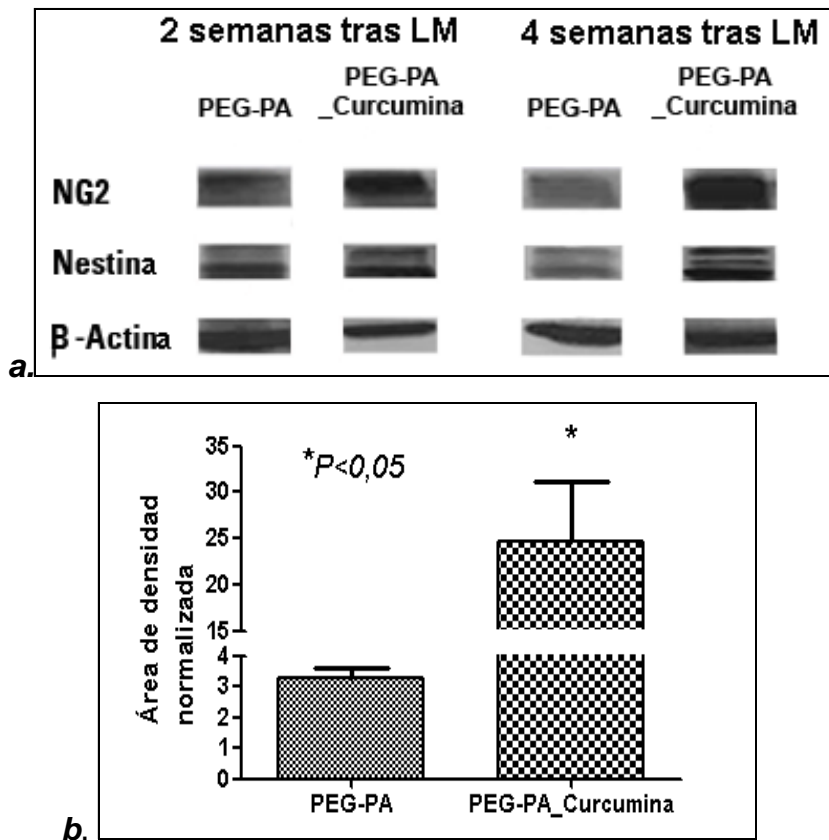


Figura 62. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de las proteínas NG2 (rojo), β -Tubulina (verde) y DAPI (azul: marcador nuclear): a) Muestra representativa de los

animales tratados con PEG-PA_Curcumina (10x); **b**) Muestra representativa de los animales tratados con PEG-PA; **c**) Detalle de la imagen a) a 40x; **d**) Detalle de la imagen b) a 40x.

Las muestras analizadas corresponden al epicentro de la lesión de animales sacrificados 4 semanas tras LM. Las imágenes son tomadas al microscopio confocal. En ambas muestras representativas de los dos grupos experimentales (PEG-PA_Curcumina y PEG-PA) se observa que el marcaje de NG2 (proteoglicano condroitín sulfato, en amarillo) se encuentra por toda la muestra y que en los animales tratados con PEG-PA_Curcumina se entremezcla con la señal de β -Tubulina (verde) que muestra mayor intensidad que en el grupo PEG-PA. Esto sugiere que existe presencia de precursores de oligodendrocitos y por tanto, debido a su función en la formación de las vainas de mielina que recubren los axones, actividad neuroprotectora.

Para validar los resultados se realiza además un análisis mediante Western Blotting de las proteínas NG2 y Nestina (precursor neuronal) a partir de extractos proteicos totales de muestras de animales tratados con PEG-PA_Curcumina o PEG-PA sacrificados a distintos tiempos (2 o 4 semanas tras LM ambas condiciones experimentales) (**Figura 63**).



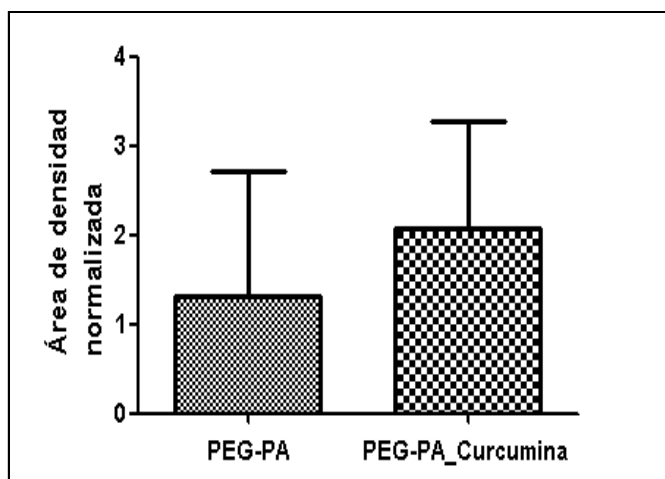
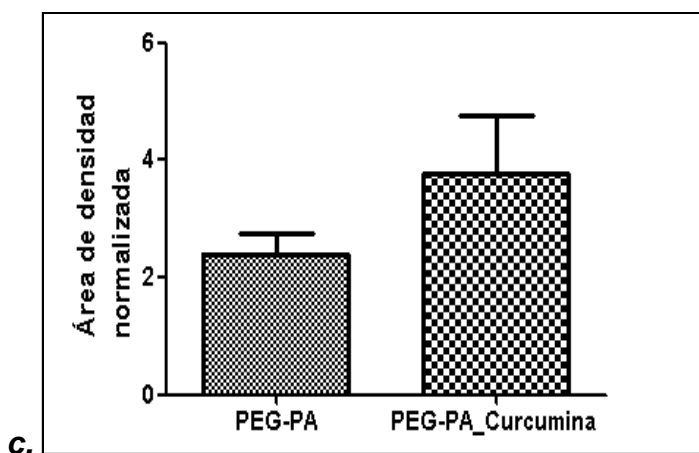
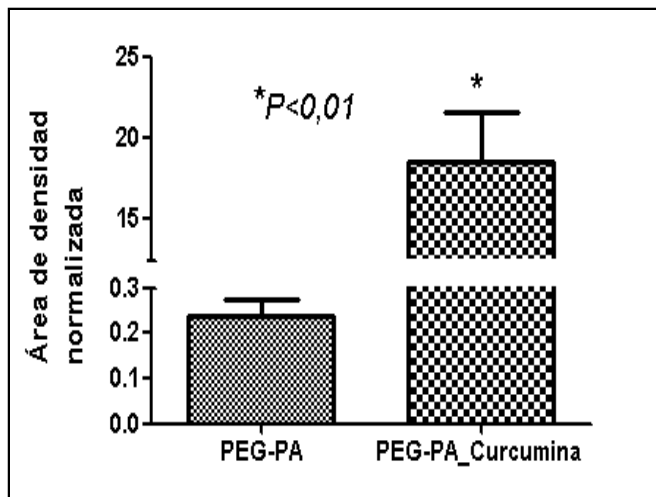
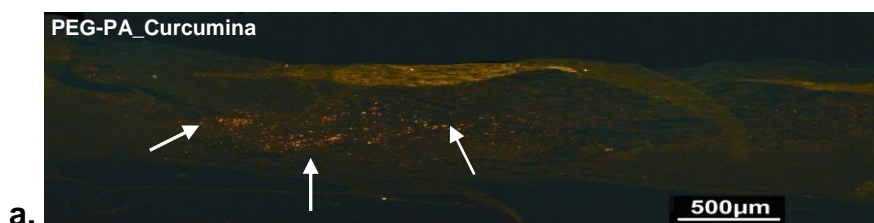


Figura 63. Análisis de la expresión de las proteínas NG2 y Nestina en animales tratados con PEG-PA_Curcumina o PEG-PA y sacrificados a 2 o 4 semanas tras LM: a) Imágenes representativas de ambos grupos del análisis por Western-Blotting SDS-Page de NG2 y Nestina; Análisis densitométrico de las bandas obtenidas tras Western-Blotting de NG2 y Nestina normalizadas respecto a la expresión de β -Actina en animales tratados con PEG-PA_Curcumina y PEG-PA y sacrificados a 2 semanas tras LM (b) y 4 semanas tras LM (c).

En el análisis por Western-Blotting el control de carga se efectúa mediante cuantificación de la expresión de β -Actina. Los resultados sugieren que el compuesto PEG-PA_Curcumina posee un efecto neuroprotector 2 semanas tras la LM y el tratamiento. Ambas proteínas (NG2 y Nestina) se expresan significativamente ($P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente) más en los animales tratados con el polímero conjugado con curcumina que en los animales control (**Figura 64 b**). Mientras que a las 4 semanas tras LM existe una tendencia, aunque no significativa, de este resultado (**Figura 64 c**).

4.4. LA ADMINISTRACIÓN INTRATECAL DE PEG-PA_CURCUMINA TRAS LM REDUCE LA APOPTOSIS

La curcumina ha mostrado con anterioridad actividad anti-apoptótica (Woodbury-Farina M. et al., 2013). En el tejido medular tras LM esta actividad se activa desde las primeras fases tras la lesión en un proceso de muerte celular por apoptosis de todos los tipos celulares, incluidos neuronas, oligodendrocitos y precursores neurales (Freire M.A., 2012). En las muestras representativas del epicentro de la lesión de animales sacrificados 4 semanas tras LM de ambas condiciones experimentales, se observa que la expresión de Caspasa-9 (proteína iniciadora de la cascada apoptótica, en rojo y amarillo) es menor en las muestras de animales tratados con PEG-PA_Curcumina (**Figura 64 a**) y esta aparece limitada únicamente al epicentro de la lesión como se puede apreciar en el detalle de las imágenes a 40x (**Figura 64 c**). Por el contrario, en la imagen representativa del grupo control (**Figura 64 b**), se observa un marcaje intenso de Caspasa-9 (rojo y amarillo), indicativo de actividad apoptótica, en el epicentro de la lesión que se torna más débil en las zonas circundantes (indicado en la imagen con flechas) (detalle a 40x en la **Figura 64 d**). Las imágenes de inmunofluorescencia son tomadas al microscopio confocal.



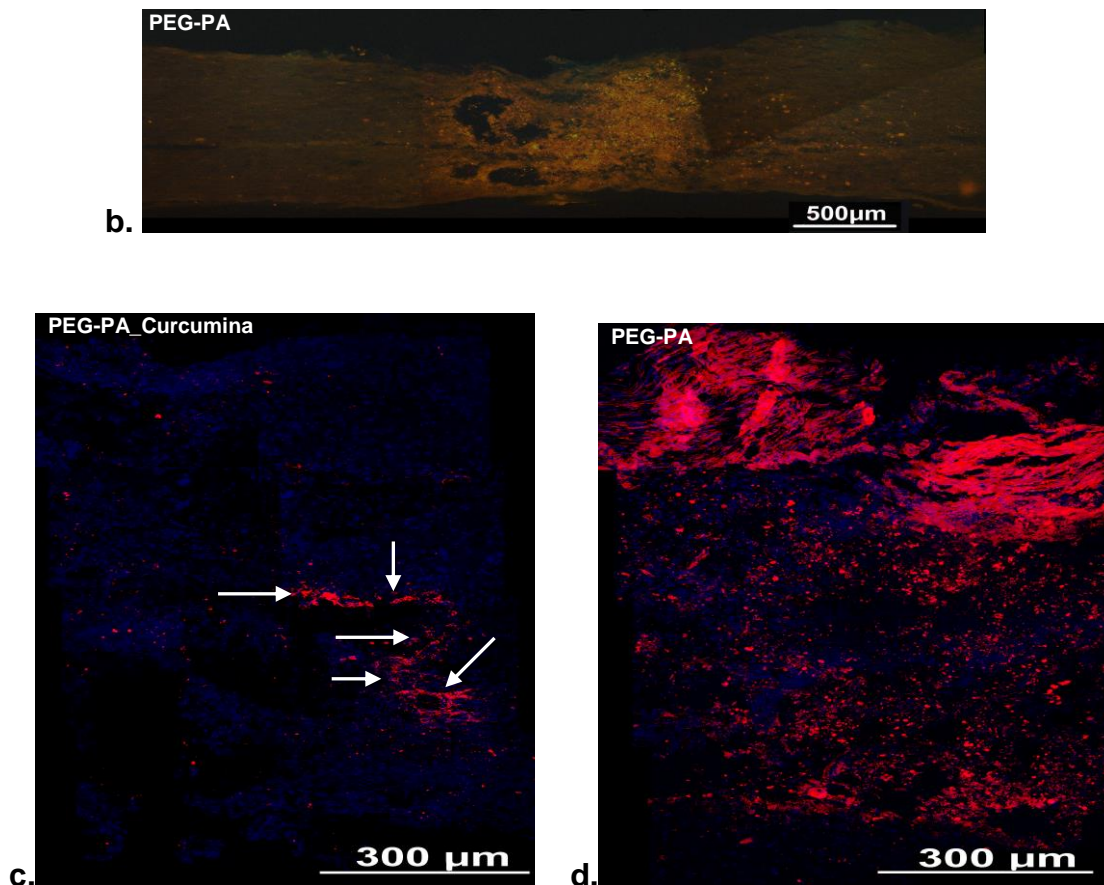


Figura 64. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de la proteína Caspasa-9 (en rojo) y DAPI (en azul: marcador nuclear). **a)** Muestra representativa de los animales tratados con PEG-PA_Curcumina (10x); **b)** Muestra representativa de los animales tratados con PEG-PA (10x); **c)** Detalle de la imagen a) a 40x; **d)** Detalle de la imagen b) a 40x.

Se realiza un análisis cuantitativo del porcentaje de marcadores de Caspasa-9 presentes en las muestras analizadas por inmunofluorescencia para cuantificar los hallazgos observados al microscopio. Tal y como muestra el gráfico (**Figura 66**), existen diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los porcentajes de marcadores de Caspasa-9 entre los animales tratados con PEG-PA y PEG-PA_Curcumina: el porcentaje es mayor en los animales control y por lo tanto el polímero PEG-PA_Curcumina posee capacidad anti-apoptótica tras LM.

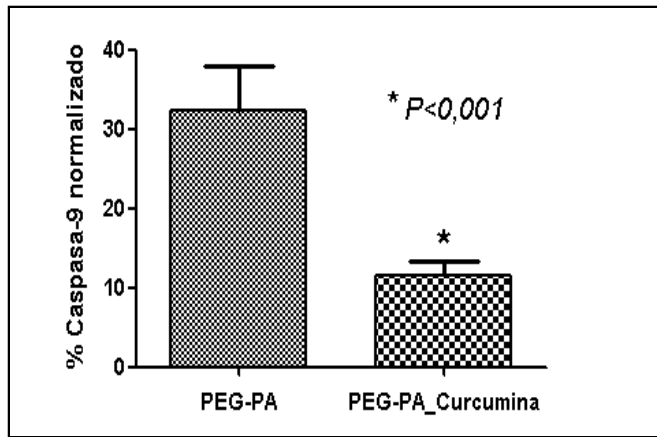
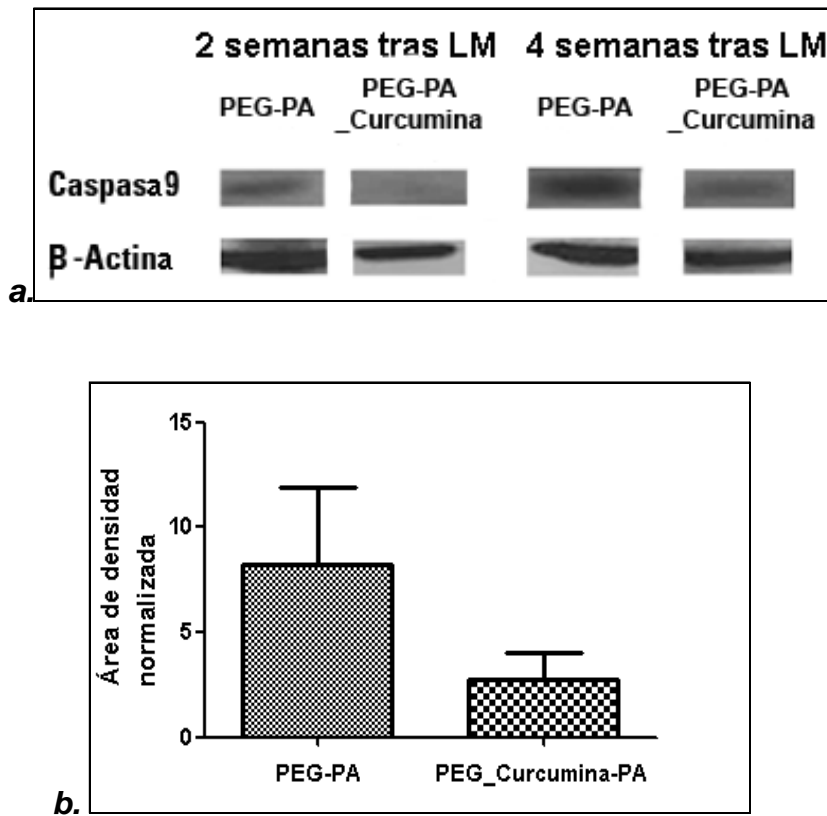


Figura 65. Representación gráfica de la cuantificación de la expresión de Caspasa-9.

Además, el análisis mediante Western Blotting de la proteína Caspasa-9 en muestras de animales tratados con PEG-PA_Curcumina o PEG-PA sacrificados a distintos tiempos (2 o 4 semanas tras LM para ambas condiciones experimentales) (**Figura 66**), valida los resultados obtenidos en el estudio inmunohistoquímico.



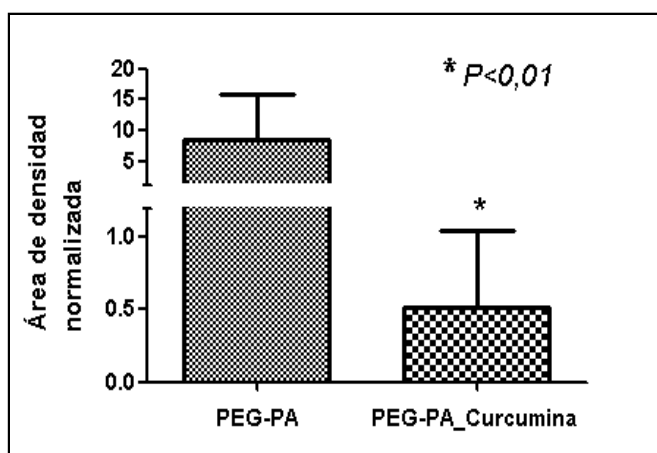


Figura 66. Análisis de la expresión de la proteína Caspasa-9 en animales tratados con PEG-PA_Curcumina o PEG-PA y sacrificados a 2 o 4 semanas tras LM: a) Imágenes representativas de ambos grupos del análisis por Western-Blotting SDS-Page de Caspasa-9; Análisis densitométrico de las bandas obtenidas tras Western-Blotting de Caspasa-9 normalizadas respecto a la expresión de β -Actina en animales tratados con PEG-PA_Curcumina y PEG-PA y sacrificados a 2 semanas tras LM (b) y 4 semanas tras LM (c).

El control de carga se efectúa mediante el análisis de la expresión de β -Actina. Los resultados muestran que existen diferencias significativas ($P < 0,01$) en la presencia de la proteína Caspasa-9 en ambos grupos 4 semanas después de la LM: en los animales tratados con el vehículo (PEG-PA) la presencia de Caspasa-9 es superior a la de los animales tratados con PEG-PA_Curcumina ($8,53\text{px}^2$ frente a $0,51\text{px}^2$, respectivamente), al contrario de lo que ocurre 2 semanas post-LM ($2,46\text{px}^2$ en controles frente a $7,94\text{px}^2$ en animales tratados con el compuesto). Estos hallazgos permiten elucidar que la cascada apoptótica ocurre durante las dos primeras semanas tras la LM y que el efecto del compuesto PEG-PA_Curcumina disminuye significativamente el proceso apoptótico una vez pasado ese tiempo, a las 4 semanas tras LM.

4.5. LA ADMINISTRACIÓN INTRATECAL DE PEG-PA_CURCUMINA TRAS LM REDUCE EL COMPONENTE INFLAMATORIO.

La curcumina es conocida por su potente efecto antiinflamatorio. Su eficacia para prevenir la neuroinflamación y así la neurodegeneración mediante administración oral ha sido defendida por diversos autores (Virmani A. et al., 2013; Borre Y.E. et al., 2013; Tegenge M.A. et al., 2014). En el presente estudio se analiza la capacidad antiinflamatoria

de la curcumina administrada localmente mediante cateterización intratecal tras LM y su actividad sobre células de la microglía y macrófagos. Se realiza un análisis inmunohistoquímico de la microglía, por el marcador IBA1, y la presencia de macrófagos mediante ED1 (**Figura 67**).

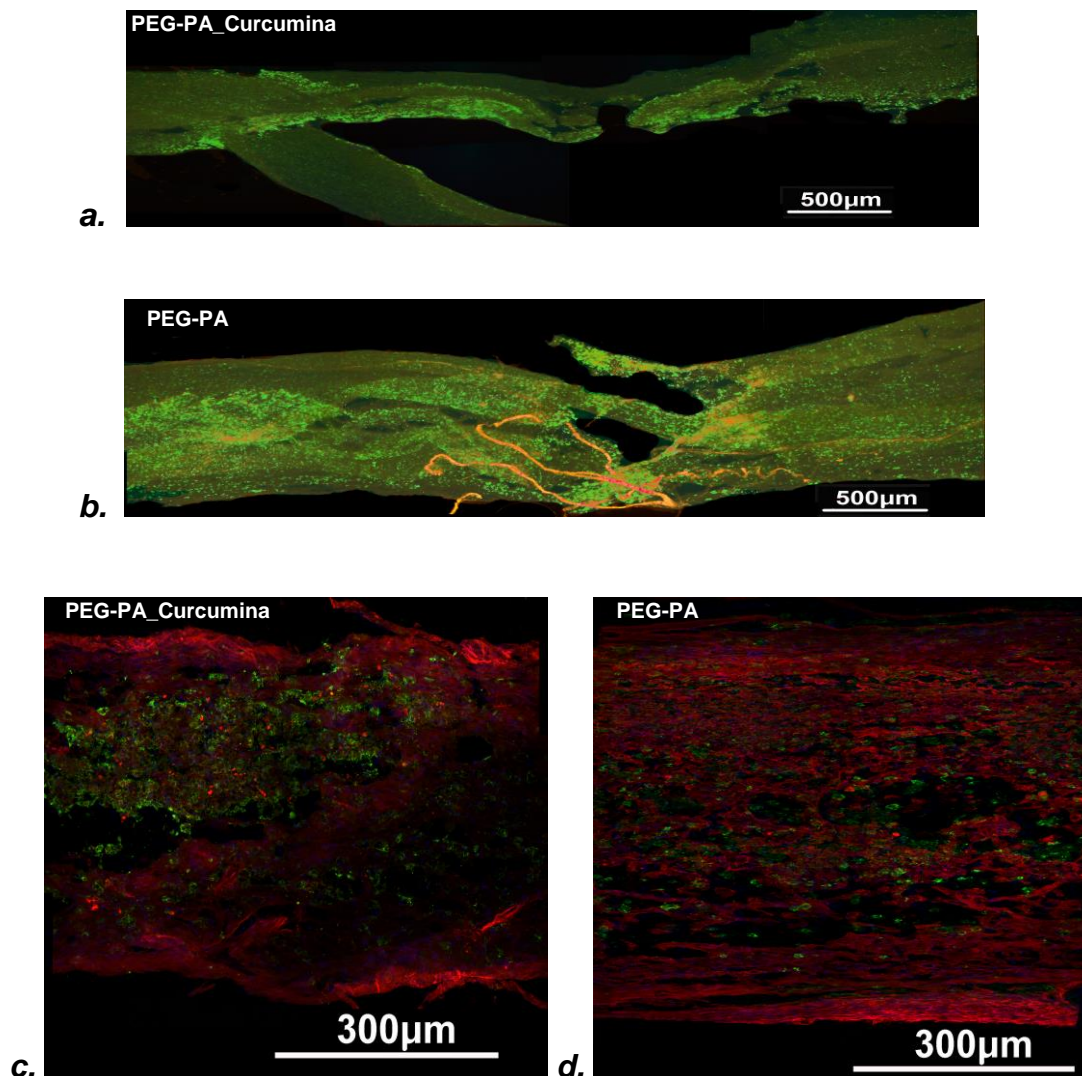
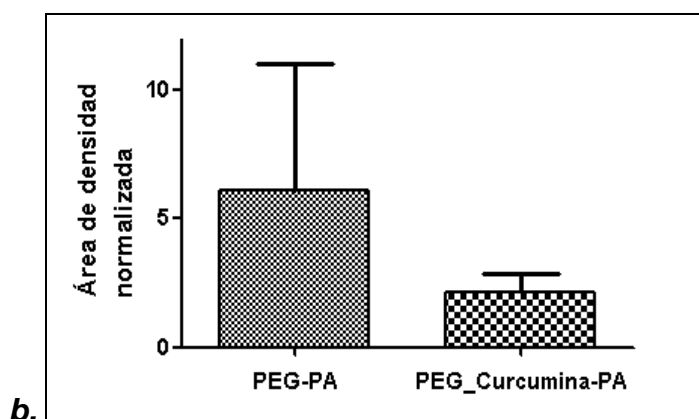
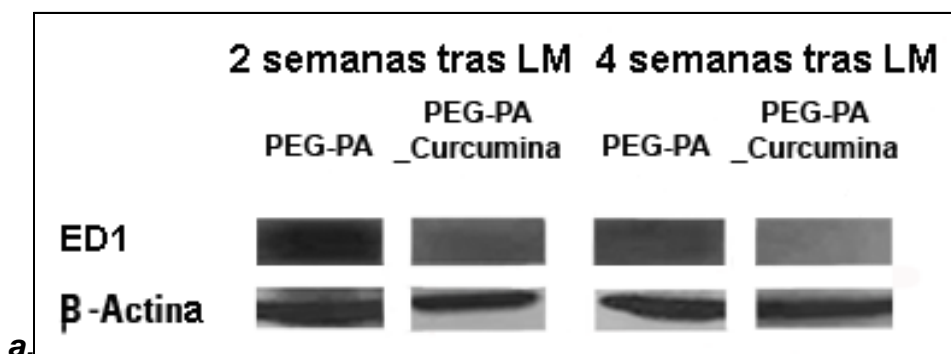


Figura 67. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de las proteínas ED1 (en verde) e IBA1 (en rojo): **a)** Muestra representativa de los animales tratados con PEG-PA_Curcumina (10x); **b)** Muestra representativa de los animales tratados con PEG-PA (10x); **c)** Detalle de la imagen a) a 40x; **d)** Detalle de la imagen b) a 40x.

Las muestras analizadas corresponden al epicentro de la lesión de animales sacrificados 4 semanas tras LM. Las imágenes, representativas de cada grupo experimental, son tomadas al microscopio confocal. La intensidad de la señal de IBA1 (rojo), marcador de microglía, en la muestra representativa del grupo control se distribuye por toda la zona de la lesión aunque se observa una mayor concentración en el epicentro

(**Figura 67 b**). El marcaje de ED1 (verde), marcador de macrófagos, en las muestras representativas del grupo tratado con PEG-PA se reduce únicamente al epicentro de la lesión. En la muestra que representa los animales tratados con PEG-PA_Curcumina (**Figura 67 a**) se aprecia un marcaje menos intenso de IBA1 y aparece limitado solamente en el epicentro de la lesión. La señalización de ED1 (en verde) es prácticamente inapreciable y se encuentra concentrada sólo en el epicentro. Los hallazgos sugieren que la administración local en el lugar de la LM del complejo PEG-PA_Curcumina posee actividad antiinflamatoria: limita los procesos de activación de células inflamatorias como los macrófagos y los fenómenos de fagocitosis tras LM.

El análisis mediante Western Blotting de la proteína ED1 en muestras de animales tratados con PEG-PA_Curcumina o PEG-PA sacrificados a distintos tiempos (2 o 4 semanas tras LM para ambas condiciones experimentales) (**Figura 69**) respalda los resultados inmunohistoquímicos:



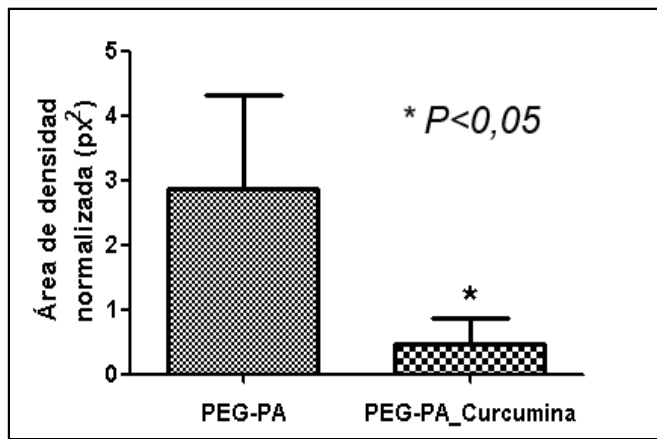


Figura 68. *Análisis de la expresión de la proteína ED1 en animales tratados con PEG-PA_Curcumina o PEG-PA y sacrificados a 2 o 4 semanas tras LM: a) Imágenes representativas de ambos grupos del análisis por Western-Blotting SDS-Page de ED1; Análisis densitométrico de las bandas obtenidas tras Western-Blotting de ED1 normalizadas respecto a la expresión de β -Actina en animales tratados con PEG-PA_Curcumina y PEG-PA y sacrificados a 2 semanas tras LM (b) y 4 semanas tras LM (c).*

El control de carga se efectúa mediante β -Actina. Los resultados muestran que apenas existen diferencias en la expresión de ED1 entre ambas condiciones experimentales 2 semanas tras LM: se observa una tendencia en que el componente inflamatorio en los animales tratados con el compuesto es ligeramente mayor que en los animales tratados con PEG-PA. Por otra parte, a partir de las 4 semanas post-LM, existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre ambas condiciones experimentales, siendo la presencia de macrófagos significativamente mayor en los animales control que en los animales tratados con PEG-PA_Curcumina.

TERAPIA CELULAR EN LESIÓN MEDULAR

4.6. EL TRASPLANTE SUB-AGUDO DE epSPCi TRAS LM FAVORECE LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL.

Los antecedentes de nuestro grupo muestran que el trasplante agudo de células endimarias con capacidad multipotente derivadas de animales adultos, habiendo sufrido una lesión medular, rescatan la pérdida de actividad neurológica con recuperación funcional locomotora (Moreno V. et al., 2009). Actualmente, los protocolos clínicos de

actuación en caso de lesión medular priorizan la estabilización del paciente previamente a la aplicación del tratamiento. En 1957, Peter Safar describió el protocolo de estabilización ABC (A: *Airway*, vía aérea; B: *Breathing*, respiración; C: *Circulation*, circulación) que hoy en día se sigue empleando. Esto implica que el tratamiento de la LM no se realizaría inmediatamente tras el trauma, sino que transcurre cierto tiempo (con variabilidad entre los pacientes) hasta poder instaurar el tratamiento: por lo tanto, la realidad clínica actual es que las LM son tratadas en su fase sub-aguda. Dado que la LM sub-aguda va a ser el escenario más frecuente en la práctica clínica, y acorde a los resultados obtenidos con el trasplante agudo de epSPCi, se plantea realizar un estudio sobre la recuperación funcional de la actividad neurológica tras trasplante sub-agudo de epSPCi.

4.6.1. Trasplante de epSPCi en un modelo de LM sub-aguda

Se realiza el trasplante de epSPCi acorde a lo descrito en el artículo de Moreno V. et al., 2009, aunque en este caso se realiza el trasplante una semana tras LM (ver Capítulo 3: Material y Métodos). Desde la primera semana post- trasplante hasta la última semana del experimento (semana 6) se analiza la recuperación funcional a nivel locomotor de los animales trasplantados en fase sub-aguda y no trasplantados (sólo lesionados) en un campo abierto y aplicando la escala BBB (**Figura 69**).

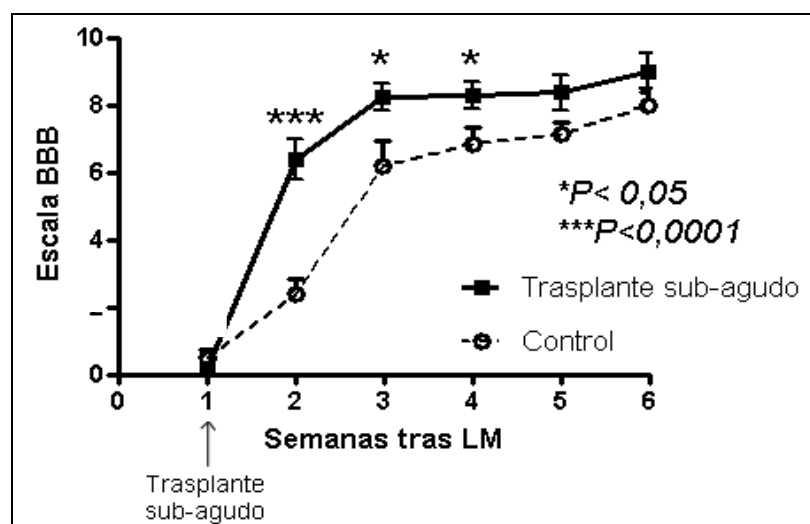


Figura 69. Test BBB. El trasplante sub-agudo con epSPCi acelera la recuperación funcional de la actividad locomotriz tras LM.

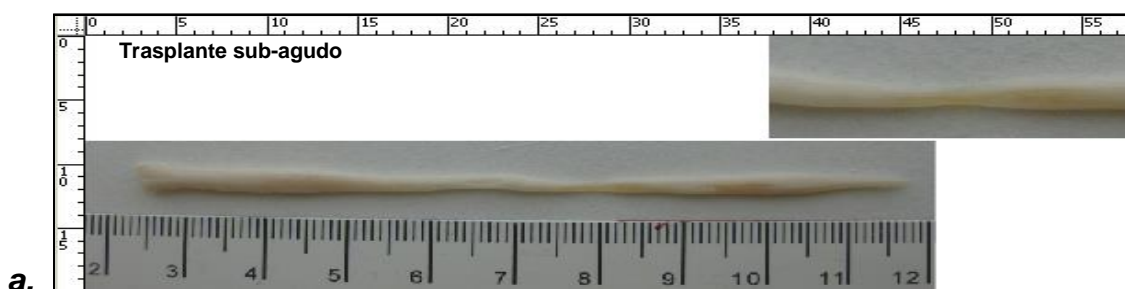
Los animales habiendo recibido trasplante celular en fase sub-aguda de epSPCi mejoran significativamente ($P < 0,05$) tras la primera semana post-trasplante (con una

media de 6,4 puntos y $\pm 1,89$ SD en los animales trasplantados frente a una media de 2,3 puntos en los individuos control con $\pm 1,62$ SD). Durante la segunda semana tras el trasplante, la significatividad en las diferencias entre ambos grupos se incrementa a $P < 0,0001$: con una media de 8,2 puntos y $\pm 1,20$ SD en animales trasplantados y 6,1 con $\pm 2,48$ SD en los animales trasplantados. Durante la cuarta semana post-trasplante las diferencias siguen siendo significativas ($P < 0,05$) con una media de 8,3 puntos y $\pm 1,25$ SD en animales trasplantados frente a 6,8 puntos y $\pm 1,69$ SD en animales control.

Sin embargo, a diferencia de los resultados observados en los antecedentes del grupo (Moreno V. et al., 2009) entre los animales trasplantados en fase aguda y no trasplantados donde las diferencias permanecen significativas entre ambos grupos hasta el fin del experimento en la sexta semana ($P < 0,05$), en el caso del trasplante sub-agudo, las diferencias entre los animales trasplantados y no trasplantados son significativas durante las cuatro primeras semanas del experimento, existiendo en la quinta y sexta semana una tendencia a una mejor recuperación funcional en los animales trasplantados (con una media de 8,3 puntos y $\pm 1,74$ SD para los trasplantados frente a 7,1 y $\pm 1,05$ SD en los no trasplantados durante la quinta semana tras LM; y una media de 9 puntos con $\pm 1,5$ SD en trasplantados y una media de 8 puntos con $\pm 1,06$ SD en los control).

4.6.2. Cambios morfológicos.

Para estudiar los mecanismos de acción a través de los cuales el trasplante sub-agudo de epSPCi favorece la recuperación funcional, se analizan los cambios morfológicos tras sacrificio a las 6 semanas post-LM en el tejido medular diseccionado y fijado de los animales trasplantados y control (sólo lesionados) (**Figuras 70 a 72**).



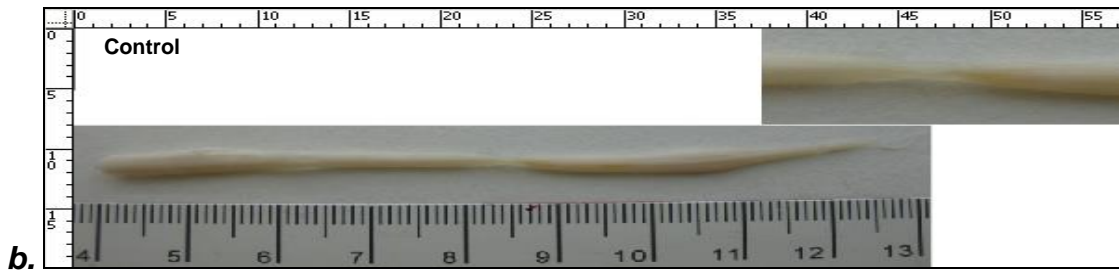


Figura 70. Análisis macroscópico: Médula representativa de las muestras de animales con **a) trasplante sub-agudo de epSPCi** y **b) control**.

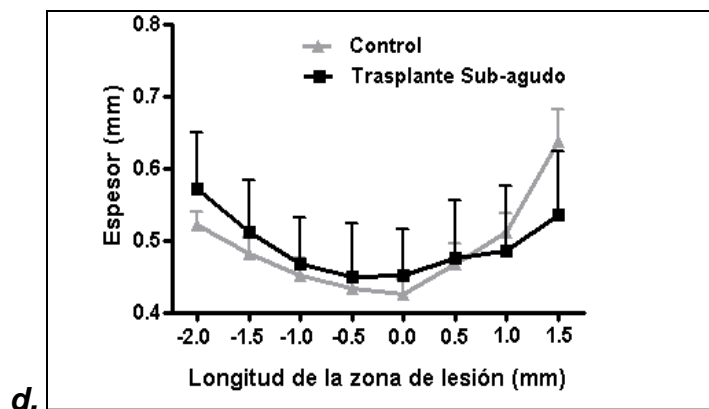
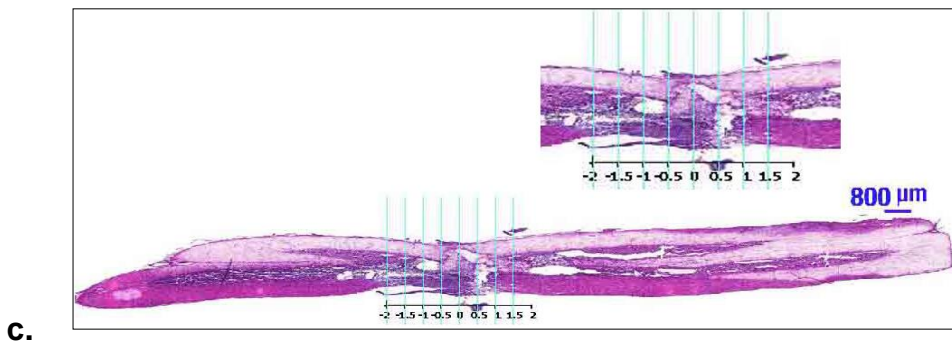
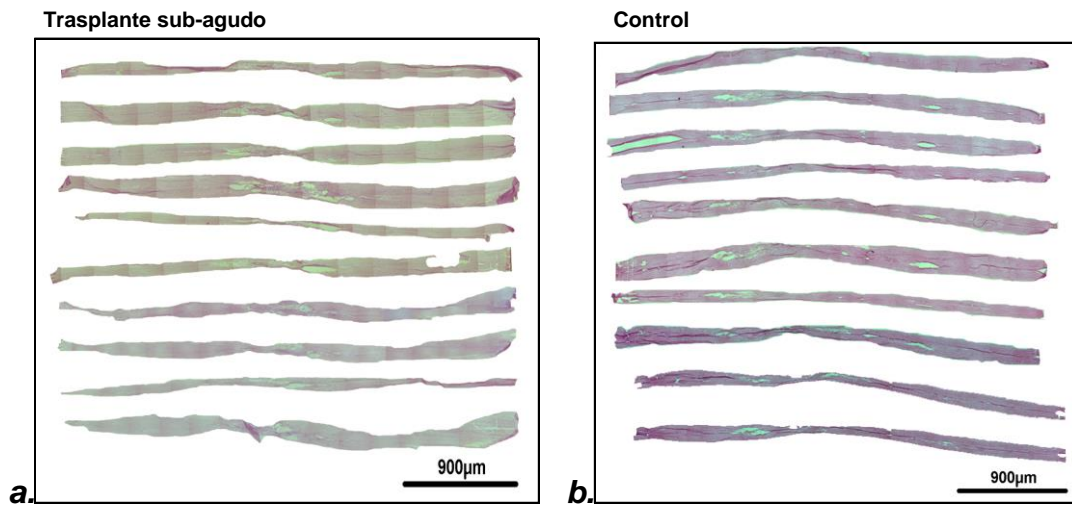


Figura 71. Análisis de los espesores del epicentro de la lesión en animales con trasplante sub-agudo de epSPCi y control: Serie de cortes de médula representativa de las muestras de **a)** animales trasplantados y **b)** control; **c)** Esquema del método de medición de los espesores medulares; **d)** Gráfico del resultado de la cuantificación de los espesores medulares de los animales con trasplante sub-agudo de epSPCi y control en el área señalada en las imágenes.

Los resultados representados en la gráfica (**Figura 71 d**) no muestran diferencias significativas en el espesor medular de las muestras representativas de los grupos de trasplante sub-agudo y control.

Para analizar la preservación del tejido medular entre los animales con trasplante sub-agudo de epSPCi y los animales control se cuantifica el número de quistes en diversas muestras representativas de cada condición experimental (**Figura 72**) (ver método de cuantificación en el Capítulo 3: Material y Métodos).

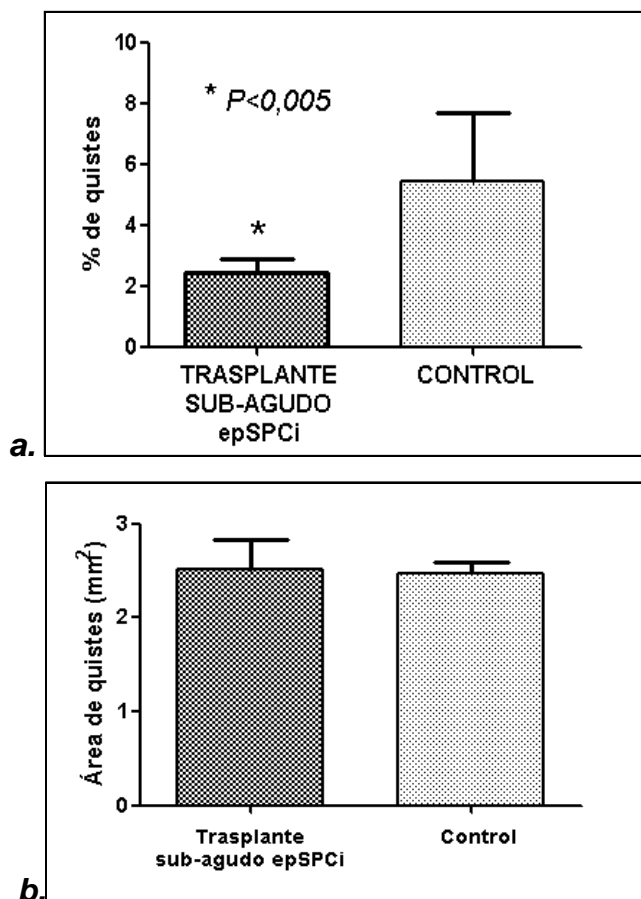


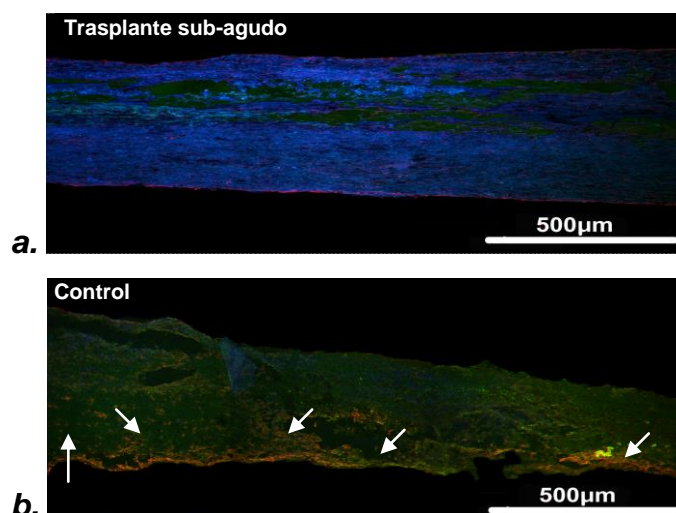
Figura 72. Cuantificación del porcentaje (a) y del área de quistes/cavidades (b) en animales con trasplante agudo de epSPCi y animales control.

Los resultados muestran que el porcentaje de quistes es significativamente mayor ($P < 0,005$) en los animales control cuando los comparamos con aquellos que han recibido trasplante sub-agudo de epSPCi (**Figura 72 a**). Sin embargo, los resultados del área total de quistes/área total de la médula de los animales trasplantados no muestran diferencias significativas frente al grupo control (**Figura 72 b**) ya que el tamaño de los quistes/cavidades en las muestras representativas de los individuos trasplantados poseen un tamaño mayor al grupo control.

4.6.3. Análisis inmunohistoquímico.

Los antecedentes del grupo (Moreno V. et al., 2009) demuestran la capacidad neuroprotectora del trasplante de células epSPCi en fase subaguda. Por ello se establece, tras el trasplante sub-agudo de epSPCi, una valoración de los marcadores relacionados con la formación de la cicatriz glial (GFAP como marcador de astrocitos), células neurales (β -Tubulina) y células epSPCi trasplantadas (GFP positivas) en muestras medulares de animales con trasplante sub-agudo de epSPCi y en animales control.

Tras el análisis inmunohistoquímico, se observa que en las muestras de animales trasplantados en fase sub-aguda con epSPCi, las células trasplantadas (GFP) migran hacia la zona de la lesión. Las células GFP migran al menos 2mm desde las zonas de trasplante, rostral y caudal a la lesión, acompañando a los axones incluso a través de la cicatriz glial (**Figura 73**).



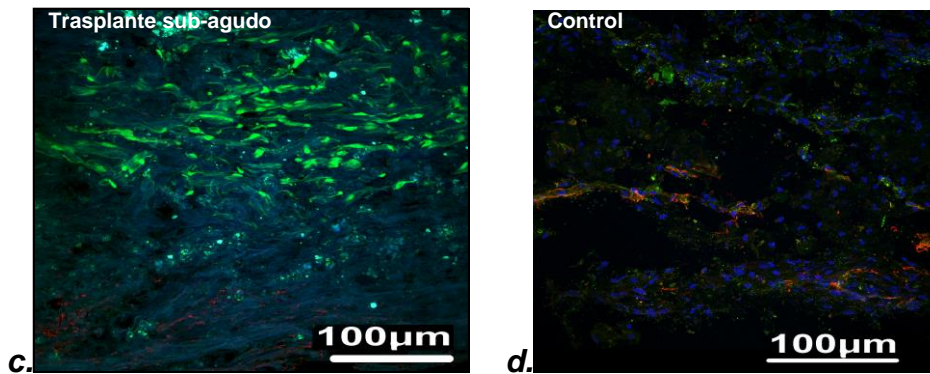


Figura 73. Análisis por inmunofluorescencia de las proteínas GFAP, β -Tubulina y GFP (epSPCi) : **a)** Muestra representativa de las médulas trasplantadas en fase sub-aguda con células epSPCi (GFP, verde; β -Tubulina en azul y GFAP en rojo) (10x); **b)** Muestra representativa de las médulas control (β -Tubulina en verde y GFAP en rojo) (10x); **c)** Detalle de la imagen a) a 40x; **d)** Detalle de la imagen b) a 40x.

Las muestras analizadas corresponden al epicentro de la lesión de animales con trasplante sub-agudo de epSPCi y animales control. Las imágenes están tomadas al microscopio confocal (10x). En la muestra representativa del grupo trasplantado (**Figura 73 a**) se observa menor marcaje de GFAP (rojo) indicativo de tejido cicatricial (cicatriz glial) al compararla con la muestra representativa del grupo control (señalado con flechas blancas, **Figura 73 b**). Por otro lado, en el centro del tejido de la muestra representativa de trasplante sub-agudo se observa también marcaje verde indicativo de presencia de células GFP. En la imagen que muestra en detalle el epicentro de la lesión de la muestra representativa de los animales trasplantados (**Figura 73 c**) se observa el amplio marcaje de células GFP (verde) que han migrado desde las zonas rostral y caudal a la lesión. Por el contrario, en la imagen que muestra una ampliación del epicentro de la lesión de la muestra representativa de animales control (**Figura 73 d**) se observa el marcaje nuclear (azul) y una mayor proporción de marcaje rojo (GFAP) respecto a los animales trasplantados.

El área GFAP negativa, como índice de la extensión de la cicatriz glial, de cada muestra se analiza mediante el software Image J tal y como se describe en el Capítulo 3: Material y Métodos. El gráfico **a** de la **Figura 74** representa el porcentaje del área GFAP negativa normalizada en las muestras representativas de animales trasplantados frente a los animales control. Los resultados de la cuantificación del área GFAP negativa no muestra diferencia significativas entre ambas condiciones experimentales:

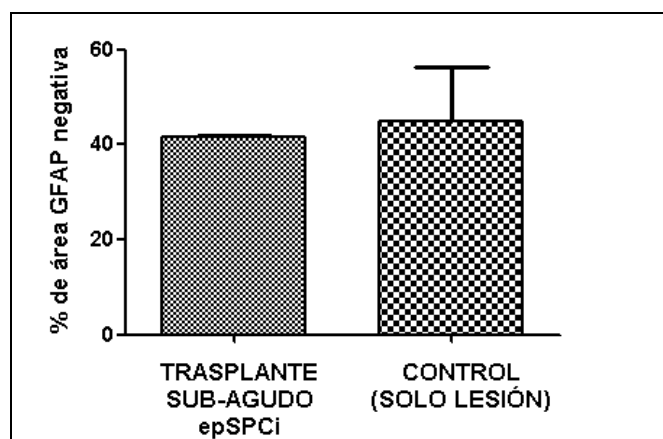


Figura 74. Representación gráfica de la cuantificación del área GFAP negativa en animales con trasplante sub-agudo de células epSPCi y animales control.

4.7. EL TRASPLANTE SUB-AGUDO DE epSPCi TRAS LM PRODUCE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA.

4.7.1. Estudio comparativo a nivel transcripcional en el modelo de trasplante agudo y sub-agudo.

Con el fin de esclarecer el mecanismo implicado en la actividad reparadora en el modelo de trasplante en fase aguda (inmediatamente tras LM) o en fase sub-aguda (1 semana tras LM), así como las diferencias entre cada modelo de trasplante, se realiza un ensayo de estudio de expresión masiva empleando micro-arrays conteniendo el total del genoma de rata. La totalidad del ARN de áreas lesionadas equivalentes entre sí, de 4 animales por grupo, se retrotranscriben e hibridan con el genoma completo de rata.

Además, en el estudio se incluye ARN de tejido medular de los segmentos torácicos que incluyen la zona de LM (ver Capítulo 3: Material y Métodos) de cuatro animales para cada condición experimental a distintos tiempos tras LM: animales control sin LM (T0), sacrificados en fase aguda (T1, 1 semana post-LM), sub-aguda (T2, 2 semanas post-LM) y crónica (T4 y T8, 4 y 8 semanas tras LM, respectivamente), así como de animales trasplantados en fase aguda (TP1, inmediatamente tras LM) y sub-aguda (TP2, 1 semana tras LM) (**Figura 75**).

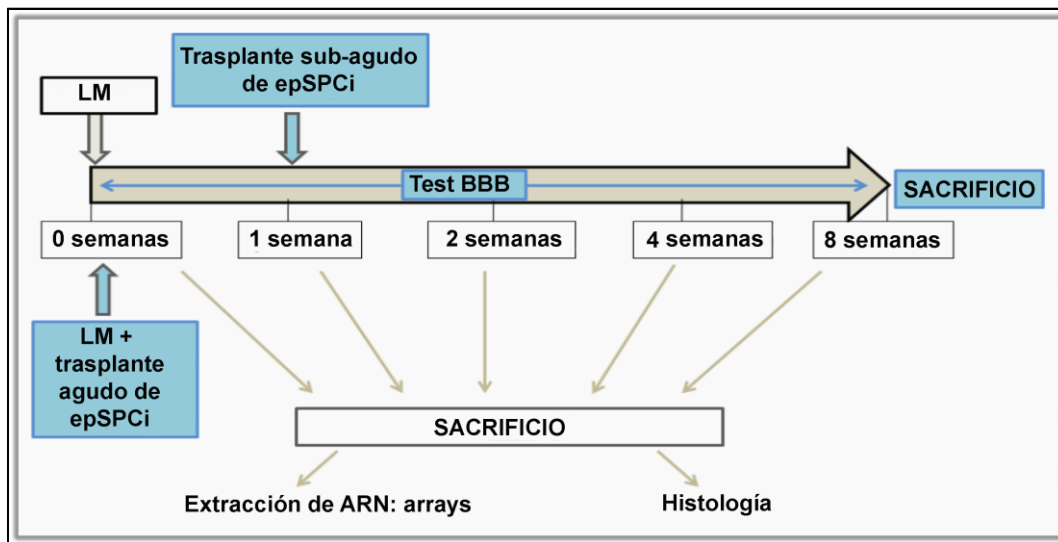


Figura 75. Esquema del procedimiento experimental.

El estudio bioinformático se realizó en colaboración con el Laboratorio de Biología de Sistemas, del departamento de Bioinformática, liderado por el Dr. Joaquín Dopazo. Se estudiaron los cambios de expresión génica (tanto incremento de la expresión génica o *up-regulation* como el descenso de la misma o *down-regulation*) a cada tiempo indicado tras LM en comparación con el grupo control aquellos genes estadísticamente diferentes entre los grupos comparados.

Se agruparon en distintos grupos funcionales mediante la aplicación FatiGO. Entre los grupos funcionales encontrados se seleccionan aquellos de mayor consistencia entre los grupos, como aquellos relacionados con la activación de la respuesta inmune y la inducción de apoptosis, necrosis y autofagia (resultados globales incluidos en el siguiente enlace:

4.7.2. Análisis de los procesos de apoptosis y autofagia.

Para la validación de los resultados obtenidos en el micro-array se estudiaron individualmente, por PCR cuantitativa, aquellos genes incluidos en el grupo funcional relacionado con autofagia, significativamente inducido tras LM: Atg5, Atg7, Atg12, Bcl2 y LC3 (**Figuras 76 y 77**).

Atg5 no mostró diferencias significativas tras LM y los grupos trasplantados tanto en fase aguda como en fase sub-aguda reducen sus niveles con respecto a sus controles.

La expresión de Atg7 disminuye significativamente en los animales lesionados al compararla con la de los animales control, y el trasplante sub-agudo de epSPCi

incrementa su expresión de forma significativa ($P < 0,005$) en comparación con los animales sacrificados en estadio sub-agudo.

La expresión de Atg12 se reduce significativamente en todos los grupos de lesión al compararlos con el grupo control. El grupo trasplantado en fase sub-aguda no recupera estos niveles, y de hecho reduce significativamente ($P < 0,005$) su expresión en comparación con el grupo control.

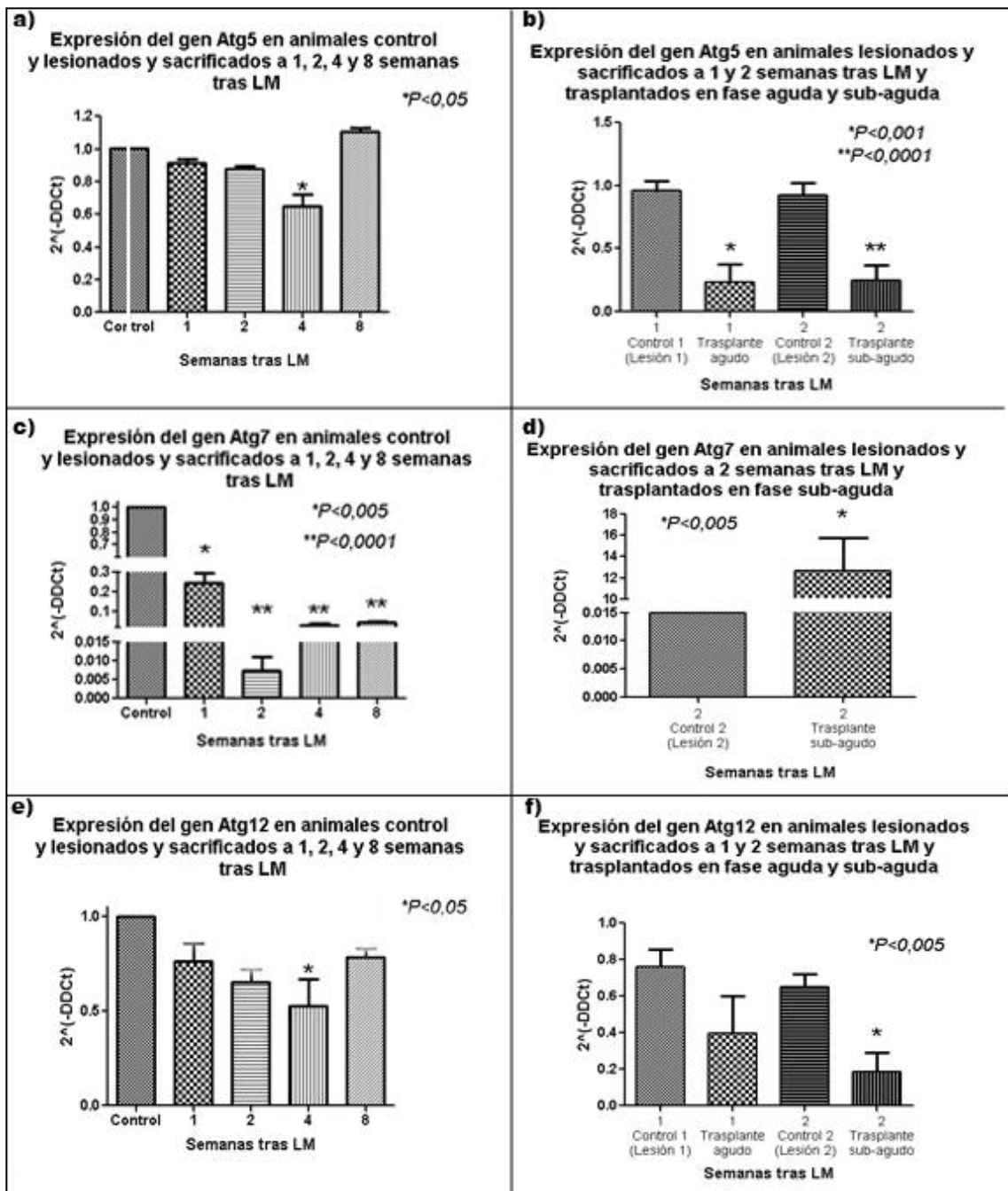


Figura 76. Expresión de los genes Atg5 (a, b), Atg7 (c, d) y Atg12 (e, f) implicados en la formación del fagóforo en la cascada de activación de apoptosis, en animales con LM aguda, sub-aguda y crónica y en animales trasplantados en fases aguda y sub-aguda.

La formación del autofagosoma depende de la expresión del gen LC3, por lo que su expresión resulta indispensable para que se dé el proceso de autofagia. Los resultados obtenidos por PCR muestran que la expresión de LC3 en LM en comparación con los individuos control aparece disminuida (**Figura 78**). La expresión de LC3 se recupera y aumenta significativamente en ambos grupos trasplantados, agudo y sub-agudo, recuperándose entonces la activación de la autofagia mediada por la formación del autofagosoma a través de la expresión del gen LC3.

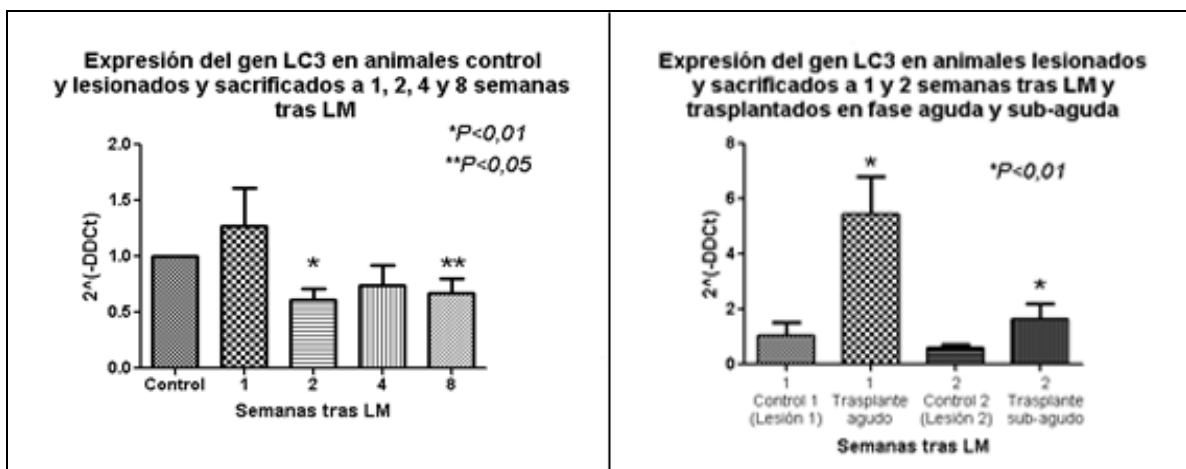


Figura 77. Expresión del gen LC3 implicado en la formación del autofagosoma en el proceso de autofagia, en animales con LM aguda, sub-aguda y crónica y en animales trasplantados en fases aguda y sub-aguda.

5- DISCUSIÓN

Capítulo 5: DISCUSIÓN

Los precursores neurales adultos (PNa) suponen una fuente de neuroregeneración endógena frente a enfermedades neurodegenerativas o LM. Meletis K. et al. (2008) y los resultados previos obtenidos en nuestro grupos de investigación (Moreno V. et al., 2009), demuestran que las epSPC son una fuente potencial de células precursoras en el trasplante tras LM. Aunque la capacidad neuroregenerativa de los PNa resulte escasa, el trasplante en mayor número de PN adultos, fetales o neonatales ha demostrado capacidad en restaurar parcialmente la función nerviosa (Ke Y. et al., 2006; Petrova E.S. et al., 2013; Drury-Stewart D. et al., 2013; Gelati M. et al., 2013).

Las células endimarias (epSPC) son capaces de diferenciarse a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. A pesar de que las epSPCi trasplantadas en forma de neuroesferas permanecen indiferenciadas o se diferencian únicamente a células gliales (Cao Q. et al., 2001), los antecedentes del grupo demostraron que tras el aislamiento en cultivo *in vitro* de células endimarias derivadas de una ME previamente lesionada (epSPCi), estas mostraban una tasa de proliferación significativamente mayor a las epSPC (Moreno V. et al., 2009) y eran capaces de restaurar la función locomotriz tras ser trasplantadas en fase aguda en individuos con LM. El objetivo de este trabajo es trasladar los buenos resultados obtenidos en el modelo agudo de trasplante celular de epSPCi a un modelo sub-agudo de trasplante, realizado una semana tras LM. El motivo de la elección de la terapia de trasplante celular de epSPCi reside en la intención de reemplazar el tejido medular dañado y perdido tras LM (fundamentalmente neuronas y oligodendrocitos), promoviendo al mismo tiempo el recrecimiento axonal mediante los factores tróficos que los precursores neurales adultos (PNa) (entre los que se encuentran las epSPC) secretan (NGF, factor de crecimiento nervioso; BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; GDNF, factor neurotrófico derivado de células gliales) (Lu P. et al., 2003).

Por otra parte, los precursores neurales de origen embrionario (PNe) también suponen una alternativa terapéutica celular en el tratamiento de LM debido a su capacidad pluripotente (son capaces de diferenciarse a líneas celulares derivadas de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo). Los PNe pueden ser cultivados eficientemente y mantener su potencial de diferenciación durante largo tiempo (Ko J.Y. et al., 2007). Sin embargo, los PNe también poseen desventajas como es la necesidad de instaurar una terapia inmunosupresora previa al trasplante de PNe (Preynat-Seauve O. et al., 2009); en nuestro estudio no se aplica terapia inmunosupresora tras el trasplante de epSPCi, lo que supone una ventaja frente al tratamiento con PNe (sin embargo, en la

práctica clínica humana se requeriría de terapia inmunosupresora en el paciente trasplantado ya que las células trasplantadas provendrían de un cadáver humano al requerirse una gran cantidad de tejido para aislar un gran número de células que solo podría obtenerse de este modo). Todo ello adicionado a la polémica ética generada sobre la utilización de PNe humanos hace que los PNe no sean la herramienta de terapia celular de primera opción para el tratamiento de LM.

Las células madre pluripotenciales inducidas (iPSC) suponen en la actualidad científica una alternativa en la terapia celular de la LM: la técnica de inducción a la pluripotencia celular consigue reprogramar células somáticas a células pluripotentes con capacidad de diferenciación a las tres capas germinales (Nakagawa M. et al., 2008 y 2010). Recientemente se han logrado reprogramar iPSC sin la utilización de vectores virales (Kaji K. et al., 2009; Soldner F. et al., 2009), fármacos selectivos (Yu J. et al., 2009) ni proteínas iPSC (Cho H. et al., 2010) que suponían la principal limitación en el empleo de este tipo celular, pero a pesar de ello la terapia de LM con estos métodos de reprogramación celular todavía cuenta con la desventaja de la tumorigenicidad (Okita K. et al., 2007; Wernig M. et al., 2008), la cual no está descrita en la terapia con epSPCi.

Mothe A.J. et Tator C.H. (2012) recogen en la siguiente tabla las ventajas e inconvenientes del empleo de la terapia celular con precursores neurales adultos en el tratamiento de LM:

VENTAJAS	INCONVENIENTES
No hay consideraciones éticas	Baja disponibilidad
	Difícil aislamiento
No provoca tumorigenicidad	Imposibilidad de donantes autólogos
	Potencial de diferenciación neural
Alta eficacia en numerosos ensayos pre-clínicos	No existen ensayos sobre seguridad en la aplicación humana

Tabla 14. Ventajas e inconvenientes de la utilización de precursores neurales adultos en el tratamiento de LM.

En la práctica clínica los pacientes lesionados medulares son sometidos, en orden de prioridad, a la estabilización hemodinámica, y si es necesario a una cirugía de descompresión medular, lo que implica un retraso en el potencial tratamiento inmediato, siendo por lo tanto la primera intervención en estadios sub-agudos. Los resultados

obtenidos mediante el análisis del test BBB muestran que el trasplante agudo favorece la recuperación de la actividad locomotora frente al trasplante sub-agudo, y que el trasplante sub-agudo favorece a su vez significativamente ($P < 0,05$) esta recuperación frente a los animales control (no trasplantados, sólo lesionados). No obstante, Parr A.M. et al. (2007) defienden que el trasplante sub-agudo de epSPC favorece más la viabilidad celular que el trasplante agudo, y que no existen diferencias en la mejora de la actividad funcional entre los animales trasplantados en fase aguda y no trasplantados a pesar de observarse migración celular desde la zona de trasplante hacia el epicentro de la LM, fenómeno que también observamos en nuestros resultados. En definitiva, la principal ventaja de realizar el trasplante celular en fase sub-aguda radica en que se realiza tras la primera fase de daño primario en que se da una infiltración masiva de células inflamatorias del sistema inmune, y por lo tanto el ambiente tóxico generado y la presencia de células fagocíticas serán menores que en fase aguda, proporcionando una mayor probabilidad de supervivencia a las células trasplantadas.

La autofagia es un mecanismo catabólico necesario para el mantenimiento de una buena función celular, encargado de eliminar la acumulación de sustancias u orgánulos anormales en el medio intracelular. Los resultados obtenidos tras el análisis de la expresión génica ligada a procesos autofágicos (mediante el análisis de la expresión de LC3, necesaria para la formación del autofagosoma) se corresponde con los resultados defendidos por otros autores (Ribas V.T. et al., 2014; Zhang Q. et al., 2014): los niveles de LC3 incrementan en fase aguda de LM. Sin embargo, Hou H. et al. (2014) defienden que los niveles de expresión de este gen disminuyen a partir de 21 días tras LM mientras que en nuestros resultados se observa una disminución desde la segunda semana post-LM, y Tanabe F. et al. (2011) identifican en sus experimentos de LM crónica un aumento de LC3 inducido por estrés hipóxico. Por otra parte, la autofagia juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis en las células trasplantadas e incluso se ha descrito un efecto neuroprotector de la misma (Tanabe F. et al., 2011; Tang P. et al., 2014); los resultados obtenidos en animales trasplantados se corresponden con los defendidos por Song C. et al., (2014): la expresión de LC3 aumenta tras el trasplante celular agudo ya que todavía existen procesos oxidativos derivados de la LM que resultan tóxicos para las células trasplantadas, mientras que en fase sub-aguda de trasplante la expresión de la autofagia mediada por LC3 disminuye. Sin embargo, Sun L. et al. (2014) demuestran que la expresión de LC3 (evaluada por Western-Blotting) decae tras el trasplante en fase aguda.

La expresión de los genes Atg5, Atg7 y Atg12 también contribuye a la formación del fagóforo en las fases tempranas de la formación de la autofagia. Ribas V.T. et al. (2014) observan un incremento de Atg5 y Atg7 en fase aguda de LM, mientras que nuestros resultados sólo expresan un incremento de Atg7. En nuestros resultados, los niveles de expresión de los tres genes estudiados son mayores en la fase aguda de lesión que en la sub-aguda y crónica.

Debido a la complejidad de los eventos fisiopatológicos que convergen tras LM, terapias combinatorias de trasplante celular y terapia farmacológica serían más efectivas en el tratamiento de esta patología que la aplicación de una sola terapia. Nuno A. Silva et al., (2014) recogen diferentes posibilidades de terapias combinatorias enfocadas al tratamiento de LM, como el trasplante de células madre de origen humano (HSC) en combinación con vacuna de mielina en el tratamiento de LM aguda que consigue una disminución del epicentro de la lesión, reducción del componente inflamatorio y una mejora de la función locomotora (Ziv Y. et al., 2006), o la combinación del trasplante de PN con la administración de bFGF en el tratamiento de LM sub-aguda consiguiendo una mejora locomotora y electrofisiológica (Meng et al., 2008).

Con el objetivo de elucidar un tratamiento farmacológico efectivo que pueda ser empleado en sinergia con el trasplante celular de epSPCi, se decidió investigar sobre la capacidad neuroprotectora de la curcumina. Se trata de un pigmento derivado de *Curcuma longa* con poder cicatricial, neuroprotector, antioxidante y antiinflamatorio (entre otros) (Aggarwal B.B. and Shishodia S., 2004), utilizado en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Mu Y. et al., 2012). Recientemente, Zu J. et al. (2014), han demostrado la capacidad de la curcumina en la reducción del edema derivado de LM mediante la inhibición de la cascada de señalización JAK/STAT, mejorando así la recuperación funcional tras LM.

A pesar de los grandes beneficios de este compuesto, también presenta algunas desventajas entre las que destacan su baja hidrosolubilidad y biodisponibilidad debidas a su rápida metabolización, que limitan su empleo en el tratamiento de LM y mediante vías de administración sistémica: intravenosa, intraperitoneal u oral (Gryniewicz G. and Ślifirski P. et al., 2012). A estas limitaciones del compuesto hay que sumarle el edema y la pérdida de la BHE que se producen tras LM, los cuales dificultan todavía más la acción y distribución de la curcumina. Por otra parte, a pesar de su extensa capacidad terapéutica en modelos *in vivo*, la citotoxicidad de la curcumina libre administrada a altas dosis ha

sido probada en diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* (Clutterbuck A.L. et al., 2008; Hollborn M. et al., 2013). Sin embargo, y aunque la citotoxicidad de la curcumina supone una limitación en la mayoría de los frentes terapéuticos (en los propios resultados del presente estudio se observa la citotoxicidad de la curcumina libre a dosis superiores a 10 μ M en cultivos *in vitro* de epSPC), esta citotoxicidad ha resultado de gran interés terapéutico en el campo de la oncología en el tratamiento de células quimioresistentes (Thongrakard V. et al., 2014).

Diversos autores han tratado de solventar las principales limitaciones de la curcumina (su escasa biodisponibilidad e hidrosolubilidad) mediante la aplicación de técnicas nanotecnológicas que alteran la presentación original de la molécula como la encapsulación del compuesto (Krausz A.E. et al., 2014) o nanoemulsiones de acetato (Shukla P. et al., 2014). El laboratorio de Polímeros Terapéuticos del Centro de Investigación Príncipe Felipe realizó la conjugación de la molécula de curcumina con el polímero PEG-PA para la innovadora administración local única en el espacio subaracnoideo que se propone en este estudio. De este modo se ha logrado establecer una cinética de liberación prolongada (con un pico máximo de distribución a las 24h de la administración) del principio activo de la curcumina en el lugar de la lesión no descrita anteriormente (el medio ácido generado tras LM hidroliza las uniones acetal entre la curcumina y el PEG-PA), aumentando su acción terapéutica y al mismo tiempo su solubilidad y biodisponibilidad a lo largo de una semana desde su administración. Dada la conocida citotoxicidad de la curcumina libre, previamente al estudio *in vivo* se realizó un estudio de citotoxicidad *in vitro* que demostró que el conjugado PEG-PA_Curcumina a las mismas altas dosis en que la curcumina libre resulta tóxica (10 μ M), el polímero PEG-PA_Curcumina mejora significativamente la supervivencia celular ($P < 0,001$), evidenciando las ventajas del empleo del conjugado. Además, los resultados evidencian la capacidad neuroprotectora de la curcumina ya que favorece la viabilidad celular de precursores neurales a dosis inferiores a 1 μ M.

El efecto neuroprotector de la curcumina es defendido por diversas fuentes (Srivastava P. et al., 2014), y esta neuroprotección se observa también en nuestros resultados: los animales tratados con el polímero PEG-PA_Curcumina preservan mayor cantidad de tejido medular, evidenciado por un menor número de quistes en comparación con los animales habiendo recibido el vehículo (PEG-PA). Por otra parte, se asocia la mayor recuperación funcional analizada por la escala BBB en los animales tratados con PEG-PA_Curcumina al efecto neuroprotector de la curcumina (Yao M. et al., 2014). El marcaje de β -Tubulina indicativo de preservación de células neurales y el de GFAP

indicativo de cicatriz glial, acorde a los resultados observados tras el análisis inmunohistoquímico, sugiere que la mayor preservación de células neurales y la menor área de cicatriz glial observadas en animales tratados con PEG-PA_Curcumina están ligadas a la mejor recuperación funcional (evaluada por el test BBB) que estos animales muestran en comparación con los tratados con el vehículo PEG-PA.

Los resultados obtenidos en la terapia celular de trasplante de epSPCi en fase aguda y sub-aguda junto con los obtenidos tras la innovadora administración única y local mínimamente invasiva del nanofármaco PEG-PA_Curcumina tras LM aguda, abren las puertas a la futura aplicación sinérgica de terapia celular y nanomedicina en el rescate funcional de LM, aunque todavía se requiere de estudios experimentales para la validación del potencial efecto sinérgico del tratamiento combinado.

6- CONCLUSIONES

Capítulo 6: CONCLUSIONES

1- Los nanoconjugados poliméricos de PEG-PA_Curcumina no presentan citotoxicidad a altas dosis en los cultivos de epSPC y por lo tanto suponen una alternativa al tratamiento con curcumina libre.

2- El tratamiento intratecal único con el polímero PEG-PA_Curcumina inmediatamente tras LM favorece una mayor y más temprana recuperación funcional en comparación con los animales tratados únicamente con el vehículo PEG-PA.

3- La preservación del tejido nervioso es mayor en los animales tratados con PEG-PA_Curcumina que en los animales control un mes después de LM, confiriendo propiedades neuroprotectoras al polímero PEG-PA_Curcumina.

4- El tratamiento agudo con el polímero PEG-PA_Curcumina reduce la formación de la cicatriz glial tras LM.

5- El tratamiento con el polímero PEG-PA_Curcumina reduce la activación de los fenómenos de apoptosis tras LM.

6- La administración del conjugado PEG-PA_Curcumina provoca la disminución del componente inflamatorio generado tras LM, confiriendo propiedades antiinflamatorias al conjugado de curcumina.

7- El trasplante sub-agudo de epSPCi, una semana tras LM, favorece la recuperación funcional frente a animales no trasplantados y sólo lesionados a las 2 semanas tras LM.

8- Las células epSPCi trasplantadas en fase sub-aguda en los animales lesionados migran hacia el epicentro de la lesión, pero no reducen de forma significativa la extensión de la cicatriz glial.

9- La actividad apoptótica se sobre-expresa en la fase aguda de LM comprometiendo la supervivencia y diferenciación celular.

10- Tanto el trasplante agudo como sub-agudo expresan actividad anti-apoptótica, sugiriendo que existe un mecanismo de protección celular debido al trasplante celular.

11- El trasplante de epSPCi, en fases aguda y sub-aguda, induce la activación de la autofagia.

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Capítulo 7: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott N.J., Rönnbäck L. and Hansson E. (2006). **Astrocyte-endothelial interactions** at the **blood-brain barrier**. *Nature Reviews. Neuroscience*, **1**, 41-53.

Aggarwal B.B. and Shishodia S. (2004). Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. *Annals of the New York academy of sciences*, **1030**, 434-441.

Aggarwal B.B., Sundaram C., Malani N. and Ichikawa H. (2007). Curcumin: the Indian solid gold. *Advances in experimental medicine and biology*, **595**, 1-75.

Aggarwal B.B. and K.B. Harikumar (2009). Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **41**, 40-59.

Alfaro-Cervello C., Cebrián-Silla A., Soriano-Navarro M., García-Tárraga P., Matías-Guiu J., Gómez-Pinedo U., Molina-Aguilar P., Álvarez-Buylla A., Luquin M.R. And García-Verdugo J.M. (2014). The adult macaque spinal cord central canal zone contains proliferative cells and closely resembles the human. *The Journal of comparative neurology*, **8**, 1800-1817.

Altman J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, **3509**, 1127-1128.

Altman J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *The anatomical record*, **145**, 573-591.

Bacha W.J. and Bacha L.M. (2001). Atlas color de histología veterinaria, 2ª edición, *Inter-médica*.

Bansal S.S., Vadhanam M.V. and Gupta R.C. (2011). Development and *in vitro-in vivo* evaluation of polymeric implants for continuous systemic delivery of curcumin. *Pharm Res*, **28**, 1121-1130.

Bar-Sela G., Epelbaum R. and Schaffer M. (2010). Curcumin as an anti-cancer agent: review of the gap between basic and clinical applications. *Current medicinal chemistry*, **17**, 190-197.

Barnabé-Heider F., Göritz C., Sabelström H., Takebayashi H., Pfrieger F.W., Meletis K. and Frisén J. (2010). Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell stem cell*, **4, 470-482.**

Basnel P. and Skalko-Basnet N. (2011). Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules*, **16**, 4567-4598.

Basso D.M., Beattie M.S. And **Bresnahan J.C.** (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of neurotrauma*, **1**, 1-21.

Bito H., Furuyashiki T., Ishihara H., Shibasaki Y., Ohashi K., Mizuno K., Maekawa M., Ishizaki T. and Narumiya S. (2000). A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron*, **2**, 431-441.

Bombardier C.H., Williams R.T., Wilson C.S., Heinemann A.W., Lazowski L.E. and Fann J.R. (2014). Identifying depression severity risk factors in persons with traumatic spinal cord injury. *Rehabilitation psychology*, **1**, 50-56.

Borre Y.E., Panagaki T., Koelink P.J., Morgan M.E., Hendriksen H., Garssen J., Kraneveld A.D., Olivier B. and Oosting R.S. (2013). Neuroprotective and cognitive enhancing effects of a multi-targeted food intervention in an animal model of neurodegeneration and depression. *Neuropharmacology*, **79**, 738-749.

Botero L., Gómez R. y Chaparro O. (2013). Patogenia de la lesión medular y mecanismos de reparación inducidos por las células de la glía envolvente olfatoria. *Revista de neurología*, **56**, 521-531.

., Collins W.F., Freeman D.F., Shepard M.J., Wagner F.W., Silten R.M., Hellenbrand K.G., Ransohoff J., Hunt W.E., Perot P.L. Jr., et al. (1984). **Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury.** *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, **1**, 45-52.

Braugher J.M. (1985). Lipid peroxidation-induced inhibition of gamma-aminobutyric acid uptake in rat brain synaptosomes: protection by glucocorticoids. *Journal of neurochemistry*, **4**, 1282-1288.

Cameron I.D., Middleton J.W., Simpson G.K., De Wolf A., Quirk R. and Descallar J. (2014). Psychological distress, quality of life, and burden in caregivers during community reintegration after spinal cord injury, *Archives of physical medicine and rehabilitation*, **7**, 1312-1319.

Cao, Q.-I., Zhang, Y.P., Howard, R.M., Walters, W.M., Tsoulfas, P., Whittemore, S.R., 2001. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Experimental Neurology*, **167**, 48–58.

Cemil B., K. Topuz, M.N. Demircan, G. Kurt, K. Tun, M. Kutlay, O. Ipcioglu and Z. Kucukodaci (2010). Curcumin improves early functional results after experimental spinal cord injury. *Acta Neurochirurgica*, **152**, 1583-1590.

Chen D., Lian S., Sun J., Liu Z., Zhao F., Jiang Y., Gao M., Sun K., Liu W. and Fu F. (2014). Design of novel multifunctional targeting nano-carrier drug delivery system based on CD44 receptor and tumor microenvironment pH condition, *Drug delivery*, **3**, 1-6.

Chhunchha B., Fatma N., Kubo E., Rai P., Singh S.P. and Singh D.P. (2013). Curcumin abates hypoxia-induced oxidative stress based-ER stress-mediated cell death in mouse hippocampal cells (HT22) by controlling Prdx6 and NF-κB regulation. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, **7**, 636-655.

Chiu S., Terpstra K.J., Bureau Y., Hou J., Raheb H., Cernvosky Z., Badmeav V., Copen J., Husni M. and Woodbury-Farina M. (2013). Liposomal-formulated curcumin [Lipocurc™] targeting HDAC (histone deacetylase) prevents apoptosis and improves motor deficits in Park 7 (DJ-1)-knockout rat model of Parkinson's disease: implications for epigenetics-based nanotechnology-driven drug platform. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, **7**, 10-20.

Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, Paek JS, Lee SH, Hur J, Lee EJ, Roh TY, Chu IS, Leem SH, Kim Y, Kang HJ, Park YB and Kim HS. (2010). Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation, *Bood*, **3**, 386-395.

Clutterbuck AL, Allaway D, Harris P and Mobasheri A. (2013). Curcumin reduces prostaglandin E2, matrix metalloproteinase-3 and proteoglycan release in the secretome of interleukin 1B-treated articular cartilage, *F1000Research* Version2, **147**, 10.12688/f1000research.2-147.v2.

Corvetti L. and Rossi F. (2005). Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans induces sprouting of nontactin purkinjenaxons in the cerebellum of the adult rat. *The Journal of Neuroscience*, **31**, 7150-7158.

Crowe M.J., Bresnahan J.C., Shuman S.L., Masters J.N. And **Beattie M.S.** (1997). **Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys.** *Nature medicine*, **1**, 73-76.

Daimon C.M., Chirdon P., Maudsley S. and Martin B. (2013). The role of Thyrotropin Releasing Hormone in aging and neurodegenerative diseases, *American journal of alzheimer disease (Columbia)*, **1**, 10.7726/ 2013.1003.

Dey S. and Sreenivasan K. (2014). Conjugation of curcumin onto alginate enhances aqueous solubility and stability of curcumin, *Carbohydrate polymers*, **99**, 499-507.

Dickendeshler T.L., Baldwin K.T., Mironova Y.A., Koriyama Y., Raiker S.J., Askew K.L., Wood A., Geoffroy C.G., Zheng B., Liepmann C.D., Katagiri Y., Benowitz L.I., Geller H.M. and Giger R.J. (2012). **NgR1** and **NgR3** are **receptors** for **chondroitin sulfate proteoglycans**. *Nature neuroscience*, **5**, 703-712.

Doggui S., Belkacemi A., Paka G.D., Perrotte M., Pi R. and Ramassamy C. (2013). Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways. *Molecular nutrition and food research*, **9**, 1660-1670.

Domeniconi M., Cao Z., Spencer T., Sivasankaran R., Wang K., Nikulina E., Kimura N., Cai H., Deng K., Gao Y., He Z. and Filbin M. (2002). Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth, *Neuron*, **2**, 283-290.

Donnelly D.J. and Popovich P.G. (2008). Inflammation and its role inneuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury, *Experimental Neurology*, **2**, 378-388.

Dergham P., Ellezam B., Essagian C., Avedissian H, Lubell W.D. and McKerracher L. (2002). Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair, *The Journal of Neuroscience*, **15**, 6570-6577.

Drury-Stewart D., Song M., Mohamad O., Guo Y., Gu X., Chen D. and Wei L. (2013), Highly efficient differentiation of neural precursors from human embryonic stem cells and benefits of transplantation after ischemic stroke in mice, *Stem Cells research and therapy*, **4**, 93.

Dvorak M.F., Noonan V., Fallah N., Pisher C.G., Rivers C.S., Ahn H., Tsai E.C., Linassi G., Christie S., Attabib N., Hurlbert R.J., Fournay D.R., Johnson M.G., Fehlings M., Drew B., Bailey C., Paquet J., Parent S., Townson A., Ho .C, Craven B.C., Gagnon D., Tsui D., Fox R., Mac-Thiong J.M. And Kwon B.K. (2014). Minimizing errors in acute traumatic spinal cord injury trials by acknowledging the heterogeneity of spinal cord anatomy and injury severity: An observational Canadian cohort analysis. *Journal of Neurotrauma*, **31**.

Erceg S., Láinez S., Ronaghi M., Stojkovic P., Pérez-Aragó M.A., Moreno-Manzano V., Moreno-Palanques R., Planells-Cases R. and Stojkovic M. (2008). Differentiation of

human **embryonic stem cells** to **regional specific neural precursors** in **chemically defined medium conditions**. *PLoS One*, **5**, 10.1371/0002122.

Fawcett J.W. and Asher R.A. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain research bulletin*, **6**, 377-391.

Franklin R.J., Zawadzka M., Rivers L.E., Fancy S.P., Zhao C., Tripathi R., Jamen F., Young K., Goncharevich A., Pohl H., Rizzi M., Rowitch D.H., Kessler N., Suter U. And Richardson W.D. (2010). CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell*, **6**, 578-590.

Franzblau L. and Chung K.C. (2014). Psychosocial outcomes and coping after complete avulsion traumatic brachial plexus **injury**. *Disability and rehabilitation*, 10.3109/09638288.

Freire M.A. (2012). Pathophysiology of neurodegeneration following traumatic brain injury, *The west indian medical journal*, **7**, 751-755.

Gage G.J., Kipke D.R. and Shain W. (2012). Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, **65**, 10.3791/3564.

Gage F.H., Thuret S. and Moon L. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature reviews Neuroscience*, **7**, 628-643.

Garcia-Bennett A.E., König N., Abrahamsson N., Kozhevnikova M., Zhou C., Trolle C., Pankratova S., Berezin V. and Kozlova E.N. (2014). In vitro generation of motor neuron precursors from mouse **embryonic stem cells** using mesoporous nanoparticles. *Nanomedicine*, 0.2217/ 14.23.

Gelati M., Profico D., Progetti-Pensi M., Muxi G., Sgaravizzi G. And Vescovi A.L. (2013). Culturing and expansion of “clinical grade” precursors cells from the fetal human central nervous system, *Methods in molecular biology*, 10.1007/978-1-62703-574-3_6.

Gopinath D., M. Rafiuddin Ahmed, K. Gomathi, K. Chitra, P.K. Sehgal and R. Jayakumar (2003). Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials*, **25**, 1911-1917.

Görütz C., Dias D.O., Tomilin N., Barbacid M., Shupliakov O. and Frisé J. (2011). A **pericyte origin** of **spinal cord scar tissue**. *Science*, **6039**, 238-242.

Gryniewicz G. and P. Ślifirski (2012). Curcumin and curcuminoids in quest for medical status. *Biochimica Polonica*, **59**, 201-212.

Guérout N., Li X. and Barnabé-Heider F. (2014). Cell fate control in the developing central nervous system. *Experimental cell research*, **1**, 77-83.

Hall E.D. and Braughler J.M. (1984). Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury: a review and therapeutic rationale. *Surgical neurology*, **5**, 320-327.

Hall E.D. and Springer J.E. (2004). Neuroprotection and Acute Spinal Cord Injury: A Reappraisal. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, **1**, 80-100.

Hall E.D., R.A. Vaishnav, and A.G. Mustafa (2011). Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, **7**, 1000-1016.

Hamilton L.K., Truong M.K., Bednarczyk M.R., Aumont A. and Fernandes K.J. (2009). Cellular organization of the **central canal ependymal zone**, a **niche** of latent neural **stem cells** in the adult mammalian **spinal cord**. *Neuroscience*, **3**, 1044-1056.

Hasima N. and Aggarwal B.B. (2012). Cancer-linked targets modulated by curcumin, *International journal of biochemistry and molecular biology*, **4**, 328-351.

Herebian D., Choi J.H., Abd El-Aty A.M., Shim J.H. and Spitteller M. (2009). Metabolite analysis in *Curcuma domestica* using various GC-MS and LC-MS separation and detection techniques, *Biomedical chromatography*, **9**, 951-965.

Hollborn M., R. Chen, P. Wiedemann, A. Reichenbach, A. Bringmann and L. Kohen (2013). Cytotoxic Effects of Curcumin in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Plosone*, **8**, 10.1371/0059603.

Holly L.T., Blaskiewicz D., Wu A., Feng C., Ying Z. and Gomez-Pinilla F. (2012). Dietary therapy to promote neuroprotection in chronic spinal cord injury. *Journal of neurosurgery*, **17**, 134-140.

Hoppe J.B., Haag M., Whalley B.J., Salbego C.G. and Cimarosti H. (2013). Curcumin protects organotypic hippocampal slice cultures from A β 1-42-induced synaptic toxicity. *Toxicology In Vitro*, **8**, 2325-2330.

Hou H., Zhang L., Zhang L. and Tang P. (2014). Acute **spinal cord injury** in rats should target activated autophagy. *Journal of neurosurgery. Spine*, 10.3171/2014.1.SPINE13237.

Hsu H.Y. and Hsu C.S. (1980). Commonly used chinese herb formulas with illustrations. Oriental healing arts institute.

Hsu Y.Y., Jong Y.J., Tseng Y.T., Hsu S.H. and Lo Y.C. (2014). Nanomolar naloxone attenuates neurotoxicity induced by oxidative stress and survival motor neuron protein deficiency, *Neurotoxicity research*, **3**, 262-270.

Hugnot J.P. and Franzen R. (2011). The spinal cord ependymal region: a stem cell niche in the caudal central nervous system. *Frontiers in bioscience*, **16**, 1044-1059.

Ihrle R.A. and **Alvarez-Buylla A.** (2011). Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron*, **4**, 674-686.

Jeong H.J., Lee S.H., Cho S.Y., Lee C.S., Jeong C.W., Yoon M.H. and Kim W.M. (2011). Roles of serotonergic and adrenergic receptors in the antinociception of selective cyclooxygenase-2 inhibitor in the rat spinal cord, *Korean Journal of pain*, **4**, 179-184.

Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L., Risling M., Lendahl U. and Frisén J. (1999). **Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system.** *Cell*, **1**, 25-34.

Kandel E.R., Schwartz J. and Jessell T. (2000). Principles of neural science, 4^a Edición, *McGraw Hill*.

Ke Y., Chi L., Xu R., Luo C., Gozal D. And Liu R. (2006). Early response of endogenous adult neural progenitor cells to acute spinal cord injury in mice, *Stem Cells*, **4**, 1011-1019.

Keane M. and O'Toole M.T. (2003). Miller-Keane Encyclopedia & Dictionary of Medicine, Nursing & Allied Health, 7^a edición, *Saunders*.

Kim C.Y., Bordenave N., Ferruzzi M.G., Safavry A. and Kim K.H. (2011). Modification of curcumin with polyethylene glucol enhances the delivery of curcumin in preadipocytes and its antiadipogenic property, *Journal of agricultural and food chemistry*, **3**, 1012-1019.

Kim K.T., Kim M.J., Cho D.C., Park S.H., Hwang J.H., Sung J.K., Cho H.J. and Jeon Y. (2014). The Neuroprotective Effect of Treatment with Curcumin in Acute Spinal Cord Injury: Laboratory Investigation. *Neurologia medico-chirurgica*, 10.2176/0251.

Ko J.Y., Park C.H., Koh H.C., Cho Y.H., Kyhm J.H., Kim Y.S., Lee I., Lee Y.S. and Lee S.H. (2007). Human embryonic stem cell-derived neural precursors as a continuous, stable, and on-demand source for human dopamine neurons, *Journal of neurochemistry*, **4**, 1417-1429.

Konig N., Trolle C., Kapuralin K., Adameyko I., Mitrecic D., Aldskogius H., Shortland P.J. and Kozlova EN. (2014). Murine neural crest **stem cells** and **embryonic stem cell-**

derived neuron precursors survive and differentiate after transplantation in a model of dorsal root avulsion. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 10.1002/1893.

Konwarh R., Saikia J.P., Karak N. and Konwar B.K. (2010). 'Poly(ethylene glycol)-magnetic nanoparticles-curcumin' trio: directed morphogenesis and synergistic free-radical scavenging, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 2, 578-586.

Krames E.S. (2014). The Role of the Dorsal Root Ganglion in the Development of Neuropathic Pain. *Pain medicine*, 10.1111/ 12413.

Krausz AE, Adler BL, Cabral V, Navati M, Doerner J, Charafeddine R³, Chandra D, Liang H, Gunther L, Clendaniel A, Harper S, Friedman JM, Nosanchuk JD and Friedman AJ. (2014). **Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent, *Nanomedicine*, 14, 10.1016/2014.09.004.**

Kreutz F., Scherer E.B., Ferreira A.G., Petry Fdos. S., Pereira C.L., Santana F., de Souza Wyse A.T., Salbego C.G. and Trindade V.M. (2013). Alteration on Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities induced by amyloid-B peptide in rat brain and GM1 ganglioside neuroprotective action, *Neurochemical research*, 11, 2342-2350.

Kuncl R.W., Rothstein J.D. and Martin L.J. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis, *The New England Journal of Medicine*, 22, 1464-1468.

Kurien B.T., Singh A., Matsumoto H. and Scofield R.H. (2007). Improving the solubility and pharmacological efficacy of curcumin by heat treatment. *Assay and Drug Development Technologies*, 5, 567-576.

Kurt G., Yildirim Z., Cemil B., Celtikci E. and Kaplanoglu G.T. (2014). Effects of curcumin on acute spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Journal of neurosurgery*, 10.3171/1312.

Kuvacheva N.V., Salmina A.B., Komleva Y.K., Malinovskaya N.A., Morgun A.V., Pozhilenkova E.A., Zamai G.S., Yauzina N.A. and Petrova M.M. (2013). Permeability of the hematoencephalic barrier in normalcy, brain development pathology and neurodegeneration. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*, 4, 80-85.

Lee H. (2013). Effects of co-administration of **intrathecal** nociceptin/orphanin FQ and opioid antagonists on formalin-induced pain in rats. *Yonsei medical journal*, 3, 763-771.

Lemke M. and **Faden A.I.** (1990). Edema development and **ion** changes in rat **spinal cord** after impact trauma: **injury** dose-response studies. *Journal of neurotrauma*, **1**, 41-54.

Li J., Y. Wang, C. Yang, P. Wang, D.K. Oelschlager, Y. Zheng, D. Tian, W.E. Grizzle, D.J. Buchsbaum and M. Wan (2009). PEGylated Curcumin Conjugate Inhibits Pancreatic Cancer Cell Growth through Inactivation of Jab1. *Molecular Pharmacology Fast Forward*, **76**, 81-90.

Li X. and **Jin P.** (2010). Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity. *Nature reviews. Neuroscience*, **5**, 329-338.

Li Y., Y. Zhang, D. Liu, H. Liu, W. Hou and Y. Dong (2013). Curcumin attenuates diabetic neuropathic pain by downregulating TNF-alpha in a rat model. *International Journal of Medical Sciences*, **10**, 377-381.

Lin M.S., Y.Y. Sun, W.T. Chiu, C.C. Hung, C.Y. Chang, F.S. Shie, S.H. Tsai, J.W. Lin, K.S. Hung and Y.H. Lee (2011). Curcumin Attenuates the Expression and Secretion of RANTES after Spinal Cord Injury In Vivo and Lipopolysaccharide-Induced Astrocyte Reactivation In Vitro. *Journal of Neurotrauma*, **28**, 1259-1269.

Liu Z., Xing S. and Zhang W. (2013). Neuroprotective effect of curcumin on spinal cord in rabbit model with ischemia/ reperfusion. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, **36**, 147-152.

Lu, P., Jones, L.L., Snyder, E.Y., Tuszynski, M.H., 2003. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, **181**, 115–129.

Lu X.M., Shu Y.H., Qiu C.H., Chen K.T. and Wang Y.T. (2014). Protective effects and anti-apoptotic role of nerve growth factor on spinal cord neurons in sciatic nerve-injured rats. *Neurological research*, 10.1179/1743132814Y.

Ma L., Zhang D., Chen W., Shen Y., Zhang Y., Ding W., Zhang W., Wang L. and **Yang D.** (2014). Correlation between magnetic resonance T2 image signal intensity ratio and cell **apoptosis** in a rabbit **spinal cord** cervical myelopathy model. *Chinese medical journal*, **2**, 305-313.

Ma Z., Shayeganpour A., Brocks D.R., Lavasarifar A. and Samuel J. (2007). High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin, *Biomedical chromatography*, **5**, 546-552.

Madersbacher G. and Oberwalder M. (1987). The elderly para- and tetraplegic: special aspects of the urological care. *Paraplegia*, **4**, 318-323.

Maju S. and Sreenivasan K. (2011). Gold nanoparticles generated and stabilized by water soluble curcumin-polymer conjugate: blood compatibility evaluation and targeted drug delivery onto cancer cells, *Journal of colloid and interface science*, **1**, 144-151.

McKerracher L. and Winton M.J. (2002). Nogo on the go. *Neuron*, **3**, 345-348.

McTigue D.M., Tripathi R. and Wei P. (2006). NG2 colocalizes with axons and is expressed by a mixed cell population in spinal cord lesions, *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **4**, 406-420.

Meletis K., Barnabé-Heider F., Carlén M., Evergren E., Tomilin N., Shupliakov O. and Frisén J. (2008). Spinal cord reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biology*, **7**, 10.1371/0060182.

Meng J., Li Y., Camarillo C., Yao Y., Zhang Y., Xu C. and Jiang L. (2014). The Anti-Tumor Histone Deacetylase Inhibitor SAHA and the Natural Flavonoid Curcumin Exhibit Synergistic Neuroprotection against Amyloid-Beta Toxicity. *Plos One*, **9**, 10.1371/0085570.

Meng XT, Li C, Dong ZY, Liu JM, Li W, Liu Y, Xue H and Chen D. (2008). Co-transplantation of bFGF-expressing amniotic epithelial cells and neural stem cells promotes functional recovery in spinal cord-injured rats, *Cell biology international*, **12**, 1546-1558.

Miłobędzka J., Kostanecki S. y Lampe W. (1910). Zur Kenntnis des Curcumin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **43**, 2163-2170.

Mirzadeh Z., Doetsch F., Sawamoto K., Wichterle H. and Álvarez-Buylla A. (2010). The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow. *The Journal of Visualized Experiments: JoVE*, **39**, 10.3791/1938.

Monni E., Cusulin C., Cavallaro M., Lindvall O. and Kokaia Z. (2014). Human Fetal Striatum-Derived Neural **Stem (NS) Cells** Differentiate to Mature Neurons in Vitro and in Vivo. *Current stem cell research & therapy*, **9**, 338-346.

Moreno-Manzano V., Rodríguez-Jiménez F.J., García-Roselló M., Laínez S., Erceg S., Calvo M.T., Ronaghi M., Lloret M., Planells-Cases R., Sánchez-Puelles J.M., Stojkovic M. (2009). Activated spinal cord ependymal stem cells rescue neurological function. *Stem Cells*, **3**, 733-743.

Mothe AJ. And Tator CH. (2012). Advances in stem cell therapy for spinal cord injury, *The journal of clinical investigation*, **11**, 3824-3834.

Mousavi M.E., Arazpour M., Bani M.A., Hutchins S.W., Curan S. And Javanshir M.A. (2013). Influence of orthotic gait training with powered hip orthosis in walking in paraplegic patients. *Disability and Rehabilitation. Assistive Technology*, 3, 226-230.

Mueller B.K., H.Mack and N.Teusch (2005). Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 387-398.

Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochiduki Y., Takizawa N. and Yamanaka S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts, *Nature biotechnology*, 1, 101-106.

Nakagawa M. and Yamanaka S. (2010). Reprogramming of somatic cells to pluripotency, *Advances in experimental medicine and biology*, 695, 215-224.

Nguyen P.D., Hollway G.E., Sonntag C., Miles L.B., Hall T.E., Berger S., Fernandez K.J., Guverich D.B., Cole N.J., Alaei S., Ramialison M., Sutherland R.L., polo J.M. Lieschke G.J. and Curie P.D. (2014). Haematopoietic stem cell induction by somite-derived endothelial cells controlled by meox1, *Nature*, 7514, 314-318.

Noback C.R. and Shriver J.E. (1966). Some concepts of developmental neurology as applied to the extremities. *Bulletin of the Hospital of Joint Diseases*, 2, 59-75.

Nogueira A.B., Sogayar M.C., Colquhoun A., Siqueira S.A., Nogueira A.B., Marchiori P.E. and Texeira M.J. (2014). Existence of a potential neurogenic system in the adult human brain. *Journal of translational medicine*, 10.1186/1479-5876-12-75.

Nuno A. Silva, Nuno Sousa, Rui L. Reis, Antonio J. Salgado (2014). From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in Neurobiology*, 114, 25–57

O'Maley J., Woltjen K. and Kaji K. (2009). New strategies to generate induced pluripotent stem cells, *current opinion in biotechnology*, 5, 516-521.

Oaklander A.L. (2012). Common neuropathic itch syndromes. *Acta dermatovenereologica*, 2, 118-125.

Okita K, Ichisaka T and Yamanasa S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells, *Nature*, 7151, 313-317.

Ormond R., H. Peng, R. Zeman, K. Das, R. Murali, and M. Jhanwar-Uniyal (2012). Recovery from spinal cord injury using naturally occurring antiinflammatory compound curcumin. *Journal of Neurosurgery*, 16, 497-503.

Ormond D.R., Shannon C., Oppenheim J., Zeman R., Das K., Murali R. and Jhanwar-Uniyal M. (2014). Stem cell therapy and curcumin synergistically enhance recovery from spinal cord injury. *Plos One*, **2**, 101371/0088916.

Oyinbo C.A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta neurobiologiae experimentalis*, **2**, 281-29.

Panchatcharam M., S. Miriyala, V. Subramani Gayathri and L. Suguna (2006). Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **290**, 87-96.

Parr, A.M., Kulbatski, I., Zahir, T., Wang, X., Yue, C., Keating, A., Tator, C.H., 2008. Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury. *Neuroscience* **155**, 760–770.

Petrova E.S., Isaeva E.N. and Korzhevskii D.E. (2013). Differentiation of dissociated rat embryonic brain after allotransplantation into damaged nerve, *Bulletin of experimental biology and medicine*, **1**, 136-138.

Preynat-Seauve O., de Rham C., Tirefort D., Ferrari-Lacraz S., Krause K.H. and Villard J. (2009). Neural progenitors derived from human embryonic stem cells are targeted by allogenic T and natural killer cells, *Journal of cellular and molecular medicine*, **9B**, 3556-3569.

Punfa W., Yodkeeree S., Pitchakarn P., Ampasavate C. and Limtrakul P. (2012). Enhancement of cellular uptake and cytotoxicity of curcumin-loaded PLGA nanoparticles by conjugation with anti-P-glycoprotein in drug resistance cancer cells, *Acta pharmacologica Sinica*, **6**, 823-831.

Rastogi M., Ojha R.P., Rajamanickam G.V., Agrawal A., Aggarwal A. and Dubey G.P. (2009). Curcuminoids modulates oxidative damage and mitochondrial dysfunction in diabetic rat brain, *Free radical research*, **11-12**, 999-1005.

Reddy C.A., Somepalli V., Golakoti T., Kanugula A.K., Karnewar S., Rajendiran K., Vasagiri N., Prabhakar S., Kuppusamy P., Kotamraju S. and Kutala V.K. (2014). Mitochondrial-targeted curcuminoids: a strategy to enhance bioavailability and anticancer efficacy of curcumin, *PloS One*, **3**, 10.1371/ 0089351.

Richards J.S. (1992). **Chronic pain and spinal cord injury: review and comment.** *The clinical journal of pain*, **2**, 119-122.

Rivas VT, Schnepf B, Challagundla M, Koch JC, Bähr M and Lingor O. (2014). Early and sustained activation of autophagy in degenerating axons after spinal cord injury, *Brain pathology*, 10.1111/12170.

Rojczyk-Golebiweska E., Palasz A. and Wiaderkiewicz R. (2014). Hypothalamic Subependymal Niche: A Novel Site of the Adult Neurogenesis. *Cellular and molecular neurobiology*, **34**, 631-642.

Ronaghi M., Erceg S., Moreno-Manzano V. and Stojkovic M. (2010). **Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells?** *Stem Cells*, **1**, 93-99.

Ross S.E. (2011). Pain and itch: insights into the neural circuits of aversive somatosensation in health and disease. *Current opinion in neurobiology*, **6**, 880-887.

Rossi S.L. and Keirstead H.S. (2009). Stem cells and spinal cord regeneration, *Current opinion in biotechnology*, **5**, 552-562.

Sabelström H., Stenudd M. and Frisén J. (2013). **Neural stem cells in the adult spinal cord.** *Experimental neurology*, 10.1016/2013.01.026.

Sadeghi M. and Sawatzky B. (2014). Effects of Vibration on Spasticity in Individuals with **Spinal Cord Injury**: A Scoping Systematic Review. *American journal of physical medicine and rehabilitation*, 10.1097/ PHM.0000000000000098.

Safavy A., Raisch K.P., Mantena S., Sanford L.L., Sham S.W., Krishna N.R. and Bonner J.A. (2007). Design and development of water-soluble curcumin conjugates as potential anticancer agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **50**, 6284-6288.

Şahin H., Kavakli, C. Koca, Ö. Alici (2011). Antioxidant effects of curcumin in spinal cord injury in rats. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*, **17**, 14-18.

Sahu A., Bora U., Kasoju N. and Goswami P. (2008). Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells, *Acta biomaterialia*, **6**, 1752-1761.

Salem H.K. and Thiemermann C. (2010). **Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status.** *Stem Cells*, **3**, 585-596.

Samson S., Woodard K.T. and Mathias K.A. (2012). Spinal cord regeneration in a tail autotomizing urodele. *Journal of morphology*, **2**, 211-225.

Scheff S.W. and Dekosky S.T. (1989). Glucocorticoid suppression of lesion-induced synaptogenesis: effect of temporal manipulation of steroid treatment. *Experimental neurology*, **3**, 260-264.

Scheid T., Bosco L.D., Guedes R.P., Pavanato M.A., Belló-Klein A. and Partata W.A. (2013). Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. *Neurochemical research*, **5**, 935-942.

Schwab M.E. (2004). Nogo and axon regeneration. *Current opinion in neurobiology*, **1**, 118-124.

Shehzad A.I, Khan S., Shehzad O. and Lee YS. (2010). Curcumin therapeutic promises and bioavailability in colorectal cancer. *Drugs of today*, **7**, 523-532.

Shukla P, Dwivedi P, Gupta PK and Mishra PR. (2014). Optimization of novel tocopheryl acetate nanoemulsions for parenteral delivery of curcumin for therapeutic intervention of sepsis, *Expert opinion on drug delivery*, **11**, 1697-1712.

Silva N.A., Sousa N., Reis R.L. and Salgado A.J. (2014). From **basics to clinical**: a comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in neurobiology*, **114**, 25-57.

Smith J.A., Park S., Krause J.S. and Banik N.L. (2013). Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. *Neurochemistry international*, **5**, 764-775.

Song Z., Zhu W., Song J., Wei P., Yang F., Liu N. and Feng R. (2014). Linear dendrimer type methoxy-poly (ethylene glycol)-b-poly (E-caprolactone) copolymer micelles for the delivery of curcumin, *Drug delivery*.

Soldner F., Hockemeyer D., Beard C., Gao Q., BellGW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O and Jaenish R. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors, *Cell*, **5**, 964-977.

Song C, Song c and Tong F (2014). Autophagy induction is a survival response against oxidative stress in bone marrow-derived mesenchymal stromal cells, *Cytotherapy*, **14**, 10.1016/j.jcyt.2014.04.006.

Srivastava P, Yadav RS, Chandravanshi LP, Shukla RK, Dhuriya YK, Chauhan LK, Dwivedi HN, Pant AB and Khanna VK. (2014), unraveling the mechanism of neuroprotection of curcumin in arsenic induced cholinergic dysfunctions in rats, *Toxicology and applied pharmacology*, **3**, 10.1016/2014.06.006.

Sun L, Gao J, Zhao M, Jing X, Xu X, Wang K, Zhang W and Cui J. (2014). The effects of BMSCs transplantation on autophagy by Cx43 in the hippocampus following traumatic brain injury in rats, *Neurological sciences*, 5, 677-682.

Sun W., Kim H. and Moon Y. (2010). Control of neuronal migration through rostral migration stream in mice. *Anatomy & Cell biology*, 4, 269-279.

Tanabe F, Yonek K, Kawabata N, Sakakima H, Matsuda F, Ishidou Y, Maeda S, Abematsu M, Komiya S and Setoguchi T (2011). Accumulation of p62 in degenerated spinal cord under chronic mechanical compression: functional analysis of p62 and autophagy in hypoxic neuronal cells, *Autophagy*, 12, 1462-1471.

Tanabe M. (2014). Electrophysiological evaluation of pathophysiological and pharmacological characteristics of chronic pain. *Yakugaku Zasshi*, 3, 405-412.

Tang P, Hou H, Zhang L, Lan X, Mao Z, Liu D, He C, Du H and Zhang L. (2014). Autophagy reduces neuronal damage and promotes locomotor recovery via inhibition of apoptosis after spinal cord injury in rats, *Molecular neurobiology*, 1, 276-287.

Taoka Y., Okajima K., Uchiba M., Murakami K., Kushimoto S., Johno M., Naruo M., Okabe H. and Takatsuki K. (1997). **Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat.** *Neuroscience*, 4, 1177-1182.

Tator C.H. and Fehlings M.G. (1991). Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of neurosurgery*, 1, 15-26.

Tegenge M.A., Rajbhandari L., Shrestha S., Mithal A., Hosmane S. and Venkatesan A. (2014). Curcumin protects axons from degeneration in the setting of local neuroinflammation. *Experimental neurology*, 253, 102-110.

Thapa A., Vernon B.C., De la Peña K., Soliz G., Moreno H.A., López G.P. and Chi E.Y. (2013). Membrane-mediated neuroprotection by curcumin from amyloid- β -peptide-induced toxicity. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 37, 11713-11723.

Thongrakard V, Titone R, Follo C, Morani F, Suksamrarn A, Tencomnao T and Isidoro C. (2014). Turmeric toxicity in A431 epidermoid cancer cells associates with autophagy degradation of anti-apoptotic and anti-autophagic p53 mutant, *Phytotherapy research*, 10.1002/5196.

Tomlinson R., Heller J., Brocchini S. and Duncan R. (2003). Polyacetal-doxorubicin conjugates designed for pH-dependent degradation, *Bioconjugate chemistry*, 6, 1096-1106.

Tong C.K., Chen J., Cebrián-Silla A., Mirzadeh Z., Obernier K., Guinto C.D., Tecott L.H., García-Verdugo J.M., Kriegstein A. and Álvarez-Buylla A. (2014). Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Cell stem cell*, **4**, 500-511.

Tönges L., Koch J.C., Bähr M. and Lingor P. (2011). **ROCKing regeneration: Rho kinase inhibition as molecular target of neurorestoration.** *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **4**, 1-11.

Tsai Y.M., Chien C.F., Lin L.C. and Tsai T.H. (2011). Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration. *International journal of pharmaceutics*, **416**, 331-338.

Veitenheimer B. and Osborn J.W. (2013). **Effects of intrathecal kynurenate on arterial pressure during chronic osmotic stress in nconscious rats.** *American Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology*, **2**, 303-310.

Virmani A., Pinto L., Binienda Z. and Ali S. (2013). Food, nutrigenomics, and neurodegeneration--neuroprotection by what you eat! *Molecular Neurobiology*, **2**, 353-362.

Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, constantine-Paton M, Isacson O and Jaenisch R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America*, **15**, 5856-5861.

Willerth S.M. and Sakiyama-Elbert E. (2008). Cell therapy for spinal cord regeneration, *Advanced drugs delivery reviews*, **2**, 263-276.

Wu J., Li Q., Wang X., Yu S., Li L., Wu L., Chen Y., Zhao J. and Zhao Y. (2013). Neuroprotection by Curcumin in Ischemic Brain Injury Involves the Akt/Nrf2 Pathway. *Plos One*, **8**, 10.1371/0059843.

Wyndaele J.J. (1987). Urethral sphincter dyssynergia in spinal cord injury patients. *Paraplegia*, **1**, 10-15.

Yallapu M.M., Jaggi M. and Chauhan S.C. (2010). Poly (B-cyclodextrin)/curcumin self-assembly: a novel approach to improve curcumin delivery and its therapeutic efficacy in prostate cancer cells, *Macromolecular bioscience*, **10**, 1141-1151.

Yao M, Yang L, Wang J, Sun YL, Dun RL, Wang Y, Cui XJ. (2014), Neurological recovery and antioxidant effects of curcumin for spinal cord injury in the rat: a network meta-analysis and systematic review, *Journal of neurotrauma*.

Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin I and Thomson J. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences, *Science*, 5928, 797-801.

Yukawa H., Watanabe M., Kaji N., Okamoto Y., Tokeshi M., Miyamoto Y., Noguchi H., Baba Y. and Hayashi S. (2012). Monitoring transplanted adipose tissue-derived stem cells combined with heparin in the liver by fluorescence imaging using quantum dots. *Biomaterials*, **7**, 2177-2186.

Zanca J., Dijkers M. and Bryce T. (2009). Prevalence of chronic pain after traumatic spinal cord injury : a systematic review. *The Journal of Rehabilitation Research an Development*, **1**, 13-29.

Zhang L., Luo J., Zhang M., Yao W., Ma X. and Yu S.Y. (2014). Effects of curcumin on chronic, unpredictable, mild, stress-induced depressive-like behaviour and structural plasticity in the lateral amygdala of rats. *The international journal of neuropsychopharmacology*, **9**, 1-14.

Zhang Q, Huang C, Meng B, Tang TS and Yang HL (2014). Changes in autophagy proteins in a rat model of spinal cord injury, *Chinese journal of traumatology*, **4**, 193-197.

Zhao L.N., Chiu S.W., Benoit J., Chew L.Y. and Mu Y. (2012). The effect of curcumin on the stability of A β dimmers. *The journal of physical chemistry. B.*, **25**, 7428-7435.

Zhou Y., Xu Q., Li D., Zhao L., Wang Y., Liu M., Gu X. and Liu Y. (2013). Early neurogenesis during caudal spinal cord regeneration in adult *Gekko japonicus*. *Journal of molecular histology*, **3**, 291-297.

Ziv Y, Avidan H, Pluchino S, Martino G and Schwartz M. (2006). Synergy between immune cells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury, *Proceeding of the National academy of the United states of America*, **35**, 13174-131749.

Zu J, Wang Y, Xu G, Zhuang J, Gong H and Yan J (2014). Curcumin improves the recovery of motor function and reduces spinal cord edema in a rat acute spinal cord injury model by inhibiting the JAK/STAT signaling pathway, *Acta histochemica*, **14**, 10.1016/2014.08.004.

