

# Regeneración axonal asociada a la sobreexpresión de neurotrofina 3 en células de la glía envolvente olfatoria

PROYECTOS INNOVADORES – MÁSTER EN TERAPIAS AVANZADAS EN  
BIOMEDICINA

Paula Castellanos, Marta Escobar, Sergio García, Enya Miguel, Antonio Solanilla  
Tutor: María Teresa Moreno Flores



Universidad  
Francisco de Vitoria  
**UFV** Madrid

# INDICE

<b>1. ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Lesión medular.....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Recuperación funcional de la LME. ....	7
<b>2.2. Células de la glía envolvente olfatoria (OECs) .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3. Scaffolds.....</b>	<b>10</b>
<b>2.4. Neurotrofina 3 (NT-3).....</b>	<b>11</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>4. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>14</b>
<b>4.1. Obtención de las células de la glía olfatoria (OECs) de mucosa.....</b>	<b>14</b>
4.1.1. Recogida de la mucosa olfativa en ratas.....	14
4.1.2. Recogida de la mucosa olfativa en humanos y cerdos .....	14
4.1.3. Aislamiento y cultivo de células de la glía envolvente olfatoria (OECs) de la mucosa humana de cerdos y de rata .....	15
4.1.4. Análisis por citometría de flujo .....	15
4.1.5. Análisis inmunocitoquímico .....	16
<b>4.2. Producción del hidrogel .....</b>	<b>16</b>
4.2.1. Síntesis de N-succinilquitosano.....	16
4.2.2. Síntesis de AH oxidado .....	16
4.2.3. Fabricación del hidrogel.....	17
4.2.4. Microscopía electrónica de barrido.....	17
<b>4.3. Diseño del constructo .....</b>	<b>17</b>
<b>4.4. Producción viral y transfección de células de mucosa.....</b>	<b>19</b>
4.4.1. Producción viral.....	19
4.4.2. Transfección con virus a células de la mucosa olfatoria .....	20
4.4.3. Delección del gen GFP mediante Cre/Loxp.....	21
<b>4.5. Ensayos células OECs e hidrogel.....</b>	<b>22</b>
4.5.1. Estudio de viabilidad celular .....	22

<b>4.6.</b>	<b>Ensayos in vivo - Animales de experimentación.....</b>	<b>23</b>
4.6.1.	Ensayos postoperatorios.....	24
4.6.2.	Ratas.....	25
4.6.3.	Cerdos.....	31
<b>4.7.</b>	<b>Análisis estadísticos .....</b>	<b>35</b>
<b>4.8.</b>	<b>Ensayos clínicos.....</b>	<b>36</b>
4.8.1.	Diagnóstico: .....	36
4.8.2.	Selección de pacientes/ criterios de admisión: .....	36
4.8.3.	Cirugía Humanos .....	37
4.8.4.	Análisis postoperatorios .....	39
4.8.5.	Fase I.....	40
4.8.6.	Fase II.....	41
4.8.7.	Fase III.....	41
<b>5.</b>	<b><i>DISCUSIÓN</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>6.</b>	<b><i>CONCLUSIÓN</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i>.....</b>	<b>46</b>

# 1. ABSTRACT

En este estudio se pretende evaluar el posible tratamiento de pacientes con lesión medular espinal. El tipo de lesión medular que se va a tratar es una contusión medular, ya que este es el tipo de daño medular más frecuente. Se propone la utilización de una terapia celular génica. Está basada en la modificación genética de células de la mucosa olfatoria para que sobreexpresen el factor neurotrófico neurotrofina 3. Estas células modificadas genéticamente, mediante un vector lentiviral, son implantadas en la zona de la lesión medular incluidas en el interior de un hidrogel. El hidrogel que se utiliza está compuesto por ácido hialurónico y quitosano, lo que hace que este hidrogel sea biodegradable y genere un soporte para la regeneración axonal.

En este estudio se describen los análisis preclínicos in vitro, al igual que en modelos animales. Los modelos animales que utilizamos son ratas de la cepa Wistar y cerdos miniatura Yucatán. Estos animales son sometidos a dos cirugías para generar el modelo de lesión medular y posteriormente para aplicar el tratamiento. En estos modelos animales se evalúa directamente la regeneración axonal mediante cortes histológicos e indirectamente gracias a una ganancia de sus funciones motoras y sensoriales.

Por último, se llevan a cabo los ensayos clínicos con pacientes, inicialmente en Fase I para valorar la factibilidad y la seguridad del tratamiento; y posteriormente, las Fase II y III, en las que se evaluará tanto la eficacia como la seguridad. Una vez completada la Fase III, se comienza el proceso de evaluación por las agencias reguladoras y comercialización del tratamiento y, por tanto, la Fase IV del mismo.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Lesión medular

La lesión de médula espinal (LME) es un evento traumático o no-traumático que resulta en trastornos de la función sensorial, motora o autónoma y que afecta el bienestar físico, psicológico y social del afectado (Singh *et al.*, 2014; New *et al.*, 2014) con consecuencias socioeconómicas graves relativas a los costes de recuperación y de trabajo útil perdido (van Den Hauwe *et al.*, 2020).

Se estima que más de 27 millones de personas en todo el mundo viven con una discapacidad a largo plazo después de una LME, el 90% resultado de un trauma y el 10% como consecuencia secundaria de una enfermedad (Bradbury & Burnside 2019).

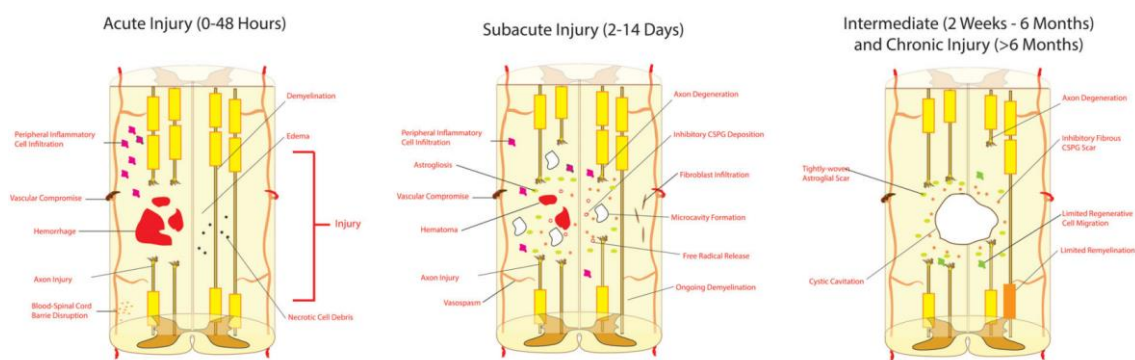
En Estados Unidos la principal causa de LME es por traumas de tipo contundente, comúnmente a causa de accidentes de automóvil (48%), seguido de caídas (21%) y lesiones deportivas (14,6%); y después por casos de asalto y traumas de tipo penetrante que representan el 10-20% de los casos. Un dato relevante, es que la mayoría de las LME suceden en la franja de los 15-30 años representando el 60% de la población que las sufren y que las lesiones relativas a caídas en los mayores de 65 años no han dejado de aumentar (van Den Hauwe *et al.*, 2020).

En datos que respecta a España, durante el 2000-2008 la tasa de incidencia media anual de altas hospitalarias con diagnóstico principal de lesión medular traumática, se estimaba en 24 casos por millón de habitantes (35,6 por millón de varones y 12,4 por millón de mujeres), ocupando los accidentes de tráfico el 36,67% de los casos (8,8 por millón de habitantes, 13,6 por millón de hombres y 4,0 por millón de mujeres), siendo la franja de edad de 18-24 años la más proclive a la LME, y la franja de los mayores de 65 años la que acumula el mayor número de LME relacionadas a “otros mecanismos” como por ejemplo caídas (Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad de España, 2011).

Adicionalmente, la supervivencia de estas lesiones está inversamente relacionada a la edad del paciente y la gravedad de la LME, con una menor supervivencia general para los pacientes tetraplégicos en comparación con los parapléjicos (van Den Hauwe *et al.*, 2020), lo cual, quizás se relaciona (como uno de múltiples factores) a episodios del síndrome de la disreflexia autónoma que puede aparecer en lesiones superiores o al

mismo nivel del sexto segmento de la médula espinal torácica (Eldahan & Rabchevsky, 2018).

Profundizando en el concepto de LME, es una lesión que surge por una compresión, sangrado y/o isquemia que compromete al componente óseo de la columna vertebral, la médula espinal y sus cubiertas. A la cual, pasado 1 a 3 días del evento de la LME prosigue una pérdida de vasos sanguíneos, neuronas, células gliales y tractos axonales que llevará a la pérdida de funciones de la región dañada en la mayoría de las ocasiones. Podemos, generalmente, diferenciar 3 estadios clínicos de la LME (*Figura 1*).



**Figura 1.** Evolución fisiopatológica de la lesión medular. En la fase aguda (0-48 horas post-lesión) se caracteriza por hemorragias, edemas, factores proapoptóticos (por ejemplo, citoquinas, K<sup>+</sup>, ADN, restos necróticos, etc), lesión de neuronas y oligodendrocitos, activación y proliferación de astrocitos que se infiltran y excretan condroitin sulfato proteoglicano, y desmielinización de los axones. En la fase subaguda o intermedia tardía, sucede una continua muerte celular apoptótica y necrótica que deja cavidades microquísticas que, finalmente, en la fase crónica (>6 meses) se unen para formar barreras formidables a la regeneración. La cicatriz de fase crónica final es una entidad dinámica que consiste en una red estrechamente tejida de procesos astrocíticos con un denso depósito fibroso de condroitin sulfato proteoglicanos que actúa como una barrera física y bioquímica para el crecimiento de neuritas y la migración celular regenerativa (Ahuja *et al.*, 2017).

- **Fase aguda:** que es dada por destrucción de la barrera hematoencefálica, alteraciones a la microvasculatura de la materia gris y la inducción de hemorragias petequiales, que conllevan la muerte de células neuronales y daño de axones. Presencia de células inflamatorias, especialmente neutrófilos (Gómez *et al.*, 2018), debido a la rotura de la barrera hematoencefálica (Ahuja *et al.*, 2017) y la muerte de las células necróticas que liberan su contenido activando la microglía

que libera citoquinas proinflamatorias y recluta células inflamatorias periféricas (Badhiwala *et al.*, 2018). Desregulación del balance iónico que conduce a una pérdida de los impulsos nerviosos y la formación de edemas. Aumento del calcio intracelular libre, que activa las proteasas y fosfolipasas dependientes de calcio, involucradas en la destrucción de la mielina (Gómez *et al.*, 2018) además de causar una disfunción mitocondrial provocando la muerte celular (Ahuja *et al.*, 2017). Liberación de glutamato y aspartato que promueve una excitación excesiva de las neuronas viables y la interrupción de la homeostasis redox, con la consiguiente generación de radicales libres (Gómez *et al.*, 2018) incluidos los producidos por las células fagocíticas inflamatorias que producen especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daño oxidativo en el DNA, oxidación proteica y peroxidación lipídica (Ahuja *et al.*, 2017), todo ello causando procesos de necrosis y apoptosis en células gliales y neuronas.

- **Fase subaguda:** donde ocurre la apoptosis de neuronas y oligodendrocitos debido a la activación de las células gliales como consecuencia de los procesos de necrosis, hemorragias e isquemias locales.
- **Fase crónica:** donde continúan y se extienden los procesos neurodegenerativos fuera de la lesión (Gómez *et al.*, 2018), y cuando la cicatriz astroglial madura para convertirse en un potente inhibidor de la regeneración (Badhiwala *et al.*, 2018; para más información sobre la cicatriz glial/astroglial, consultar Bradbury & Burnside, 2019). Algunos autores como Badhiwala *et al.* (2018) definen esta fase como la fase intermedia, durando de 14 días a 6 meses, y denominando fase crónica a aquella que supera los 6 meses del evento traumático.

En esencia, la pérdida de funciones por el LME se debe a la degeneración glial y neuronal siendo evidente la desmielinización como también las alteraciones morfológicas y estructurales anormales de la materia gris y blanca.

Tras la LME se dan déficits funcionales que persistirán debido a la baja capacidad de regeneración axonal de las neuronas para reinervar (Ahuja *et al.*, 2017; Gómez *et al.*, 2018). Esta deficiente capacidad de regeneración es producto de 1) una baja expresión de genes de regeneración/recrecimiento axonal del sistema nervioso central existente en los mamíferos adultos, 2) la presencia de factores inhibidores en la cicatriz glial desarrollada tras el traumatismo y 3) una escasez de factores tróficos de neuroprotección y de regeneración (Gómez *et al.*, 2018).

Los factores inhibitorios que se localizan en la LME son debidos a varias causas: 1) la degradación de la mielina, lo que no sucede en el caso de la mielina del sistema nervioso periférico; 2) la acción de los astrocitos que secretan condroitín sulfato proteoglicanos, que son inhibidores del crecimiento formando una barrera química (además de una barrera física llamada cicatriz glial por hipertrofia de los astrocitos desde la que secretan estos inhibidores); 3) y la infiltración de fibroblastos en la región peri-lesionada formando tejido conectivo y depositando una matriz extracelular que acumula factores inhibitorios que también limitan la regeneración axonal (Ahuja *et al.*, 2017).

En conclusión, la lesión medular está influida por factores intrínsecos y extrínsecos al trauma y de varios estadios que comienzan con la lesión del tejido que desemboca en una serie de desbalances osmóticos, daños celulares e infiltración de células inflamatorias a nivel local, que conllevarán, ya pasado el evento traumático, una persistente limitación funcional por liberación de diversos factores inhibitorios de la regeneración, y escasez de factores neuroprotectores y regenerativos, seguido de una extensión del proceso neurodegenerativo fuera de la región local de la lesión y la formación de la cicatriz glial en la región de la lesión que genera un microambiente inhibitorio de la regeneración axonal.

### **2.1.1. Recuperación funcional de la LME.**

La recuperación de la LME depende de la propia fisiopatología y las distintas estrategias que se han desarrollado para lograrlo, de uso individual o combinado.

En modelos animales se han desarrollado estrategias que consisten en: el aporte de factores neurotróficos, la neutralización de los factores inhibitorios de la cicatriz glial, y el trasplante de distintos tipos de células gliales, células madre o fibroblastos modificados o no (Gómez *et al.*, 2018).

En los casos clínicos, las estrategias (de fase I, II o III) que se han probado en pacientes con LME, son: terapias farmacológicas (inhibidores Rho-ROCK, anticuerpos anti-NOGO), terapias de estimulación de la médula espinal, terapias celulares (células madre neurales, mesenquimales, hematopoyéticas y embrionarias; células de Schwann, células de la glía envolvente olfatoria, astrocitos, etc) y aplicación de biomateriales/*scaffolds* (Ahuja *et al.*, 2017; Venkatesh *et al.*, 2019) y de *scaffolds* más células (Venkatesh *et al.*, 2019).

Para la mayoría de los tratamientos el principal impedimento de su aplicación sucede por:

- La preparación de los materiales para la estrategia escogida, dando el tiempo suficiente para la hipertrofia de los astrocitos y consiguiente formación de la cicatriz glial (las terapias celulares con células autólogas requieren un tiempo mínimo de cultivo, un ejemplo entre tantos se observa en la terapia con células del bulbo olfativo de Lim *et al.*, 2010 que requirieron de un mes de preparación).
- La estabilización del paciente contra el gran número de anomalías interrelacionadas del sistema nervioso autónomo y cardiovascular que causa la LME y que son las principales causas de muerte y morbilidad en esta población (Eldahan *et al.*, 2018). En consecuencia, parte de las estrategias se aplican tras la formación de la cicatriz glial requiriendo una previa retirada o degradación de la cicatriz glial.

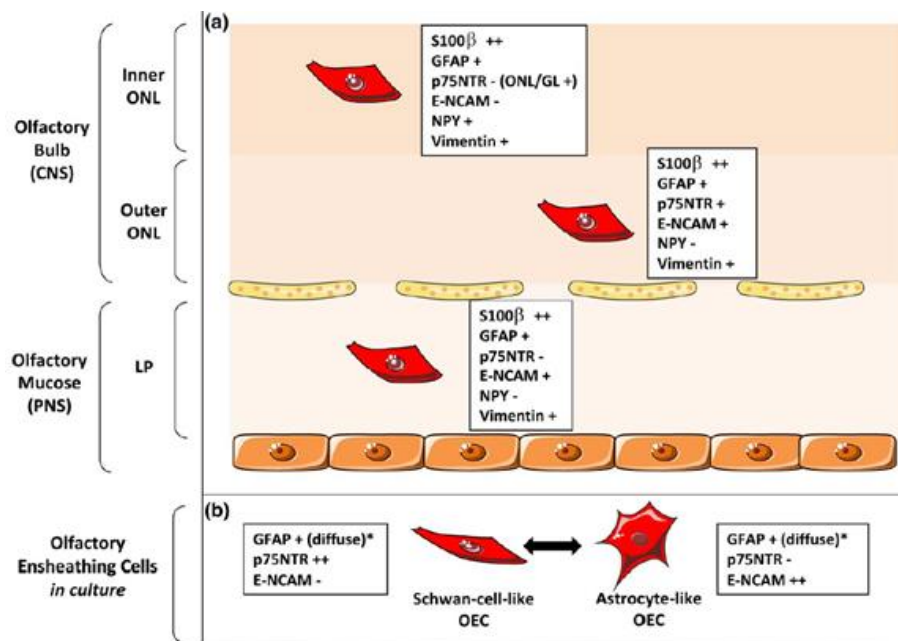
## **2.2. Células de la glía envolvente olfatoria (OECs)**

El sistema olfativo primario se compone de dos partes distintas: la mucosa olfatoria (MO) en el sistema nervioso periférico y el bulbo olfatorio (BO) en el sistema nervioso central. El sistema olfativo primario se caracteriza por la capacidad de las neuronas olfatorias primarias (PON) de autorrenovarse durante toda la vida en las especies de mamíferos. Esta capacidad es posible gracias a la presencia de células madre neurales en la MO, que dan lugar a nuevas PON. El crecimiento de sus axones desde la MO hasta el BO es facilitado por células gliales especializadas llamadas células envoltantes olfatorias (OECs) (Guerout *et al.*, 2014).

Las OECs son células que proceden de la cresta neural, y que crean un microambiente favorable para la neurogénesis de las PON desde la MO hasta el BO. Por lo tanto, las OECs pueden encontrarse en la MO y en el BO constituyendo diferentes subpoblaciones de células (Barraud *et al.*, 2010). Las diferentes propiedades de las OECs han llevado a los científicos a utilizarlas para trasplantes celulares en varios paradigmas de lesiones del sistema nervioso. De hecho, estas células producen factores de crecimiento, reducen la cicatriz glial, promueven el crecimiento axonal y se pueden entremezclar libremente con los astrocitos (Honore *et al.*, 2012).

Las OECs tienen una forma alargada con un fino proceso laminar que envuelve los nervios olfatorios in situ, mientras que se caracterizan por su morfología plana, bipolar o multipolar en cultivo. Expresan varios marcadores reconocidos que pueden detectarse

mediante inmunotinción in vitro e in vivo (Figura 2). Sin embargo, la expresión de estas proteínas depende de su estado de diferenciación y de su localización en el SNC o SNP (Vincent *et al.*, 2005).



**Figura 2:** Las OECs expresan diferentes marcadores específicos. (a) Las OECs tienen diferentes fenotipos antigénicos dependiendo de su localización en el SNC o SNP. Generalmente, las OECs expresan vimentina, S100b y GFAP, aunque también pueden expresar p75NTR, E-NCAM o NPY dependiendo de la región del SNC o SNP en la que se encuentren. (b) In vitro, las OEC pueden segregarse en dos subpoblaciones fenotípicas: (i) con una morfología similar a la de las células de Schwann, caracterizadas por una forma fusiforme y una fuerte expresión de p75NTR y (ii) con una morfología similar a la de los astrocitos aplanados y una fuerte expresión de E-NCAM (Gómez *et al.*, 2018).

Las OECs desempeñan funciones específicas dentro del sistema olfativo. En la MO proporcionan un entorno favorable para el desarrollo de los axones sensoriales, que se fasciculan para formar el primer nervio craneal, y que crecen a través de estos territorios para entrar en el SNC y establecer sinapsis funcionales en los glomérulos del BO. Las OECs envuelven, acompañan y guían estos axones desde la MO hasta el BO (Moreno-Flores *et al.*, 2002; Doucette., 1990).

Está por tanto demostrado que las OECs destacan, debido a su capacidad inherente de ayudar en la renovación continua de las neuronas olfativas en el sistema olfativo, y su capacidad de estimular la reparación, plasticidad y recuperación funcional de los axones en el sistema nervioso central (Gómez *et al.*, 2018).

### **2.3. Scaffolds**

En las lesiones medulares hay (Assunção-Silva *et al.*, 2015):

- Ambiente inhibitorio por el daño
- Deficiencia de matriz, por lo que las neuronas y las células endógenas reparadoras no pueden adherirse.

Para evitar estos problemas se utilizan diferentes biomateriales para que funcionen como andamios o “*scaffolds*”. Los *scaffolds* son una estructura tridimensional biodegradable que ayuda en el proceso regenerativo (Silva *et al.*, 2010a). Un buen *scaffold* debe seguir una serie de criterios (Silva *et al.*, 2014):

- Biocompatible.
- Alta porosidad, con tamaño de poro grande.
- Adecuada fuerza mecánica.
- Biodegradable: debe ser degradado una vez la lesión se ha regenerado.
- Proporcionar señales químicas y topografía para controlar la organización celular.

Si un buen *scaffold* presenta estas propiedades podrá controlar las células que se dispongan en su interior, permitiendo una correcta migración, proliferación, diferenciación, mantenimiento del fenotipo y apoptosis (Silva *et al.*, 2014).

Entre los más utilizados se encuentran los hidrogeles, debido a que mimetizan el ambiente de tejidos blandos y la arquitectura del sistema nervioso central (SNC), integran moléculas de matriz extracelular (ECM) y proteínas de adhesión y funcionan como guía para la regeneración axonal (Assunção-Silva *et al.*, 2015). Además, son biocompatibles y permiten la supervivencia celular y su integración correcta en el organismo (Pakulska *et al.*, 2012).

Hay diversos biomateriales por lo que se debe realizar un estudio exhaustivo sobre cuál de ellos es el más beneficioso para tratar la lesión medular. Algunos de los materiales que constituyen los hidrogeles son biodegradables o bioreabsorbibles, por lo que una vez se haya regenerado la zona de la lesión se eliminan (Pakulska *et al.*, 2012). Los hidrogeles pueden ser tanto naturales como sintéticos.

Se han estudiado diferentes tipos de biomateriales como el dextrano, el condroitín sulfato y el ácido hialurónico para poder llevar a cabo la liberación de fármacos. El problema es que no se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo sobre sus aplicaciones

en ingeniería de tejidos para portar células. Uno de los hidrogeles inyectables estudiados está compuesto por dos tipos de biomateriales naturales, el quitosano soluble en agua y el ácido hialurónico (AH) oxidado (Tan *et al.*, 2009).

El AH es uno de los principales componentes de la matriz extracelular. Forma parte de muchos tejidos y está implicado en proliferación celular, migración, cicatrización de heridas, angiogénesis y metástasis tumoral. Debido a la biocompatibilidad y biodegradabilidad del material se suele utilizar mucho para construir hidrogeles (Park *et al.*, 2010). El AH puede ser oxidado produciendo aldehídos reactivos que pueden dar lugar a reacciones químicas de reticulación con los aminos de las bases de Schiff (Ruhela *et al.*, 2006).

Por otro lado, el quitosano es un derivado desacetilado de quitina, un biopolímero de alto peso molecular. Es un polisacárido lineal compuesto por glucosamina y N-acetilglucosamina unidas por enlaces  $\beta$  (1-4) (Di Martino *et al.*, 2005). Este biomaterial es muy beneficioso debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, el inconveniente que presenta es su poca solubilidad en condiciones fisiológicas debido a un fuerte enlace de hidrógeno intermolecular. Para solventar este problema se introdujo un grupo succinil en la posición N formando el N-succinilquitosano (Tan *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2001).

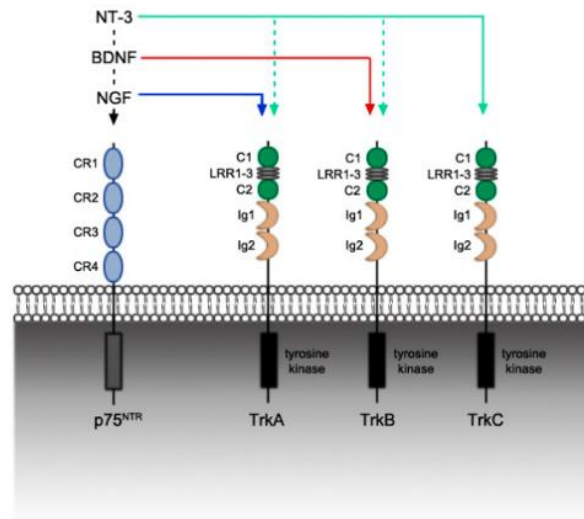
El hidrogel inyectable formado por el N-succinilquitosano y el AH oxidado se fabrica para que las células se adhieran correctamente y puedan sobrevivir para regenerar la médula ósea.

#### **2.4. Neurotrofina 3 (NT-3)**

La neurotrofina-3 (NT-3) es un factor neurotrófico que tiene la capacidad de promover la remielinización y contribuye en funciones neuronales (Zhang *et al.*, 2017). De manera general, las neurotrofinas tienen como diana los receptores de membrana Trk.

La interacción de las neurotrofinas con los receptores Trk, provocan la dimerización del receptor y una autofosforilación en los residuos de tirosina. Esto desencadena un proceso de activación de determinadas cascadas de señalización. Algunas de estas rutas son la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), la proteína quinasa B (Akt), Ras/MAPK y la fosfolipasa C (PLC). Dichas rutas están relacionadas con la supervivencia neuronal, el crecimiento axonal y la plasticidad sináptica (Blum & Konnerth, 2005)

Existen otras neurotrofinas como son NGF y BDNF que incluso se encuentran en mayor proporción que NT-3. La diferencia principal entre NGF y BDNF frente a NT-3 radica en que estas dos primeras sólo pueden interaccionar con los receptores de membrana TrkA y TrkB respectivamente. NT-3 es capaz de activar con poca afinidad TrkA y TrkB y a su vez, activar con gran afinidad TrkC (Figura 3) (Keefe *et al.*, 2017). Todas las neurotrofinas son capaces de estimular con una afinidad baja a p75.



**Figura 3:** Interacciones posibles entre las diferentes neurotrofinas (NT-3, BDNF y NGF) con los receptores de membrana p75, TrkA, TrkB y TrkC. (Keefe *et al.*, 2017).

Se ha descrito que NT-3 se encuentra expresado a altas concentraciones durante el desarrollo de la médula espinal. A su vez, NT-3 no se produce en tanta cantidad en etapas adultas, pero sí se encuentra TrkC en la médula espinal y en los nervios motores (Schnell *et al.*, 1994).

De esta forma, conseguir una sobreexpresión de una neurotrofina como es la NT-3 podría simular el ambiente presente en el desarrollo de la médula espinal. Esto puede suponer una terapia regenerativa debido a la estimulación de los receptores Trk que promueven la regeneración y la supervivencia neuronal.

### **3. OBJETIVOS**

Las lesiones de médula espinal son de las afecciones más graves del Sistema Nervioso Central, que afectan a los pacientes y a la sociedad y que todavía no cuentan con un tratamiento efectivo. Por ello nos proponemos:

1. Desarrollar una terapia combinatoria para su tratamiento, consistente en células de la glía olfatoria de mucosa con el gen NT-3 sobreexpresado inyectadas en un hidrogel constituido por ácido hialurónico y quitosano.
2. Evaluar todos los elementos de dicha terapia in vitro.
3. Evaluar dicha terapia en modelos preclínicos animales: rata y cerdo.
4. Hacer un ensayo clínico en todas sus fases para evaluar la factibilidad, seguridad y eficacia de dicho tratamiento.

## **4. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **4.1. Obtención de las células de la glía olfatoria (OECs) de mucosa.**

#### **4.1.1. Recogida de la mucosa olfativa en ratas**

Se comienza preparando tres placas de Petri de 35 mm llenas de medio de cultivo DMEM/HAM F12 en una campana de cultivo limpia. Cualquier método de eutanasia debe ser aprobado previamente por el comité de cuidado y uso de animales de la institución y llevado a cabo por personal cualificado. Después de que la rata haya entrado en anestesia profunda con pentobarbital sódico u otras formas inyectables de anestesia como la ketamina/xilazina, se decapita y retira la piel. Deben evitarse los anestésicos inhalatorios.

La adecuación de la anestesia se evalúa mediante un pellizco en el dedo de la extremidad posterior antes de la decapitación. Se quita la mandíbula inferior con tijeras y se eliminan los músculos faciales de ambos lados.

Comenzando por la parte posterior de los incisivos, se retira con un rongeur el hueso que cubre la cavidad nasal. Los cornetes olfatorios aparecen como órganos de color naranja/marrón situados en la parte posterior de la nariz. Se desechan adecuadamente los cornetes con una pinza. Con una aguja de calibre 26, se aísla la mucosa olfativa que yace en el tabique cortando el tejido a lo largo de tres líneas: el arco de la placa perpendicular, la placa cribiforme y el techo de la cavidad nasal. Se recogen las biopsias de ambos lados y son transferidas a una placa de Petri llena de DMEM/HAM F12. Este procedimiento no debería durar más de 10 minutos desde el inicio de la eutanasia.

Finalmente, para eliminar la mucosidad, transferir las biopsias dos veces en placas de Petri llenas de medio (Girard *et al.*, 2011).

#### **4.1.2. Recogida de la mucosa olfativa en humanos y cerdos**

Este procedimiento en humanos se lleva a cabo por un cirujano de Otorrinolaringología (ORL), de acuerdo con el (los) comité(s) ético(s) local(es) correspondiente(s), y cada paciente externo debe firmar un formulario de consentimiento informado. En cerdos se lleva a cabo por un veterinario de acuerdo con el (los) comité(s) ético(s) local(es) correspondiente(s).

Se inspecciona con un endoscopio rígido de 0° o 30° (4 mm de diámetro) ambas cavidades nasales y se evalúa la supuesta presencia de pólipos o cualquier lesión inflamatoria. A continuación, se elige la mejor cavidad nasal, teniendo en cuenta la desviación del tabique. Con un aplicador de algodón se aplica un anestésico local, como lidocaína con epinefrina, durante 10 minutos. Con una pinza etmoidal pasante se recoge una biopsia de dos milímetros cuadrados bien en la raíz de la cara medial del cornete medio o en el tabique en la zona dorsomedial. La biopsia olfativa se transfiere entonces, utilizando una aguja estéril, a un tubo estéril de 2 ml lleno de 1 ml de DMEM/HAM F12. Es necesario inclinar el tubo hacia abajo para asegurarse de que la biopsia se sumerge en el medio de cultivo. Finalmente, se introduce el tubo en un recipiente refrigerado y se transporta al laboratorio de investigación. En esta fase, la biopsia puede utilizarse para estudios moleculares comparativos centrados en enfermedades cerebrales específicas o procesarse para generar células gliales (Girard *et al.*, 2011).

#### **4.1.3. Aislamiento y cultivo de células de la glía envolvente olfatoria (OECs) de la mucosa humana de cerdos y de rata**

En primer lugar, se coloca la muestra de MO en HBSS que contenga 0,05% de colagenasa A durante 45 minutos a 37 °C. Se detiene la digestión enzimática añadiendo 2 ml de medio DMEM suplementado con 10% de FBS en el caso de las ratas y cerdos y suero autólogo en el caso de los pacientes humanos. A continuación, se lavan las células con medio y se centrifugan a 300 x g durante 3 min. Se trituran muestras con 2 ml de medio con una pipeta P1000 hasta obtener una suspensión celular homogénea.

Se colocan las células en los matraces pre-revestidos ( $5 \times 10^6$  células/flask) con 25 ml de medio DMEM atemperado, incubar y cultivar las células a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y se cambia la mitad del medio cada 2 días.

Después de 6-8 días *in vitro*, se comprueba la proporción de células positivas para p75 en las muestras, por citometría de flujo o por inmunocitoquímica. Para estos análisis, se pueden estudiar otros marcadores como GFAP y E-NCAM (Guerout *et al.*, 2014).

Para seleccionar las células de la glía envolvente olfatoria (OECS):

#### **4.1.4. Análisis por citometría de flujo**

Las células se incuban con el anticuerpo primario p75 (1:100) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavan las células con 2 ml de PBS-EDTA y se centrifugan a 300 x g durante 3 min.

Después, las células se incuban con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con PE durante 15 min a 4 °C en la oscuridad (1:200) y se lavan las células con 2 ml de PBS-EDTA. Se centrifugan las células a 300 x g durante 3 min y se resuspenden en 500 µl de PBS-EDTA.

Finalmente se analizan  $20 \times 10^3$  células con el citómetro de flujo (Guerout *et al.*, 2014).

#### **4.1.5. Análisis inmunocitoquímico**

Para comenzar, se colocan las células en placas de 6 pocillos ( $25 \times 10^3$  células/pocillo) durante 48h. Después, se fijan las células con PFA 4% durante 30 min a temperatura ambiente, se lavan las células con PBS y se incuban las células con PBS/Triton X100 (0,1%) durante 15 min a temperatura ambiente, se lavan las células con PBS e incuban las células con anticuerpos primarios (1:200): p75, S100β y GFAP ON a 4 °C.

Al día siguiente, se lavan las células con PBS y se incuban las células con los anticuerpos secundarios (1:500) durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad, se lavan las células con PBS y se incuban las células con Hoechst 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se lavan las células con PBS y analizar las células con un microscopio de fluorescencia (Guerout *et al.*, 2014).

### **4.2. Producción del hidrogel**

#### **4.2.1. Síntesis de N-succinilquitosano**

Primero, 0,5 g de quitosano se disuelven en 40 mL de solución de ácido láctico al 5% (v/v) y se añaden 160 mL de metanol para diluir la solución. A continuación, se añade 1,5 g de anhídrido succínico a esta solución con agitación a temperatura ambiente (Tan *et al.*, 2009).

Después de 24 horas, el quitosano modificado con succinilo se precipita ajustando a un pH 6-7. El precipitado se filtra y se disuelve en H<sub>2</sub>O. Por último, se dializa durante 3 días (Tan *et al.*, 2009).

#### **4.2.2. Síntesis de AH oxidado**

Primero se obtiene una concentración de 10 mg/ml de AH, y se añaden gota a gota 5 ml de periodato de sodio. Esta reacción se mantiene en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente y a oscuridad. A continuación, se añade 1 ml de etilenglicol para que el periodato de sodio que no está llevando a cabo la reacción se inactive, esta

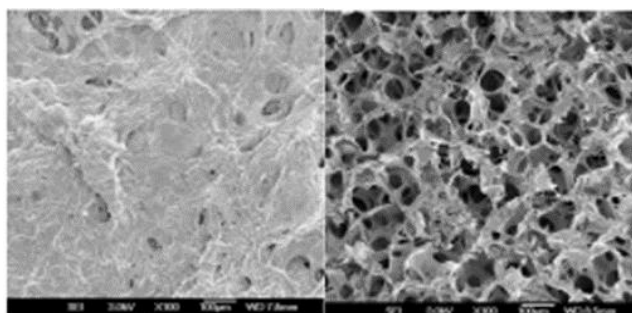
reacción se mantiene en agitación 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se lleva a cabo la purificación de la solución mediante diálisis contra H<sub>2</sub>O durante 3 días (Tan *et al.*, 2009).

#### **4.2.3. Fabricación del hidrogel**

Las distintas soluciones se disuelven en PBS a una concentración de 20 mg/ml. Se utiliza un ratio de 7/3 de N-succinilquitosano/AH oxidado ya que se ha visto que tiene un tiempo de gelificación entre 1-4 minutos y proporciona un tamaño de poro pequeño beneficioso para la adhesión de las células. Además, tiene un tiempo de degradación lento a 37°C (28 días), esto permite que las células que están dispuestas a lo largo del hidrogel tengan el tiempo suficiente para llevar a cabo la regeneración de la médula (Tan *et al.*, 2009).

#### **4.2.4. Microscopía electrónica de barrido**

Mediante la microscopía electrónica de barrido se observa la morfología que presenta el hidrogel. Primero se lleva a cabo la liofilización del hidrogel y después se recubre con oro. A continuación, se visualiza la estructura formada mediante un microscopio electrónico de barrido JSM-6330F con un voltaje de aceleración de 10 kV. Se obtiene una imagen superficial y transversal del hidrogel, representado en la *Figura 4*. Gracias a esta técnica se observa que los poros formados en el hidrogel tienen un diámetro entre 10-100 μm (Tan *et al.*, 2009).

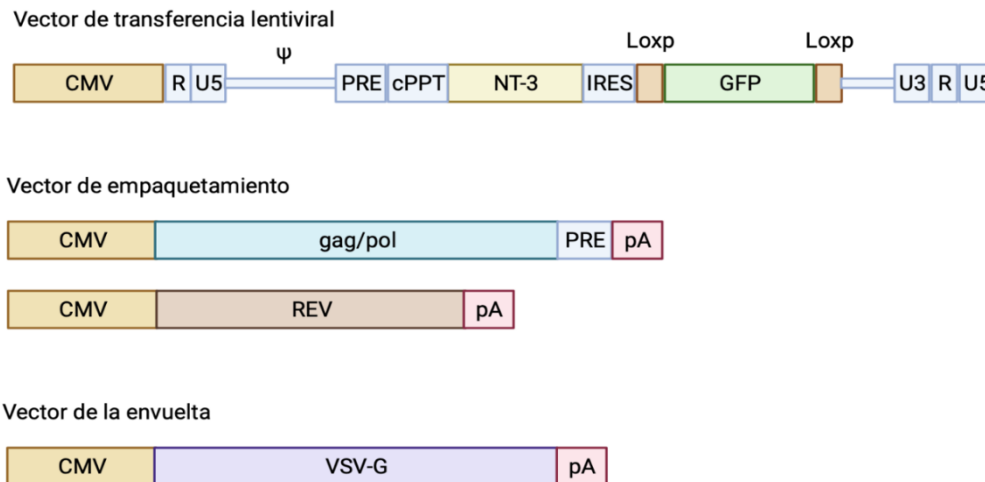


**Figura 4.** Fotografías realizadas mediante microscopía electrónica de barrido. A) Imagen superficial. B) Imagen transversal (Tan *et al.*, 2009).

### **4.3. Diseño del constructo**

Se propone la realización de un vector lentiviral con capacidad de infectar las células de la mucosa para modificarlas genéticamente y así sobreexpresar la neurotrofina NT-3.

El vector que se propone usar es un lentivirus de tercera generación, por lo que para la producción de estos es necesario transfectar las células empaquetadoras con 4 plásmidos (Li *et al.*, 2012). Estos serían, el vector de transferencia lentiviral, dos vectores de empaquetamiento (gag/pol y REV) y, por último, un vector para la envuelta viral (Figura 5).



**Figura 5:** Vectores lentivirales propios de un lentivirus de tercera generación. Se representa: El vector de transferencia con el gen de la neurotrofina 3 y el gen del GFP flanqueado por secuencias Loxp. Dos vectores de empaquetamiento (gag/pol y REV). El vector VSV-G que codifica para la envuelta viral.

El plásmido que contiene el gen de interés no puede superar las 10 Kb debido a que es la capacidad máxima de empaquetamiento que presentan los lentivirus. A su vez el ácido nucleico que pueden portar es ssRNA+. Estos virus presentan una retrotranscriptasa para retrotranscribir el RNA en DNA y que este se pueda integrar en el genoma.

El gen de la neurotrofina NT-3 que queremos integrar presenta una longitud de 812 bases (Figura 6), por lo que el lentivirus es un vector adecuado para portar este gen.

```

tcatgtcgcac gtcctggaa acggccacac ggatgcatg gttactttg ccacgatctt
acagggaac aaggatggt ccatctgtt ttatgtgata ttctcgctt atctccgtgg
catccaaggt aacaacatgg atcaaaggag ttgcccagaa gactcgctca attcctcat
tattaagctg atccaggcag atattttgaa aaacaagctc tccaagcaga tgggtgacgt
taaggaaaat taccagagca ccctgcccac agctgaggtc ccccgagagc cggagcgggg
agggcccggc aagtcagcat tccagccggt gattgcaatg gacaccgaac tgctgcgaca
acagagacgc tacaactcac cgcgggtcct gctgagcgac agcaccctc tggagccccc
gcccctgtat ctcatggagg attacgtggg cagccccgtg gtggcgaaca gaacatcacg
gcggaacgg tacgcccggc ataagagtc cggaggggag tactcggtat gtgacagtga
gagctgtgg gtgaccgaca agtcacggc catcgacatt cggggacacc aggtcacggt
gctgggggag atcaaacgg gcaactctcc cgtcaaacaa taattttatg aaacgcgatg
taaggagcc aggccggtc aaaacgggtg caggggtatt gatgataaac actggaactc
tcagtgcata acatcccaaa cctacgtccg agcactgact tcagagaaca ataaactcgt
gggctggcgg tggatacga tagacacgtc ctgtgtgtgt gcctgtcga gaaaaatcgg
aagaacatga attgcatct ctcccataa ataaattatt actttaaatt atatgatg

```

**Figura 6:** Secuencia de la cadena codificante de DNA del gen NT-3 de *Homo sapiens* (Centro Nacional para la Información Biotecnológica).

El plásmido lentiviral de expresión que contiene la proteína a transcribir, contiene una secuencia GFP para la selección positiva de las células que han incorporado el gen de interés en su genoma. El GFP se expresa bajo el mismo promotor que la neurotrofina 3, estando estos dos genes separados por una secuencia IRES. El gen GFP se flanquea con secuencias Loxp para ser deleciónado en las células que se usarán en terapia. La longitud del gen que codifica para la proteína GFP tiene una longitud de 696 bases. Por otro lado, las secuencias Loxp portan 34 pb.

En nuestro caso los constructos lentivirales deben ser de RNA debido a la naturaleza del vector.

#### **4.4. Producción viral y transfección de células de mucosa**

##### **4.4.1. Producción viral**

Los vectores virales se adquirieron de Addgene. Estos vectores bacterianos, que presentan nuestras secuencias de interés, son clonados en *E. coli*. Los clones positivos se seleccionan mediante una resistencia a ampicilina. Esta no será incluida en el vector lentiviral. Tras su crecimiento, se lisan las bacterias y se aíslan los plásmidos de interés mediante una electroforesis en gel de agarosa (An & Miyamoto, 2006).

Para la producción viral, se usa la línea celular HEK293T. Esta línea celular empaquetadora debe mantenerse en cultivo en un medio DMEM con alta glucosa (4500 mg/L), FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina en un incubador a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5% (Li *et al.*, 2012).

Una vez obtenidos los plásmidos necesarios para la producción viral, se procede a la transfección de las células empaquetadoras HEK293T mediante lipofectamina 3000 (Enomoto *et al.*, 2013). El protocolo de transfección con lipofectamina es el descrito por el fabricante (Thermo Fisher Scientific). Una vez realizada la transfección de las células empaquetadoras se les debe cambiar el medio a las 6 h. Posteriormente se dejan en cultivo durante 2-3 días para coincidir con el periodo de máxima expresión. Por último, se realiza un proceso de ultracentrifugación para la obtención de las partículas virales (Gill & Denham, 2020).

Una vez purificados los virus mediante ultracentrifugación se procede a la titulación de estos. Para la titulación de las partículas virales, la forma más efectiva y de medida directa es la realización de una RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR). De esta manera obtenemos el número de las partículas virales por mililitro de nuestra suspensión

viral. En primer lugar, se realiza la extracción del RNA viral mediante la adición de 600  $\mu\text{L}$  de BUFFER BAV1 a 150  $\mu\text{L}$  de nuestra concentración viral, y se incuba durante 10 min a 70°C. Posteriormente se lava con 600  $\mu\text{L}$  de etanol (96-100%) para que los ácidos nucleicos se puedan unir a la columna. A continuación, se realiza un lavado mediante una columna Virus Binding Column. Se realizan varias series de lavados y centrifugaciones para eliminar restos indeseados. Por último, se eluye con 50  $\mu\text{L}$  de agua sin RNAsa y se realiza una centrifugación de 1 min a 11,000 x g. El eluido contiene el RNA purificado. Este protocolo se realiza con el Speedtools RNA Virus Extration Kit (BIOTOOLS B&M Labs, S.A.).

Posteriormente, se realiza una retrotranscripción del RNA a DNA para así llevar a cabo la qPCR. Para ello se añaden 200 U M-MLV (Retrotranscriptasa) a 600 ng de RNA (Life Technologies, Carlsbad, USA), así como los correspondientes primers y nucleótidos para la preparación de la mezcla de reacción (Puglia *et al.*, 2013). La reacción se prepara con el kit Power SYBR Green, 3  $\mu\text{L}$  cDNA, 50 nM del forward primer, 50 nM del reverse primer en un volumen de reacción total de 15  $\mu\text{L}$  (Puglia *et al.*, 2013). La qPCR se realiza en un termociclador con detección de fluorescencia en tiempo real StepOne™.

Se utilizaron las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 min, 34 X (95 °C/15 s, 55 °C/15 s, 60 °C/15 s), y la fluorescencia se midió a 60 °C. El número total de copias de RNA viral se calculó multiplicando el número de copias de cDNA por un factor de conversión específico para cada muestra. Cada copia de RNA se corresponde con el mRNA de un lentivirus, por lo que el título del virus se expresó como partículas virales por mililitro (PV/mL) (Puglia *et al.*, 2013).

#### **4.4.2. Transfección con virus a células de la mucosa olfatoria**

Una vez titulada la suspensión viral, se aplican estos lentivirus cargados con el mRNA del gen de interés NT-3 al cultivo de células de mucosa olfatoria.

El número de partículas virales que debemos aplicar por célula viene dado por la MOI (Multiplicity of infection). En este caso usaremos una MOI-10. (Li *et al.*, 2012). Una MOI-10 indica que para la transfección se requieren 10 partículas virales por cada célula.

En este punto se añade el volumen de concentración viral adecuado para la transfección según la titulación y la MOI al cultivo celular diana.

Una vez infectadas las células se deben seleccionar aquellas que hayan incorporado el gen de interés y así sobreexpresen la proteína NT-3. Debido a que el plásmido lentiviral

porta un gen GFP, se pueden seleccionar las células infectadas emisoras de fluorescencia mediante citometría de flujo (McKinnon, 2018). Las células que presenten el gen GFP habrán incorporado también el gen de la NT-3.

Para comprobar que expresan NT-3 se realiza un Western Blot. El Western Blot se realiza en un gel de poliacrilamida. Posteriormente pasamos el resultado a una membrana de nitrocelulosa para generar el revelado. Esta membrana se incuba con un anticuerpo primario policlonal de ratón anti NT-3 (Enomoto *et al.*, 2013) y posteriormente con un anticuerpo secundario anti mouse conjugado con HRP. Se revela con la solución ECL que es emisora de quimioluminiscencia en contacto con el HRP (Kielkopf *et al.*, 2021).

#### **4.4.3. Delección del gen GFP mediante Cre/Loxp**

Para el uso en terapia de estas células modificadas genéticamente, se elimina la secuencia correspondiente a la proteína GFP. Esto se realiza mediante el método Cre/Loxp. La secuencia GFP está flanqueada por secuencias Loxp, lo que permite que al adicionar la enzima Cre recombinasa, se catalice la recombinación entre las secuencias Loxp y se genere la delección del gen flanqueado (Kosior *et al.*, 2019). Esto se realiza para no mantener una expresión de esta proteína in vivo en los pacientes.

Para inducir la delección del gen flanqueado por Loxp utilizamos Cre recombinasa y lipofectamina RNAiMAX (Life Technologies). Se añade Cre recombinasa 10 nM a 1,5 µL de lipofectamina RNAiMAX en DMEM. Posteriormente se tratan las células de mucosa con esta lipofectamina cargada con la proteína Cre recombinasa (Zuris *et al.*, 2015). Aproximadamente 1 día tras la incorporación de la lipofectamina se habrá completado la transfección.

En este punto, la Cre recombinasa debe catalizar la recombinación de las secuencias Loxp y así, deleccionar el gen GFP. Esto ocurre en un tiempo aproximado de 24h /48h. Una vez se ha deleccionado este gen, deja de haber expresión de la proteína GFP en las células. Esto es observable viendo una disminución de la fluorescencia a medida que se degrada el GFP. Para determinar el tiempo que tarda el GFP en degradarse y dejar de emitir fluorescencia tras la delección se realiza un ensayo. Eliminamos el gen GFP y se mide la fluorescencia a diferentes horas. Para seleccionar las células que se usarán en el tratamiento, se usa la misma técnica mencionada anteriormente. Mediante un citómetro de flujo podemos aislar las células que hayan dejado de emitir la fluorescencia

(McKinnon, 2018). De esta manera aislamos las células que se utilizarán en el tratamiento in vivo.

#### **4.5. Ensayos células OECs e hidrogel**

Una vez obtenidas las células y el hidrogel por separado se llevará a cabo su cultivo conjunto en placas multipocillo 6x. Gracias a este cultivo previo se puede llevar a cabo una serie de estudios in vitro necesarios antes de utilizar la terapia en seres vivos, comenzando con ratones.

Primero se esterilizan con rayos UV el hidrogel disuelto en PBS durante 1 hora. Se inyectan 1,2 ml del hidrogel en placas multipocillo 6x y se incuban a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se añade 1 ml de DMEM 10% FBS (o suero autólogo en el caso de humanos) junto con  $5 \times 10^5$  células en cada pocillo (Tan *et al.*, 2009).

Para comprobar si se habían adherido las células correctamente al hidrogel se lleva a cabo un ensayo de proliferación celular CyQuant, siguiendo el protocolo de ThermoFisher.

##### **4.5.1. Estudio de viabilidad celular**

Para llevar a cabo el estudio de viabilidad celular se realiza un ensayo MTT. Estos tipos de ensayos miden la actividad metabólica concreta, por lo que permite comprobar si las células una vez dispuestas en el hidrogel pueden sobrevivir. Se comprueba la citocompatibilidad entre el hidrogel y las células.

En este ensayo se utiliza el MTT (metaylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromide), una sal amarilla y soluble en agua. Lo que ocurre es que es reducida por la enzima succinato-tetrazolio-reductasa (cadena respiratoria mitocondrial) utilizando el NADH como cofactor formando cristales de formazán de color púrpura. Esto se puede asociar a la viabilidad celular ya que las células vivas son las únicas que podrán llevar a cabo la reacción.

Primero se lleva a cabo el cultivo de las células en el hidrogel. A continuación, se añade 500  $\mu$ L de solución de MTT (0,5 mg/mL) a cada pocillo, y las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, los cristales de formazán formados se disolvieron con 100  $\mu$ L de dimetil sulfóxido (DMSO). La viabilidad se cuantificó con un espectrofotómetro a 570 nm (da Fonseca *et al.*, 2020).

#### 4.6. Ensayos in vivo - Animales de experimentación

Para el estudio preclínico del tratamiento planteado, se utilizarán dos especies animales, una murina, más concretamente ratas adultas y una especie con una fisiología más parecida a la humana, el cerdo. Ambas especies se someterán a dos cirugías, una primera durante la cual se provocará la contusión medular y una segunda durante la cual se administrará el tratamiento. En ambas especies se formarán seis grupos experimentales representados en la *Tabla 1*. Por un lado, estarán los animales sometidos a la contusión de médula. Este grupo de animales se dividirá en cuatro más pequeños, ya que se formará un grupo sometido a todos los componentes del tratamiento (células e hidrogel), un grupo que recibirá solamente el hidrogel en la segunda operación, un grupo que recibirá solamente las células en la segunda operación, y un grupo que no recibirá ningún tratamiento en la segunda operación. Por otra parte, habrá un grupo de animales al que se le realizará todo el protocolo operatorio, pero sin la propia contusión de médula y un grupo de animales al que no se le hará ninguna intervención. Los tres últimos grupos servirán de control.

Cada uno de estos seis grupos estará formado por un número de animales diferente y el número de células inyectadas también variará, ambos factores dependiendo de la especie animal (*Tabla 2*).

**Tabla 1:** Grupos experimentales formados para el estudio preclínico.

Grupos experimentales	Tratamiento celular	Hidrogel	Contusión medular	Cirugía
1	X	X	X	X
2	X		X	X
3		X	X	X
4			X	X
5				X
6				

**Tabla 2:** Número de animales por grupo y número de células inyectadas según la especie usada.

Sujeto experimental	Individuos/Grupo experimental	Nº de células
Rata	12	5x10 <sup>5</sup>
Cerdo	4	10 <sup>6</sup>

La manipulación y los procesos quirúrgicos llevados a cabo en estos animales se realizan siguiendo todas las normativas establecidas y por un personal con experiencia y cualificado. Las cirugías, específicamente, se llevarán a cabo por un mismo veterinario cualificado, que realizará el proceso sobre un total de 5 animales por día.

#### **4.6.1. Ensayos postoperatorios**

En ambas especies se deben llevar a cabo una serie de ensayos postoperatorios histológicos tras la segunda cirugía. Se harán en los segmentos cortados tras la disección medular.

#### **Estudio de regeneración axonal.**

Para examinar la regeneración axonal se analiza el tracto corticoespinal, mediante aminodextrano biotinilado (BDA), un trazador anterógrado. Para ello, se debe inyectar en el córtex sensoriomotor, siete meses después de la cirugía, una solución de 10% de BDA. Tres semanas después, los animales son perfundidos. Se analiza también la regeneración de los axones rafe-espinales y coeruleo-espinales mediante inmunohistoquímica.

Para visualizar los axones de las neuronas corticoespinales que contienen el BDA inyectado previamente, se incuban las secciones con estreptavidina conjugada con "Texas red" o fluoresceína. Para visualizar los axones rafe-espinales y coeruleo-espinales, se incuban los segmentos con anticuerpos primarios específicos y posteriormente con anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína o "Texas red".

Por un lado, los anticuerpos primarios monoclonales usados son: los anticuerpos anti-serotonina (en dilución 1/750, estos sirven para observar los axones rafe-espinales) y los anticuerpos anti-dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (en dilución 1/1000, estos sirven para observar los axones coeruleo espinales). Las incubaciones de estos anticuerpos primarios se llevan a cabo en las diluciones mencionadas, a 4°C y durante toda la noche.

Por otro lado, se usan anticuerpos secundarios en dilución 1/100. La incubación con estos anticuerpos secundarios, al igual que con la estreptavidina, se hace durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Una vez preparados los segmentos, se analizan con microscopio de fluorescencia (Ramón-Cueto, A *et al.*, 2000).

#### **Estudios inflamación**

Una vez llevada a cabo la inyección de las células integradas en el hidrogel es necesario evaluar la inflamación que se produce en la médula espinal de los ratones. Para ello se debe estimar el número y el fenotipo de los macrófagos que se encuentran en la lesión.

Para ello primero el borde de la lesión se determinó gracias a GFAP. Los macrófagos M1 se detectaron gracias al anticuerpo anti-CD86 y los macrófagos M2 con anticuerpos anti-CD206. Se evaluó entonces el ratio M2/M1 gracias a la detección mediante un microscopio de fluorescencia (Li *et al.*, 2020).

### **Estudio de angiogénesis**

Para determinar el grado de vascularización se detecta el antígeno RECA-1 de los vasos sanguíneos de las ratas. Este antígeno se encuentra en el endotelio, capa de células que recubre la superficie interior de los vasos sanguíneos. La vascularización es necesaria para la reparación, mantenimiento y funcionamiento de los tejidos, por lo que es necesario que se encuentre en la lesión medular.

Para su detección se utiliza la inmunofluorescencia gracias al anticuerpo anti-RECA-1. Todos los vasos sanguíneos se van a teñir de color rojo gracias al anticuerpo secundario conjugado con Texas Red y el resto con DAPI (azul) (Li *et al.*, 2020)

#### **4.6.2. Ratas**

Como modelo murino se usan ratas de la cepa Wistar. Se realiza una contusión para simular el daño medular. Posteriormente, los animales se someten a una segunda cirugía en la cual se limpia la cicatriz glial y se administra el tratamiento propuesto. Se analiza la mejora en los animales y se espera ver una recuperación de funciones locomotoras y reflejos sensoriomotores entre 3 y 7 meses después de la segunda cirugía en las ratas tratadas.

Se usan un total de 60 ratas adultas hembras (edad de 2,5 meses y con un peso de alrededor de 200-230g). Se hacen seis grupos experimentales ya explicados en la *Tabla 1*, cada uno formado por 12 ratas (Ramón-Cueto, A *et al.*, 2000).

Todas las ratas de los grupos sometidos al daño medular reciben la cirugía de contusión a nivel de la T10, mediante un marco estereotáctico y un impactador controlado informáticamente, lo que asegura la reproducibilidad del proceso quirúrgico (Vibhor Krishna *et al.*, 2013).

Por otro lado, 6 semanas después de la primera intervención quirúrgica, y tras haber hecho un seguimiento y cuidado que se detalla a continuación, las ratas se someten a una segunda operación, en la cual se limpia la cicatriz glial y se administran las células de mucosa aisladas previamente y modificadas genéticamente, junto con el hidrogel ya descrito. Las 6 semanas entre las dos operaciones se considera tiempo suficiente para

que la lesión medular se convierta en crónica, y por otra parte permite poder llevar a cabo los análisis necesarios para verificar que la primera cirugía se ha realizado correctamente. Además, asegura un tiempo de recuperación adecuado para el bienestar de los animales.

### **Primera cirugía**

La cirugía elegida para representar el daño medular es una contusión grave. El preoperatorio, la cirugía y el postoperatorio se llevan a cabo según el protocolo establecido por Vibhor Krishna *et al.*, (2013) que ha demostrado tener una tasa de supervivencia del 93.4% (Krishna, Vibhor *et al.*, 2013).

#### **Preoperatorio**

Una hora antes de la operación se administran antiinflamatorios y antibióticos (buprenorfina 1.5 ml de 0.006 mg/ml subcutánea y Baytril 4 mg/kg subcutánea respectivamente). Se anestesian las ratas con 90 mg/kg de Ketamina y se espera hasta ver que no hay respuesta al pellizcar la pata. Tras palpar y encontrar apófisis de la T10, se marca la zona. Se rasura un rectángulo de 3 cm x 6 cm con la zona marcada en medio. Se limpia la piel tres veces con Betadine y se aplica lubricante oftálmico a los ojos. Se lleva a la rata a la zona operatoria donde se regula su temperatura corporal para mantenerla a 37,5°C (Krishna, Vibhor *et al.*, 2013).

#### **Proceso quirúrgico**

La cirugía comienza con una incisión de 4 cm centrada en la marca de T10 ya hecha. Se sigue con la disección de la fascia y diferentes capas musculares, hacia las apófisis y láminas espinosas de la T9 y T11. Se separa, mediante un retractor, el músculo y fascia del hueso. Se sigue el proceso con la estabilización de la lámina espinosa de la T9 y la división del ligamento interespinosa entre la T9 y T10 usando tijeras. Se hace el mismo proceso con la T11, pero cortando el ligamento entre la T10 y T11. Se completa la división de ligamentos, dando acceso a la duramadre. Se usan ruginas para realizar una laminectomía bilateral en T10. Se retiran la apófisis y láminas espinosas de la T10.

Posteriormente se pone a la rata en la posición adecuada para la siguiente parte de la cirugía. Se inmoviliza la columna vertebral, utilizando pinzas para sujetar la parte lateral de T11 y de T9. Tras esta estabilización se utiliza un impactador previamente preparado para producir la lesión de interés. En este caso, la configuración usada es la siguiente: una punta de 3.0 mm a una velocidad de 4 cm/s con una profundidad de 2mm y un

tiempo de 0,3s. Se extiende la punta y se baja hasta que esté en contacto con la médula espinal. Se baja 2mm y se libera el pistón a 4 cm/s para que se realice la lesión.

Finalmente se cose el músculo y fascia con puntos en figura de 8, sin aplicar ninguna presión innecesaria a la médula. Se cierra la piel con un mínimo de dos grapas pequeñas, aunque se pueden usar hasta 5 si es necesario (Krishna, Vibhor *et al.*, 2013).

### Postoperatorio

Tras esta primera cirugía, se mantienen a las ratas en las condiciones necesarias, y rigurosamente reguladas para asegurar su bienestar y el buen resultado del experimento. Para ello, se mantendrán a las ratas juntas, ya que siendo hembras y de la cepa Wistar esto no supone un problema. Además, dada su movilidad comprometida, se tiene que cambiar el método de alimentación y cuidado. Este se adaptará a las condiciones. La alimentación debe cambiar a pienso mojado en la viruta. Se debe mantener el peso corporal entre 270 y 300g. Este peso se controla de forma semanal, y se administra la cantidad necesaria de comida para mantenerlo (Ramón-Cueto, A *et al.*, 2000).

En las 24h siguientes a la operación, se mantienen las ratas en un ambiente entre 33-35°C en una incubadora mientras siguen inconscientes y posteriormente en una jaula adaptada cuando se puedan mover. Una vez estén despiertas, se administra 5ml de solución salina, 1.5 ml (0.006 mg/ml) de buprenorfina y 0.1 ml de Baytril, todo subcutáneamente.

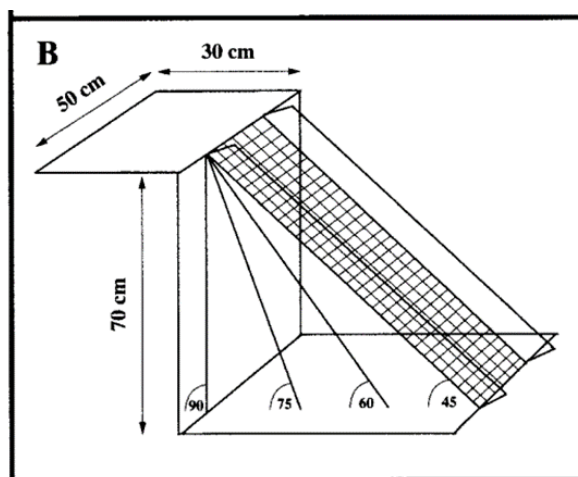
Se continúa administrando buprenorfina subcutáneamente dos veces al día en los primeros dos días, y Baytril una vez al día en los primeros 7 días. Por otra parte, se debe expresar la vejiga tres veces al día hasta que se recupere la función. Se tienen que controlar varios factores como la aparición de posibles infecciones, la actividad física, o los posibles problemas de cura de la herida (Krishna, Vibhor *et al.*, 2013).

Se regulan diferentes criterios de daño establecidos previamente para asegurar el bienestar animal. En esta lista de criterios de daño se incluye el aspecto del pelaje, el peso, la temperatura corporal, la lordiosis etc. Estos factores se monitorizan por un mismo individuo (para evitar cualquier tipo de subjetividad), cada 3 días. Estos criterios de daño y dolor se califican en una escala del 1-4, y si cualquiera de ellos puntúa más de un cuatro, se tendrá que establecer un punto final humanitario.

Para verificar que la contusión se ha llevado a cabo correctamente y ha provocado el daño esperado en las ratas, se llevan a cabo una serie de pruebas. Todas las ratas se someten a estas pruebas antes de la primera operación, por lo que ya han aprendido el proceso.

### Pruebas postoperatorias

En primer lugar, los animales se someten a una prueba de escalada, compuesta por cuatro niveles de dificultad dependiendo del ángulo de inclinación de la rejilla a escalar. El nivel 1 tiene un ángulo de inclinación de  $45^\circ$ , y los siguientes niveles de  $60^\circ$ ,  $75^\circ$  y  $90^\circ$  respectivamente (*Figura 7*). La prueba se compone de dos partes, ya que por un lado existe el factor del plano inclinado, y por otro lado el factor de las propias rejillas.



**Figura 7.** Esquema explicativo del dispositivo de escalada empleado en las pruebas postoperatorias en ratas Wistar (Ramón-Cueto, A *et al.*, 2000).

Para superar cada nivel, las ratas tienen que llegar a la parte superior de la inclinación y alcanzar una plataforma horizontal lisa. La rejilla inclinada tiene bordes para evitar que los animales se caigan. Tras superar la prueba, los animales reciben una recompensa. Para evitar la desmotivación de las ratas que no son capaces de llegar a la plataforma horizontal lisa, se les coloca una rejilla con cuadrados de 1 cm x1 cm que les permite agarrarse con las patas delanteras. Si logran llegar a la plataforma de esta manera, se recompensan también.

Solo se tendrán en cuenta los animales que intentan llegar a la plataforma.

Tras la primera operación, se llevan a cabo estas pruebas de forma semanal para comprobar la falta de función motora en ratas contusionadas y la función motora normal en ratas control. El plano inclinado permite evaluar el movimiento voluntario de las patas

traseras además del soporte del propio peso corporal. Las rejillas que componen la rampa permiten evaluar el movimiento voluntario, el posicionamiento correcto de los pies y la coordinación. Esta prueba permite por tanto estudiar los reflejos locales y el movimiento voluntario propio.

Los siguientes factores para estudiar mediante diferentes pruebas son: la respuesta al toque ligero y al plegamiento de articulaciones de las patas traseras. El análisis de la respuesta al toque ligero se hace tocando ligeramente la parte dorsal de cada pata. Para analizar la respuesta del plegamiento de las articulaciones se doblan las articulaciones a nivel de la cadera.

Las ratas control que no se han sometido a la contusión, deberían responder a los estímulos levantando la pata y apoyándola en la superficie para asegurar su soporte. En las ratas contusionadas esta respuesta debería desaparecer.

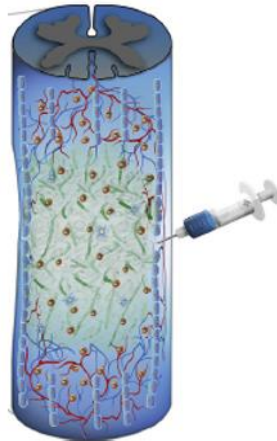
Estas características de las patas traseras se analizan de forma semanal y se evalúan entre 0 y 2. El 0 se puntúa cuando no haya ninguna respuesta, el 1 cuando haya una respuesta normal en una pata y el 2 cuando haya una respuesta normal en ambas patas. Dado que algunas ratas pueden tener movimientos causados por reflejos, solo se consideran respuestas positivas aquellas donde el movimiento y apoyo de la pata se haga de forma completa. Cada pata se debe evaluar tres veces cada semana y solamente se establece como respuesta positiva si hay un movimiento claro por lo menos dos de las tres veces. Además, esta situación debe darse durante dos semanas consecutivas (Ramón-Cueto, A *et al.*, 2000).

### **Segunda cirugía**

Después de haber comprobado, mediante los análisis descritos, que la primera cirugía se ha llevado a cabo con éxito, los animales se someten a la segunda operación.

El objetivo de este segundo proceso es, como ya se ha descrito, limpiar la cicatriz glial y administrar las células modificadas, el hidrogel, o ambos, dependiendo del grupo de ratas del que se trate. Para ello, las ratas se someten al mismo proceso de apertura descrito para la primera operación.

Una vez comprobada la viabilidad de las células en el hidrogel se lleva a cabo su inyección en la zona de la lesión. La inyección se hace directamente en la lesión el hidrogel junto con las células ( $5 \times 10^5$  células), representado en la *Figura 8*. Para la inyección se utiliza la bomba Harvard 22, se debe suministrar toda la mezcla en un periodo entre 1 y 4 minutos para evitar que se dé la gelificación antes de ser administrado al sujeto.



**Figura 8:** Representación gráfica de la inyección del hidrogel con las células en la zona de la lesión medular (Li *et al.*, 2020).

Las ratas se someten al mismo proceso de recuperación al cual se sometieron después de la primera cirugía. Además, se llevan a cabo las mismas pruebas, con el fin de observar si en las ratas tratadas hay algún tipo de mejora.

#### Pruebas postoperatorias

Se llevan a cabo las tres pruebas descritas en el apartado anterior: de escalada, de toque ligero y de plegamiento de las articulaciones traseras. Se deben realizar una vez a la semana durante los seis meses posteriores a la administración (o no, en caso de los grupos control) del tratamiento.

La diferencia en el protocolo es que su objetivo no es verificar que el proceso quirúrgico se haya llevado a cabo correctamente, sino que el tratamiento administrado es efectivo en la recuperación de los animales.

En la prueba de escalada de los planos inclinados con diferentes ángulos, se espera ver que las ratas tratadas logran superar la prueba mejor que las no tratadas y mejor que tras la primera cirugía. Se espera ver que logran pasar a niveles superiores a 1.

En cuanto a las pruebas de toque ligero y plegamiento de las articulaciones, se esperará ver una recuperación en la respuesta de apoyo de patas traseras.

Para asegurar objetividad en estas pruebas comportamentales, las observaciones se deben llevar a cabo por tres individuos diferentes, todos ciegos al tratamiento. Se forman tres grupos de dos investigadores cada uno. La recuperación funcional se debe analizar por un grupo diferente cada semana y se graba. Las grabaciones son analizadas por dos investigadores, también ciegos al tratamiento. Las respuestas se tienen en cuenta solamente si los resultados de los dos examinadores grabados y de los análisis de las grabaciones coinciden (Ramón-Cueto, A *et al.*, 2000).

### **Disección de la LME**

Finalizado el periodo de estudios de la recuperación motora y sensorial tras el tratamiento, realizamos una disección de la médula espinal para hacer un análisis del estado de la región de la LME.

Las ratas son anestesiadas profundamente con inyección de pentobarbital (200 mg/kg) ip (Nembutal, CEVA Santé Animale, Libourne, Francia) y perfundidas con 250 ml de NaCl 0,09% (4 °C) seguido de 500 ml de paraformaldehído al 4% (4 °C) en solución salina tampón de fosfato de 0,1 M (PBS, pH 7,4). La médula espinal se disecciona rápidamente y se fija en el mismo fijador durante 24 h a 4 ° C y luego se mantiene durante 48 h en sacarosa al 30% para crioprotección. Se toman dos bloques de tejido de 0,75 cm de longitud de ambos lados del epicentro de la lesión (Quertaintmont *et al.*, 2012). Los bloques de tejido se seccionan transversalmente con un criostato, en secciones en serie de 15 µm, se montan en portaobjetos de vidrio supercongelantes y se almacenan a -20 ° C. Estos cortes se emplean para llevar a cabo los ensayos histológicos, mencionados en el apartado 4.6.1.

#### **4.6.3. Cerdos**

El modelo de animal murino ya descrito es de gran interés para el estudio de este tratamiento, pero presenta varias limitaciones. Las más evidentes y limitantes son el tamaño y la diferencia en fisiología de las ratas en comparación con el humano. Esta diferencia no solo influye a la hora de generar la lesión medular de interés, sino además a la hora de administrar el tratamiento.

Se puede plantear la duda de si nuestro tratamiento celular tiene la misma supervivencia, migración e integración en un modelo humano al que se le tendría que administrar una cantidad mucho más grande de suspensión celular e hidrogel. También se podría pensar que esta administración de un volumen más elevado podría generar un daño local mayor en la médula espinal, lo cual sería contraproducente. Finalmente

se podría plantear la duda de si la regeneración axonal generada en ratas realmente sería significativa en una lesión de tamaño más grande producida en humanos. Estas son algunas de las dudas y limitaciones que seguramente han provocado que una gran parte de los tratamientos planteados en proyectos anteriores, no hayan logrado pasar de la preclínica a la clínica (Lee, Jae H T *et al.*, 2013).

De aquí el interés de plantear el estudio de nuestro tratamiento en un modelo animal más cercano en tamaño y fisiología al humano: el cerdo.

Esta parte del proyecto de investigación se llevaría a cabo solamente si la etapa anterior en ratas demuestra ser eficiente.

En este estudio se propone el uso de cerdos miniatura Yucatán (hembras de entre 20-25 kg), que, aunque evidentemente siguen presentando diferencias en tamaño y fisiología, presentan un tamaño de médula espinal más parecida a humanos que las ratas (Lee, Jae H T *et al.*, 2013).

La cercanía en fisiología y anatomía de este tipo de cerdo al humano está muy estudiada, y se ha empleado ya como modelo en otras investigaciones de infarto, daño cerebral traumático y daño de la médula espinal. Son animales de fácil acceso, fáciles de entrenar, y fáciles de mantener siempre y cuando se disponga de las instalaciones y personal adecuado (Lee, Jae H T *et al.*, 2013).

Se emplean seis grupos experimentales de animales explicados en la *Tabla 1*, cada uno formado por 4 animales.

Al igual que en las ratas, se realizan dos cirugías, una primera en la cual, mediante un impacto, se genera la lesión medular de contusión, y una segunda en la cual se limpia la cicatriz glial y se administra (o no, dependiendo del grupo del que se trate) el tratamiento de células e hidrogel.

### **Primera Cirugía**

La cirugía elegida para representar el daño medular es una contusión grave. El preoperatorio, la cirugía y el postoperatorio se llevan a cabo según el protocolo establecido por Lee, Jae H T *et al.* (2013).

## Preoperatorio

Se lleva a cabo una preanestesia de los animales con una inyección intramuscular de Telazol (4–6 mg/kg), xilacina (0.6 mg/kg), y atropina (0.02 mg/kg). Se entuban en traquealmente y se mantienen con isoflurano (2 – 2.5%) durante todo el proceso. A continuación, se administran los antibióticos y antiinflamatorios necesarios. Se administra cefazolina (15 mg/kg) de forma intravenosa y ketoprofeno (3 mg/kg) y morfina (0.5 mg/kg) de forma intramuscular de forma previa a la operación.

Como anestesia local se emplea Bupivacaine (1 mg/kg) administrado de forma subcutánea. Para preparar al animal a las condiciones postoperatorias que sufrirá por el daño medular, se debe insertar un catéter urinario para el drenaje de la vejiga. Se mantiene una ventilación y volumen tidal adecuado.

Durante toda la operación se monitorizan varios parámetros de interés: el ritmo cardíaco, el ritmo respiratorio, la presión arterial etc. Además de estos parámetros, se mide la temperatura corporal del animal, que se debe mantener entre 37.0 y 38.5°C. Se asegura también la hidratación adecuada mediante la administración intravenosa de solución Ringer (Lee, Jae H T *et al.*, 2013).

## Proceso quirúrgico

El primer paso en el protocolo quirúrgico es localizar la T10, que, debido a la variación que se puede encontrar en cerdos, se lleva a cabo mediante una radiografía.

Una vez localizada la zona de interés, se realiza una incisión de 12 cm entre T8 y T13, y se hacen accesibles la apófisis y láminas espinosas entre T9 y T12. Se lleva a cabo una laminectomía en la T10 de forma parecida a las ratas y se lleva a cabo la contusión empleando el impactador de 7mm de diámetro y 50g. Se encuentra a una altura de 20 cm y se produce una compresión durante 10 min (Lee, Jae H T *et al.*, 2013).

## Postoperatorio

Tras haber terminado el proceso quirúrgico, se cosen las capas musculares y de piel, y se administra cefazolina (25 mg/kg) y ketoprofeno (1 mg/kg) por vía intramuscular durante los siguientes 5 días. Las primeras 12h tras la operación, se mantienen los animales en ayunas. Se deben mantener aislados durante las primeras 48h y posteriormente se mantienen en parejas. Se mantienen en las mismas condiciones de recuperación postoperatorias que las ratas, con una vigilancia muy rigurosa. Se

someterán también a las diferentes pruebas que permitirán asegurar que la cirugía y el daño medular se han llevado a cabo adecuadamente (Lee, Jae H T *et al.*, 2013).

### Pruebas postoperatorias

Para ello, se someterán a las pruebas evaluadas por la escala comportamental porcina de daño torácico. Esta escala tiene 10 niveles de puntuación. Los tres primeros niveles describen diferentes grados de arrastre, los tres intermedios de capacidad de dar pasos y los últimos tres de caminar.

Los cerdos, aproximadamente tres semanas antes de la primera cirugía, se entrenan para caminar cuando se les pide, por un tapete de goma de 1.22 m de ancho y 5 m de largo. Una semana antes de la cirugía se establece la función locomotora basal a la cual se comparan con los resultados postoperatorios.

Se graba la prueba de función locomotora tres días después del primer proceso quirúrgico y una vez a la semana hasta el segundo procedimiento.

Se analizan las grabaciones de diferentes momentos del proceso de recuperación (Lee, Jae H T *et al.*, 2013).

### Segunda cirugía

Al igual que en el estudio con las ratas, después de haber comprobado, mediante los análisis descritos, que la primera cirugía se ha llevado a cabo con éxito, los animales se someten a la segunda operación. Además, esta segunda cirugía se debe realizar una vez que la lesión medular se pueda considerar como lesión crónica. Este tiempo es de aproximadamente seis meses.

El objetivo de este segundo proceso es, como ya se ha descrito, limpiar la cicatriz glial y administrar las células modificadas, el hidrogel, o ambos, dependiendo del grupo de cerdos del que se trate. Para ello, los cerdos se someten al mismo proceso de apertura descrito para la primera operación.

El proceso de administración de las células en el hidrogel en la médula lesionada se lleva a cabo siguiendo el mismo protocolo que en las ratas, pero con un mayor número de células:  $1 \times 10^6$ . Los cerdos se someten al mismo proceso de recuperación al cual se sometieron después de la primera cirugía. Además, se llevan a cabo las mismas pruebas, con el fin de observar si en los animales tratados hay algún tipo de mejora.

## **Disección de la LME**

Finalizado el periodo de estudios de la recuperación motora tras el tratamiento, realizamos una disección de la médula espinal para hacer un análisis del estado de la región de la LME.

Los cerdos son anestesiados profundamente con pentobarbital sódico y perfundidos transcárdicamente con paraformaldehído tamponado al 4% (pH 7,4). Inmediatamente después de la perfusión, la médula espinal fue expuesta por laminectomía y diseccionada. Los tejidos recolectados se colocaron en el mismo fijador (durante 20 minutos a temperatura ambiente), se lavaron varias veces en tampón de fosfato de 0,1 M y se almacenaron en sacarosa tamponada al 18% a 4 °C. Las médulas espinales se seccionaron con criostato Zeiss HM525 en secciones transversales seriadas de 15µm (Lepiarczyk *et al.*, 2020). Estos cortes se emplean para llevar a cabo los ensayos histológicos, mencionados en el apartado 4.6.1.

### **4.7. Análisis estadísticos**

Una vez obtenidos los datos de las pruebas de funcionalidad motora tanto en animales como en humanos, se realizan análisis estadísticos para comprobar que las diferencias encontradas se deben al tratamiento o al azar.

En primer lugar, se realizan análisis gráficos de tendencia para observar si existe progreso o no en las capacidades motoras de los sujetos de experimentación. Si se observan diferencias frente a los sujetos control se deben realizar otro tipo de análisis estadísticos para comprobar que las diferencias observadas se deben a el tratamiento y no al azar. Estos análisis se realizan mediante pruebas ANOVA de dos factores: 1. El tratamiento con 6 niveles correspondientes a los diferentes tratamientos: sujetos con tratamiento celular + hidrogel, sujetos con hidrogel, sujetos con tratamiento celular, sujetos sin tratamiento celular y sin hidrogel (todos ellos con la LME), el grupo control sin lesión medular y con cirugía y el grupo control sin ningún tipo de intervención.

El tiempo tras el trasplante con X niveles, siendo X = número de semanas post-trasplante en las que se pasa la prueba de comportamiento (según el modelo que se esté evaluando, rata o cerdo).

Se toma como variable independiente la correspondiente a los valores obtenidos en cada prueba de comportamiento, para los diferentes grupos y a los diferentes tiempos.

Si alguno de los factores es significativo, se realizan pruebas post-hoc de comparación múltiple entre medias (prueba de Tukey).

Estos análisis se realizan en el entorno estadístico R. Se considerarán resultados significativos aquellos que presenten un valor de  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## **4.8. Ensayos clínicos**

### **4.8.1. Diagnóstico:**

Tras el traumatismo y estabilización, salvando variaciones entre hospitales, la mayoría de los pacientes son sometidos a un examen neurológico (que incluye un examen motor y sensorial voluntario de cada extremidad y un examen rectal) y se les toma fotos de la médula espinal (utilizando, por ejemplo, rayos X, MRI o TC) si se sospecha una LME. Posteriormente, el examen clínico o las imágenes radiográficas tempranas son seguidas por imágenes avanzadas y exámenes neurológicos detallados (electrofisiológicos; Ahuja *et al.*, 2017).

### **4.8.2. Selección de pacientes/ criterios de admisión:**

En el experimento se inscriben pacientes (el número por fase viene descrito por la *Tabla 3.*) con una LME crónica (más de 6 meses post-traumatismo) y completa [de acuerdo con la “American Spinal Injury Association” (ASIA) de clasificación A]. La operación y el seguimiento son realizados en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Los criterios de inclusión y exclusión seguidos son:

- Criterios de inclusión: (i) Hombre o mujer entre 18 y 65 años de edad, (ii) LME completa entre la sección torácica 5 y 12 (*Figura 9*); por debajo de la sección torácica 6 para evitar síndromes como el de la disreflexia autonómica), (iii) no haya sufrido mejoras significativas en su lesión desde el traumatismo, (iv) que realizarán regularmente fisioterapia y continúen haciendo después de la operación con la terapia.(v) que los pacientes hayan firmado el documento de consentimiento, (vi) que sean capaces y quieran realizar visitas regulares al hospital y participar en los exámenes de seguimiento del estudio.

INTERNATIONAL STANDARDS FOR NEUROLOGICAL CLASSIFICATION OF SPINAL CORD INJURY (ISNCSCI) ASIA AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION ISCOS

Patient Name \_\_\_\_\_ Date/Time of Exam \_\_\_\_\_  
 Examiner Name \_\_\_\_\_ Signature \_\_\_\_\_

**RIGHT** **MOTOR KEY MUSCLES** **SENSORY KEY SENSORY POINTS** **SENSORY KEY SENSORY POINTS** **MOTOR KEY MUSCLES** **LEFT**

**UER** (Upper Extremity Right) **UEL** (Upper Extremity Left)

**LER** (Lower Extremity Right) **LEL** (Lower Extremity Left)

(VAC) Voluntary Anal Contraction (Yes/No)  (DAP) Deep Anal Pressure (Yes/No)

**MOTOR SUBSCORES** **SENSORY SUBSCORES**

**NEUROLOGICAL LEVELS** **3. NEUROLOGICAL LEVEL OF INJURY (NLI)** **4. COMPLETE OR INCOMPLETE?** **6. ZONE OF PARTIAL SENSORY PRESERVATION**

Page 1/2 This form may be copied freely but should not be altered without permission from the American Spinal Injury Association. REV 04/19

**Figura 9:** Formulario de examen clínico de las Normas Internacionales para la Clasificación Neurológica de la Lesión de la Médula Espinal. La evaluación estandarizada y el cálculo de las puntuaciones motoras y sensoriales se demuestran en esta plantilla. Reimpresión del formulario de evaluación ISNCSCI de la American spinal injury association (2019).

- Criterios de exclusión: (i) El paciente posea graves complicaciones, (ii) antecedentes de reacciones alérgicas o inmunomediadas potencialmente mortales, (iii) presencia de anomalías clínicamente significativas en los exámenes de rutina del laboratorio, (iv) Mujer lactante o embarazada, (v) participación en cualquier otro ensayo clínico dentro de los 3 meses anteriores a la inscripción, (vi) cumplimiento deficiente o dificultad para completar los requisitos del estudio.

**Tabla 3:** Número de pacientes por fase clínica y número de células inyectadas.

Sujeto experimental	Individuos/Grupo experimental		Nº de células
Humano	Fase I	5 - 20	10 <sup>6</sup>
	Fase II	25 - 100	
	Fase III	300	

### 4.8.3. Cirugía Humanos

La cirugía se realiza en pacientes que cumplen los criterios de inclusión previamente establecidos y una vez que la lesión sea considerada como crónica. Entre el momento

que se produce la lesión y el momento de esta cirugía, el paciente debe participar en sesiones de rehabilitación fisioterapéutica.

El proceso quirúrgico se realiza aproximadamente seis semanas después de la extracción de las células de interés y de la expansión y modificación genética de las mismas.

El objetivo de la cirugía es administrar el tratamiento compuesto por las células autólogas de la glía envolvente modificadas genéticamente, junto con el hidrogel escogido. Además, se limpia la cicatriz glial.

Al igual que las operaciones en animales, éstas se deben llevar a cabo por el mismo individuo o equipo. En este caso, se llevan a cabo por el mismo equipo de neurocirujanos.

### **Preoperatorio**

Antes de comenzar el proceso quirúrgico, el paciente se somete a anestesia general, administrada por intubación endotraqueal. Además, se le administran los antibióticos profilácticos necesarios.

Se prepara la piel de la zona de interés con Betadine alcohólico y la línea de incisión propuesta se infiltra con bupivacaína 0.5% con 1 : 200.000 de adrenalina. Además, se administra un gramo de cefazolina por inducción y se repite a las 4h (Féron, F *et al.*, 2005).

### **Cirugía**

El paciente se coloca en posición “park bench”, lo que asegura el acceso seguro a la zona de interés. El proceso quirúrgico se realiza en dos etapas diferentes. La primera consiste en realizar una incisión de línea media, seguida de una laminectomía y de la apertura de la duramadre a nivel de la lesión. Se llega a la médula por una mielotomía de la línea media posterior. En el caso que fuera posible, se hace un anclaje posterior y posterolateral de la médula. Se retira el tejido sobrante de la cicatriz para dar acceso a la contusión (Carlos Lima MD *et al.*, 2016).

En la siguiente etapa, se procede con la limpieza de la cicatriz glial y una vez que la médula espinal sea accesible, se procede a la administración del tratamiento. La inyección de las células y del hidrogel se realiza con una aguja desechable específica a la zona de la lesión. Se hace una punción en el lugar donde termina la zona de médula

espinal sana y comienza la zona de médula espinal lesionada. La profundidad y el ángulo de la punción se deben supervisar mediante escaneos de tomografía computarizada y su reconstrucción tridimensional. Como agente de contraste para ver la médula, se inyecta iodixanol en el espacio subaracnoideo. La aguja se inyecta lentamente en la médula, introduciendo un total de  $10^6$  células junto con el hidrogel (Cheng *et al.*, 2014).

Se cierra la duramadre con grapas absorbibles y se recubre en Gelfoam. Además, se aplica un sistema de drenaje de herida sobre el Gelfoam y se conecta con una bolsa a la cual llegará la sustancia drenada. Finalmente se cierra la herida por capas (Féron, F *et al.* 2005).

Posteriormente a la cirugía, los pacientes son llevados a la unidad de cuidados intensivos postquirúrgicos.

#### **4.8.4. Análisis postoperatorios**

En los 6 meses posteriores a esta cirugía, la mejoría de los pacientes se mide mediante una serie de escalas que analizan diferentes parámetros indicativos de la mejoría neurológica y urodinámica. Los análisis mencionados se deben llevar a cabo por un único asesor de rehabilitación, que no conoce el tratamiento ni la organización de los grupos de pacientes.

Los análisis de eficacia se hacen de manera previa al tratamiento y 6 meses después del mismo. Se miden diferentes factores mediante la escala ASIA, la escala de fuerza muscular manual, la escala de tensión muscular (Cheng *et al.*, 2014). y el Index Barthel: la fuerza muscular, la tensión muscular, la sensación de piernas paralizadas y la capacidad de autocuidado.

Se deben realizar varios exámenes clínicos en todos los pacientes, incluyendo recuento de células, evaluación de parámetros bioquímicos (dosificación de electrolitos: sodio, potasio y magnesio), análisis de urea y creatinina para evaluar la funcionalidad renal, marcadores de coagulación, funcionalidad hepática, análisis de glucosa y colesterol total para evaluar el perfil metabólico, y análisis de orina y cultivos. También se realiza la serología necesaria para la transfusión de sangre, el electrocardiograma y los exámenes radiológicos (ClinalTrial.gov, NCT02152657).

Para comprobar que se ha recuperado la conducción nerviosa y la función neurológica se debe hacer un electromiograma de aguja (EMG). Gracias al EMG se puede analizar

las señales eléctricas derivadas de fibras musculares tanto en reposo como en contracción voluntaria (Rubin., 2019). También son necesarias unas pruebas de imagen como la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) de la médula espinal a nivel torácico y lumbar.

Dado que la lesión medular tiene efecto sobre la capacidad urinaria, es necesario analizar la recuperación de esta capacidad. Para ello, se miden la presión de la vejiga, el volumen de la vejiga, la presión de vaciado y la tasa de flujo. Se miden empleando el sistema urodinámico Medtronic. Además, se analizan la tasa de flujo urinario máxima, la capacidad de la vejiga máxima, el volumen residual de orina, y la presión máxima del detrusor. Estos análisis se llevan a cabo antes del tratamiento y seis meses después, en el grupo que ha recibido el tratamiento y en el grupo que ha recibido la fisioterapia.

Con el objetivo de supervisar los progresos en la cartografía sensorial y la mejora del dolor neuropático, se realizarán análisis clínicos de los pacientes y cuestionarios (ClinalTrial.gov, NCT02152657).

#### **4.8.5. Fase I**

Durante la fase I de estudio, el objetivo principal es evaluar la viabilidad en términos de seguridad y factibilidad de la administración de OECs, en el hidrogel, en sujetos con LME crónica.

Es de vital importancia evaluar la seguridad y la eficacia potencial de la administración autóloga de OECs junto con el hidrogel. Para ello se debe realizar la caracterización de las células mediante la evaluación por citometría de flujo, el ensayo de diferenciación y el análisis del cariotipo de banda G, además de testar su esterilidad (ClinalTrial.gov, NCT01325103).

En este estudio, se incluyen entre 5 y 20 pacientes afectados por una paraplejía completa y una LME durante al menos seis meses, clasificada como Lesión Espinal Americana (ASIA). Tras los procedimientos quirúrgicos, los pacientes se someten a una serie de evaluaciones neurológicas.

A los seis meses del trasplante, se evalúa la sensibilidad y la fuerza motora en los miembros inferiores mediante el grado AIS en la puntuación ASIA y se realiza pruebas de laboratorio como el potencial evocado somatosensorial, la TC y la RM a nivel torácico y lumbar (ClinalTrial.gov, NCT02152657). Además, se deben realizar todos los análisis postoperatorios que vienen recogidos en el apartado 3.8.4.

#### **4.8.6. Fase II**

A lo largo de la fase II es necesario comprobar la eficacia del tratamiento propuesto para los pacientes con lesión medular. En esta fase utilizan entre 25 y 100 pacientes con el mismo tipo de lesión utilizando el método más seguro, ya comprobado en la fase I. Este estudio se lleva a cabo con 60 personas (ClinalTrial.gov, NCT01393977)

Para comprobar que el tratamiento produce una mejora en los pacientes con lesiones medulares se lleva a cabo una comparación con pacientes que están realizando rehabilitación de la función de las extremidades.

Después de 3 meses de inyectar el hidrogel con las células en los pacientes se debe comprobar si se ha recuperado la conducción nerviosa y la función neurológica. Para ello se utiliza un electromiograma de aguja, EMG (ClinalTrial.gov, NCT01393977). Además, se deben realizar todos los análisis postoperatorios que vienen recogidos en el apartado 3.8.4.

#### **4.8.7. Fase III**

En un ensayo en fase III, se evalúa en primer orden la eficacia. También se presta la atención a la seguridad y a la aparición de nuevos efectos secundarios, pero esto ha tenido que ser estudiado ya en fases previas. La diferencia fundamental con la fase II es el aumento considerable de pacientes. En nuestro caso se seleccionan 300 sujetos siguiendo los criterios de selección determinados anteriormente (ClinicalTrials.gov, NCT01873547).

El objetivo es comparar la eficacia de los pacientes de los distintos grupos experimentales. De esta manera se determina la efectividad real de tratamiento frente a los controles. Los estudios y ensayos que se realizan para la valoración de la eficacia son iguales que los descritos en fase II.

En caso de finalización de esta fase con resultados favorables, se procede a la autorización del tratamiento por las agencias reguladoras. Toda la información referida a los estudios de eficacia y seguridad preclínicos y clínicos deben ser entregados a estas agencias para que valoren si se puede comercializar. En nuestro caso, se contacta con la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) y con la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). En el caso que sea aceptado, se comienza con la última fase (Fase IV) donde se evalúa la seguridad de la terapia a largo plazo. Esto se conoce como farmacovigilancia.

## 5. DISCUSIÓN

La LME es una condición devastadora con grandes efectos fisiológicos además de socioeconómicos que afecta aproximadamente a 27 millones de personas en el mundo (Bradbury & Burnside, 2019). Se conocen cada vez mejor los factores sobre la fisiopatología de la LME, sin embargo, no hay ninguna terapia establecida que consiga: en primera instancia, neutralizar la cascada de eventos dañinos desencadenado por la LME en las fases aguda y subaguda; y en segunda instancia, ya estabilizado el paciente y formada la cicatriz glial, que consiga la definitiva regeneración de la médula espinal y restauración de las conexiones nerviosas perdidas. En cualquiera de los casos, todas las terapias en fase clínica presentan ventajas y desventajas cuyo mejor remedio es la combinación de varias terapias para compensar las deficiencias (Xiao *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017; Ahuja *et al.*, 2017; Venkatesh *et al.*, 2019).

En las terapias celulares encontramos un gran número de tipos celulares como, por ejemplo, células madre (neurales, mesenquimales, etc), células de Schwann, células de la glía envolvente olfatoria, etc. Nuestro grupo de laboratorio optó por las células de la glía envolvente olfatoria por sus excelentes propiedades de soporte e inducción del crecimiento axonal, su capacidad para reducir la cicatriz glial y de entremezclarse con los astrocitos, además de su fácil acceso en la mucosa olfativa (Guerout *et al.*, 2014). Esta decisión se tomó en consideración a sendas desventajas que presentan el resto de las terapias celulares, por mencionar algunas (Venkatesh *et al.*, 2019):

- Las células madre neurales aportan buenos resultados debido a su potencial de convertirse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Sin embargo, con la deposición de condroitina sulfato proteoglicanos en la cicatriz glial, se restringe su integración, migración y capacidades regenerativas.
- La terapia con astrocitos (que en el SNC cumple múltiples y vitales funciones de soporte y protección), los experimentos llevados son ineficientes cuando está presente la cicatriz glial, aunque no se tiene claro se cree que tiene que ver por la influencia de los astrocitos reactivos presentes en la cicatriz glial.
- Las células de Schwann, aun teniendo buenos resultados en la recuperación de la función motora y sensorial, presentan limitaciones en la recuperación de la función motora a causa de no promover suficientemente la respuesta axonal.

Por tanto, las células de la glía envolvente olfatoria presentan las características más factibles para tratar la LME. Sin embargo, en todos los casos de tipos celulares se podría

mejorar tanto la supervivencia, mediante la expresión de factores neuroprotectores y neuroregenerativos, como su integración en la zona de la lesión, contrarrestando los elementos de la cicatriz glial. Uno de los componentes que consideramos esenciales en este tratamiento es el *scaffold*, en nuestro caso, un hidrogel.

Los *scaffolds* permiten superar el límite que presenta la terapia celular en este tipo de lesión, asociado a la muerte celular. En muchos casos, las células trasplantadas mueren antes de poder realizar su función, y este hecho podría estar implicado en la baja eficacia que presentan la mayor parte de los tratamientos propuestos para el uso clínico actualmente (Venkatesh & Katari *et al.*, 2019).

En esta propuesta, hemos planteado el uso de un hidrogel compuesto por quitosano soluble en agua y el ácido hialurónico oxidado. Por un lado, la inyección de este hidrogel, compuesto por biomateriales naturales, permite rellenar la zona de la lesión, mejorar la supervivencia de las células terapéuticas y facilitar su distribución. Por otro lado, sirve como guía para que la regeneración axonal inducida por el tratamiento se realice en la dirección adecuada. Además, busca imitar las propiedades mecánicas de la médula para asegurar la infiltración de la zona por las células endógenas (Li & Xiaowei *et al.*, 2020).

La elección de este hidrogel se debe a las propiedades ya explicadas de ambos componentes, incluyendo su parecido en composición a la matriz extracelular, su biodegradabilidad, su biocompatibilidad y su solidificación tras la inyección en la zona de lesión (Assunção-Silva *et al.*, 2015).

Como ya hemos mencionado anteriormente, las neurotrofinas son un grupo de moléculas que tienen capacidad para regular la supervivencia neuronal y el crecimiento axonal (Zhang *et al.*, 2017). En nuestro caso, hemos decidido expresar la neurotrofina 3 (NT-3) para favorecer la regeneración axonal y así ofrecer un posible tratamiento a esta patología.

Otros estudios evalúan otros tipos de neurotrofinas como son el caso del NGF y del BDNF (Keefe *et al.*, 2017). La glía envolvente olfatoria es capaz de sintetizar y secretar cantidades significativas tanto de NGF como de BDNF, mientras que no produce NT-3 (Woodhall *et al.*, 2003). Estas neurotrofinas activan los receptores de membrana Trk. La ventaja de la utilización de NT-3 frente al resto de neurotrofinas reside en la capacidad de cada neurotrofina para activar los diferentes receptores Trk. NGF activa TrkA y BDNF activa TrkB. Sin embargo, NT-3 es capaz de activar su receptor TrkC con gran afinidad

y también puede activar TrkA y TrkB con menor afinidad. Esto hace que una sola molécula genera más respuesta que el resto de neurotrofinas (Keefe *et al.*, 2017).

Aunque la cura de los pacientes que sufren una lesión medular completa sigue siendo un problema clínico sin resolver debido a la falta de regeneración de los axones centrales lesionados, existen muchos grupos de investigación dedicados a investigar distintos tratamientos para este tipo de lesiones. En 2014 se consiguió por primera vez la regeneración funcional de conexiones supraespinales en un paciente con médula espinal transectada tras el trasplante de células olfativas bulbares con puente nervioso periférico. Un hombre de 38 años sufrió una transección traumática de la médula espinal torácica en el nivel vertebral superior T9. A los 21 meses de la lesión, el paciente presentaba síntomas de una lesión medular clínicamente completa (clase ASIA A). Se extirpó uno de los bulbos olfatorios del paciente para obtener un cultivo que contenía células envoltoras olfatorias y fibroblastos del nervio olfatorio que se trasplantaron en la médula espinal. Además, el paciente se sometió a un intenso programa de neurorrehabilitación pre y postoperatoria, y a los 19 meses del postoperatorio, el paciente mejoró de ASIA A a ASIA C. Hubo una mejora de la estabilidad del tronco, una recuperación parcial de los movimientos voluntarios de las extremidades inferiores, así como una recuperación parcial de la sensibilidad superficial y profunda. Las imágenes confirmaron que los injertos habían generado un puente en el lado izquierdo de la médula espinal, donde se implantaron la mayoría de los injertos nerviosos (Tabakow *et al.*, 2014).

Aunque nuestra terapia puede llegar a ser muy beneficiosa para el tratamiento de los pacientes con lesiones medulares, no es la única que se está estudiando. Una de las terapias que se ha utilizado ha sido el uso de electrodos a lo largo de las raíces dorsales de las piernas y del tronco. Esta nueva tecnología ha permitido que tres individuos hayan podido volver a controlar el movimiento del tronco, e incluso volver a andar (Rowald *et al.*, 2022).

Asimismo, se ha conseguido la fabricación de médula espinal humana en formato 3D. Para ello se han reprogramado células del tejido adiposo en células madre embrionarias y se han inyectado en un hidrogel, producido a partir de la matriz extracelular del paciente (Wertheim *et al.*, 2022). Esta última investigación es muy parecida a la terapia que nosotros hemos desarrollado, lo que implica que nuestra terapia puede llegar a producir un impacto significativo en la recuperación de estos pacientes.

## **6. CONCLUSIÓN**

La lesión medular es una de las afecciones más graves que puede afectar a los seres humanos, por lo que cualquier hipótesis para el desarrollo de un tratamiento, así como su posterior optimización puede suponer una gran diferencia en la vida de los pacientes.

Nuestro trabajo propone el desarrollo de un tratamiento múltiple, con la aplicación de un hidrogel de ácido hialurónico y quitosano junto con células de la glía olfatoria de mucosa con el gen NT-3 sobreexpresado. Se han propuesto diferentes ensayos tanto in vitro como in vivo (ratas y cerdos) para comprobar la eficacia y seguridad del tratamiento. Posteriormente se plantean los análisis clínicos en humanos.

La combinación de terapias contribuirá sin duda en el futuro a obtener un tratamiento efectivo para la recuperación funcional de los pacientes lesionados medulares, con toda la repercusión que esto implica tanto para sus vidas como para la sociedad.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja, C. S., Nori, S., Tetreault, L., Wilson, J., Kwon, B., Harrop, J., Choi, D., & Fehlings, M. G. (2017). Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration. *Neurosurgery*, 80(3S), S9–S22.
- American spinal injury association. (2019). *International Standards for Neurological Classification of SCI (ISNCSCI) Worksheet*. Recuperado de <https://asia-spinalinjury.org/international-standards-neurological-classification-sci-isncsci-worksheet/>
- An, H. Y., & Miyamoto, T. (2006). Cloning and sequencing of plasmid pLC494 isolated from human intestinal *Lactobacillus casei*: construction of an *Escherichia coli*-*Lactobacillus* shuttle vector. *Plasmid*, 55(2), 128–134.
- Anjum, A., Yazid, M. D., Fauzi Daud, M., Idris, J., Ng, A., Selvi Naicker, A., Ismail, O., Athi Kumar, R. K., & Lokanathan, Y. (2020). Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7533.
- Assunção-Silva, R. C., Gomes, E. D., Sousa, N., Silva, N. A., & Salgado, A. J. (2015). Hydrogels and cell based therapies in spinal cord injury regeneration. *Stem cells international*, 2015.
- Azizi, M., Farahmandghavi, F., Joghataei, M. T., Zandi, M., Imani, M., Bakhtiari, M., & Omidian, H. (2020). ChABC-loaded PLGA nanoparticles: A comprehensive study on biocompatibility, functional recovery, and axonal regeneration in animal model of spinal cord injury. *International journal of pharmaceutics*, 577, 119037.
- Badhiwala, J. H., Ahuja, C. S., & Fehlings, M. G. (2018). Time is spine: a review of translational advances in spinal cord injury. *Journal of neurosurgery. Spine*, 30(1), 1–18.
- Barraud, P., Seferiadis, A. A., Tyson, L. D., Zwart, M. F., Szabo-Rogers, H. L., Ruhrberg, C., Liu, K. J., & Baker, C. V. (2010). Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49), 21040–21045.
- Blum, R., & Konnerth, A. (2005). Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 20, 70–78.

Bradbury, E. J., & Burnside, E. R. (2019). Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. *Nature communications*, 10(1), 3879.

Cheng, H., Liu, X., Hua, R., Dai, G., Wang, X., Gao, J., & An, Y. (2014). Clinical observation of umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in treatment for sequelae of thoracolumbar spinal cord injury. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 1-8.

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT01393977, Difference Between Rehabilitation Therapy and Stem Cells Transplantation in Patients With Spinal Cord Injury in China [cited 2011 Oct 10]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01393977>

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT01873547, Different Efficacy Between Rehabilitation Therapy and Stem Cells Transplantation in Patients With SCI in China (SCI-III) [cited 2018 May 25]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01873547>

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT01325103, Autologous Bone Marrow Stem Cell Transplantation in Patients With Spinal Cord Injury [cited 2017 Nov 28; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01325103>

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT02152657, Evaluation of Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Chronic Spinal Cord Injury [cited 2017 April 26]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02152657>

da Fonseca, G. F., Avelino, S. D. O. M., Mello, D. D. C. R., do Prado, R. F., Campos, T. M. B., de Vasconcellos, L. M. R., ... & Borges, A. L. S. (2020). Scaffolds of PCL combined to bioglass: synthesis, characterization and biological performance. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31(5), 1-10.

Di Martino, A., Sittinger, M., & Risbud, M. V. (2005). Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26(30), 5983-5990.

Doucette, R. (1990). Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia*, 3(6), 433-449.

- Eldahan, K. C., & Rabchevsky, A. G. (2018). Autonomic dysreflexia after spinal cord injury: Systemic pathophysiology and methods of management. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*, 209, 59–70.
- Enomoto, M., Bunge, M. B., & Tsoulfas, P. (2013). A multifunctional neurotrophin with reduced affinity to p75NTR enhances transplanted Schwann cell survival and axon growth after spinal cord injury. *Experimental neurology*, 248, 170–182.
- Féron, F., Perry, C., Cochrane, J., Licina, P., Nowitzke, A., Urquhart, S., Geraghty, T., & Mackay-Sim, A. (2005). Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain : a journal of neurology*, 128(Pt 12), 2951–2960.
- Gill, K. P., & Denham, M. (2020). Optimized Transgene Delivery Using Third-Generation Lentiviruses. *Current protocols in molecular biology*, 133(1), e125.
- Girard, S. D., Devéze, A., Nivet, E., Gepner, B., Roman, F. S., & Féron, F. (2011). Isolating nasal olfactory stem cells from rodents or humans. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (54), 2762.
- Gómez, R. M., Sánchez, M. Y., Portela-Lomba, M., Ghotme, K., Barreto, G. E., Sierra, J., & Moreno-Flores, M. T. (2018). Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia*, 66(7), 1267–1301.
- Guerout, N., Paviot, A., Bon-Mardion, N., Honoré, A., Obongo, R., Duclos, C., & Marie, J. P. (2014). Transplantation of olfactory ensheathing cells to evaluate functional recovery after peripheral nerve injury. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (84), e50590.
- Honoré, A., Le Corre, S., Derambure, C., Normand, R., Duclos, C., Boyer, O., Marie, J. P., & Guérout, N. (2012). Isolation, characterization, and genetic profiling of subpopulations of olfactory ensheathing cells from the olfactory bulb. *Glia*, 60(3), 404–413.
- Kato, Y., Onishi, H., & Machida, Y. (2001). Biological characteristics of lactosaminated N-succinyl-chitosan as a liver-specific drug carrier in mice. *Journal of Controlled Release*, 70(3), 295-307.
- Keefe, K. M., Sheikh, I. S., & Smith, G. M. (2017). Targeting Neurotrophins to Specific Populations of Neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and Their Relevance for Treatment of Spinal Cord Injury. *International journal of molecular sciences*, 18(3), 548.

- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2021). Analysis of Proteins by Immunoblotting. *Cold Spring Harbor protocols*, 2021(12), pdb.prot102251.
- Kosior, N., Petkau, T. L., Connolly, C., Lu, G., & Leavitt, B. R. (2019). Isolating cells from adult murine brain for validation of cell-type specific cre-mediated deletion. *Journal of neuroscience methods*, 328, 108422.
- Krishna, V., Andrews, H., Jin, X., Yu, J., Varma, A., Wen, X., & Kindy, M. (2013). A contusion model of severe spinal cord injury in rats. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (78), 50111.
- Lee, J. H., Jones, C. F., Okon, E. B., Anderson, L., Tigchelaar, S., Kooner, P., Godbey, T., Chua, B., Gray, G., Hildebrandt, R., Cripton, P., Tetzlaff, W., & Kwon, B. K. (2013). A novel porcine model of traumatic thoracic spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*, 30(3), 142–159.
- Lepiarczyk, E., Bossowska, A., Majewska, M., Skowrońska, A., Kaleczyc, J., & Majewski, M. (2020). Distribution and chemical coding of phoenixin-immunoreactive nerve structures in the spinal cord of the pig. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 232, 151559.
- Li, M., Husic, N., Lin, Y., & Snider, B. J. (2012). Production of lentiviral vectors for transducing cells from the central nervous system. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (63), e4031.
- Li, X., Zhang, C., Haggerty, A. E., Yan, J., Lan, M., Seu, M., Yang, M., Marlow, M. M., Maldonado-Lasunción, I., Cho, B., Zhou, Z., Chen, L., Martin, R., Nitobe, Y., Yamane, K., You, H., Reddy, S., Quan, D. P., Oudega, M., & Mao, H. Q. (2020). The effect of a nanofiber-hydrogel composite on neural tissue repair and regeneration in the contused spinal cord. *Biomaterials*, 245, 119978.
- Lim, F., Martín-Bermejo, M. J., García-Escudero, V., Gallego-Hernández, M. T., García-Gómez, A., Rábano, A., Díaz-Nido, J., Avila, J., & Moreno-Flores, M. T. (2010). Reversibly immortalized human olfactory ensheathing glia from an elderly donor maintain neuroregenerative capacity. *Glia*, 58(5), 546–558.
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2019). Scratch wound healing assay. In *Epidermal cells* (pp. 225-229). Humana, New York, NY.
- McKinnon K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*, 120, 5.1.1–5.1.11.

- Ministerio de sanidad, política social e igualdad de España. (2011). *Lesiones Medulares Traumáticas y Traumatismos Craneoencefálicos en España, 2000-2008*. Recuperado de [https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/Prevencion/SeguridadVial/JornadaDecenioAccionSeguridadVial/docs/Lesiones\\_Medulares\\_WEB.pdf](https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/Prevencion/SeguridadVial/JornadaDecenioAccionSeguridadVial/docs/Lesiones_Medulares_WEB.pdf)
- Moreno-Flores, M. T., Diaz-Nido, J., Wandosell, F., & Avila, J. (2002). Olfactory ensheathing glia: Drivers of axonal regeneration in the central nervous system? *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2(1), 37–43.
- New, P. W., Cripps, R. A., & Bonne Lee, B. (2014). Global maps of non-traumatic spinal cord injury epidemiology: towards a living data repository. *Spinal cord*, 52(2), 97–109.
- Pakulska, M. M., Ballios, B. G., & Shoichet, M. S. (2012). Injectable hydrogels for central nervous system therapy. *Biomedical materials*, 7(2), 024101.
- Puglia, A. L., Rezende, A. G., Jorge, S. A., Wagner, R., Pereira, C. A., & Astray, R. M. (2013). Quantitative RT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semliki Forest virus. *Journal of virological methods*, 193(2), 647–652.
- Quertainmont, R., Cantinieaux, D., Botman, O., Sid, S., Schoenen, J., & Franzen, R. (2012). Mesenchymal stem cell graft improves recovery after spinal cord injury in adult rats through neurotrophic and pro-angiogenic actions. *PloS one*, 7(6), e39500.
- Ramón-Cueto, A., Cordero, M. I., Santos-Benito, F. F., & Avila, J. (2000). Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*, 25(2), 425–435.
- Rowald, A., Komi, S., Demesmaeker, R., Baaklini, E., Hernandez-Charpak, S. D., Paoles, E., Montanaro, H., Cassara, A., Becce, F., Lloyd, B., Newton, T., Ravier, J., Kinany, N., D'Ercole, M., Paley, A., Hankov, N., Varescon, C., McCracken, L., Vat, M., Caban, M., ... Courtine, G. (2022). Activity-dependent spinal cord neuromodulation rapidly restores trunk and leg motor functions after complete paralysis. *Nature medicine*, 10.1038/s41591-021-01663-5.
- Rubin, D. I. (2019). Needle electromyography: Basic concepts. *Handbook of clinical neurology*, 160, 243-256.

- Ruhela, D., Riviere, K., & Szoka, F. C. (2006). Efficient synthesis of an aldehyde functionalized hyaluronic acid and its application in the preparation of hyaluronan– lipid conjugates. *Bioconjugate chemistry*, 17(5), 1360-1363.
- Schnell, L., Schneider, R., Kolbeck, R., Barde, Y. A., & Schwab, M. E. (1994). Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature*, 367(6459), 170–173.
- Silva, N. A., Salgado, A. J., Sousa, R. A., Oliveira, J. T., Pedro, A. J., Leite-Almeida, H., ... & Reis, R. L. (2010a). Development and characterization of a novel hybrid tissue engineering–based scaffold for spinal cord injury repair. *Tissue Engineering Part A*, 16(1), 45-54.
- Silva, N. A., Sousa, N., Reis, R. L., & Salgado, A. J. (2014). From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in neurobiology*, 114, 25-57.
- Singh, A., Tetreault, L., Kalsi-Ryan, S., Nouri, A., & Fehlings, M. G. (2014). Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clinical epidemiology*, 6, 309–331.
- Tabakow, P., Raisman, G., Fortuna, W., Czyz, M., Huber, J., Li, D., Szewczyk, P., Okurowski, S., Miedzybrodzki, R., Czapiga, B., Salomon, B., Halon, A., Li, Y., Lipiec, J., Kulczyk, A., & Jarmundowicz, W. (2014). Functional regeneration of supraspinal connections in a patient with transected spinal cord following transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells with peripheral nerve bridging. *Cell transplantation*, 23(12), 1631–1655.
- Tan, H., Chu, C. R., Payne, K. A., & Marra, K. G. (2009). Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 30(13), 2499-2506.
- van Den Hauwe, L., Sundgren, P. C., & Flanders, A. E. (2020). Spinal Trauma and Spinal Cord Injury (SCI). In J. Hodler (Eds.) et. al., *Diseases of the Brain, Head and Neck, Spine 2020–2023: Diagnostic Imaging*. (pp. 231–240). Springer.
- Venkatesh, K., Ghosh, S. K., Mullick, M., Manivasagam, G., & Sen, D. (2019). Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications. *Cell and tissue research*, 377(2), 125–151.
- Wertheim, L., Edri, R., Goldshmit, Y., Kagan, T., Noor, N., Ruban, A., Shapira, A., Gat-Viks, I., Assaf, Y., & Dvir, T. (2022). Regenerating the Injured Spinal Cord at the Chronic Phase

by Engineered iPSCs-Derived 3D Neuronal Networks. *Advanced science* (Weinheim, Baden-Wurtemberg, Germany), e2105694.

Woodhall, E., West, A. K., & Chuah, M. I. (2001). Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Brain research. Molecular brain research*, 88(1-2), 203–213.

Xiao, Z., Tang, F., Tang, J., Yang, H., Zhao, Y., Chen, B., Han, S., Wang, N., Li, X., Cheng, S., Han, G., Zhao, C., Yang, X., Chen, Y., Shi, Q., Hou, S., Zhang, S., & Dai, J. (2016). One-year clinical study of NeuroRegen scaffold implantation following scar resection in complete chronic spinal cord injury patients. *Science China. Life sciences*, 59(7), 647–655. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5080-z>

Zhang, M. L., Zhang, X. J., Kang, J., Zhang, H. J., Chen, X. L., Liu, N., Liu, S. Q., Ma, W. D., Zhang, G. X., & Zhu, L. (2017). Matrine promotes NT3 expression in CNS cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience letters*, 649, 100–106.

Zhao, Y., Tang, F., Xiao, Z., Han, G., Wang, N., Yin, N., Chen, B., Jiang, X., Yun, C., Han, W., Zhao, C., Cheng, S., Zhang, S., & Dai, J. (2017). Clinical Study of NeuroRegen Scaffold Combined With Human Mesenchymal Stem Cells for the Repair of Chronic Complete Spinal Cord Injury. *Cell transplantation*, 26(5), 891–900. <https://doi.org/10.3727/096368917X695038>

Zuris, J. A., Thompson, D. B., Shu, Y., Guilinger, J. P., Bessen, J. L., Hu, J. H., Maeder, M. L., Joung, J. K., Chen, Z. Y., & Liu, D. R. (2015). Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nature biotechnology*, 33(1), 73–80.