

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

INFORMACIÓN INTRODUCTORIA

FISIOPATOLOGIA DE LA LESIÓN MEDULAR TRAUMÁTICA

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

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

La fisiopatología de la lesión medular traumática, sea de causa endógena o exógena, comprende mecanismos de daño primario y mecanismos de daño secundarios, debidos, principalmente a efectos vasculares, celulares y bioquímicos ².

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

DAÑO PRIMARIO

La lesión medular traumática puede generarse por cuatro mecanismos que condicionan el daño primario, como son el impacto con compresión persistente, el impacto con compresión transitoria, la distracción y la laceración/transección ³. El mecanismo más habitual es el provocado por una compresión con presión persistente. Dicha compresión puede ser provocada por un fragmento de hueso o por el propio hematoma generado por el impacto.

Se producen eventos sistémicos y locales, en los que se incluyen hipotensión sistémica, shock espinal, vasoespasmo, isquemia, trastornos homeostáticos y acumulación de transmisores entre otros fenómenos ⁴. El proceso se inicia con una hemorragia local seguida de una interrupción del flujo sanguíneo, lo que provoca un infarto debido a la hipoxia y a la isquemia secundaria. Este hecho daña gravemente la materia gris debido a sus altas necesidades metabólicas. A su vez, la transmisión nerviosa es interrumpida por microhemorragias o edema cercano a la zona de la lesión ³.

DAÑO SECUNDARIO

Respuesta Inmunomediada

La inflamación, evento clave en la cascada del daño secundario, ocurre inmediatamente y persiste durante semanas incluso meses después de la lesión medular⁵.

Se secretan citoquinas proinflamatorias, incluyendo interleuquina (IL)-1 β , interleuquina-6, y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) que aumentan la inflamación. La respuesta inflamatoria es crítica para la eliminación de los restos celulares, que pueden

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

prevenir la regeneración de las neuronas supervivientes. De todas formas, la sobreactivación de la respuesta inflamatoria puede dañar el tejido sano y exacerbar la lesión⁴.

La inflamación producida tras la lesión atrae cuatro grandes categorías de células inflamatorias: neutrófilos, monocitos, microglía y linfocitos T⁶.

Se producen dos fases en la respuesta leucocítica. Inicialmente, se produce una infiltración de neutrófilos. Los neutrófilos en el tejido espinal, eliminan restos de tejido y también libera citoquinas, proteasas y radicales libres, los cuales activan otras células inflamatorias y gliales dentro de la cascada inflamatoria que finalmente pueden provocar daño neuronal o la muerte⁷.

Tras la lesión también se produce una infiltración de monocitos en la médula espinal y su diferenciación a macrófagos. Los macrófagos y las células gliales residentes activadas secretan numerosas citoquinas, radicales libres y factores de crecimiento que pueden afectar de forma positiva o negativa. Mientras los factores de crecimiento son críticos para la supervivencia de las neuronas, los radicales libres y las citoquinas pro-inflamatorias contribuyen a la expansión de la lesión⁴. A su vez, el rol de los linfocitos es controvertido. Existen argumentos de que algunos tipos de linfocitos, como los linfocitos T reactivos, incrementan el daño en los axones e inducen desmielinización debido a la isquemia⁸. Otros argumentos indican que los linfocitos no son patológicos sino que proporcionan protección a las neuronas aisladas de la mielina⁹.

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

Daño oxidativo

Muchos de los mecanismos secundarios afectan a la mitocondria. La mitocondria tiene un papel muy importante en el metabolismo celular y en el mantenimiento de la homeostasis del calcio celular³.

El daño en el sistema nervioso central altera la habilidad de la mitocondria en la respiración celular y la fosforilación oxidativa. Se debe a la aparición de oxígeno reactivo (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), evento que ocurre de forma temprana tras la lesión medular¹⁰ y que produce un aumento del calcio intracelular, disfunción mitocondrial, descomposición del ácido araquidónico y la activación de la óxido nítrico sintasa. ROS y RNS producen, también, peroxidación lipídica y daño en proteínas y ácidos nucleicos¹¹. A su vez, los radicales libres generan daño en el citoesqueleto y las organelas mitocondriales. Además, el daño oxidativo incrementa la disfunción mitocondrial y contribuye al aumento del calcio intracelular que activan las proteasas, que también dañan las proteínas del citoesqueleto¹⁰.

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

De esta forma, ROS y RNS podrían ser dianas potenciales, así como el Calcio, de forma que inhibiéndolo tendríamos un efecto neuroprotector como ocurre cuando se utilizan

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

la ciclosporina A, capaz de inhibir el calcio inducido por los cambios de permeabilidad mitocondrial¹².

Excitotoxicidad

La lesión medular provoca una liberación excesiva de glutamato, el mayor neurotransmisor excitador del SNC. El aumento del glutamato provoca un daño directo en la médula y un daño indirecto en la producción de oxígeno reactivo y especies de nitrógeno así como en alteraciones en la microcirculación e isquemia secundaria³.

Olney introdujo el término “excitotoxicidad” para describir estos procesos producto de la excesiva activación del glutamato que generaban daño neuronal. La excitotoxicidad asume un papel central en la descripción de mecanismos de daño del SNC¹³. La activación del receptor del glutamato resulta en la temprana acumulación de sodio intracelular con su consecuente edema citotóxico y acidosis intracelular³.

Las neuronas y los oligodendrocitos son particularmente vulnerables a la excitotoxicidad del glutamato porque expresan una gama completa de receptores del glutamato. El daño excitotóxico sobre los oligodendrocitos y neuronas provoca una desmielinización de los axones y una pérdida de neuronas entorno a la lesión, provocando una drástica reducción de la transmisión axonal⁴.

Apoptosis

En la fase aguda de la lesión medular, el daño mecánico provoca la muerte instantánea de células por necrosis, que finaliza con la ruptura de la membrana celular. Tras unas horas, otro tipo de muerte celular se inicia⁴. La apoptosis no provoca una inflamación asociada a la muerte celular, sino que provoca la fragmentación celular mediante una vía programada que necesita energía y síntesis de proteínas⁷. Se sabe que esta vía programada de muerte neuronal está implicada en la fisiopatología de multitud de desórdenes neurológicos incluida la lesión medular³.

La cascada apoptótica se activa en neuronas, oligodendrocitos, microglía y, quizá, astrocitos¹⁴. El mayor detonante parece ser el daño inducido por el calcio intracelular. Activa enzimas proteolíticas como caspasas y calpainas, que rompen las proteínas del citoesqueleto desencadenando la muerte celular^{10, 15}.

Trastornos vasculares

Los mecanismos vasculares que tienen lugar tras la lesión medular incluyen: isquemia/reperfusión, hipotensión sistémica (shock neurogénico), hemorragia (principalmente en materia gris) y trastornos microcirculatorios⁴. Se producen graves hemorragias tras la lesión principalmente en la materia gris, provocando una necrosis hemorrágica y la consecuente mielomalacia en la zona de la lesión¹⁶.

Inmediatamente después de la lesión se produce una reducción del flujo sanguíneo. Esta isquemia empeora con el paso de las horas. Los mecanismos no están claros pero se asocian a vasoespasmo secundario al daño mecánico o a aminas vasoactivas. La isquemia está, a su vez, implicada en la formación de edema local lo que incrementa el daño medular. La pérdida de microcirculación, la interrupción directa de los pequeños vasos y la hemorragia provocan un fallo en la autorregulación^{4, 11}. La isquemia y reperfusión producidas inducen daño endotelial mediado por radicales libres y la

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

producción de productos tóxicos¹⁷. La producción de radicales libres se produce principalmente en el momento de reperfusión e incluye: superóxido, radicales hidroxilo, óxido nítrico y otros oxidantes de alta energía.

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

En definitiva, el estrés oxidativo resultante de los compromisos en la microcirculación contribuyen a la lesión medular y están íntimamente relacionados con otros mediadores de daño secundario⁴.

Shock Neurogénico

El shock neurogénico se caracteriza por la triada hipotensión, bradicardia e hipotermia. Se sabe que la lesión medular causa hipotensión por la pérdida de tono simpático y la disminución de la resistencia periférica⁴. La bradicardia ocurre sin oposición vagal debido a la interrupción simpática que nutre al corazón¹⁸.

Sin tratamiento, la cascada neurogénica exagera el daño del tejido nervioso y favorece la morbilidad y la mortalidad¹⁸.

Cavitación

Un fenómeno que se añade a la complejidad de la regeneración es la progresión de una cavitación central en la cual, desde días hasta meses, la lesión medular puede expandirse y generar una cicatriz glial mucho mayor que en el momento inicial¹⁹.

Varios estudios sugieren que la cavitación está relacionada con procesos de isquemia, hemorragias, actividad de las lisozimas, infiltración de macrófagos e inflamación⁴.

El ambiente influencia el crecimiento intrínseco de una neurona lesionada. Durante la lesión numerosas moléculas actúan con efecto inhibitor en la regeneración axonal. Después de la lesión, la interrupción de axones mielinizados y la muerte de los oligodendrocitos, resulta en numerosos restos de mielina²⁰.

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

AGUDA	SUBAGUDA	CRÓNICA
Hipotensión sistémica		
Vasoespasm	Vasoespasm	
Muerte celular	Muerte celular	
Isquemia	Isquemia	
Edema	Edema	
Alteración homeostasis	Alteración homeostasis	
Acumulación de neurotransmisores	Acumulación de neurotransmisores	
Compromiso de membranas plasmáticas	Compromiso de membranas plasmáticas	
	Producción de radicales libres	
	Peroxidación lipídica	
	Exceso de óxido nítrico	
	Exceso de noradrenalina	
	Descenso de ATP	

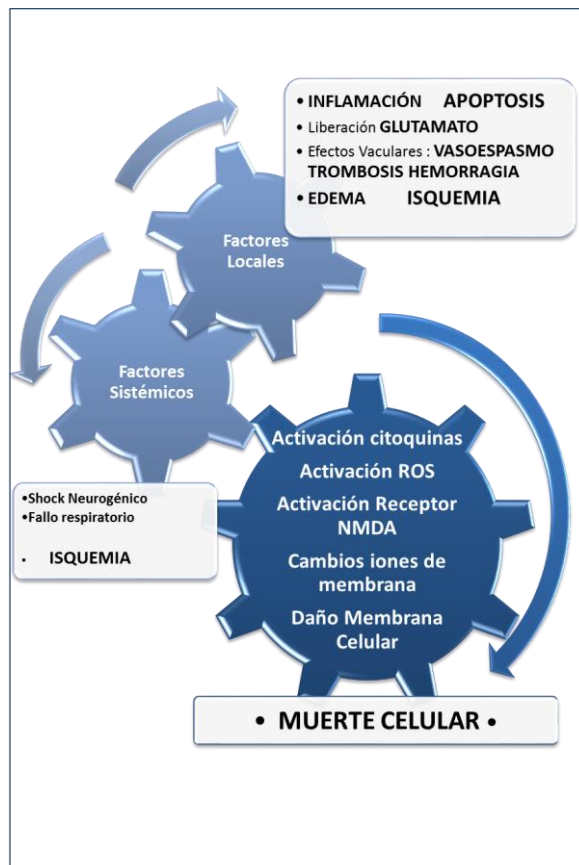
REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

	Invasión células inflamatorias	
	Factores inhibitorios de crecimiento neuronal	
	Compresión vertebral/ Inestabilidad columna	
	Desmielinización axones vivos	Desmielinización axones vivos
	Apoptosis	Apoptosis
	Inicio de cavitación central	Inicio de cavitación central
	Formación cicatriz glial	Formación cicatriz glial
		Alteración canales iónicos y receptores
		Procesos regenerativos
		Neurocircuitos alterados
		Siringomelia

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

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

Tabla 1: Fenómenos que tienen lugar en las diferentes fases de la lesión medular traumática. Versión adaptada Oyinbo, CA (2011) ⁴.



Principales eventos de daño secundario producido tras la lesión medular

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

FASES DE LA LESIÓN MEDULAR

En la médula espinal dañada por compresión o traumatismo, la secuencia temporal de los cambios anatomopatológicos tras una lesión se compone de tres etapas: aguda, subaguda y crónica²⁶.

AGUDA

La fase aguda tiene lugar en las primeras horas después de la lesión. Inmediatamente tras el trauma se produce una ruptura de la barrera hematoencefálica y los vasos sanguíneos locales, ocasionando una alteración de la microvasculatura e induciendo hemorragias petequiales. Se genera un edema y la destrucción de los capilares provoca isquemia, anoxia e hipoglucemia. Debido al reducido flujo sanguíneo durante estas primeras horas, se producen cambios necróticos en la sustancia gris que afectan tanto a las neuronas como a la glía^{26, 27}.

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

Entre las cuatro y las 24 horas siguientes el rango metabólico aumenta y se inicia un metabolismo oxidativo en el tejido originando una acidosis láctica. Por otra parte, el edema generado por la interrupción del flujo sanguíneo es máximo en los primeros días tras la lesión afectando inicialmente a la porción central del cordón espinal y de forma centrífuga a la sustancia blanca. Este ambiente induce liberación de bradicininas, citoquinas, histaminas y óxido nítrico que, a su vez, contribuyen a aumentar la permeabilidad vascular. Todo ello afecta a las concentraciones de iones, perturbando la excitabilidad y la transmisión sináptica. Esto provoca una acumulación de calcio intraaxonal y una disminución de calcio extracelular. La concentración total de calcio alcanza sus valores máximos ocho horas tras la lesión permaneciendo elevado durante una semana. Se sabe que el exceso de calcio tiene un efecto nocivo sobre las neuronas y que la activación de las fosfolipasas dependientes de calcio, como la fosfolipasa C y A2, provocan una alteración de la membrana celular y la producción de diferentes compuestos como los tromboxanos y los leucotrienos entre otros, que promueven el daño tisular y la inflamación. A su vez, la elevación del calcio intracelular estimula la liberación de aminoácidos excitatorios como el glutamato y el aspartato, cuya concentración máxima ocurre minutos después de la lesión, siendo muy tóxicos para las neuronas que no sufrieron daño²⁶.

SUBAGUDA

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

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

Estos astrocitos muestran incremento en la expresión de filamentos intermedios que son reconocidos por anticuerpos contra la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP). Esta respuesta alcanza un máximo a los 14 días de la lesión, pero permanece hasta 28 días después. La cicatriz glial constituye uno de los mayores obstáculos para la restitución de las conexiones lesionadas, ya que la superficie de los astrocitos reactivos cambia debido a la expresión de proteoglicanos inhibidores de la iniciación, adhesión, crecimiento y orientación de las neuritas. Se produce una infiltración de células inflamatorias. Primero se infiltran los granulocitos polimorfonucleares en función de la hemorragia producida durante la lesión ya que se producen fuertes quimioatrayentes y posteriormente los monocitos-macrófagos que fagocitan el tejido muerto. Otros tipos celulares que se infiltran son las células de Schwann, células meníngeas y fibroblastos, implicándose en procesos de proliferación de fibroblastos y angiogénesis ^{26, 27}.

CRÓNICA

Tanto la fase aguda como la subaguda son etapas muy inestables, en las que los cambios moleculares y celulares son continuos. Se considera fase crónica al estado de la lesión más estable, en el cual no se espera observar grandes cambios histológicos ni funcionales en el individuo lesionado. El intervalo de tiempo a partir del cual una lesión alcanza su estado crónico depende del tipo de lesión y del propio individuo ²⁷.

Aun así, el proceso degenerativo de la médula espinal continua. El tejido neural cercano al área de lesión presenta actividad eléctrica y actividad funcional deprimidas y evoluciona a lo que se conoce como lesión secundaria y posiblemente es responsable de la pérdida de función neuronal. Las neuronas muertas no son reemplazadas, los axones lesionados no se regeneran y los trastornos funcionales son permanentes ²⁶.

La pérdida de mielina es dependiente del tiempo y empieza a las 24 horas de la lesión. A los siete días, los axones ya no poseen protección de mielina y la desmielinización aumenta después de dos semanas debido a que las células inflamatorias inician un estado de inflamación secundario. A las tres semanas, algunas fibras presentan degeneración walleriana y pérdida del diámetro axonal. En zonas adyacentes a la lesión medular se encuentran formas inmaduras de oligodendrocitos no dañadas, que al madurar son capaces de remielinizar algunos axones. Se ha detectado remielinización por células de Schwann en lesiones con una gran degeneración walleriana. Lo que indica que las neurotrofinas, debidas a las células de Schwann o las administradas de forma exógena, pueden inducir regeneración axonal ²⁶. A nivel macroscópico, se produce un considerable adelgazamiento dorsoventral de la zona de la lesión ²⁷.

MODELO DE LESIÓN MEDULAR CRÓNICA EN ROEDOR

Los modelos animales son un elemento crítico para el desarrollo de terapias experimentales en la reparación de la lesión medular. Diversas especies han sido y son utilizadas como modelo de lesión medular ²⁸⁻³⁰. Sin embargo, la rata es la especie más utilizada, principalmente por su coste, accesibilidad, facilidad de cuidados y la existencia de técnicas de análisis funcional bien establecidas, aunque los ratones también son ampliamente utilizados por la habilidad de modificar su genoma ³¹.

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

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

Otro elemento a tener en cuenta es localización de la lesión ya que generar un modelo de lesión cervical es muy complejo dadas las complicaciones que pueda presentar al verse afectada la inervación cardiorespiratoria, a pesar de ser la lesión más habitual en humanos. No hay que olvidar el abordaje necesario para muchos modelos y la anestesia empleada. La realización de una laminectomía tiene un impacto a nivel fisiopatológico mayor que aquellos métodos, como la compresión por balón, que no la realizan por la afección de tejido que conlleva la propia técnica. A su vez, la anestesia puede afectar a la presión sanguínea, la frecuencia respiratoria, el metabolismo del animal, etc...³².

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

El modelo de contusión es el modelo animal más ampliamente utilizado, cuya base radica en el impacto realizado a través de una máquina directamente sobre la médula espinal, como la caída de una pesa con un peso específico, conocido como New York University Impactor. El impacto variará en función de la distancia de la pesa y de su peso. El primer modelo de contusión controlado fue descrito por Allen en 1911 en el cual la caída de la pesa liberaba una cantidad definida de energía sobre la médula espinal expuesta, provocando una compresión y un desplazamiento de la médula³².

Más tarde, Noyes (1997) describió un modelo de impacto electromecánico, ahora conocido como Ohio State University (OSU) Impactor. Este modelo se basa en la utilización de un solenoide montado sobre un marco rígido con una punta que impacta directamente sobre la médula espinal expuesta siendo la médula firmemente sujeta. Un estudio demuestra la existencia de 3 diferentes niveles de lesión siguiendo la escala de Tarlov³³. Tal y como sucede con el modelo de la pesa, los déficits funcionales aparecen inmediatamente y se observa una mejoría que presenta un plato a las 2-3 semanas tras la lesión. Estudios describen déficits motores y de recuperación valorados con el plano inclinado, el test grid-walking así como el análisis de la pisada o la escala BBB. El sistema OSU proporciona un buen control de los aspectos biomecánicos del método como velocidad, profundidad de compresión y fuerza^{34, 35}.

En 2003 surgió un método similar al OSU que utiliza la fuerza en lugar del desplazamiento del tejido para lesionar la médula espinal de la rata³⁶. También requiere la exposición de la médula espinal y una rígida estabilización de la columna vertebral. Una principal característica de este Impactor, producido por primera vez por Infinity

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

Horizon (IH), es la habilidad de producir lesiones reproducibles sin tocar o manipular la médula antes del impacto. La lesión generada imita fielmente la lesión vista en humanos mejor que el modelo de transección. En el proyecto TIME to MOVE empleamos este dispositivo de Infinity Horizon para realizar las lesiones (Figura 1).

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

Una ventaja de este sistema es la monitorización de varios parámetros biomecánicos como velocidad, fuerza, compresión/desplazamiento del tejido, y eso permite la rápida eliminación del estudio de animales que no cumplan estándares establecidos. Aunque, por otra parte y en comparación con el modelo de transección es más difícil distinguir entre tejido repuesto y tejido regenerado ^{20, 35}.

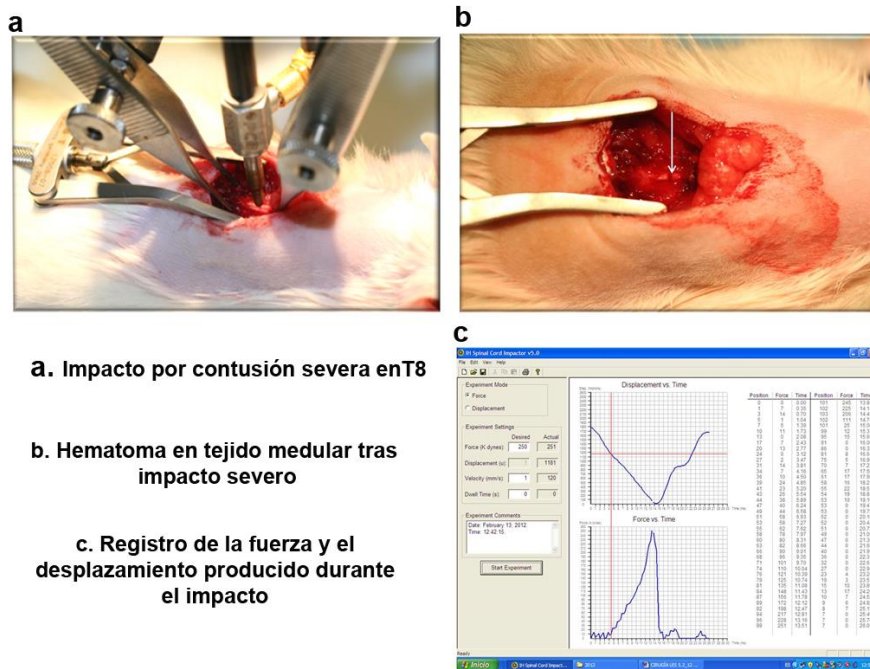


Figura 1: Impacto en médula espinal por contusión severa con Infinity Impactor

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

TERAPIA CELULAR BASADA EN EL USO DE PRECURSORES NEURALES (NSC)

Las células madre neurales (NSCs) son células multipotentes con la habilidad de diferenciarse a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Poseen una elevada capacidad de autorenovación siendo capaces de renovar las neuronas dañadas y remielinizar axones desmielinizados pero dicha capacidad no es suficiente para restaurar una lesión medular³⁷. Debido a estas cualidades, son células candidatas a ser empleadas en la reparación de la lesión medular, de hecho ya se han iniciado algunos estudios traslacionales con ellas, sea su origen cerebral o espinal²⁰.

Sus características difieren según su origen sea la médula espinal o el cerebro³⁸. En el adulto se localizan principalmente en el tejido adyacente a los ventrículos, aunque también se ha comprobado que el canal central de la médula espinal, el *canal ependimario*, es fuente de precursores neurales capaces de diferenciarse^{39, 40}.

Estas células pueden ser aisladas y expandidas in vitro, habitualmente como neuroesferas. Su principal uso en lesión medular está focalizado en el reemplazo de tejido, principalmente neuronas y oligodendrocitos, así como la provisión de factores tróficos que apoyen la supervivencia del tejido neuronal. De hecho, se ha demostrado que las NSCs son capaces de secretar diversos factores como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el derivado cerebral (BDNF) y el glial (GDNF), in vitro e in vivo^{20, 41}.

El crecimiento en condiciones in vitro de las NSCs muestra que son capaces de mantener su capacidad de autorenovación tras varios pases y que son capaces de secretar factores neurotróficos^{42, 43}, aunque una desventaja del uso de estos precursores cultivados in vitro para diversas terapias es la disminución de su potencial de diferenciación tras varios pases.

Hay pocos estudios que traten sobre la integración de las NSCs y su mecanismo para promover la recuperación funcional cuando son trasplantados en la médula espinal lesionada⁴⁴. Sin embargo, sí se ha descrito que la manipulación y tratamiento in vitro previo al trasplante es crucial para la supervivencia y la integración celular^{45, 46}. Por ejemplo, el cultivo celular en monocapa mejora la proliferación de las NSCs multipotentes, mientras el cultivo de neuroesferas es más restrictivo. Interesantemente, los cultivos en monocapa y de neuroesferas no se comportan igual tras el trasplante^{47, 48}.

Investigadores como Shihabunndi y Lu demostraron que la diferenciación in vivo de las NSCs estaba muy relacionada con el ambiente. Las células trasplantadas en el hipocampo se diferenciaron a neuronas mientras que las trasplantadas en la médula espinal lesionada solo a células gliales⁴⁹, aunque otros estudios han conseguido que la diferenciación se produzca tanto a células gliales (31.2% de astrocitos y 50% de oligodendrocitos) como a neuronas (1%), aunque en menor proporción⁵⁰.

Por otra parte, diversos estudios de trasplante de NSCs en medula espinal lesionada observan resultados beneficiosos en la recuperación funcional en modelos experimentales pero su mecanismo aún no se conoce bien^{38, 51}.

Como hemos comentado, el canal ependimario posee también una fuente de precursores neurales. *Las células ependimarias* ciliadas no existen a lo largo del tubo neural inmaduro, y conforme las células de la zona ventricular y las células gliales

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

radiales retroceden, el canal central y los ventrículos son gradualmente cubiertos por epéndimo ciliado ⁵². En 1992, Sarnat describió las funciones secretoras de las células endimarias fetales pero ya indicó que el epéndimo de cerebro adulto tenía funciones a definir. Indicó que la superficie basal de las células endimarias expresa proteínas de matriz extracelular que funciona como guía para los axones, al menos en invertebrados ⁵³. También se ha definido una actividad importante a los cilios endimales, los cuales, crean unas diferencias de gradiente en el líquido cefalorraquídeo que sirve para la migración de los neuroblastos ⁵⁴.

En los últimos años han surgido evidencias que sugieren que un pequeño grupo de células endimarias en el polo dorsal del canal central de la médula espinal de ratones adultos, distinto a las células de la zona ventricular, pueden tener potencial como célula madre tras una lesión medular ^{51, 55}. Además son capaces de responder al EGF y FGF2 ⁵⁶.

En una médula no lesionada, los astrocitos y las células endimarias proliferan para mantener la población mientras los progenitores de oligodendrocitos se autorenewan y generan más oligodendrocitos maduros. Tras una lesión medular las células endimarias o epSPC aumentan y se diferencian ⁵⁷ y, de hecho, constituyen la principal población celular en la médula espinal intacta con propiedades in vitro de células madre neurales⁵⁸, pero el origen del incremento de células madre neurales que se produce tras la lesión es desconocido. Este incremento se ha comprobado mediante cultivo de esta población de precursores, células endimarias (epSPC), de animales sanos o tras lesión medular y se observó que la proliferación in vitro fue 10 veces mayor en los cultivos de epSPCs de animales tras lesión medular en comparación con los cultivos de animales sin lesión. Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran en el modelo de lesión agudo, que esta población de precursores neurales, activados tras la lesión y con mayor capacidad proliferativa, rescatan la actividad locomotriz de ratas con lesión medular cuando son trasplantadas inmediatamente tras la lesión ⁵¹ (Figura 2).

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

En nuestro grupo de investigación hemos demostrado que el trasplante de células madre neurales, células endimarias (epSPCs) y oligodendrocitos prediferenciados (OPCs) de una rata lesionada provoca una recuperación de la función motora cuando son trasplantadas en fase aguda, inmediatamente tras lesión ⁵¹ (Figura 2)

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

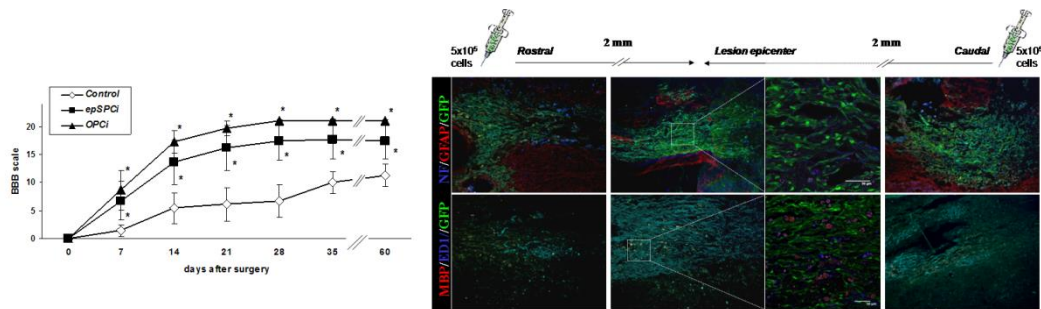


Figura 2. Transplante de células endimarias en el modelo de lesion medular agudo. A la izquierda se muestra el estudio funcional, de l actividad locomotriz, de animales trasplantado con células endimarias (epSPC), precursores de oligodendrocitos (OPC) o solo con medio de cultivo (Control). A la derecha, las imágenes muestran el estudio histológico del tejido medular dos meses tras lesion y trasplante. En verde se visualizan las células endimarias trasplantadas.

El tipo de modelo animal, el momento del trasplante y el tipo de lesión también afectan a la recuperación, y aunque la comunidad científica apuesta por las NSCs considerando su efectividad y su menor capacidad de generar tumores en comparación con las células embrionarias, una caracterización de las NSCs adultas y su aplicación en las diferentes lesiones espinales son necesarios para incrementar los estudios traslacionales ²⁰.

En mamíferos superiores, incluidos los humanos, la proliferación de dichas células tiene lugar principalmente en el periodo embrionario y post-natal ⁵⁹ pero la presencia de epSPCs en la médula adulta sugiere que los mecanismos endógenos pueden ser empleados en la reparación de lesiones medulares también en el individuo adulto.

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

OBJETIVOS CONCRETOS DEL TOTAL DEL PROYECTO (DE 3 AÑOS) *(transcritos directamente desde el proyecto en su versión inglesa)*

- 1) Cell replacement/transplantation of epSPC in chronic stage: Allosteric ependymal stem-progenitor cells, from adult spinal cords, will be transplanted into the intramedullar space and this will be compared to the intrathecal via of administration. IN RATS
- 2) Nanomedicine application for neuroprotection and axonal growth promotion: Individual polymeric conjugations have been firstly approached for Fasudil as axonal growth promotor. In the second stage of the project simple polymeric conjugates of Curcumin PGA will be developed for neuroprotection. Based on the property of multivalency provided by the use of polymeric carriers, a multiple conjugation of several bioactive agents in the same polymer, neuroprotector, axon elongator will be constructed for a markedly enhancing the therapeutic value of these independent macromolecules. Once assessed the biological activity of the individual polymeric conjugates, both drugs (Fasudil and Curcumin) will be incorporated to the same polymeric backbone yielding a combination therapy nanomedicine for neuroprotection and axonal growth promotion.
- 3) Combinatorial approaches: cell transplantation and pharmacological treatment of the previous conjugates
- 4) Experimental probe of concept of previous objective by using human ependymal cells.
 - a. To improve the possibilities for tissue collection and in vitro characterization will be the priority together with a set-up of animal-free protocol development for better translational application of the cell isolation method.
 - b. In vivo human cell transplantation from the generated cell bank for functional analysis and histological studies for cell survival and cell integration or rejection will be performed in rodents

The proposed strategy is a convergent approach from individual efforts of two groups, V Moreno and MJ Vicent labs, focusing on functional regeneration of SCI chronic lesions favouring axonal regeneration and/or neural/glial protection by cell replacement- and nanomedicine-based approaches.

Although this proposal is based on a rodent experimental model we have incorporated aspects to adapt the classical cell transplantation and pharmacological approaches to a more innovative and efficient application for a more compatible translational strategy. To do so we will first try to optimize the intrathecal administrations, either for cell transplantation approaches or pharmacological delivery.

Second, we will conduct the polymer conjugation mainly with those molecules that have already shown functional properties with no toxic or important side effects and be able to be scaled in a high dimension. Third, this proposal includes the promotion, in tight collaboration with the Clinicians from different Hospitals in Spain to obtain human samples from spinal cords from organ donors post-mortem. From these samples we set up the procedure to efficiently isolate human ependymal cells and we reproduce the transplantation experiments done with rat ependymal cells transplanted in rats, in this case under immunosuppresants treatment.

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

PLAN DE TRABAJO PROPUESTO EN BASE A LOS OBJETIVOS:

Aim/YEAR	1 st year (2014)	2 nd year (2015)	3 rd (2016)	4 rd year (2017)
<u>Cell transplantation of epSPC</u>	<u>XXXXXX XXXXXX</u>	<u>XXXXXX XXXXXX</u>		
<u>Nanomedicine-based Treatment</u>	<u>XXXXXX XXXXXX</u>	<u>XXXXXX XXXXXX</u>	<u>XXXXXX XXXXXX</u>	<u>XXXXXX XXXXXX</u>
<u>Combinatorial approaches</u>		<u>XXXXXX XXXXXX</u>	<u>XXXXXX XXXXXX</u>	<u>XXXXXX XXXXXX</u>
<u>human ependymal cell banking</u>				<u>XXXXXX XXXXXX</u>

Personal que interviene en el desarrollo del trabajo:

Grupo de investigación "Regeneración Neuronal y Tisular":

Dra Victoria Moreno; Dra Raquel Requejo; Dra Esther Giraldo; Dra Ana Alastrue; Dra Marta Cases; Dra Viviana Bisbal; D^a Mara Mellado; D Eric Lopez; D^a Giulia Calabresse;

Grupo de investigación "Polímeros Terapéuticos":

Dra MJesus Vicent; Dr Vicent Nebot; Dra Ana Armiñan; Oleksandr Zagorodko

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

Objetivo 1: Cell replacement/transplantation of epSPC in chronic stage

ADMINISTRACIÓN ÚNICA, EN LESIÓN MEDULAR CRÓNICA, DE epSPC INTRAMEDULARMENTE:

Hemos realizado una primera fase que por un lado nos ha permitido poner a punto el modelo de lesión medular por traumatismo severo y crónico como modelo base para los tratamientos celulares y farmacológicos así como para desarrollar parte del primer objetivo, que es el rescate de función locomotriz tras trasplante único de células ependimarias.

Hemos realizado el trasplante de precursores neurales adultos (epSPCi) intramedularmente, por inyección en el tejido medular, en la zona de la lesión, y con inyección única, una vez estabilizada la lesión y cuando la regeneración espontánea no mostró más cambios significativos en el test locomotriz (BBB, Figura 3), alrededor de la semana 5 tras lesión medular. En este estudio tenemos dos grupos, un grupo de animales con lesiones muy severas (Figura 3A) y un grupo de animales con lesiones menos severas y que han evolucionado con mejores recuperaciones espontáneas (Figura 3B)

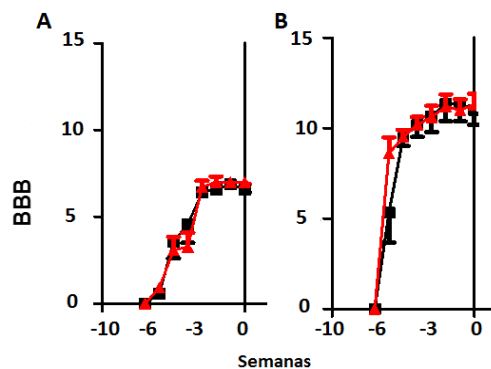


Figura 3: Valoración de la recuperación funcional a lo largo de la cronificación de la lesión medular. A: Grupos con lesión medular severa. B: Grupos con lesión medular leve. Obsérvese en la gráfica A como los valores alcanzados en la valoración BBB se encuentran entre 6 y 7 mientras que la gráfica B muestra valores superiores, indicando una lesión medular más leve. ▲: Grupo epSPCs. ■: Grupo control.

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

Por otra parte y tal y como se puede observar en la Figura 4, en el grupo experimental de lesión severa (A), ambos grupos, control y trasplante, mejoran de forma paralela y espontáneamente su actividad locomotriz tras la lesión medular y antes de la intervención celular como hemos comentado anteriormente en la figura 1. Entre la quinta y sexta semana tras LM la recuperación funcional espontánea se estabiliza sin mostrar mejoras reflejadas en la escala de BBB durante tres semanas más. Esta estabilización del BBB nos permite considerar la lesión medular ya cronificada. Cuando

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

se realiza el trasplante, en la semana 0, se observa una pequeña depresión en la función locomotriz en ambos grupos, en la primera semana tras trasplante con epSPCi o inyección de medio en el caso del grupo control, presumiblemente por la nueva intervención quirúrgica en ambos grupos. El grupo control se recupera del orden de un grado en la escala BBB y se mantiene de media en ese nivel durante las 16 semanas posteriores de estudio. Sin embargo, el grupo trasplante mejora significativamente en la escala de valoración funcional en comparación con el grupo control hasta el final del ensayo (Figura 4A). Animales con una valoración de 6 en el BBB en el momento del trasplante fueron capaces de alcanzar valores de 8 y 9 en dos semanas, pasando de un estado en el que únicamente pueden movilizar dos o tres articulaciones a otro en el que posicionan la extremidad en posición plantar e incluso cargan peso. En el grupo experimental de lesión leve (Figura 4B), los grupos en los que ya parten de un estado con apoyo plantar (valoración 8 y 9 del BBB), los animales son capaces de alcanzar estados en los que hay soporte de peso y coordinación en el movimiento (valoración 14-15). Sin embargo, y a pesar de que la tendencia en los animales trasplantados muestra mejor recuperación funcional, en este grupo experimental, de lesión leve, la dispersión interindividuo es mayor, resultando no significativa la diferencia entre ambos grupos, control y trasplantado.

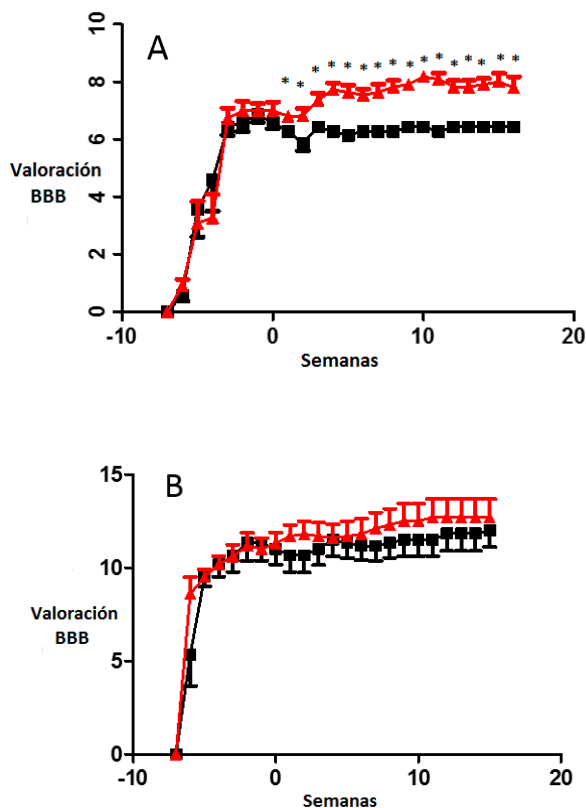


Figura 4: Valoración de la función motora empleando la escala del test BBB a lo largo de todo el estudio. En la imagen A se encuentran las valoraciones del grupo de lesión medular grave y en la gráfica B las valoraciones de los

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

grupos con lesión medular leve. ▲: Grupo epSPCs. ■: Grupo control. En la gráfica A se representan con asterisco los tiempos en los que existen diferencias entre el grupo trasplante y el grupo control (*p< 0,05) En la gráfica B no se observan dichas diferencias.

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

Los animales con una valoración del BBB superior a 8, con capacidad de realizar posición plantar en las extremidades posteriores, sí permiten el uso e interpretación de los resultados de este test (Figuras 5 y 6). Este test permite valorar la pisada y la calidad de las mismas de ambas extremidades, traseras y delanteras, con valoración de la coordinación en el desplazamiento, y además permite valorar el uso de otras estructuras que no intervienen directamente en el marcha pero que resultan indicativos de la recuperación funcional, como son el arrastre de las rodillas, las caderas, el abdomen, la cola o incluso la nariz.

En la Figura 5 se muestra un ejemplo de un registro en la semana 14 post trasplante de un animal trasplantado con epSPCi, con un valor en la escala BBB de 17. El registro y posterior análisis de la pisada muestra que este animal utiliza las extremidades anteriores y posteriores siguiendo un patrón aparentemente normal en la marcha como puede observarse en la imagen donde las extremidades aparecen representadas por colores. Las extremidades anteriores derecha e izquierda se representan en verde y rojo, respectivamente. Las extremidades posteriores en la misma gama de colores pero con mayor intensidad. Se ha indicado, también, con las letras A, B, C y D. En la imagen central, obsérvese que no existe contacto de otras estructuras como las rodillas, las caderas, la cola o la nariz.

Sin embargo en la Figura 6 se muestra el resultado del análisis del Catwalk en un animal control con 13 en la valoración BBB, también en la semana 14 post trasplante. Obsérvese como utiliza las extremidades anteriores y posteriores siguiendo un patrón aparentemente normal en la marcha. Las extremidades derecha e izquierda se representan en verde y rojo, respectivamente. Las extremidades posteriores en la misma gama de colores pero con mayor intensidad. En la imagen central, obsérvese como existe un arrastre del abdomen (se indica en azul en la imagen), principalmente, y de otras estructuras como las rodillas

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

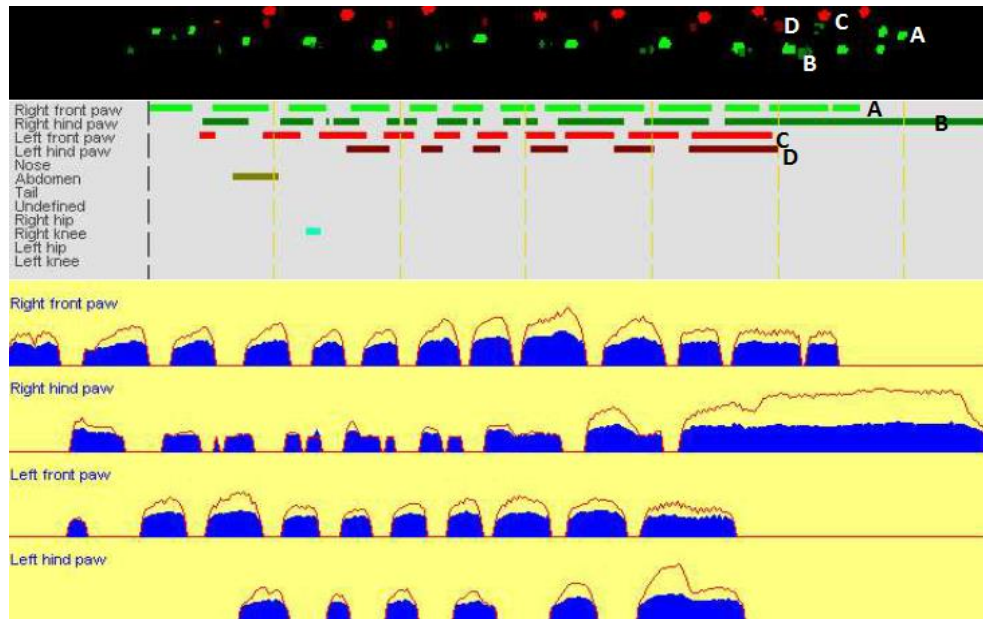


Figura 5: Resultados del análisis del test Catwalk en un animal trasplantado con epSPCi del grupo experimental de lesiones leves

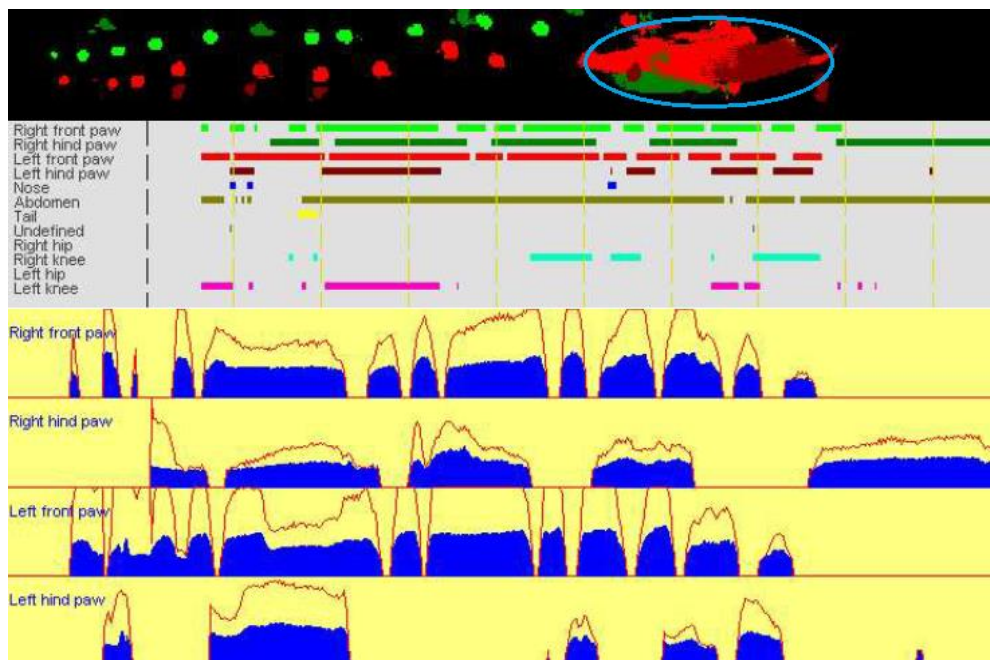


Figura 6: Resultados del análisis del test Catwalk en un animal control del grupo experimental de lesiones leves

El área de la pisada de cada una de las extremidades, anteriores y posteriores así como los contactos más habituales de otras estructuras, como el abdomen y la cola, se resumen en la Figura 7:

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

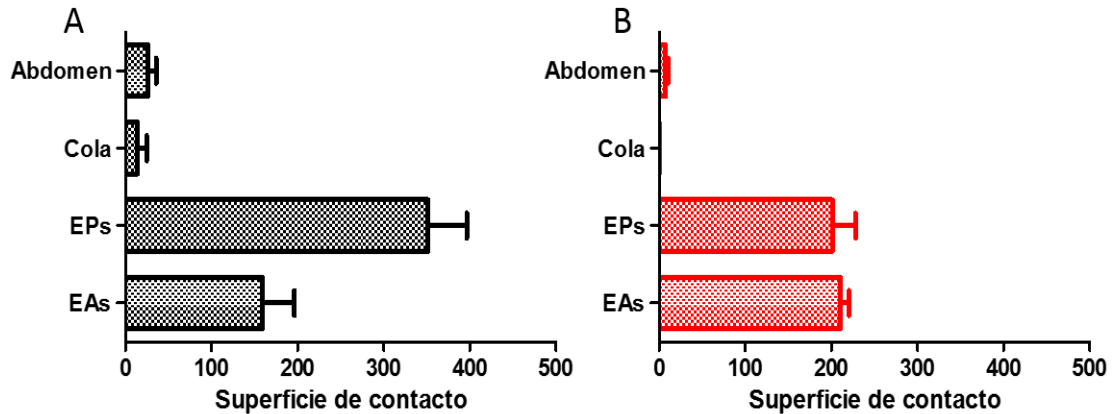


Figura 7: Uso y contacto de estructuras en la marcha. Superficie de contacto expresada como pixeles. A más pixeles, mas contacto y por tanto más arrastre. EPs: Extremidades Posteriores. EAs: Extremidades Anteriores. A: Grupo Control lesión leve (n=6) B: Grupo Trasplante lesión leve (n=10). En la tabla adjunta los resultados del estudio de distribución de frecuencias.

ESTUDIO HISTOLÓGICO Y ESTRUCTURAL DE LA MÉDULA ESPINAL TRAS LESIÓN MEDULAR CRÓNICA

Una vez concluido el estudio funcional in vivo de la actividad motora en este grupo experimental, en la semana 16 tras el trasplante, todos los animales fueron eutanasiados.

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

En primer lugar se muestran los resultados del estudio de espesor en el grupo de lesión severa (Figura 10). En las figuras 12 A1 y A2 se puede apreciar el sistema de medida utilizado. Como se puede observar, el grupo trasplante epSPCis aun presentando espesores completos inferiores al grupo control, presenta mayor uniformidad a lo largo de toda la zona de la lesión, mientras el grupo control muestra un descenso importante en el epicentro. Se realizó un test Mann-Whitney para el análisis estadístico entre grupos, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p=0,002$).

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

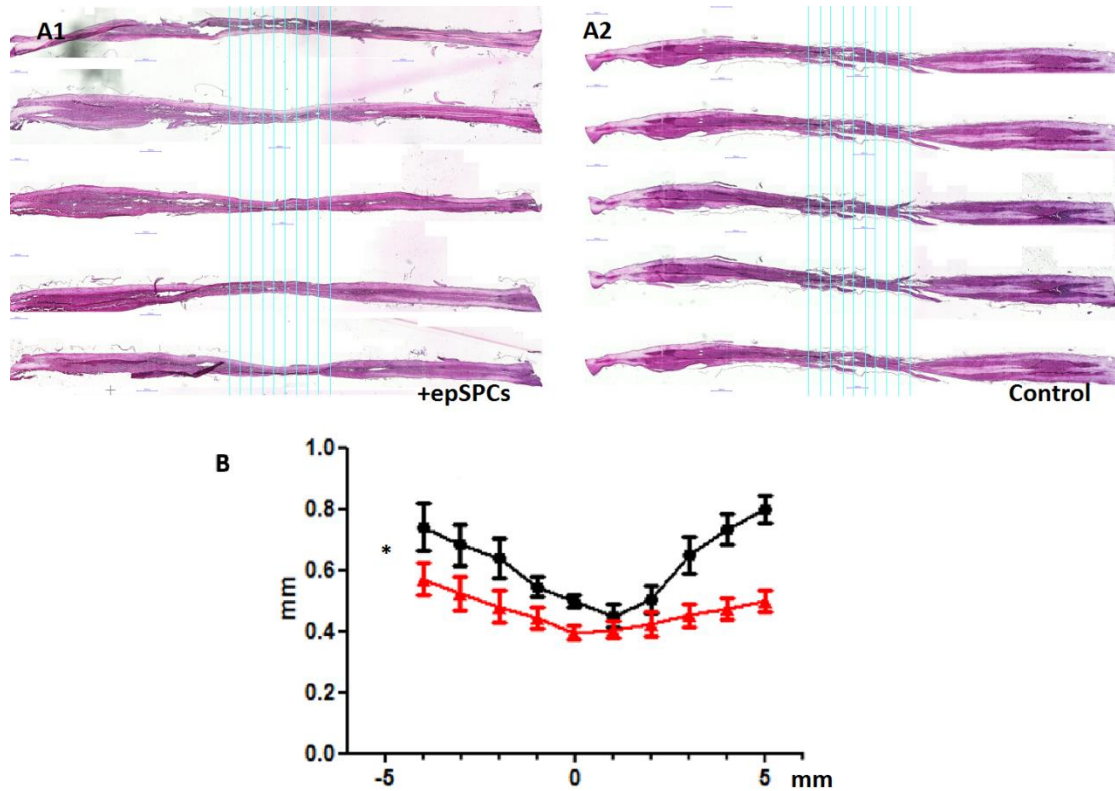


Figura 10: A: Secciones longitudinales de médula espinal tras tinción con H/E. A1: Trasplante. A2: Control. La disposición de las médulas se utilizó para realizar el cálculo del espesor mediante el Adobe PS2. B: Resultados en mm del espesor de las médulas de los grupos control y trasplante con lesión severa. Ambos grupos presentan diferencias estadísticamente significativas ($p=0,002$). ▲: Grupo epSPCs ($n=11$). ■: Grupo control ($n=7$). p value <0.05 comparando con el grupo trasplante (+epSPC)

Dentro del estudio ultraestructural se realizaron cortes ultrafinos de sección transversal con el fin de detectar a través del detalle ultraestructural el proceso de remielinización incipiente en ambos grupos, control y trasplantado con epSPCi (Figuras 11-12). En los animales trasplantados se observaron axones mielínicos valorados de forma cualitativa en mayor cantidad que en los controles. A su vez, las vainas de mielina presentes en el área de lesión de los animales trasplantados estaba mejor organizada, con menor deformidad y se observaron numerosos de oligodendrocitos activos produciendo dicha mielina. En los controles se encontraron abundantes astrocitos reactivos que se localizaban principalmente formando la barrera en la zona cicatricial, entre la lesión y el tejido externo (Figura13).

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

Se observaron estructuras compatibles con células fagocíticas llenas de material de desecho, tanto en el control como en el trasplante. Valorando de forma cualitativamente, estas estructuras resultan mayoritarias en el control que en el trasplante (Figura 14).

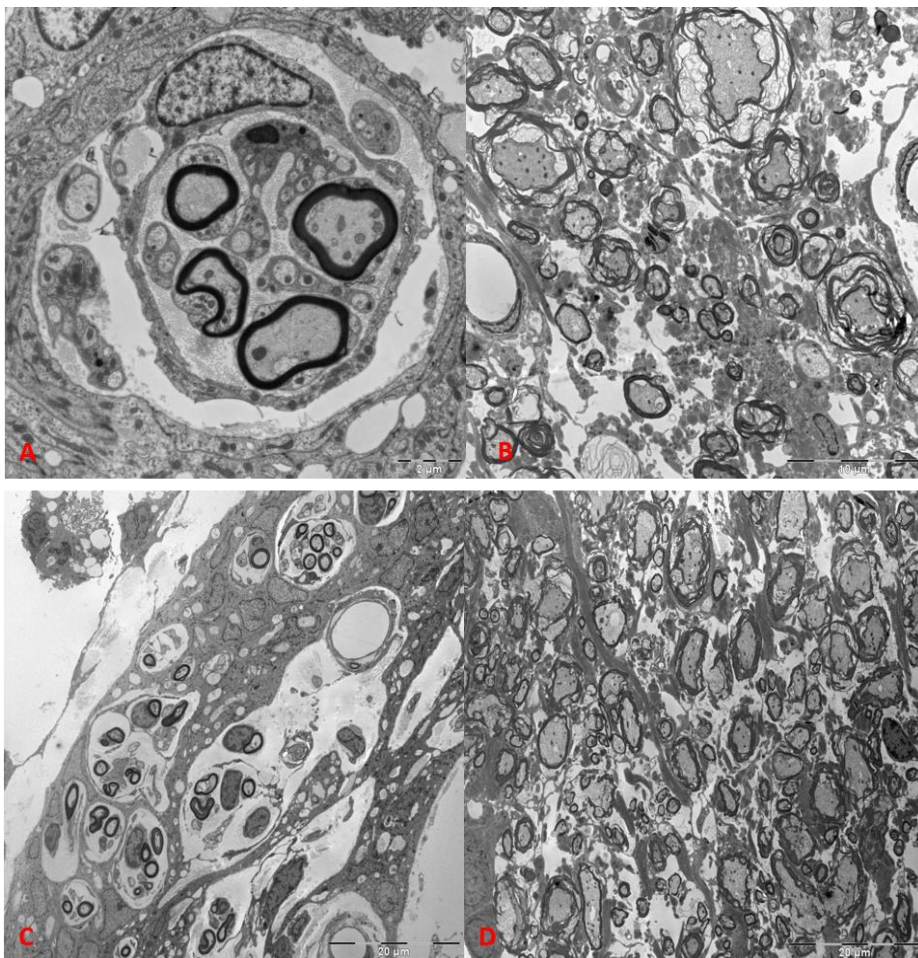


Figura 11: Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión. A y B: Imágenes de animales control. C y D: Imágenes de animales trasplantados. A: Axones mielínicos (señalados en rojo) y amielínicos (señalados en amarillo), estos últimos en gran cantidad. B: Axones mielínicos de la zona externa a la lesión. Obsérvese la deformidad de las vainas de mielina. C: Axones amielínicos y oligodendrocitos produciendo mielina en la zona de la lesión. D: Axones mielínicos de la zona externa a la lesión con morfología similar a la normalidad.

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

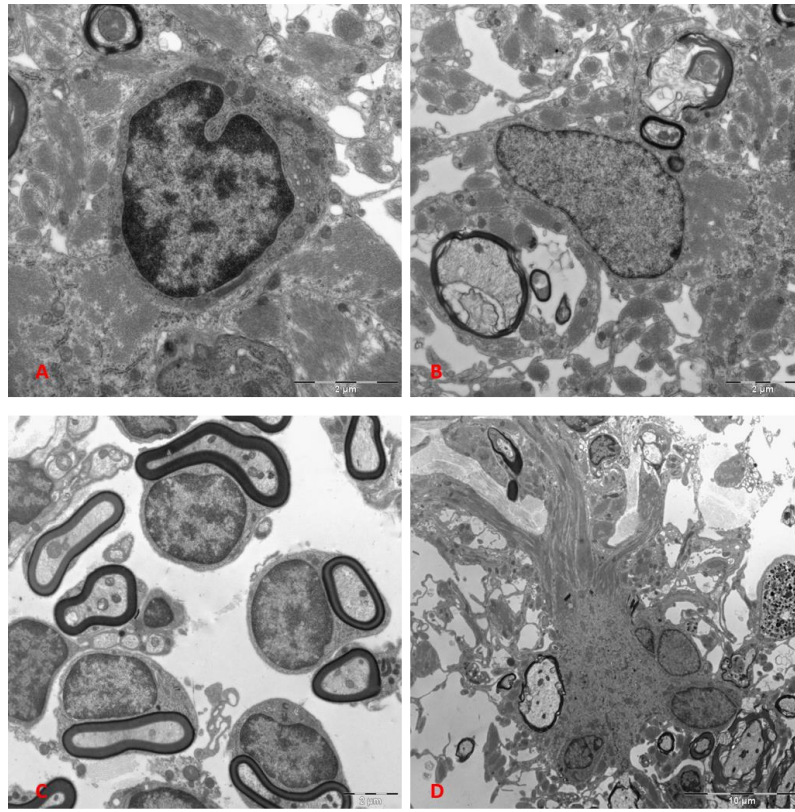


Figura 12: Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión. A y B: Imágenes de animales control. C y D: Imágenes de animales trasplante. A: Célula anormal compatible con oligodendrocito. B: Célula anormal compatible con astrocito reactivo. C: Oligodendrocitos activos produciendo vainas de mielina. D: Astrocito y extensiones astrocíticas.

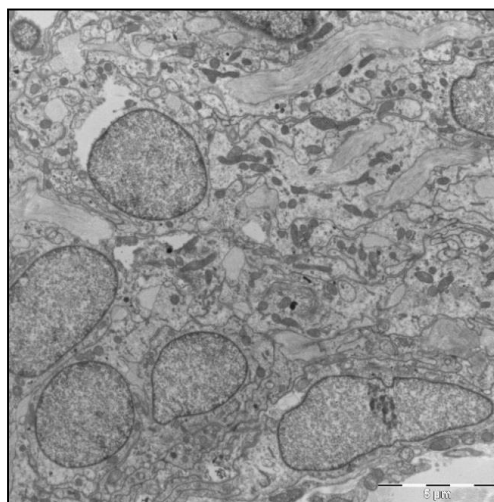


Figura 13: Imagen de microscopía electrónica. Astrocitos reactivos formando la cicatriz glial.

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

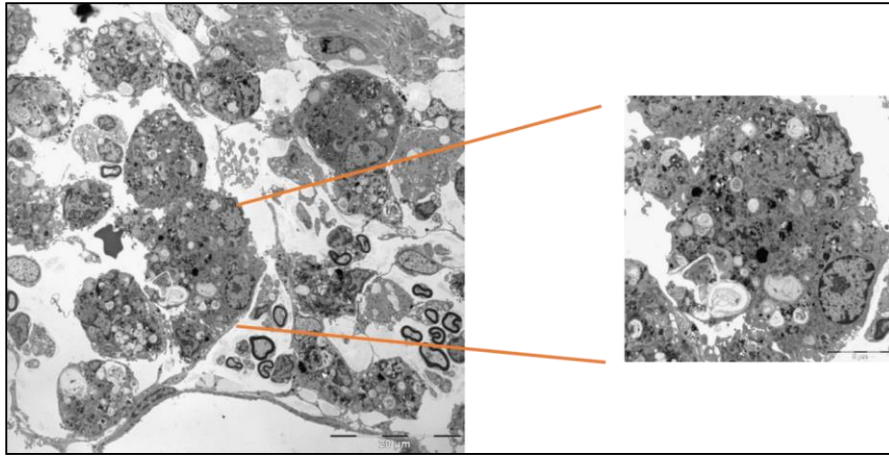


Figura 14: Imagen de microscopía electrónica. Células fagocíticas llenas de debris celular.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas se evaluó la extensión de la cicatriz glial, compatible con el área de lesión en los diferentes grupos. Para ello se utilizó el marcador de astrocitos GFAP, de forma que se delimitara la barrera astrocítica que forma la cicatriz glial (Figura 15):

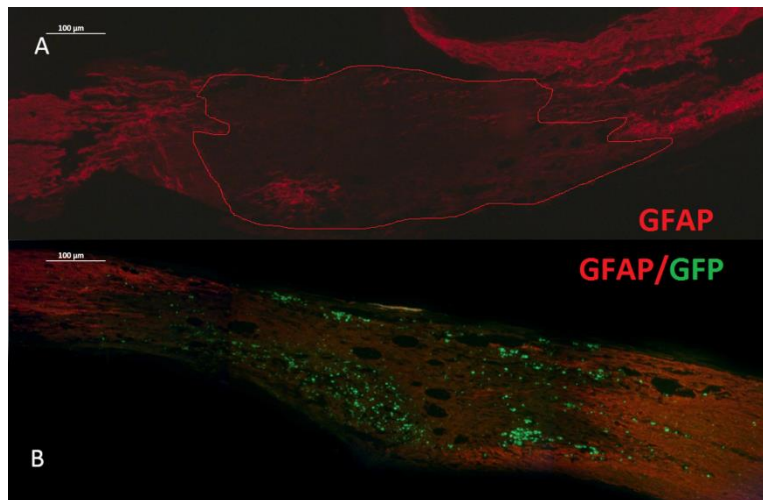


Figura 15: Imagen inmunohistoquímica del estudio del área cicatricial. A: Animal Control. B: Animal trasplante. Se observan en verde las células trasplantadas. En ambas imágenes, se observa el área GFAP negativa que delimita el área cicatricial (área delimitada por la línea roja).

Se realizó un estudio comparativo cuantificando la extensión de la cicatriz glial delimitada por la reactividad de GFAP como marcador astrocitario, entre ambos grupos, control y trasplante. El estudio estadístico reveló que no existían diferencias entre las medias de ambos grupos siendo el valor p 0,76. (Figura 16).

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

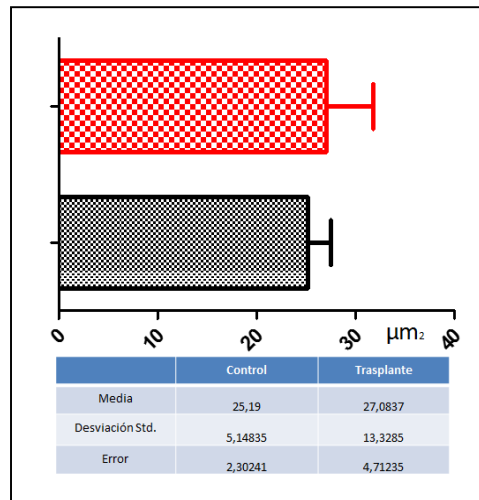


Figura 16: Representación gráfica del área de lesión en el grupo control (negro) y en el grupo trasplante (rojo). La n de estudio fue 5 y 8, respectivamente. Se indican los resultados del estudio de distribución de frecuencias obtenidos.

Establecida el área de lesión se localizaron las células trasplantadas con el fin de comprobar si habían sido capaces de migrar desde el punto de inyección y se observó como las células epSPCi, GFP positivas, trasplantadas habían sido capaces no solo de migrar sino de atravesar e incluso permanecer en la zona cicatricial de la lesión (Figura 17; epSPC marcadas en verde).

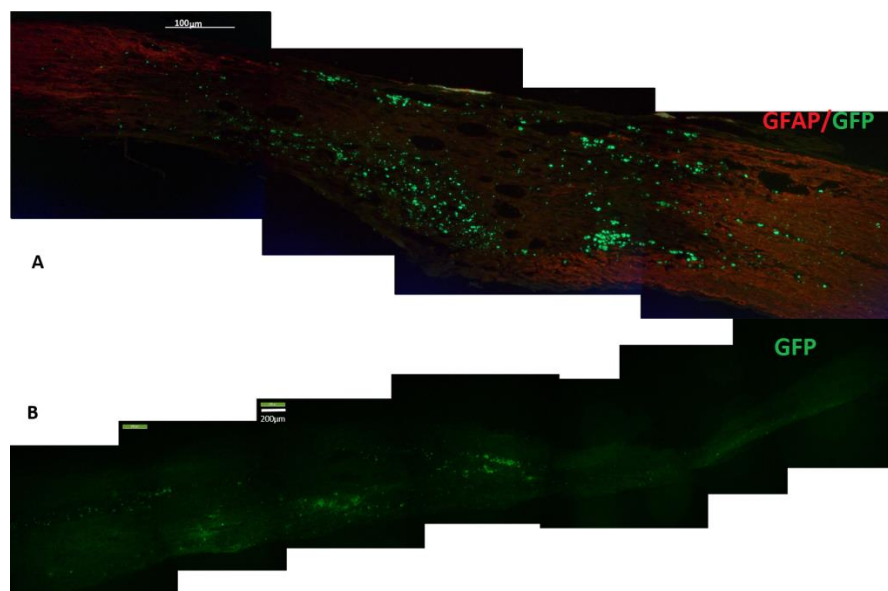


Figura 17: Imagen inmunohistoquímica que muestra las células GFP trasplantadas. A: epSPCs trasplantadas dentro del área de lesión (GFP) 4 meses después del trasplante (en rojo se marca GFAP, delimitando la zona de la cicatriz glial). B: Migración de las epSPCs a través de la médula, dentro y fuera de la lesión. Obsérvese la extensión de la imagen B donde la barra de medida indica 200 µm.

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

El estudio inmunohistoquímico con el marcador de fibras nerviosas, neurofilamento tubulina III o TUJ1, muestra como las fibras nerviosas atraviesan el área de lesión (Figuras 18 y 19). Se realizó un estudio cuantitativo de las mismas en relación al área de cicatriz, área GFAP negativa. (Figuras 20).

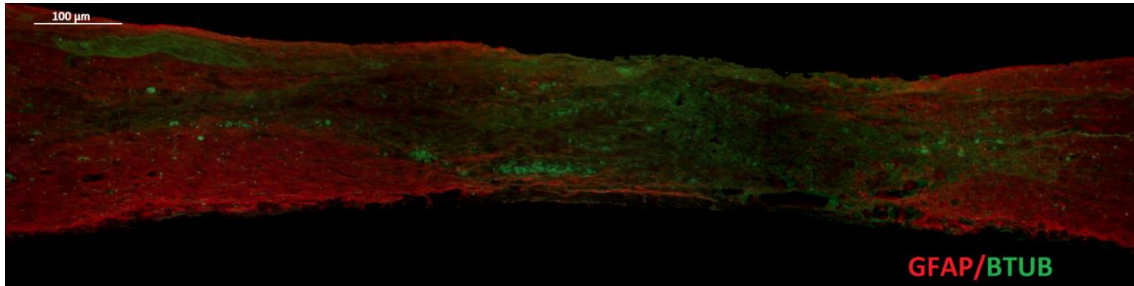


Figura 18: Imagen inmunohistoquímica que muestra el paso de fibras nerviosas (naranja) por la zona de la lesión (zona GFAP negativa) en un animal control, en menor proporción que en el caso del grupo trasplante.

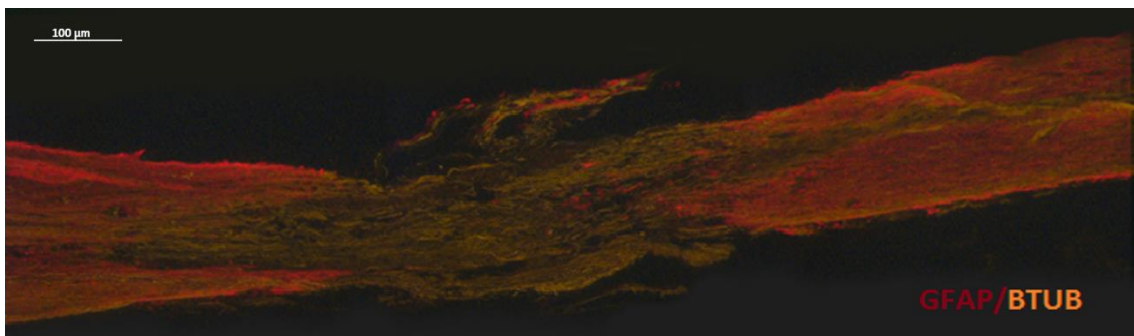
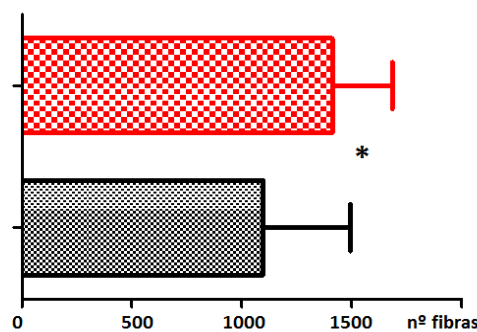


Figura 19: Imagen inmunohistoquímica que muestra el paso de fibras nerviosas (naranja) por la zona de la lesión (zona GFAP negativa) en un animal trasplante.

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



REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

Figura 20: Grafica representativa de las medias obtenidas al analizar las fibras nerviosas presentes dentro del área cicatricial. En rojo el grupo trasplante (n=7) En negro el grupo control (n=4). Diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0,05$) representadas con asterisco.

TRANSPLANTE DE epSPC VIA INTRATECAL:

Como parte del **objetivo 1**, hemos realizado un ensayo in vivo, con 30 animales, distribuidos en 3 grupos, grupo control (con lesión medular severa), grupo intramedular (LM severa con epSPC trasplantados intramedularmente inmediatamente tras la lesión, agudo), grupo intratecal (LM severa con epSPC trasplantados intratecalmente inmediatamente tras la lesión, agudo). Ambos grupos experimentales recuperan de forma significativa la actividad locomotriz en comparación con el grupo control (para el trasplante intramedular ya lo habíamos descrito con anterioridad, Moreno et al, Stem Cell 2009), aunque no se observó diferencias significativas entre ambos grupos de trasplante.

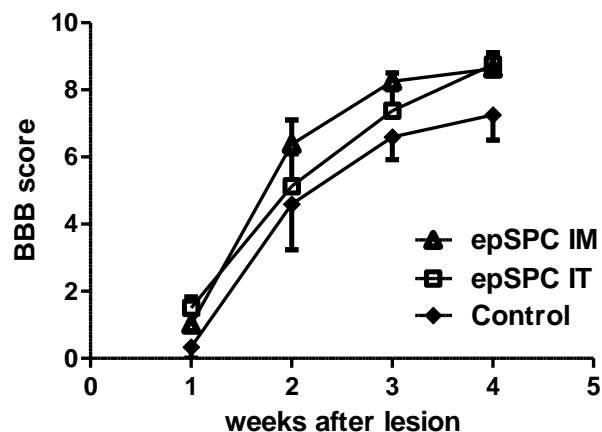


Figura 21: Estudio funcional por test locomotor (BBB) en grupos de animales sólo lesionados en comparación con aquellos además trasplantados con epSPCi intramedular (IM) o intratecalmente (IT) en estadio agudo

Hemos analizado el tejido medular post-mortem, dos meses tras lesión y trasplante, con el objetivo de estudiar la distribución y supervivencia del trasplante de epSPC en ambas aproximaciones (Figura 22). Aún no hemos analizado suficiente número de animales para poder hacer un estudio cuantitativo, pero la tendencia en general es que el trasplante IT muestra mejores tasas de supervivencia. La distribución de las células trasplantadas, muestra un patrón diferente en ambas estrategias, aunque aún estamos analizando las consecuencias de cada una de ellas. Sin embargo, es apreciable en las

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

imágenes que en ambos tipos de trasplante existe una distribución en todo el espesor medular.

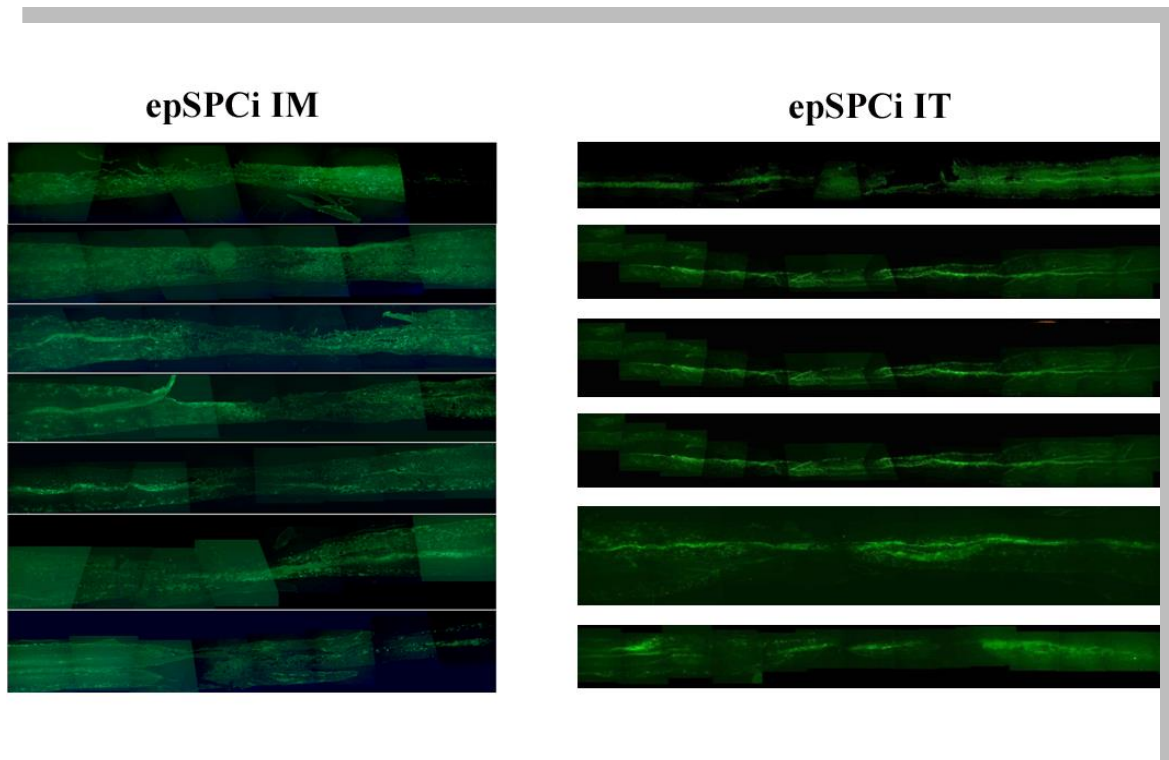


Figura 22: Estudio anatómico de distribución y supervivencia del trasplante de epSPCi intratecal (IM) versus intramedular (IT) en modelo agudo:

Estamos analizando el tejido por técnicas de inmunohistoquímica y western blot para evaluar la diferencia, si hubiera, en mecanismos relacionados con neuroprotección y reparación.

En estos momentos estamos reproduciendo este experimento realizado en agudo en fases crónicas.

Objetivo 2 y 3: Nanomedicine-based and Combinatorial Treatments:

En el proyecto TIME to MOVE hemos generado varias nanomedicinas, seleccionando principios activos que ya han mostrado un beneficio en su uso en forma “libre” sin nano-conjugar, pero que por su naturaleza lábil y mala biodisponibilidad mejorarían

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

significativamente su actividad en forma de nanoconjugados poliméricos. Hemos empleado hasta la fecha, dos principios activos, la Curcumina y el Fasudil. Los resultados obtenidos con la combinación del nanofármaco de Curcumina (PA-Curcumin) han sido recientemente publicados en la prestigiosa revista científica *Biomaterials* (*Biomaterials* 113 (2017) 18e30).

La curcumina es un componente antiinflamatorio natural de la cúrcuma (*Curcuma longa*) ligado a la regulación de la apoptosis, con efectos antioxidantes y actividad neuroprotectora en el tratamiento agudo de las LM⁶⁰. Sin embargo, su baja hidrosolubilidad y la inestabilidad del compuesto en solución acuosa hacen que su biodisponibilidad sea muy baja⁶¹. Es por ello que ya se han hecho esfuerzos para mejorar estas propiedades utilizando diversos nano-transportadores⁶². Los sistemas poliacetálicos sensibles al pH (96) tienen varias características que los convierten en portadores ideales de fármacos para el tratamiento de la LM. Son relativamente estables a pH fisiológico, pH 7,4, y muestran una degradación dependiente en medio ligeramente ácido, alrededor de pH 6 que es el que se encuentra en los endosomas, los lisosomas y en un ambiente inflamatorio⁶³.

El laboratorio de la Dra M^a Jesús Vicent, es quien ha realizado el desarrollo experimental de la parte química, generando el nuevo nanoconjugado de Curcumina (PA-Curcumin) y en el laboratorio de la Dra Victoria Moreno hemos realizado los ensayos en células y en el modelo animal de lesión medular. La conjugación polimérica de curcumina a una cadena portadora de poliacetales (PA), sensible a cambios pequeños en el pH, favorece por un lado la hidrosolubilidad del principio activo, y por otro lado su estabilidad manteniendo la molécula activa por más tiempo generando así un sistema de liberación sostenida (Figura 1).

En primer lugar se realizaron estudios in vitro de toxicidad, en cultivos primarios de epSPCs y neuronas maduras desde los ganglios dorsales (DRGs) de ratas adultas. El estudio comparativo del efecto de la forma libre de curcumina con su formado conjugada PA-Curcumina (a una dosis final de 10 μ M en equi-molecularidad de curcumina en ambos casos) durante 72 horas en cultivo mostró que el nanoconjugado mejoraba significativamente la supervivencia celular en ambos casos (Figura 2A, B). Al valorar los tratamientos morfológicamente se observó la evidencia de una mayor elongación axonal en los cultivos de neuronas maduras en presencia de PA-Curcumina (Figura 2C), efecto evidenciado además en organocultivos de lonchas de

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

médula espinal neonatal (Figura 2D). Este efecto de elongación axonal no se vio alterado en co-cultivo con epSPCi (Figura 2E).

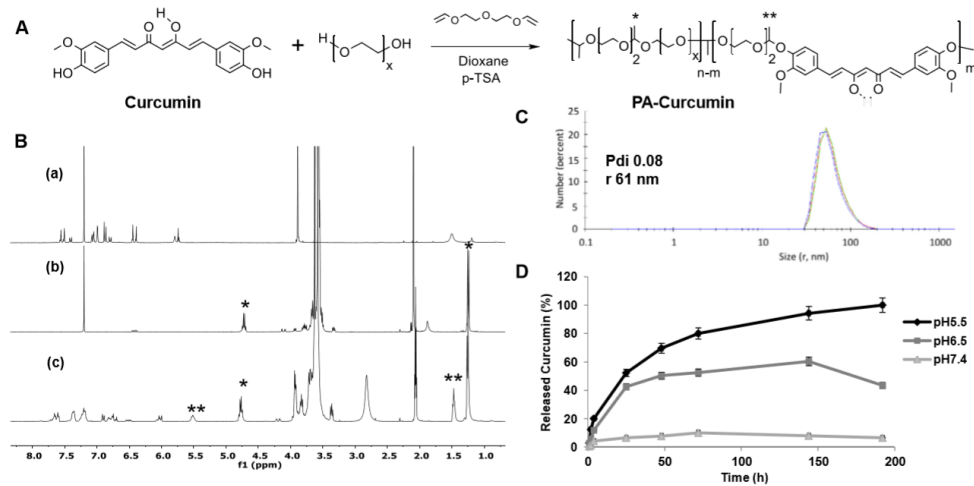
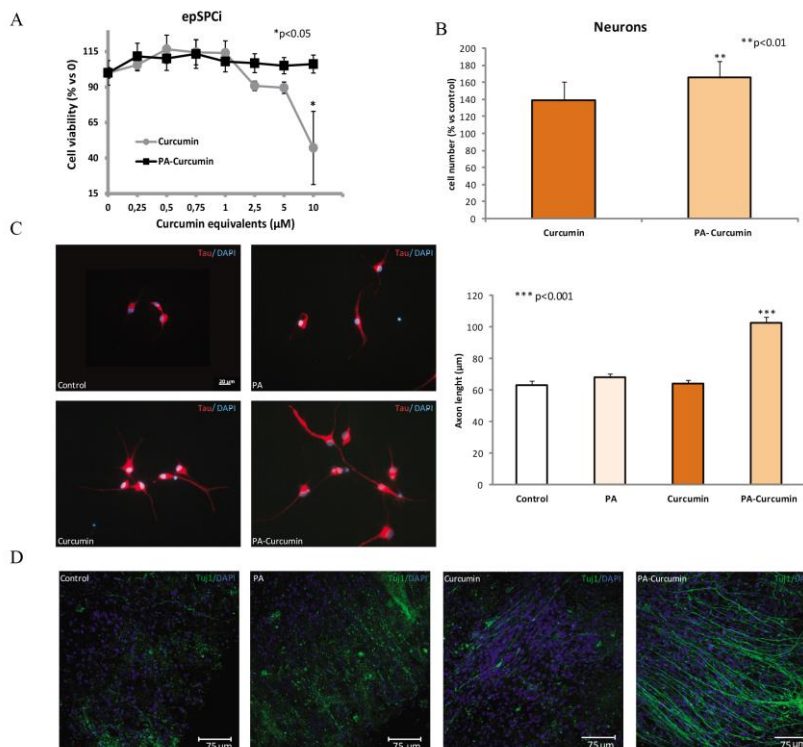


Fig. 1. Polyacetal (PA)-Curcumin: Structure, synthesis and characterization. (A) Synthetic approach followed to obtain polyacetal curcumin conjugate (PA-curcumin). (B) Stacked ^1H NMR (300 MHz) of (a) free Curcumin (CDCl_3), (b) Control polyacetal (CDCl_3) and (c) PA-Curcumin (3.8% w/w Curcumin loading) (d_6 -acetone). Indicating * PEG-acetal and ** Curcumin acetal bonds. (C) Example of particle size obtained by Dynamic Light Scattering (DLS) from PA-curcumin (3.8% w/w) at 1 mg/mL in PBS 7.4 at 25 °C. Size distribution by number. (D) pH-responsive Curcumin release from PA-curcumin (3.8%w/w) conjugate.



REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

E

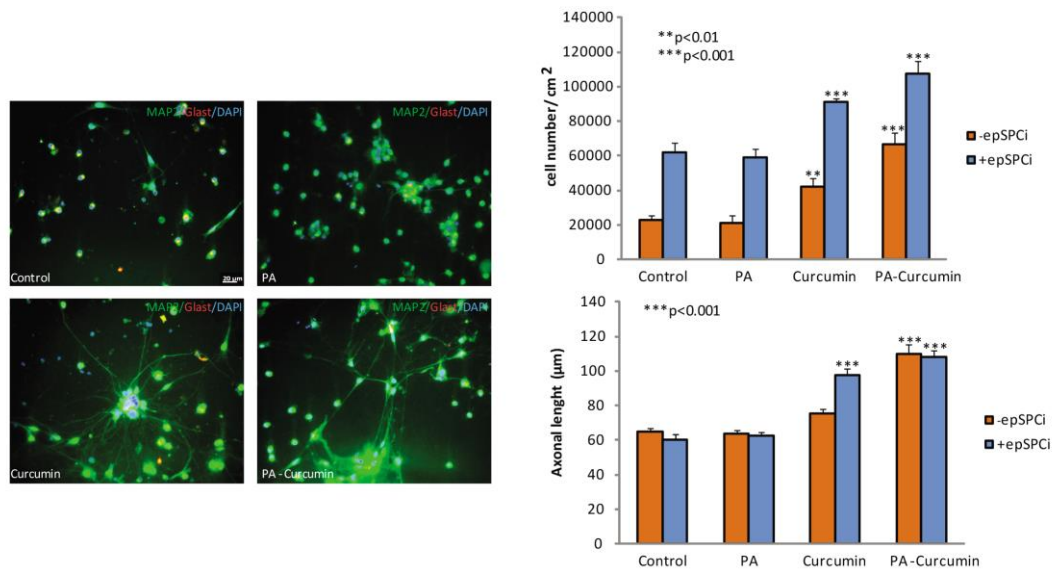


Fig. 2. PA-curcumin Improves Neural Survival and Axon Growth *in vitro*. (A) Increasing equimolar doses (0–10 µM, drug equivalent) of both PA-curcumin and free curcumin were assayed for 24 h in epSPCi neurosphere forming culture for cell survival rate analysis. (B) Adult primary DRG culture were incubated with 10 µM curcumin-equiv. of both PA-curcumin or the free form for 72 h to determine cell survival. (C) Immunostaining for Tau (mature neural marker of projecting axonal fibers) was performed to measure axonal length in all tested conditions. Quantification of axonal length is showed in the right graph. (D) Spinal cord neonatal (8 days-old rats) organotypic slices culture were incubated

Este trabajo muestra cómo el conjugado de curcumina aumenta la neuroprotección y el crecimiento axonal en las epSPCi, mostrándose como un nuevo inhibidor de la ruta Rho/Rock. Además si se aplica el tratamiento en fase aguda en un modelo de LM, la PA-Curcumina mejora la recuperación funcional a través de la inhibición de la formación de la cicatriz glial, la inflamación y la muerte celular. Al indagar en el posible mecanismo de acción que media este efecto de crecimiento axonal, se demostró que la curcumina, en forma libre y conjugada, tiene capacidad inhibitoria de la kinasa Rho, responsable del colapso del crecimiento axonal, inhibiendo la activación de uno de sus proteínas diana, Limk (Figura 5).

El tratamiento con PA-Curcumina en un modelo de LM severa en fase aguda mejoró significativamente el rescate locomotriz en comparación con el grupo control (Figura 3A).

Sin embargo, la recuperación funcional de la fase crónica de la LM requiere no sólo de actividad neuroprotectora sino que es prioritaria la actividad regeneradora. En este modelo, no se encontraron recuperaciones significativas a nivel locomotor en aquellos animales tratados sólo con el nanoconjugado, sin embargo la combinación de éste con el trasplante de epSPCi mostró los mejores resultados en el rescate funcional en comparación con el resto de los grupos experimentales (Figura 4A). En ambos modelos, agudo y crónico, el tratamiento con PA-

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

Curcumina redujo la formación de quistes y cavidades (Figura 3C; Figura 4B), la extensión de la cicatriz (Figura 3D; Figura 4C) y mejoró la preservación de fibras neurales en la zona de la lesión (Figura 3D; Figura 4C). Sin embargo, todos estos parámetros mejoraron en el tratamiento combinado con la terapia celular basada en el trasplante intratecal de epSPCi (Figura 4 y 5).

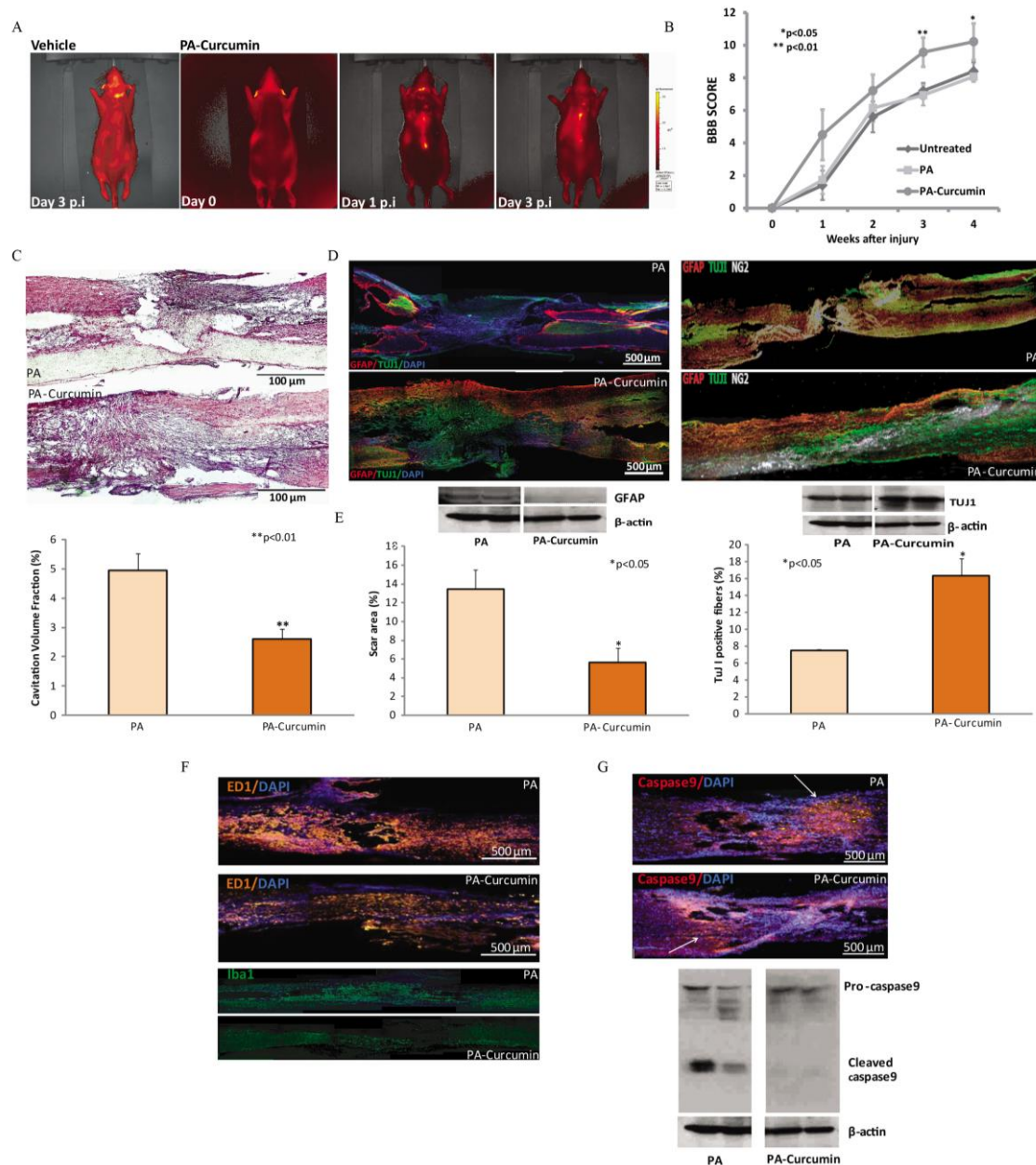


Fig. 3. PA-curcumin Rescues Functional Activity after Severe Acute Rat Spinal Cord Injury (SCI). (A) IVIS[®] imaging system showing PA-curcumin diffusion series, before injection (left), immediately after injection (middle), and 48 h post-injection (right) in which the compound reach the injured area. (B) Functional locomotion analysis (BBB scores) over 4 weeks post-treatment with PA-curcumin or PA polymer as control. (C) (upper panel) Hematoxylin-Eosin staining of sagittal sections from spinal cords showing the cavities 4 weeks after SCI of PA-curcumin group and PA control group; (lower panel) Quantitation of the cavitation volume. (D) Immunohistochemical analysis (upper panels) and Western Blotting (lower panels) of GFAP negative area and TuJ1 positive fibers from rats treated with PA-curcumin or PA (left panels). NG2, GFAP and TUJ1 merge representative images (right panels) of PA-curcumin or PA (left panels) spinal cord injured area (right panels); (E) Western-blotting analysis of GFAP and TuJ1. (F) Immunostaining for ED1 (macrophages) and Iba1 (microglia). (G) Immunostaining (upper panel) and western blot analysis (lower panel) of caspase 9 expression (apoptotic marker). Quantitative data are expressed as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA; $n = 12$, $n = 15$ and $n = 8$ in PA, PA-curcumin and untreated groups respectively for BBB analysis; $n = 6$ for histological analysis and western blotting).

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

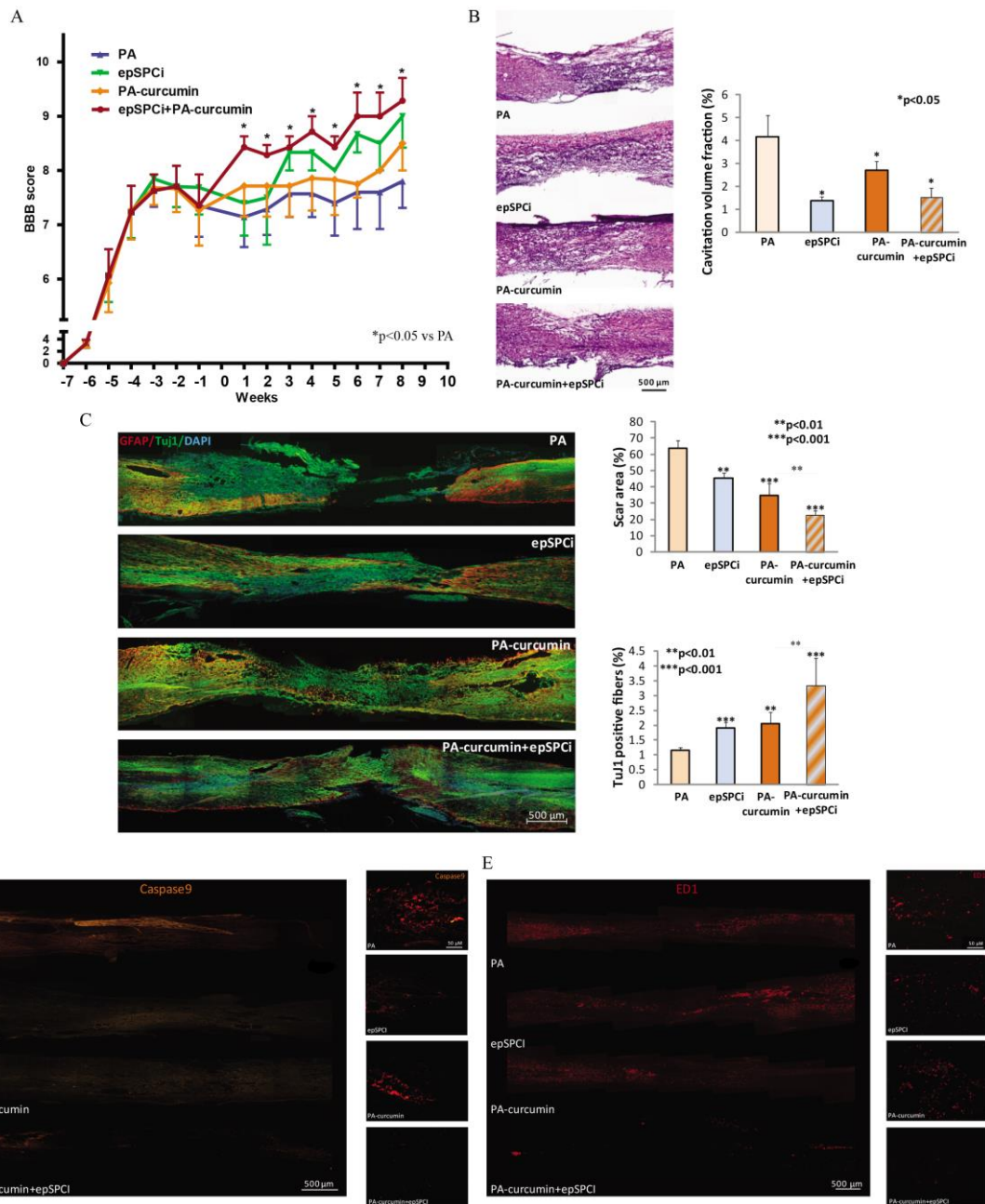


Fig. 4. Effects of Combinatorial Therapy of epSPCi and PA-curcumin Conjugate in Chronic SCI. (A) Functional locomotion analysis (BBB scores). Week 0 was considered the chronic stage and the time of first treatments. (B) Histological analysis from spinal cords stained with hematoxylin-eosin of cavitation volume. (C) Immunohistochemical analysis, and quantification of GFAP negative or scar area (upper graph) and Tuj1 positive fibers in the scar area (lower graph). Immunohistochemical analysis of caspase-9 (D) and ED1 (E) in sagittal section of thoracic region including the injured area from all the animals groups. Enlarged images corresponding to the injured area shown on the right of each original. Quantitative data are expressed as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs PA group or the indicated comparison (ANOVA; $n = 9$ in all four groups).

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

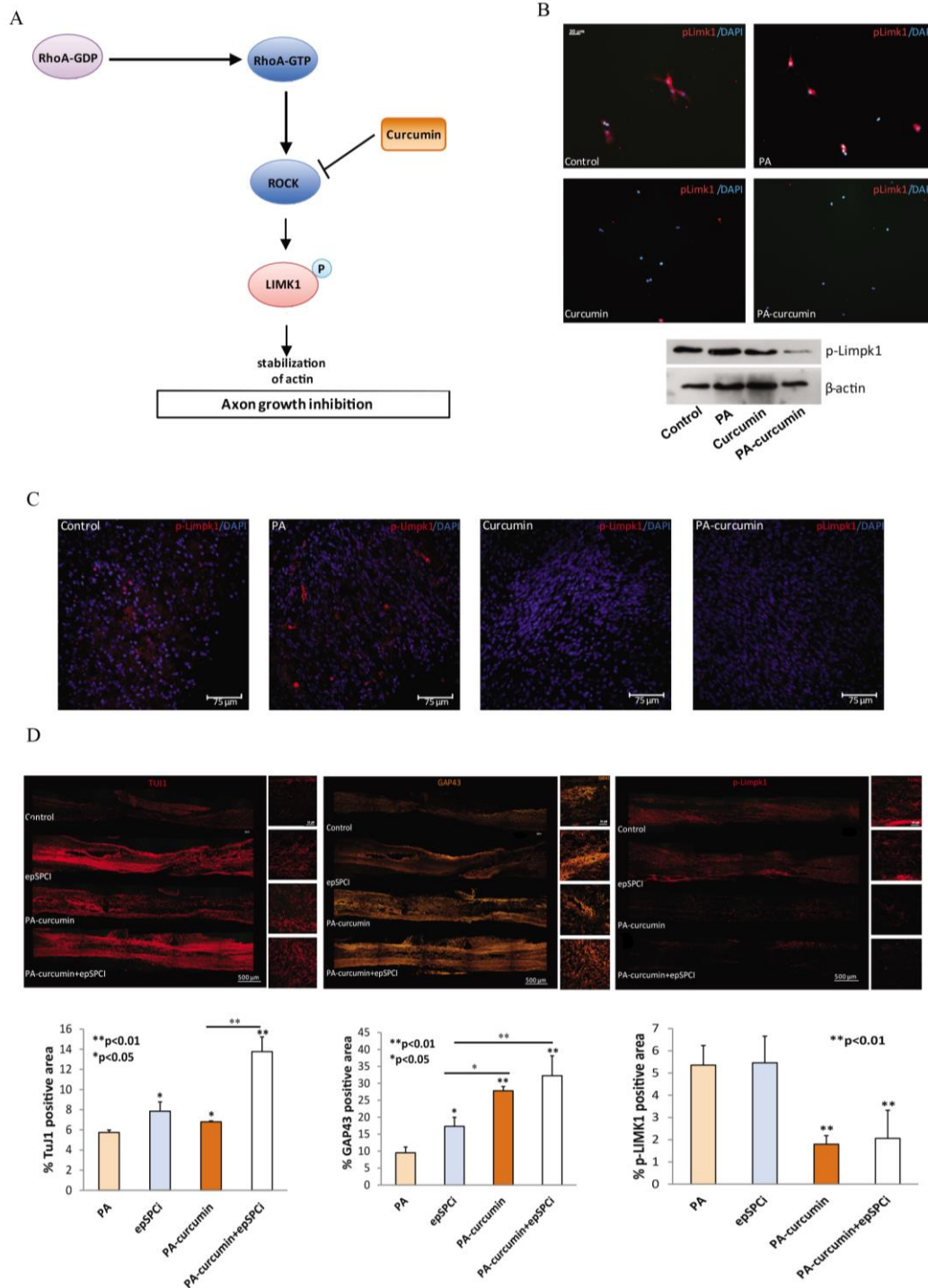


Fig. 5. Rho/Rock Pathway Inhibition by Curcumin and PA-curcumin Promotes Axonal Growth. (A) Proposed model of Rho/Rock-kinase signaling pathway regulation by PA-curcumin. (B) Immunostaining (upper panel) and Western blotting (lower panel) of Rock substrate Limk1 (phosphorylated form) on primary DRGs treated with curcumin or PA-curcumin or vehicle (control) or PA. (C) Spinal cord organotypic slices culture subject to immunohistochemical analysis of P-Limk1 upon the indicated treatments. Cell nuclei were stained with DAPI. (D) Representative sagittal spinal cord sections including the injured area from chronic SCI of all indicated treatments, were immunostained with TuJ1 (left) a neurofilament for neuronal marker, GAP43 (middle) as growth cone marker, and p-Limk1 (right) as Rock target-protein marker. Enlarged images corresponding to the injured area shown on the right of each original. Quantification of each protein expression is represented as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs PA group or the indicated comparison (ANOVA; $n = 9$ in all four groups).

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

Según lo acordado con el grupo de Regeneración Tisular y Neuronal (V. Moreno), se propuso la preparación de un conjugado polimérico con un fármaco inductor del crecimiento axonal como el Fasudil® (inhibidor de Rho-kinasa) para su posterior evaluación en un modelo animal de lesión medular crónica y en combinación con el tratamiento mediante células madre. Hemos generado hasta tres nanofármacos que liberan el principio activos, Fasudil, en respuesta a diferentes estímulos, y se han probado todos con éxito en ensayos biológicos in vitro, con neuronas maduras y precursores neurales así como en el modelo in vivo de lesión medular crónica, con resultados muy prometedores. Sin embargo esta información aún no podemos difundirla ya que estos resultados se encuentran en proceso de protección de patente. En pocos meses podremos hacer públicos todos los resultados obtenidos hasta la fecha en relación al uso individual de los nanoconjugados, en combinación con la terapia celular o en combinación con otros principios activos.

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

Objetivo 4: human ependymal cell transplantation:

Planteamos la traslación de los resultado de laboratorio realizados en roedor, en primer lugar, generando líneas de células ependimarias primarias de origen humano. En una primera aproximación hemos podido realizar hasta tres cultivos primarios procedentes de médula espinal no lesionada, extraída post-mortem, desde pacientes adultos donantes de órganos. La primera muestra fue enviada desde A Coruña, por el Dr Antonio Rodriguez Sotillo y las siguientes dos muestras las recibimos desde el Hospital la Fe por la Dra Eugenia Pareja y el Dr Jose Mir. En los tres casos seguimos el procedimiento de cultivo establecido y seguido para las muestras de roedor, y obtuvimos neurosféricas morfológicamente similares a las obtenidas desde médulas sanas en roedor (Figura 28). Parte del cultivo enriquecido en neurosféricas, en los tres casos, se ha criopreservado para proseguir con su estudio. Sin embargo todas las muestras de médula humana adulta que se cultivaron no mostraron una buen eficacia en la amplificación del cultivo, que fue en todos los casos muy escaso y pobre con una vida media muy corta. Es por ello que realizamos ensayos de microscopia electrónica (fotos en gris de la derecha en figura 29) y observamos que el canal ependimario en adulto no mantiene el patrón fenotípico del canal adulto en rata.

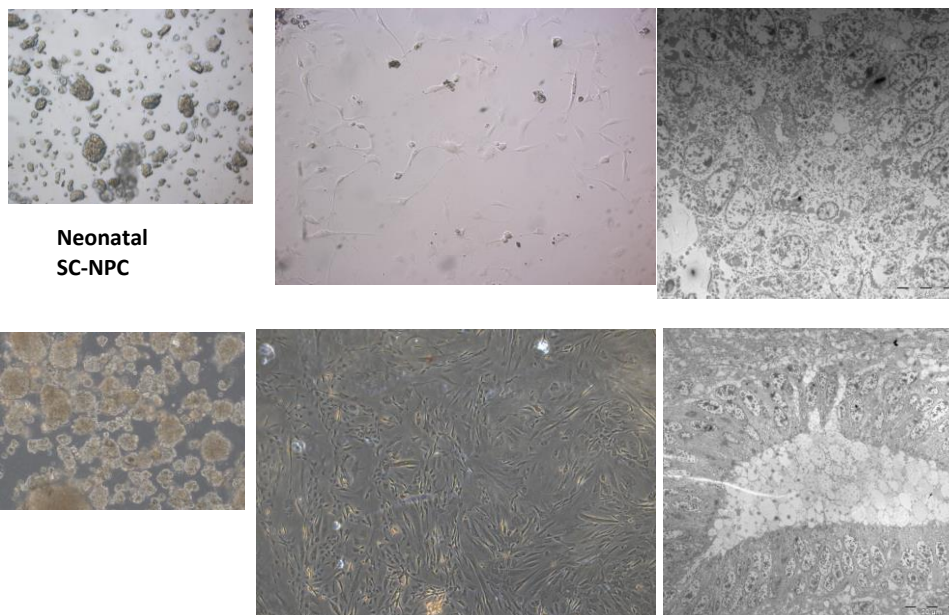


Figura 29: Cultivo primario de células ependimaras desde tejido medular humano para el aislamiento de epSPC adulto y neonatal

Una primera alternativa fue generar el banco desde tejido neonatal, para poder asegurar así un crecimiento de la población precursora. En la parte inferior de la figura se muestra el cultivo desde muestra neonatal tanto en forma de neurosféricas como en adherencia. En este caso, la imagen de microscopia electrónica muestra una estructura

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

fenotípica del canal con células ependimarias viables. Sin embargo esta estrategia no se ha podido continuar ya que no hemos obtenido mas muestra neonatal. Es por ello que en la actualidad hemos establecido una colaboración con el departamento de obstetricia del Hospital Val De Hebron, y con los pertinentes permisos del comité ético clínico, ya aprobados, vamos a generar el banco de células humanas de médula espinal desde tejido fetal, de abortos legalmente inducidos. Este banco se va a generar en las instalaciones de grado clínico, en salas GMP, del banco de sangre y tejidos de Cataluña. Las primeras muestras serán procesadas en el mes de Abril de 2018.

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

CONCLUSIONES PRELIMARES:

1. El trasplante único via intramedular de células ependimarias en un modelo de rata de lesión medular crónica mejora significativamente la actividad locomotriz desde dos semanas tras el trasplante
2. El trasplante intratecal en el modelo agudo de LM en rata muestra similares resultados de recuperación funcional al trasplante intramedular
3. La terapia combinatoria del nanoconjugado de curcumina con células ependimarias por administración intratecal mejora la actividad locomotriz tras una lesión medular crónica significativamente mejor que el grupo solo trasplantado con células ependimarias
4. Las células ependimarias humanas pueden aislarse y amplificarse desde tejido neonatal
5. La síntesis de nanoconjugados con PGA de Fasudil sensibles a su liberación por pH ligeramente ácido, por la acción de proteasas o por un ambiente reductor muestra buenos perfiles de internalización, de viabilidad celular en ensayos in vitro con células ependimarias, de elongación axonal y de recuperación funcional en un modelo de lesión medular crónica (en proceso de protección por patente)

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Urdzikova L, Jendelova P, Glogarova K, et al. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 2006;23:1379-1391.
2. Ray SK, Dixon CE, Banik NL. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histol Histopathol*. 2002;17:1137-1152.
3. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, et al. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol*. 2001;24:254-264.
4. Oyibo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71:281-299.
5. Fehlings MG, Nguyen DH. Immunoglobulin G: a potential treatment to attenuate neuroinflammation following spinal cord injury. *J Clin Immunol*. 2010;30 Suppl 1:S109-112.
6. Bareyre FM, Schwab ME. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends Neurosci*. 2003;26:555-563.
7. Catherine T. Liverman. *Spinal Cord Injury: progress, promise and priorities*. Washington, DC: The National Academy Press 2005.
8. Popovich PG, Jones TB. Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:13-17.
9. Schwartz M, Kipnis J. Protective autoimmunity: regulation and prospects for vaccination after brain and spinal cord injuries. *Trends Mol Med*. 2001;7:252-258.
10. Xiong Y, Rabchevsky AG, Hall ED. Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J Neurochem*. 2007;100:639-649.
11. Xu W, Chi L, Xu R, et al. Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2005;43:204-213.
12. Sullivan PG, Thompson MB, Scheff SW. Cyclosporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 1999;160:226-234.
13. JW O. *Neurotoxicity of excitatory amino acids. Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. New York: Raven Press; 1976.
14. Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2000;17:915-925.
15. Ray SK, Hogan EL, Banik NL. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res Brain Res Rev*. 2003;42:169-185.
16. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26:S2-12.
17. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*. 2001;53:135-159.
18. Guly HR, Bouamra O, Lecky FE. The incidence of neurogenic shock in patients with isolated spinal cord injury in the emergency department. *Resuscitation*. 2008;76:57-62.
19. Rossignol S, Schwab M, Schwartz M, et al. Spinal cord injury: time to move? *J Neurosci*. 2007;27:11782-11792.
20. Silva NA, Sousa N, Reis RL, et al. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol*. 2014;114:25-57.

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

21. Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron*. 2002;35:283-290.
22. Fouad K, Dietz V, Schwab ME. Improving axonal growth and functional recovery after experimental spinal cord injury by neutralizing myelin associated inhibitors. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001;36:204-212.
23. Vinson M, Strijbos PJ, Rowles A, et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with ganglioside GT1b. A mechanism for neurite outgrowth inhibition. *J Biol Chem*. 2001;276:20280-20285.
24. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*. 1999;49:377-391.
25. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, et al. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2004;24:2143-2155.
26. Caballero SN-S, M. Fisiopatología de la lesión medular. Revision de literatura. *Vet. Mex*. 2005;36:75-86.
27. Muñoz Quiles C. Trasplante de glía envolvente olfatoria para reparar lesiones crónicas de la médula espinal de ratas adultas: de roedores a primates Instituto de Biomedicina. Valencia: Universidad de Valencia; 2007:316.
28. Blight AR, Toombs JP, Bauer MS, et al. The effects of 4-aminopyridine on neurological deficits in chronic cases of traumatic spinal cord injury in dogs: a phase I clinical trial. *J Neurotrauma*. 1991;8:103-119.
29. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, et al. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med*. 1997;3:73-76.
30. Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG, et al. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain*. 2003;126:1628-1637.
31. Jakeman L, Ma, M., Stokes, B. Considerins the use of transgenic mice in spinal cord research. In: Press P, ed. *Traumatic CNS Injury*; 2001:180-201.
32. Kundi S, Bicknell R, Ahmed Z. The role of angiogenic and wound-healing factors after spinal cord injury in mammals. *Neurosci Res*. 2013;76:1-9.
33. Somerson SK, Stokes BT. Functional analysis of an electromechanical spinal cord injury device. *Exp Neurol*. 1987;96:82-96.
34. Pearse DD, Lo TP, Jr., Cho KS, et al. Histopathological and behavioral characterization of a novel cervical spinal cord displacement contusion injury in the rat. *J Neurotrauma*. 2005;22:680-702.
35. Onifer SM, Rabchevsky AG, Scheff SW. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. *ILAR J*. 2007;48:385-395.
36. Scheff SW, Rabchevsky AG, Fugaccia I, et al. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. *J Neurotrauma*. 2003;20:179-193.
37. Hyun JK, Kim HW. Clinical and experimental advances in regeneration of spinal cord injury. *J Tissue Eng*. 2010;2010:650857.
38. Barnabe-Heider F, Frisen J. Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell*. 2008;3:16-24.
39. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999;96:25-34.
40. Thuret S, Moon LD, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:628-643.

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

41. Lu P, Jones LL, Snyder EY, et al. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2003;181:115-129.
42. Coutts M, Keirstead HS. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2008;209:368-377.
43. Llado J, Haenggeli C, Maragakis NJ, et al. Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci.* 2004;27:322-331.
44. Erceg S, Lainez S, Ronaghi M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to regional specific neural precursors in chemically defined medium conditions. *PLoS One.* 2008;3:e2122.
45. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, et al. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:14069-14074.
46. Hooshmand MJ, Sontag CJ, Uchida N, et al. Analysis of host-mediated repair mechanisms after human CNS-stem cell transplantation for spinal cord injury: correlation of engraftment with recovery. *PLoS One.* 2009;4:e5871.
47. Pollard SM, Conti L, Sun Y, et al. Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cereb Cortex.* 2006;16 Suppl 1:i112-120.
48. Kim HT, Kim IS, Lee IS, et al. Human neurospheres derived from the fetal central nervous system are regionally and temporally specified but are not committed. *Exp Neurol.* 2006;199:222-235.
49. Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, et al. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci.* 2000;20:8727-8735.
50. Parr AM, Kulbatski I, Tator CH. Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2007;24:835-845.
51. Moreno-Manzano V, Rodriguez-Jimenez FJ, Garcia-Rosello M, et al. Activated spinal cord ependymal stem cells rescue neurological function. *Stem Cells.* 2009;27:733-743.
52. Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Lim DA, et al. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex.* 2003;13:580-587.
53. Sarnat HB. Role of human fetal ependyma. *Pediatric neurology.* 1992;8:163-178.
54. Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, et al. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science.* 2006;311:629-632.
55. Hamilton LK, Truong MK, Bednarczyk MR, et al. Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience.* 2009;164:1044-1056.
56. Kojima A, Tator CH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 cause proliferation of ependymal precursor cells in the adult rat spinal cord in vivo. *Journal of neuropathology and experimental neurology.* 2000;59:687-697.
57. Barnabe-Heider F, Goritz C, Sabelstrom H, et al. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell.* 2010;7:470-482.
58. Meletis K, Barnabe-Heider F, Carlen M, et al. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol.* 2008;6:e182.
59. Bruni JE. Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech.* 1998;41:2-13.

REPORT DE RESULTADOS DEL PROYECTO TIME TO MOVE (2014-2017)

60. in W, Wang J, Zhu T, Yuan B, Ni H, Jiang J, et al. Anti-inflammatory effects of curcumin in experimental spinal cord injury in rats. *Inflamm Res*. 2014;63(5):381-7.; Sahin Kavakli H, Koca C, Alici O. Antioxidant effects of curcumin in spinal cord injury in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2011;17(1):14-8.; Ormond DR, Shannon C, Oppenheim J, Zeman R, Das K, Murali R, et al. Stem cell therapy and curcumin synergistically enhance recovery from spinal cord injury. *PLoS One*. 2014;9(2):e88916.
61. Metzler M, Pfeiffer E, Schulz SI, Dempe JS. Curcumin uptake and metabolism. *Biofactors*. 2013;39(1):14-20.
62. Lee WH, Loo CY, Young PM, Traini D, Mason RS, Rohanizadeh R. Recent advances in curcumin nanoformulation for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014;11(8):1183-201.; Wang S, Su R, Nie S, Sun M, Zhang J, Wu D, et al. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *J Nutr Biochem*. 2014;25(4):363-76.
63. Gimenez V, James C, Arminan A, Schweins R, Paul A, Vicent MJ. Demonstrating the importance of polymer-conjugate conformation in solution on its therapeutic output: Diethylstilbestrol (DES)-polyacetals as prostate cancer treatment. *J Control Release*. 2012;159(2):290-301