



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIRUGIA

TESIS DOCTORAL

**PAPEL NEUROPROTECTOR DE LAS CÉLULAS
MESENQUIMALES HUMANAS A NIVEL
OCULAR EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Romana García Gil

Licenciada en Medicina y Cirugía

Especialista en Oftalmología

Valencia 2015



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGIA COMPARADA ICBIBE

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIRUGIA

040G992 CIRUGIA EN OTONEUROOFTALMOLOGIA

TESIS DOCTORAL

**PAPEL NEUROPROTECTOR DE LAS CÉLULAS
MESENQUIMALES HUMANAS A NIVEL OCULAR EN LA
ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

AUTOR:

ROMANA GARCÍA GIL

Licenciada en Medicina y Cirugía

Especialista en Oftalmología

DIRECTORES:

Dr. JOSE MANUEL, GARCIA VERDUGO

Dra. SARA, GARCIA GIL-PEROTIN

Dra. MARIA DOLORES, PINAZO DURAN

Valencia 2015

D. José Manuel García Verdugo, Profesor Catedrático de Universidad del Departamento de biología celular y parasitología, Universidad de Valencia.
Director del departamento de Neurobiología comparada.

Certifica

Que el trabajo de investigación titulado **“PAPEL NEUROPROTECTOR DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS A NIVEL OCULAR EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE”** que presenta *Dña. ROMANA GARCÍA GIL*, licenciada en Medicina y Cirugía, especialista en oftalmología, para optar al GRADO DE DOCTOR, fue realizado por el doctorando bajo mi dirección, por lo que considero que reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa ante tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente documento en Valencia, a 31 de septiembre de 2015.

Fdo. José Manuel García Verdugo

Dña. Sara García Gil-Perotín, Doctora en Medicina y Cirugía. Facultativo del servicio de Neurología, Unidad mixta de esclerosis múltiple y neuroregeneración del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

Certifica

Que el trabajo de investigación titulado **“PAPEL NEUROPROTECTOR DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS A NIVEL OCULAR EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE”** que presenta *Dña. ROMANA GARCÍA GIL*, licenciada en Medicina y Cirugía, especialista en oftalmología, para optar al GRADO DE DOCTOR, fue realizado por el doctorando bajo mi dirección, por lo que considero que reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa ante tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente documento en Valencia, a 31 de Septiembre de 2015.

Fdo. Sara García Gil-Perotín

Dña. M^a Dolores Pinazo Durán, Doctora en Medicina y Cirugía, Especialista en Oftalmología. Profesora Asociada de Oftalmología del Departamento de Cirugía de la Universidad de Valencia. Directora de la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” de Valencia.

Certifica

Que el trabajo de investigación titulado **“PAPEL NEUROPROTECTOR DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS A NIVEL OCULAR EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE”** que presenta *Dña. ROMANA GARCÍA GIL*, licenciada en Medicina y Cirugía, especialista en oftalmología, para optar al GRADO DE DOCTOR, fue realizado por el doctorando bajo mi dirección, por lo que considero que reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa ante tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente documento en Valencia, a 31 de Septiembre de 2015.

Fdo. M^a Dolores Pinazo Durán

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer al Profesor José Manuel García Vedugo y a la Dra. Sara García Gil-Perotín el haberme acogido en su laboratorio, dándome la oportunidad de conocer de cerca el mundo de la investigación, lo que me ha permitido ampliar mi visión y enriquecerme desde un punto de vista científico y humano. Sin vuestra ayuda indudablemente este trabajo no se habría podido desarrollar.

Sara mi más sincero agradecimiento por ser mucho más que una directora de tesis, gracias por tu ayuda desinteresada. Gracias por tu amistad.

A la Dra. María Dolores Pinazo Durán por su disposición para ayudarme en todo momento, por el interés mostrado sobre mi progresión. Eres un espejo donde mirarse tanto a nivel médico, científico y sobre todo personal.

A todos y cada uno de los miembros del Laboratorio de Biología celular, de la Universidad de Valencia, por haber conseguido reunirse en un equipo excepcional, y continuar de forma exitosa con la realización de este trabajo. En especial deseo agradecer la colaboración de Jorge Fuentes, Marianna Fil, Laura Cuevas, Patricia, muchas gracias por vuestra buena disposición para colaborar en todo momento y por hacer que todo parezca más fácil.

A mi marido Anselmo y a mis hijos Romy, María y Anselmo, sois lo mejor de mi vida, gracias por vuestro apoyo en todo momento, gracias por recordarme que podía conseguir llegar a mi meta, gracias por haberme entendido y siento haberos robado tanto tiempo. Sin vuestro constante apoyo no hubiera sido posible.

A mis padres, Manuel y Romy, que siempre me han animado y aceptado mis decisiones. Vuestro apoyo incondicional durante 6 años de estudio de medicina, preparación para el examen MIR, gracias por darme la oportunidad de llegar a ser lo que soy hoy. No hay suficientes palabras para agradeceros todo lo que en silencio y sin esperar nada a cambio hacéis por mí. Os quiero muchísimo.

A mis hermanos y cuñados Manuel, Andrea, Marce, David, Raquel y Pedro, que han sabido aguantarme en los momentos más duros y han estado siempre ahí para ayudarme.

A Anselmo y Macu, que siempre han apostado por mí, tengo que agradecerles sus inagotables consejos. Su capacidad de trabajo siempre ha sido un ejemplo para mí.

A todos aquellos que hayan colaborado en este proyecto y que de manera involuntaria no aparezcan sus nombres en estas líneas.

Muchas gracias a todos.

INDICE

1.-INTRODUCCION	1
1.1.-ANATOMIA COMPARADA DEL OJO	3
1.1.1.-Estructura del globo ocular del roedor adulto	3
1.1.2.-Nervio óptico	7
1.1.3.-Estructura de la retina	8
1.2.-ESCLEROSIS MÚLTIPLE	14
1.2.1.-Etiología	15
1.2.2.-Patogenia	17
1.2.3.-Anatomía patológica	20
1.2.4.-Clínica	21
1.2.5.-Diagnóstico	24
1.2.6.-Tratamiento	28
1.3.-NEURITIS ÓPTICA	29
1.4.-PROCESOS QUE INHIBEN LA REGENERACIÓN AXONAL	32
1.5.-ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL	33
1.6.-CELULAS MADRE	38
1.6.1.-Tipos y clasificación	38
1.6.2.-Células Madre Mesenquimales	41
A. Caracterización	42
B. Reparación Tisular	44
2.-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
3.-MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1.-Generación de un modelo de Encefalitis Autoinmune Experimental	59
3.2.-Animales de Experimentación	62
3.3.-Diseño experimental	62
3.3.1-Cultivos y transfección de hMSCs	62

3.3.2.-Observación y valoración de signos clínicos en modelo EAE	66
3.4.-Procesado Histológico	68
3.4.1.-Perfusión de los animales	68
3.4.2.-Disección	68
3.4.3.-Procesado de las secciones transversales del globo ocular	69
3.4.4.-Tinciones histológicas	72
3.4.5.- Inmunohistofluorescencia	73
3.5.-Estudio y análisis morfológico	75
3.5.1.-Adquisición de las imágenes	75
3.6.-Cuantificación de las poblaciones celulares	78
3.7.-Medición del G-ratio axonal	81
3.8.-Análisis estadístico	82
4.-RESULTADOS	83
4.1.- Observación y valoración de los signos clínicos en modelo EAE	85
4.2.- Objetivo 1 y 2: Estudio del microambiente celular inflamatorio y de la respuesta neuroprotectora de las MSC en la retina y en el NO	87
4.2.1. Estudio de la retina	87
4.2.2. Estudio del nervio óptico	100
4.2.3. Mielinización y daño axonal	110
5.-DISCUSIÓN	117
6.-CONCLUSIONES	133
7.-BIBLIOGRAFIA	139

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

ANGPT1	<i>Angiopoyetina</i>
AV	<i>Agudeza visual</i>
BCG	<i>Bacilo Calmette-Guerin</i>
BHE	<i>Barrera hemato-encefálica</i>
CCG	<i>Capa de células ganglionares</i>
CCR5	<i>Receptor 5 de Quimioquina 5</i>
CFA	<i>Adyuvante de Freund (completo)</i>
CFNR	<i>Capa de fibras nerviosas de la retina</i>
CGR	<i>Células ganglionares de la retina</i>
CMH	<i>Complejo mayor de histocompatibilidad</i>
CNE	<i>Capa nuclear externa</i>
CNI	<i>Capa nuclear interna</i>
COX 2	<i>Ciclooxigenasa 2</i>
CPA	<i>Célula presentadora de antígeno</i>
CPE	<i>Capa plexiforme externa</i>
CPI	<i>Capa plexiforme interna</i>
CSCL12	<i>C-X-C motif chemokine 12</i>
CXCR3	<i>Quimioquina CXC receptor 3 (CXC chemokine receptor 3).</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DPAR	<i>Defecto pupilar aferente relativo</i>
DSS	<i>Disability Status Scale (Escala de Estado de la discapacidad)</i>
EAE	<i>Encefalitis autoinmune experimental</i>

EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale (Escala de Estado de la discapacidad ampliada)</i>
EGF	<i>Factor de crecimiento epidérmico</i>
EM	<i>Esclerosis Múltiple</i>
EM-PP	<i>Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva</i>
EM-RP	<i>Esclerosis Múltiple Recurrente-Progresiva</i>
EM-RR	<i>Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente</i>
EM-SP	<i>Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva</i>
EPO	<i>Eritropoyetina</i>
EPR	<i>Epitelio pigmentario de la retina</i>
ESCs	<i>Células madre embrionarias (Embryonic Stem Cells)</i>
FGF	<i>Factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast growth factor).</i>
FR	<i>Fotorreceptores</i>
GFP	<i>Proteína fluorescente verde</i>
GSF3	<i>Factor estimulante de colonias de granulocitos</i>
HFG	<i>Factor de crecimiento de hepatocitos, hepapoyetina A</i>
hMSCs	<i>Células madre mesenquimales humanas</i>
ICAM-1	<i>Molécula de adhesión intracelular 1</i>
IDO	<i>Indolamina 2,3-dioxigenasa</i>
IFN	<i>Interferón</i>
IL-10	<i>Interleukina 10</i>
IL-6	<i>Interleukina 6</i>
iNOS	<i>Óxido nítrico sintasa inducible</i>
LCR	<i>Líquido cefalorraquídeo</i>

LPS	<i>Lipopolisacáridos</i>
MBP	<i>Proteína básica de Mielina</i>
ME	<i>Microscopía electrónica</i>
MLE	<i>Membrana limitante externa</i>
MLI	<i>Membrana limitante interna</i>
MMP	<i>Metaloproteasas</i>
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
MSCs	<i>Células madre mesenquimales (Mesenchymal Stem Cell);</i>
NEFL	<i>Neurofilament light polypeptide</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NO	<i>Nervio óptico</i>
NOD	<i>Neuritis óptica desmielinizante</i>
NogoR^{DN}	<i>Receptor Nogo dominante negativo</i>
NOIA	<i>Neuritis óptica isquémica anterior</i>
ONTT	<i>Optic Neuritis Treatment Trial (Ensayo de Tratamiento de Neuritis óptica)</i>
PB	<i>Tampón fosfato (del inglés: "phosphate buffer").</i>
PBS	<i>Tampón fosfato salino (del inglés: "phosphate buffer saline").</i>
PDGF	<i>Factor de crecimiento derivado de plaquetas</i>
PEV	<i>Potenciales evocados visuales</i>
PFA	<i>Paraformaldehído</i>
PGE-2	<i>Prostaglandina E2</i>
PSC	<i>Células madre pancreáticas (Pancreatic Stem Cell).</i>
RM	<i>Resonancia magnética</i>

RT	<i>Room temperature</i>
SEF	<i>Segmento externo de los fotorreceptores</i>
SNC	<i>Sistema nervioso central</i>
TCR	<i>Receptor células T</i>
TGF β	<i>Factor de crecimiento transformante beta</i>
TRIS	<i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane</i>
VCAM-1	<i>Molécula de adhesión celular-vascular 1</i>
VEGF	<i>Factor de crecimiento endotelio vascular</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen 4</i>

FIGURAS

INTRODUCCION

- Figura 1.1** *pág 6* *Esquema sección sagital del globo ocular*
- Figura 1.2** *pág 8* *Capas de la retina de mamífero.*
- Figura 1.3** *pág 11* *Organización en capas de la retina y tipos de neuronas que la constituyen.*
- Figura 1.4** *pág 19* *Mecanismos posibles de lesión y reparación en la EM*
- Figura 1.5** *pág 22* *Formas evolutivas de la EM*
- Figura 1.6** *pág 26* *Escala de valoración y puntuación de los sistemas funcionales*
- Figura 1.7** *pág 27* *Escala EDSS: progresión de la incapacidad*
- Figura 1.8** *pág 40* *Esquema representativo del origen y potencialidad de los diferentes tipos de células madre y sus destinos tisulares durante el desarrollo.*
- Figura 1.9** *pág 46* *Proceso básico de reparación tisular por MSCs.*
- Figura 1.10** *pág 47* *Secreción de factores paracrinos por MSCs.*
- Figura 1.11** *pág 48* *Modulación del sistema inmune mediada por las MSCs.*

MATERIAL Y MÉTODOS

- Figura 2.1** *pág 63* *Plásmido Episomal pCEP4*
- Figura 2.2** *pág 64* *Mecanismo de neuroreparación.*
- Figura 2.3** *pág 69* *Vibratomo Leica 1000mM Biosystems.*
- Figura 2.4** *pág 69* *Sección transversal ojo de ratón (Grosor 400 μ m).*
- Figura 2.5** *pág 70* *Criostato CM1900, Leica, Heidelberg, Alemania*
- Figura 2.6** *pág 71* *Ultramicrotoma Leica ultracut MZ6*

- Figura 2.7** pág 71 *Ultramicrotoma Leica EM UC6*
- Figura 2.8** pág 72 *Imagen de la izquierda: Tinción hematoxilina-eosina. Imagen de la derecha: tinción azul de toluidina.*
- Figura 2.9** pág 75 *Microscopio Nikon Eclipse E800*
- Figura 2.10** pág 76 *Microscopio de fluorescencia (Nikon, Eclipse80i).*
- Figura 2.11** pág 77 *Microscopio óptico de transmisión*
- Figura 2.12** pág 79 *Sección longitudinal de nervio óptico (NO) (10x). Ejemplo del procedimiento de cuantificación de la población celular.*
- Figura 2.13** pág 79 *Sección longitudinal de nervio óptico (40x). Ejemplo del procedimiento de cuantificación de la población celular.*
- Figura 2.14** pág 80 *Técnica Inmunohistoquímica: Imagen de la retina y la cabeza del nervio óptico*
- Figura 2.15** pág 81 *Método de estimación G-ratio.*

RESULTADOS

- Figura 4.2.1** pág 88 *Estudio comparado de la retina del grupo control y del grupo EAE.*
- Figura 4.2.2** pág 92 *Imagen ME de la retina grupo control*
- Figura 4.2.3** pág 93 *Imagen ME de la retina grupo EAE*
- Figura 4.2.4** pág 96 *Estudio grupo experimental*
- Figura 4.2.5** pág 97 *Imagen ME de la retina y nervio óptico del grupo experimental.*
- Figura 4.2.6** pág 101 *Estudio comparado del nervio óptico grupo control y grupo EAE.*
- Figura 4.2.7** pág 103 *Análisis por inmunofluorescencia de la proteína Iba 1*
- Figura 4.2.8** pág 105 *Comparación ultraestructural del nervio óptico del grupo control y del grupo EAE.*
- Figura 4.2.9** pág 113 *Estudio del daño axonal mediante G-ratio.*

TABLAS

INTRODUCCION

- Tabla 1.1 pág 25** *Revisión de 2010 de los criterios de McDonalds para el diagnóstico de la EM*
- Tabla 1.2 pág 35** *Distintas patologías y progresiones de EAE*

MATERIAL Y MÉTODOS

- Tabla 2.1 pág 61** *Protocolo de generación del modelo de EAE*
- Tabla 2.2 pág 65** *Cultivos celulares*
- Tabla 2.3 pág 67** *Valoración de los signos clínicos en EAE modelo.*

GRÁFICOS

- Gráfico 4.1 pág 87** *Promedio de días del inicio de los síntomas y grado de discapacidad.*
- Gráfico 4.2.1 pág 94** *Promedio de CGR/ μm*
- Gráfico 4.2.2 pág 98** *Comparación de CGR/ μm entre grupo experimental y el grupo EAE.*
- Gráfico 4.2.3 pág 106** *Promedio de la celularidad en el nervio óptico*
- Gráfico 4.2.4 pág 109** *Comparación de las células/ μm^2 en el grupo experimental y el grupo EAE*

INTRODUCCIÓN

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-ANATOMIA COMPARADA DEL OJO

El sistema visual de los mamíferos, en general, se asemeja entre distintas especies en cuanto a morfología y funcionalidad. Por esa razón, los modelos animales pueden ser útiles para estudiar los mecanismos fisiopatológicos de una determinada afección oftalmológica, con la posibilidad de extrapolarlos al sistema visual humano. El sistema visual de los roedores muestra pocas diferencias anatómicas con respecto al humano. La estructura de la retina presenta una organización en capas, con la particularidad, de no poseer fovea, estructura presente en los humanos y los monos. Describimos a continuación la estructura del globo ocular y la organización celular del ojo de ratón adulto.

1.1.1.-ESTRUCTURA DEL GLOBO OCULAR DEL ROEDOR ADULTO

El globo ocular del ratón tiene una morfología esférica y se encuentra ubicado en la parte anterior de la órbita. Está formado por tres capas concéntricas.

1.- Capa externa:

a. En su parte anterior se encuentra la córnea, la cual está formada por varias capas celulares, (epitelio, membrana de Bowman, la Dua, el estroma,

membrana de Descemet y el endotelio) Aunque este tejido avascular es aparentemente simple en su composición, la enorme regularidad y uniformidad de su estructura son las que permiten su precisa transmisión y refracción de la luz. Su forma consiste básicamente en una lente cóncavo-convexa con una cara anterior, en contacto íntimo con la película lagrimal precorneal, y otra cara posterior, bañada por el humor acuoso.

b. En su parte posterior se encuentra la esclerótica es una membrana de color blanco, gruesa, resistente y rica en fibras de colágeno que constituye la capa más externa del globo ocular. Su función es la de darle forma y proteger a los elementos internos. Cubre aproximadamente las cuatro quintas partes del ojo. Por detrás está el nervio óptico (NO), perfora la esclera por una zona conocida como lámina cribosa, por donde salen los haces nerviosos, las fibras se mielinizan y forman el nervio óptico intraorbitario. La esclerótica está recubierta por la conjuntiva en su parte externa y por la parte interna ésta recubre a la coroides.

2.- Capa intermedia o úvea:

Está formada por el iris, el cuerpo ciliar y la coroides. En la parte posterior del globo ocular esta la coroides y en la parte anterior el iris y el cuerpo ciliar. El iris es la región con pigmento del ojo, separa la cámara anterior de la cámara

posterior, el espacio que comunica ambas cámaras es la pupila, su tamaño varía según la intensidad de la luz.

El cuerpo ciliar es el encargado de la producción de humor acuoso, así como del mantenimiento de la posición del cristalino, gracias a los ligamentos suspensorios. La coroides es la capa vascular del globo ocular, y su principal función es nutrir a las capas externas de la retina.

En el ratón, el iris ocupa prácticamente toda la cara anterior del cristalino con un menor tamaño pupilar. Por su parte el cristalino en el ratón es más grande y esférico.

3.- Capa interna:

La capa más interna del globo ocular es la retina. Está formada por capas de neuronas perfectamente organizadas para recepción y procesamiento del estímulo luminoso (fotorreceptores, células bipolares, células interplexiformes, células amacrinas, células ganglionares) y por células gliales (células de Müller, astrocitos y células de migroglia).

Después de atravesar la luz todas las capas de la retina se estimulan los fotorreceptores (los conos y los bastones) que contienen las moléculas proteicas que absorben la luz e inician la respuesta de excitación. La membrana externa convierte la señal química en eléctrica (fototransducción), generando un impulso nervioso que se transmite como señal química a las

interneuronas de la retina, éstas transmiten la información a las células ganglionares, cuyos axones constituyen el nervio óptico, y llevan la información luminosa hasta los centros cerebrales de la visión.

En el ratón la retina está organizada en capas de forma similar a la de los otros mamíferos; sin embargo, no posee fovea como los humanos y los primates, aunque sí posee una estría visual, una región de alta densidad celular de células ganglionares de la retina (CGR)^{1,2,3}.

La irrigación del ojo proviene de la arteria oftálmica, rama de la carótida. La arteria oftálmica se divide en varias ramas a la entrada del globo ocular que se denominan arterias ciliares anteriores y posteriores (largas y cortas). Y la arteria central de la retina, que entra en el ojo en la vaina de mielina que recubre al nervio óptico, en la región inferior y nasal.

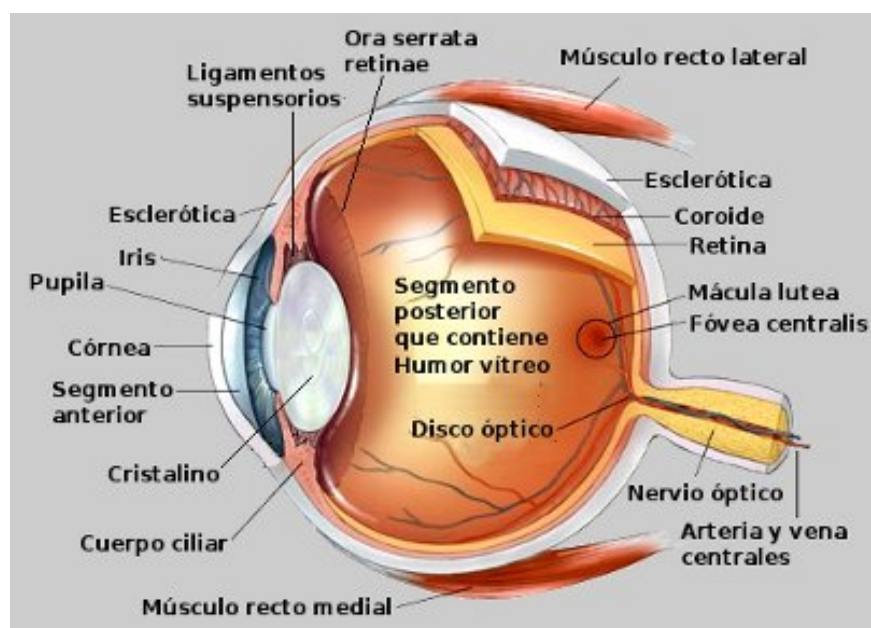


Figura 1.1. Esquema sección sagital del globo ocular.

1.1.2.-NERVIO ÓPTICO (NO).

El nervio óptico es el II de los pares craneales, está constituido por los axones de las CGR, cada una de las cuales posee un único axón que se reúne con los axones de las otras CGR de una manera ordenada según su disposición en la retina, formando el nervio óptico. En el nervio óptico se pueden distinguir 4 porciones según su trayecto: la porción intraocular, intraorbitaria, canalicular e intracraneal. La porción intraocular en los roedores es distinta de la de los primates, en los roedores los axones de las CGR convergen radialmente hacia la papila óptica y forman el NO, mientras que en los primates los somas de las CGR están separadas por un rafe horizontal, con una zona superior y otra inferior, y envían respectivamente los axones al polo superior e inferior del NO. En la porción intraorbitaria, los axones de las CGR son mielinizados por los oligodendrocitos (ya que el NO forma parte del Sistema Nervioso Central) a diferencia de los nervios periféricos que son mielinizados x las células de Schwann. La porción intracanalicular corresponde a la salida del NO y la arteria oftálmica de la órbita a través de la hendidura esfenooidal. En la región intracraneal ambos NO se unen en el quiasma óptico, donde decusan sus fibras (en los roedores se decusan alrededor del 97-95%), éstas se reúnen para formar las cintillas o tractos ópticos que transmiten la información hasta cada hemisferio cerebral.

1.1.3.-ESTRUCTURA DE LA RETINA

La retina es un modelo de gran utilidad para estudios fisiológicos y morfológicos del Sistema Nervioso en general, gracias a la posibilidad de estudiar el procesamiento de la información y por su accesibilidad.

Santiago Ramón y Cajal describe la retina como “...una extensión periférica del Sistema Nervioso Central, cuya delicadeza, transparencia y otras características estructurales la hacen especialmente apta para el análisis histológico...”.

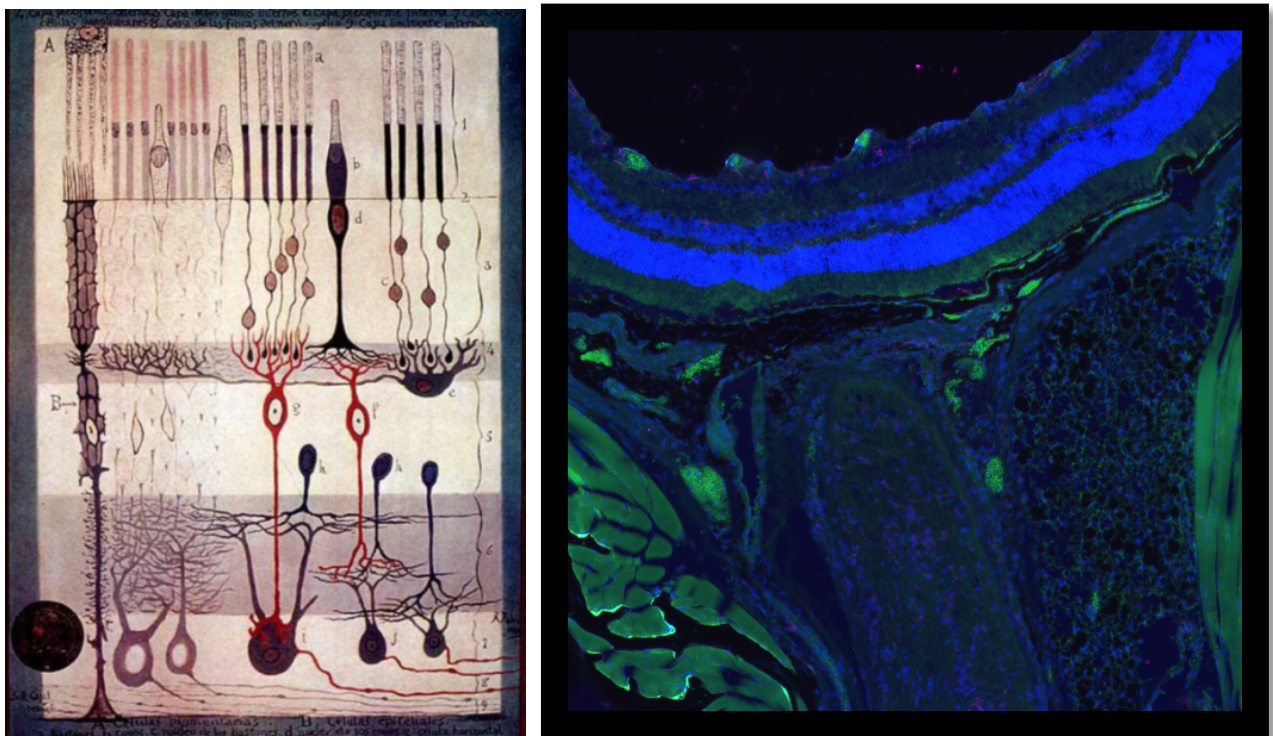


Figura 1.2. Capas de la retina del mamífero. La mayoría de sus descripciones y clasificaciones de Santiago Ramón y Cajal todavía continúan siendo válidas y se mantienen vigentes, en la imagen de la izquierda se muestran todas las capas de la retina de mamífero, la imagen de la derecha es una imagen panorámica en inmunohistofluorescencia, se muestran las capas de la retina y el nervio óptico.

La retina de ratón, como la de otros vertebrados, está formada por 10 capas, estas capas están formadas por células neuronales (fotorreceptores- conos y bastones-, células horizontales, amacrinas, bipolares, interplexiformes y ganglionares de la retina) y por células no neuronales (células de Müller, astrocitos y microglia).

Membrana limitante interna (MLI).

Es la capa más interna de la retina, contacta con el vítreo. Es una lámina basal de glicoproteínas adheridas a los pies de las células de Müller.

Capa las de fibras nerviosas de la retina (CFNR).

Está formada por los axones de las CGR en su trayecto hacia la papila. Estos axones son lo que, a su salida de la retina, forman el NO

Capa de las células ganglionares (CCG).

Está formada por los somas de las CGR y de las células amacrinas desplazadas⁴, en los roedores está constituida por la misma proporción de estos 2 tipos celulares.

Capa plexiforme interna (CPI).

Es una capa de contactos sinápticos entre las células bipolares, interplexiformes, amacrinas y CGR.

Capa nuclear interna (CNI).

Está formada por los núcleos de las células bipolares, horizontales, amacrinas e interplexiformes.

Capa plexiforme externa (CPE).

Es una capa de contacto sináptico entre los fotorreceptores (FR), las células interplexiformes, las células bipolares y las células horizontales.

Capa nuclear externa (CNE).

En esta capa se encuentran los núcleos de los FR, conos y bastones.

Membrana limitante externa (MLE).

Está constituida por unas uniones adherens entre las células de Müller, que proporcionan sostén y los FR.

Capa de los segmentos externos de los FR (SEF).

En esta capa se alojan los segmentos externos de los FR.

Epitelio pigmentario (EP).

Está formado por una monocapa de células epiteliales muy pigmentadas (no deriva del neuroectodermo) y se encuentra en contacto con la coroides, separado de ella por la membrana de Bruch. Entre sus funciones destaca la de proporcionar el intercambio metabólico entre coriocapilar y neuroepitelio y contribuir a la renovación constante de los segmentos externos de los fotorreceptores.

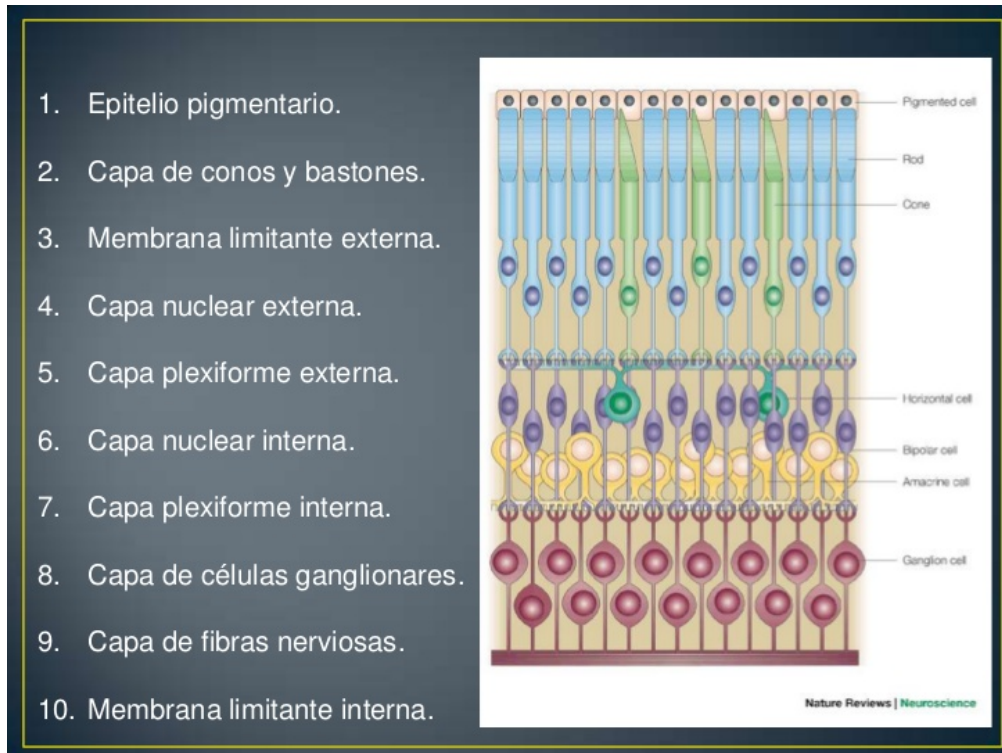


Figura 1.3. Organización en capas de la retina y tipos de neuronas que la constituyen.

Las neuronas que constituyen las capas de la retina son las siguientes:

Células fotorreceptoras: Son la primera neurona de la vía óptica, en la retina adulta existen dos tipos, los conos y los bastones. Son los encargados de la captación de la energía electromagnética y su transformación en impulsos eléctricos. Los bastones son importantes en la visión nocturna (escotópicas) mientras que los conos son los responsables de la visión diurna (fotópica) y de la discriminación del color. Los FR más abundantes en los roedores son los bastones, por eso está especializada la visión escotópica. En cuanto a los conos tienen sólo dos tipos, los que detectan la luz azul o conos S y los que detectan

la luz roja/verde o conos L/M, (los humanos y primates tienen tres tipos de conos).

Células horizontales: son neuronas típicas cuyos cuerpos se encuentran en la capa nuclear interna y sus ramas dendríticas se encuentran en la capa plexiforme externa donde las hay que hacen conexión con los conos y las hay que hacen conexión con los bastones. Su principal función es la de regular la información que pasa de los fotorreceptores a las células bipolares en circuitos de retroalimentación.

Células bipolares: Son la segunda neurona de la vía óptica, estas neuronas se extienden desde la capa plexiforme externa hasta la plexiforme interna, están situadas de modo vertical con respecto a las capas de la retina. Su cuerpo está en la capa nuclear interna y tienen dendritas que ascienden por la capa plexiforme externa donde hacen conexión con las células fotorreceptoras y el axón se ramifica en la capa plexiforme interna donde hacen sinapsis con las células ganglionares y las amacrinas. Su función es transmitir la información desde la capa plexiforme externa a la interna.

Células Amacrinas: Estas neuronas tienen numerosas dendritas pero carecen de axón. Su cuerpo se encuentra en la capa nuclear interna y sus dendritas se extienden a la capa plexiforme interna conectándose entre sí y con los axones de las células bipolares y las dendritas de las células ganglionares. Su principal

función, al igual que las células horizontales en la plexiforme externa, es la de regular y elaborar la información que procede de bipolares y pasa a las ganglionares.

Células ganglionares: Son la tercera neurona de la vía óptica. Las CGR representan menos del 1% de la población total de células de la retina. Sus cuerpos están localizados en el estrato de células ganglionares, con sus dendritas conectan con las células bipolares y con las células amacrinas de la capa plexiforme interna. Sus axones abandonan la retina y se convierten en fibras del nervio óptico.

Las células no neuronales más importantes de la retina son: las células de Müller, los astrocitos y las células de microglía.

Las **células de Müller** se extienden a lo ancho de toda la retina, dando soporte a las neuronas de la retina. Los núcleos de las células de Müller se encuentran en la CNI. Entre sus funciones destaca dar soporte y mantener la homeostasis de la retina.

Los **astrocitos** se sitúan en la capa de las fibras nerviosas de la retina, rodeando a los axones sobre todo a nivel papilar y a los vasos sanguíneos^{5,6}. Entre sus funciones destaca: proteger a las neuronas durante el envejecimiento y el mantenimiento de la barrera endotelial en el SNC.

Las **células de microglía** tienen forma ramificada y pequeño tamaño. Su función principal es la fagocítica, ya que son macrófagos que forman parte del sistema inmune⁷.

1.2.-ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad autoinmune más común del sistema nervioso central (SNC), es a su vez inflamatoria-desmielinizante y neurodegenerativa.

Es una enfermedad mundialmente extendida y su prevalencia varía con el área geográfica, siendo mayor en latitudes alejadas del ecuador. En nuestro país, la prevalencia oscila entre los 45-120 casos/100.000 habitantes^{8,9,10}. Se calcula que en España hay más de 40.000 casos. Es la segunda causa de discapacidad en adultos jóvenes en nuestro medio. La EM afecta a todas las edades, pero tiene una incidencia mayor entre los 20 y 40 años de edad⁸. Es una enfermedad predominante en mujeres, con razones comprendidas entre 1,4-2,2:1¹¹. Además de existir una agregación familiar, descrita en estudios epidemiológicos^{12,13,14}. Se ha descrito que predomina en niveles sociales medio-altos; y menos en el medio rural. La tasa de mortalidad, se ha estimado recientemente, en torno a 0,35 fallecimientos por cada 100.000 habitantes y año.

En el 85% de los pacientes la EM sigue una evolución inicial con brotes y remisiones (remitente-recidivante, RR). Cada brote supone la aparición de un nuevo foco de inflamación (placa) en el SNC. Los brotes con el paso del tiempo disminuyen en frecuencia y sin embargo en estos pacientes el deterioro neurológico continúa lento y progresivo, lo que provoca la discapacidad de esta enfermedad. Debido a que la enfermedad se produce en la edad adulta, provoca un gran impacto en la vida profesional, familiar y social de las personas afectadas.

1.2.1.-ETIOLOGÍA

La causa de la EM es aún desconocida. Entre los factores ambientales, los estudios muestran la existencia de incidencias mayores de la enfermedad en latitudes altas, tal y como hemos descrito en la epidemiología. Por otra parte, los estudios de migración sugieren que cuando la migración se produce durante la infancia los riesgos son similares al país de origen y si la migración se produce durante la adolescencia los riesgos son similares a los del país receptor¹⁵. Entre otros factores ambientales, la EM también se puede asociar con los climas fríos, con un alto grado de humedad, y con la dieta, con la ingesta abundante de grasa de origen animal.

Se aceptan los factores infecciosos como causa desencadenante de la EM, los coronavirus, retrovirus, herpesvirus¹⁶. Estudios recientes postulan la

posibilidad de que el virus Epstein-Barr (VEB) sea el principal agente causal de la EM, debido a su capacidad de desmielinizante^{17,18}.

Existen razones para sugerir la participación de los factores genéticos en la etiología de la EM, estudios en población general muestran un riesgo 20-40 veces mayor de desarrollo de la enfermedad en familiares cercanos de pacientes con EM^{19,20}; también los estudios de concordancia gemelar muestran que en el 25% de los gemelos monozigóticos tienen concordancia en el desarrollo de la EM, lo que sugiere la participación genética, pero mediante una herencia poligénica²¹.

Se ha demostrado en diversos estudios la asociación en la EM y los antígenos leucocitarios HLA clase II. En estudios en familias con EM españolas, se demostró asociación significativa en el HLA-DR2²², y estudios en población europea demostró asociación significativa con el HLA-DR2, DR15, Dw2, DR3, DR4²³.

Otros posibles factores a tener en cuenta serían la influencia de las hormonas en la patogenia de la EM, ya que durante el embarazo el número de brotes disminuye, y poco después del parto aumenta el riesgo de brotes. El tabaco es considerado un factor de riesgo independiente para la EM²⁴. Se ha observado una evidencia débil del estrés como factor de riesgo de la enfermedad^{25,26}. En un metaanálisis reciente, sobre la vacunación y su relación con el riesgo de

desarrollo de EM, concluye que no existe cambios en el riesgo tras la vacunación con la triple vírica (sarampión, rubéola y parotiditis), polio, influenza, Hepatitis B, fiebres tifoideas o con bacilo de Calmette-Guerin (BCG)²⁷.

1.2.2.-PATOGENIA

La patogenia de la EM, así como la relación causal y temporal son aún desconocidas. Hoy en día, entre las hipótesis la más aceptada es: la de un individuo con una predisposición genética que junto a un factor ambiental desconocido, producirían células T autorreactivas, que se mantienen latentes durante 10-20 años, por la reacción de algún factor local o sistémico, se reactivan. Estas células T activadas son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y desencadenar una reacción inflamatoria que provocaría de desmielinización²⁸. Estos daños a nivel de la mielina no serían provocados solo por las células T CD4+ sino también por células citotóxicas T-CD8+, citocinas y anticuerpos²⁹.

Factores ambientales y genéticos tales como infecciones virales, lipopolisacáridos bacterianos, superantígenos, metabolitos reactivos y estrés metabólico pueden facilitar la movilización de células T autorreactivas y de anticuerpos desmielinizantes desde la circulación sistémica al interior del SNC gracias a la rotura de la BHE. En el SNC, otros factores locales como infecciones

virales o estrés metabólico pueden activar la expresión de moléculas de adhesión endotelial, como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión celular-vascular 1 (VCAM-1) y la E-selectina, que hacen posible la entrada de células T al SNC.

Los linfocitos T activados, una vez que han atravesado la barrera hematoencefálica, interacciona su receptor (TCR) con los antígenos presentados por las células presentadoras de antígenos (CPA) a través de las moléculas del CMH de clase II (en humanos HLA-II). Lo que provoca producción y secreción de citoquinas, que a su vez, activa a otros macrófagos y linfocitos B. Esta reacción inmunológica produce la destrucción de la mielina. Una vez desencadenada la respuesta autoinmune, la cadena de reacciones y los elementos que intervienen en ellas son los mismos que en cualquier tipo de respuesta inmunitaria inflamatoria.

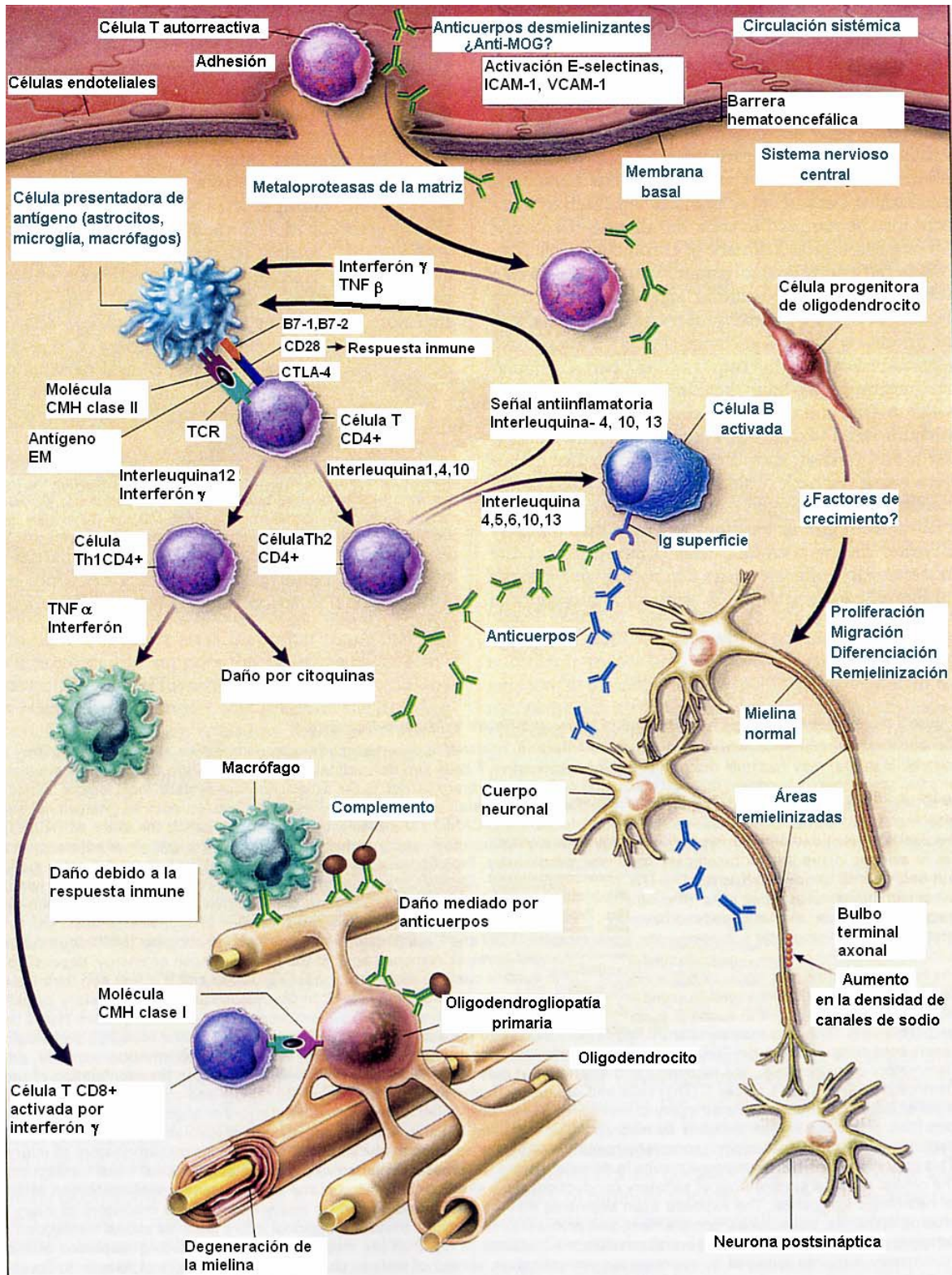


Figura 1.4. Mecanismos posibles de lesión y reparación en la EM³⁰

1.2.3.-ANATOMÍA PATOLÓGICA

En la EM, los infiltrados inflamatorios perivasculares y las áreas de desmielinización, son hallazgos muy característicos. Las placas, que son lesiones focales en la sustancia blanca, formadas por áreas con pérdida de mielina (desmielinización) pero también hay lesiones corticales y daño axonal precoz^{31,32}.

Las placas tienen predilección por determinadas localizaciones, aunque pueden encontrarse en cualquier punto del SNC. Son casi constantes en los nervios, quiasma y cintillas ópticas, en la sustancia blanca subependimaria o periventricular (ventrículos laterales y IV ventrículo), pedúnculos y laminillas cerebelosas, en el límite entre la sustancia gris cortical y la blanca subcortical, en el tronco cerebral, y en la médula espinal. Las placas se encuentran rodeando vasos de pequeño-mediano calibre³³ y su tamaño es variable entre 2 mm y 6 cm.

La histología de la EM es heterogénea:

En las *placas activas*, la lesión *aguda* tiene los bordes mal definidos, con infiltración inflamatoria de linfocitos T y B y macrófagos, aparecen restos de mielina en distintas fases de digestión. Existe pérdida de oligodendrocitos, se degradan las vainas de mielina, se degeneran los axones y, posteriormente, hay una proliferación de astrocitos. El método más fiable para identificar

lesiones activas es identificar restos de la degradación de la mielina en macrófagos³². Las placas activas captan gadolinio en las secuencias ponderadas en T1, en la resonancia magnética (RM), lo que permite la detección de nuevas lesiones en el SNC. En la EM crónica la frecuencia de placas activas es extremadamente baja. Se han descrito cuatro patrones de lesiones. En los patrones I y II principalmente hay destrucción de la mielina, y en los patrones III y IV hay degeneración de los oligodendrocitos³⁴.

Las *placas inactivas* son áreas desmielinizadas, no contienen productos de degradación de la mielina, hay pérdida de oligodendrocitos, son hipocelulares y esclerosadas.

Las *placas crónicas*, destacan por una gran desmielinización, y progresivamente presentan deneración axonal y gliosis³¹.

Las “placas sombra”, están formadas por finas vainas de mielina, son áreas de remielinización defectuosa, siendo consecuencia de la resolución del edema inflamatorio.

1.2.4.-CLÍNICA

Existen distintas formas de EM, según su evolución clínica. Las formas de evolución de la EM se clasificaron en 1996, como esclerosis múltiple remitente recurrente (EM-RR), esclerosis múltiple primaria progresiva (EM-PP), EM secundaria progresiva (EM-SP) y EM recurrente progresiva (EM-RP)³⁵.

La EM se caracteriza por la presencia de brotes, que son síntomas de disfunción neurológica de más de 24 horas de duración, para considerarse dos brotes deben afectar a diferentes partes del SNC, con un intervalo de 1 mes entre ellos³⁶.

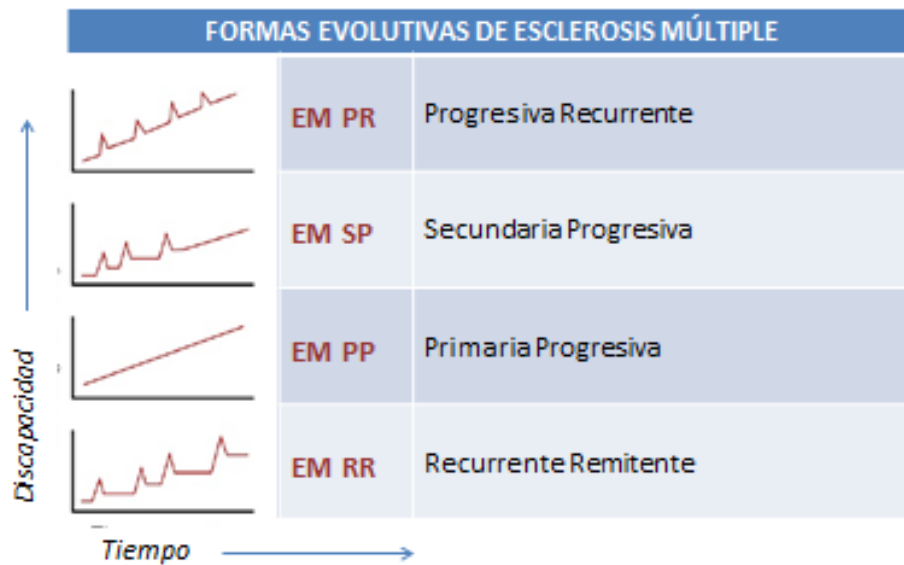


Figura 1.5. Formas evolutivas de Esclerosis Múltiple.

La forma clínica EM remitente recurrente (RR), se da en el 85% de los pacientes con EM. Los brotes de la enfermedad están claramente definidos con recuperación parcial o total.

La forma clínica EM primaria progresiva (PP), se da en el 10-15% de los pacientes con EM. No presentan brotes. Existe progresión de la enfermedad desde el inicio, con estabilizaciones ocasionales y mejorías temporalmente menores.

La forma clínica EM secundaria progresiva (SP), un 50% de los pacientes con EM-RR pueden evolucionar hacia esta forma de progresión, es de una forma remitente-recurrente, que progresa la discapacidad neurológica con o sin brotes. Esta evolución puede producirse entre los 10-20 años de progresión³⁷.

Los factores de riesgo para desarrollar una forma progresiva son sexo masculino, síntomas de médula espinal, incompleta recuperación entre recaídas, mayor edad al inicio.

La forma clínica EM progresiva recurrente (PR) presenta progresión desde el inicio con brotes, con o sin recuperación completa y con progresión continua en el periodo entre brotes.

Al inicio de la enfermedad, el 40% de los pacientes, presenta como síntoma la alteración de la sensibilidad, en forma de parestesias, acorchamiento...Otro 40% presenta una alteración motora, como la pérdida de fuerza en los miembros inferiores. En el curso de la enfermedad son los síntomas motores más frecuentes que los sensitivos y cerebelosos.

Entre las manifestaciones clínicas más comunes se encuentra la neuritis óptica.

La alteración visual en los pacientes con EM aparece en el 80%, bien como disminución de la agudeza visual o como alteración de la motilidad ocular extrínseca³⁶.

1.2.5.-DIAGNÓSTICO

En 1965, Schumacher et al publicaron unos criterios para definir clínicamente la EM, convirtiéndose en las reglas de oro para el diagnóstico de la EM. Le siguieron los criterios de McAlpine, Lumsden y Acheson en 1972³⁸, los criterios de Poser en 1983³⁹ en los que se integraban los hallazgos clínicos con los hallazgos en la RM y otras exploraciones complementarias como son los potenciales evocados visuales (PEV) y el líquido cefalorraquídeo (LCR). En el 2001 un comité internacional de expertos en EM revisó los criterios de Poser y formuló unos nuevos los criterios de McDonald disminuyeron el número de categorías diagnósticas, lo que permitió un diagnóstico más precoz.

En el 2010 los criterios de McDonald han sido revisados, la RM es la prueba principal para demostrar la diseminación espacial y la diseminación temporal⁴⁰.

ATAQUES CLÍNICOS	LESIONES	CRITERIOS ADICIONALES PARA EL DIAGNÓSTICO
2 O MÁS	Evidencia clínica objetiva de 2 o más lesiones o Evidencia clínica objetiva de 1 lesión con evidencia histórica razonable de un ataque anterior	Ninguno. La evidencia clínica es suficiente. Otra evidencia es deseable pero debe ser consistente con la EM
2 O MÁS	Evidencia clínica objetiva de 1 lesión	Diseminación en espacio demostrada por: <ul style="list-style-type: none"> • 1 o más lesiones en T2 en por lo menos dos áreas del SNC típicas de la EM (periventricular, yuxtacortical, infratentorial o médula espinal) ; O • Se espera otro ataque clínico que comprometa otro sitio diferente del SNC.
1	Evidencia clínica objetiva de 2 o más lesiones.	Diseminación en tiempo demostrada por: <ul style="list-style-type: none"> • Lesiones asintomáticas vistas con y sin contraste en cualquier momento; O • Una lesión nueva T2 y/o lesiones demostradas con contrastes en la RM de seguimiento sin importar el momento; O • Se espera un segundo ataque clínico.
1	Evidencia clínica objetiva de 1 lesión	Diseminación en espacio demostrada por: <ul style="list-style-type: none"> • 1 o más lesiones en T2 en por lo menos dos áreas del SNC típicas de la EM (periventricular, yuxtacortical, infratentorial o médula espinal); O • Se espera otro ataque clínico que comprometa otro sitio diferente del SNC; Y Diseminación en tiempo demostrada por: <ul style="list-style-type: none"> • Lesiones simultáneas asintomáticas vistas con y sin contraste en cualquier momento; O • Una lesión nueva T2 y/o lesiones demostradas con contrastes en la RM de seguimiento sin importar el momento; O • Se espera un segundo ataque clínico.
0 (Progresión desde el comienzo)		Un año de la progresión de la enfermedad (retrospectiva o prospectiva) Y por lo menos 2 de estos 3 criterios: <ul style="list-style-type: none"> • Diseminación en espacio en el cerebro basada en 1 o más lesiones en T2 en las regiones periventricular , yuxtacortical o infratentorial. • Diseminación en espacio en la médula espinal basada en 2 o más lesiones en T2; O • LCR positivo.

Tabla 1.1. Revisión de 2010 de los criterios de McDonald para el diagnóstico de la EM⁴⁰.

La primera escala para definir el estado de discapacidad física, la *Disability Status Scale* (DSS), fue elaborada por Kurtzke en 1955. Posteriormente, en 1983, Kurtzke hizo una versión ampliada de su escala, la *Expanded Disability Status Scale* (EDSS).

<p>Función piramidal</p> <p>0. Normal. 1. Presencia únicamente de signos sin afectación funcional. 2. Mínima paresia. 3. Paresia o hemiparesia moderada. Monoparesia grave. 4. Marcada paresia. Monoplejía, tetraparesia moderada. 5. Paraplejía, hemiplejía o marcada tetraparesia. 6. Tetraplejía</p>	<p>Función cerebelosa</p> <p>0. Normal. 1. Presencia únicamente de signos sin afectación funcional. 2. Ataxia leve. 3. Ataxia moderada de tronco o extremidades. 4. Ataxia grave de las cuatro extremidades. 5. Incapacidad de realizar movimientos coordinados. X Desconocido o no valorable por afectación piramidal.</p>
<p>Función de tronco cerebral</p> <p>0. Normal. 1. Presencia únicamente de signos sin afectación funcional. 2. Nistagmo moderado u otra afectación leve de los cuales el paciente es consciente. 3. Nistagmo intenso, paresia extraocular, afectación moderada de otro par craneal. 4. Disartría, disfagia u otra alteración marcada. 5. Anartría o incapacidad de tragar.</p>	<p>Función mental</p> <p>0. Normal. 1. Alteración del humor (no afecta al EDSS). 2. Leve afectación en funciones superiores 3. Moderada afectación de funciones superiores. 4. Síndrome cerebral orgánico moderado o disminución mental marcada. 5. Demencia o síndrome cerebral orgánico crónico grave.</p>
<p>Función sensitiva</p> <p>0. Normal. 1. Disminución de la sensibilidad vibratoria leve en una o dos extremidades. 2. Disminución leve de la sensibilidad táctil o algésica o artrocinética, o moderada de la vibratoria en dos extremidades, o leve de la vibratoria en tres o cuatro extremidades 3. Disminución moderada de la sensibilidad táctil, algésica o artrocinética, o pérdida de la sensibilidad vibratoria en 1-2 extremidades, o disminución moderada de la vibratoria en 3-4 extremidades, o disminución ligera de la tactoalgésica en 3-4 extremidades. 4. Disminución marcada de la sensibilidad táctil, algésica o pérdida de la artrocinética en 1-2 extremidades, o moderada pérdida de sensibilidad artrocinética táctil o algésica, en 3-4 extremidades. 5. Pérdida de la sensibilidad en uno o más miembros, o disminución moderada de las sensibilidades por debajo de la cabeza. 6. Sensibilidad perdida por debajo de la cabeza.</p>	
<p>Función visual</p> <p>0. Normal. 1. Escotoma con agudeza visual mejor de 20/30 2. Agudeza visual entre 20/30 y 20/59 o escotoma importante 3. Gran escotoma o afectación moderada de campos visuales, pero con agudeza entre 20/60 y 20/99. 4. Afectación grave de campos visuales o agudeza visual entre 20/100 y 20/200, o grado 3 con agudeza del ojo mejor menor de 20/60. 5. Agudeza visual máxima menor de 20/200 o grado 4 con ojo mejor con agudeza menor de 20/60 6. Grado 5 con agudeza visual del ojo mejor menor de 20/60.</p>	<p>Función intestinal y vesical</p> <p>1. Ligera disfunción (urgencia o retención) urinaria. 2. Moderada urgencia o retención o escasa incontinencia urinaria. 3. Frecuente incontinencia. 4. Precisa sondaje urinario. 5. Pérdida de la función vesical. 6. Pérdida de la función vesical e intestinal.</p>

Figura 1.6. Escala de valoración y puntuación de los sistemas funcionales.

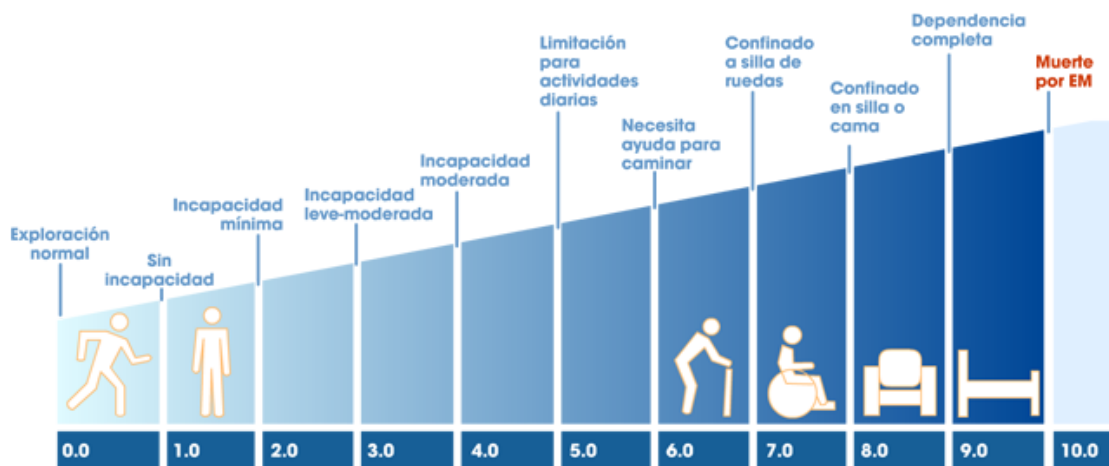


Figura 1.7. Escala EDSS: progresión de la incapacidad.

En la escala EDSS, el estado del paciente recibe una puntuación entre 0 (examen normal) y 10 (muerte por EM), con incrementos de 0,5 puntos a partir de 1 punto.

Los puntos se obtienen mediante la valoración de las alteraciones en los sistemas funcionales. Kurtzke diseñó ocho subescalas para cuantificar la exploración neurológica (función piramidal, función cerebelosa, función del tronco cerebral, función sensitiva, función intestinal/vesical, función visual, función mental y otras funciones).

La Escala de Estado de la Discapacidad Ampliada y la puntuación de los Sistemas Funcionales desarrollados por Kurtzke son las medidas más ampliamente utilizadas y reconocidas en la EM.

1.2.6.-TRATAMIENTO

En la EM no existe por el momento un tratamiento curativo, el tratamiento médico se basa en: tratamientos farmacológicos con base inmunológica, el tratamiento sintomático y el rehabilitador.

El tratamiento de la EM, durante las fases iniciales es más eficaz, cuando la inflamación es más prominente, un tratamiento precoz retrasa la discapacidad, al disminuir el daño del sistema nervioso causado por la enfermedad⁴².

La agencia Europea del medicamento tiene aprobados los siguientes medicamentos que han demostrado su eficacia para el tratamiento de la EM:

Tratamientos de primera línea: el IFN- β 1-b, IFN- β 1-a subcutáneo⁴³, IFN- β 1-a intramuscular⁴⁴ y acetato de glatirámico^{45,46}, estas terapias no son siempre efectivas como monoterapia⁴². El natalizumab⁴⁷ si está autorizado para su uso en monoterapia en formas agresivas de la enfermedad. Como tratamiento oral existe el fingolimod^{48,49,50}. Tratamiento de rescate: la mitoxantrona^{51,52}.

En cuanto al tratamiento sintomático de los brotes se utilizan los corticoides. Los esteroides han demostrado que acortan la duración de los brotes al disminuir la inflamación en las lesiones de EM⁵³. Por el contrario, no han demostrado que afecte a la progresión de la EM ni a la tasa de brotes por lo que no están indicados como tratamiento de mantenimiento.

En lo que respecta al tratamiento rehabilitador es imprescindible para reducir la discapacidad y minusvalía de los pacientes y así mantener cierta independencia.

1.3.-NEURITIS ÓPTICA

Entre las diferentes áreas del SNC que pueden verse afectadas por la EM, la vía visual presenta diversas manifestaciones oftalmológicas con una gran variedad de síntomas. Se puede afectar cualquier punto de la vía visual, nervio óptico, retina, quiasma, vía retro-quiasmática, cortex cerebral visual. La neuropatía óptica desmielinizante aguda (NOD) es la patología oftalmológica mejor estudiada de la EM y la más común⁵⁴. Los signos y síntomas extraoculares pueden preceder, suceder o coincidir con los signos oculares.

En los pacientes con EM, la NOD puede ser el primer síntoma de EM en el 20%⁵⁵. En un 75% de los casos la NOD se presenta en el curso evolutivo de la EM. La desmielinización de la vía visual en estudios de autopsias aparece en todos los paciente con EM.

El estudio *Optic Neuritis Treatment Trial* (ONTT, Ensayo de Tratamiento de Neuritis Óptica)⁵⁶ es de donde se extraen los datos más fiables sobre la NOD en relación con la EM. Que comentaremos a continuación:

La NOD afecta a jóvenes con edades entre 20 y los 30 años^{56,57}. La incidencia anual de NOD según los estudios en EEUU, oscila entre 3-5 individuos por 100.000 habitantes^{57,58}.

La clínica de presentación de la NOD es la disminución de agudeza visual (AV), el dolor ocular con los movimientos de los ojos, la alteración de la percepción cromática, defecto pupilar aferente relativo (DPAR), alteraciones campimétricas y del fondo de ojo.

La *disminución de la AV*, se da en el 90% de los pacientes con NOD, es muy variable, desde una mínima a una gran afectación. Según el ONTT, el 35% de los pacientes tuvieron una AV igual o mejor al 50% y un 20% tuvo una AV inferior a 10%. Al mes la AV comienza a mejorar, la AV inicial es el mejor predictor pronóstico de la AV final⁵⁶. En el ONTT, el 92% de estos pacientes tenían AV mayor del 50%⁵⁹. La afectación bilateral simultánea no es frecuente, la afectación secuencial de los ojos es un hecho común⁵⁴.

El *dolor ocular*, sobre todo con el movimiento de los ojos, está presente en el 92% de los pacientes. El dolor no se relaciona con pérdida de AV ni con la recuperación visual⁵⁴.

La *percepción cromática* suele estar alterada en la NOD, sobre todo la percepción del rojo (protanopia) y el verde (deuteranopia). En el ONTT, la prueba de Ishihara estaba alterada en el 88% de los ojos con NO.

La *función pupilar* alterada se manifiesta con un defecto pupilar aferente relativo (DPAR) en el ojo afecto, la ausencia de éste en un paciente con sospecha de NOD hace improbable el diagnóstico.

La *sensibilidad al contraste* estaba alterada, según el ONTT en el 51% de los pacientes con AV normales y en el 99% de los pacientes con AV alteradas^{54,56}.

Lo que convierte a la sensibilidad al contraste en un marcador muy sensible.

También puede estar presente el fenómeno de Uhthoff, visión borrosa desencadenada por el calor, el ejercicio físico o el estrés.

Las *alteraciones campimétricas* podían ser muy variables tal y como demostró el estudio ONTT, que documentó una gran variabilidad de defectos campimétricos, no solo el escotoma central⁶⁰.

En la exploración del *fondo de ojo* de los pacientes con NOD, dos tercios presentarán el disco óptico normal (neuritis retrobulbar) y un tercio tendrán el disco óptico edematoso (papilitis)⁵⁶.

El estudio ONTT, después de 10 años de seguimiento, concluye que el factor predictivo de desarrollo de EM es la RM cerebral realizada en el 1^{er} episodio de NOD, la existencia de una o más lesiones en la sustancia blanca aumenta el riesgo de sufrir EM al 56%⁶¹. La RM normal reduce el riesgo de conversión a EM al 25%, una RM con lesiones desmielinizantes no supone el desarrollo de EM.

Las neuropatías ópticas isquémicas (NOIA) se deben considerar como diagnóstico diferencial sobre todo si se presentan edemas de papila con hemorragias peripapilares ya que éstas son muy poco frecuentes en los casos de papilitis (sólo el 6%) y se asocian con un riesgo muy bajo, casi cero, de desarrollar una EM⁶².

1.4. PROCESOS QUE INHIBEN LA REGENERACIÓN AXONAL EN EM

Se han investigado diversas proteínas inhibitorias del crecimiento axonal, entre ellas la glicoproteína asociada a mielina (MAG)⁶³, la glicoproteína de mielina oligodendroglial (OMgp)⁶⁴ y Nogo-A⁶⁵. Pese a que estas moléculas no presentan similitud estructural, las tres se localizan en la superficie periaxonal de la vaina de mielina y se unen a un mismo receptor denominado Receptor Nogo (NgR), identificado inicialmente como receptor para Nogo-A⁶⁶. Se ha investigado el papel de las proteínas inhibitorias de la regeneración axonal en EAE y en la EM. En EAE cuando se realizaba la inducción activa de anticuerpos contra Nogo A, o la inmunización pasiva con anticuerpos neutralizantes IgG anti Nogo-A se observaba una mejoría en la enfermedad y en los hallazgos histológicos de las lesiones. Además, se evidenció una disminución significativa en la producción de IFN- γ y un aumento de citocinas anti-inflamatorias como TGF- β e IL-10, lo que indica el cambio de una respuesta patogénica Th1 a una protectora Th2⁶⁷. También se han observado

cuadros similares a la EAE por la inmunización con Nogo A, el cual actúa como auto-antígeno en ciertas condiciones.

En los estudios anatomopatológicos de lesiones desmielinizantes de la EM, se demostró que tanto Nogo-A como su receptor se expresan en forma aumentada, el Nogo-A en los oligodendrocitos supervivientes y su receptor en los astrocitos y la microglía⁶⁸. Además, en pacientes con EM se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-Nogo-A IgM en plasma, así como la síntesis intratecal de anticuerpos IgG contra Nogo-A⁶⁹.

En conjunto, estos datos sugieren que las proteínas inhibitorias de la mielina estarían involucradas en la patogenia del daño axonal que se observa en la EM y que su bloqueo podría mantener o restaurar la integridad neuronal del SNC.

En nuestro proyecto vamos a centrarnos en el Nogo-A, ya que transfectaremos a las MSC con un gen específico del receptor del Nogo dominante negativo (NogoR^{DN}) para favorecer la regeneración axonal.

1.5.-ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE)

Para el estudio de enfermedades del SNC, se han desarrollado una gran variedad de modelos animales, debido a la escasa disponibilidad de muestras de cerebro humano, sobre todo en estadios tempranos de la enfermedad aguda.

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es el modelo animal más usado, en la actualidad, para el estudio de la esclerosis múltiple. El modelo fue definitivamente establecido en 1933 por Tomas Rivers quien logró, por primera vez, producir una reacción inflamatoria acompañada de desmielinización mediante repetidas inmunizaciones con tejido nervioso, y demostró que las complicaciones encefálicas eran causadas por contaminantes de este tejido presente en las vacunas⁷⁰.

Desde entonces, el modelo de EAE ha sido empleado en distintas especies, en 1949 se logró inducir EAE en un ratón similar a la que se conoce hoy en día, y se reprodujeron gran parte de las características inmunológicas, neuropatológicas y clínicas de la esclerosis múltiple^{71,72,73}. El modelo murino de EAE fue descrito en 1950, gracias a inmunopotenciadores como la toxina pertussis que permitió aumentar tanto la inducción de la enfermedad así como el número de cepas susceptibles a ella.

En los animales con EAE se afecta normalmente el neuroeje con la consiguiente parálisis ascendente de los cuatro miembros, puede ser parcial o total. Los primeros signos clínicos son, debilidad en la cola, debilidad de las patas traseras, parálisis de las patas traseras, parálisis de las cuatro extremidades, y finalmente se produce la muerte del animal^{74,75}. Además,

estos síntomas vienen generalmente acompañados por una pérdida de peso causada por una disminución en la ingesta de agua y alimento.

En cuanto al curso clínico de la EAE se distinguen:

La *EAE aguda* hay un único episodio clínico de la enfermedad, que revierte totalmente con el tiempo. En la *EAE crónica remitente-recurrente*, hay dos o más brotes clínicos de la enfermedad, se da una alternancia de episodios clínicos intercalando periodos de remisión total o parcial de los síntomas. La *EAE crónica progresiva* no hay brotes, es un curso progresivo y continuo de la sintomatología hasta llegar a la parálisis total del individuo que le lleva a la muerte.

El curso clínico de la enfermedad puede ser muy diferente según la especie o cepa y el péptido utilizado.

Autoantígeno	Especie/cepa	Especie/cepa
MBP	Ratón/SJL/J Rata/Lewis Ratón/B10.PL o PL/J	Recurrente-remitente, con desmielinización ⁷⁶ . Aguda, inflamatoria, sin desmielinización ^{77,78} . Aguda/crónica; monofásica y resistente a la reinducción; inflamatoria y con daño axonal ⁷⁹ .
MOG	Ratón/C57BL/6, 129/J Ratón/A.SW Rata/Brown Norway	Crónica/recurrente-remitente con desmielinización ⁸⁰ . Aguda; progresiva, desmielinización, infiltrado de neutrófilos ⁸¹ . Aguda, inflamatoria, sin desmielinización ⁸²
PLP	Ratón/SJL/J o (SWR x SJL/J)F1 Ratón/129/J, C57BL/6 Rata/Lewis	Recurrente-remitente, desmielinización ^{83,84} . Aguda; inflamatoria ^{85,86} . Aguda, inflamatoria y desmielinizante ⁸⁷

Tabla 1.2. Distintas patologías y progresiones de EAE. MBP: Proteína básica de la mielina, MOG: proteína mielínica de los oligodendrocitos, PLP: proteína proteolípida.

Como podemos observar en la tabla 1.2 existen muchas alternativas de EAE que reflejan aspectos concretos de la enfermedad, ya que ningún modelo es capaz de mimetizar todas las características inmunopatológicas.

La EAE en el SNC, del mismo modo que la EM, se caracteriza por una infiltración de linfocitos y macrófagos en la sustancia blanca y una posterior desmielinización⁸⁸. Las lesiones en el SNC son múltiples, con una preferente localización perivascular, sobre todo a nivel del tronco cerebral y de la médula espinal. El curso temporal comienza con la inflamación, la desmielinización, seguido de la gliosis y una remielinización parcial. Además podemos encontrar inmunoglobulinas en el LCR y en el SNC^{73,89}.

La EAE ha servido para avanzar en el conocimiento de los mecanismos inflamatorios de la enfermedad y ha aportado importantes hallazgos: se ha descubierto la existencia de células autorreactivas, que escapan de la selección negativa en el timo y que pueden encontrarse en individuos sanos⁹⁰.

La EAE ha permitido demostrar que el SNC no es un órgano inmunoprivilegiado, ya que las células T activadas son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica para iniciar los procesos de inflamación. Las células T autorreactivas tienen que adherirse al endotelio mediante diferentes ligandos; como, la vía de adhesión de la integrina/receptor VLA-4/VCAM-1 (de *Integrin alpha4beta1 -Very Late Antigen 4-* y *Vascular cell adhesion molecule*

1). El Natalizumab (anticuerpo humanizado anti-VLA4) es un medicamento que se encuentra hoy en el mercado basándose en estos hallazgos.

Igualmente, el acetato de glatiramer, uno de los fármacos más utilizados en la actualidad para el tratamiento de la enfermedad, derivó del estudio de la EAE. Mientras se estudiaban nuevos modelos de EAE, diseñaron un copolímero sintético de aminoácidos, con la intención de mimetizar la proteína básica de la mielina (MBP), el copolímero no produjo la enfermedad, sino que se demostró que disminuía los brotes en la EM-RR en un 30%^{91,92}.

La EAE también ha aportado hallazgos sobre el daño axonal, la causa de la mayor parte de la invalidez en los pacientes con EM. Estudios experimentales han mostrado que se correlaciona la extensión de mielina perdida en los axones con el número de macrófagos infiltrados⁹³, también se han observado distribución anómala de los canales iónicos en los axones crónicos desmielinizados⁹⁴ y que las células CD8+ interactúan con axones desmielinizados, produciendo daño axonal por un mecanismo dependiente de antígeno⁹⁵.

En conclusión este modelo animal, que simula la EM, ha permitido el estudio de esta enfermedad, tanto su respuesta inflamatoria, respuesta autoinmune..., y ha contribuido en el desarrollo de medicamentos actuales para EM como, la

mitoxantrona, acetato de glatiramer y el natalizumab, además es una herramienta fundamental para desarrollar en el futuro nuevas terapias.

1.6.- CÉLULAS MADRE

Las células madre son un tipo de células indiferenciadas que poseen la capacidad de autorrenovación y diferenciación. La autorrenovación, es la capacidad de dividirse dando lugar a nuevas células idénticas a la de origen; y el potencial de diferenciación les confiere la habilidad de generar células hijas comprometidas a diferentes linajes celulares con funciones y morfología especializada, siempre que se encuentre bajo las condiciones apropiadas del microambiente⁹⁶.

1.6.1.-TIPOS Y CLASIFICACIÓN

Las células madre se pueden clasificar, por su origen o por su potencial de diferenciación:

Según su origen, las células madre se clasifican de acuerdo a la fase de desarrollo en la que están presentes, dividiéndose en: embrionarias, fetales o adultas. Las *células madre embrionarias o ESCs* (del inglés, *Embryonic Stem Cells*) proceden de embriones antes de su implantación en el útero, y son células pluripotentes⁹⁷. Las *células madre fetales* son células multipotentes que

se encuentran en los órganos del feto en desarrollo, y poseen características similares a sus homólogas en tejidos adultos⁹⁸. En el caso de las células madre presentes en el organismo adulto se denominan genéricamente *células madre adultas* o células madre somáticas. Éstas son células relativamente indiferenciadas, y pueden originar diferentes tipos celulares más especializados.

Según su potencial de diferenciación, las células madre pueden clasificarse como células madre *totipotenciales* capaces de producir células de todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios (trofoblasto y placenta) de un individuo, células madre *multipotenciales* capaces de originar múltiples tipos celulares procedentes sólo de una capa embrionaria, células madre *pluripotenciales* aquellas que pueden dar origen a tejidos de cualquiera de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) exceptuando las estructuras extraembrionarias, y células madre *oligopotenciales* o células progenitoras específicas de linaje capaces de dar lugar a uno o pocos tipos celulares de un mismo tejido⁹⁹.

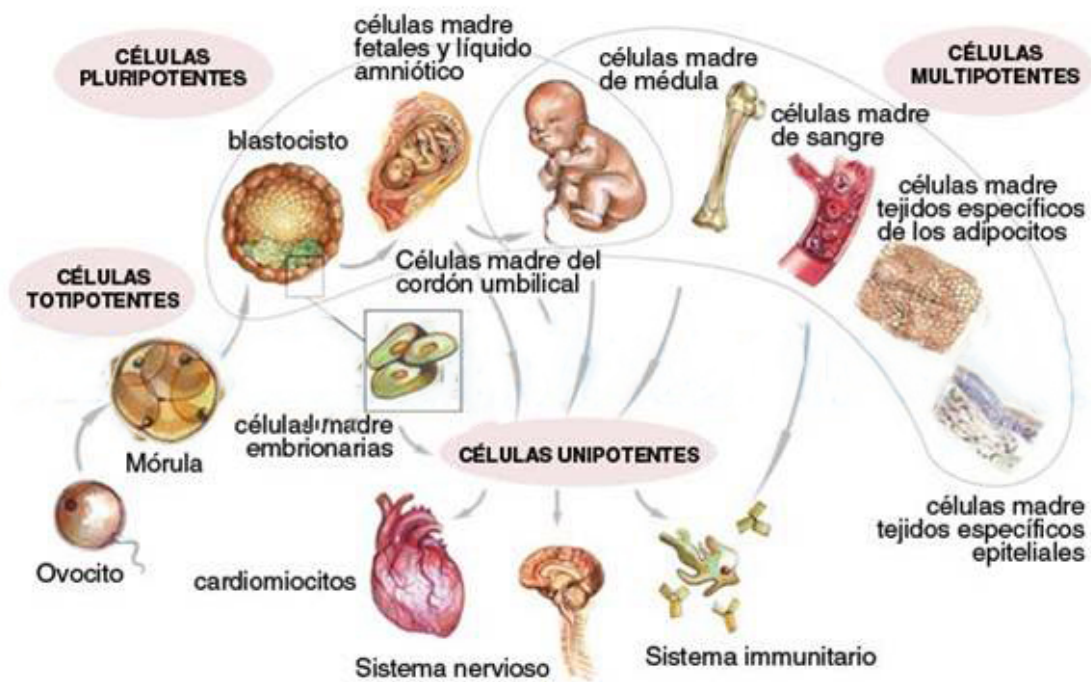


Figura 1.8. Esquema representativo del origen y potencialidad de los diferentes tipos de células madre y sus destinos tisulares durante el desarrollo.

1.6.2.-CELULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales o MSCs (del inglés *Mesenchymal Stem Cells* o *Mesenchymal Stromal Cells*) son células madre adultas “multipotentes”, se aislaron por primera vez en medula ósea (del componente estromal). Las MSCs pueden formar colonias y diferenciarse a tipos celulares de linaje mesodérmico, endodérmico y ectodérmico¹⁰⁰; además de presentar capacidad inmunorreguladora. Se cree que están localizadas en el tejido conectivo o estroma que da soporte a los órganos que las albergan y que están principalmente asociadas a los nichos perivasculares. Estos nichos son el microambiente que permite la transferencia de señales a través de interacciones por contacto celular, factores solubles y matriz extracelular, las cuales regulan el balance de las células madre según las necesidades del organismo. El nicho, de esta manera, mantiene a las células madre en un estado quiescente o inactivo, o por el contrario promueve su activación para responder frente a diferentes estímulos, mediando el reemplazo de células muertas o disfuncionales (homeostasis), o reparando el tejido después de sufrir un daño.

Las hMSC residen principalmente en la médula ósea adulta¹⁰¹ aunque diversos hallazgos han demostrado también su presencia en otros tipos de tejidos, tan diferentes como músculo esquelético¹⁰², tejido adiposo¹⁰³, hueso compacto¹⁰⁴,

periostio^{105,106}, cartílago articular¹⁰⁷, sangre periférica¹⁰⁸, sangre de cordón umbilical^{109,110}, líquido amniótico¹¹¹, membrana sinovial^{112,106}, líquido sinovial¹¹³, tejido fetal¹¹⁴, pulpa dental¹¹⁵, tejido pulmonar¹¹⁶ o placenta.

Actualmente, las células madre mesenquimales mejor caracterizadas y más utilizadas en la regeneración de tejidos, son las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo debido a su elevada facilidad de extracción y aislamiento¹¹⁷.

A.-CARACTERIZACIÓN

Debido a que las MSCs se comportan de forma heterogénea según el tejido de origen y las condiciones de cultivo. La ISCT (del inglés *International Society for Cell Therapy*) en el año 2006, estableció unas pautas para la caracterización de acuerdo a 3 criterios¹¹⁸:

- I. Crecimiento en adherencia a las superficies plásticas utilizadas para su cultivo.
- II. Expresión de las moléculas de superficie CD73, CD90 y CD105, y la ausencia de marcadores de monocitos y macrófagos (CD11b y CD14), marcador leucocitario (CD45), marcador de células B (CD19 ó CD79a), marcador de progenitores hematopoyéticos y marcadores de células endoteliales (CD34), y HLA-DR.

III. Capacidad de diferenciación *in vitro* hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

Las MSCs se caracterizan por:

- a) Cuando se administran por vía endovenosa poseen la capacidad de migrar e injertar en lugares donde existe un daño tisular e inflamación¹¹⁹.
- b) Poseen la capacidad de diferenciarse hacia diferentes tipos celulares: tanto hacia células de estirpe mesenquimal (osteoblastos, adipocitos y condroblastos) como hacia otros linajes.
- c) Pueden secretar múltiples moléculas bioactivas capaces de estimular la recuperación de células dañadas y de inhibir la inflamación. Los mecanismos de comunicación con dichas células no son completamente conocidos.
- d) Presentan escasa inmunogenicidad y poseen propiedades inmunomoduladoras. Son capaces de sobrevivir en un ambiente xenogénico. Su capacidad inmunomoduladora depende entre otros de la supresión de la función linfocitaria, el aumento de la regulación por linfocitos T y células dendríticas, así como de la alteración del patrón de citoquinas¹²⁰.

B. REPARACIÓN TISULAR

Cuando se produce un daño en los tejidos, pueden activarse los macrófagos locales y eliminarse las células necróticas o apoptóticas sin inflamación, o bien, puede producirse inflamación con la activación del componente celular del sistema inmune, células T, células B.

Para que se produzca la reparación tisular es necesaria la **migración** de las MSCs hasta la zona dañada. El tejido dañado secreta una gran cantidad de quimioquinas y factores de crecimiento, además, las MSCs expresan gran variedad de receptores para quimioquinas, lo que sugiere un potencial de movilización hacia diversos tejidos¹²¹. Existen estudios que han demostrado la capacidad de migración de las MSCs ante citoquinas quimioatrayentes tales como CX3CL1 y CXCL10¹²², IL-8¹²³, CCL3¹²⁴, CXCL12¹²⁵. Factores de crecimiento generados por los tejidos dañados, como FGF, PDGF y CXCL12 también favorecen la migración de las MSCs¹²⁶.

La preincubación de las MSCs con citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IFN- γ , solas o en combinación, es capaz de incrementar la expresión de sus receptores, aumentando el potencial de migración de las MSCs¹²². En la migración de MSCs, la quimioquina CXCL12 y su receptor CXCR4 son, necesarios para la permanencia en la médula, la movilización y el

reclutamiento de células madre hematopoyéticas y células progenitoras endoteliales^{127,128}.

El endotelio de las zonas dañadas se activa por el TNF- α , que estimula la expresión de una gran cantidad de quimioquinas y moléculas de adhesión. Las MSCs migran por el torrente sanguíneo hacia las zonas dañadas rodando sobre las células endoteliales de los vasos. Existen estudios que demuestran que las hMSCs se unían a células endoteliales y rodaban sobre ellas, con una rápida extensión de podios, mediante la unión entre el ligando de selectinas CD24 (presente en la membrana de las MSCs), y la selectina-P (expresada en las células endoteliales)¹²⁹. Posteriormente, se produce la **adhesión** de las MSCs a los vasos del tejido, produciéndose una adhesión firme a los mismos, mediada por integrinas y moléculas de adhesión. Así, la integrina VLA-4, expresada en las MSCs es capaz de unirse con VCAM1 en las células endoteliales¹²⁹. Y la integrina CD11a/CD18 expresada en las MSCs, se une a ICAM1 de las células endoteliales, favoreciendo el proceso de adhesión¹³⁰. Seguidamente, se produce la migración celular a través de las paredes del endotelio vascular, proceso conocido como **transmigración**. Para ello, las MSCs sufren cambios morfológicos y la transmigración puede ser paracelular (entre las células endoteliales), mediante podios de membrana o transcelular (directamente a

través de las células endoteliales), mediante diapédesis a través de poros en la capa endotelial^{131,132}.

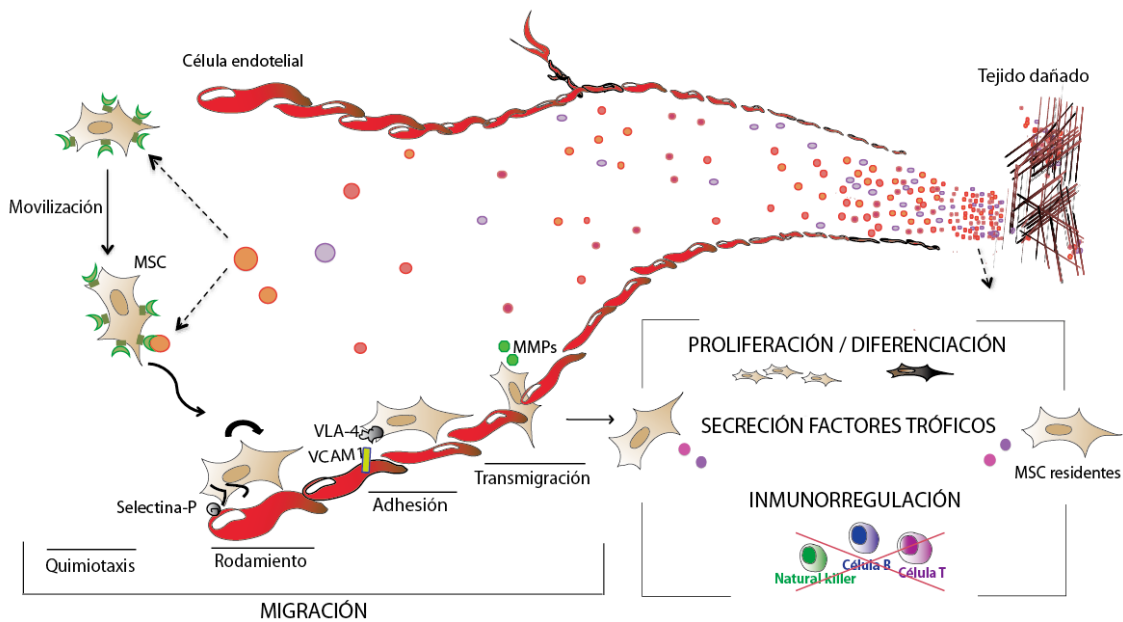


Figura 1.9. Proceso básico de reparación tisular por MSC.

Cuando las MSCs llegan al tejido dañado, son capaces de proliferar y se diferencian en los tipos celulares que han sido dañados, formando tejido maduro y funcional¹³³.

Existen estudios que han demostrado que las MSCs pueden disminuir el daño en el tejido y mejorar la función en pulmón¹³⁴, riñón^{135,136}, hígado^{137,138}, diabetes^{138,139} e infarto de miocardio^{140,141}.

Para que las MSCs puedan reparar el tejido dañado, son indispensables la **secreción** de moléculas como tales como *factores de crecimiento* (incluyendo

factores proangiogénicos), *factores inmunosupresores* y por último *moléculas de superficie y quimioquinas*.

Las MSCs producen varios factores de crecimiento como: EGF, FGF, PDGF, TGF β , VEGF, HGF, IGF1, ANGPT1, y CXCL12^{142,143}. Que favorecen la formación de fibroblastos, células endoteliales y otras células progenitoras del tejido en cuestión.

El VEGF, promueve la angiogénesis, reduciendo la permeabilidad endotelial, otros factores mantienen la integridad del tejido mediante la secreción de proteínas de matriz extracelular como colágeno, fibronectina o gelatina.

La reparación y regeneración de los tejidos no hematopoyéticos, son promovidas por factores de crecimiento, como eritropoyetina (EPO) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (GSF3) producidas por las MSCs^{144,145}.

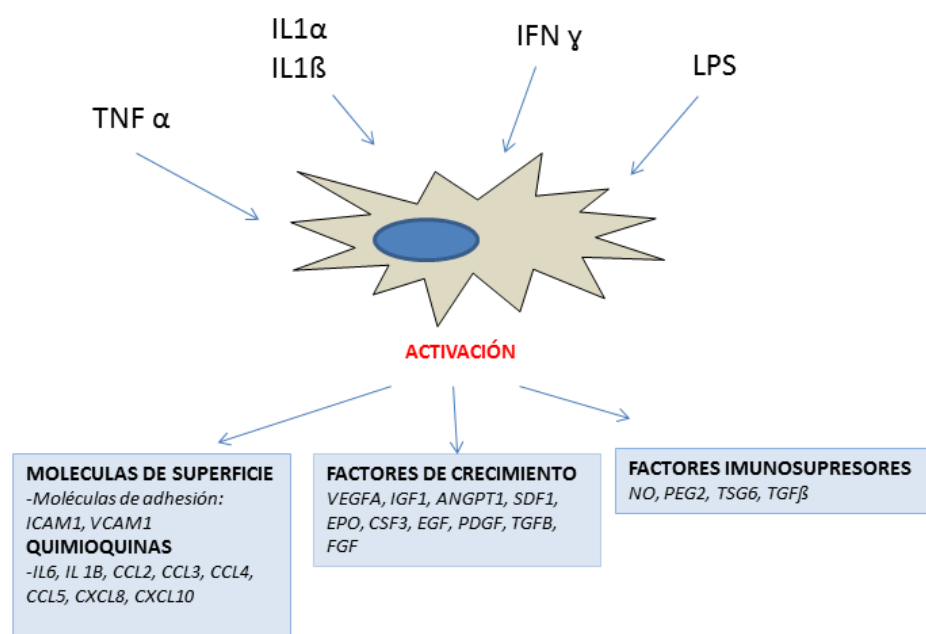


Figura 1.10. Secreción de factores paracrinos por MSCs¹⁴².

La **secreción** de factores inmunorreguladores por parte de las MSCs, permite modular la respuesta del sistema inmune, se controla mediante diversos mecanismos que son activados por la presencia de factores proinflamatorios^{146, 147}

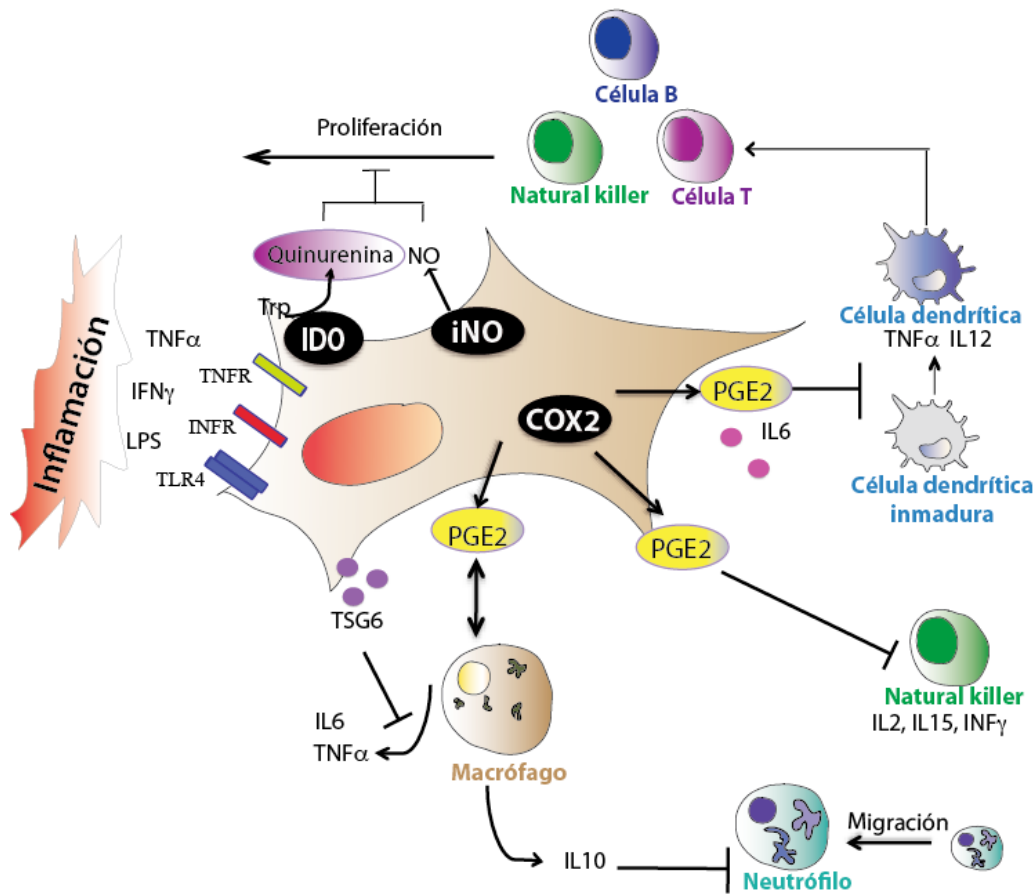


Figura 1.11. Modulación del sistema inmune mediada por las MSCs. Tras la inflamación, las MSCs son activadas por varias citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IFN- γ así como por otros factores asociados a procesos infecciosos, como LPS. En ratón, la activación de las MSCs promueve fundamentalmente la expresión de iNOS y la consiguiente producción de óxido nítrico, la cual inhibe la proliferación de las células T y B. A su vez, las MSCs activadas expresan COX2, que produce PGE2, la cual afecta a los macrófagos aumentando la secreción de IL-10. Los altos niveles de PGE2 también bloquean la correcta maduración de las células dendríticas, lo que se traduce en una pobre activación de las células T y por tanto en una importante supresión de toda la respuesta inmune subsiguiente¹⁴⁸.

La activación de las MSCs promueve la expresión de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible), la cual produce óxido nítrico. El óxido nítrico producido es un potente inmunosupresor, en altas concentraciones, es capaz de inhibir la proliferación de las células T *in vitro*¹⁴⁹. Sin embargo, en el ser humano la activación de las MSCs expresan altas cantidades de IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase) la cual, es un catalizador de la degradación del triptófano (aminoácido esencial que interviene en la proliferación de linfocitos), favoreciendo la producción de quinurenina. Por ello, IDO ha sido relacionado con la inhibición de la proliferación de varios tipos celulares, incluyendo células T, B y NK^{150,151}.

Cuando se reconocen moléculas de patógenos y de tejidos dañado durante la inflamación las MSCs expresan la enzima COX2 (ciclooxigenasa 2), que produce PGE2. La PGE2 producida es capaz *de cambiar* su fenotipo de un estado proinflamatorio (elevada secreción de IL-6 y baja de IL-10) a un estado antiinflamatorio (alta secreción de IL-10 y baja IL-6) promoviendo la disminución de la sepsis en ratón¹⁴⁷. También se ha visto que la IL-6 y la PGE2, producidas por las MSCs, inhiben la maduración de las células dendríticas, las cuales tienen un papel fundamental en la presentación de antígenos a las células T^{152,153}.

En conclusión, la PGE2 ha sido descrita como un potente supresor de células T, NK, y macrófagos^{147,150,154}. Estos factores inmunosupresores secretados por las MSCs son muy lábiles y sólo tienen efecto en proximidad de las MSCs que las secretan.

Las MSCs **expresan** una gran variedad de *quimioquinas y receptores de quimioquinas*, que les permiten su movilización al lugar del daño. Las MSCs producen los ligandos de CXCR3 (receptores presentes en las células T y *natural killers*), y de CCR5 (expresado en células Th1), que sirven a las MSCs para atraer a las células del sistema inmune. Las MSCs expresan ICAM1 y VCAM1, moléculas de adhesión que retienen a las células atraídas, y reclutan a las células T¹⁵⁵.

Las MSCs también actúan en el proceso de inmunorregulación por contacto directo entre MSCs y células del sistema inmune. El contacto directo entre MSCs-macróforos puede incrementar el marcador de superficie CD206, propio de macróforos antiinflamatorios¹⁵⁶, que a su vez estimulan la producción de IL-10, lo que no sucede cuando se utiliza solo el medio secretado por las MSCs¹⁴⁷.

Las propiedades biológicas de las hMSCs y su aparente inocuidad han sido responsables de la realización de más de 580 ensayos clínicos en humanos en todo el mundo (<http://clinicaltrials.gov>), en los que se infunden hMSCs para

tratar diversas enfermedades, como la esclerosis múltiple, la enfermedad injerto contra huésped, la cirrosis biliar primaria, entre otras. Estos ensayos en su mayoría se encuentran en fase I y II y han demostrado la factibilidad, seguridad y eficacia de esta terapia en humanos. En general, las hMSCs son bien toleradas, y la mayoría de ensayos no observan efectos adversos moderados-graves a medio plazo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.-HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Partiendo del conocimiento de que las células madre mesenquimales poseen tropismo por las regiones inflamadas (lesionadas) y del papel neuroregenerador del bloqueo del receptor de Nogo, planteamos las siguientes hipótesis:

H1.- Existe tropismo de MSC al microambiente inflamatorio del nervio óptico en el modelo animal de esclerosis múltiple.

H2.- Debido a este tropismo de las MSC es posible su acción neuroprotectora a nivel ocular, lo que resulta una mejoría histológica en la neuritis óptica en el modelo animal de esclerosis múltiple.

OBJETIVOS.-

OB1: Estudio del microambiente celular inflamatorio del nervio óptico y la retina en el modelo animal de EM.

OB2: Estudio de la respuesta neuroprotectora y neuroregeneradora, en el nervio óptico y la retina, de las células mesenquimales humanas (hMSCs) transfectadas con un gen neuroregenerador (forma dominante negativa del receptor de Nogo).

MATERIAL Y MÉTODOS

3.-MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1.-GENERACIÓN DE UN MODELO DE ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL.

El primer paso de nuestro trabajo fue la creación de un modelo de EAE en ratón. Existen varios métodos para generar este modelo: usando virus especiales (Semliki Forest virus, Mouse hepatitis virus, etc.), proteínas de mielina como la proteína proteolípida (PLP), proteína básica de mielina (MBP o MOG), o toxinas (lisolecitina, bromuro de etidio, etc...). Cada uno de estos métodos tiene ventajas y desventajas, además de presentar diferentes síntomas clínicos.

En nuestro caso, utilizamos la proteína MOG acompañada de toxina pertusside ya que sensibiliza el sistema inmune de una forma más profunda y ayuda a los linfocitos T activados a traspasar la barrera hematoencefálica. Las preparaciones de la vacuna, concentraciones y volumen que fueron inyectados a los animales se hicieron según el protocolo siguiente:

PROTOCOLO DE LA GENERACIÓN DEL MODELO DE EAE.

MATERIAL:

REACTIVOS

- PBS sin calcio ni magnesio (estéril) (GIBCO); RT.
- DMSO anhidro >99% (sólo si existe una menor solubilidad del péptido en PBS); RT.
- Péptido inmunogénico:
 - MOG 35-55 (ESPIKEM, Italia) 10 mg, polvo; 4°C. 10 alícuotas de 500 µl (10 mg MOG en 5 ml de PBS, 2 mg/ml).
 - NEFL (home made); 4°C.
- Coadyuvante de Freund completo (CFA) (SIGMA F5881, 10 ml); 4°C.
- 1 mg/ml Mycobacterium TBC. Alícuotas de 500 µl.
- Toxina pertussoide (SIGMA P2980, 50 µg glicina, y 0.5 M): solución filtrada con 50 µg/ml estéril en 50% (v/v) glicerol con 50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM NaCl. Se recomienda diluir con un tampón de fosfato sódico 25 mM, pH 9, NaCl 0,5M, y 4% (v/v) glicerol.
- 10 ml de solución de dilución
 - 25 mM fosfato sódico (Mw=163,94) (SIGMA 342483): 41 mg
 - 0,5M NaCl (Mw=58,44 g/ml): 0,3 g
 - 4% Glicerol estéril: 800 µl de glicerol al 50%
 - Medir pH y ajustar a 9.0
 - Filtrar
- Ovoalbúmina (proteína control)
- Anestesia ligera (ketamina/medetomidina 75/1 (mg/kg)): Administrar 10 µl/g de peso corporal ratón.
 - 1 ml de anestésico:
 - 100 µl ketamina (Ketolar 100 mg/ml) (0,100 ml=10 mg/ml (concentración final en lo inyectado: 2 mg/200 ul)
 - 100 µl medetomidina (Dormtor 1 mg/ml) (0,100 ml= 100 µg/ml (concentración final en lo inyectado 20 µg/200 µl))
 - Salino estéril 800 µl.

EQUIPAMIENTO

- Vórtex de tubos eppendorf (IKA)
- Jeringas de insulina con agujas de 26G 3/8
- Agujas de 25G y 30G
- Tubos eppendorf
- Peso con escala de hasta 0,1 gramos de sensibilidad

PROCEDIMIENTO
CÁLCULOS:
PREPARACIÓN DE LA EMULSIÓN CFA/INMUNÓGENO (1h):
<ul style="list-style-type: none"> • N=número de animales; 200 µl de emulsión/animal (1:1, v/v: antígeno/CFA). • Se calcula para 1,5 X N (para que sobre emulsión): $N \times 200 \times 1,5 = N \times 300 = N \times 150$ (volumen de antígeno disuelto en PBS) + $N \times 150$ (volumen de CFA) • 200 µg de péptido/animal, en 200 µl: $1 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 1 \text{ mg/ml}$ (concentración final) x 2 porque hay que diluir 1:1 con el CFA: 2 mg/ml. 10 mg de MOG se diluirían en 5 ml de PBS, y se alicuotarían en 0,5 ml/tubo. • Preparar stock de 2 mg/ml de ovoalbúmina para los animales control. • Vórtex CFA stock para resuspender las partículas de Mycobacterium. • 500 µl de solución de PBS antígeno a 2 mg/ml + 500 µl de CFA. • Vórtex de tubos 45 minutos
PREPARACIÓN DE LA TOXINA PERTUSSIS (15 min):
<ul style="list-style-type: none"> • 200 ng/100 µl. Alicuotar en alícuotas de 50 µl
INMUNIZACIÓN (1-2h):
<ul style="list-style-type: none"> • Pesar al animal (un descenso del 20-30% en el peso durante el seguimiento es criterio de punto final) • Anestesiarse al animal (10 µl/g peso de la mezcla de ketamina/xilazina) ip. Tras 5 minutos iniciar el procedimiento. • Administrar 0,1 ml de toxina pertussis ip (200 ng). • Cargar jeringa de insulina con 1 ml de emulsión antígeno/CFA. • Inyectar 50 µl de la mezcla en el flanco (4 inyecciones, dos en cada flanco) subcutánea. Total 200 µl por animal. • Al día siguiente o a las 48h: <ul style="list-style-type: none"> ○ 2ª dosis de pertussis (para este paso no es necesario anestesiarse al animal)

Tabla 2.1. Protocolo de generación del modelo de EAE.

3.2.-ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En nuestro estudio utilizamos ratones B6/C57 hembras, de 10 semanas de vida. Estos animales fueron utilizados para la experimentación animal según las directrices éticas de experimentación animal (Consejo de la Comunidad Europea, 24 de Noviembre 1986 [86/609/EEC] y real decreto 1201/2005 del 10 de Octubre sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE num.252 del 21 de Octubre de 2005)).

3.3.-DISEÑO EXPERIMENTAL

3.3.1.-CULTIVOS Y TRANSFECCIÓN DE hMSC.

Una de las moléculas implicada en la remielinización en la EM es Nogo-A, la cual se une al receptor Nogo (NogoR) activando la señal que activa el inhibidor de crecimiento axonal. Así, la introducción de NogoR^{DN} puede tener un efecto inmunomodulador y antiinflamatorio en el organismo. Para dilucidar esta hipótesis se utilizan en el proyecto células mesenquimales humanas que han sido transfectadas con un plásmido (formado por, un transgen compuesto por la etiqueta *FlagTAG* y el gen modificado que codifica el receptor de Nogo (Nogo-R)). La *FlagTAG* puede ser detectada por inmunohistoquímica, permitiendo la localización de las MSCs y el gen modificado del Nogo-R, actúa como antagonista competitivo del Nogo, estimulando la regeneración axonal.

Las hMSCs fueron proporcionadas por STEMCELL TECHNOLOGIES INC, se cultivaron siguiendo los protocolos hasta llegar a pase 4, cuando se realizó la electroporación del plásmido, (elegimos la transfección de NogoR^{DN} mediante electroporación ya que es un sistema bien establecido, usando Nucleofector® (Lonza)). El vector de expresión se construyó mediante la inserción en el vector vacío pCEP4 el gen dominante negativo del NogoR. De este modo, el plásmido se introdujo en la concentración adecuada, y 24 horas después fue posible determinar la eficacia del proceso mediante detección de FlagTAG.

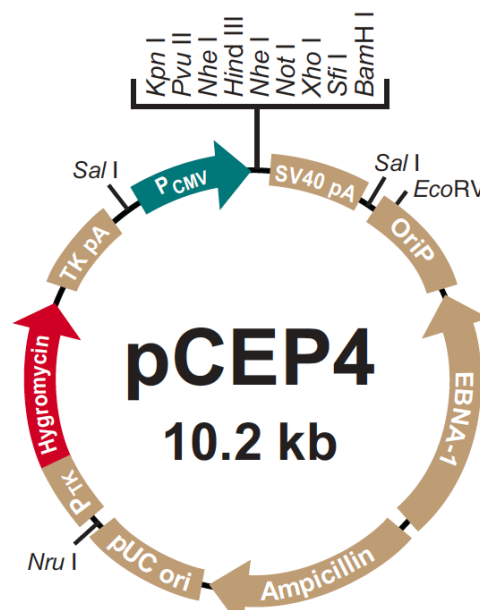


Figura 2.1.- Vector episomal pCEP4. El gen NogoR^{DN} se incorporó en el sitio de restricción mediante digestión con BamHI y XhoI.

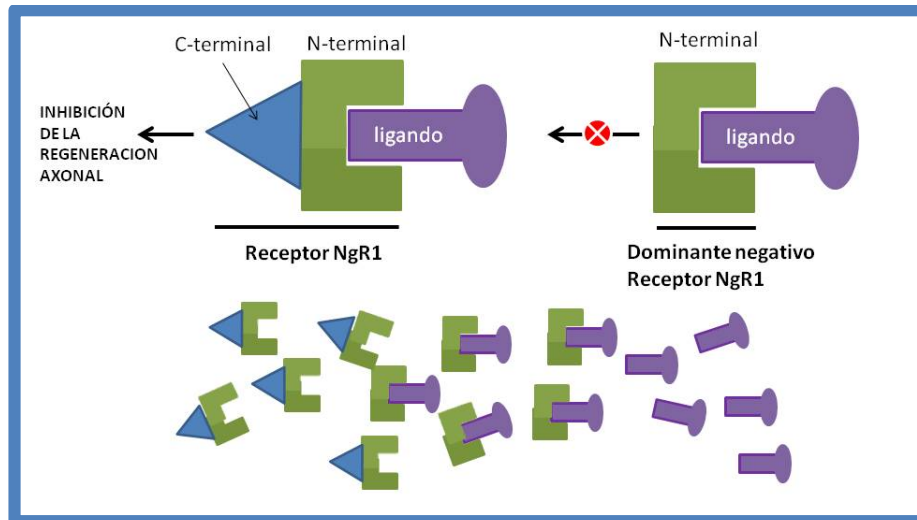


Figura 2.2. Mecanismo de neurorreparación: El mecanismo mediante el cual se bloqueará la inhibición de la regeneración axonal será la expresión por el transgén de una proteína defectuosa, a la que le falta el extremo C-terminal (que es el que determina la acción inhibidora la regeneración axonal). Sin embargo, esta proteína sí que es capaz de unirse al ligando. Por tanto, actúa captando ligando que no puede unirse a los receptores que sí transducen la señal. Este efecto de antagonismo competitivo se denomina efecto dominante negativo.

Una vez transfectadas las células, realizamos los cultivos celulares siguiendo el siguiente esquema (Resultados no publicados (Gil-Perotín S. et al.)):

- Comunicación directa (CD). Las hMSC se siembran en contacto con las neuroesferas diferenciadas. Si existe transferencia de material génico o proteico implicaría una comunicación paracrina, o mediante contacto directo vía exosomas o nanotubos.
- Comunicación a través de Transwell® (TW): Las hMSC no contactan con las células nerviosas diferenciadas en el fondo del pocillo, sino que se

encuentran en un Transwell® (pocillo intermedio) semipermeable. Si existe comunicación en este sistema sería paracrina y/o mediante la liberación de exosomas.

- Medio condicionado (MC): si existe comunicación mediante la adición de medio de hMSCs pCEP4:GFP sin células (aunque sí que pueden existir exosomas) también implicaría una comunicación mediante exosomas o de tipo paracrino.
- NEG (control negativo). Cultivo de neuroesferas diferenciadas.

	PFA 4%			PFA 4% + Glutaraldehído 0.5%		
1000 células / pocillo	CD	CD	CD	CD	CD	CD
1000 células / pocillo	TW	TW	TW	TW	TW	TW
200 um de hMSC medio	MC	MC	MC	MC	MC	MC
1000 células / pocillo	NEG	NEG	hMSC-Nogo	NEG	NEG	hMSC-Nogo

Tabla 2.2. Cultivos celulares.

Se incubó esta placa durante 3 días a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente se fijaron las células a 37°C durante 1 hora con diferentes soluciones, paraformaldehído (PFA) al 4% o PFA al 4% + glutaraldehído al 0,5%, en función del posterior procesamiento de las muestras. Se estudió en estas células la expresión de FlagTAG y/o NogoR^{DN}.

ENSAYO *IN VIVO*: TRANSFECCIÓN DE hMSC:GFP:pCEP4:NogoR^{DN}

Por lo tanto, dividimos un total de 23 ratones, en tres grupos: en el primero, controles negativos (**grupo control**), 10 animales, en el segundo se realizó la inmunización con la proteína MOG y la administración intravenosa de hMSCs (**grupo experimental**), 7 animales, y en el tercer grupo de controles positivos, se realizó la inmunización con la proteína MOG, pero sin administrarse hMSCs (**grupo EAE**), 6 animales.

3.3.2.-OBSERVACIÓN Y VALORACIÓN DE LOS SIGNOS CLÍNICOS EN EAE MODELO.

A los animales, se les monitorizó y se observó su conducta, al principio a días alternos, y cuando los animales estaban muy afectados, diariamente. En el momento en que el animal cumplía criterios de punto final, se sacrificaba mediante eutanasia.

PUNTUACIÓN AL INICIO DE LA CLÍNICA (7-10 días) Y EN EL PICO (14-17 días)

Puntos	Observaciones clínicas
0	Sin cambios en la función motora: al coger al ratón por la base de la cola, la cola presenta tensión y está recta. Las patas traseras están separadas. No se tambalea ni cabecea.
0,5	Flacidez de la punta de la cola: al coger al ratón por la base de la cola, la cola presenta tensión, excepto la punta. Se percibe tensión muscular en la cola, que aún se mueve.
1	Flacidez completa de la cola: al coger al ratón por la base de la cola, ésta cae por completo sobre nuestro dedo (flácida). Las patas traseras están separadas. La cola no se mueve.
1,5	Cola flácida y afectación leve de al menos una extremidad trasera: además de la cola completamente flácida, al colocar al ratón sobre la jaula, al menos una pata cae entre los alambres consistentemente. Camina oscilando ligeramente.
2	Cola flácida y afectación moderada (debilidad) de extremidades traseras: además de la cola completamente flácida, al sujetar al ratón por la base de la cola, las patas traseras no se separan (están juntas). La marcha es obviamente oscilante. Un pie, al menos, puede arrastrar los dedos, pero la otra pata no presenta signos de debilidad. ○ Cabeceo al caminar con equilibrio alterado: sin necesidad de que haya signo alguno de parálisis en cola o patas traseras
2,5	Cola flácida y arrastre de pies de extremidades traseras: ambas extremidades traseras, aunque tienen movimiento, arrastran los pies. ○ Parálisis completa de una extremidad trasera (arrastre): la otra extremidad sí que se mueve. ○ Puntuación de 0 a 1,5 con caída grave de la cabeza: con caídas ocasionales al ratón.
3	Cola flácida y parálisis completa de ambas extremidades traseras. ○ Cola flácida y parálisis casi completa de ambas extremidades traseras: una de ambas patas traseras es capaz de moverse (a nivel del pie) pero no puede doblarse hasta la cadera. ○ Cola flácida y parálisis de una extremidad trasera y, al menos, una extremidad delantera. ○ Todos los siguientes signos juntos: a) cabeceo importante; b) solo camina por los bordes de la jaula; c) se golpea o empuja las paredes de la jaula; d) al cogerlo por la base de la cola, el ratón hace movimientos giratorios
3,5	Cola flácida y parálisis completa de ambas extremidades traseras añadido a incapacidad de levantarse: si se le coloca de lado, las patas traseras se disponen juntas y el ratón no puede ponerse recto y levantarse. ○ Cola flácida y parálisis completa de ambas extremidades traseras añadido a parálisis de la cintura pélvica: de cintura para abajo el ratón está flácido (como aplanado) MOMENTO PARA COLOCAR PELLETS Y AGUA SÓLIDA EN EL SUELO DE LA JAULA
4	Cola flácida, parálisis completa de ambas extremidades traseras, parálisis parcial de las patas delanteras: el ratón se mueve poco pero permanece alerta y se alimenta. SE RECOMIENDA EUTANASIA CON PUNTUACIÓN DE 4, 2 DÍAS CONSECUTIVOS
4,5	Cola flácida, parálisis completa de ambas extremidades traseras, parálisis completa de las patas delanteras: el ratón no se mueve alrededor de la jaula, solo mínimamente y en el sitio, no está alerta, escasamente reactivo. EUTANASIA
5	Movimiento espontáneo de giro EUTANASIA ○ Se encuentra muerto al ratón ○ Se decide eutanasia por parálisis grave (4.5)

Tabla 2.3. Valoración de los signos clínicos en EAE modelo.

3.4.-PROCESADO HISTOLÓGICO

3.4.1.-PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES

Cuando el animal cumplía criterios de punto final, se procedía a la perfusión intracardiaca. Para el procesado de los animales, se realizó una laparotomía para acceder a la cavidad peritoneal y desde allí se seccionó el diafragma, para en la cavidad torácica observar el corazón. Se clampó la aorta abdominal y se seccionó la aurícula derecha dejando que la sangre saliera durante unos segundos. Se introdujo una pequeña aguja 26G en el ventrículo izquierdo. La cánula se conectó por un sistema de tubos a una bomba peristáltica y ésta a un reservorio de fluidos. Primero, el animal se perfundió con 50 ml de suero salino estéril (NaCl al 0,9%) para limpiar la sangre de los vasos y órganos, a continuación se perfundió con 150 ml de una solución de paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M, a 4°C de temperatura.

3.4.2.-DISECCIÓN

Una vez perfundidos los animales, se exenteraron los globos oculares con todo el tejido orbitario alrededor. El tejido exenterado se postfijó en PFA durante 1 hora y seguidamente se lavó en PBS. A continuación, se procedió a diseccionar los ojos para separarlos del resto del tejido orbitario, finalmente, se conservaron en PB con azida sódica al 0,05% hasta el momento de realizar las secciones transversales.

3.4.3.-PROCESADO DE LAS SECCIONES TRANSVERSALES DEL GLOBO OCULAR

De cada globo ocular se realizaron secciones longitudinales al NO, de 400 μm de grosor cada una, mediante (*Vibratomo Leica 1000mM Biosystems*).

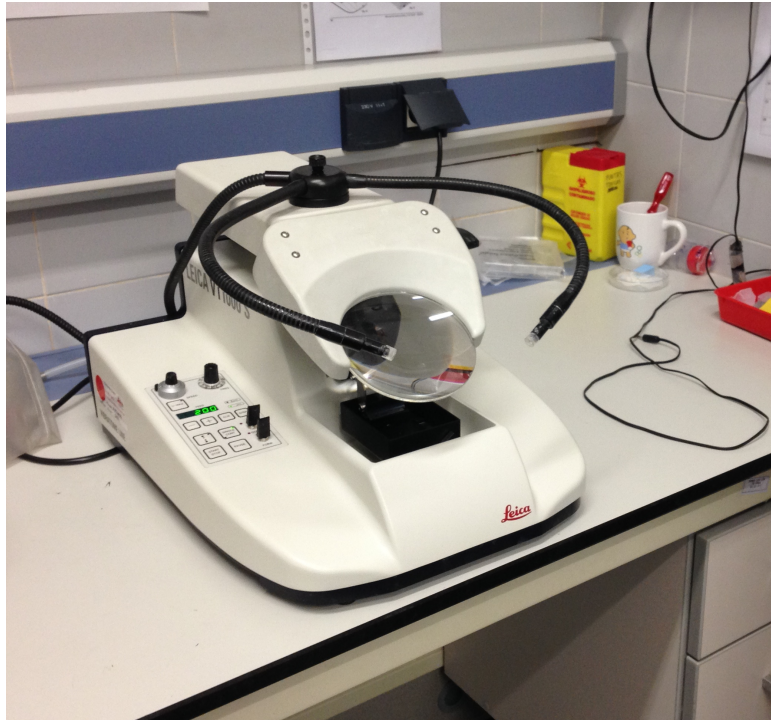


Figura 2.3. Vibratomo Leica 1000mM Biosystems.



Figura 2.4. Sección transversal ojo de ratón. Grosor 400 μm

Se seleccionaron aquellas secciones que contenían la salida del NO del globo ocular (2 secciones por ojo) y realizamos 2 procesamientos distintos:

A) Procedimos a la crioprotección de los cortes en sacarosa al 30%, a continuación se congelaron las muestras con nitrógeno líquido y seguidamente, se obtuvieron secciones histológicas de 10 μm de espesor con ayuda de un criostato (CM1900, Leica, Heidelberg, Alemania).



Figura 2.5. Criostato CM1900, Leica, Heidelberg, Alemania

B) Se procedió a la inclusión de los cortes en araldita, a continuación se retallaron y se cortaron con ultramicrotomo obteniéndose cortes semifinos (1,5 μm), seguidamente se procedió a realizar secciones ultrafinas de 90nm de grosor para estudio ultraestructural con microscopio electrónico.



Figura 2.6. Ultramicrotomo Leica ultracut MZ6 (corte semifinos)



Figura 2.7. Ultramicrotomo Leica EM UC6 (corte de ultrafinos)

3.4.4.-TINCIONES HISTOLÓGICAS

Para el estudio histológico de las secciones, realizamos tinciones con hematoxilina-eosina y azul de toluidina.

a. *Hematoxilina-Eosina*: Es una tinción topográfica, basada en colorantes naturales que tiñen en función de su afinidad ácido/base por el tejido. La hematoxilina, de color azul, tiene un pH básico por lo que tendrá afinidad por estructuras ácidas (como el núcleo), mientras que la eosina, rosa y de carácter ácido presenta afinidad por las estructuras básicas (citoplasma).

b. *Azul de toluidina*: Es también una tinción topográfica, pero en este caso monocromática, por lo que tiñen núcleos más intensos y los citoplasmas más claros.

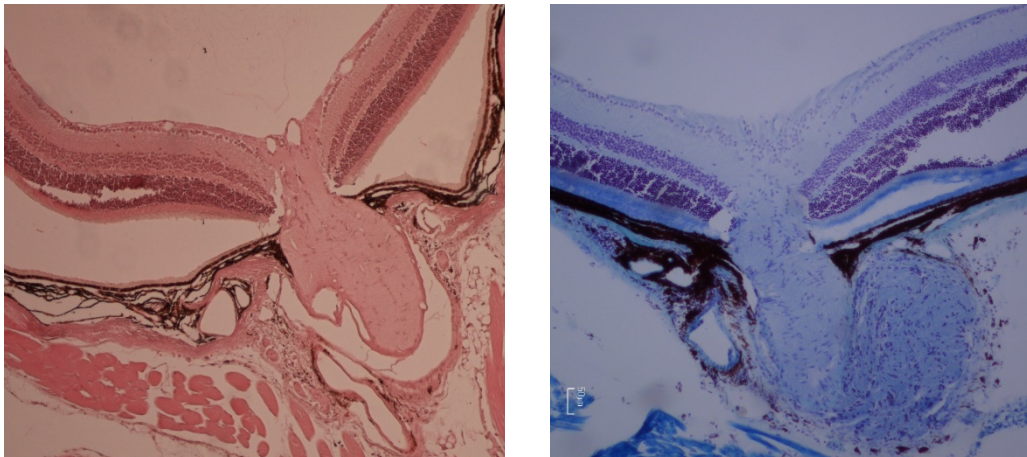


Figura 2.8. Imagen de la izquierda: Tinción hematoxilina-eosina. Imagen de la derecha: tinción azul de toluidina.

Se procedió a la tinción de las muestras de 2 portas por ojo, y el resto se reservó para las técnicas de inmunofluorescencia.

3.4.5.-INMUNOHISTOFLUORESCENCIA

En las secciones transversales del globo ocular, el protocolo de inmunofluorescencia que se realizó fue el siguiente:

Permeabilización: Los cortes obtenidos en el criostato se hirvieron primero en tampón citrato y después en tampón fosfato (PB) 0.1M, posteriormente se inhibió la peroxidasa endógena.

Incubación con el anticuerpo primario: Los cortes del globo ocular y NO, se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo (5% NGS, 5% caseína en PBS) durante toda la noche a 4°C.

Incubación con el anticuerpo secundario: Se lavaron las muestra en PB 0,1 M y se realizó la incubación del anticuerpo secundario diluido en 5% NGS en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las muestras en PB 0,1M.

Las secciones transversales, se montaron con un medio de montaje comercial conteniendo DAPI (4',6-diamidina-2-fenilindol) para contrateñir los núcleos (DAPI, Sigma-Aldrich, Sant Louis, USA). El DAPI es un compuesto fluorescente que se une al ADN de doble cadena, preferentemente a las regiones ricas en A-T y forma un complejo estable que es 20 veces más fluorescente que el DAPI solo. De esta manera, el DAPI tiñe los núcleos de todas las células de un determinado tejido. El pico de excitación es 358 nm y el de emisión es 461 nm

(azul) y, por lo tanto, la señal del DAPI se observa con luz ultravioleta bajo el filtro azul.

Anticuerpos utilizados en los ojos de ratón:

Detección de Iba1:

Para la inmunodetección del Iba1, se utilizó un anticuerpo de conejo anti-Iba1 (rabbit anti-Iba1, ab5076, Abcam) diluido 1:200. Para detectar este anticuerpo, se utilizó el anticuerpo secundario cabra, anti-conejo Fluor 647 (anti rabbit 647, goat), que emite fluorescencia malva, diluido 1:500.

Detección de GFAP

Para la inmunodetección del GFAP, se utilizó un anticuerpo de conejo anti-GFAP (rabbit anti-GFAP, Dako Z0334) diluido 1:200. Para detectar este anticuerpo, se utilizó el anticuerpo secundario cabra, anti-conejo Fluor 555 (anti rabbit 555, goat, A21428), que emite fluorescencia rojo, diluido 1:500.

Detección de NG2

Para la inmunodetección del NG2, se utilizó un anticuerpo de ratón anti-NG 2 (mouse anti-NG2, Millipore MAB 5384) diluido 1:200. Para detectar este anticuerpo, se utilizó el anticuerpo secundario burro, anti-ratón Fluor 647 (anti mouse 647, donkey, A31571), que emite fluorescencia malva, diluido 1:500.

3.5.-ESTUDIO Y ANÁLISIS MORFOLÓGICO

3.5.1.-ADQUISICIÓN DE LAS IMÁGENES

Las muestras histológicas, se examinaron en un microscopio óptico (*Nikon Eclipse E800*), equipado a una cámara digital de alta resolución.

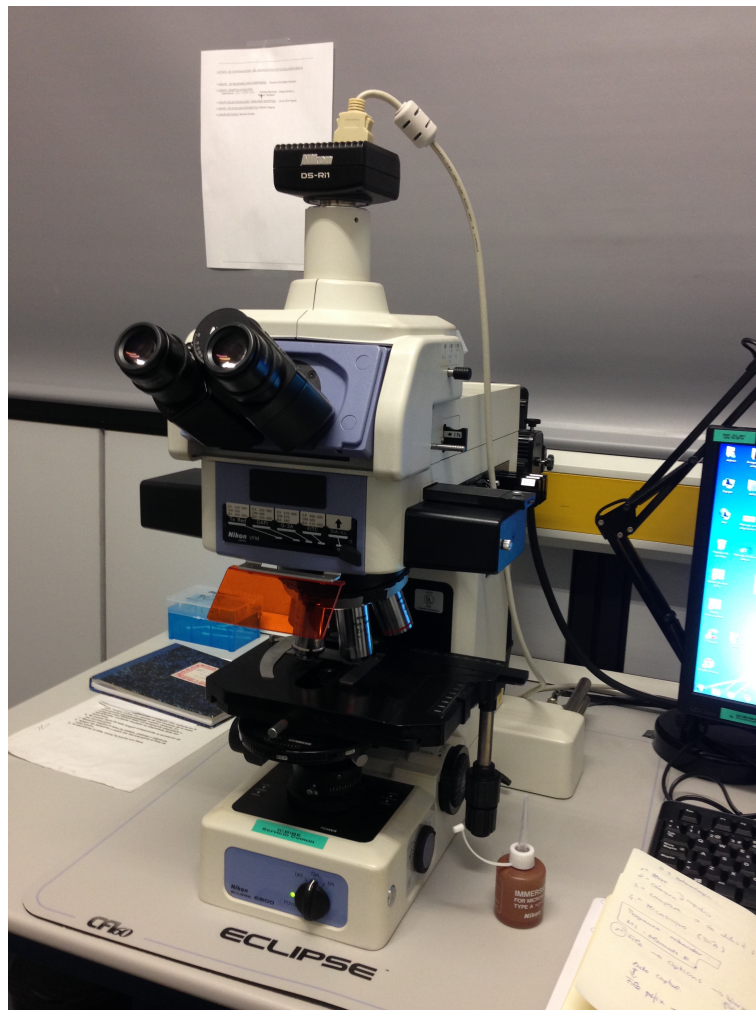


Figura 2.9. Microscopio Nikon Eclipse E800

Las muestras para inmunofluorescencia, se examinaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia (*Nikon, Eclipse,80i*) equipado con un filtro ultravioleta. El microscopio tiene adaptada una cámara digital de alta

resolución y una pletina motorizada controladas por ordenador, mediante un programa informático de análisis de imagen (*Nis-elements BR 3.0 for Windows®*).

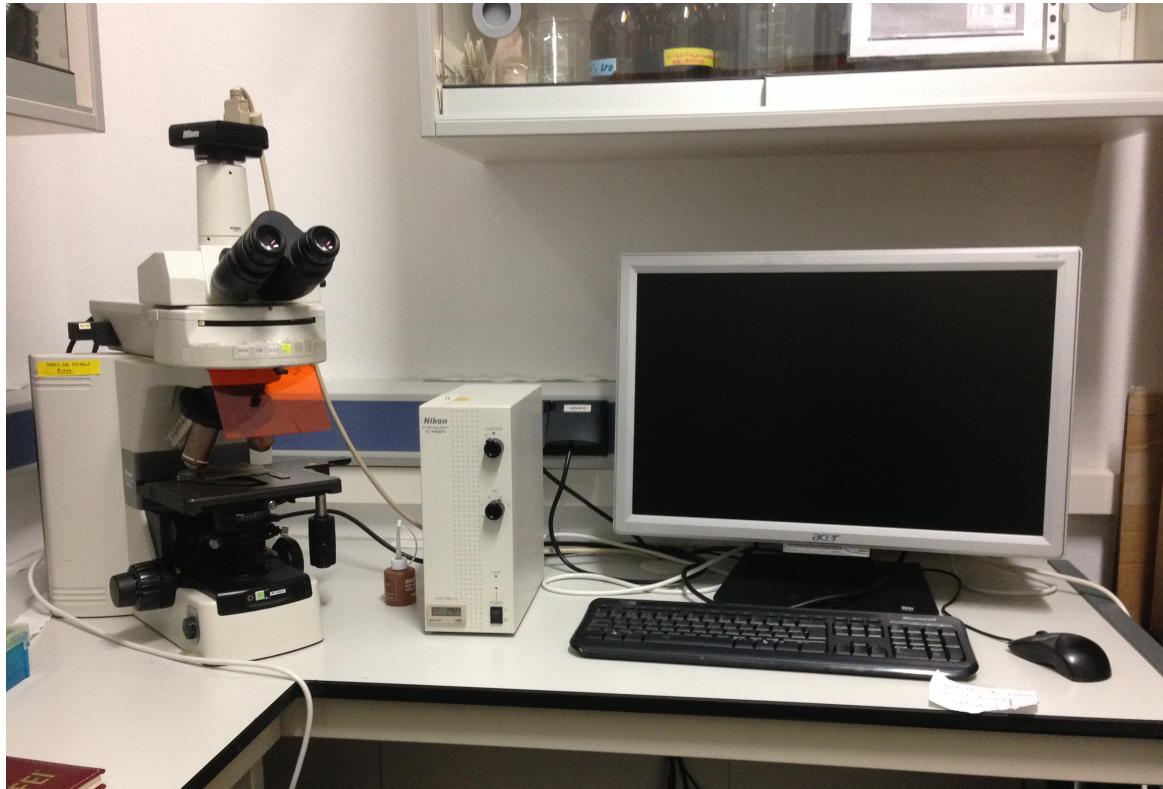


Figura 2.10. Microscopio de fluorescencia (Nikon, Eclipse, 80i)

Las muestras para ME, se examinaron y fotografiaron en el Microscopio electrónico de transmisión **FEI Tecnai Spirit G2** con cámara digital (Soft Image System, Morada) y software de adquisición de imágenes (ITEM) del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

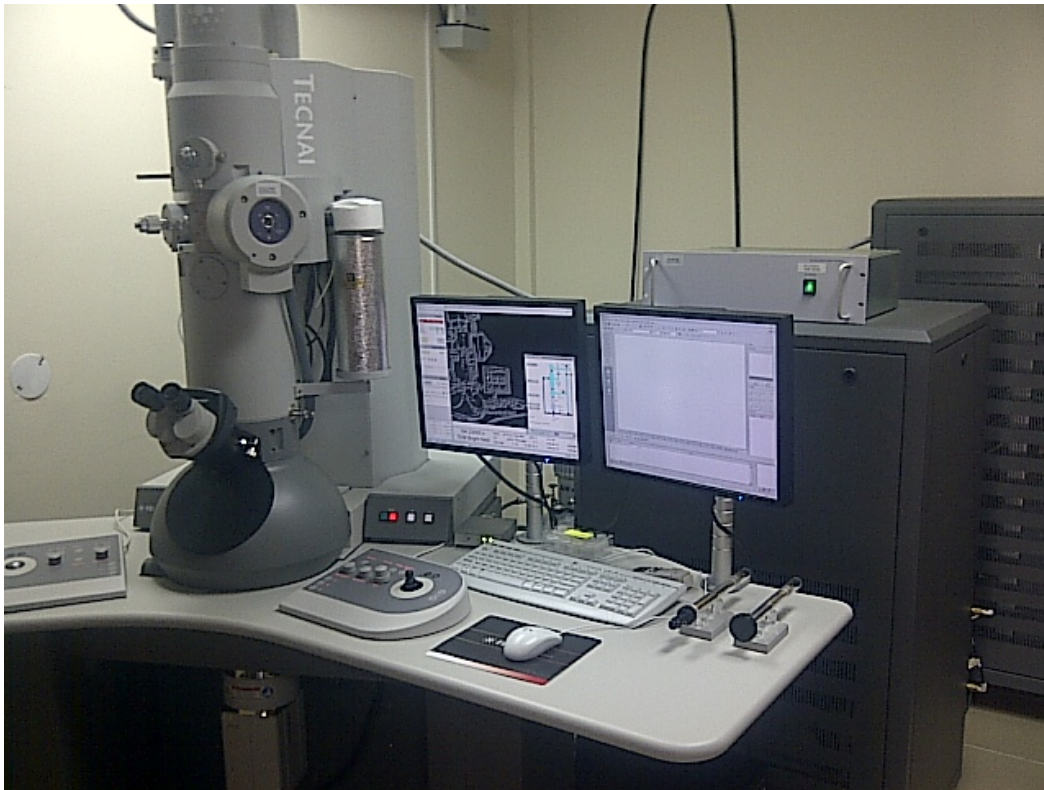


Figura 2.11. Microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai Spirit G2 con cámara digital (Soft Image System, Morada) y software de adquisición de imágenes (ITEM). Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF).

Las fotografías para ME, se realizaron del NO y retina de los tres grupos a estudio (control, experimental y EAE). Centrándonos en la ultraestructura de las distintas células a ese nivel neuronales (células fotorreceptoras, células bipolares, CGR) y no neuronales (astrocitos, microglia).

Los montajes globales de las imágenes de ME superpusieron posteriormente con Adobe Photoshop®CS.

3.6.-CUANTIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES CELULARES

Para cuantificar el número de células en el NO y el de las CGR de los ratones, se capturaron fotografías a 4x, 10x, 40x aumentos de todas las muestras de cada porta.

Posteriormente se seleccionaron las fotografías de la retina 40x, se acotó una distancia media de $300 \pm 50 \mu\text{m}$ de la retina distribuida a ambos lados del NO, ya que es la correspondencia con la estría visual; zona de la retina con mayor densidad de CGR, además de ser una zona de fácil localización por su proximidad anatómica al NO. En la retina, existen áreas de alta y baja densidad de CGR, para promediar el número de CGR por unidad de superficie existen estudios en secciones transversales, donde se han hecho aproximaciones estereológicas con buenos resultados¹⁵⁷.

Seguidamente, se cuantificaron manualmente todas las CGR ahí comprendidas; para posteriormente calcular el número de $\text{CGR}/\mu\text{m}^2$.

Para realizar la cuantificación de la población celular en el NO, se procedió a seleccionar fotografías 40x, se dividió mediante una rejilla con cuadrantes de $15000 \mu\text{m}^2$ de área, se seleccionaron aleatoriamente cuatro cuadrantes y se cuantificaron manualmente todas células/por cuadrante, para posteriormente calcular el número de células/ μm^2 de NO.

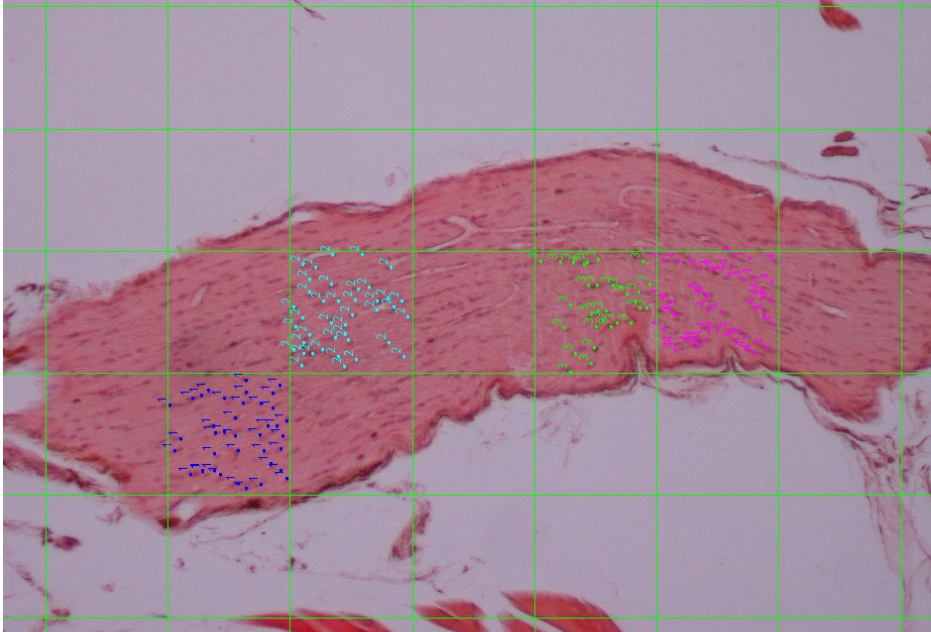


Figura 2.12. Sección longitudinal de NO. 10x. Ejemplo del procedimiento de cuantificación de la población celular. Se analizó a grandes aumentos.

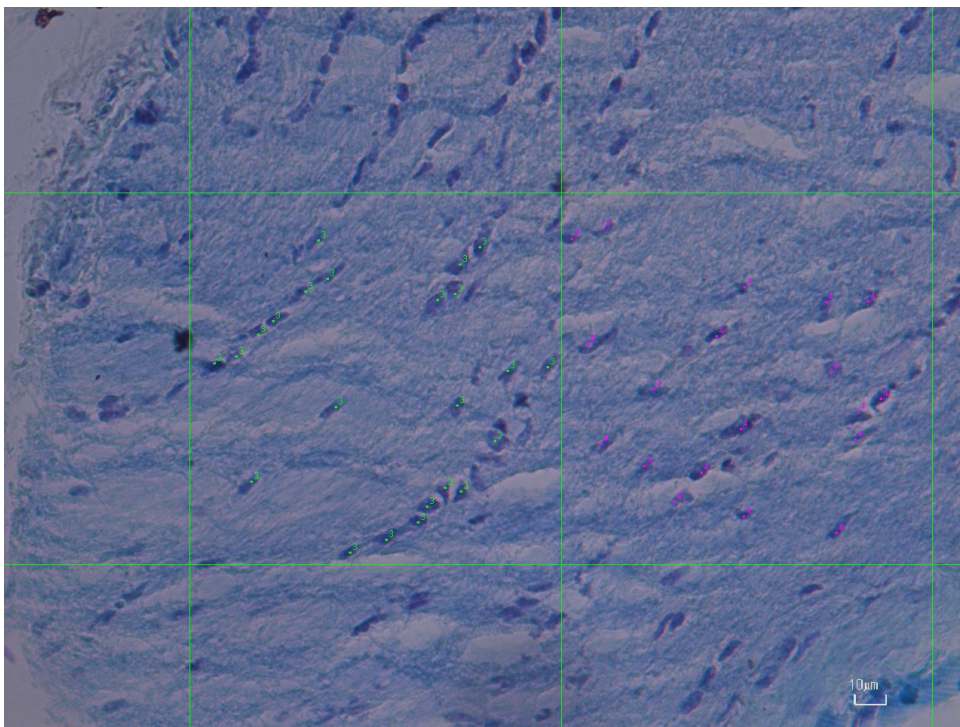


Figura 2.13. Sección longitudinal de NO. 40x. Ejemplo del procedimiento de cuantificación de la población celular.

Las fotografías para microscopia con fluorescencia, se realizaron con el objetivo de 10x, 20x, 40x de áreas representativas del NO y de la retina (la capa de las CGR); con los tres filtros diferentes (azul, para la señal del DAPI; violeta para la señal de Iba, verde, para observar la señal de las hMSC. Todas ellas se capturaron sin desplazar la pletina, para obtener el mismo campo microscópico y superponerlos después con Adobe Photoshop®CS.

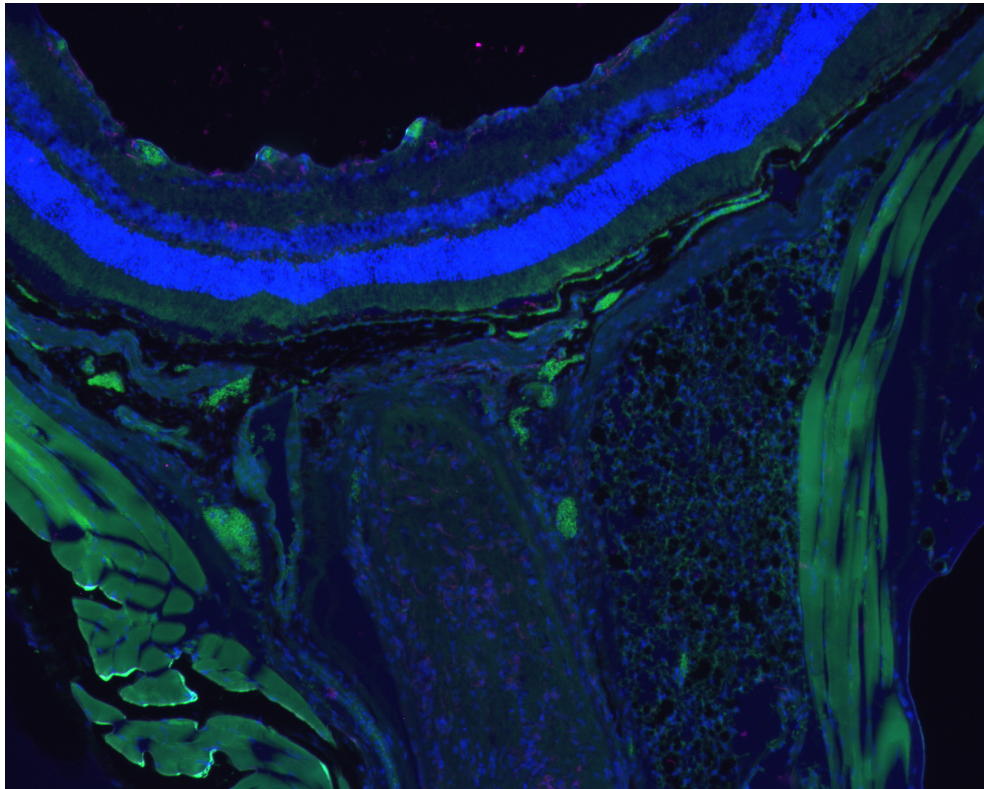


Figura 2.14. Técnica Inmunohistofluorescencia: Imagen de la retina y la cabeza del nervio óptico.

3.7.-MEDICIÓN DEL G-RATIO AXONAL

La mielinización se puede cuantificar midiendo la relación del grosor de la capa de mielina respecto del diámetro del citoplasma axonal o axolema. Este valor, que resulta de dividir el diámetro interno del axón con respecto al diámetro externo (incluyendo la mielina) se denomina razón G (en inglés *G-ratio*).

Para la realización del G-ratio se capturaron fotografías a ME de los tres grupos de estudio, y se procedió a valorar el número de axones por micra², para obtener la densidad de axones en cada grupo. Posteriormente, se estimó el espesor de la vaina de mielina mediante la relación de diámetro de la vaina de mielina/diámetro del axón, en 2 mediciones transversal y longitudinal.

Las medidas se hicieron con un programa de procesamiento de imagen digital Image J diseñado para imágenes científicas multidimensionales.

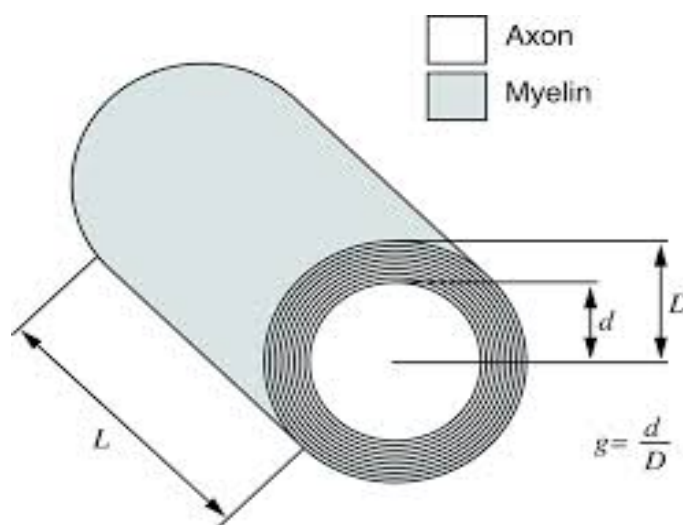


Figura 2.15. Método de estimación del G-ratio.

3.8.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa Stata 9.1 para Windows™ y las diferencias entre grupos analizados se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$. La comparación de células entre más de dos grupos se realizó con el Test de Kruskal-Wallis; y para la comparación específica dos a dos empleamos el Test de Mann-Whitney.

Finalmente para confirmar la significación de los resultados y establecer los intervalos de confianza de las diferencias realizamos ajuste multivariado, empleando modelos lineares generalizados.

RESULTADOS

4.-RESULTADOS

4.1.-OBSERVACIÓN Y VALORACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS EN MODELO EAE.

En este primer apartado, exponemos los resultados de los signos clínicos observados en el modelo EAE que hemos generado. Los animales con EAE de nuestro modelo presentaron la siguiente clínica al inicio: debilidad en la cola, debilidad de las patas traseras, parálisis de las patas traseras, parálisis de las cuatro extremidades, y finalmente la muerte del animal.

Los primeros síntomas clínicos de la EAE aparecieron desde el 7 al 19 día post-inyección, y el curso fue variable con una esperanza de vida media de 57 días (en un rango de 30 a 70 días). Aunque existía un retraso en el inicio de los síntomas (en el grupo experimental vs grupo EAE) no se alcanzaron valores de p estadísticamente significativos ($p < 0,05$), aunque con una tendencia a la significación ($p = 0,07$). Al no haber podido realizar seguimiento completo en todos los animales, se comparó el grado de discapacidad máximo alcanzado para cada grupo. Entonces se vio que los animales del grupo experimental (tratados con hMSCs) puntuaban menos en la escala de discapacidad (puntuación máxima 2,5), mientras que los animales del grupo EAE que alcanzaban una mayor discapacidad (puntuación máxima 3,5).

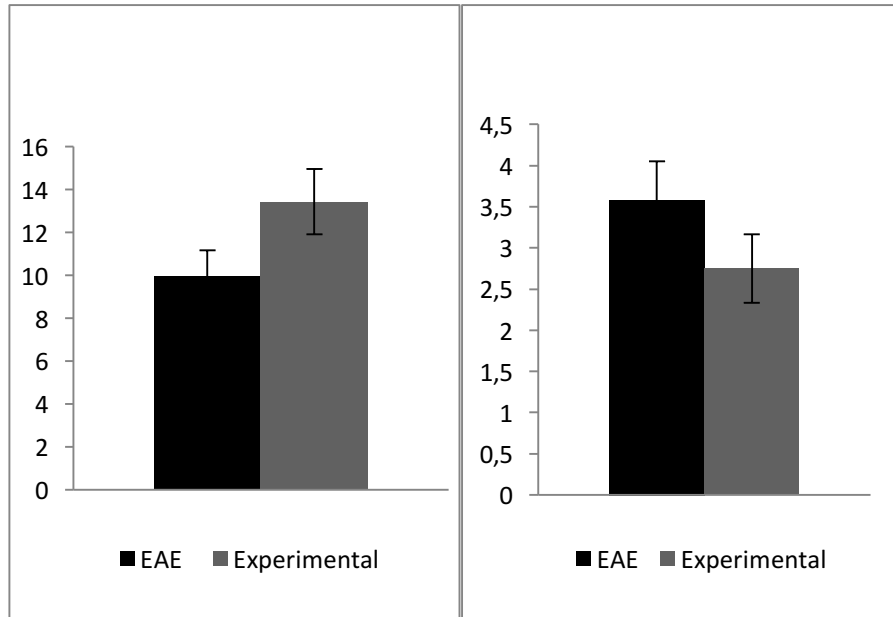


Gráfico 4.1. A) Promedio de días hasta inicio de los síntomas en el grupo EAE y el grupo experimental. B) Promedio del grado de discapacidad en el grupo EAE y el grupo experimental.

Durante el seguimiento clínico, dos de los ratones fallecieron antes de lo esperado: uno tras la inyección de las hMSCs, probablemente por fenómenos embólicos (por agregados celulares) y otro, del grupo EAE, con puntuación de 3, durante la anestesia previa a la realización de resonancia magnética. Estos resultados fueron registrados para el estudio posterior de la lesión medular y de la neuritis, aunque nosotros nos centramos en el estudio del globo ocular y el nervio óptico que era el objetivo de nuestro trabajo.

4.2.- OBJETIVO 1 y 2: ESTUDIO DEL MICROAMBIENTE CELULAR INFLAMATORIO Y DE LA RESPUESTA NEUROPROTECTORA DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS (hMSCs) EN LA RETINA Y EN EL NERVIÓ ÓPTICO.

En los siguientes apartados se exponen los resultados obtenidos del estudio histológico de las secciones de retina y nervio óptico (NO) en los grupos de estudio.

4.2.1. ESTUDIO DE LA RETINA

Inicialmente realizamos un estudio histológico básico con hematoxilina-eosina y/o azul de toluidina. Analizamos secciones semifinas, y realizamos inmunohistoquímica para detectar marcadores de gliosis reactiva (GFAP), inflamación (microglía, Iba1) y remielinización (precursores de oligodendrocitos, NG2). Mediante estudio ultraestructural al microscopio electrónico pudimos apreciar cambios morfológicos más sutiles y alteraciones subcelulares.

Mediante tinciones histológicas en las secciones de la retina de los animales del grupo control, pudimos observar la anatomía e histología normal de la retina, donde se observaban todas las capas de la retina sin alteraciones apreciables. Las capas nuclear interna y externa poseen un grosor de 4-10 capas de células (Figura 4.2.1 A). Morfológicamente y a pocos aumentos, la retina del grupo EAE, no mostró cambios ni se distinguía de la normalidad, presentando el grosor adecuado y las capas correspondientes (Figura 4.2.1 B).

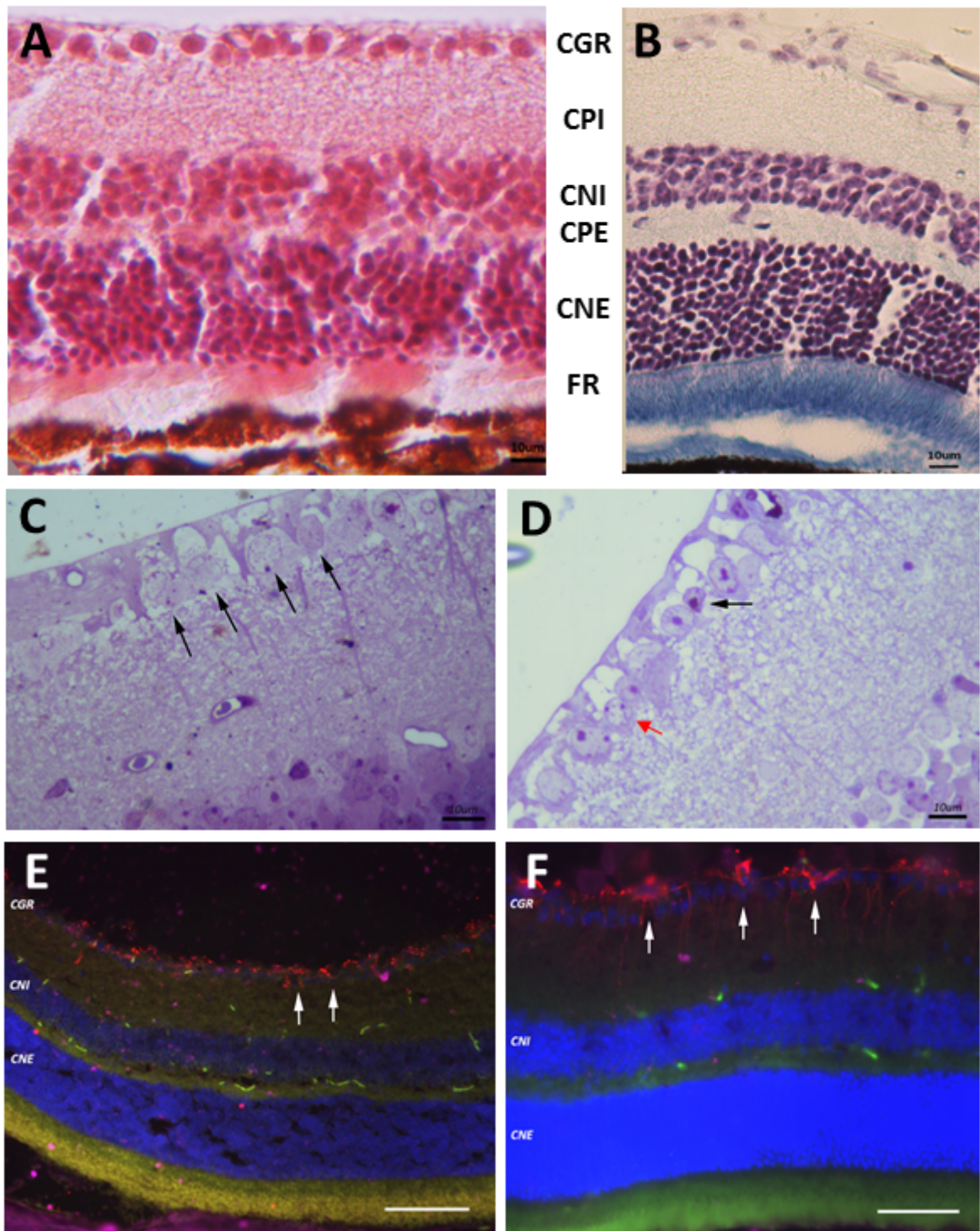


Figura 4.2.1. Estudio comparado de la retina del grupo control y el grupo EAE. **A.** Sección transversal de la retina grupo control. Hematoxilina eosina. Mantiene las capas de la retina sin alteraciones (escala 10 μ m). **B.** Sección transversal de la retina grupo EAE. Azul de toluidina. Mantiene la estructura de las capas retinianas sin alteraciones aparentes. (escala 10 μ m). **C.** Sección semifina de la retina grupo control. Azul de toluidina. Flechas: CGR morfología redondeada y homogénea (escala 10 μ m).

D. Sección semifina de la retina grupo EAE. Azul de toluidina. Flecha negra: CGR con citoplasma oscuro e irregular. Flecha roja: Células gliales (no presentes en el grupo control) (escala 10 μ m).

E-F. Análisis por inmunofluorescencia de las proteínas GFAP, NG2, DAPI. Muestra representativa de la retina. DAPI (azul) tiñe los núcleos celulares, principalmente la CNE (corresponde a los núcleos de los fotorreceptores, conos y bastones), la CNI y la CGR; GFAP (rojo) tiñe los astrocitos y sus expansiones a lo largo de la capa de las CGR, ya que actúan protegiendo y dando soporte a estas CGR; NG2 (malva), los precursores de oligodendrocitos. E. Grupo control. Flechas: escasa expresión de GFAP en las terminaciones de las células de Müller (20x). F. Grupo EAE Flechas: mayor expresión de GFAP en las terminaciones de las células de Müller (20x).

Sin embargo, mediante el estudio de secciones semifinas (1,5 μ m) a mayores aumentos, la capa de las CGR mostraba diferencias sustanciales entre grupos (Figura 4.2.1 C y D). Los núcleos celulares aparecen más pequeños y menos redondeados y observamos alteraciones del nucleoplasma que le confieren una coloración más oscura en el grupo EAE (flecha negra en Figura 4.2.1. D). Además se observan células gliales no presentes en el control (flecha roja en Figura 4.2.1. D). Mediante inmunohistoquímica (Figura 4.2.1. E-F) observamos un aumento de la glía de Müller en la capa de CGR en el grupo EAE que lanzan abundantes expansiones basales hacia el resto de capas. El marcaje de NG2 fue mínimo y no mostró un aumento de celularidad de un grupo respecto al otro, a diferencia de lo que ocurre en la médula espinal.

Procesando las imágenes para microscopía electrónica confirmamos que existía una integridad estructural de las capas de la retina en el grupo control

tal y como habíamos observado en las técnicas histológicas (Figura 4.2.2. A). Al observar a mayores aumentos las CGR (Figura 4.2.2. B-D), presentan un gran núcleo redondeado con un nucleoplasma claro y 1 ó 2 nucléolos bien desarrollados, con una dendrita única dirigida hacia la capa plexiforme interna (asterisco en Figura 4.2.2.C). El núcleo en su perímetro suele presentar una pequeña indentación en la zona de donde parte la dendrita (flecha en Figura 4.2.2. C). En la base de la dendrita, junto al núcleo presentan retículo endoplásmico rugoso (RER) rodeando al aparato de Golgi, que se coloca en el eje de la dendrita (Figura 4.2.2. D).

Por el contrario, el grupo inmunizado con EAE, sin tratamiento presentaba aparentemente una estructura en capas preservada (Figura 4.2.3. A), pero la capa de CGR mostraba regiones pobres en células, CGR de aspecto alterado, y células de microglía, que de normal no se observaban en esta capa (Figura 4.2.3. A, recuadro). A mayores aumentos, las CGR mostraban morfologías muy alteradas (Figura 4.2.3. B-D) con pérdida de la morfología redondeada, aumento de las invaginaciones nucleares y de su profundidad (flechas en Figura 4.2.3. B-C), y las células de microglía (Figura 4.2.3. D) eran un hallazgo frecuente. Dado que la morfología esférica representa el máximo volumen por área de envoltura nuclear, los núcleos invaginados podrían representar una disminución del volumen o que el aumento del área de la

envoltura nuclear había aumentado. El espacio perinuclear parecía aumentado en estas células, comparadas con las del grupo control.

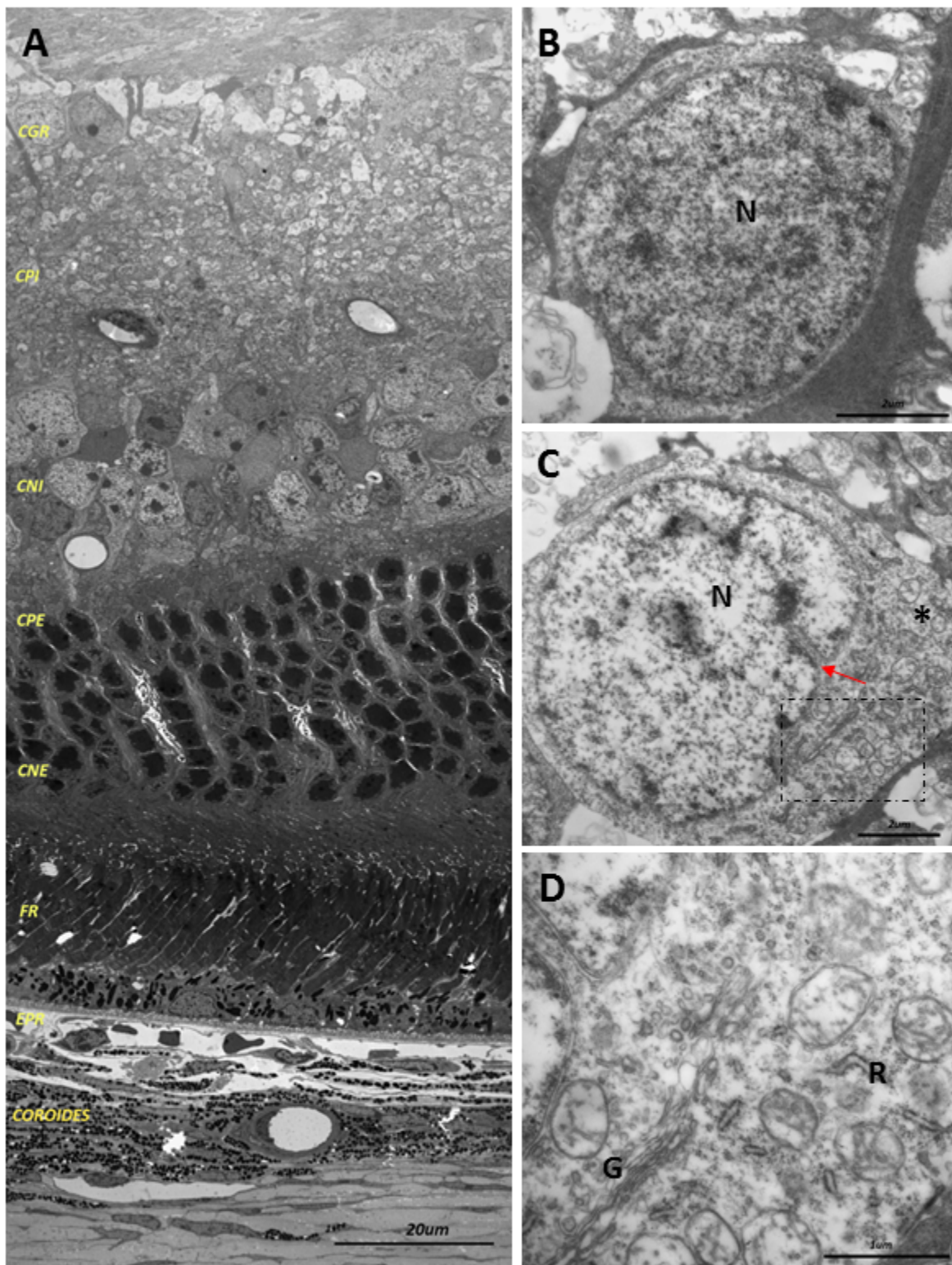


Figura 4.2.2. Imagen ME de la retina grupo control. **A.** Imagen panorámica de la retina, describe la estructura de la retina en capas. EPR:epitelio pigmentario de la retina. FR:fotorreceptores, CNE:capa nuclear externa, CPE:capa plexiforme externa, CNI:capa nuclear interna, CPI:capa plexiforme interna, CGR:células ganglionares de la retina (escala 20 μ m). **B.** GCR normal. N:núcleo (escala 2 μ m).**C.**GCR normal. N:núcleo. Flecha roja: invaginaciones nucleares (escala 2 μ m). **D.** Espacio perinuclear. R:retículo endoplásmico. G:aparato de Golgi (escala 1 μ m).

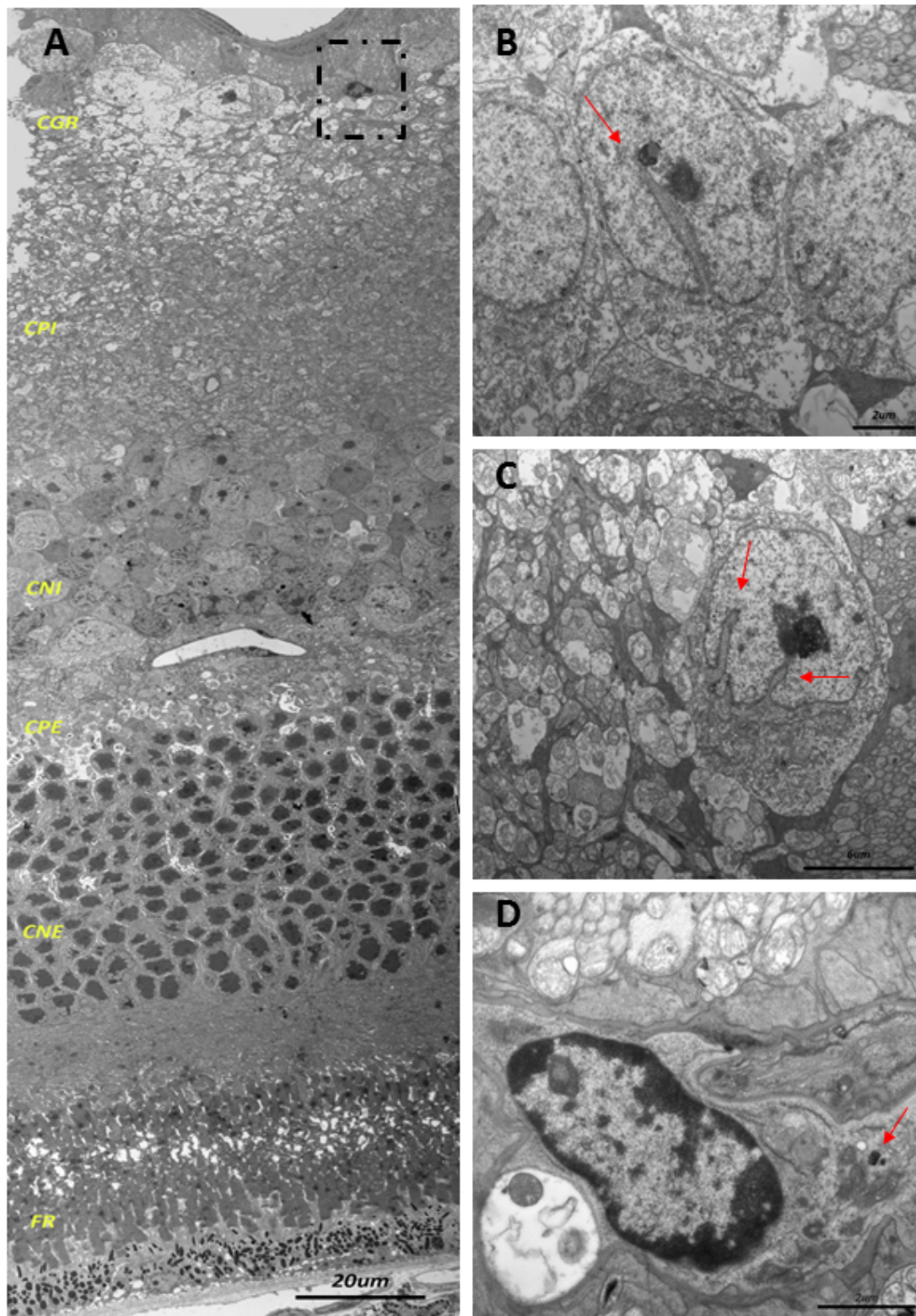


Figura 4.2.3. Imagen ME de la retina grupo EAE. **A.** Imagen panorámica de la retina, describe la estructura de la retina en capas, sin alteraciones apreciable. FR:fotorreceptores, CNE:capa nuclear externa, CPE:capa plexiforme externa, CNI:capa nuclear interna, CPI:capa plexiforme interna, CGR:células ganglionares de la retina. Recuadro:microglia (escala 20µm) **B-C.** GCR alterada. Flechas:invaginaciones nucleares prominentes (escala 2 y 6µm respectivamente). **D.** Microglia. Flecha: lisosoma (escala 2µm).

Ante estos cambios morfológicos tan evidentes quisimos estudiar cuantitativamente el efecto de la inmunización con MOG en la capa de CGR. Realizamos secciones longitudinales que incluían retina y nervio óptico, e hicimos el recuento de CGR por μm sistemáticamente por cada animal del grupo control y del EAE. Confirmando nuestras observaciones, el número de CGR en el grupo control presentaba valores medios de 0.1678 CGR/ μm , mientras que en el grupo EAE, la cantidad de CGR se encontraba disminuida, de forma significativa a valores de 0.0967 CGR/ μm ($p=0.0035$) (Gráfico 4.2.1.). Es decir, podíamos concluir que la inmunización con MOG producía una disminución en el número de CGR.

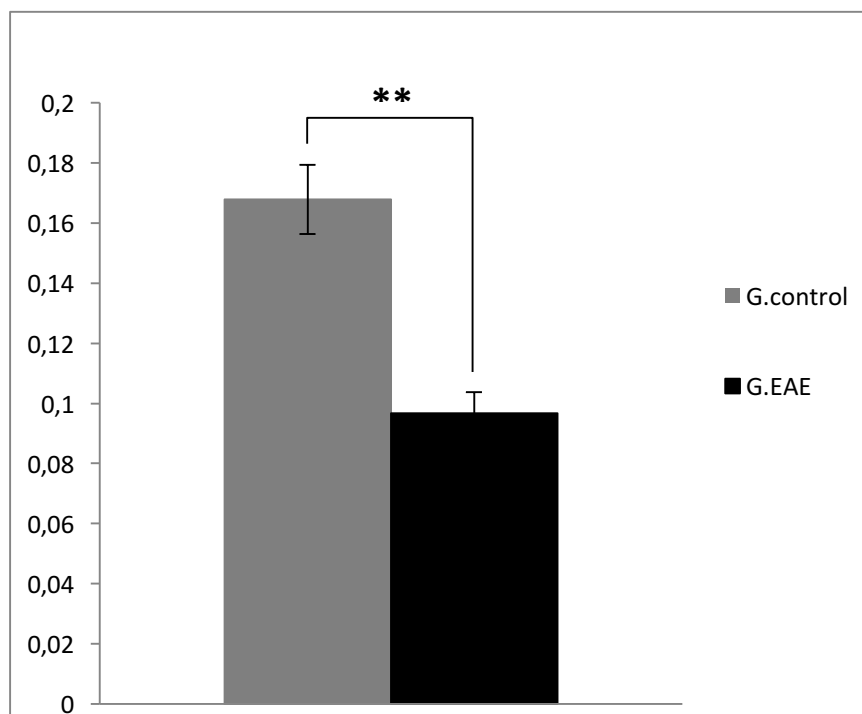


Gráfico 4.2.1. Promedio de CGR/ μm .

Efecto sobre la retina de hMSC-NogoR^{DN} del modelo EAE

La retina del grupo experimental, tratado con hMSCs, presentaba una estructura en capas sin alteraciones a pequeños aumentos (Figura 4.2.4. A). La inmunofluorescencia no mostraba gliosis (GFAP) ni aumento del número de células NG2+ (Figura 4.2.4. B). La imagen semifina mostraba una capa de CGR conservada con células de morfología redondeada sin aparentes alteraciones nucleares o aumento de células gliales (Figura 4.2.4. C).

La microscopía electrónica mostró una distribución en capas normal (Figura 4.2.5. A) y, pese a que la imagen semifina no había mostrado una afectación grave de la estructura de la capa de CGR, sí que observamos células con pérdida de esfericidad en los núcleos y grandes invaginaciones nucleares sinónimo de afectación celular (Figura 4.2.5. B).

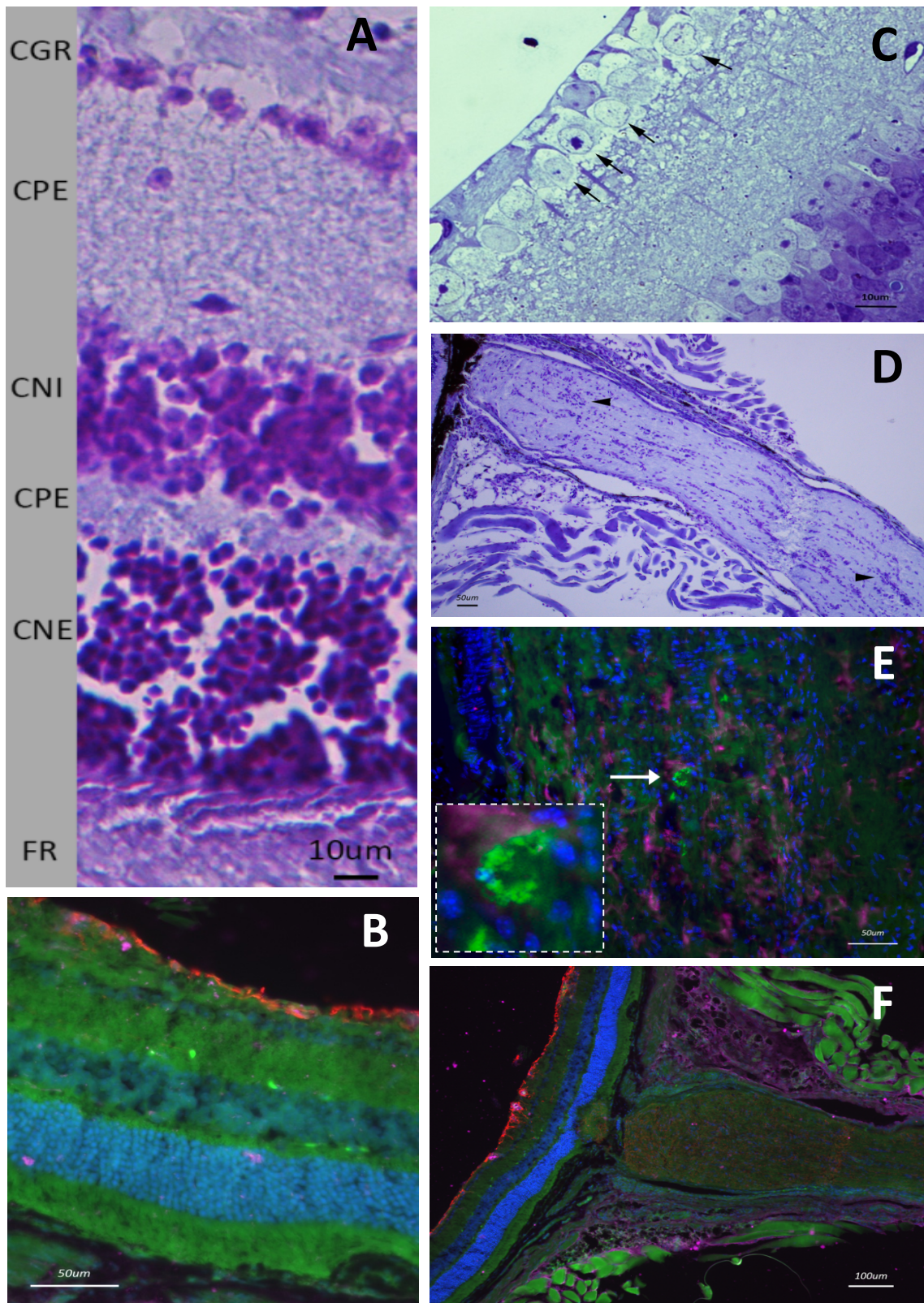


Figura 4.2.4. Estudio grupo experimental. Estudio retina y NO. A. Sección transversal de la retina. Hematoxilina eosina (escala 10µm). C. Corte semifino de la capa de CGR. Flechas: CGR. Azul de toluidina (escala 10µm). D. Sección longitudinal del nervio óptico. Puntas de flecha: zonas con mínimo incremento de la celularidad. Azul de toluidina (escala 50µm). E. Inmunofluorescencia verde de hMSC (flecha). Recuadro: hMSC a mayor aumento (escala 50µm) B y F. Analisis por inmunofluorescencia de la expresión de GFAP, NG2, DAPI. La inmunofluorescencia no mostraba gliosis (GFAP) ni aumento del número de células NG2+ (escala 50 y 100µm respectivamente).

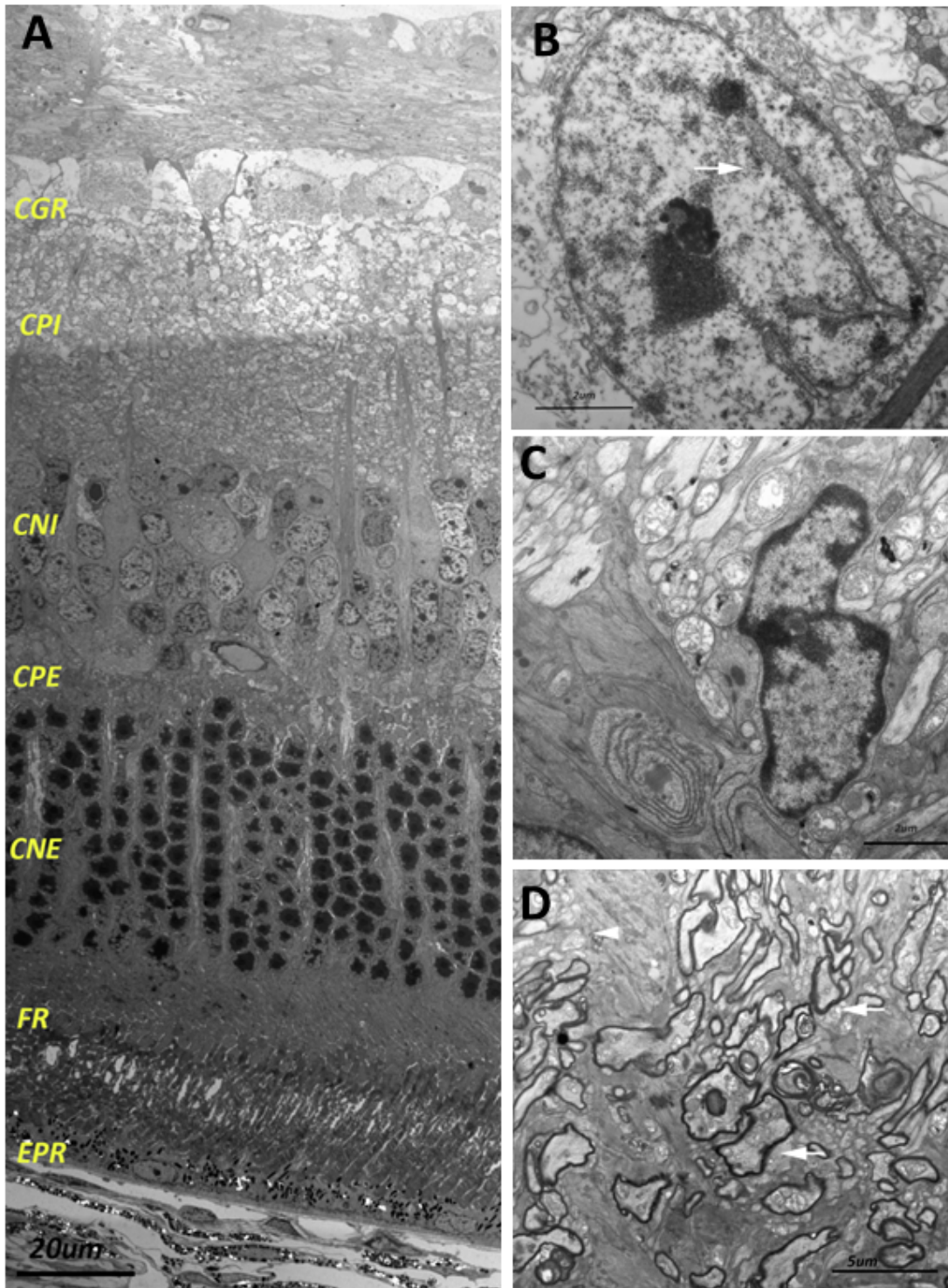


Figura 4.2.5. Imagen ME de la retina y nervio óptico del grupo experimental. **A.** Imagen panorámica de la retina, describe la estructura de la retina en capas, sin alteraciones apreciables. EPR:epitelio pigmentario de la retina, FR:fotorreceptores, CNE:capa nuclear externa, CPE:capa plexiforme externa, CNI:capa nuclear interna, CPI:capa plexiforme interna, CGR:células ganglionares de la retina (escala 20µm) **B.** GCR alterada. Flecha:invaginación nuclear prominente (escala 2µm).**C.** Microglía (escala 2µm). **D.** Sección transversal del nervio óptico, se observa axones irregulares, flechas axones remielinizados, punta de flecha: axones amielínicos (escala 5µm)

Para analizar si el tratamiento con hMSC-NogoR^{DN} influía cuantitativamente en el número de CGR, obtuvimos la media de CGR por micra en el grupo experimental y lo comparamos con las medias anteriores. Comparamos este resultado en función del grupo con el test de Kruskal-Wallis, las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,0427$), pero cuando realizamos una comparación específica de las diferencias entre la media de CGR por micra de los sujetos del grupo experimental respecto al grupo EAE empleamos el test de Mann-Whitney, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p=0,7122$). El gráfico de cajas mostraba que la CGR media es ligeramente inferior en el grupo de EAE respecto al grupo de tratamiento experimental, pese a no obtenerse significación estadística (Gráfico 4.2.2.).

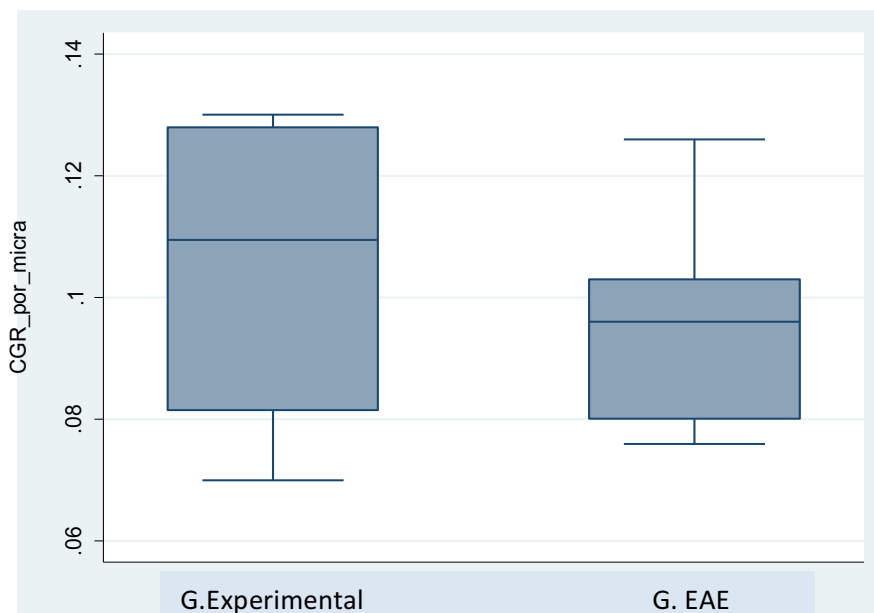


Gráfico 4.2.2. Comparación CGR/ μm entre grupo experimental vs grupo EAE.

Para confirmar los resultados empleamos modelos lineales generalizados de efectos mixtos con ajuste restringido por máxima verosimilitud. El objetivo de este análisis complementario era valorar las diferencias entre grupo asignado teniendo en cuenta tanto la variabilidad entre individuos como la variabilidad intraindividual en los resultados de las muestras (es decir, la variabilidad en los resultados de las muestras extraídas en un mismo individuo). El modelo fue globalmente significativo ($p=0,0027$).

Una vez realizado el ajuste por los parámetros incluidos en el modelo, tomando como referencia a los sujetos control, se observa que las muestras de los sujetos del grupo experimental presentan 0,06 CGR por micra menos (IC95%: 0,02-0,10) que las muestras de los controles sanos, sin diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,161$). En el caso de las muestras en el grupo EAE, la diferencia ajustada respecto al grupo control es de 0,07 CGR por micra (IC95%: 0,00-0,11) lo que supone una diferencia estadísticamente significativa respecto a éstos ($p=0,039$). Considerando como categoría de referencia a los sujetos con EAE tras ajustar por los parámetros incluidos en el modelo, se observa que las muestras de los sujetos en el grupo experimental presentan 0,01 CGR más por micra (IC95%: -0,04-0,07) respecto a las muestras de los sujetos con EAE; esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,552$). Estos datos confirmaban los resultados previos.

4.2.2. ESTUDIO DEL NERVIÓ ÓPTICO

Como habíamos realizado en el apartado anterior con la retina, comenzamos el estudio mediante el análisis histológico del nervio óptico (NO) en el grupo control y en el modelo animal. En la figura 4.2.6 A, C, E se aprecia la salida del NO del globo ocular en el grupo control que confluye en forma de “V”, a la vez que atraviesa la esclera, el cual mantiene su morfología de axones organizados longitudinalmente en haces. Es esa porción del NO, la intraorbitaria, donde estos haces comienzan a mielinizarse. También podemos apreciar las estructuras macroscópicas que dan envoltura al NO (duramadre, aracnoides, piamadre).

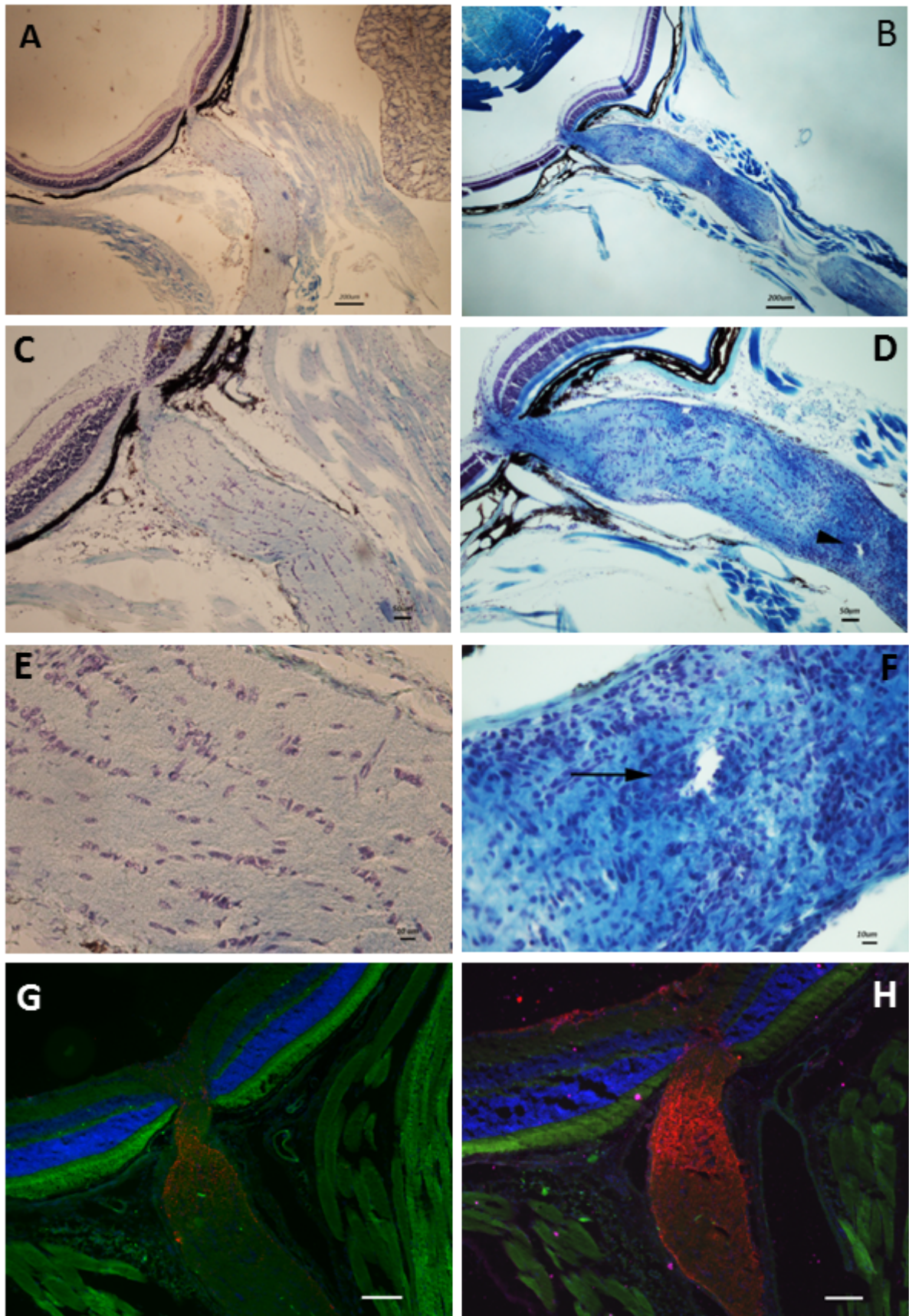


Figura 4.2.6. Estudio comparado del NO grupo control y grupo EAE. Sección longitudinal del nervio óptico. A. Grupo control. Vista panorámica nervio óptico normal. Azul de toluidina. Se aprecia la salida de la CNR confluyendo en el NO, el cual mantiene su

morfología de axones organizados longitudinalmente (escala 200µm). B. Grupo EAE. Vista panorámica nervio óptico enfermo, se observan zonas de estrechamiento. (escala 200µm). C. Grupo control. Azul de toluidina (escala 50µm). D. Grupo EAE. Azul de toluidina (escala 50µm). Punta de flecha: zona dañada del nervio óptico, con disminución del grosor y aumento del componente celular a ese nivel. E. Grupo control a mayor aumento. Azul de toluidina (escala 10µm). F Grupo EAE. Azul de toluidina. Aumento de la celularidad localizada a lo largo del nervio, flecha: zona con incremento de la celularidad (escala 10µm). G-J. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de las proteínas GFAP, NG2, DAPI. Muestra representativa del NO (10x). G. Imagen grupo control. Autofluorescencia roja, GFAP, muy escasa. J. Imagen grupo EAE. aumento de autofluorescencia GFAP en el NO retrobulbar, por activación de la macroglía, como consecuencia del proceso inflamatorio a ese nivel.

En el caso del grupo EAE la afectación del NO era muy evidente incluso a pequeños aumentos (Figura 4.2.6 B, D, F). La estructura del NO en cortes longitudinales mostraba una tortuosidad no observada en el grupo control, y que era debida al estrechamiento del nervio en zonas bien delimitadas. También era muy evidente el aumento de células de forma “parcheada”, detectable en la tinción de azul de toluidina como núcleos azul intenso/morado. En algunas regiones, más deterioradas, se observaban infiltrados celulares que podían corresponder a regiones perivasculares (flecha en Figura 4.2.6. F). Mediante inmunohistoquímica con GFAP (Figura 4.2.6. G-H) se observaba en el grupo EAE una disrupción del marcaje sobre todo en la entrada a la esclera con aumento de la gliosis formando agrupaciones de células GFAP+.

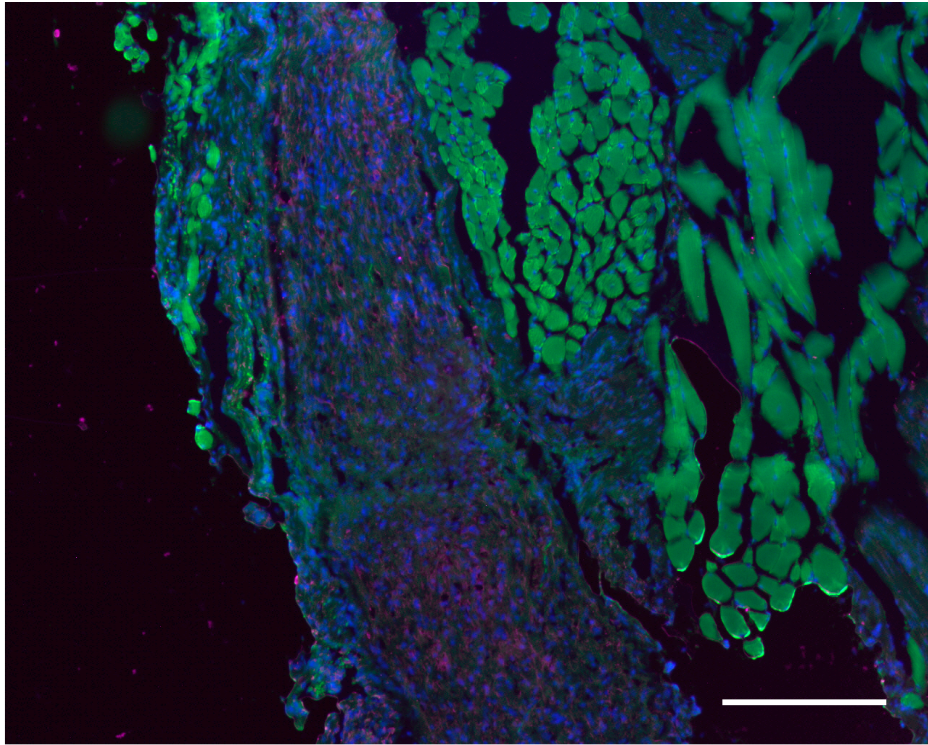


Figura 4.2.7. Análisis por inmunofluorescencia de las proteínas Iba1, DAPI. Muestra representativa de sección del nervio óptico del grupo experimental (20x). DAPI azul tiñe los núcleos celulares. Iba1 malva tiñe la microglia.

Mediante el uso de anticuerpos contra la proteína Iba-1 se detectó la microglía, el macrófago del SNC, presente en las regiones con inflamación activa (Figura 4.2.7.).

Cuando procedemos al estudio ultraestructural del NO comparado entre el grupo control y el grupo EAE, en la figura 4.2.8.A observamos como en el grupo control los axones del nervio óptico mantienen una mielinización homogénea, una forma regular y una disposición ordenada, por el contrario, el grupo EAE presenta mielinización irregular de los axones (flecha amarilla figura 4.2.8.B) y abundantes estructuras vacuolizadas (flecha roja figura 4.2.8.B).

Además las expansiones de los astrocitos, rellenan los espacios existentes por la falta de mielina con sus cuerpos celulares y expansiones (figura 4.2.8.C). En la figura 4.2.8.D se puede observar un astrocito gigante, de núcleo irregular. Estos astrocitos vienen caracterizados por un alto número de filamentos intermedios (figura 4.2.8.E).

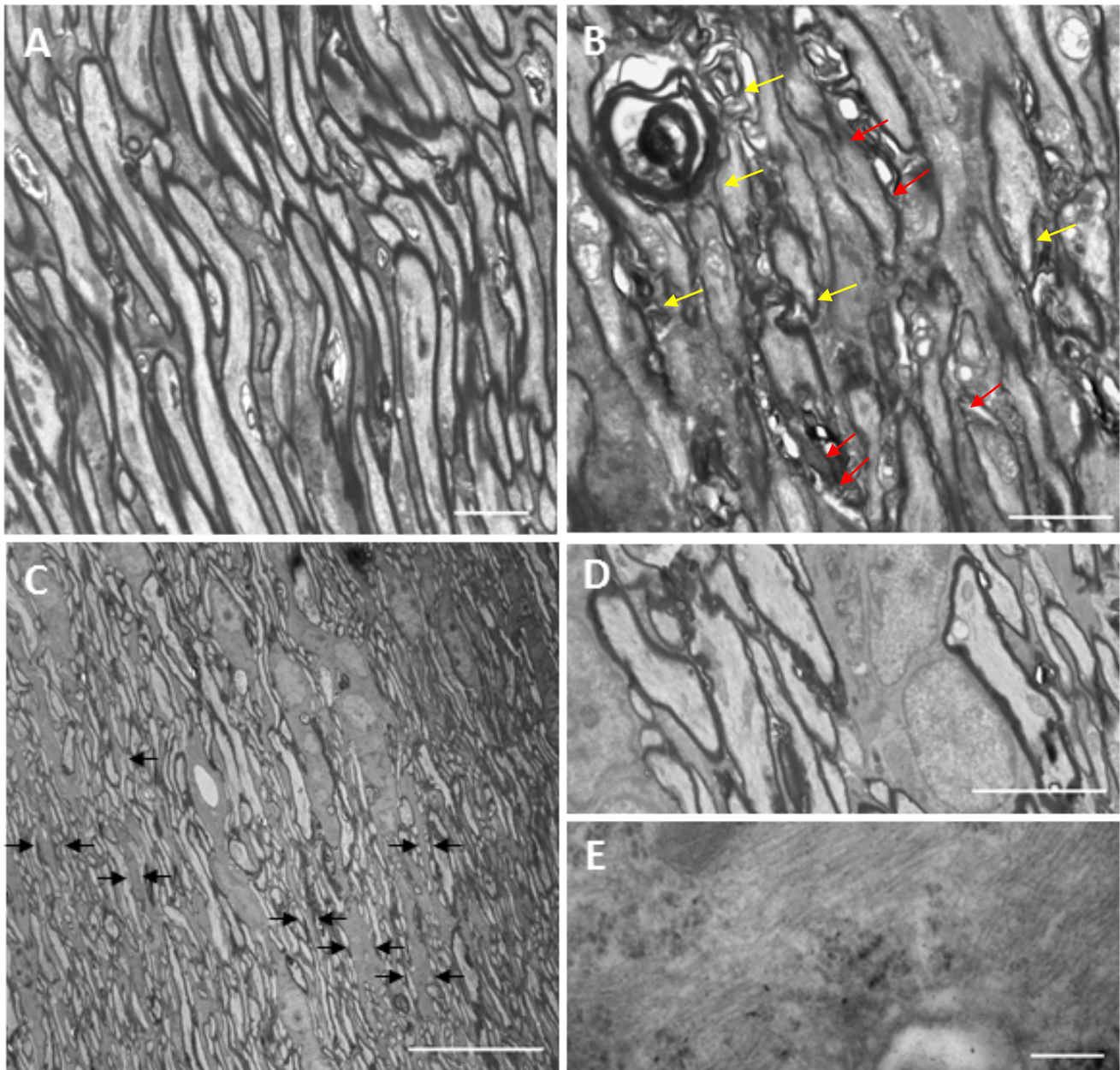


Figura 4.2.8. Comparación ultraestructural del nervio óptico del grupo control y grupo EAE.

A. Grupo control. Se observa la disposición ordenada de los axones del nervio óptico, de morfología regular y mielinización homogénea (escala $2\mu\text{m}$). **B.** Grupo EAE. Los axones tienen una mielinización irregular (flecha amarilla) y estructuras vacuolizadas (flecha roja) (escala $2\mu\text{m}$). **C.** Grupo EAE. Se observa a lo largo de los axones mielínicos citoplasma de astrocitos, flechas: expansiones astrocitarias entre los axones (escala $20\mu\text{m}$). **D.** Grupo EAE. Se observa un astrocito de gran tamaño entre los haces de mielina (escala $2\mu\text{m}$). **E.** Grupo EAE. Abundantes filamentos intermedios (escala 200nm).

Para el estudio cuantitativo de estos hallazgos, obtuvimos 39 muestras de secciones transversales del NO de los grupos de estudio y realizamos el recuento de los núcleos celulares por unidad de superficie.

En el grupo control, el número de células a nivel del NO, mostró unos valores medios de 1,86 células/ μm^2 . En el grupo EAE, donde ya habíamos observado mediante tinciones histológicas un aumento aparente de células, mostró, confirmando nuestros datos unos valores medios de 7,99 células/ μm^2 . Al realizar la comparación de medias mediante análisis estadístico, se demostró la significación estadística ($p=0.00022$).

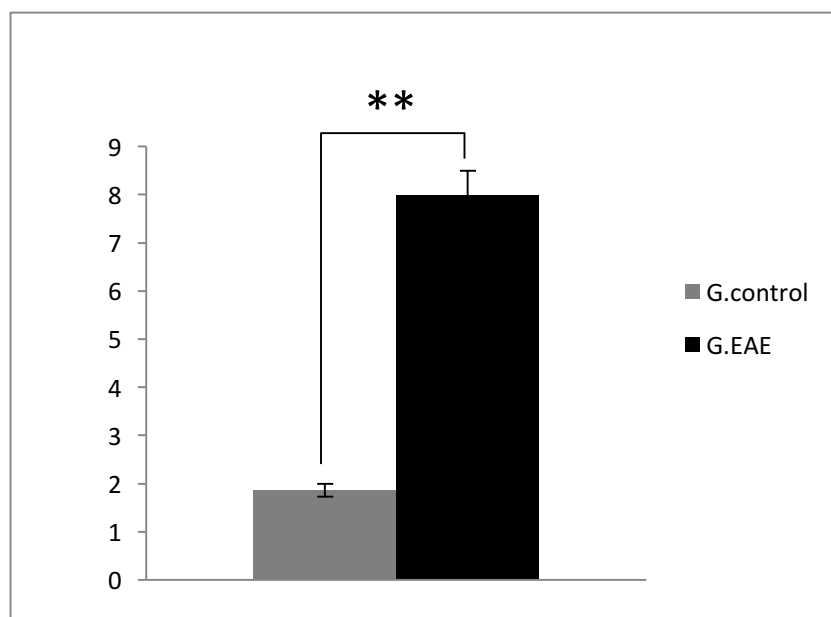


Gráfico 4.2.3. Promedio de la celularidad en secciones del nervio óptico.

Efecto sobre el nervio óptico de hMSC-NogoR^{DN} en el modelo de EAE

El nervio óptico de los animales EAE tratados con células (grupo experimental) mostró en muestras histológicas teñidas con azul de toluidina, en apariencia, una celularidad intermedia entre grupo control y EAE, con pequeñas regiones de aumento de células (flechas en Figura 4.2.4.D) inmersas en un NO con una estructura similar a la del grupo control. El aspecto no era tortuoso, sino de grosor bastante homogéneo en toda su longitud. La inmunohistoquímica mostraba un infiltrado de microglía presente (Figura 4.2.4.E), pero menor afectación glial que en el modelo EAE (Figura 4.2.4.F). Muy ocasionalmente se detectaron células GFP+, que se correspondían con las células hMSC-NogoR^{DN}, que habían sido co-transfectadas con un plásmido GFP para permitir su inmunodetección. Eran células grandes con múltiples vacuolas en el interior del citoplasma, y se encontraron en el interior del NO (Figura 4.2.4.E).

Al cuantificar las células por unidad de superficie mediante el mismo sistema, el grupo experimental mostró un promedio de 4,3 células/ μm^2 , que se encontraba en el punto medio entre los valores del control (1,86 células/ μm^2) y del grupo EAE (7,99 células/ μm^2). Comparamos este resultado en función del grupo con el test de Kruskal-Wallis, las diferencias entre grupos fueron estadísticamente significativas para Kruskal-Wallis, $p=0,0048$. Posteriormente, comparamos específicamente las diferencias entre las celularidades medias de

los sujetos en el grupo experimental respecto al grupo EAE mediante Mann-Whitney, siendo estas estadísticamente significativas ($p=0,0143$). Es decir, el tratamiento con hMSC produjo una disminución del componente celular (probablemente inflamatorio) en el NO. En un gráfico de cajas se representan las diferencias entre el grupo experimental y EAE y se observa una celularidad media más baja y con una menor variabilidad (rango intercuartílico) en el grupo experimental respecto al grupo de EAE (Gráfico 4.2.4.).

Para confirmar los resultados empleamos modelos lineares generalizados de efectos mixtos con ajuste restringido por máxima verosimilitud, donde el resultado del modelo fue globalmente significativo ($p<0,0001$). Una vez realizado el ajuste por los parámetros incluidos en el modelo, se observó que las muestras de los sujetos del grupo experimental presentaban 2,44 células más por μm^2 (IC95%: 0,39-4,60) que las muestras del grupo control, con diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,020$). En el caso de las muestras del grupo EAE, la diferencia ajustada respecto al grupo control fue de 6.13 células/ μm^2 (IC95%: 3,59-7,99) lo que suponía asimismo una diferencia estadísticamente significativa respecto a éstos ($p<0,001$).

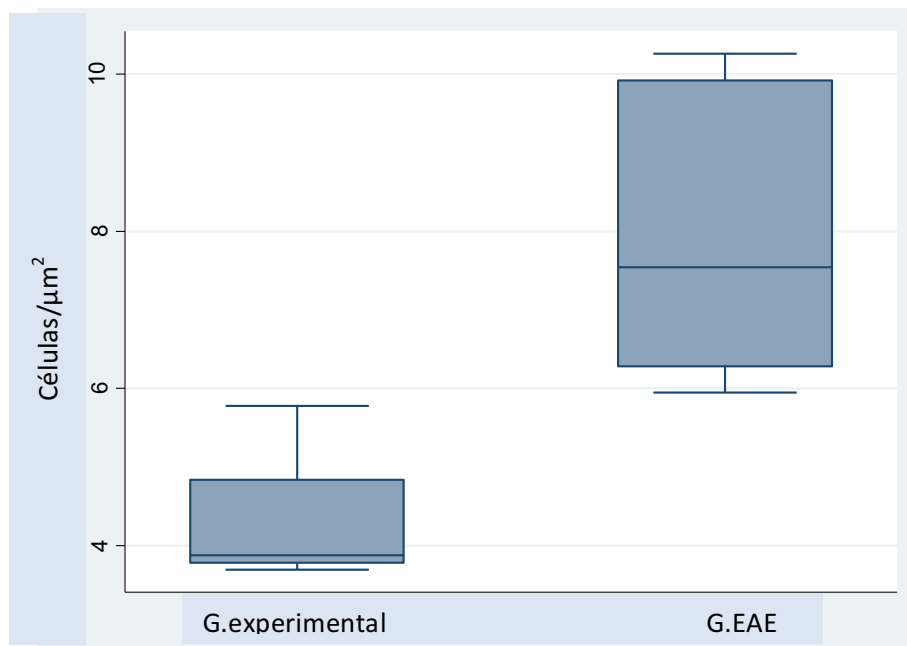


Gráfico 4.2.4. Comparación células/ μm^2 grupo experimental vs grupo EAE.

Utilizando como categoría de referencia a los sujetos con EAE se observó que las muestras de los sujetos en el grupo experimental presentaban 3,69 células menos por μm^2 (IC95%: 1,10-5,09) respecto a las muestras de los sujetos con EAE; esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,002$).

4.2.3. MIELINIZACIÓN Y DAÑO AXONAL

Aunque se estudió la mielinización y el daño axonal en el nervio óptico, hemos expresado este resultado aparte por tratarse del estudio específico de la mielinización. Estudiamos dos indicadores:

1. Densidad axonal
2. Grado de mielinización por axón

En la figura 4.2.9. se pueden observar micrografías de microscopía electrónica que muestran cortes transversales del nervio óptico de los diversos grupos a estudio (A (control); B (EAE)) y C (experimental). Observando las imágenes es evidente que existe una clara disrupción de la mielina en el grupo EAE, donde se muestran imágenes de esferoides, separación de las capas, alteración del contenido axonal. El grupo experimental, parece mostrar axones con capas finas de mielina, que pueden traducir un fenómeno de remielinización tras daño.

Para cuantificar el daño axonal y la alteración de la mielinización estudiamos los indicadores citados en los tres grupos:

1. La densidad axonal

La densidad axonal traduce la pérdida de axones que puede asociarse al daño producido por la inmunización con MOG. Se contabilizó como el número de

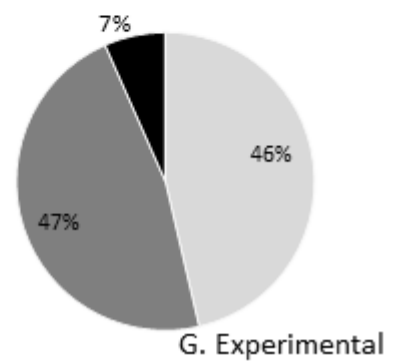
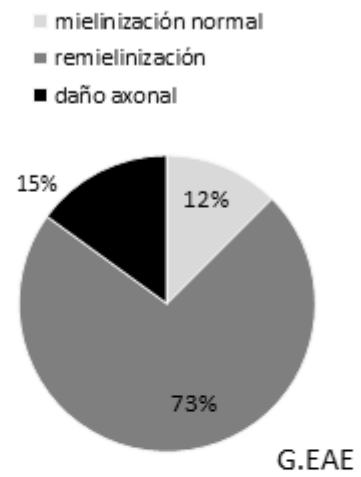
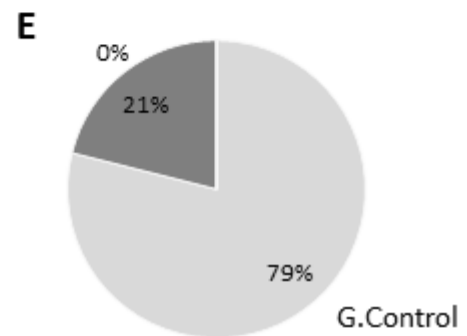
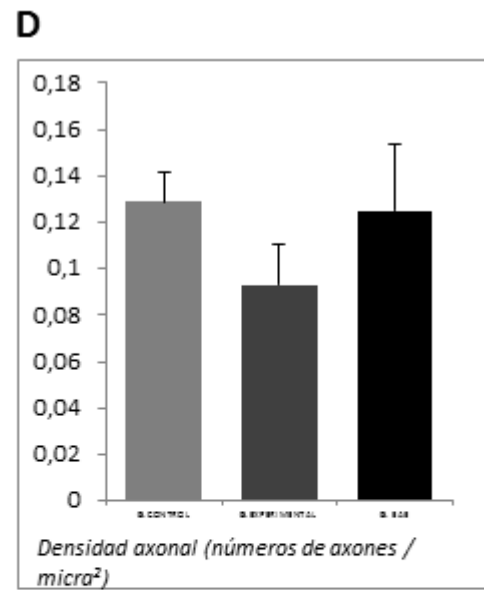
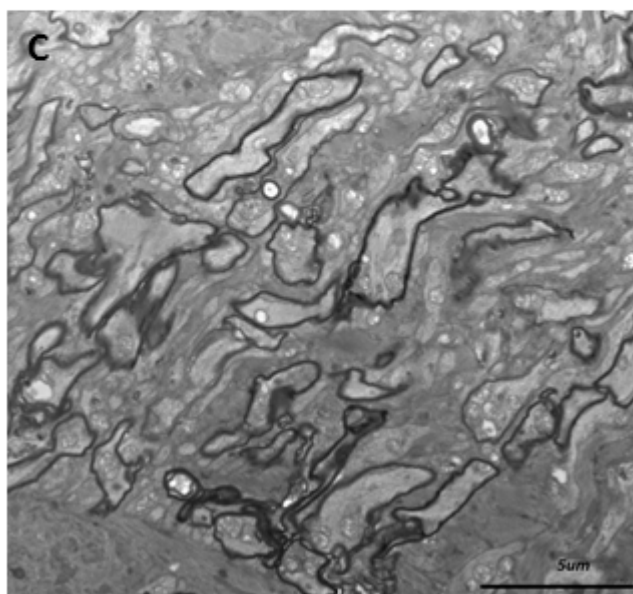
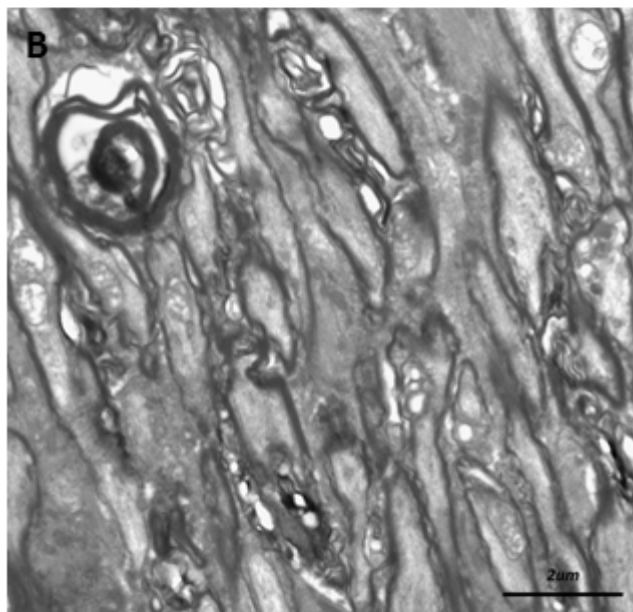
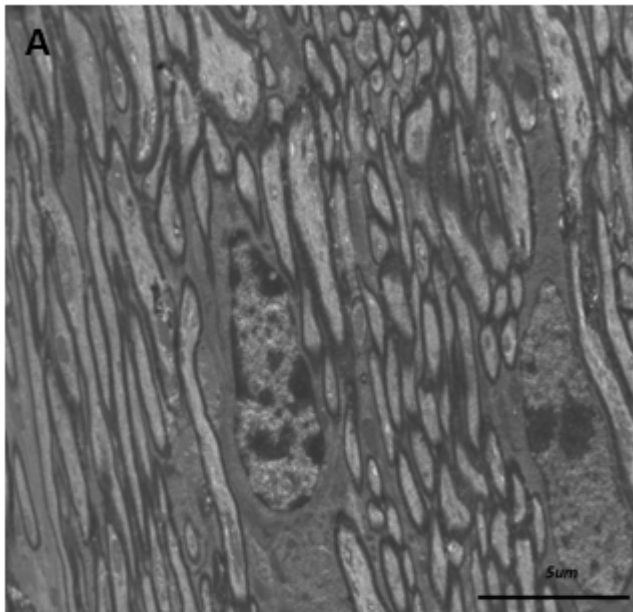
axones por μm^2 . En la figura 4.2.9 D. se reflejan los resultados de estos recuentos. Se utilizó el grupo control como valor de referencia. La densidad axonal fue similar en los tres grupos a estudio, con rangos en grupo control de 0.11-0.16 axones/ μm^2 , grupo experimental 0.05-0.013 axones/ μm^2 y en el grupo EAE entre 0.08-0.16 axones/ μm^2 . La diferencia de densidad de axones no fue estadísticamente significativa en ninguno de los casos.

2. Grado de mielinización

La mielinización se puede cuantificar midiendo la relación del grosor de la capa de mielina respecto del diámetro del citoplasma axonal o axolema. Este valor, que resulta de dividir el diámetro interno del axón con respecto al diámetro externo (incluyendo la mielina) se denomina razón G (en inglés *G-ratio*). Hemos realizado el estudio de >100 axones por grupo y hemos representado en gráficos circulares los axones con G-ratio normal (G-ratio 0,74-0,84), axones remielinizando (G-ratio 0,85-0,94) y/o axones con daño mielínico (G-ratio 0,95-1) (Figura 4.2.9 E). En el grupo control predominaba el porcentaje de axones con mielinización normal (79%), con un porcentaje de 21% de axones con G-ratio de remielinización, y evidentemente, no encontramos daño axonal (0%). Por el contrario, en el grupo EAE, predominaba el porcentaje de axones que con daño axonal (15%) y axones remielinizando (73%), siendo de un 88%, si consideramos los axones que han sufrido daño globalmente (G-ratio

superiores a 0.84). El grupo experimental presentaba porcentajes intermedios, con un porcentaje de axones con mielinización normal del 46%, frente al 7% de axones con daño axonal. Destacar un porcentaje de axones en estado de remielinización del 47%, con lo que el daño axonal global se reduciría al 54%.

Figura 4.2.9. Estudio daño axonal mediante G-ratio. Las imágenes corresponden a cortes transversal del nervio óptico a ME .A. grupo control. B. grupo EAE. C. grupo experimental. D. Gráfico de barras: estudio de la densidad axonal (números de axones por μm^2). E. gráficos circulares. Exponemos el resultado del G-ratio, considerando los siguientes valores de referencia: Axones con mielinización normal (G-ratio 0,74-0,84), axones remielinizando (G-ratio 0,85-0,94), axones con daño mielínico (G-ratio 0,95-1).



DISCUSIÓN

5.-DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral hemos estudiado los cambios que ocurren en la retina y nervio óptico (NO) tras inmunización con la proteína de la mielina (MOG) en ratón, y hemos analizado el efecto de la infusión endovenosa de células mesenquimales transfectadas con un gen específico (MSC-NogoR^{DN}) para favorecer la regeneración axonal. Hemos concluido que el modelo animal presenta una alteración significativa de la capa de células ganglionares de la retina (CGR) morfológica y cuantitativa. Además, el NO se vio intensamente afectado con una gliosis reactiva y un aumento del daño axonal. Al tratar a los animales con MSC-NogoR^{DN} se observó un menor deterioro tanto en retina como en NO, pese a una baja tasa de injerto de MSC. A continuación discutiremos uno a uno los resultados obtenidos.

5.1.-Idoneidad del modelo animal de EAE para el estudio de alteraciones desmielinizantes en retina y NO.

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral era estudiar el microambiente inflamatorio presente en el modelo EAE que habíamos generado. No hay duda de que los estudios realizados en el modelo EAE han sido y siguen siendo vitales para conocer y comprender conceptos generales y específicos de los mecanismos de autoinmunidad que tienen lugar en la EM. A pesar de que no existe ningún modelo EAE hasta la fecha capaz de mimetizar todas las

características inmunopatológicas de la enfermedad humana, es una buena alternativa para el estudio de aspectos concretos de la enfermedad. Debemos tener presente que el modelo que usa la proteína MOG para generar EAE tiene un inicio más tardío de la apoptosis de las CGR, en comparación con otros modelos de ratones EAE^{158,159}. Esto sugiere que distintos antígenos en la inmunización inducen diferentes respuestas inflamatorias o que diferentes cepas de ratón tienen niveles de resistencia a la pérdida de CGR variables debido a su distinto fondo genético. Existen estudios que demuestran que la cepa de ratón influye significativamente en el punto de partida de la pérdida de CGR¹⁶⁰, esto también podría afectar a la aparición de la EAE.

En nuestro caso, los ratones B6/C57 tras la inoculación con MOG presentaron un curso crónico progresivo de la lesión medular, tal y como era de esperar según lo publicado⁸⁰. Sin embargo no pudimos hacer un seguimiento clínico de la afectación visual *in vivo*, porque para esto se requieren técnicas más específicas que luego comentaremos.

En los estudios publicados sobre los distintos modelos de daño axonal (isquemia transitoria de la retina¹⁶¹, la elevación de la PIO, axotomía por corte o aplastamiento del NO¹⁶²) la interrupción de los axones de las CGR provocaba una degeneración retrógrada axonal induciendo la muerte de la CGR¹⁶³. La muerte de las CGR era mayor y más rápida cuanto más cerca del

globo ocular se produce el daño. De igual manera, en nuestro modelo, observamos una pérdida significativa de CGR en ratones EAE en comparación con el grupo control. Pese a ello, la estructura y la morfología de la retina permanecieron intactas después de la inmunización EAE. En base a nuestros resultados podríamos pensar que, de igual manera que en los otros modelos, el daño primario ocurre en el NO, y la desaferentización condiciona la degeneración y muerte de las CGR a posteriori. Otra posibilidad a barajar era la de que la muerte de CGR se debiese a un aumento de la respuesta inflamatoria propia de la EAE. De hecho, trabajos en donde existía inflamación ocular grave, el número de CGR fue significativamente menor que el número de CGR en ojos con inflamación leve¹⁶⁴. En el modelo EAE encontramos un aumento de las células de la glía (glía de Müller) en la capa de CGR. Estos hallazgos podrían considerarse una respuesta a la inflamación retiniana¹⁶⁵.

Respecto a la lesión observada en el NO en la EAE, la susceptibilidad del NO al ataque inflamatorio es inherente a la debilidad de la barrera hematoencefálica de los vasos sanguíneos en la región retrobulbar del NO¹⁶⁶, esto es responsable de las lesiones a ese nivel, tanto en EAE y EM. A diferencia de los axones del nervio óptico de los seres humanos y gatos, que están totalmente mielinizados inmediatamente detrás la lámina cribosa, los de los ratones se mielinizan progresivamente a una distancia de 120 a 250 μm por detrás de la

lámina cribosa¹⁶⁷. En el análisis cuantitativo realizado, observamos un aumento en la densidad de infiltración de células de forma significativa en el NO durante la progresión aguda de la EAE. Se confirmó, como se había observado en estudios previos¹⁶⁸ que la severa infiltración celular se concentraba en la región mielinizada del NO. Por el contrario, se detectó un bajo nivel de respuesta inflamatoria en las regiones amielínicas. Además, en las tinciones histológicas se pudieron observar células inflamatorias de la sangre (linfocitos y macrófagos) de forma homogénea, a excepción de pequeñas concentraciones perivasculares. Estos infiltrados ya se habían descrito en la EAE¹⁶⁹.

El resultado del proceso inflamatorio sobre los axones mielínicos del NO fue la afectación de la mielina en el grupo afectado por EAE. Este aspecto ha sido estudiado, aunque existen pocos trabajos al respecto, y en ellos se ha detectado una desmielinización diseminada con múltiples focos de degradación¹⁷⁰.

La activación de la macroglía, juega pues un papel muy relevante en el daño axonal del NO y la apoptosis de la CGR. Esto también se ha descrito en otras enfermedades de la retina, como la degeneración macular asociada a la edad, la retinopatía diabética¹⁷¹ o el glaucoma crónico de ángulo abierto. La vía común en aquellas enfermedades parece ser la expresión de moléculas

neurotóxicas como interleucinas por astrocitos y células de Müller, que conducen mayor activación de la cascada inflamatoria¹⁷². También se observó un aumento de células de microglía, en relación con el evento inflamatorio inmunitario. La activación y migración de la microglía a la zona lesionada ha sido descrita en lesiones neuronales, isquémicas, metabólicas así como retinopatías hereditarias¹⁷³. En el microambiente inflamatorio donde ocurre la lesión neuronal, la microglía se activa y libera sustancias proinflamatorias tales como el TNF- α y las interleucinas. Esta inflamación activa, produciría una disrupción de la barrera hematoencefálica¹⁷⁴, que podía afectar al NO o a la retina como demuestran las uveítis autoinmunes¹⁷⁵. En la degeneración macular asociada a la edad, los macrófagos están presentes durante las fases tempranas de la enfermedad y se pueden asociar directamente con la pérdida de CGR debido a la fagocitosis de los depósitos de células¹⁷⁶.

5.2. Propiedades neuroprotectoras y neuroregeneración tras administración endovenosa de MSC-NogoR^{DN}

Nuestros resultados mostraron una mejoría en los parámetros analizados en NO y retina tras la administración de MSCs transfectadas. En el caso de la retina, disminuyó la pérdida de CGR (aunque fue más una tendencia que no alcanzó significación estadística) y en el NO evitaba la pérdida de mielina en un

34% y reducía el grado de inflamación (en forma de gliosis y celularidad inflamatoria). Las hMSC representan una población de células madre “multipotente” que cuando se administran por vía endovenosa poseen la capacidad de migrar e injertar en lugares donde existe un daño tisular e inflamación¹¹⁹. Estas hMSCs inoculadas en el grupo experimental y tras el procesamiento de la muestra, debían ser detectadas por la presencia de fluorescencia verde. Encontramos, aunque pocas, hMSCs GFP+ injertadas en las zonas inflamadas del NO, lo que confirmaba los trabajos que hablan de un tropismo de estas células al microambiente inflamatorio.

La escasa detección de células GFP+, pese a que se obtuvo mejoría histológica, podía deberse a varias causas, entre ellas: una tasa de injerto muy baja en el SNC por secuestro en otros órganos, o la muerte de la MSC aunque haya injertado con éxito. En cuanto a la tasa de injerto baja, existen estudios que sugieren que el efecto primer paso hepático y/o pulmonar son los obstáculos más importante para el injerto de las MSC administradas por vía intravenosa. Tanto el tamaño celular, la cantidad de receptores de adhesión y/o tipo de célula madre parecen ser variables cruciales para el paso pulmonar de las células madre^{177,178,179}. Según los estudios realizados a este respecto, las hMSCs administradas por vena de la cola en los ratones se acumulan inicialmente, en los pulmones, y poco a poco pasan a hígado, bazo, riñón y

médula ósea en las primeras 48h^{177,178}. Rochefort et al. encontraron una acumulación pulmonar 50-60% de MSCs una hora después de la inyección con la subsiguiente disminución a alrededor de 30% 3h después de la inyección¹⁸⁰. En los seres humanos, inyectaron MSC por vía intravenosa y también mostraron una captación pulmonar alta en 30 min¹⁷⁹.

En cuanto a la muerte de las MSCs, numerosos estudios han demostrado la baja inmunogenicidad de las células madre mesenquimales, que al no expresar MHC-II evitan el reconocimiento por las células dendríticas y los linfocitos T. Sin embargo, pese a que se las ha considerado como células que no producen rechazo, cuando las células son expuestas a un medio inflamatorio caracterizado por la presencia de niveles elevados de interferón- γ ¹⁸¹ comienzan a expresar el HLA-DR (MHC-II), y por tanto, a ser inmunógenas y susceptibles de rechazo.

Sea cual fuere la causa de la llegada de un número pequeño de células al sistema visual, hemos encontrado unos efectos neuroprotectores tras su administración. Este efecto, denominado “by-stander”, se ha descrito en estudios en infarto de miocardio tras infusión de MSC, donde se observó mejoría clínica y funcional, pero no se pudieron identificar células injertadas ejerciendo de miocardiocitos¹⁸². Las MSCs se caracterizan por una capacidad elevada de comunicación paracrina basada en la liberación de vesículas de

pequeño tamaño o exosomas¹⁸³. A los exosomas se ha atribuido el efecto de MSC a distancia. La disminución de la respuesta inflamatoria que hemos observado en nuestro estudio, podría deberse a la liberación de exosomas conteniendo el transgen NogoR^{DN}, además de ejercer la función neurotrófica e inmunomoduladora atribuida a las MSCs. Sin embargo, los mecanismos aún no se entienden completamente. Nuestra hipótesis es que la administración simultánea de un millón de células durante la inmunización, podría “desviar” la respuesta de células T necesaria para la generación de Ac anti-MOG.

Tras la administración de MSCs, se observó además una mejoría en el G-ratio o grado de mielinización axonal del NO. La disminución de la respuesta inflamatoria atribuida a las MSCs, previene el daño sobre los oligodendrocitos maduros que son la principal fuente de mielina. Y probablemente esa sea la causa de la mejoría histológica. Sin embargo, no podemos descartar que exista cierto grado de regeneración mielínica o remielinización, debida a la migración hacia la zona lesionada de precursores de oligodendrocitos (OPCs), células que expresan NG2. A este respecto, en la inmunohistoquímica realizada para detectar células NG2+, no encontramos diferencias entre grupos.

5.3. Papel de Nogo en la inhibición de la regeneración axonal.

Como comentábamos, en nuestro trabajo la inyección de MSC-NogoR^{DN} sí que evidenció un efecto neuroprotector, pero no se consiguió el objetivo que pretendía revertir el daño axonal. Es decir, una vez el animal alcanzaba una puntuación en la escala de discapacidad, nunca se redujo el grado de lesión neuronal, al menos en la afectación medular motora, que era el único factor que pudimos analizar. De hecho los animales fueron deteriorándose progresivamente hasta cumplir criterios de punto final y ser sacrificados, sin excepción.

La utilización del dominante negativo del receptor de Nogo se basó en trabajos recientes, el estudio de la expresión de la proteína Nogo-A y su receptor NgR en muestras anatomopatológicas de lesiones desmielinizantes de EM demostró que la expresión de ambos estaba aumentada: Nogo-A en los oligodendrocitos supervivientes y su receptor en los astrocitos y la microglía¹⁸⁴. Además, en pacientes con EM se han detectado anticuerpos anti-Nogo-A IgM en plasma, así como la síntesis intratecal de anticuerpos IgG contra Nogo-A. Estos últimos fueron hallados más frecuentemente en pacientes jóvenes y en pacientes con formas de EM-RR⁶⁹. Se han descrito modos de bloqueo de Nogo en la literatura que se han mostrado efectivos en la EAE. La inducción activa de anticuerpos contra Nogo A, así como la inmunización pasiva con anticuerpos

neutralizantes IgG anti Nogo-A mejoraron en forma marcada la evolución clínica de la enfermedad y los hallazgos histológicos de las lesiones. Además, se evidenció una disminución significativa en la producción de IFN- γ y un aumento de citocinas anti-inflamatorias como TGF- β e IL-10, lo que indica el cambio de una respuesta patogénica Th1 a una protectora Th2^{96,97}. Sin embargo, en estos estudios no se describe una regeneración axonal. En nuestro caso, el dominante negativo ejercía una acción como antagonista competitivo, ya que Nogo-A al unirse a este receptor, no poseía acción catalítica.

Si se esperaba una recuperación neurológica mediante el efecto sobre la regeneración axonal, ésta no se obtuvo. Las posibles causas que barajamos serían: a) la no expresión en membrana de las células (hecho descartado, ya que previamente se había comprobado en el laboratorio que sí que se expresaba en membrana), b) que se inhibiera la expresión del episoma (plásmido de ADN de acción en citosol) al introducirse en el organismo por degradación por ADNasas del citoplasma, o porque al morir la célula MSC, el episoma se había liberado al espacio extracelular y eliminado.

Si, relacionándolo con estudios previos, lo que se esperaba era una menor afectación, en ese caso, los beneficios atribuibles a las MSCs podrían ser debidos a la acción del plásmido en el microambiente. Esto podría justificar

que no hubiera células, pero sí que hubiera plásmido (vehiculado por exosomas, por ejemplo). Para confirmar este hecho, está en proceso la expresión de NogoR^{DN} en el microambiente inflamatorio.

Por último, es posible que los axones se regeneren, pero las CGR no se pueden recuperar. Sobre aquellas en estadio intermedio, es decir, que hayan sufrido lesión axonal pero aún no se han perdido. A este respecto, la pérdida de CGR tras axotomía se ha intentado revertir mediante el empleo de factores neurotróficos, o utilizando ratones transgénicos con la sobreexpresión de genes antiapoptóticos, pero los resultados respecto a la supervivencia y/o la regeneración de las CGR han sido poco esperanzadores¹⁸⁵. El por qué no regeneran estas CGR es una cuestión a resolver, aunque el hecho de que existan distintos subtipos de CGR¹⁸⁶, podrían suponer que cada subtipo tuviera una susceptibilidad variable ante el mismo tipo de daño o de terapia. En el futuro sería muy interesante identificar marcadores moleculares específicos de las subpoblaciones de CGR para confirmar o no esta hipótesis.

Por último, aunque antes de concluir esta discusión, nos gustaría comentar brevemente las limitaciones de este estudio, que, aunque prometedor, se trata de un estudio piloto. Uno de los problemas a los que nos hemos enfrentado en este proyecto ha sido la imposibilidad del seguimiento *in vivo* de la patología ocular. Por eso consideramos de interés, discutir el estado-

de-arte de esta cuestión. En los últimos años, la tomografía de coherencia óptica (OCT) se ha convertido en un método común para la observación no invasiva y para investigar la morfología de la retina en roedores^{187,188}. Aunque las principales capas de la retina pueden ser identificadas utilizando el OCT, es un proceso complejo, ya que en roedores, la retina es muy fina, y sobre todo porque todos los sistemas disponibles actualmente han sido diseñados para los ojos humanos. Sería de gran utilidad en los estudios de modelos experimentales de lesión visual, poseer de esta tecnología adecuada al ratón, ya que es fácil de realizar, rápida e incruenta. Permitiendo obtener imágenes de la retina que aun siendo virtuales recrean con bastante fidelidad la morfología tisular, como si de un corte histológico se tratara, *in situ* y en tiempo real, nos permitiría, además de identificar alteraciones patológicas de dicha morfología, hacer mediciones de gran fiabilidad y reproducibilidad, y analizar de forma temprana y continuada la respuesta a los distintos tratamientos ensayados.

Otro inconveniente del estudio fue el tamaño muestral, aunque pudimos utilizar controles y EAE históricos que habíamos utilizado en la optimización de la técnica que posteriormente llevamos a cabo durante el trabajo. Si bien es verdad, que existían cambios histológicos claros, en el modelo generado pero también tras tratamiento que alcanzaron significación

estadística. Sería interesante en un futuro ampliar este estudio mejorando las limitaciones encontradas.

Finalmente, después de todo lo expuesto, podemos concluir que hemos caracterizado el microambiente inflamatorio tras inmunización con MOG en un modelo experimental de EM, y hemos encontrado un efecto neuroprotector que probablemente se deba a la infusión de MSC sin poder encontrar un efecto regenerador debido al bloqueo de Nogo. Hemos seguido la enfermedad con escalas de discapacidad motora, pero sería en el futuro ideal poseer una técnica de visualización *in vivo* y seguimiento del modelo. Ampliando tamaño muestral podríamos analizar otros efectos no determinados en este trabajo.

CONCLUSIONES

6.-CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en los experimentos descritos en esta Tesis Doctoral concluimos:

En el modelo EAE generado en ratón B6/C57, mediante MOG:

1.-Hemos estudiado el microambiente inflamatorio, que habíamos generado, el cual presenta una alteración significativa de la capa de CGR morfológica y cuantitativa; y el NO se vio afectado con una gliosis reactiva y aumento del daño axonal.

2.-Hemos encontrado un efecto neuroprotector tras la administración de MSCs transfectadas con NogoR^{DN}, apreciándose menor pérdida de CGR, disminución de la pérdida de mielina y menor grado de inflamación en el NO.

3.-No hemos encontrado un efecto regenerador debido al bloqueo de Nogo, no se consiguió revertir el daño axonal.

4.-Hemos confirmado el tropismo de las hMSC al tejido inflamado del NO, después de su inoculación endovenosa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salinas-navarro, M., Mayor-torroglosa, S., Jiménez-lópez, M. & Avilés-trigueros, M. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res.* **49**, 115–126 (2009).
2. Salinas-navarro, M., Jiménez-lópez, M., Valiente-soriano, F. J. & Alarcón-martínez, L. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice : A computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res.* **49**, 637–647 (2009).
3. Jime, M. *et al.* Whole Number , Distribution and Co-Expression of Brn3 Transcription Factors in Retinal Ganglion Cells of Adult Albino and Pigmented Rats. *PLoS One* **7**, 1–16 (2012).
4. Jeon, C., Strettoi, E. & Masland, R. H. The Major Cell Populations of the Mouse Retina. *J. Neurosci.* **18**, 8936–8946 (1998).
5. Ramírez, J. M., Triviño, A., Ramírez, A. I., Salazar, J. J. & Garcia-sanchez, J. Structural Specializations of Human Retinal Glial Cells. *Vis. Res* **36**, 2029–2036 (1996).
6. Triviño, A., Ramírez, J. M., Salazar, J. J., Ramírez, A. I. & García-Sanchez, J. Immunohistochemical Study of Human Optic Nerve Head Astroglia. *Vision Res.* **36**, 2015–2028 (1196).
7. Galindo-Romero, C. *et al.* Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor on Mouse Axotomized Retinal Ganglion Cells and Phagocytic. *IOVS* **54**, 974–985 (2013).
8. Ayuso, G. I. Multiple sclerosis : socioeconomic effects and impact on quality of life. *Med. Clin. (Barc).* **143**, 7–12 (2014).
9. Weinshenker, B. Epidemiology of multiple sclerosis . *Neurol Clin* **14**, 291–308 (1996).
10. Weinshenker, B. G. *et al.* The Natural History of Mulltiple Sclerosis: A Geographically Based Study 2 Predictive Value of the Early Clinicl Course. *Brain* **112**, 1419–1428 (1989).

11. Hader, W., Elliot, M. & Ebers, G. Epidemiology of multiple sclerosis in London and Middlesex County , Ontario, Canada. *Neurology* **38**, 617–621 (1988).
12. Sadovnick, A., Baird, P. & Ward, R. Multiple sclerosis : updated risks for relatives . *Am. J. Med Genet* **29**, 533–541 (1988).
13. Sadovnick, A., Yee, I., Ebers, G. & Risch, N. Effect of age at onset and parental disease status on sibling risks for MS . *Neurology* **50**, 719–723 (2007).
14. Robertson, N. P. *et al.* Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain* **119**, 449–455 (1996).
15. Sadovnick, A. D. & Ebers, G. C. Epidemiology of Multiple Sclerosis a critical overview. *Can J Neurol Sci* **20**, 17–29 (1993).
16. Nexø, B. A. *et al.* The Etiology of Multiple Sclerosis: Genetic Evidence for the Involvement of the Human Endogenous Retrovirus HERV-Fc1. *PLoS One* **6**, e16652 (2011).
17. Levin, L. I. *et al.* Multiple Sclerosis and Epstein-Barr Virus. *JAMA* **289**, 1533–1536 (2003).
18. Maghzi, A. H. *et al.* Viral pathophysiology of multiple sclerosis: A role for Epstein-Barr virus infection? *Pathophysiology* **18**, 13–20 (2011).
19. Ebers, G. C. & Sadovnick, A. D. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *J. Neuroimmunol.* **54**, 1–17 (1994).
20. Ebers, G. C., Sadovnick, A. D. & Rish, N. J. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature* **337**, 150–151 (1995).
21. Bulman, D. E., Sadovnick, a D. & Ebers, G. C. Age of onset in siblings concordant for multiple sclerosis. *Brain* **114**, 937–950 (1991).

22. Villoslada, P. *et al.* The HLA locus and multiple sclerosis in Spain . Role in disease susceptibility , clinical course and response to interferon- B. *J. Neuroimmunol.* **130**, 194–201 (2002).
23. Uría, D. HLA and multiple sclerosis. Studies of a spanish population. *Rev Neurol* **31**, 1066–1070 (2000).
24. Bäärnhielm, M. & AK Hedström. Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **17**, 788–793 (2011).
25. Artemiadis, A. K., Anagnostouli, C. & Alexopoulos, E. C. Stress as a Risk Factor for Multiple Sclerosis Onset or Relapse : A Systematic Review. *Neuroepidemiology* 109–120 (2011). doi:10.1159/000323953
26. Benito-León, J. Stress and multiple sclerosis: What's new? *Neuroepidemiology* **36**, 121–122 (2011).
27. Farez, M. F. & Correale, J. Immunizations and risk of multiple sclerosis : systematic review and meta-analysis. *J Neurol* **258**, 1197–1206 (2011).
28. Noseworthy, J. H. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* **399**, A40–A47 (2000).
29. Sospedra, M. & Martin, R. Immunology of multiple sclerosis*. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 683–747 (2005).
30. Noseworthy, J. H. Clinical course and diagnosis. *N. Engl. J. Med.* **343**, 938–952 (2000).
31. Ferguson, B., Matyszak, M. K., Esiri, M. M. & Perry, V. H. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* **120**, 393–399 (1997).
32. Trapp, B. D. *et al.* Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **338**, 278–285 (1998).

33. Lassmann, H. & Vass, K. Are current immunological concepts of multiple sclerosis reflected by the immunopathology of its lesions? *Immunopathol. Mult. Scler.* **17**, 77–87 (1995).
34. Kornek, B. & Lassmann, H. Neuropathology of multiple sclerosis — new concepts. *Brain Res. Bull.* **61**, 321–326 (2003).
35. Lublin, F. D. & Reingold, S. C. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology* **46**, 907–911 (1996).
36. Petzold, A. Isolated, relapsing and progressive demyelinating diseases of the central nervous system. *J Neurol* **255**, 69–76 (2008).
37. Vukusic, S. & Confavreux, C. Prognostic factors for progression of disability in the secondary progressive phase of multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **206**, 135–137 (2003).
38. Poser, C. M. & Brinar, V. V. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: an historical review. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **106**, 147–158 (2004).
39. Poser, C. M. *et al.* New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann. Neurol.* **13**, 227–231 (1983).
40. Polman, C. H. *et al.* Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria. (2011). doi:10.1002/ana.22366
41. Baxter Alan G. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 904–912 (2007).
42. Fernández, O. Combination therapy in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **259**, 95–103 (2007).
43. Ebers, E., Rice, G., Lesaux, J. & Paty, D. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* **352**, 1498–1504 (1998).

44. Jacobs, L. D. *et al.* Intramuscular Interferon Beta-1a for Disease Progression in Relapsing Multiple Sclerosis. *Am. Neurol. Assoc.* **39**, 285–294 (1996).
45. Jonshon, K. P. *et al.* Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis : Results of a phase III multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* **45**, 1268–1276 (1995).
46. Wolinsky, J. S. *et al.* Glatiramer Acetate in Primary Progressive Multiple Sclerosis : Results of a Placebo-Controlled Trial. *Ann Neurol.* **1**, 14–24 (2007).
47. Polman, C. *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* **354**, 899–910 (2006).
48. Singh, M., Cugati, G., Singh, P. & Singh, A. K. Fingolimod : The first oral drug approved by food and drug administration ; A breakthrough in treatment of multiple sclerosis. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **3**, 460–461 (2011).
49. Mehling, M., Kappos, L. & Derfuss, T. Fingolimod for Multiple Sclerosis : Mechanism of Action , Clinical Outcomes , and Future Directions. *CurrNeurol Neusci Rep* **11**, 492–497 (2011).
50. Huggins, A. & Sergott, R. C. Background and rationale for mechanism of action , efficacy , and safety of fingolimod (Gilenya), the first oral therapy for relapsing-remitting multiple sclerosis : with special emphasis upon visual safety. *Curr Opin Ophthalmol.* **22**, 447–450 (2011).
51. Hartung, H. *et al.* Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis : a placebo- controlled , double-blind , randomised , multicentre trial. *Lancet* **360**, 2018–2025 (2002).
52. Edan, G. *et al.* Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis : a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **62**, 112–118 (1997).

53. Andersson, P. & Goodkin, D. E. Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis : A critical review. *J. Neurol. Sci.* **160**, 16–25 (1998).
54. Chen, L. & Gordon, L. K. Ocular manifestations of multiple sclerosis. *Curr Opin Ophthalmol.* **16**, 315–320 (2005).
55. Miller, D., Barkhof, F., Montalban, X., Thompson, A. & Filippi, M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis , part I : natural history , pathogenesis , diagnosis , and prognosis. *Lancet Neurol* **4**, 281–88 (2005).
56. Group, O. N. S. The clinical profile of optic neuritis Experience of the Neuritis Treatment Trial. *Arch. Ophthalmol.* **109**, 1673–1678 (1991).
57. Rodriguez, M., Siva, A., Cross, S., O'Brien, P. & T, K. L. Optic neuritis : A population-based study in Olmsted County , Minnesota. *Neurology* **45**, 244–250 (1996).
58. Kaufman, D. I., Trobe, J. D., Eggenberger, E. R. & Whitaker, J. N. Practice parameter: The role of corticosteroids in the management of acute monosymptomatic optic neuritis. *Neurology* **54**, 2039–2044 (2000).
59. Beck, R. W. *et al.* Visual Function More Than 10 Years After Neuritis Treatment Trial. *Am. J. Ophthalmol.* **137**, 77–83 (2004).
60. Keltner, J. L., Johnson, C. A., Spurr, J. O. & Beck, R. W. Visual field profile of optic neuritis. One-year follow-up in the Optic Neuritis Treatment Trial. *Arch Ophthalmol* **112**, 946–953 (1994).
61. Neuritis, O. & Group, S. High- and Low-Risk Profiles for the Development of Multiple Sclerosis Within 10 Years After Optic Neuritis. *Arch Ophthalmol* **121**, 944–949 (2003).
62. Trial, T. Visual Function 15 Years after Optic Neuritis. *Ophthalmology* **115**, 1079–1082 (2008).

63. McKerracher, L. *et al.* Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* **13**, 805–811 (1994).
64. Wang, K. C. *et al.* Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* **417**, 941–944 (2002).
65. GrandPré, T., Nakamura, F., Vartanian, T. & Strittmatter, S. M. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* **403**, 439–444 (2000).
66. Fournier, a E., GrandPre, T. & Strittmatter, S. M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* **409**, 341–346 (2001).
67. Karnezis, T. *et al.* The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nat. Neurosci.* **7**, 736–744 (2004).
68. Satoh, J.-I., Onoue, H., Arima, K. & Yamamura, T. Nogo-A and nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 129–138 (2005).
69. Reindl, M. *et al.* Serum and cerebrospinal fluid antibodies to Nogo-A in patients with multiple sclerosis and acute neurological disorders. *J. Neuroimmunol.* **145**, 139–47 (2003).
70. Thomas M. Rivers, S. & runt , M . D . , G.P. Berry, M. D. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.* **58**, 39–56 (1933).
71. Robert H, S. Animal Models of Human Disease Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rodents as a Model for Human Demyelinating Disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **77**, 4–13 (1995).
72. Gold, R., Linington, C. & Lassmann, H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models : 70 years of merits and

- culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* **129**, 1953–1971 (2006).
73. Baxter Alan G. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 904–912 (2007).
 74. Fuller, K. G., Olson, J. K., Howard, L. M., Croxford, J. L. & Miller, S. D. Mouse Models of Multiple Sclerosis. *Methods Mol. Med.* **102**, 339–361 (2004).
 75. Terayama, R., Bando, Y., Jiang, Y., Mitrovic, B. & Yoshida, S. Differential expression of protease M / neurosin in oligodendrocytes and their progenitors in an animal model of multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* **382**, 82–87 (2005).
 76. Owens, T. & Sriram, S. The immunology of multiple sclerosis and its animal model, experimental allergic encephalomyelitis.pdf. *Neurol. Clin.* **13**, 51–73 (1995).
 77. Linington, C., Engelhardt, B., Kapocs, G. & Lassman, H. Induction of persistently demyelinated lesions in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody. *J. Neuroimmunol.* **40**, 219–224 (1992).
 78. Kibler, B. R. F. *et al.* Immune response of Lewis rats to peptide C1(residues 68-88) of guinea pig and rat myelin basic proteins. *J. Exp. Med.* **146**, 1323–1331 (1977).
 79. Zamvil, S. S., Mitchell, D. J., Moore, A. C., Kitamura, K. & Steinman, L. T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. *Nature* **324**, 258–260 (1986).
 80. Slavin, A. *et al.* Induction of a Multiple Sclerosis-Like Disease in Mice with an Immunodominant Epitope of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein. *Autoimmunity* **28**, 109–120 (1998).
 81. Tsunoda, I., Ph, D. & Kuang, L. Antibody association with a novel model for primary progressive multiple sclerosis: Induction of relapsing-

- remitting and progressive forms of EAE in H2 (s) mouse strains. *Brain Pathol.* **10**, 402–418 (2000).
82. Stefferl, A. *et al.* Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Induces Experimental Aituoimmune Encephallomyelitis in the ‘Resistant’ Brown Norway Rat: Disease Susceptibility Is Determined by MHC and MHC-Linked Effects on the BCell Response. *J. Immunol.* **163**, 40–49 (1999).
 83. Sobel, R. A., Tuohy, V. K., Lu, Z., Laursen, R. A. & Lees, M. B. Acute experimental allergic encephalomyelitis in SJL mice induced by a syntheticpeptide of myelin proteolipid protein. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **49**, 468–479 (1990).
 84. Tuohy, V. K., Lu, Z., Sobel, R. A., Laursen, R. A. & Lees, M. B. Identification of an Encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *J. Immunol.* **142**, 1523–1527 (1989).
 85. Tompkins, S. M. *et al.* De Novo Central Nervous System Processing of Myelin Antigen Is Required for the Initiation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **168**, 4173–4183 (2002).
 86. Fritz, R. B. & Zhao, M. Active and Passive Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Strain 129 / J (H = 2b) Mice. *J. Neurosci. esearch* **45**, 471–474 (1996).
 87. Kunishita, T., Tabira, T., Endoh, M., Kunishita, T. & Tabira, T. Experimental Allergic Encephalomyelitis Induced by Proteolipid Apoprotein in Lewis Rats. *J. Neuroimmunol.* **12**, 143–153 (1986).
 88. Herrero-herranz, E., Pardo, L. A., Gold, R. & Linker, R. A. Pattern of axonal injury in murine myelin oligodendrocyte glycoprotein induced experimental autoimmune encephalomyelitis : Implications for multiple sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **30**, 162–173 (2008).
 89. Adams, R. D. & Kubik, C. S. The Morbid Anatomy of the Demyelinative Diseases. *Am. J. Med.* **12**, 510–546 (1952).

90. Kyewski, B. & Derbinski, J. Self-representation in the thymus: an extended view. *Immunology* **4**, 688–698 (2004).
91. Teitelbaum, D., Meshorer, A., Hirshfeld, T., Arnon, R. & Sela, M. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol* **1**, 242–248 (1971).
92. Johnson, K. P. *et al.* Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. *Neurology* **50**, 701–708 (1998).
93. Berger, T. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis the antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the Central and Peripheral Nervous System. *Lab. Investig.* **76**, 355–364 (1997).
94. Kornek, B. *et al.* Distribution of a calcium channel subunit in dystrophic axons in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* **124**, 1114–1124 (2001).
95. Medana, I., Martinic, M. A., Wekerle, H. & Neumann, H. Transection of Major Histocompatibility Complex Class I-Induced Neuritis by Cytotoxic T Lymphocytes. *American J. Pathol.* **159**, 809–815 (2001).
96. Potten, C. S. & Loeffler, M. Stem cells : attributes , cycles , spirals , pitfalls and uncertainties Lessons for and from the Crypt. *Development* **110**, 1001–1020 (1990).
97. Doetschman, T., Williams, P. & Maeda, N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev. Biol.* **127**, 224–227 (1988).
98. Donoghue, K. O. Fetal stem cells. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **18**, 853–875 (2004).
99. Wagers, A. J. & Weissman, I. L. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell* **116**, 639–648 (2004).

100. Nakagawa, H., Akita, S., Fukui, M., Fujii, T. & Akino, K. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute healing. *Br. J. Dermatol.* **153**, 29–36 (2005).
101. Carter, B. D. & Prockop, D. J. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science (80-.)*. **276**, 71–74 (1997).
102. John, T., Shiela, S., Andrew, F. & Richard, G. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into Multiple Mesodermal Phenotypes. *Am. Surg.* **65**, 22–26 (1999).
103. Zuk, P. A. *et al.* Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295 (2002).
104. Zikuan Guo & Hong Li. In Vitro Characteristics and In Vivo Immunosuppressive Activity of Compact Bone-Derived Murine Mesenchymal. *Stem Cells* **24**, 992–1000 (2006).
105. Bari, C. De, Accio, F. D. & Luyten, F. P. Human Periosteum-Derived Cells Maintain Phenotypic Stability and Chondrogenic Potential throughout Expansion Regardless of Donor Age. *Arthritis Rheum.* **44**, 85–95 (2001).
106. Bari, C. De *et al.* Mesenchymal Multipotency of Adult Human Periosteal Cells Demonstrated by Single-Cell Lineage Analysis. *Arch. Neurol.* **54**, 1209–1221 (2006).
107. Dowthwaite, G. P. *et al.* The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J. Cell Sci.* **2**, 889–897 (2004).
108. Zvaifler, N. J. *et al.* Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* **2**, 477–488 (2000).
109. Condes, L. & Received, M. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* **109**, 235–242 (2000).
110. Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M. M. & Davies, J. E. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells* **23**, 220–229 (2005).

111. Pieterella, A., Sicco, S. & Keur, K. der. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* **102**, 1548–1549 (2003).
112. Bari, C. De, Accio, F. D., Tylzanowski, P. & Luyten, F. P. Multipotent Mesenchymal Stem Cells From Adult Human Synovial Membrane. *Arthritis Rheum.* **44**, 1928–1942 (2001).
113. Jones, E. A. *et al.* Enumeration and Phenotypic Characterization of Synovial Fluid Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells in Inflammatory and Degenerative Arthritis. *Arthritis Rheum.* **50**, 817–827 (2004).
114. Campagnoli, C. *et al.* Identification of mesenchymal stem / progenitor cells in human first-trimester fetal blood , liver , and bone marrow. *Blood* **98**, 2396–2403 (2015).
115. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS* **97**, 13625–13630 (2000).
116. Sabatini, F. *et al.* Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab. Investig.* **85**, 962–971 (2005).
117. Uter, L. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow , Umbilical Cord Blood , or Adipose Tissue. *Stem Cells* **24**, 1294–1301 (2006).
118. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells . The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
119. Yagi, H. *et al.* Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing. *Cells Transplant.* **19**, 667–679 (2010).
120. De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blazquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, A.-M. F. Immunosuppressive properties of mesenchymal

- stem cells : advances and applications . *Curr Mol Med* **12**, 574–591 (2012).
121. Sordi, V. Mesenchymal Stem Cell Homing Capacity. *Transplantation* **87**, S42–S45 (2009).
 122. Res, I. C. *et al.* Human mesenchymal stem cells constitutively express chemokines and chemokine receptors that can be upregulated by cytokines , IFN - beta , and Copaxone. *J Interf. Cytokine Res* **27**, 53–64 (2007).
 123. Ringe, J. *et al.* Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J. Cell. Biochem.* **101**, 135–146 (2007).
 124. Wang, L. E. I. *et al.* MCP-1 , MIP-1 , IL-8 and Ischemic Cerebral Tissue Enhance Human Bone Marrow Stromal Cell Migration in Interface Culture. *Hematology* **7**, 113–117 (2002).
 125. Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M. & Marini, F. Inflammation and tumor microenvironments : defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* **15**, 730–738 (2008).
 126. Honczarenko, M. *et al.* Human Bone Marrow Stromal Cells Express a Distinct Set of. *Stem Cells* **24**, 1030–1041 (2006).
 127. Lévesque, J., Hendy, J., Takamatsu, Y., Simmons, P. J. & Bendall, L. J. Disruption of the CXCR4 / CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J. Clin. Invest.* **111**, 187–196 (2003).
 128. Yamaguchi, J. *et al.* Stromal Cell – Derived Factor-1 Effects on Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cell Recruitment for Ischemic Neovascularization. *Circulation* **107**, 1322–1328 (2003).
 129. Rüster, B. *et al.* Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* **108**, 3938–3944 (2006).

130. Meerschaert, J. & Furie, M. B. The Adhesion Molecules Used By Monocytes for Migration Across Endothelium Include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on Monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and Other Ligands on Endothelium. *J. Immunol.* **154**, 4099–4112 (1995).
131. Steingen, C. *et al.* Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **44**, 1072–1084 (2008).
132. James E Ip *et al.* Mesenchymal Stem Cells Use Integrin B 1 Not CXC Chemokine Receptor 4 for Myocardial Migration and Engraftment. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2873–2882 (2007).
133. Liu, Z., Zhuge, Y. & Velazquez, O. C. Trafficking and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *J. Cell. Biochem.* **106**, 984–991 (2009).
134. Curley, G. F. *et al.* Mesenchymal stem cells enhance recovery and repair following ventilator-induced lung injury in the rat. *Thorax* **67**, 496–501 (2012).
135. Kunter, U., Rong, S., Djuric, Z., Boor, P. & Mu, G. Glomerular Healing in Experimental Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 2202–2212 (2006).
136. Alfarano, C. *et al.* Intraparenchymal Injection of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Reduces Kidney Fibrosis After Ischemia-Reperfusion in Cyclosporine-Immunosuppressed Rats. *Cells Transplant.* **21**, 2009–2019 (2012).
137. Kanazawa, H., Fujimoto, Y., Teratani, T., Iwasaki, J. & Kasahara, N. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Ischemia Reperfusion Injury in a Rat Model. *Plos* **6**, 2–9 (2011).
138. Zhao, W. *et al.* Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis. *World J. Gastroenterol.* **18**, 1048–1058 (2012).

139. Lee, R. H. *et al.* Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD /scid mice. *PNAS* **103**, 17438–17443 (2006).
140. Iso, Y. *et al.* Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 700–706 (2007).
141. Manuscript, A., Mesenchymal, D., Cells, S. & Cardiac, A. Myocardial Injection with GSK-3B-Overexpressing Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuates Cardiac Dysfunction after Myocardial Infarction. *Circ Res* **108**, 478–489 (2012).
142. Shi, Y. *et al.* How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.* **33**, 136–143 (2012).
143. Hung, S., Yang, M., Tseng, K. & Lee, O. K. Hypoxia-Induced Secretion of TGF- β 1 in Mesenchymal Stem Cell Promotes Breast Cancer Cell Progression. *Cells Transplant.* **22**, 1869–1882 (2013).
144. Galeano, M. *et al.* Recombinant Human Erythropoietin Stimulates Angiogenesis and Wound Healing in the Genetically Diabetic Mouse. *Diabetes* **53**, 2509–2517 (2004).
145. Harada, M. *et al.* G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat. Med.* **11**, 305–311 (2005).
146. Ren, G. *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell* **2**, 141–150 (2008).
147. Németh, K. *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* **15**, 42–49 (2009).

148. Frenette, P. S., Pinho, S., Lucas, D. & Scheiermann, C. Mesenchymal Stem Cell : Keystone of the Hematopoietic Stem Cell Niche and a Stepping-Stone for Regenerative Medicine. *Annu Rev Immunol* **31**, 285–316 (2013).
149. Ren, G. *et al.* Species Variation in the Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell- Mediated Immunosuppression. *Stem Cells* **27**, 1954–1962 (2009).
150. Spaggiari, G. M. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit natural killer – cell proliferation , cytotoxicity , and cytokine production : role of indoleamine 2 , 3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* **111**, 1327–1334 (2008).
151. Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M. & Go, U. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2 , 3-dioxygenase – mediated tryptophan degradation. *Immunobiology* **103**, 4619–4622 (2015).
152. Jiang, X. *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **105**, 4120–4127 (2005).
153. Ramasamy, R., Fazekasova, H. & Lam, E. W. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Dendritic Cell Differentiation and Function by Preventing Entry Into the Cell Cycle. *Transplantation* **83**, 71–76 (2007).
154. Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815–1823 (2015).
155. Ren, G. *et al.* Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical ofr Immunosuppression. *J Immunol.* **184**, 2321–2328 (2010).
156. Kim, J. & Hematti, P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol.* **37**, 1445–1453 (2010).
157. Fileta, J. B. *et al.* Efficient Estimation of Retinal Ganglion Cell Number: A stereological Approach. *J Neurosci Methods* **170**, 1–8 (2008).

158. Shindler, K. S., Guan, Y., Ventura, E., Bennett, J. & Rostami, a. Retinal ganglion cell loss induced by acute optic neuritis in a relapsing model of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **12**, 526–532 (2006).
159. Shindler, K. S., Ventura, E., Dutt, M. & Rostami, A. Inflammatory demyelination induces axonal injury and retinal ganglion cell apoptosis in experimental optic neuritis. *Exp. Eye Res.* **87**, 208–13 (2008).
160. Li, Y., Semaan, S. J., Schlamp, C. L. & Nickells, R. W. Dominant inheritance of retinal ganglion cell resistance to optic nerve crush in mice. *BMC Neurosci.* **8**, 19 (2007).
161. Selles-navarro, I., Villegas-perez, M. P., Salvador-silva, M., Ruiz-gomez, J. M. & Vidal-sanz, M. Retinal Ganglion Cell Death After Different Transient Periods of Pressure-Induced Ischemia and Survival Intervals A Quantitative In Vivo Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**, 2002–2014 (1996).
162. Borsello, T., Mottier, V., Castagné, V. & Clarke, P. G. H. Ultrastructure of retinal ganglion cell death after axotomy in chick embryos. *J. Comp. Neurol.* **453**, 361–71 (2002).
163. C, G.-R., Avilés-Trigueros M & Fj, V. Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice : quantitative and topographic time course analyses . *Exp Eye Res* **92**, 377–387 (2011).
164. Guan, Y., Shindler, K. S., Tabuena, P. & Rostami, a M. Retinal ganglion cell damage induced by spontaneous autoimmune optic neuritis in MOG-specific TCR transgenic mice. *J. Neuroimmunol.* **178**, 40–8 (2006).
165. Voß, E. V. *et al.* Characterisation of microglia during de- and remyelination: Can they create a repair promoting environment? *Neurobiol. Dis.* **45**, 519–528 (2012).
166. Hu, P., Pollard, J., Hunt, N. & Chan-Ling, T. Microvascular and cellular responses in the retina of rats with acute experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *Brain Pathol.* **8**, 487–498 (1998).

167. Black, J., Hildebrand, C., Remahl, S. & Waxman, S. G. Axo-glial relations in the retina-optic nerve junction of the adult rat: electron-microscopic observations. *J. Neurocytol.* **14**, 597–617 (1985).
168. Hayreh, S. S., Massanari, R. M., Yamada, T. & Hayreh, S. M. Experimental allergic encephalomyelitis. I. Optic nerve and central nervous system manifestations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **21**, 256–269 (1981).
169. Lassmann, H., Rinner, W. & Hickey, W. F. Differential role of hematogenous macrophages, resident microglia and astrocytes in antigen presentation and tissue damage during autoimmune encephalomyelitis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **20**, 195–196 (1994).
170. Horstmann, L. *et al.* Inflammatory demyelination induces glia alterations and ganglion cell loss in the retina of an experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J. Neuroinflammation* **10**, 120 (2013).
171. Tuo J, Grob, S. & Zhang K, C. Genetics of immunological and inflammatory components in age-related macular degeneration. *Ocul Immunol Inflamm* **20**, 27–36 (2012).
172. Yong, V. W. & Marks, S. The interplay between the immune and central nervous systems in neuronal injury. *Neurology* **74**, 9–16 (2010).
173. Langmann, T. Microglia activation in retinal degeneration. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 1345–51 (2007).
174. Kermode, a G. *et al.* Breakdown of the blood-brain barrier precedes symptoms and other MRI signs of new lesions in multiple sclerosis. Pathogenetic and clinical implications. *Brain* **113**, 1477–1489 (1990).
175. Motulsky, E. *et al.* Aquaporin expression in blood-retinal barrier cells during experimental autoimmune uveitis. *Mol. Vis.* **16**, 602–610 (2010).
176. Cruz-Guilloty, F. *et al.* Infiltration of proinflammatory m1 macrophages into the outer retina precedes damage in a mouse model of age-related macular degeneration. *Int. J. Inflamm.* **2013**, 503725 (2013).

177. Gao, J., Dennis, J. E., Muzic, R. F., Lundberg, M. & Caplan, A. I. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* **169**, 12–20 (2001).
178. Daldrup-Link, H. E. *et al.* Cell tracking with gadophrin-2: a bifunctional contrast agent for MR imaging, optical imaging, and fluorescence microscopy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **31**, 1312–1321 (2004).
179. Kang, W. J. *et al.* Tissue distribution of 18F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *J. Nucl. Med.* **47**, 1295–1301 (2006).
180. Rochefort, G. Y. *et al.* Influence of hypoxia on the domiciliation of mesenchymal stem cells after infusion into rats: possibilities of targeting pulmonary artery remodeling via cells therapies? *Respir. Res.* **6**, 125 (2005).
181. Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M. & Mahon, B. P. Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* **149**, 353–363 (2007).
182. Mazhari, R. & Hare, J. M. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **4 Suppl 1**, S21–S26 (2007).
183. Yu, B., Zhang, X. & Li, X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 4142–57 (2014).
184. Satoh, J.-I. *et al.* LC3, an autophagosome marker, is expressed on oligodendrocytes in Nasu-Hakola disease brains. *Orphanet J. Rare Dis.* **9**, 68 (2014).
185. Inoue, T., Hosokawa, M., Morigiwa, K., Ohashi, Y. & Fukuda, Y. Bcl-2 Overexpression Does Not Enhance In Vivo Axonal Regeneration of Retinal Ganglion Cells after Peripheral Nerve Transplantation in Adult Mice. *J. Neurosci.* **22**, 4468–4477 (2002).

186. Jeon, C. J., Strettoi, E. & Masland, R. H. The major cell populations of the mouse retina. *J. Neurosci.* **18**, 8936–8946 (1998).
187. Chen, J., Qian, H., Horai, R., Chan, C.-C. & Caspi, R. R. Use of optical coherence tomography and electroretinography to evaluate retinal pathology in a mouse model of autoimmune uveitis. *PLoS One* **8**, e63904 (2013).
188. Kocaoglu, O. P. *et al.* Simultaneous fundus imaging and optical coherence tomography of the mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 1283–1289 (2007).