



2017

Tesis Doctoral

Paula García Belda



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Programa de doctorado en Neurociencias

Direccionamiento de células madre
mesenquimales adultas para el tratamiento
del infarto cerebral mediante la aplicación
de campos magnéticos

Paula García Belda

TESIS DOCTORAL

Dirigida por el Dr. D. Jose Manuel García Verdugo
y la Dra. Dña. Sara García Gil-Perotín

Valencia, 2017

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Neurociencias
Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Biologia Cel·lular, Biologia Funcional
i Antropologia Física



“Direccionamiento de células madre mesenquimales adultas para el tratamiento del infarto cerebral mediante la aplicación de campos magnéticos”.

Tesis doctoral presentada por D^a Paula García Belda y dirigida por el Dr. D. José Manuel García Verdugo, Catedrático de la Universitat de València y la Dr. D^a Sara García Gil-Perotín.

Valencia, Mayo 2017



José Manuel García Verdugo, Catedrático del Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València,

CERTIFICO

Que D^a. Paula García Belda ha realizado en el Laboratorio de Neurobiología Comparada del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universitat de València, bajo mi dirección, el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada “Direccionamiento de células madre mesenquimales adultas para el tratamiento del infarto cerebral mediante la aplicación de campos magnéticos”.

Revisado el trabajo, autorizo su presentación para optar al grado de Doctor, y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Valencia,

Firmado: José Manuel García Verdugo



Sara García Gil-Perotín, Dra. en Neurociencias,

CERTIFICO

Que D^a. Paula García Belda ha realizado en el Laboratorio de Neurobiología Comparada del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universitat de València, bajo mi dirección, el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada “Direccionamiento de células madre mesenquimales adultas para el tratamiento del infarto cerebral mediante la aplicación de campos magnéticos”.

Revisado el trabajo, autorizo su presentación para optar al grado de Doctor, y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Valencia,

Firmado: Sara García Gil-Perotín.



Yo, Paula García Belda, declaro que soy autora del presente trabajo de investigación realizado en el Laboratorio de Neurobiología Comparada del Instituto Cavanilles, bajo la dirección del Dr. José Manuel García Verdugo, Catedrático de Biología Celular de la Universitat de València, y la Dra. D^a. Sara García Gil-Perotín.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Valencia,

Firmado: Paula García Belda

El presente trabajo ha sido financiado por la ayuda para la formación de personal investigador de carácter predoctoral *Atracció de Talent* de la Universitat de València y por el proyecto 479/C/2012 de La Fundació La Marató de TV3 con título “*Brain repair after stroke: magnetic field-mediated stem cell migration*”.

Agradecimientos

Espero que cada una de las personas que han formado parte de esta “historia” sean conscientes de antemano de lo que han supuesto dentro de ella. Por si acaso, haré un breve repaso de cada nombre que me viene a la cabeza cuando pienso en todo este tiempo, porque parece poco sintetizado en una tesis, pero ya han pasado más de 6 años desde el primer día que pisé el laboratorio.

A Jorge, porque si no hubiera sido por él nada de esto hubiera empezado, o por lo menos no en este laboratorio.

A Verdugo, por mostrarme la pasión por una profesión en estado puro. Por su forma de ser, porque durante todo este tiempo ha sido mucho más que un jefe.

A Sara, por sacarme del cascarón y por darme ese empujón y ser mi motor siempre que ha sido necesario.

A Patri, Arantxa, Susana, María y Vicente, porque lo más importante que me llevo de ellos está fuera de la bancada, además de todo lo que me han enseñado dentro del laboratorio. Por taaantas risas y alguna lágrima que otra también, porque siempre ha habido una buena excusa para un importante almuerzo, por los cafés imbebibles con hielos llenos de bacterias y por los resopones con Snapchat. Por todo.

A Mariana, Mari y MJ, porque aunque hayamos compartido menos tiempo en el laboratorio, no han faltado momentos “chistosos”, historias peculiares ni clases de terminología española “de turno”. Porque ojalá todo el que llegara lo hiciera con sus ganas y alegría.

A Mario, por haberle hecho esperar tantos días, por tantos filamentos fundidos y por tantas llamadas de socorro durante las sesiones de electrónico.

A Joan, Germán, María, Chelo, Alicia y Mikahela. Por acogerme sin pensarlo y hacerme sentir como si estuviera en “casa”, a pesar de que nunca entendieran por qué comía puré con cúrcuma y quinoa. A las chicas en especial, por todo el tiempo que me han dedicado, por su paciencia y por hacer siempre menos duras las largas horas de quirófano. Por supuesto que nunca voy a olvidar cada canción de la lista de reproducción que sonó incansable día tras día durante más de un año.

A Helena y a Ángel, por no pensar que estábamos locos y ayudarnos en todo lo que estaba en su mano cuando les explicamos que queríamos mover células con un imán y retenerlas dentro del cerebro de una rata con un casco.

A mis chicas. A mi Triangle, a las Brujildas, a *Piccole Amore* y a Sandru, porque estén cerca o lejos, siempre están.

A mis padres y a mis hermanas, por toda una vida. Por ser mi equilibrio y mi punto de apoyo pase lo que pase.

A Carles, por “sufrir” conmigo esta última etapa de la tesis. Por animarme, por entenderme y por ser mi compañero de vida.

A todos, gracias de corazón.

Índice

Índice de figuras.....	XVII
Índice de tablas	XIX
Abreviaturas	XX
Resumen	XXI
1. Introducción	3
1.1. La enfermedad cerebrovascular: definición y epidemiología.....	3
1.2. Clasificación del ictus y su fisiopatología.	4
1.2.1. Fisiopatología del ictus	5
1.3. Tratamiento después del infarto cerebral.....	9
1.3.1. Concepto de “ <i>ventana de oportunidad</i> ” terapéutica.....	11
1.3.2. Protección cerebral	11
1.3.3. Plasticidad cerebral para la reparación.....	15
1.4. Medicina regenerativa con células madre	18
1.5. MSCs para el tratamiento del infarto cerebral.....	25
1.6. Direccionamiento magnético de MSCs	26
2. Hipótesis y objetivos	33
3. Material y métodos.....	37
3.1. Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales adultas.....	37
3.1.1. Células madre mesenquimales de médula ósea de ratón.....	37
3.1.2. Células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata.	38
3.1.3. Células madre mesenquimales de tejido adiposo de humano. ...	39
3.1.4. Caracterización de células madre mesenquimales.	40
3.2. Marcaje de células madre mesenquimales con nanopartículas de óxido de hierro.	43
3.2.1. Determinación del marcaje de elección.	43
3.2.2. Viabilidad celular después del marcaje.....	44
3.3. Caracterización de las propiedades magnéticas de las SPIOs P-904 (Guerbet) y las MSCs-SPIOs	45
3.4. Direccionamiento <i>in vitro</i> de células marcadas con hierro mediante la aplicación de campos magnéticos	46
3.5. Direccionamiento magnético de MSCs-SPIOs en un modelo animal de infarto cerebral.....	47

3.5.1. Elementos para la aplicación del campo magnético	47
3.5.2. Animales	49
3.5.3. Diseño experimental.	50
3.5.4. Modelo animal de ictus isquémico: oclusión-reperusión de la arteria cerebral media mediante la técnica del filamento intraluminal (tMCAo).....	51
3.5.5. Infusión intravenosa de rASCs-SPIOs durante la aplicación del campo magnético.....	55
3.5.6. Registro de imagen mediante resonancia magnética (RM).....	55
3.6. Inyección intracerebral de MSCs-SPIOs.....	55
3.7. Procesado de muestras.....	56
3.7.1. Recuento de MSCs-SPIOs alojadas en el parénquima cerebral.	56
3.7.2. Microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.	57
3.7.3. Inmunohistoquímica.....	57
3.8. Análisis estadístico.....	58
4. Resultados	61
BLOQUE A: DIRECCIONAMIENTO MAGNÉTICO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS MARCADAS CON HIERRO.	61
4.1. Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales adultas de diferentes tejidos.....	61
4.2. Magnetización de células madre mesenquimales adultas.....	79
4.2.1. Marcaje de MSCs con nanopartículas de óxido de hierro	79
4.2.2. Caracterización morfológica y magnética de las SPIOs	86
4.2.3. Caracterización magnética de las MSCs después de su marcaje con SPIOs.....	87
4.3. Direccionamiento <i>in vitro</i> de MSCs aplicando un campo magnético.	90
BLOQUE B: TERAPIA CELULAR DIRIGIDA MEDIANTE CAMPOS MAGNÉTICOS EN UN MODELO ANIMAL DE INFARTO CEREBRAL	94
4.4. Sistema de aplicación del campo magnético.....	94
4.5. Direccionamiento magnético de MSCs después del infarto cerebral.	97
4.6. Análisis morfológico de las rASCs-SPIOs después del direccionamiento magnético.....	101
4.7. Estudio inmunohistoquímico de las rASCs-SPIOs alojadas en el parénquima cerebral.....	105

4.8. Administración de intracerebral de rASCs	106
5. Discusión	113
5.1. Aislamiento de MSCs de distintos tejidos y cultivo <i>in vitro</i>	115
5.2. Ultraestructura de las MSCs durante su cultivo y su diferenciación <i>in vitro</i>	116
5.3. Biocompatibilidad de las SPIOs para la magnetización de las MSCs.	118
5.4. Migración <i>in vitro</i> de las MSCs-SPIOs mediante la aplicación de campos magnéticos.....	120
5.5. Direccionamiento magnético de MSCs-SPIOs después de infarto cerebral.	121
5.6. Viabilidad e injerto de las MSCs-SPIOs en el tejido cerebral después de su infusión intravenosa.....	125
6. Conclusiones.....	133
7. Bibliografía	137

Índice de figuras

Introducción

Figura 1. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular según su naturaleza	4
Figura 2. Core isquémico y zona de penumbra	6
Figura 3. Esquema de los efectos de la isquemia cerebral sobre la inflamación citoquinas y células inmunes y su contribución a la neurotoxicidad	8
Figura 4. Relación de mecanismos patogénicos después del infarto cerebral y las opciones terapéuticas disponibles	12
Figura 5. Ventanas de tolerancia isquémica.....	14
Figura 6. Dinámica de la unidad neurovascular en el tejido cerebral en el período subagudo después de ictus	16
Figura 7. Distintos orígenes de células madre	20
Figura 8. Células mesenquimales estromales multipotentes (MSCs)	23
Figura 9. Evolución de los ensayos clínicos registrados en las bases de datos internacionales diferenciando entre tipos celulares desde el 2011 a 2015.....	24
Figura 10. Diferentes métodos de estabilización de las nanopartículas de óxido de hierro con polímeros	27
Figura 11. Diagrama esquemático del direccionamiento magnético de células marcadas con SPIOs	29

Material y métodos

Figura 12. Aislamiento de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón	38
Figura 13. Sistema utilizado para el estudio de migración <i>in vitro</i> de las MSCs-SPIOs	47
Figura 14. Sistema compuesto por la combinación de un electroimán y un imán estacionario situado en un casco de ácido poliláctico que se adapta a la cabeza de la rata	48
Figura 15. Diagrama cronológico de los procedimientos incluidos en el diseño experimental	50
Figura 16. Implantación de la cánula para el registro intraoperatorio de la perfusión cerebral	52
Figura 17. Modelo animal de infarto cerebral mediante la inserción intraluminal de un filamento de nylon	54
Figura 18. Monitorización de parámetros fisiológicos intraoperatorios y confirmación de la isquemia-reperfusión durante el modelo animal de infarto cerebral	54

Resultados

Figura 19. Imágenes con el microscopio invertido mostrando células obtenidas del cultivo primario de médula ósea de ratón y gráficas de puntos de citometría de flujo de las mMSCs en fase celular 4	62
Figura 20. Estudio morfológico de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón (mBMSCs)	64
Figura 21. Imágenes con el microscopio invertido mostrando células obtenidas en el cultivo primario de tejido adiposo de rata (rASCs) y gráficas de puntos para la caracterización de las rASCs mediante citometría de flujo.	66

Figura 22. Estudio morfológico de células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata (rASCs).....	67
Figura 23. Imágenes con el microscopio invertido mostrando células madre mesenquimales en fase 4 obtenidas de tejido adiposo humano (hASCs).....	69
Figura 24. Estudio morfológico de células madres mesenquimales obtenidas de tejido adiposo humano (hASCs).....	71
Figura 25. Detalles de la ultraestructura de las hASCs.....	72
Figura 26. Diferenciación de MSCs a distintos linajes de origen mesodérmico.....	73
Figura 27. Estudio morfológico de hASCs después de 7 días de cultivo <i>in vitro</i> para su diferenciación a distintos linajes de origen mesodérmico.....	76
Figura 28. Estudio morfológico de hASCs después de 21 días de cultivo <i>in vitro</i> para su diferenciación a distintos linajes de origen mesodérmico.....	78
Figura 29. Estudio morfológico de las mBMSCs después de su marcaje con SPIOs	80
Figura 30. Estudio morfológico de las rASCs después de su marcaje con SPIOs.....	81
Figura 31. Estudio morfológico de las hASCs después de su marcaje con SPIOs.....	83
Figura 32. Ensayo de viabilidad celular después del marcaje con SPIOs mediante XTT.....	84
Figura 33. Diferenciación de MSCs a distintos linajes de origen mesodérmico después de su marcaje con SPIOs.....	85
Figura 34. Caracterización morfológica y magnética de las SPIOs P-904	87
Figura 35. Caracterización magnética de las MSCs marcadas con SPIOs mediante un magnetómetro (SQUID).....	89
Figura 36. Migración <i>in vitro</i> de MSCs marcadas con SPIOs mediante la aplicación de un campo magnético	91
Figura 37. Análisis ultraestructural de las mBMSCs-SPIOs después de su migración <i>in vitro</i>	93
Figura 38. Estudio del campo magnético generado combinando electroimán e imán permanente.....	95
Figura 39. Gradiente del flujo magnético generado por las bobinas electromagnéticas en combinación con el imán permanente situado en el casco.....	96
Figura 40. Gradiente del flujo magnético generado por dos imanes permanentes en combinación con el imán permanente situado en el casco.....	97
Figura 41. Registro de imagen mediante resonancia magnética (RM).....	98
Figura 42. Tinción de Perls para el recuento de rASCs-SPIOs en el tejido cerebral.....	99
Figura 43. Análisis del recuento de rASCs-SPIOs en el tejido cerebral después de su administración IV.....	100
Figura 44. Análisis ultraestructural de las rASCs-SPIOs en el tejido cerebral después de su infusión intravenosa sin la aplicación de un campo magnético.....	102
Figura 45. Estudio morfológico de las rASCs-SPIOs en el tejido cerebral después de su infusión intravenosa durante la aplicación de un campo magnético.....	104
Figura 46. Inmunofluorescencia del microambiente de las rASCs-SPIOs alojadas en el tejido cerebral.....	106
Figura 47. Estudio morfológico de rASCs-SPIOs después de 72 horas de su inyección intracerebral.....	108

Índice de tablas

Material y métodos

Tabla 1. Listado de anticuerpos utilizados para la caracterización mediante citometría de flujo de las MSCs después de su aislamiento.....41

Tabla 2. Relación de animales totales incluidos en cada grupo experimental y número de ellos utilizados para cada una de las técnicas especificadas.....49

Tabla 3. Listado de anticuerpos primarios.....58

Tabla 4. Listado de anticuerpos secundarios.....58

Resultados

Tabla 5. Relación de datos obtenidos en el conteo de células Perls+ en el tejido cerebral100

Abreviaturas

ACC arteria carótida común.
ACE arteria carótida externa.
ACI arteria carótida interna.
AG aparato de Golgi
AIT accidente isquémico transitorio
AO arteria occipital
APP arteria pterigopalatina
ATS arteria tiroidea superior
ASCs células madre mesenquimales de tejido adiposo
BHE barrera hematoencefálica
ESCs células madre embrionarias
GA glutaraldehído
hASCs células madre mesenquimales de tejido adiposo humano
IA intraarterial
IL interleucina
iPSCs células madre pluripotentes inducidas
IV intravenosa
kV kilovoltios
μl microlitros
mm milímetros
μm micrómetros
mT militeslas
MCA arteria cerebral media
MET microscopía electrónica de transmisión
MHC complejo mayor de histocompatibilidad
MO microscopía óptica
MSCs células madre mesenquimales adultas
MSCs-SPIOs células madre mesenquimales marcadas con hierro
mBMSCs células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea de ratón
NSCs células madre neurales
PFA paraformaldehído
PAS presión arterial sistólica
PBS tampón fosfato salino
PC perfusión cerebral
PLL poli-L-lisina
REL retículo endoplasmático liso
RER retículo endoplasmático rugoso.
RM resonancia magnética
SNC sistema nervioso central
rASCs células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata
SPIOs nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro
V-SVZ zona ventricular-subventricular

Resumen

La terapia con células madre mesenquimales (MSCs) resulta una opción prometedora para el tratamiento después del infarto cerebral, debido a las ventajas que presentan éstas frente a otros tipos de células madre: (i) pueden obtenerse en la práctica clínica mediante técnicas mínimamente invasivas, (ii) su cultivo primario y expansión *in vitro* resultan muy eficientes, (iii) poseen tropismo por las zonas lesionadas (*homing*) y (iv) tienen capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria en el organismo receptor. Todo ello, ha hecho que se conviertan en unas perfectas candidatas como agente terapéutico después del ictus, habiendo concluido varios ensayos clínicos con una mejor recuperación funcional después de su infusión intravenosa y con un excelente perfil de seguridad. Sin embargo, los estudios llevados a cabo en modelos animales utilizando dicha ruta de administración, muestran de forma reiterada un tasa de injerto muy baja de las MSCs en el órgano diana. Así, con la finalidad de potenciar el efecto local ejercido por las células en el tejido cerebral lesionado, en el presente trabajo hemos diseñado un sistema de direccionamiento magnético *in vivo* de las MSCs durante su infusión endovenosa. Para ello, les hemos conferido propiedades magnéticas gracias a la internalización de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIOs) y hemos conseguido una tendencia al aumento de la retención celular dentro del tejido cerebral, siendo potenciado este efecto de forma proporcional al volumen de la lesión. Además, mediante el estudio ultraestructural e inmunohistoquímico del microambiente de las MSCs en el parénquima cerebral, hemos apreciado que su viabilidad se encuentra claramente comprometida y el sistema inmune endógeno las ha reconocido iniciando procesos de fagocitosis. De estos resultados podemos concluir que, el direccionamiento magnético resulta una interesante estrategia en el ámbito clínico para la retención de las MSCs en el tejido cerebral lesionado después del ictus, pudiendo potenciar así la liberación de mediadores bioquímicos presentes en ellas aunque durante un tiempo limitado y como consecuencia, poder maximizar los efectos beneficiosos observados en estudios previos.

Introducción

1. Introducción

1.1. La enfermedad cerebrovascular: definición y epidemiología.

Las enfermedades cerebrovasculares son todas aquellas alteraciones encefálicas secundarias a un trastorno vascular. Su manifestación aguda se conoce con el término *ictus*, cuyo significado en latín es «golpe», puesto que su presentación suele ser súbita y violenta. Así, el ictus corresponde al trastorno neurológico que tienen lugar a causa de una disminución brusca del aporte sanguíneo cerebral. Existe común acuerdo en evitar términos más confusos o menos explícitos, como «accidente vascular cerebral» o similares, y optar por el término ictus en analogía con el uso del vocablo «*stroke*» en inglés, puesto que dicha denominación une a la naturaleza cerebrovascular la connotación del carácter agudo del episodio (Diez-Tejedor et al. 2001).

El ictus constituye un problema de salud pública de primer orden. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en los países desarrollados es una de las primeras causas de muerte, junto con la enfermedad cardiovascular y el cáncer y además, constituye la primera causa de discapacidad permanente en la edad adulta. Muchos de los pacientes que sobreviven sufren secuelas importantes que les limitan en sus actividades de la vida cotidiana, por lo que desde una perspectiva socioeconómica, se estima que consume aproximadamente el 4% del gasto sanitario total en los países desarrollados (World Health Organization 2012).

En concordancia a los datos de la OMS, en nuestro país el ictus supone el condicionante más importante de discapacidad permanente en el adulto, la segunda causa de muerte de la población (la primera en las mujeres), la segunda causa de demencia después del Alzheimer, y el motivo más frecuente de hospitalización neurológica, constituyendo alrededor de un 70% de los ingresos en los servicios de neurología (Brea et al. 2013). Además, la supervivencia tras el ictus no va unida a una recuperación total, ya que hasta un 90% de los pacientes quedan con secuelas que hasta en el 35-45% de los casos incapacitan al individuo de forma parcial o total para su autonomía en las actividades de la vida cotidiana. Dicho aspecto resulta de especial importancia, teniendo en cuenta que el 25% de los ictus afectan a personas todavía en situación laboral activa (Matias-Guiu et al. 2009). Por ello, el ictus se

convierte no sólo en un problema de salud, si no en un problema de gran relevancia también a nivel económico y social, por la dependencia producida por la enfermedad.

1.2. Clasificación del ictus y su fisiopatología.

El término ictus engloba diversos trastornos dentro de la enfermedad cerebrovascular aguda. Su clasificación más sencilla y extendida es la que hace referencia a su naturaleza (*Figura 1*), dividiéndose en dos grandes grupos: aproximadamente el 85 % son de tipo isquémico, producidos como consecuencia de la falta de aporte sanguíneo al encéfalo; y el 15% restantes son de tipo hemorrágico, debido a la extravasación de sangre por la rotura de un vaso sanguíneo intracraneal (Fuentes et al. 2012).

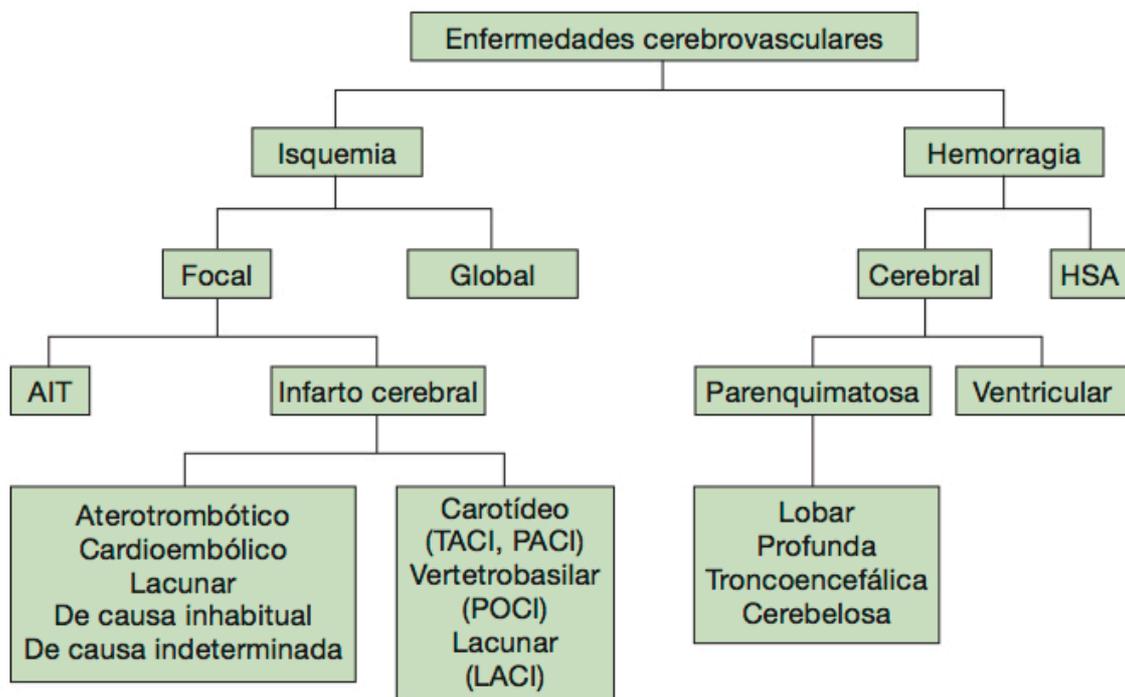


Figura 1. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular según su naturaleza. AIT: Ataque isquémico transitorio; HSA: hemorragia subaracnoidea; TACI: infarto total de la circulación anterior; PACI: infarto parcial de la circulación anterior; POCI: infarto de la circulación posterior; LACI: infarto lacunar. Modificado de (Diez-Tejedor et al. 2001) y (Arboix et al. 2002).

Dentro del ictus isquémico y atendiendo a la zona del encéfalo afectada durante el accidente cerebrovascular, se distingue por una parte (i) la isquemia global, en la que se compromete todo el encéfalo de forma simultánea y, por otra, (ii) la isquemia

focal, cuando se afecta únicamente una zona determinada del encéfalo. Esta última es la forma más frecuente de afectación vascular del cerebro. En cuanto a la clínica asociada al proceso isquémico focal, se distingue entre accidente isquémico transitorio (AIT) e infarto cerebral. Convencionalmente se considera un AIT al episodio isquémico focal de duración inferior a las 24 horas, siendo reversible y sin suponer un déficit neurológico permanente tras su finalización. En cambio, se denomina infarto cerebral al conjunto de manifestaciones clínicas, de neuroimagen o patológicas permanentes que aparecen como consecuencia de la alteración en el aporte sanguíneo a una zona del encéfalo, produciendo una necrosis tisular y determinando un déficit neurológico focal habitualmente de duración mayor a 24 horas (Diez-Tejedor et al. 2001). Recientemente, teniendo en cuenta que el tratamiento precoz es la única posibilidad terapéutica hasta el momento en estos pacientes, el límite temporal de 24h para definir AIT o ictus ha dejado de ser operativo, y se considera ictus (a efectos de tratamiento) toda focalidad neurológica que no se haya resuelto cuando el paciente es valorado por Neurología en el ámbito hospitalario, independientemente de cuándo se inició.

1.2.1. Fisiopatología del ictus

La comprensión moderna de la fisiopatología del ictus se extiende mucho más allá de los efectos inmediatos del deterioro de la circulación sanguínea local. El daño cerebral en el accidente cerebrovascular es el resultado de una multitud de mecanismos altamente complejos. Como el cerebro tiene una demanda muy alta de oxígeno y glucosa, una interrupción de la circulación conduce principalmente a un agotamiento de los sustratos en cuestión de minutos y a la acumulación de metabolitos tóxicos, conduciendo a un déficit de energético en el tejido afectado. Así, el resultado es un daño funcional o incluso estructural de las células, dependiendo del grado y la duración de este déficit energético (Murphy et al. 2008).

Concepto de penumbra isquémica: eventos espacio-temporales después del ictus

En el cerebro isquémico se pueden distinguir dos áreas de tejido: el núcleo del infarto o *core* y la zona circundante que se denomina penumbra isquémica (*Figura 2*). En la actualidad, está generalmente aceptado que no todas las células cerebrales mueren inmediatamente después del ictus, sino que la muerte celular avanza en un *continuum* definido principalmente, por un frente de penumbra perilesional (Bandera et al. 2006; Baron 1999; Jung et al. 2013). Casi inmediatamente después de la oclusión del vaso, se define el núcleo isquémico donde las células están destinadas a morir a menos que se pueda lograr una rápida restauración del flujo sanguíneo. La reducción masiva del flujo sanguíneo en el core, conduce a una alteración del metabolismo

Introducción

celular y el suministro de energía, así como la homeostasis iónica y una pérdida consecutiva de la integridad celular. El resultado es la muerte celular en cuestión de minutos: la necrosis de las células y del tejido que las rodea (Pulsinelli 1992).

Los vasos sanguíneos colaterales proporcionan circulación residual en la zona de penumbra circundante. Este tejido es funcionalmente silente aunque metabólicamente todavía activo y por lo tanto salvable (Astrup et al. 1981). Sin embargo, la alteración de la homeostasis celular en la penumbra conduce a una muerte celular lenta y a un aumento dilatado en el tiempo de la lesión, convirtiéndose el tejido cerebral previamente viable en tejido infartado. Así, en la zona de penumbra, las cascadas apoptóticas e inflamatorias de señalización desempeñan un papel importante en el curso de la evolución de la enfermedad (Siesjo 1992).

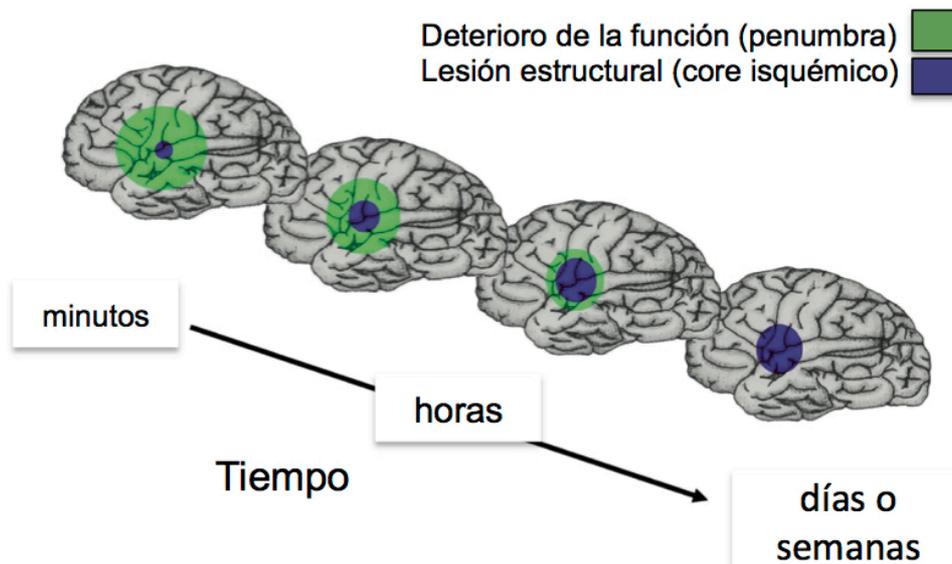


Figura 2. Core isquémico y zona de penumbra. El núcleo isquémico, una región donde el flujo sanguíneo cerebral se ha reducido por debajo de un umbral crítico en el que la muerte celular y el daño estructural son inevitables, rodeado por la zona de penumbra. En la penumbra prevalece flujo sanguíneo cerebral residual y las células se encuentran deterioradas funcionalmente pero viables. Desde el inicio del déficit de la perfusión, tanto el núcleo como la penumbra son dinámicos en espacio y tiempo, lo que puede resultar en el crecimiento del núcleo a través de la penumbra si no se inicia una reperusión suficiente. Modificado de (Kunz et al. 2010).

Eventos fisiopatológicos posteriores a la isquemia

Entre el inicio del infarto cerebral y la muerte celular, tienen lugar una serie de reacciones químicas que son responsables de la progresión del daño, la denominada *cascada isquémica*. (Figura 3)(Khoshnam et al. 2017). Se sabe que después del ictus se desencadenan mecanismos que promueven activamente la muerte celular, aunque por el momento no se conozcan con exactitud ni su distribución en el tiempo ni todos

los elementos que componen las rutas celulares implicadas. Así, los mecanismos que finalmente ocasionaran la muerte de las células afectadas serán la necrosis y la apoptosis (Lo et al. 2005; Dirnagl et al. 1999).

La necrosis se caracteriza por cambios edematosos en la célula, produciéndose el hinchamiento y la lisis celular. Además, este tipo de muerte celular induce a la respuesta inflamatoria. Se trata de un fenómeno pasivo desencadenado por las alteraciones bioquímicas producidas durante el déficit energético originado por la isquemia, produciendo un incremento del calcio intracelular y la liberación de aminoácidos excitatorios con la consecuente excitotoxicidad (J. H. Weiss et al. 1993; Lo et al. 2003). Todo ello desencadena la producción de mediadores del daño isquémico como la producción de radicales libres y el peroxinitrito, la calpaína, las fosfolipasas y la activación de poli-ADP-ribosa polimerasa, finalizando con la destrucción celular (J. Chen et al. 1998; Endres et al. 1999; Furukawa et al. 1997).

Mientras que la muerte neuronal y de las células gliales en el core isquémico del infarto tiene lugar mediante una muerte rápida por necrosis (en cuestión de minutos u horas) o por la excitotoxicidad generada, la apoptosis comienza de forma simultánea principalmente en la región de penumbra, pero puede durar días (Lo et al. 2005; Kunz et al. 2010). Este tipo de muerte celular depende del inicio de una cascada de eventos iniciada como consecuencia de un daño en el SNC, en este caso la isquemia (Galluzzi et al. 2009). Se encuentra bien caracterizada, por una serie de cambios morfológicos como la formación de cuerpos apoptóticos, bioquímicos como la fragmentación del ADN, moleculares como la activación de caspasas y por fenómenos de autofagocitosis (Majno & Joris 1995). Además, oleadas de despolarización posteriores al evento isquémico pueden comprometer de forma secundaria el balance energético de las neuronas en la zona de penumbra y, a su vez, la inflamación provocada por la necrosis puede contribuir también al daño tisular en esta región, ayudando a la propagación de la lesión desde el core hacia la periferia (Astrup et al. 1981; Nedergaard & Hansen 1993).

Como hemos comentado, la isquemia cerebral viene acompañada por una reacción inflamatoria en el tejido afectado, la cual puede durar desde días hasta semanas después del evento isquémico. Este proceso inflamatorio, contribuye al progreso de la lesión cerebral agravando los déficits neurológicos focales. Sin embargo, también se ha demostrado que la inflamación post-isquémica conlleva ciertos efectos beneficiosos como, por ejemplo, la reparación del tejido en el contexto de la tolerancia isquémica, de la cual hablaremos más adelante dentro de las

Introducción

estrategias terapéuticas actuales después del infarto cerebral (Dirnagl et al. 2009; Iadecola & Alexander 2001).

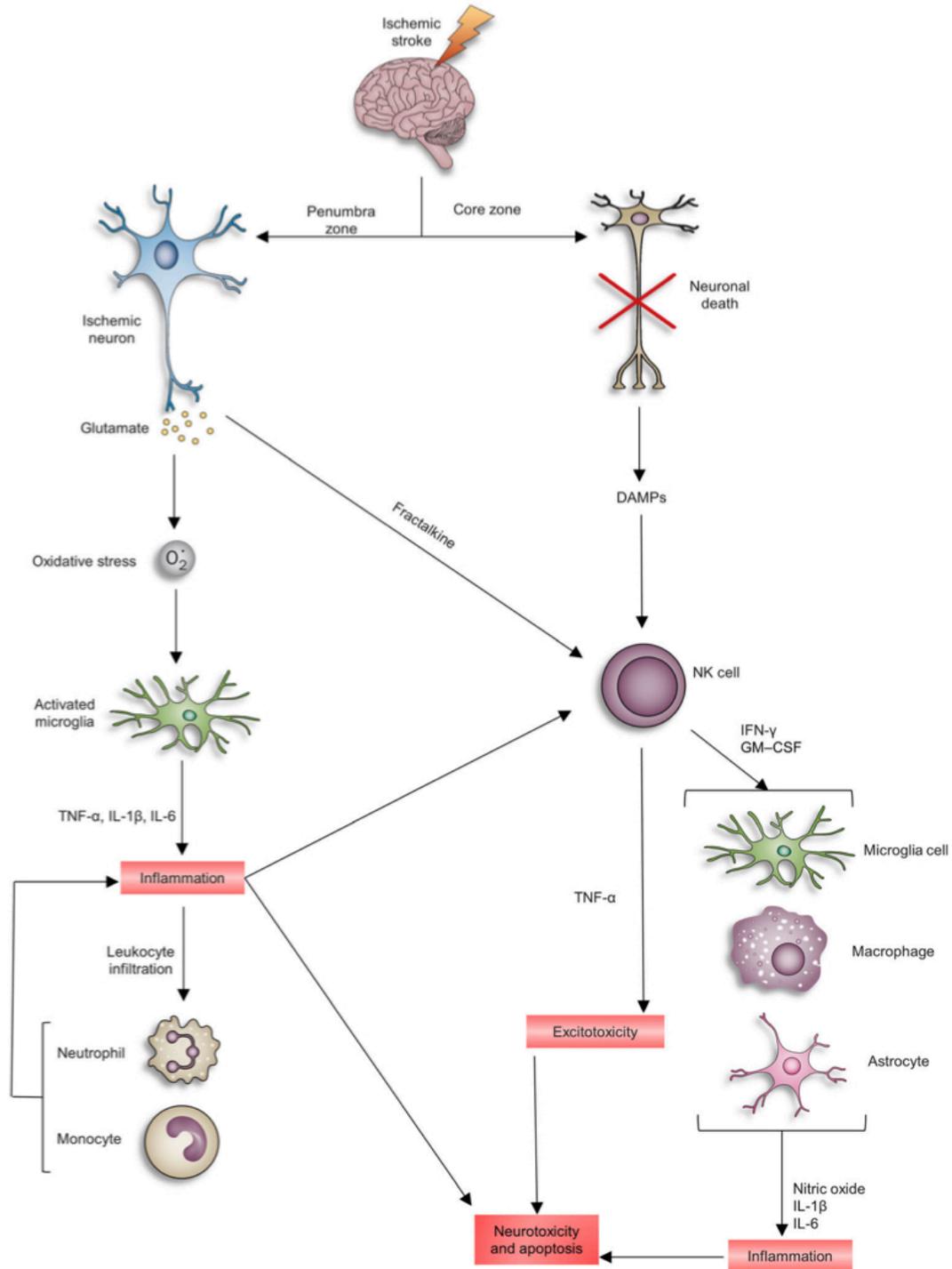


Figura 3. Esquema de los efectos de la isquemia cerebral sobre la inflamación citoquinas y células inmunes y su contribución a la neurotoxicidad. La isquemia cerebral causa una disminución del suministro de sangre en la penumbra y desencadena una cascada compleja de eventos que incluyen excitotoxicidad y estrés oxidativo en las neuronas isquémicas. Estas cascadas conducen a la activación microglial y a la liberación de citoquinas tales como $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$. Estas citoquinas pueden potenciar la inflamación por reclutamiento e infiltración de los neutrófilos, monocitos y las células T en la lesión cerebral. (Khoshnam et al. 2017)

En lo que respecta a los eventos bioquímicos, durante la etapa temprana después del ictus la expresión génica es regulada por factores de transcripción que promueven la inflamación o la muerte celular después de isquemia (como p.e. NF- κ B, IRF-1 o C/EBP β), aunque también tiene lugar la activación de otros factores de transcripción que median efectos neuroprotectores (como es el caso de HIF-1), implicados en el fenómeno de la mencionada tolerancia isquémica (Iadecola & Alexander 2001; Yi et al. 2007; Prass et al. 2003).

Por otra parte, las citoquinas proinflamatorias son importantes señalizadores moleculares liberados en el tejido dañado poco después del evento isquémico. Entre ellas podemos destacar el factor de necrosis tumoral α (TNF α), las interleucinas (IL-1b y IL-6) y el interferón χ (IF χ), así como varias quimioquinas (Iadecola & Alexander 2001; Yi et al. 2007; Q. Wang et al. 2007). A su vez, las citoquinas inducen la expresión de moléculas de adhesión como moléculas de adhesión intracelulares (ICAM-1), moléculas de adhesión vascular (VCAM), selectinas (en particular selectinas P y E) e integrinas en células endoteliales, leucocitos y plaquetas (Iadecola & Alexander 2001; Q. Wang et al. 2007). La acumulación temprana de células inflamatorias de origen sanguíneo en la zona de isquemia persiste durante horas incluso días desde el evento isquémico. Sin embargo, la respuesta inflamatoria no se limita a las células de la médula ósea ni de la sangre, sino que coincidiendo con la infiltración de los leucocitos, se activan las células inmunocompetentes residentes en el cerebro como la microglía y los astrocitos (Q. Wang et al. 2007). Al conjunto de todos estos elementos implicados en el proceso inflamatorio después de la isquemia cerebral lo denominamos la “unidad neurovascular”, y supone una importante diana terapéutica como veremos en el siguiente apartado.

1.3. Tratamiento después del infarto cerebral.

Entre los tratamientos disponibles en el ictus isquémico agudo, únicamente se ha demostrado una eficacia clara en el caso de la trombólisis o trombectomía endovascular, consistente en la eliminación del coágulo causante de la disrupción del flujo sanguíneo cerebral. Aunque la gestión del ictus en el ámbito clínico ha mejorado notablemente en la última década debido principalmente al establecimiento de estas técnicas en la práctica clínica, pocos pacientes se pueden beneficiar de ella debido a su limitada ventana terapéutica de 4,5 horas para la trombólisis y 6h para la trombectomía según las últimas guías clínicas (Jauch et al. 2013; Emberson et al.

Introducción

2015; Tsvigoulis et al. 2017). Por otra parte, con la mayoría de tratamientos farmacológicos que han resultado eficaces en los estudios de experimentación animal, no se han detectado beneficios evidentes en los ensayos clínicos posteriores. Así pues, la combinación de la trombólisis junto con algunos fármacos ha ofrecido resultados favorables en la investigación básica pero a la hora de su traslación al ámbito clínico tampoco se han obtenido datos suficientes para extraer conclusiones con una base sólida (Christophe et al. 2017). En este sentido, las terapias centradas en la estimulación de la plasticidad cerebral o la terapia celular, han demostrado cierta eficacia tanto en modelos animales como en ensayos clínicos posteriores, por lo que constituyen una línea de investigación en desarrollo con perspectivas terapéuticas prometedoras.

Los estudios pre-clínicos de los distintos tratamientos para el ictus, se han llevado a cabo en su mayoría en pequeños animales (p.e. ratón, rata o conejo). La rata en concreto, ha sido el modelo más utilizado en el infarto cerebral por varias razones: la vasculatura cerebral y la fisiología son similares a las del cerebro humano (Yamori et al. 1976); el tamaño moderado de su cuerpo permite una fácil monitorización de los parámetros fisiológicos; el pequeño tamaño de su cerebro es adecuado para procedimientos de fijación (Ponten et al. 1973); existe una homogeneidad relativa dentro de las cepas (Strom et al. 2013); y, sobre todo, es un modelo que permite realizar estudios reproducibles. En cuanto a los procedimientos utilizados para originar el infarto cerebral, existe una amplia gama con diferentes estrategias, cada uno de ellos con sus correspondientes ventajas e inconvenientes. Por ejemplo, con la cauterización o la trombosis de la arteria cerebral media (MCA) se consiguen lesiones sutiles y localizadas en la corteza parietal (Mora-Lee et al. 2011), mientras que el modelo de inserción intraluminal transitoria de un filamento en la MCA provoca lesiones más difusas que dependen de la duración de la oclusión: pueden verse afectadas estructuras como el estriado y la corteza frontoparietal y temporal, así como porciones de la corteza occipital, incluso en ocasiones induce al infarto del tálamo o el hipotálamo (Garcia et al. 1995).

Por este motivo, de forma acorde a las recomendaciones de la *Mesa Redonda Académica de la Industria para la Terapia del Ictus* (STAIR), el resultado positivo de un tratamiento en una determinada especie siempre deberá ser verificado en otra especie y, además, ser replicado en otro modelo de infarto (p.e. mediante un modelo de oclusión permanente y posteriormente otro de oclusión transitoria)(Fisher et al. 2009).

1.3.1. Concepto de “ventana de oportunidad” terapéutica

Gracias a la constante investigación centrada en el ictus, se ha llegado a una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos subyacentes a nivel celular y molecular durante la isquemia y la reperfusión del tejido cerebral, lo que ha derivado en la investigación opciones terapéuticas muy diversas. Está bien establecido que, independientemente del tratamiento que se realice, debe llevarse a cabo de forma temprana y se debe centrar en dos aspectos fundamentales: la reperfusión y la protección del tejido isquémico mediante la inhibición de los mediadores de daño celular. Así, el concepto de ventana terapéutica implica el período dentro del cual la restitución del flujo sanguíneo regional y otras medidas citoprotectoras pueden evitar la muerte de las células potencialmente viables, mientras que si este tiempo se sobrepasa, cualquier medida terapéutica no resultará beneficiosa (Pulsinelli et al. 1997).

1.3.2. Protección cerebral

Como ya hemos mencionado anteriormente, el factor tiempo en la evolución del tejido afectado es crucial para “rescatar” el mayor número de células posibles en la zona de penumbra. Por este motivo, gran parte de las investigaciones para el desarrollo de terapias futuras esta relacionada con la protección cerebral endógena (Dirnagl et al. 2003) que tiene lugar desde los minutos iniciales de la isquemia hasta los días posteriores y la reparación celular (*Figura 4*).

Protección farmacológica

Aunque existen varios agentes terapéuticos como los antagonistas de receptores de NMDA, bloqueadores de canales de calcio o antioxidantes, que se han utilizado en la clínica o se están evaluando, hay una importante controversia entre los beneficios de éstos y las propiedades de un fármaco ideal para el tratamiento del ictus. Puesto que la mayor parte de ensayos clínicos basados en la terapia farmacológica han fracasado, ha sido necesario buscar un nuevo enfoque no dirigido únicamente hacia la protección neural, sino también hacia una función angioprotectora de la unidad neurovascular. Así, el sistema vascular cerebral responde regulando el aumento de la expresión de factores tróficos, quimiocinas y moléculas de adhesión involucradas en los procesos de reparación a través de la protección cerebral (Ohab et al. 2006).

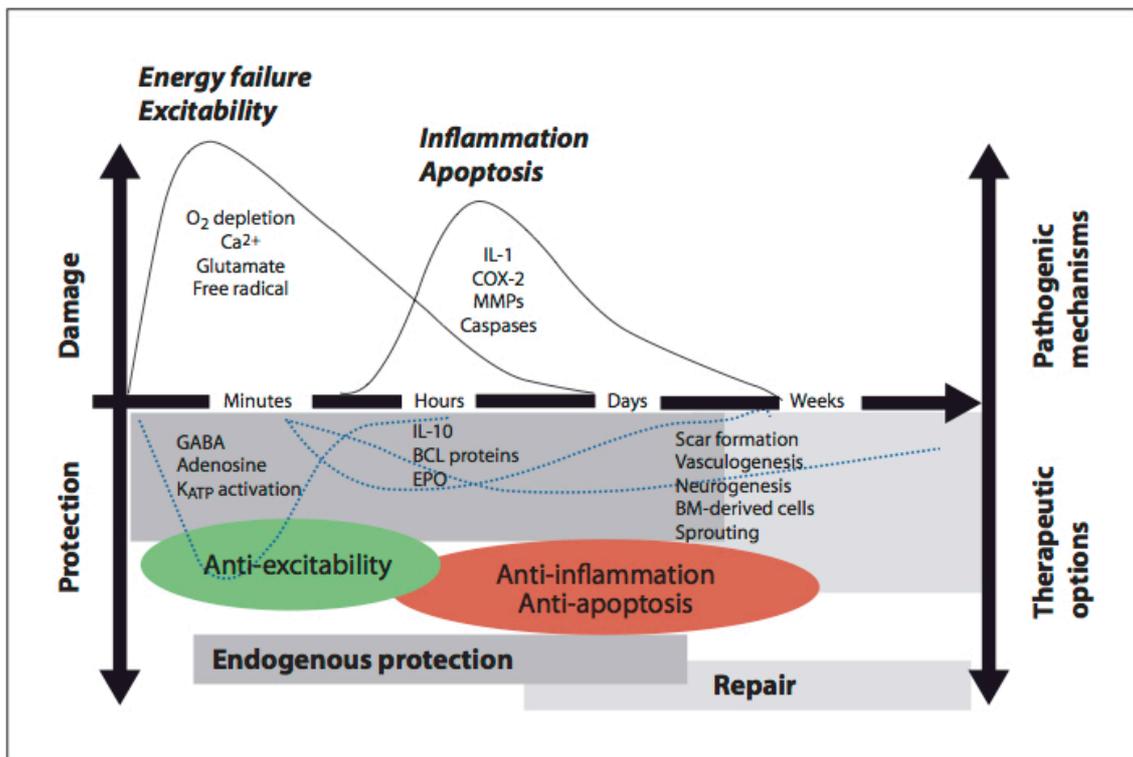


Figura 4. Relación de mecanismos patogénicos después del infarto cerebral y las opciones terapéuticas disponibles. La liberación de mediadores de daño tras la lesión, pone en marcha la activación de mecanismos patogénicos como la inflamación y la apoptosis, que a su vez activan mecanismos de protección y reparación (anti-excitatorios, anti-inflamatorios, anti-apoptóticos) desde los primeros minutos hasta semanas después del infarto cerebral para evitar la progresión del daño y reparar la lesión producida por la isquemia (Gutiérrez et al. 2009).

Existen varias estrategias dirigidas hacia una mayor protección contra las consecuencias de la isquemia cerebral. Los objetivos de estas terapias son proteger el tejido isquémico, limitar el tamaño del infarto, prolongar la ventana terapéutica para la reperfusión, minimizar el daño producido durante la reperfusión post-isquémica o daño inflamatorio y limitar el riesgo de hemorragias. En este sentido, la mayoría de los neuroprotectores farmacológicos que han demostrado eficacia en estudios experimentales han fallado en estudios clínicos. Así, la evaluación de parámetros como la eficacia, la farmacocinética y la toxicidad entre los datos experimentales preclínicos y clínicos reflejan la importante variabilidad de las condiciones experimentales en el laboratorio y el estado real en la clínica (Alonso de Leciñana et al. 2001; Grotta 1999).

Otros resultados sugieren que hay que tener en cuenta una conclusión importante: la inhibición de mediadores de la cascada isquémica de forma aislada parece tener poco éxito, especialmente en el caso de mediadores cuya producción y acción ocurren muy temprano. Esto sólo serviría, probablemente, para promover el

resto de los mecanismos perjudiciales. Con la utilización de algunos fármacos neuroprotectores que inhiben diversos mecanismos implicados simultáneamente o que actúan sobre una ruta común podría superarse esta limitación, sin embargo, antagonistas del calcio (Horn et al. 2001; Mohr et al. 1994), *lubeluzol* (Gandolfo et al. 2002; Muir & Lees 2003) o magnesio (Muir et al. 2004) suponen efectos secundarios indeseables que han superado a los beneficios obtenidos a pesar de haberse encontrado cierta eficacia en los ensayos clínicos. En otros estudios utilizando *ebsele*n (Ogawa et al. 1999), *piracetam* (Ricci et al. 2012) o *clometiazol* (Wahlgren et al. 2000; Lyden et al. 2002), los resultados han sido muy inconsistentes.

Trombólisis-reperfusión combinada con agentes farmacológicos

La eficacia clínica de la trombólisis intravenosa con activador tisular del plasminógeno (rtPA) ha sido demostrada. Sin embargo, hasta ahora su uso ha sido limitado por su estrecha ventana terapéutica (4,5 horas), por sus complicaciones derivadas esencialmente del riesgo de hemorragia, y por el daño potencial en el proceso de reperfusión (Hacke et al. 1998; Hacke et al. 1999; Marler et al. 2000; Hacke et al. 2004). Por ello, el tratamiento óptimo en el caso de la isquemia cerebral focal podría ser la combinación de la re-perfusión y la neuroprotección tempranas. Así, existen evidencias en estudios con modelos animales que apoyan esta hipótesis, encontrando que la combinación de ciertos neuroprotectores junto con la trombólisis es más beneficiosa que los efectos de cada uno de ellos por separado (Andersen et al. 1999; Meden et al. 1993; Alonso de Leciana et al. 2006; Sereghy et al. 1993). Sin embargo, los ensayos clínicos posteriores no han sido capaces de reproducir los beneficios observados en la investigación básica (Lyden et al. 2001; Grotta 2001).

Pre-condicionamiento para la neuroprotección.

Después de un ictus, además de las cascadas destructivas, se activan los mecanismos de protección endógena (como hemos visto en la *Figura 4*). Estos mecanismos de neuroprotección endógena y de tolerancia isquémica han sido intensamente estudiados en diferentes modelos animales de pre-condicionamiento (Kirino et al. 1991; Matsushima & Hakim 1995; Perez-Pinzon et al. 1997; Stagliano et al. 1999). El principio del pre-condicionamiento es lograr un estado de protección a través de un estímulo nocivo (desencadenante) aplicado por debajo pero cerca del umbral de daño. Tal estímulo, induce a una protección frente a posteriores accidentes de mayor gravedad. Así, se ha observado que una gran variedad de estímulos inducen cierta tolerancia a la isquemia, además de la propia tolerancia *per se* ("tolerancia isquémica"): la hipoxia, las especies reactivas del oxígeno, la inflamación y distintos tipos de drogas entre otros, pueden servir como estímulos a la hora de inducir dicha

tolerancia. En el pre-condicionamiento, la tolerancia isquémica tiene lugar dentro dos ventanas tras la inducción: la ventana temprana de tolerancia, que tiene lugar de 5-120 min después de la estimulación (pre-condicionamiento clásico) y una ventana tardía (pre-condicionamiento atrasado), producida después de una latencia de aproximadamente 24-72 horas (Figura 5). Sin embargo, aproximadamente después de 7 días después de la inducción, ya no se puede detectar la protección desarrollada.

Tipos de tolerancia isquémica

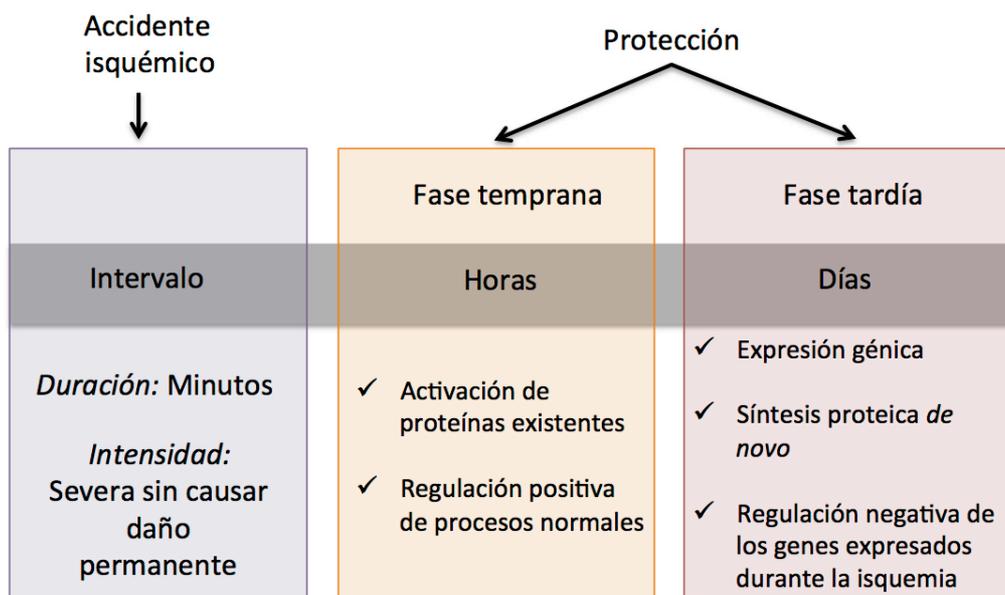


Figura 5. Ventanas de tolerancia isquémica. La protección inducida por el pre-condicionamiento isquémico puede ser temprana/breve o tardía/permanente. Cada una de ellas implica mecanismos diferentes.

En lo que respecta a las bases moleculares de la tolerancia isquémica, tienen lugar en tres etapas: (i) la etapa de inducción, en la que los sensores moleculares (principalmente receptores, canales y reguladores) se activan a través de factores de transcripción; (ii) la etapa de transducción, en la que ciertas proteinquinas, factores de transcripción, y mediadores para- y autocrinos (como factores de crecimiento) amplifican la señal de condicionamiento para la preparación para la fase final; y por último, (iii) la etapa efectora, dentro de la cual se activan las proteínas con propiedades protectoras directas (antiapoptóticas, antiinflamatorias, antioxidantes, etc.) (Mergenthaler & Dirnagl 2011).

Mientras que el pre-condicionamiento es una de las estrategias anti-isquémicas más estudiadas en la actualidad, su potencial clínico en enfermedades neurológicas permanece aún inexplorado. Así, el objetivo de las investigaciones centradas en el

pre-condicionamiento isquémico es identificar los receptores celulares, protectores endógenos subyacentes y las cascadas de señalización implicadas en los mecanismos de tolerancia, todo ello con el objetivo de desarrollar terapias que promuevan los mecanismos de protección endógenos y, a su vez, diseñar nuevas estrategias neuroprotectoras en el marco farmacológico.

1.3.3. Plasticidad cerebral para la reparación.

Como hemos visto, muchos de los estudios están centrados en el desarrollo de tratamientos en la fase aguda, pero no podemos olvidar que el ictus conduce a la discapacidad en un alto porcentaje de pacientes. Por tanto, es necesario tener en cuenta terapias de apoyo a las terapias tradicionales de rehabilitación para mejorar las posibilidades de recuperación mediante el fomento de la plasticidad cerebral. Existen una serie de mecanismos interrelacionados implicados en la plasticidad cerebral como la angiogénesis, la neurogénesis o la sinaptogénesis, los cuales pueden contribuir activamente a la reparación de la unidad neurovascular como veremos a continuación.

La unidad neurovascular

Después del infarto cerebral, un importante sitio de inflamación es la unidad neurovascular (*Figura 6*), compuesta por un sistema celular complejo que incluye constituyentes sanguíneos circulantes, células endoteliales, pericitos, células portadoras de antígenos perivasculares, astrocitos y neuronas (del Zoppo 2009). Como consecuencia de la isquemia, la integridad de la unidad neurovascular se ve comprometida por mecanismos que incluyen interacciones celulares con el endotelio, estrés oxidativo, sobre-regulación de las proteasas tales como las metaloproteinasas y activadores del plasminógeno, todo ello resultando en la degeneración de la matriz y la consecuente ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) (Tovar y Romo et al. 2015). Así, la unidad neurovascular también constituye un importante blanco terapéutico en el tratamiento de la isquemia cerebral, por lo que terapias de reparación que regulen los mecanismos asociados con la angiogénesis, la neurogénesis o la sinaptogénesis, pueden constituir nuevas herramientas terapéuticas destinadas a paliar el daño originado en la isquemia cerebral.

Angiogénesis, neurogénesis y sinaptogénesis

La isquemia cerebral promueve la formación de nuevos vasos con morfología alterada y estructura microvascular (Wei et al. 2001). Se han descrito varios factores implicados en la angiogénesis después del ictus, tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor inducible por hipoxia (HIF-1). Así pues, la angiogénesis en la frontera isquémica crea un ambiente ideal para la plasticidad

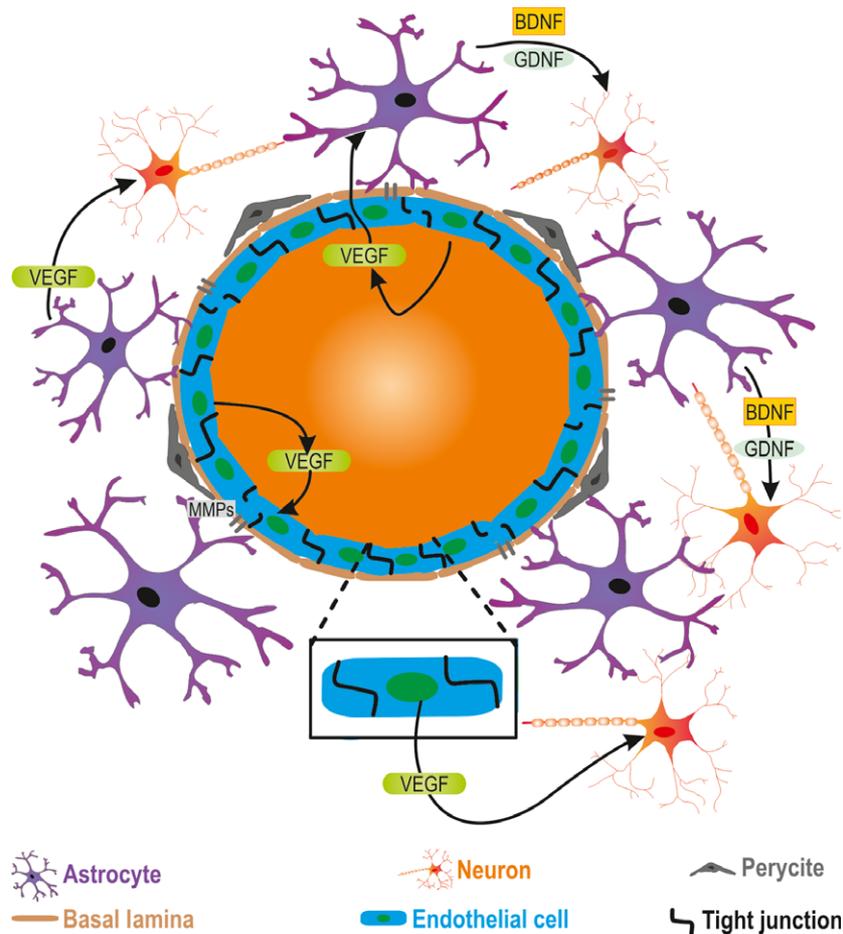


Figura 6. Dinámica de la unidad neurovascular en el tejido cerebral en el período subagudo después de ictus. En las horas siguientes al accidente cerebrovascular, las uniones estrechas en la interfase de las células endoteliales se rompen, los componentes de la lámina basal se degradan por las metaloproteinasas, los astrocitos se vuelven reactivos y el tejido del parénquima cerebral se hincha. Todas estas respuestas podrían estar reguladas por factores tróficos tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), regulados en respuesta a la hipoxia. Estos factores promueven la reorganización estructural de las sinapsis y los vasos, junto con la activación directa de los receptores de la tirosina quinasa expresada tanto en las neuronas como en la glía que contribuyen a mantener la supervivencia neuronal. Además, pueden provocar respuestas adaptativas en astrocitos que estimulan la síntesis y secreción del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y el factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF), que también contribuyen a la preservación de la función neuronal (Tovar y Romo et al. 2015).

neuronal promoviendo la recuperación funcional (Plate 1999), puesto que los vasos sintetizados *de novo* expresan factores tróficos y otros factores solubles que estimulan el reclutamiento de nuevas neuronas y la función sináptica (Leventhal et al. 1999; Bibel & Barde 2000). Además, los vasos generados como respuesta a la lesión isquémica influyen a su vez en la migración y supervivencia de los neuroblastos (Louissaint et al. 2002). Todo esto supone importantes implicaciones del nicho vascular en el proceso de neurogénesis después de la isquemia (Ohab et al. 2006).

La neurogénesis consiste en la generación de nuevas neuronas a partir de células madre neurales (NSCs). Las NSCs son células madre multipotentes, capaces de autorrenovarse y diferenciarse en distintos tipos celulares tales como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Llorens-Bobadilla & Martín-Villalba 2017). Este proceso, además de tener lugar durante estadios embrionarios y postnatales, se ha demostrado que persiste durante la vida adulta en los mamíferos (Altman 1962) y en otros vertebrados como las aves (Alvarez-Buylla 1990), los reptiles (García-Verdugo & Alvarez-Buylla 2002), los anfibios (Kaslin et al. 2008) y los peces (Zupanc 2001). En los mamíferos adultos, los dos principales nichos neurogénicos son el giro dentado del hipocampo (Kempermann 2002; Seri et al. 2001) y la zona subventricular-ventricular (V-SVZ) (Alvarez-Buylla et al. 2008; Doetsch et al. 1999). Existen estudios realizados en roedores adultos que demuestran que después del infarto cerebral, la población de neuroblastos generados en la V-SVZ aumenta, y éstos son reclutados a las zonas circundantes al infarto, siendo capaces de generar neuronas maduras funcionales que sobreviven durante periodos considerables de tiempo (Arvidsson et al. 2002; Parent et al. 2002; Yamashita et al. 2006). Sin embargo, el número de neuronas generadas es demasiado pequeño para que se puedan recuperar las funciones neurológicas (Arvidsson et al. 2002) y uno de estos estudios sugiere que las neuronas generadas poseen fenotipo de inter-neurona (Yamashita et al. 2006), por lo que queda pendiente esclarecer si realmente podrían sustituir a las neuronas perdidas o simplemente ejercerían una función temporal.

Como hemos visto, la recuperación después de la isquemia cerebral es un proceso complejo y dinámico (Wieloch & Nikolich 2006). Después del infarto, la actividad sináptica aumenta en el borde de la lesión, detectada por un aumento de la expresión de proteínas y factores de crecimiento sinápticos (Liao 2005). La plasticidad sináptica está relacionada con cambios en el comportamiento y en la recuperación funcional después del daño cerebral (Nudo et al. 2003), por lo que el aumento de las ramificaciones dendríticas y de la densidad de las espinas resultan potenciales estrategias morfológicas que pueden permitir la reorganización neuronal de los circuitos neuronales en el cerebro (Nudo et al. 2001).

Estrategias para estimular la plasticidad cerebral.

Tanto la neurorehabilitación como la administración de factores tróficos han mostrado potenciales efectos terapéuticos en la fase de recuperación después de la isquemia cerebral, modulando los mecanismos asociados con plasticidad cerebral y la reparación tisular. Numerosos modelos experimentales en ratas y primates, han encontrado una relación negativa entre el lapso de tiempo desde el evento isquémico

y los efectos de la intervención para la rehabilitación (Yang et al. 2003). Además, varios ensayos clínicos han mostrado un efecto considerable con este tipo de terapia si el tratamiento se inicia durante los primeros días después del infarto cerebral, en comparación con ventanas de actuación más tardías (de 20 a 40 días después de la isquemia) (Paolucci et al. 2000).

En lo que respecta a la administración de factores tróficos, también existen estudios de experimentación en animales que han observado un incremento de los niveles de neurogénesis, gliogénesis, y angiogénesis, acompañados por una mejoría funcional durante la recuperación (Kidd 2009). Por ejemplo, la administración intravenosa del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) mejora los procesos de reorganización y las secuelas neurológicas en un modelo experimental de rata (Schabitz et al. 2004). Por otra parte, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor endotelial de crecimiento (EGF2) son potentes estimuladores de la proliferación en la SVZ (Craig et al. 1996; Zheng et al. 2004) y el EGF2 a su vez, aumenta el número de neuronas en el bulbo olfatorio (Kuhn et al. 1997). Así pues, un número considerable de estudios en modelos animales de infarto cerebral han demostrado el efecto neuroprotector y neuroregenerador de factores neurogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)(Sun et al. 2003; Z. G. Zhang et al. 2000; J. Chen et al. 2006), la eritropoyetina (EPO)(Brines et al. 2000; L. Wang et al. 2004) o el factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF)(Schneider et al. 2005; Schabitz et al. 2003), además de los mencionados anteriormente. Sin embargo, la mayoría de los ensayos clínicos que han utilizado dichos factores de crecimiento recombinantes humanos no han encontrado resultados favorables (Revisado por (Chan et al. 2017)). Una de las principales limitaciones ha derivado de la dificultad que conlleva la traslación a la clínica de parámetros como dosis, efectos fuera de destino, problemas de permeabilidad de la BHE o selectividad y la liberación de los agentes terapéuticos. Por este motivo, la promoción de la protección cerebral con la utilización de factores tróficos es un campo con un elevado potencial terapéutico en el ictus, pero todavía pendiente de investigaciones que consigan resolver las cuestiones mencionadas.

1.4. Medicina regenerativa con células madre

La plasticidad cerebral no solo se puede lograr promoviendo la capacidad endógena del cerebro a través de las estrategias desarrolladas en los apartados anteriores, sino que otra alternativa podría ser la administración exógena de elementos que la favorezcan, como sería el caso de la terapia celular.

Las células madre tienen la habilidad de proliferar, la capacidad de auto-renovación y el potencial de diferenciarse a distintos linajes celulares (Klassen et al. 2004). Estas células pueden multiplicarse de forma considerable durante su cultivo *in vitro* y constituyen una herramienta fundamental en la medicina regenerativa. En base a su origen, las células madre se pueden clasificar de forma amplia en células madre embrionarias (ESCs), células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) y células madre adultas (Figura 7).

Las ESCs son células madre pluripotentes aisladas de la masa celular interna de los embriones de temprana edad y tienen la capacidad de generar cualquier célula de las tres líneas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo)(Evans & Kaufman 1981). Este tipo de células madre se han aislado y estudiado a fondo en diferentes especies como el ratón o los primates (Evans & Kaufman 1981; Martin 1981; Marshall et al. 2001; Smith 2001), sin embargo su notable capacidad para formar tumores (Blum & Benvenisty 2008) y las cuestiones éticas y morales derivadas de su obtención, ha limitado de forma importante un enfoque traslacional de los resultados obtenidos en el laboratorio. En este sentido, una posible alternativa a las ESCs podrían ser las iPSCs, las cuales se generan a partir de células adultas por la sobreexpresión de cuatro factores de transcripción (Oct4 / 3, Sox2, Klf4 y c-Myc) o mediante protocolos con ciertas variaciones del protocolo original (Takahashi & Yamanaka 2006; Nakagawa et al. 2008). A nivel celular, las iPSCs son prácticamente similares a las ESCs: tienen capacidad de auto-renovación, potencial de diferenciación y la capacidad de producir quimeras competentes para cada línea germinal (Takahashi et al. 2007; Nakagawa et al. 2008). Así, estudios experimentales que utilizan las iPSCs para el tratamiento del ictus han demostrado mejorar la función motora, reducir el tamaño del infarto, y atenuar las citoquinas inflamatorias mediando la neuroprotección (S.-J. Chen et al. 2010). Sin embargo, para que las iPSCs sean consideradas una buena opción terapéutica se requiere una evaluación más exhaustiva de su alto potencial tumorigénico en determinadas condiciones, una cuestión pendiente de resolver para su utilización en el ámbito clínico (Lindvall & Kokaia 2011; Kawai et al. 2010).

Por otro lado, en la mayoría de los tejidos de individuos adultos, existen pequeñas poblaciones de células indiferenciadas que poseen la capacidad de diferenciarse a tipos celulares maduros cuando la situación lo requiere, dividiéndose a su vez para mantener el balance de células progenitoras indiferenciadas necesario (Fuchs & Segre 2000). Las células madre adultas, desempeñan un papel esencial en el organismo, no sólo por su contribución en la formación de órganos y tejidos, sino sobre todo, por

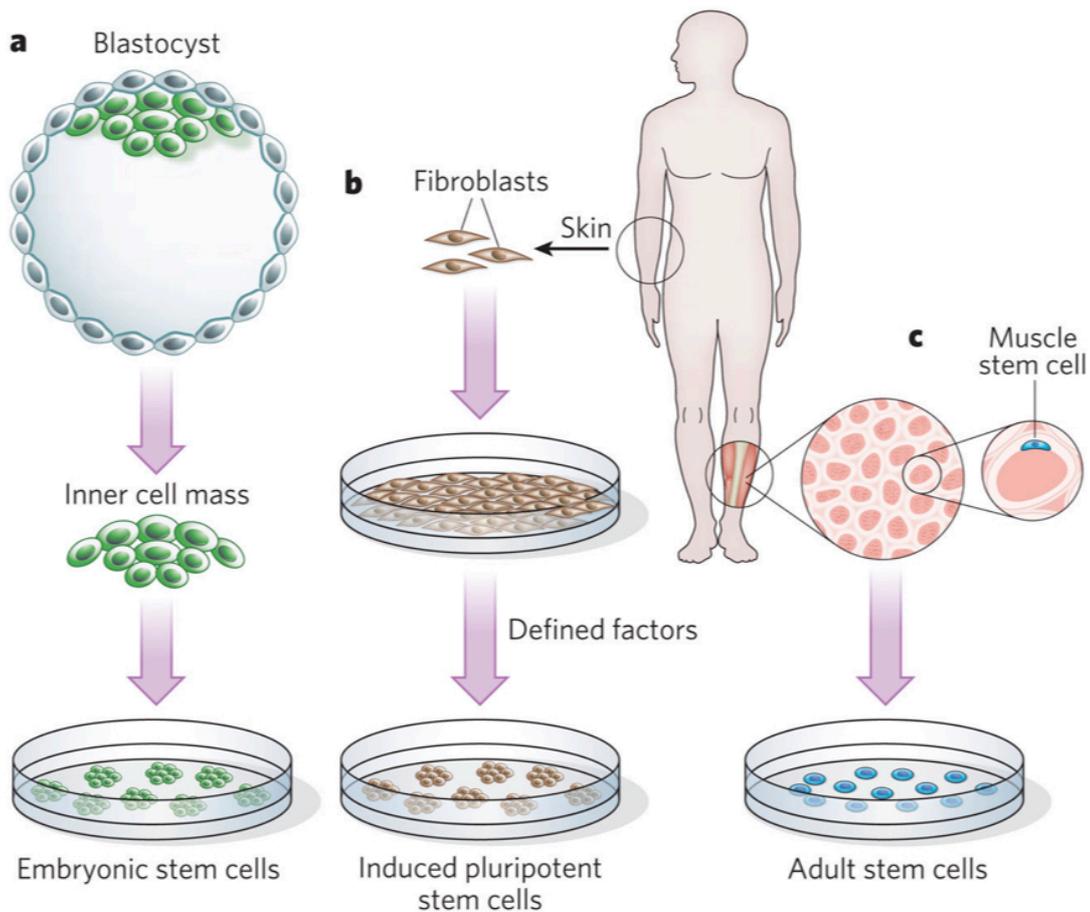


Figura 7. Distintos orígenes de células madre. a) Las células madre embrionarias (ESCs), formadas en etapas tempranas de la embriogénesis, proporcionaron la primera fuente humana de células pluripotentes capaz de diferenciarse para generar cualquier tipo de celular. b) Las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), poseen todas las propiedades de las células madre embrionarias, generadas mediante la introducción de genes que codifican cuatro proteínas en las células somáticas, como por ejemplo los fibroblastos de la piel (Takahashi & Yamanaka 2006). c) Las células madre adultas específicas de tejidos (por ejemplo, células madre musculares) generan su progenie para que se diferencien en tipos de células especializadas. Extraído de (Lutolf et al. 2009).

encargarse del mantenimiento, crecimiento y renovación de los mismos durante todo el proceso de desarrollo ontogénico (Firulli & Olson 1997; Orkin 1998; Edlund & Jessell 1999; Gimble et al. 2007). Este tipo de células madre han sido aisladas a partir de numerosos tejidos adultos como la médula ósea (Clark et al. 2003), la piel (Metcalf & Ferguson 2008), el corazón (Barile et al. 2007), el músculo (Figeac et al. 2007), el cerebro (Reynolds & S. Weiss 1992), o el tejido adiposo (Zuk et al. 2002) y son ampliamente utilizadas en el campo de la medicina regenerativa.

¿Son todas las células madre buenas candidatas para la terapia celular?

En modelos con animales de experimentación, se ha demostrado que la administración de NSCs mejora el crecimiento y el transporte axonal, la actividad dendrítica y la expresión de genes relacionados con la neurogénesis, gliogénesis y

genes asociados al soporte neurotrófico (Xiong et al. 2010; Stroemer et al. 2009; L. H. Shen et al. 2010; Andres et al. 2011). Mientras que el tamaño del infarto no se reduce significativamente, los niveles de muerte celular y las células Bax-positivas (indicativas de fenómenos apoptóticos) disminuyen después de 7 días de tratamiento en los animales, a la vez que la expresión de Bcl-2 (proteínas antiapoptóticas) en la penumbra aumenta y la función neurológica mejora (P. Zhang et al. 2009).

A pesar de los beneficios reportados de la terapia con NSCs en modelos animales de ictus, adoptando un enfoque traslacional este tipo de células madre resultaría poco idóneo para el establecimiento de su utilización en la práctica clínica, basándonos en los criterios establecidos por Gimble y colaboradores para que una célula sea buena candidata para la terapia celular (Gimble et al. 2007). Así pues, los requisitos a tener en cuenta serían los siguientes: (i) ser muy abundante en la fuente de origen en términos de millones o billones de células, (ii) ser extraída con un procedimiento poco invasivo, (iii) ser capaz de diferenciarse hacia diferentes tipos celulares de una manera reproducible, (iv) ser trasplantadas de una manera segura y efectiva a un huésped bien sea autólogo o alogénico y (v) ser manipuladas de acuerdo con la guía práctica de buena manipulación (Gimble et al. 2007). En el caso de las NSCs, su establecimiento en el ámbito clínico no sería factible teniendo en cuenta la principal limitación que supone el requerimiento de una cirugía cerebral abierta para su obtención en caso de trasplante autólogo. Además, otro aspecto que ha desviado la atención hacia otros tipos de células madre en el tratamiento del ictus, radica en el hecho de que exista cierta controversia en cuanto a la funcionalidad e integración de las NSCs administradas en el cerebro del huésped (Abe et al. 2012; Locatelli et al. 2009)

Por los motivos expuestos, gran parte de las investigaciones centradas en el tratamiento de la isquemia cerebral con células madre desarrolladas en los últimos años, se han redirigido buscando la protección de la zona de penumbra y dejando de lado el concepto del reemplazo celular.

Células madre mesenquimales para la neuroprotección

Las células madre mesenquimales (MSCs) poseen ciertas ventajas y peculiaridades biológicas con respecto a otros tipos de células madre: (i) pueden obtenerse a partir de distintos tejidos de una forma mínimamente invasiva, (ii) pueden expandirse mediante su cultivo *in vitro*, manteniendo su capacidad de diferenciación hacia linajes distintos linajes de origen mesodérmico, (iii) poseen tropismo por las zonas lesionadas (en inglés *homing*) y (iv) participan activamente modulando la respuesta del sistema inmune y por tanto el proceso inflamatorio, lo que influye en su

baja inducción al rechazo por parte del organismo receptor (Dominici et al. 2006; Yagi et al. 2010).

En primer lugar se identificaron mediante su aislamiento a partir de la médula ósea (Friedenstein et al. 1974), pero posteriormente se han conseguido expandir con éxito a partir de una gran variedad de tejidos incluyendo el tejido adiposo, sangre del cordón umbilical, piel, tendón, músculo y pulpa dental (Im et al. 2005; Campagnoli et al. 2001; Kawashima 2012). Históricamente, supuso un desafío en el campo la falta de criterios uniformes para definirlos, lo que dificultó los esfuerzos para comparar los resultados obtenidos de diferentes estudios experimentales y clínicos. En respuesta a este reto, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) formuló unos criterios mínimos para la definición de las MSCs con el fin de crear un consenso para una caracterización más uniforme de estas células: deben ser adherentes al plástico en condiciones de cultivo estándar, expresar una serie de marcadores de superficie (CD73, CD90 o CD105) y a su vez carecer de la expresión de otros (como p.e. CD45, CD34, CD14) y, tener la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares del linaje mesodérmico (Dominici et al. 2006). Más allá de su capacidad para generar osteocitos, adipocitos y condrocitos *in vitro* (Pittenger 1999), muchos estudios han reportado su diferenciación en otros tipos de células de origen mesodérmico y no mesodérmico, incluyendo células endoteliales (Oswald et al. 2004), cardiomiocitos (Makino et al. 1999), hepatocitos (Snykers et al. 2009) y células neurales (Arthur et al. 2008; Phinney & Prockop 2007). Sin embargo, tales capacidades multipotentes de las MSCs no están universalmente aceptadas en la actualidad (*Figura 8*).

Aunque el interés clínico de las MSCs inicialmente se centró en su potencial como célula madre para la regeneración y reparación de tejidos, el descubrimiento de sus propiedades paracrinas con su consecuente efecto inmunomodulador y antiinflamatorio fueron los rasgos que realmente las convirtieron en unas potenciales candidatas para su utilización en terapia celular en el tratamiento de patologías muy diversas. A pesar de que los mecanismos subyacentes a los efectos terapéuticos de las MSCs no están bien caracterizados, se cree que surgen parcialmente de la liberación de una combinación de múltiples moléculas bioactivas con propiedades antiinflamatorias, antiproliferativas, antiapoptóticas y angiogénicas (revisado en (Meirelles et al. 2009)). Además, uno de los aspectos fundamentales para su utilización en el ámbito clínico radica en su característica relación con el sistema inmunitario del huésped y su compatibilidad después de la administración. En este sentido, gracias a la baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

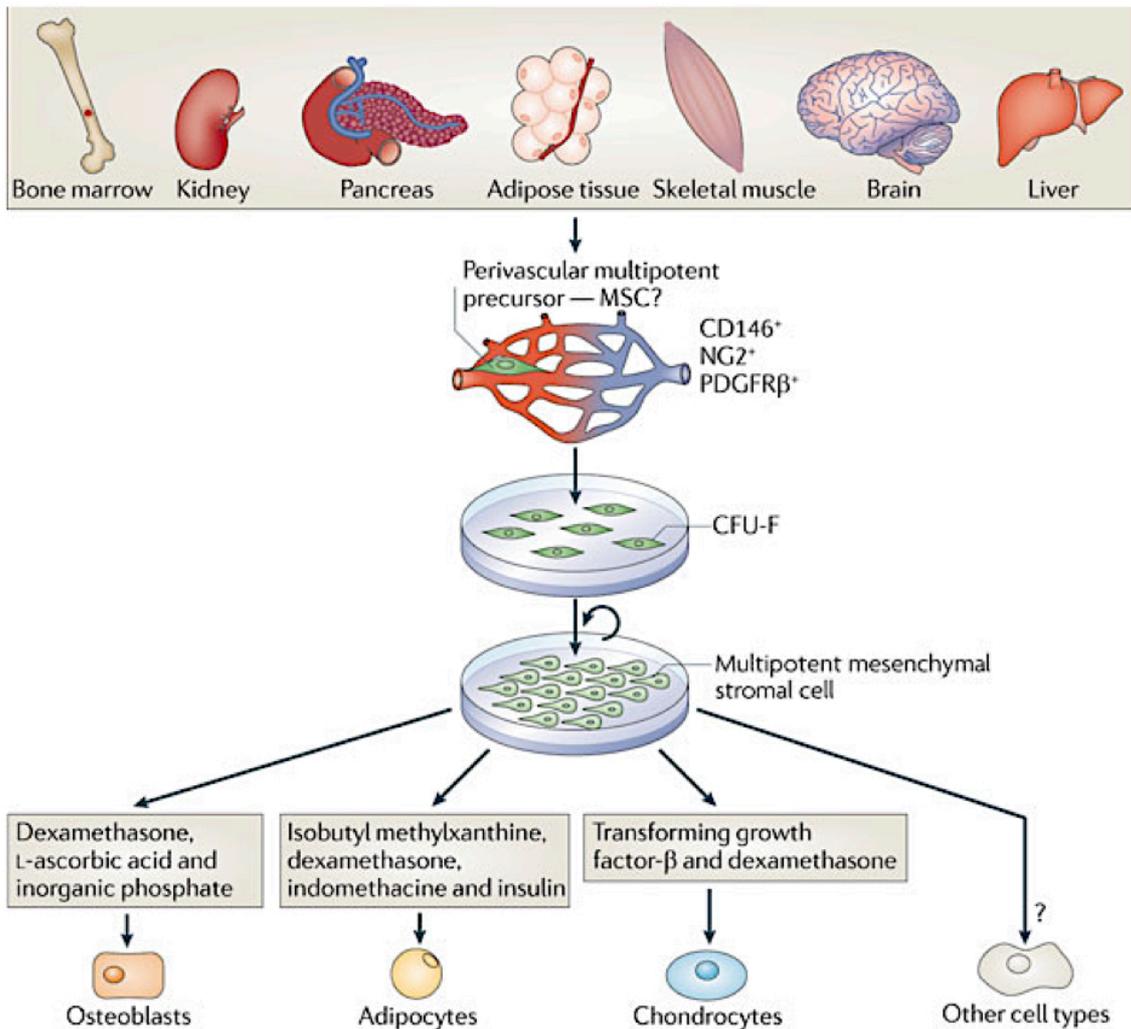


Figura 8. Células mesenquimales estromales multipotentes (MSCs). La fracción celular adherente al plástico de muchos órganos contiene células progenitoras estromales que pueden dar lugar a colonias de morfología fibroblástica, las MSCs. Son células multipotentes que reside en la proximidad de los vasos sanguíneos en los tejidos estudiados (expresando marcadores periciticos específicos como CD146, NG2 y PDGFR β). Pueden aislarse y expandirse *in vitro* a través de un número limitado de pases celulares sin perder su capacidad multipotente. Uno de los criterios para definir las es su capacidad *in vitro* para diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteoblastos en determinadas condiciones de cultivo. Existen estudios que les confieren la capacidad de diferenciarse a otros tipos celulares maduro no mesenquimatosos, aunque sigue siendo motivo de debate (Nombela-Arrieta et al. 2011).

del tipo I y a la ausencia del MHC de tipo II así como de moléculas coestimuladoras (CD80, CD40 y CD86), las MSCs son incapaces de generar una aloreactividad sustancial, incluso algunos estudios afirman que dicha naturaleza las protege de la lisis celular por parte de las células *natural killer* (NKs) (Rasmusson et al. 2003). Así, la terapia con MSCs puede aliviar la respuesta patológica, inhibiendo la conversión de los linfocitos T en linfocitos T colaboradores del tipo I (TH1) y del tipo II (TH2), a través de la modulación de los niveles de IL-4 e interferón IFN- γ (Figuroa et al. 2012). También tiene la capacidad de inhibir a las células NKs y a los linfocitos T citotóxicos

por medio de diferentes vías (Selmani et al. 2008). Otro mecanismo con acción inmunomoduladora por parte de las MSCs consiste en los receptores tipo *toll* (TLRs), los cuales son componentes clave del sistema inmune innato y están estrechamente implicados en la iniciación de respuestas adaptativas del sistema inmune. Las MSCs expresan dichos TLRs, elevando su secreciones de citoquinas así como su proliferación en respuesta a los estímulos del microambiente. Además, como hemos mencionado anteriormente, tienen la capacidad de mantenerse a salvo de la invasión por parte de las NKs, gracias a la codificación de un gen en el MHC tipo 1 junto con el ligando TLR3 y otras proteínas inmunorreguladoras (Giuliani et al. 2014).

El descubrimiento de la capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria de las MSCs aumentó notablemente el rango de sus aplicaciones terapéuticas, multiplicándose exponencialmente cada año los ensayos clínicos que utilizan este tipo de células madre (Figura 9). Así pues, el papel putativo de las MSCs en el mantenimiento de la homeostasis tisular, ha sentado las bases para su aplicación clínica en trastornos resultantes de respuestas inmunológicas autogénicas o alogénicas (como es el caso de la enfermedad de injerto contra huésped), trastornos autoinmunes y todo tipo de patologías que cursan con daño tisular e inflamación, como es el caso del infarto cerebral (Le Blanc et al. 2008; Duijvestein et al. 2011; Bang, J. S. Lee, P. H. Lee & Lee 2005a; Bhasin et al. 2013).

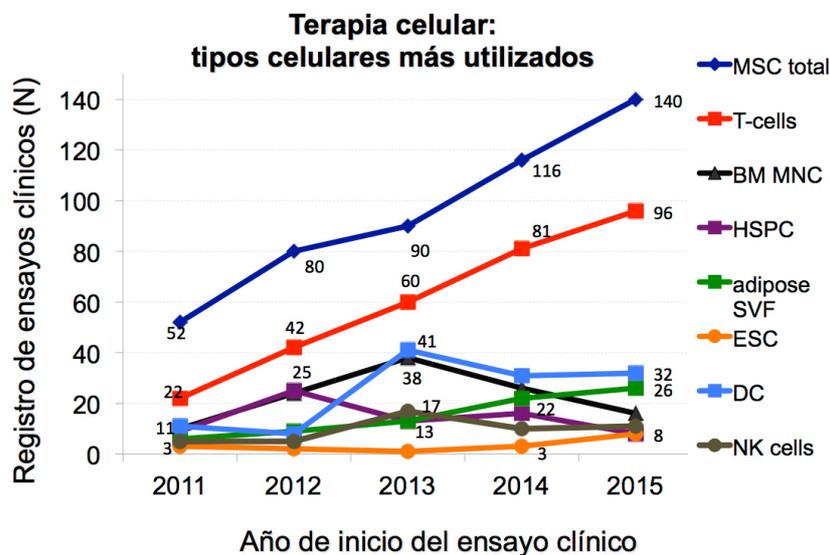


Figura 9. Evolución de los ensayos clínicos registrados en las bases de datos internacionales diferenciando entre tipos celulares desde el 2011 a 2015. La gráfica muestra como se han multiplicado de forma exponencial durante los últimos años los ensayos clínicos que utilizan las MSCs, superando con creces a los estudios que utilizan otros tipos celulares. MSC: células madre mesenquimales; T-cells: células T, BM-MNC: células mononucleares de la médula ósea; HSPC: Células madre progenitoras hematopoyéticas; Adipose SVF: Fracción vascular estromal adiposa; ESC: Células madre embrionarias; DC: Células dendríticas; NK cells: Células madre Natural Killer. Extraído de (Bernesev 2016).

1.5. MSCs para el tratamiento del infarto cerebral.

Las razones fundamentales para el uso experimental de las MSCs en el tratamiento del ictus incluyen una serie de mecanismos de acción divergentes, tales como su capacidad de diferenciación en tipos celulares relevantes para la reparación, su acción inmunomoduladora, la promoción de la angiogénesis y la neurogénesis y la secreción de factores neuroprotectores y neurotróficos. Sin embargo, por el momento ha quedado prácticamente descartada la idea de que en el tratamiento después de ictus se produzca un reemplazo celular en el tejido cerebral dañado a través de su integración y diferenciación, puesto que no existen evidencias que lo demuestren (Miller et al. 2010; Hilfiker et al. 2011; Krabbe et al. 2005).

En el año 2013 se llevó a cabo una revisión sistemática de los estudios preclínicos centrados en la administración de MSCs después de infarto cerebral, encontrando que el 85% de estos estudios habían mostraron una mejor recuperación funcional en comparación con los animales del grupo control. Estos efectos beneficiosos sobre la recuperación eran robustos a través de especies como los roedores y los primates, distintas vías de administración (intravenosa, intraarterial e intracerebral), diferentes tipos de MSCs (autólogas o alogénicas) y diversos tiempos de administración en relación al evento isquémico, así como utilizando diferentes dosis de células (Revisado por (Eckert et al. 2013)).

Los resultados alentadores de la terapia celular con MSCs obtenidos en modelos animales de infarto, han sentado las bases para la realización de estudios en el ámbito clínico. Así pues, existen investigaciones en humanos ya concluidas mostrando un excelente perfil de seguridad y una mejoría de las funciones neurológicas de los pacientes después de la administración intravenosa de las MSCs después del ictus (Honmou et al. 2011; Bang, J. S. Lee, P. H. Lee & Lee 2005a; J. S. Lee et al. 2010; Qiao et al. 2014; Bhasin et al. 2013; Kim et al. 2013). Todos ellos han utilizado el trasplante autólogo de las células, pero también existen ensayos clínicos en marcha para probar la seguridad de la administración alogénica de las MSCs (Díez-Tejedor et al. 2014). Si a día de hoy introducimos las palabras clave *stroke* y *mesenchymal* en la base de datos internacional de ensayos clínicos de <http://clinicaltrials.gov>, encontramos 22 estudios registrados centrados en el campo, reflejando el creciente desarrollo de investigaciones basadas en este tipo de tratamiento.

En cuanto a las rutas de administración utilizadas para el tratamiento del ictus mediante terapia celular, encontramos la implantación de las células de forma local sobre el tejido dañado (p.e. mediante una inyección intracerebral) o bien, la

administración sistemática a través de las vías intraarterial (IA) o intravenosa (IV). La primera de ellas ha resultado valiosa a la hora de estudiar el efecto local de las MSCs sobre el tejido cerebral en modelos animales (Lowrance et al. 2015; Moisan et al. 2012; Shin et al. 2016), sin embargo ha quedado prácticamente descartada en los ensayos llevados a cabo en la práctica clínica, por tratarse de una opción poco recomendable dada la necesidad de una cirugía y los riesgos que ello conlleva. Por otra parte, la administración IA de las células evitaría el efecto de primer paso de las mismas por órganos como el pulmón o el hígado donde pueden quedar retenidas. Aunque resulta un enfoque relativamente menos invasivo que la implantación intracerebral de las células, también involucra riesgos específicos como la posibilidad de generarse microembolismos (Grieve et al. 2010; Argibay et al. 2017) o la mortalidad, por lo que únicamente existe un ensayo clínico en curso en la actualidad que utilice este tipo de vía (Jiang et al. 2013).

Por los motivos expuestos, prácticamente la totalidad de los ensayos clínicos centrados en la administración de MSCs para el tratamiento del ictus utilizan la infusión IV de las células, por tratarse de una ruta de administración mínimamente invasiva y haber demostrado eficacia en los tratamientos llevados a cabo a través de la misma. Partiendo de la base de que las MSCs son selectivamente atraídas a regiones dañadas donde existe inflamación (Chapel et al. 2003; Ortiz et al. 2003) y, por otra parte, que la vasculatura cerebral queda comprometida después del infarto cerebral permitiendo una retención pasiva de las células en el tejido cerebral (Taheri et al. 2009), cabría esperar un injerto apreciable de las MSCs administradas en la región perilesional después del ictus. Sin embargo, los estudios en animales de experimentación llevados a cabo con esta vía, a pesar de encontrar una mejora significativa en la recuperación funcional de los individuos, aprecian de forma reiterada tasas de injerto notablemente bajas en la zona de la lesión (Argibay et al. 2017; Gutiérrez-Fernández et al. 2015; Byun et al. 2013; J. Chen et al. 2001). Por ello, ha resultado necesario el planteamiento de estrategias que permitan una mayor eficiencia del número de células retenidas en la zona del tejido cerebral dañado después de la administración IV.

1.6. Direccionamiento magnético de MSCs

Con el desarrollo de la nanomedicina y el diseño de herramientas tales como las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIOs), el direccionamiento

magnético de células constituye una potencial estrategia de creciente interés en el campo de la terapia celular.

El concepto de la utilización de fuerzas magnéticas para manipular las células se había estudiado con anterioridad, sin embargo, la habilidad de generar SPIOs biofuncionales ofrece un amplio espectro de posibilidades para la manipulación celular tanto *in vitro* como *in vivo* (Pan et al. 2012). El recubrimiento de las nanopartículas de hierro con polímeros biocompatibles (Figura 10), ha permitido su utilización en estudios muy diversos con numerosas aplicaciones en la práctica clínica, tales como la detección de células marcadas con SPIOs mediante distintas modalidades de imagen después de su infusión (C. Xu et al. 2012), la liberación controlada de fármacos en tejidos diana específicos (Barahuie et al. 2017) o el diagnóstico en determinadas patologías como el cáncer (Liang et al. 2017).

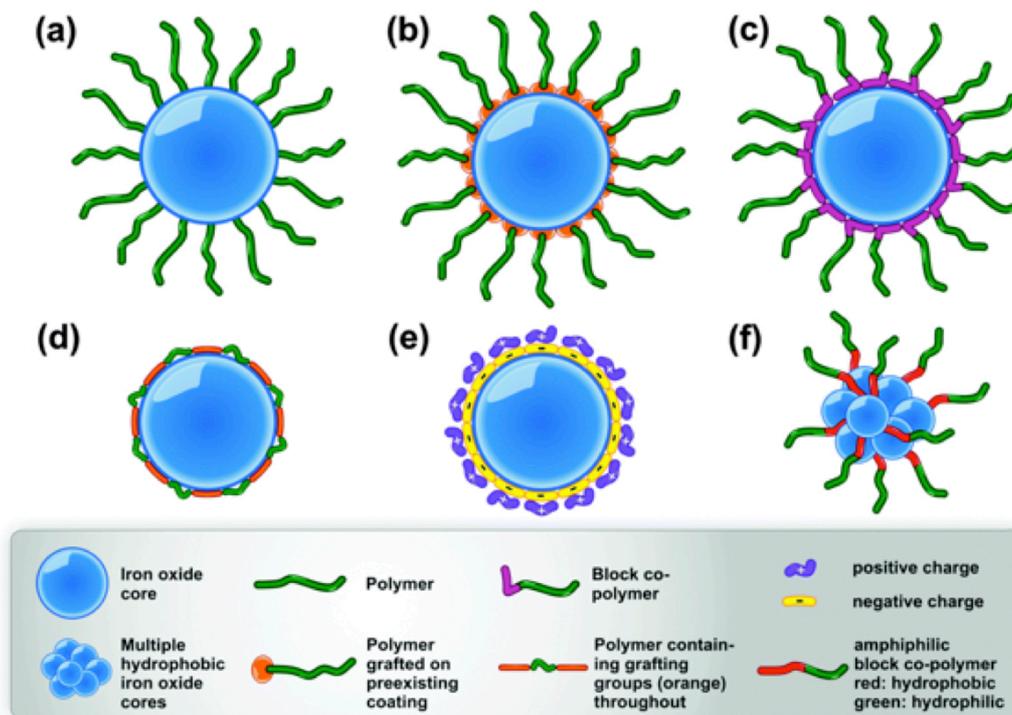


Figura 10. Diferentes métodos de estabilización de las nanopartículas de óxido de hierro con polímeros. (a) El anclaje viene por un grupo funcional en el extremo del polímero (b) Polímero insertado en la nanopartícula pre-sintetizada con una envoltura (c) Un co-polímero di-bloque con un bloque consistente en los grupos de adhesión (d) Un polímero que contiene grupos de adhesión en toda su superficie y adopta una conformación de envoltura (e) Recubrimiento electrostático con cargas opuestas (f) Polímero anfifílico utilizado para estabilizar nanopartículas hidrofobas en agua. Extraído de (Barrow et al. 2015).

Así pues, el diseño de SPIOs biocompatibles ha permitido el marcaje de células mediante su incubación conjunta *in vitro*, su monitorización mediante técnicas de imagen y su atracción o movimiento en patrones de cultivos celulares tridimensionales

Introducción

(Shapiro et al. 2010). Parámetros físicos como el tamaño de la nanopartículas o el material de su núcleo, así como la localización del campo magnético, su forma y su intensidad, son cruciales para un direccionamiento exitoso (Shapiro et al. 2010). En cuanto a los estudios basados en el direccionamiento magnético en animales de experimentación, Lythgoe y sus colaboradores fueron uno de los primeros grupos en utilizar campos magnéticos para guiar con campos magnéticos células progenitoras endoteliales a un sitio de lesión arterial (Kyrtatos et al. 2009) (*Figura 11*). En primer lugar marcaron las células con SPIOs, en su caso Feridex® (nanopartículas de óxido de hierro aprobadas por la “*Food and drugs Administration*”, FDA). A continuación, colocaron un imán externo situado sobre la región de interés en el animal y así, después de la administración endovascular de las células consiguieron concentrar parte de éstas en la zona de aplicación del campo magnético. Sin embargo, en ese estudio los investigadores no determinan el impacto del campo magnético en la fisiopatología del tejido lesionado, aspecto que consideramos se debe tener en cuenta. De la misma forma, otro estudio integrativo donde las SPIOs se utilizaban junto con partículas lentivirales, también mostró la capacidad de retención de las células transgénicas marcadas con SPIOs sobre las paredes de vasos lesionados, después de su direccionamiento magnético (Hofmann et al. 2009).

Estudios posteriores que han utilizando MSCs marcadas con SPIOs también han conseguido un mayor número de células mediante la aplicación de un campo magnético externo, en regiones como articulaciones (Kobayashi et al. n.d.; Mahmoud et al. 2016) u otras partes del sistema musculoesquelético como el fibrocartilago (Qi et al. 2016), el músculo (Oshima et al. 2014) o el hueso (Kodama et al. 2012), después de su inyección en zonas cercanas. No obstante, esta estrategia de direccionamiento se encuentra prácticamente inexplorada en el caso de órganos de difícil acceso como sería el caso del cerebro, restringido en toda su superficie por el hueso del cráneo. Así, existen varios estudios que consiguen retener células marcadas con SPIOs en las capas más superficiales de la corteza cerebral en contacto con el cráneo (Carenza et al. 2013; W.-B. Shen et al. 2016) después de su inyección intravenosa. Sin embargo, el principal reto del direccionamiento magnético en el caso del tejido cerebral sería la retención localizada de las células en estructuras cerebrales concretas, como podrían ser capas profundas del cortex o ciertas regiones de la base del encéfalo.

Dado el excelente perfil de bioseguridad del marcaje celular con SPIOs (Riegler et al. 2013; Gao et al. 2012; Ju et al. 2006; Neri et al. 2008) y el hecho de que éstas confieran propiedades ferromagnéticas a las células en cuestión (comprobado en los estudios descritos previamente), el direccionamiento magnético proporciona una

nueva estrategia en terapia celular con la finalidad de aumentar las células que lleguen al órgano diana después de su administración y, así, poder mejorar la eficacia del tratamiento en cuestión.

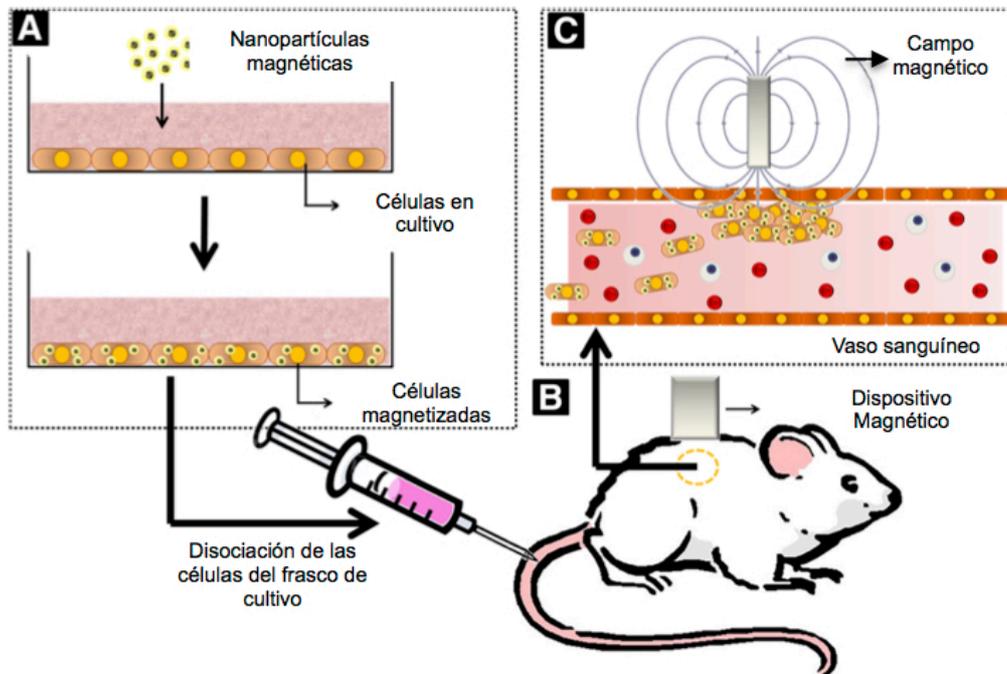


Figura 11. Diagrama esquemático del direccionamiento magnético de células marcadas con SPIOs. A) En primer lugar, las células se expanden en cultivo y se magnetizan con SPIOs. B) Una vez magnetizadas, las células se inyectan en animales expuestos a campos magnéticos estáticos. C) Las células magnetizadas son retenidas de forma más eficaz en las regiones de aplicación del campo magnético. Modificado de (Silva et al. 2017).

Hipótesis y objetivos

2. Hipótesis y objetivos

Tras el infarto cerebral, la terapia con células madre mesenquimales (MSCs) es una prometedora alternativa terapéutica, habiéndose observado que la infusión intravenosa de estas células provoca una mejoría de la función neurológica en los pacientes de los ensayos clínicos llevados a término (Bang, J. S. Lee, P. H. Lee & Lee 2005a; Qiao et al. 2014; Bhasin et al. 2013; J. S. Lee et al. 2010). Sin embargo, los estudios en modelos animales de ictus que utilizan dicha ruta de administración, han encontrado de forma reiterada tasas de injerto muy bajas en la zona de la lesión (Argibay et al. 2017; Gutiérrez-Fernández et al. 2015; Byun et al. 2013; J. Chen et al. 2001). Partiendo de dichas premisas y, aprovechando el desarrollo de nuevas herramientas como las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIOs) que permiten el direccionamiento magnético de las células (Mahmoud et al. 2016; Qi et al. 2016; Oshima et al. 2014; Kodama et al. 2012), planteamos la siguiente hipótesis:

Las MSCs pueden ser marcadas con SPIOs manteniendo su viabilidad celular y características intrínsecas, adquiriendo propiedades magnéticas para que tras su infusión intravenosa en un modelo animal de infarto cerebral, aumente el número de células retenidas en las zonas lesionadas gracias a la aplicación de un campo magnético externo.

Con este fin, los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

- OB1.** Aislamiento y caracterización de MSCs y estudio del efecto del marcaje con SPIOs sobre las propiedades biológicas de las células, así como su viabilidad.
- OB2.** Estudio de la propiedades magnéticas de las MSCs tras su marcaje *in vitro* con SPIOs.
- OB3.** Diseño de un sistema de aplicación de campos magnéticos para el direccionamiento *in vivo* de las MSCs marcadas con SPIOs a regiones cerebrales profundas de forma unilateral.
- OB4.** Análisis del direccionamiento magnético de las MSCs marcadas con SPIOs durante su infusión intravenosa en un modelo animal de infarto cerebral
- OB5.** Estudio morfológico e inmunohistoquímico de las MSCs-SPIOs alojadas en el parénquima cerebral después de su administración endovenosa.

Material y métodos

3. Material y métodos

3.1. Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales adultas.

3.1.1. Células madre mesenquimales de médula ósea de ratón

Se realizaron cultivos primarios para la obtención de células madre mesenquimales adultas a partir de médula ósea de ratón (mBMSCs, tomando como referencia varios protocolos de la literatura al respecto (Soleimani & Nadri 2009; Phinney et al. 1999; Pierini et al. 2012; S. Xu et al. 2010). Para ello se eligió la cepa C57BL y se utilizaron animales de 6-10 semanas de edad. Se sacrificó a los animales mediante dislocación cervical y, seguidamente se extrajeron los fémures y las tibias esterilizándolos con etanol al 70% y, reservando los huesos en tampón fosfato salino (PBS)(Gibco) estéril en frío.

Una vez en la campana de cultivos estéril, se colocaron los huesos en un mortero junto con medio de recogida, para la extracción de la médula ósea de los mismos. El medio de recogida utilizado se componía de DMEM/F12 (Gibco), L-glutamina 2mM y penicilina/estreptomicina al 1%. Con todos los huesos en el mortero, se hizo presión con el pistilo para trocearlos y que su médula ósea quedase suspendida en el medio (*Figura 12A*). Se recogió la fracción líquida y se hizo pasar a través de una malla de nylon de 70 µm de poro, para eliminar cualquier grumo de células o trozo de hueso.

Después de centrifugar, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 4 ml de medio de recogida, para a continuación, extraer la fracción mononuclear se procedió separándola por el gradiente de densidad celular utilizando Ficoll Paque Premium (GE Healthcare Bioscience) de densidad 1,073 g/ml (Pierini et al. 2012). Así obtuvimos 4 fracciones bien diferenciadas: plasma, células mononucleares, Ficoll y un *pellet* situado en el fondo del tubo compuesta por granulocitos y eritrocitos (*Figura 12 B*). Una vez extraída la fracción mononuclear (*Figura 12, B2*), se procedió a su cultivo en medio completo Mesencult (STEMCELL Technologies), sembrando a una densidad de $1,45 \times 10^6$ células/cm² en frascos de cultivo de plástico (Nunc).

El medio se renovó cada 3-4 días y así, se fue eliminando la subpoblación de células no adherentes de linaje hematopoyético. Los pases celulares se realizaron alcanzada una confluencia del 80-90%. En primer lugar se lavó con PBS estéril sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (Gibco), para eliminar los restos de suero y facilitar el desprendimiento de las células, y se incubó con solución tripsina/EDTA (Gibco) durante 5 minutos a 37°C. Neutralizamos la

Material y métodos

tripsinización con medio completo y, arrastramos las células adheridas a la placa con un *cell scraper* (Fischer). En el pase celular 1, se sembró las células recogidas en el doble de la superficie inicial (1:2). En los sucesivos pases celulares, se procedió de la misma forma, pero en este caso sin utilizar el *cell scraper*, sino recogiendo únicamente las células que se desprendieron mediante la tripsinización. Así, se purificó la subpoblación de células madre mesenquimales, puesto que la fracción de células adherentes de linaje hematopoyético (monocitos) presenta una adhesión mayor a la placa de cultivo. En este caso se sembró a una densidad de 12.000 células/cm².

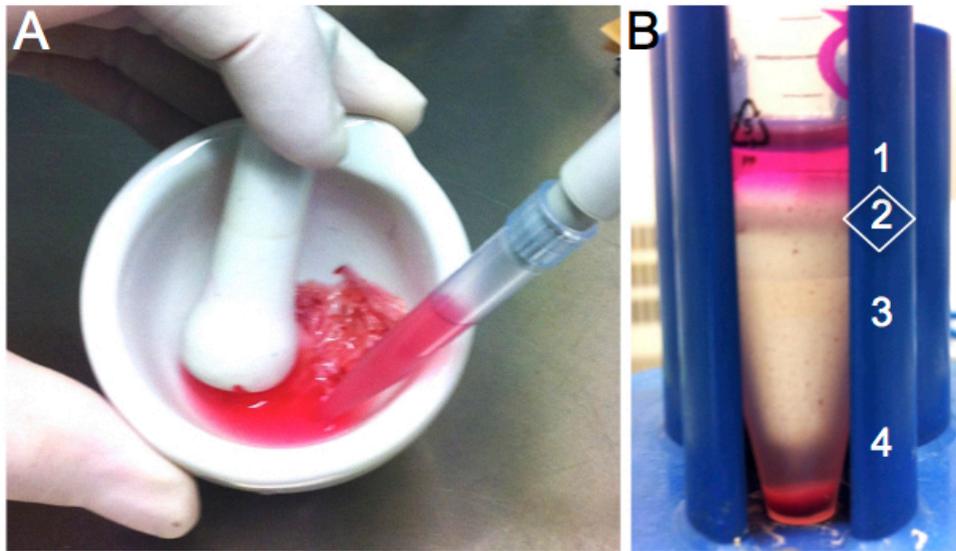


Figura 12. Aislamiento de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón. A) Recogida de la médula ósea de los huesos de las patas traseras de ratón. B) Separación de la fracción de células mononucleares (2) de la médula ósea por el gradiente de densidad después de su centrifugación con Ficoll. Las fases restantes corresponden al medio de recogida junto con plasma (1), al propio Ficoll (3) y a una fracción conteniendo eritrocitos y granulocitos en el fondo del tubo.

3.1.2. Células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata.

Para el aislamiento de células madre mesenquimales a partir de tejido adiposo de rata (rASCs), se utilizaron ratas adultas de la cepa Wistar Han de entre 250-300 gr de peso procedentes de Charles River Laboratory (Barcelona, España). Se anestesió a los animales mediante la inyección intraperitoneal (i.p.) de 5 mg/kg diazepam (Valium®, Roche Pharma) y 100 mg/kg ketamina (Ketolar®, Parke-Davis), y se les proporcionó analgesia mediante inyección subcutánea (s.c.) de 0.1 mg/kg de buprenorfina (Buprex, Schering-Plough). A continuación, se procedió a la obtención de la grasa abdominal e inguinal, procurando trabajar con la mayor esterilidad posible. Se realizaron varios lavados con PBS (Gibco) y el tejido adiposo obtenido se cortó en trozos de aproximadamente 1cm² para ser

digerido enzimáticamente con colagenasa tipo II (Worthington), manteniendo en agitación constante a 37°C durante 3-4h.

Posteriormente, se filtró el homogeneizado a través de una malla de nylon de 70mm de poro y, la fracción obtenida, se sembró a una densidad de 2×10^5 células/cm² en frascos de cultivo de plástico (Nunc). El medio utilizado para el cultivo de las células se componía de MEM-alpha sin nucleósidos (Gibco), suero bovino fetal (FBS)(Gibco) al 10% y L-glutamina 2 mM. Después de 24h, se procedió a la eliminación de la fracción celular no adherida al plástico mediante la aspiración del medio de cultivo y sustitución por medio fresco en su lugar.

Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. Se continuó cultivando las células, renovando el medio de cultivo cada 2-3 días y, una vez alcanzada una confluencia del 80-90%, se procedió a su amplificación. Para ello, se levantó las células del frasco con solución tripsina/EDTA (Gibco), previo lavado con PBS (sin Ca²⁺ ni Mg²⁺) y, resembrando en este caso y en pases celulares posteriores a una densidad de 2000 células/cm².

3.1.3. Células madre mesenquimales de tejido adiposo de humano.

Para el cultivo de células madre mesenquimales de tejido adiposo humano (hASCs), se utilizaron muestras cedidas por el biobanco de células madre CELULIFE (Centro de Investigación Príncipe Felipe). Todas las muestras fueron recogidas por lipoaspiración como producto de una cirugía plástica en la Clínica Cervera Sebastián (Valencia, España). En todos los casos se entregó un formulario de consentimiento informado a los pacientes y la utilización de muestras de tejido adiposo fue aprobada por el Comité de Ética correspondiente (CAEC, Comité Autónomo de Ensayos Clínicos, Valencia, España).

El aislamiento de hASCs se llevó a cabo utilizando un método mecánico y enzimático. La solución utilizada para la digestión del tejido adiposo fue compuesta por colagenasa tipo I al 0,1% (Gibco) en DPBS pH 7,5 (Gibco) y el mismo volumen de tejido adiposo lipoaspirado. El tejido se digirió durante 30 minutos a 37°C en agitación y se filtró con una malla de nylon de 70 mm de poro, para desechar la fracción no digerida. Después de centrifugar la muestra, se eliminó el sobrenadante (adipocitos flotantes) y el *pellet* (fracción de células madre mesenquimales) y se resuspendió en tampón de lisis de eritrocitos (BD Bioscience). Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y finalmente, las células se resuspendieron en medio completo Mesencult libre de suero para humano (STEMCELL Technologies) al que se añadió penicilina/estreptomicina al 1%. La densidad

Material y métodos

de siembra fue de 5000 células /cm², tanto en el cultivo primario como en los pases celulares posteriores.

Las células se mantuvieron con medio completo de cultivo a 37°C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. El medio se renovó cada 2-3 días y, una vez alcanzada una confluencia de aproximadamente el 80% en la placa de cultivo, se procedió al pase celular para su expansión. Para ello, se lavó las células con PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (Gibco) y se procedió a su levantamiento incubándolas durante 5 minutos a temperatura ambiente con una solución de TrypLE Select (Gibco). Una vez obtenidas las células, se centrifugaron durante 5 minutos a 300 g y posteriormente se eliminó el sobrenadante para ser resuspendidas en medio completo para su siembra.

3.1.4. Caracterización de células madre mesenquimales.

Para llevar a cabo la caracterización de las células cultivadas se utilizaron diferentes técnicas: (i) análisis del inmunofenotipo mediante citometría de flujo, (ii) estudio morfológico y ultraestructural mediante microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de transmisión (MET) y (iii) capacidad de diferenciación a diferentes linajes celulares.

Citometría de flujo.

Para caracterizar mediante citometría de flujo las poblaciones cultivadas a partir de las diferentes fuentes de obtención, se utilizaron marcadores de superficie positivos para las MSCs de cada especie en cuestión (ratón, rata o humano) y, por otra parte, marcadores negativos que no deberían presentar este tipo celular en su superficie, descartando así también la posibilidad de que se trate de células de otros linajes (*Tabla 1*).

Cada tipo celular se cultivó mediante el protocolo especificado previamente. En el momento del análisis mediante citometría de flujo (pase celular 4-6), se procedió al levantamiento de las células y a su resuspensión en PBS, para distribuir en alícuotas de 1x10⁵ células en tubos específicos para citometría de flujo. Después de centrifugar las alícuotas durante 5 minutos a 300 g, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 100 µL de tampón de bloqueo (HBSS con 1% HSA, Gibco) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, después de centrifugar las células bajo las mismas condiciones, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 µl de PBS al tubo para resuspender las células y añadir los anticuerpos correspondientes en cada caso (*Tabla 1*) e incubar durante 20 minutos en oscuridad a 4°C. A continuación se realizaron varios lavados con PBS y se resuspendió las células en 400 µl de PBS para su análisis en el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y la adquisición se llevó a cabo con el software FACSCanto

hasta agotar la muestra. En todos los casos se analizó previamente sin marcar con los anticuerpos las poblaciones a estudiar, para así establecer la señal de fluorescencia negativa y determinar la posible autofluorescencia de las mismas.

Marcador	Isotipo	Reactividad	Tipo de marcador	Casa comercial
CD105	IgG _{2A} rata	Ratón	+	R&D
CD29	IgG _{2A} rata	Ratón	+	R&D
Sca-1	IgG _{2A} rata	Ratón	+	R&D
CD45	IgG _{2B} rata	Ratón	-	R&D
CD29	IgG hámster	Rata	+	eBioscience
CD90	IgG _{2A} ratón	Rata	+	eBioscience
CD45	IgG ₁ ratón	Rata	-	eBioscience
CD73	IgG ₁ ratón	Humano	+	Miltenyi
CD90	IgG ₁ ratón	Humano	+	Miltenyi
CD105	IgG ₁ ratón	Humano	+	Miltenyi
CD34	IgG ₁ ratón	Humano	-	BD
CD3	IgG ₁ ratón	Humano	-	BD
CD14	IgG ₁ ratón	Humano	-	BD
CD19	IgG ₁ ratón	Humano	-	BD
CD45	IgG ₁ ratón	Humano	-	BD

Tabla 1. Listado de anticuerpos utilizados para la caracterización mediante citometría de flujo de las MSCs después de su aislamiento.

Caracterización morfológica

Para el estudio morfológico de las poblaciones celulares obtenidas se llevo a cabo el análisis de las muestras mediante microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de transmisión (MET). Una vez las células se encontraron en fase celular 4, se procedió a su siembra sobre *chamber slides* (Nunc) y, después de cultivarlas durante 48h se fijaron con glutaraldehído (GA) al 3,5% durante 30 minutos a 37°C, previo lavado con PBS. A continuación se procesaron las muestras mediante el protocolo especificado en el apartado 3.7. *Procesado de muestras* de la metodología.

Material y métodos

Diferenciación in vitro a distintos linajes mesodérmicos

Para comprobar la multipotencialidad de las células se llevó a cabo su diferenciación *in vitro* a los 3 tipos celulares del linaje mesodérmico que las caracterizan: adipogénico, osteogénico y condrogénico (Pittenger 1999; Dominici et al. 2006). Este estudio se llevó a cabo en rASCs y hASCs basándonos en el protocolo establecido por Zuk y colaboradores (Zuk et al. 2002) con ciertas modificaciones y, una vez concluido el periodo necesario para la diferenciación (21 días), se realizaron tinciones específicas para cada uno de los linajes celulares. En todos los casos, una vez teñidas las muestras se observaron y fotografiaron con un microscopio óptico ECLIPSE E800 (NIKON) con una cámara acoplada.

Para la diferenciación adipogénica, se sembraron células en placas de 6 pocillos, se cultivaron con medio completo hasta alcanzar una confluencia casi 100% y, a partir de este momento, se empezaron a cultivar con el medio completo habitual suplementado con dexametasona 1 μM , indometacina 200 μM , insulina 10 μM y 1-metil-3-isobutilxantina 0,5 mM (Sigma). Las placas se incubaron en las condiciones habituales durante 21 días, reemplazando el medio completo suplementado cada 3-4 días. Posteriormente, se lavaron con PBS y se fijaron con una solución de PFA al 4% durante 30 minutos a 37°C. En este caso, se realizó la tinción con Aceite Rojo O (Panreac) para confirmar la diferenciación al linaje adipogénico, ya que ésta marca de un color rojo intenso los depósitos de grasa acumulados en el interior de las células. Para ello, las células se lavaron con agua destilada y se incubaron con isopropanol al 60% durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se sustituyó el isopropanol por una solución de aceite rojo O al 0,16% en agua destilada durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron varios lavados con agua destilada y se procedió al análisis de las muestras.

Para la diferenciación osteogénica, se sembraron 3×10^4 células/pocillo en placas de plástico de 6 pocillos (Nunc). Así, se cultivaron durante 21 días con el medio completo utilizado para su cultivo suplementado con ácido ascórbico 0,05 mM, dexametasona 0,1 μM y β -glicerolfosfato 10 mM. Pasados 21 días, se lavaron con PBS y se fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% a 37°C durante 30 minutos. La diferenciación osteogénica se evaluó mediante una tinción con Rojo Alizarín S (Sigma Aldrich), la cual tiñe de un rojo intenso los depósitos de calcio formados por el linaje osteogénico. Para ello, lavamos las muestras con agua destilada y las incubamos con una solución de Rojo Alizarín S al 2% (en agua destilada) durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se realizaron nuevamente lavados con agua destilada y se procedió al estudio de las muestras.

Para la diferenciación de las MSCs hacia el linaje condrogénico se cultivaron *pellets* de $2,5 \times 10^5$ células con medio completo suplementado con SingleQuots™ (Lonza)

(conteniendo dexametasona, ascorbato, ITS-suplemento, GA-1000, piruvato de sodio, prolina y L-glutamina) y además, adicionando TGF- β 3 en una concentración de 10 ng/ml (ThermoFisher) justo antes de cada cambio de medio. Los *pellets* se mantuvieron en el incubador durante 21 días en tubos de plástico de 15 ml con el tapón sin cerrar completamente, para que se respetase las condiciones de cultivo habituales. El medio se renovó cada 2-3 días y, a los 21 días, la esfera formada se fijó con PFA al 4% durante 30 minutos a 37°C. En este caso se procedió a la deshidratación de las muestras con lavados en alcoholes de concentración creciente y su posterior inclusión en parafina. Las esferas formadas se cortaron en secciones de 10mm de grosor con un microtomo de parafina modelo HM 340E (Microm). Para la detección condrogénica, los cortes se desparafinaron y se tiñeron con Azul Alcían (Sigma), marcador de mucopolisacáridos fosfatados y glicosaminoglicanos sulfatados presentes en el cartílago.

Además, en el caso de las hASCs, se llevó a cabo el estudio morfológico de las muestras, tanto a 7 como a 21 días de cultivo. En el caso de los linajes adipogénico y osteogénico, las células se cultivaron con los mismos protocolos detallados anteriormente, pero en este caso sobre *chamber slides*. Se procedió a la fijación de las muestras con GA al 3,5 % durante 30 minutos a 37°C tanto a 7 como a 21 días desde el inicio de la diferenciación. En el caso del linaje condrogénico, las células se cultivaron de la misma forma que para la tinción pero en este caso las esferas flotantes se fijaron con GA al 3,5% durante 30 minutos a 37 °C. Una vez fijadas, todas las muestras se procesaron mediante el protocolo especificado en el apartado 3.7. *Procesado de muestras* para su estudio mediante MO y MET.

3.2. Marcaje de células madre mesenquimales con nanopartículas de óxido de hierro.

Para conferir a las MSCs propiedades magnéticas que permitieran su direccionamiento *in vivo* mediante la aplicación de un imán después de su infusión endovenosa y además, permitir su detección una vez alojadas en el parénquima cerebral, se procedió al marcaje de las células cultivadas con nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIOs).

3.2.1. Determinación del marcaje de elección.

Revisando la literatura al respecto, encontramos un trabajo que había estudiado el proceso de biodegradación de unas SPIOs en el organismo, las P-904 comercializadas por

Material y métodos

la casa Guerbet, encontrando que el hierro de las nanopartículas se almacena en la proteína ferritina evitando así la toxicidad a largo plazo del hierro libre (López-Castro et al. 2011). Por este motivo, decidimos que las partículas que utilizaríamos en nuestro estudio serían las mencionadas.

Con la finalidad de determinar el marcaje de elección se procedió al pase de las MSCs y se esperó 24h a que se adhiriesen a la placa. Se sustituyó el medio de cultivo por medio completo fresco en el que se diluyeron distintas concentraciones de SPIOs. Puesto que utilizando las SPIOs de forma individual no se consiguió el marcaje de las células, hubo que recurrir a un agente que facilitara la internalización de las mismas en el citoplasma celular. Uno de los agentes de transfección más utilizado en trabajo previos es la poli-L-lisina (PLL), un poli-catión que confiere a las nanopartículas carga positiva, haciendo así más afín su superficie a la membrana celular con carga negativa (Vanecek et al. 2012a; H. Zhang 2004; Babič et al. 2008)

Así pues, basándonos en los trabajos citados y con la finalidad de determinar las concentraciones idóneas tanto de SPIOs como de PLL para nuestras células, se procedió a la incubación de las mismas con distintas concentraciones de ambos diluidas en el medio de cultivo completo: 0, 25, 50, 75 y 100 μg de Fe/ml con las SPIOs y 0, 1, 1.25, 1.50, 1.75 y 2 μg de PLL. Después de la incubación conjunta durante 24 horas a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%, se realizaron varios lavados con PBS estéril para eliminar los restos de SPIOs libres y se procedió a la fijación de las células con PFA al 4% durante 30 minutos a 37°C.

Para la valoración del marcaje se llevó a cabo la tinción de las células con azul de Prusia o tinción de Perls, la cual tiñe de un color azul intenso el hierro férrico (ión Fe³⁺) presente en las SPIOs. Para ello, se lavaron las células con agua destilada y posteriormente, se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación con una solución acuosa compuesta a partes iguales por ácido clorhídrico (Sigma) al 20% y hexoferrocianida potásica trihidrato (Sigma) al 10%. Finalmente se realizaron varios lavados con PBS y se observaron las células con el microscopio invertido modelo IMT-2 (Olympus) acoplado a una cámara modelo C-7070 (Olympus).

3.2.2. Viabilidad celular después del marcaje.

Análisis morfológico de las MSCs-SPIOs.

Para el análisis morfológico de las MSCs una vez habían internalizado las SPIOs (MSCs-SPIOs) se llevó a cabo el marcaje de las células utilizando las concentraciones de

elección para cada caso (mBMSCs, rASCs y hASCs) pero en este caso sobre *chamber slides*. Una vez marcadas con hierro, se fijaron con GA al 3,5% durante 30 minutos a 37°C y se procedió a su procesamiento mediante el protocolo especificado en el apartado 3.7. *Procesado de muestras para su análisis mediante MO y MET* .

Ensayo de viabilidad celular mediante XTT

El ensayo colorimétrico con XTT (Thermo Fisher Scientific) permitió evaluar la viabilidad celular después del marcaje con hierro. Este procedimiento se basa en la conversión la sal 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida soluble en agua, que reacciona formando un producto de formazán naranja por las células que respiran activamente. Para ello, se sembraron 5×10^6 MSCs en pase celular 4 por pocillo, en una placa de 96 pocillos. Se realizaron 24 réplicas de cada grupo de estudio (células control y células marcadas con hierro) y, después de 24 horas de incubación con SPIOs con el protocolo establecido, se procedió a la realización del ensayo con XTT.

Para llevar a cabo el ensayo, se preparó una solución con metosulfato de fenazina (MSF) 10 mM en PBS. Por otra parte, se disolvieron 4 mg de XTT en 4 ml de medio completo de cultivo a 37 °C y se añadieron 10 µl de la solución de MSF preparada previamente. A continuación se dejaron 100 µl de medio completo en cada uno de los pocillos con células y, seguidamente, se añadieron 25 µl de solución XTT / MSF directamente a cada pocillo. Después de 4h de incubación a 37°C en atmósfera de humedad con CO₂ al 5%, se procedió a la lectura de la absorbancia de los pocillos (Multiskan FC, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 450nm.

Conservación de la capacidad de diferenciación a distintos linajes

Para comprobar que las células después del marcaje con SPIOs mantenían la capacidad para diferenciarse a diferentes linajes, se repitió el estudio de diferenciación mediante los protocolos detallados previamente, pero en este caso en células incubadas previamente con SPIOs. A continuación se procedió a las diferenciación de las MSCs-SPIOs y la realización de las tinciones específicas para cada linaje celular.

3.3. Caracterización de las propiedades magnéticas de las SPIOs P-904 (Guerbet) y las MSCs-SPIOs

En el caso de las SPIOs, en primer lugar se llevó a cabo la caracterización morfológica de las mismas analizando la solución proporcionada por la casa comercial en un microscopio electrónico de transmisión modelo JEM-2010 (Jeol), operándose a 200 kV.

Material y métodos

Para el análisis de la distribución de los tamaños de las nanopartículas se utilizó el software Digital Micrograph TM 1.80.70 para GAMA 1.8.0 (Gatan).

En lo que respecta a la caracterización magnética tanto de las SPIOs de forma individual como de las MSCs-SPIOs, se utilizó un magnetómetro SQUID PPMS-9 (Quantum Design), utilizando la metodología descrita en trabajos previos (Carenza et al. 2013; Riegler et al. 2013) con ciertas modificaciones. Así, los protocolos utilizados fueron los siguientes:

- Protocolo “Zero Field Cool” (ZFC): las SPIOs se enfriaron hasta 2 K sin la presencia de campo magnético. Inmediatamente después, bajo un campo magnético externo de 1 Oe se midió el ZFC desde 2 K hasta 298 K.
- Protocolo “Field Cool”(FC): se calentó el sistema hasta 298 K en presencia de un campo magnético H y se midió el FC mientras se disminuía la temperatura (T) de forma gradual.

3.4. Direccionamiento *in vitro* de células marcadas con hierro mediante la aplicación de campos magnéticos

Para comprobar que la aplicación de un campo magnético podía provocar el movimiento *in vitro* de las MSCs-SPIOs, construimos una placa soporte con varios imanes que generaban en su base un campo magnético de alrededor de 100 militeslas (mT), y sobre ella colocaríamos la placa de cultivo con las células ya marcadas resuspendidas en medio de cultivo (*Figura 13*). Incubamos durante 6 horas, tiempo suficiente para que las MSCs-SPIOs pudieran adherirse a la placa y posteriormente, retiramos la placa-soporte para poder estudiar la distribución de las células a lo largo de la superficie de cultivo. Para una mejor visualización de las MSCs-SPIOs, llevamos a cabo la fijación de las células con PFA al 4% durante 30 minutos a 37°C y a continuación, realizamos la tinción de Perls para la coloración azul del hierro contenido en las mismas. Las células fueron observadas con un microscopio invertido modelo IMT-2 (Olympus) y fotografiadas con una cámara acoplada modelo C-7070 (Olympus).

Por otra parte llevamos a cabo un registro de vídeo durante la migración *in vitro*. Para ello procedimos de la misma forma pero previamente a la suspensión de las MSCs-SPIOs en la placa de cultivos las marcamos con CellTracker™ CM-Dil (Thermo Fischer), bajo el protocolo especificado por la casa comercial. El Dil es marcador fluorescente lipófilo que permite la tinción inespecífica de las células para su visualización bajo el microscopio de

fluorescencia. En nuestro caso utilizamos un microscopio de fluorescencia modelo ECLIPSE 80i (Nikon) con una cámara acoplada modelo DS-QiMc (Nikon).

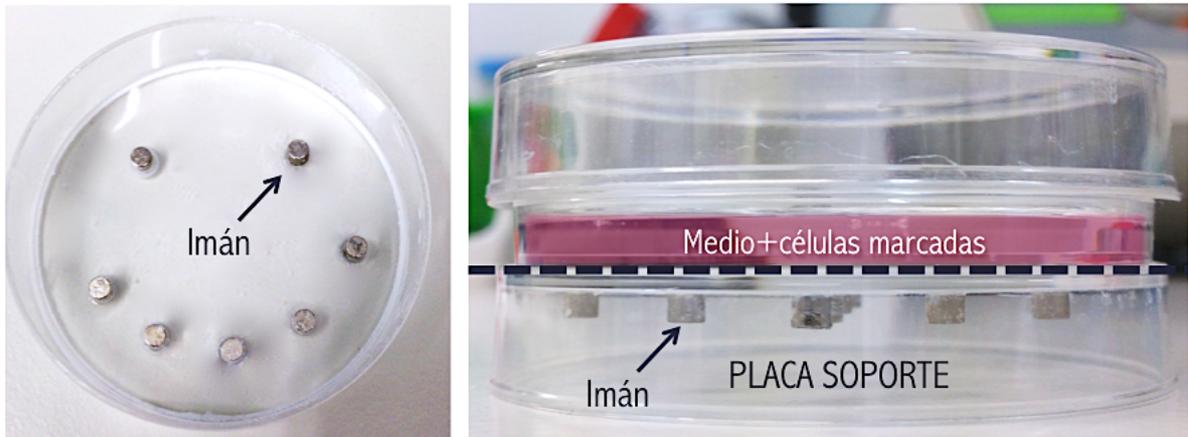


Figura 13. Sistema utilizado para el estudio de migración *in vitro* de las MSCs-SPIOs. A) Placa de cultivos con imanes permanentes adheridos que sirve de soporte. B) Una vez marcadas las células, se depositan suspendidas en el medio de cultivo en la placa superior situada sobre la placa soporte con imanes y se incuban durante 6 horas para que éstas se adhieran sobre la superficie de cultivo.

3.5. Direccionamiento magnético de MSCs-SPIOs en un modelo animal de infarto cerebral.

3.5.1. Elementos para la aplicación del campo magnético

Para determinar el sistema que se utilizaría para la aplicación del campo magnético durante la administración endovenosa de las MSCs-SPIOs se eligieron varios componentes, cada uno con un campo magnético característico y, posteriormente, se combinaron entre ellos para comprobar la fuerza magnética aplicada con cada uno de ellos sobre el cerebro del animal. Para la elección de la intensidad magnética a aplicar, tomamos como referencia estudios previos (Carenza et al. 2013; W.-B. Shen et al. 2016) y realizamos las modificaciones pertinentes para que la resultante del campo magnético se adaptara a las regiones afectadas en nuestro modelo animal.

El primer sistema estudiado constaba de un electroimán en combinación con un imán permanente situado en un casco de ácido poliláctico (*Figura 14A*), el cual fue diseñado especialmente para que se adaptara al tamaño de la cabeza de los animales que iban a utilizar (ratas de la cepa *Wistar* de entre 250-300 gr). El electroimán consiste en unas bobinas y un polo conectados a una fuente de alimentación, el cual genera una intensidad de corriente eléctrica de 7 Amperios, para mantener un campo magnético de entre 200-250 mT. Además, el imán estacionario acoplado al casco genera una potencia magnética de hasta 150 mT y éste se encuentra situado aproximadamente sobre los niveles más

Material y métodos

comúnmente afectados del cerebro del animal con el modelo de infarto cerebral elegido. Así pues, la finalidad del imán cilíndrico sería la de intentar focalizar la resultante de la fuerza magnética ejercida por la combinación de ambos elementos dentro del volumen cerebral del animal.

Para calcular la fuerza magnética generada por el sistema, se realizaron medidas de la fuerza magnética en los tres ejes del espacio (X , Y , Z) a diferentes distancias de los polos de las bobinas, con un medidor de campo modelo DTM-133 de la marca GROUP3 Technology. Así, se obtuvieron mapas de colores que reflejaban la intensidad del gradiente magnético aplicado en cada punto del espacio.

Por otra parte, se utilizó un sistema compuesto por dos imanes permanentes de forma rectangular que generaban un campo magnético de hasta 360 mT unidos directamente al imán cilíndrico situado en el casco de ácido poliláctico, generando este último la misma intensidad que en el caso anterior (alrededor de 150 mT) (Figura 14B). De la misma forma, se midió el campo magnético generado a diferentes distancias de la base del imán situado en el casco y se llevó a cabo el estudio del campo magnético generado en relación a la cabeza del animal.

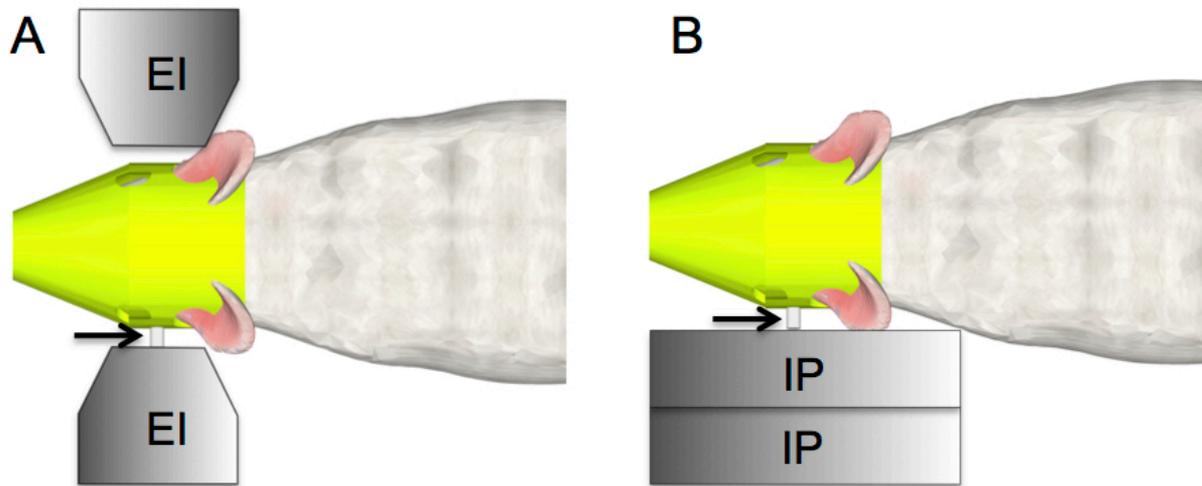


Figura 14. A) Sistema compuesto por la combinación de un electroimán y un imán estacionario situado en un casco de ácido poliláctico que se adapta a la cabeza de la rata. El electroimán genera un corriente eléctrica de 7 Amperios entre sus dos bobinas (EI) manteniendo un campo magnético de entre 200-250 mT. El imán permanente (flecha) situado en el casco, genera un campo de alrededor de 150 mT sobre el hemisferio derecho del animal (correspondiendo con la zona que se verá afectada en el modelo de infarto cerebral utilizado). B) Sistema magnético consistente en dos imanes estacionarios potentes unidos al imán estacionario situado en el casco diseñado. Los imanes estacionarios tienen forma rectangular y generan un campo magnético de hasta 360 mT. Éstos se encuentran directamente unidos al imán estacionario situado en el casco del animal, de igual potencia que en el caso anterior (150 mT)

3.5.2. Animales

Para la realización de los estudios del presente trabajo se utilizaron ratas *Wistar* macho (Charles River) con un peso comprendido entre 250-300 gr. Los animales se mantuvieron a 22°C en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y con acceso a agua y comida *ad libitum*. El cuidado y la manipulación de los animales se llevó a cabo de acuerdo con las directrices del Comité de Ética y Experimentación de la Universidad de Valencia y del animalario del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia), y bajo la autorización del Servicio de Sanidad y bienestar animal de la Generalitat Valenciana (2015/VSC/PEA/00068).

El número final de animales que se pudo incluir en el estudio fueron N=26. Dentro de ese total, se distinguieron distintos grupos experimentales y dentro de cada uno de ellos se pudieron utilizar un número concreto de animales para cada técnica de análisis (*Tabla 2*). Así pues, hubo animales en los que no se pudo obtener un registro de imagen apto para su análisis por el movimiento del animal durante el proceso pero sin embargo, las muestras de los cerebros si que pudieron ser utilizadas para su estudio histológico. Por otra parte, hubo casos en los que las muestras pudieron utilizarse exclusivamente para el estudio de TEM o inmunohistoquímica, sin poderse llevar a cabo los recuentos de células Perls+ al haber quedado considerablemente comprometidos determinados niveles durante su corte.

Grupo Experimental	Técnica	Animales
Control Ictus N total=6	Resonancia Magnética	n=6
Ictus + MSCs-SPIOs N total=10	Resonancia Magnética	n=6
	Recuentos cels. Perls+	n=4
	MET/Inmuno.	n=8
Ictus + MSCs-SPIOs + imán N total=7	Resonancia Magnética	n=6
	Recuentos cels. Perls+	n=3
	MET/Inmuno.	n=6
Inyección IC MSCs-SPIOs N total=3	MET	n=2

Tabla 2. Relación de animales totales incluidos en cada grupo experimental y número de ellos utilizados para cada una de las técnicas especificadas. Abreviaturas MSCs-SPIOs: células madre mesenquimales marcadas con nanopartículas de hierro, MET: microscopía electrónica de transmisión; Inmuno.: inmunohistoquímica de fluorescencia; Inyección IC: inyección intracerebral.

En cuanto a los grupos experimentales, por una parte se obtuvieron animales en los que únicamente se llevó a cabo la cirugía para el modelo animal de infarto cerebral, los cuales sirvieron como control para el registro de resonancia magnética (RM), ya que

Material y métodos

mediante una de sus modalidades de imagen (R2*) susceptible al hierro, se intentarían detectar variaciones de la concentración de hierro en el volumen cerebral después de la administración de MSCs-SPIOs. Por otra parte, encontramos los dos grupos experimentales que sirvieron para la valoración del efecto del campo magnético durante la administración intravenosa de MSCs-SPIOs después del infarto cerebral (uno de ellos sin y el otro con aplicación del campo magnético). Además, hubo un grupo reducido de animales en los que se llevó a cabo la administración intracerebral de MSCs-SPIOs, únicamente para su estudio ultraestructural en comparación con las células administradas por infusión endovenosa.

3.5.3. Diseño experimental.

El diseño experimental para el direccionamiento magnético de las MSCs-SPIOs en un modelo animal de infarto cerebral y su posterior análisis estuvo compuesto por los procedimientos recogidos en el diagrama mostrado a continuación (*Figura 15*).

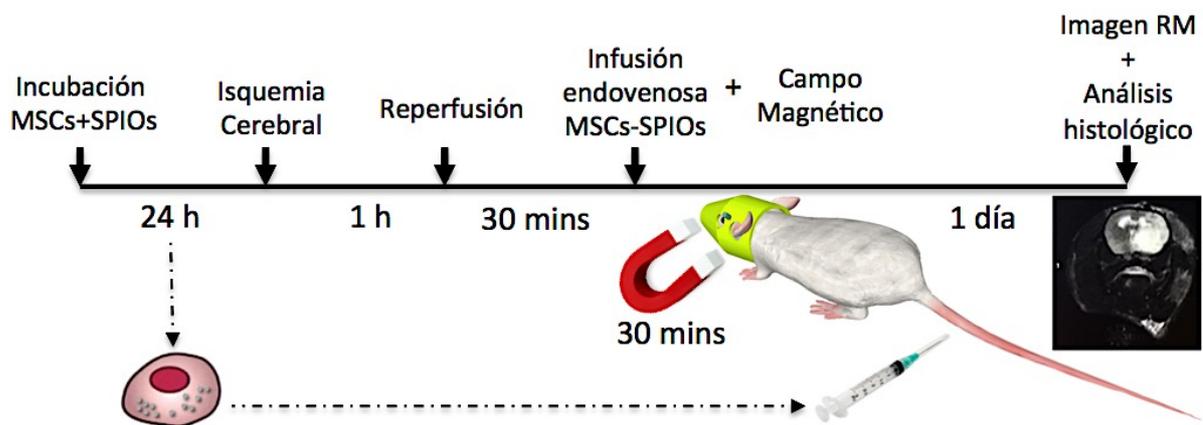


Figura 15. Diagrama cronológico de los procedimientos incluidos en el diseño experimental. En primer lugar se llevó a cabo el marcaje de las MSCs con SPIOs y 24 h después, se procedió a la realización de la cirugía para la inducción de la isquemia cerebral en uno de los hemisferios de los animales. Una hora después se llevó a cabo la restauración del flujo cerebral, y transcurridos 30 minutos desde la reperusión se administraron las MSCs-SPIOs a través de una de las venas laterales de la cola del animal. En el grupo experimental que correspondía, se aplicó el campo magnético durante la administración celular manteniéndose durante 30 minutos. Después de un día, se llevó a cabo el registro de imagen mediante resonancia magnética (RM) y finalmente, procedió a la eutanasia de los animales para el análisis histológico de las muestras.

En primer lugar se procedió al marcaje de las células con SPIOs mediante el protocolo establecido previamente. A continuación, se procedió a la cirugía de los animales para provocar la isquemia cerebral durante una hora y posteriormente se restableció la perfusión cerebral. Para simular una ventana de actuación temprana para el tratamiento del ictus, llevamos a cabo la infusión endovenosa de las células transcurridos 30 minutos desde el momento de la reperusión (Kleinschnitz et al. 2015; Gutiérrez-Fernández et al. 2015). La aplicación del campo magnético se llevó a cabo durante 30 minutos en los

animales que pertenecían al grupo experimental en cuestión, coincidiendo su aplicación con el inicio de la infusión endovenosa de las células. Para el registro de imagen mediante resonancia magnética (RM) se esperó un día y, una vez realizado, se llevó a cabo la eutanasia de los animales para el análisis histológico de las muestras.

3.5.4. Modelo animal de ictus isquémico: oclusión-reperfusión de la arteria cerebral media mediante la técnica del filamento intraluminal (tMCAo)

La preparación del modelo animal de infarto cerebral se llevó a cabo en dos días. En primer lugar, el animal fue anestesiado mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de 5 mg/kg diazepam (*Valium®*, Roche Pharma) y 100 mg/kg ketamina (*Ketolar®*, Parke-Davis), y además se le proporcionó analgesia mediante inyección subcutánea (s.c.) de 0.1 mg/kg buprenorfina (*Buprex*, Schering-Plough). A continuación, se colocó al animal en decúbito prono en un aparato estereotáxico (Kopf Instruments, mod. 900) y se realizó una incisión longitudinal en la línea media de la cabeza. Se separaron la piel y el periostio exponiendo así la superficie del cráneo (*Figura 16*). Con la ayuda de un microscopio quirúrgico se realizó un trépano de 1 mm de diámetro a 2 mm de Bregma en dirección caudal y 3.5 mm a la derecha de la sutura sagital. Por otra parte, se realizaron otros dos trépanos adicionales de 0.8 mm de diámetro, sin llegar a perforar completamente el hueso, uno situado a 3.5 mm a la derecha de la sutura sagital y a 4.5 mm posterior a la sutura coronal, y otro situado a 1 mm a la derecha de la sutura sagital y 2 mm posterior a bregma (*Figura 16A*). En estos dos últimos trépanos se enroscó un minitornillo de acero inoxidable (Fine Science Tools)(*Figura 16C*). A continuación se colocó en el trépano de 1 mm de diámetro un cono de aguja de 21G cortada y limada que serviría posteriormente de guía para la fibra óptica que se conectaría a la sonda láser-Doppler para el registro del flujo sanguíneo durante la cirugía del segundo día (*Figura 16B*). Este cono se fijó al cráneo con cemento dental, aprovechando el anclaje al mismo que ofrecen los tornillos. Posteriormente se suturó la herida y una vez recuperado el animal de la anestesia se estabuló al animal con libre acceso al agua y a la comida hasta el día siguiente (*Figura 16D*).

El segundo día se anestesió al animal con una inyección i.p. de clorhidrato de ketamina (100 mg/Kg), diazepam (5 mg/kg) y sulfato de atropina (0.3 mg/Kg) (B. Braun Medical), esta última para permitir la intubación orotraqueal con una cánula de 16G. De la misma forma que el día anterior, se les proporcionó analgesia mediante una inyección s.c. de 0.1 mg/kg buprenorfina. Una vez intubado el animal, se monitorizaron los siguientes parámetros: (i) flujo sanguíneo láser-Doppler cerebro-cortical (indicativo de la perfusión cerebral (PC)), (ii) presión arterial sistémica (PAS) y (iii) temperatura corporal. Para la

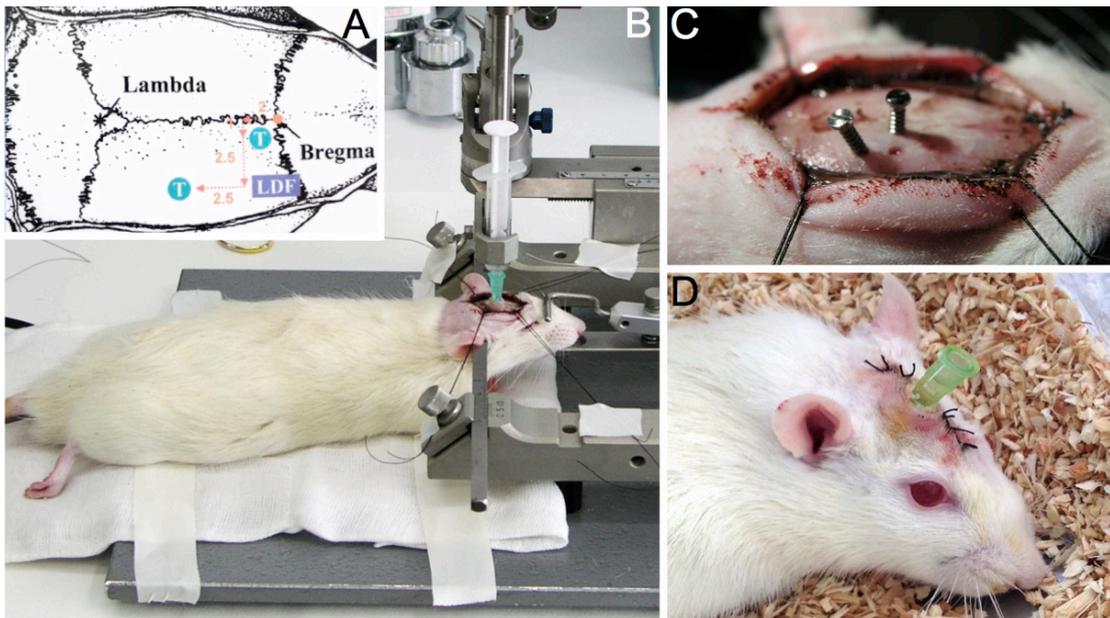


Figura 16. Implantación de la cánula para el registro intraoperatorio de la perfusión cerebral. A) Localización de las coordenadas para la realización de los orificios en el hueso del cráneo (T: tornillo, LDF: fibra láser doppler). B) Implantación del soporte a través del cual se introduce la fibra para el registro láser-doppler del flujo cerebral durante la operación para el modelo animal de infarto cerebral. C) Colocación de los minitornillos que servirán de apoyo para la sujeción del soporte, quedando todo posteriormente rodeado por cemento dental. D) Animal con la cánula implantada y la incisión suturada.

monitorización de la PC se alojó la fibra óptica (mod. MT B500-0 L 120, Perimed AB) en el soporte implantado el día anterior, avanzando su extremo hasta que estableció contacto suave con la corteza cerebral. Esta fibra se conectó, por el extremo opuesto al que está en contacto con el tejido cerebral, a la sonda láser- Doppler (Probe 418, Perimed AB) conectada a su vez un medidor láser-Doppler (Periflux 4001 Master, Perimed AB).

A continuación, se colocó al animal en posición de decúbito supino, fijado a la mesa de trabajo y se conectó a un respirador (Harvard Rodent Ventilator, mod. 683). La anestesia se mantuvo con una mezcla de 0.5-1% de sevofluorano (Sevorane®, Abbot Laboratories) en N₂O y O₂ (70:30, respectivamente), un volumen de 2.5 mL por pulso y una frecuencia inicial de 55-60 pulsos/minuto. La proporción de gases, volumen y frecuencia fueron modificados en función de los requerimientos del animal. La temperatura corporal se mantuvo a 37.5 °C durante todo el experimento con la ayuda de una manta calefactora y una sonda rectal conectada al medidor de temperatura, modulando así la manta calefactora según la temperatura del animal.

Para el registro de la PAS, se introdujo un catéter de 0.9 mm de diámetro externo (Vasocan Braunüle, Braun Medical S.A.) en la arteria femoral izquierda, y se conectó a un transductor de presión (Hewlett-Packard Medical Products Group, mod. 1290C) a través de una cúpula estéril (Hewlett-Packard Medical Products Group, mod. 1295C) conectada a

una unidad de registro de presión arterial (Stoelting mod.). Las señales de PC, PAS y temperatura corporal, fueron digitalizadas (PF 472, Perimed AB) y enviadas a un ordenador equipado con un programa de adquisición y almacenamiento de datos para su posterior análisis (Perisoft v5.10, Perimed AB).

Una vez monitorizados los parámetros se procedió a la oclusión de la arteria cerebral media (ACM) mediante la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAo) con el método del filamento intraluminal (Longa et al. 1989). Para ello, en primer lugar se llevó a cabo la exposición de la arteria carótida común (ACC) derecha, tras una incisión longitudinal en la línea media ventral del cuello y posterior separación por disección roma de las glándulas submaxilares y de los músculos omohioideo y esternohioideo. Seguidamente se diseccionó la arteria carótida externa (ACE), además de la cauterización de las dos primeras ramas de la ACE (la arteria tiroidea superior (ATS) y la arteria occipital (AO)) (*Figura 17A*) para evitar el sangrado durante la intervención. Para la disección de la ACE, se colocaron dos ligaduras por encima de las ramificaciones cauterizadas previamente y se cortó la ACE entre ambas, dejando un muñón. A continuación, se aisló la arteria carótida interna (ACI), separándola del nervio vago y del cuerpo carotídeo, hasta visualizar la bifurcación donde surge la arteria pterigopalatina (APP), la cual se ligó en su parte distal. Una vez llegado este punto, se procedió a la introducción de un filamento de nylon (4/0) con la punta redondeada por acercamiento a una fuente de calor, el cual ocluiría la ACM. Para ello se colocaron dos clips microvasculares, uno en la ACC y otro en la ACI, interrumpiéndose momentáneamente el flujo sanguíneo, para realizar una pequeña incisión en el extremo distal del muñón de la ACE, a través de la cual se introduciría el filamento de nilón (*Figura 17B*). Después de comprobar que el filamento se encontraba en la luz de la arteria, se colocó una ligadura para impedir que el animal sangrase por la incisión, y se retiraron los clips con la finalidad de restaurar la circulación sanguínea normal.

Tras unos minutos de registro de las señales de PC, PAS y temperatura corporal, se hizo avanzar el filamento hasta el origen de la ACM en el polígono de Willis (*Figura 17C*). La colocación óptima del filamento se puso de manifiesto por el descenso brusco de la PC (*Figura 18*). La oclusión se mantuvo durante 60 minutos, tras los cuales se retiró el filamento permitiendo la reperfusión, poniéndose de manifiesto por la recuperación de los valores de PC (*Figura 18*). Por último, se extrajo el filamento y el catéter introducido en la arteria femoral, se suturaron las heridas quirúrgicas del cuello y de la pata y se estabuló a los animales hasta el momento de la inyección intravenosa de la administración intravenosa de las MSCs-SPIO.

Material y métodos

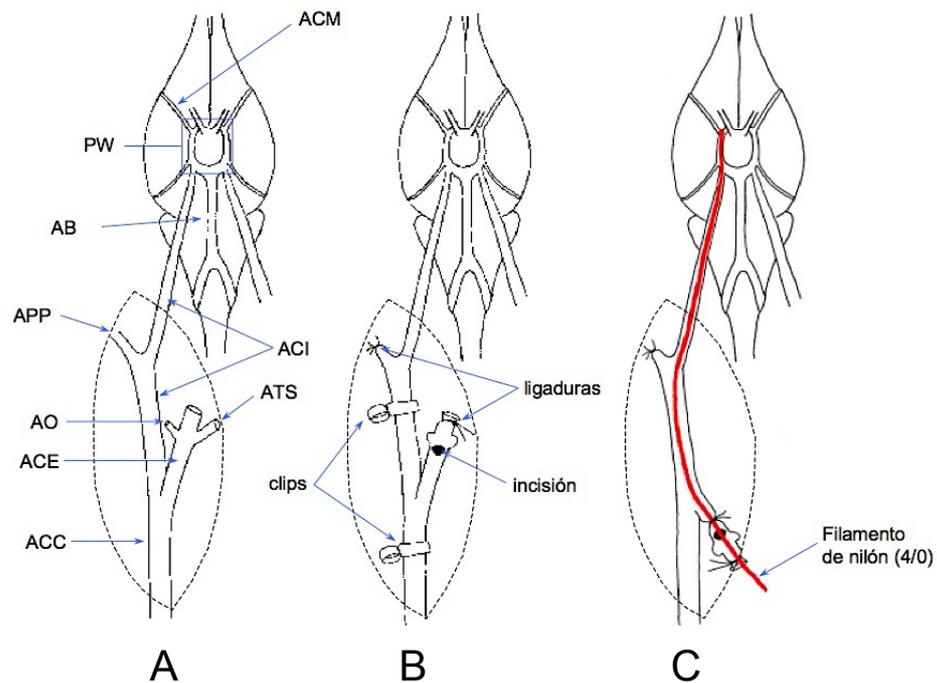


Figura 17. Modelo animal de infarto cerebral mediante la inserción intraluminal de un filamento de nylon. A) Mediante la exposición de la arteria carótida común (ACC) se secciona la ACE, además de la cauterización de las dos primeras ramas de la ACE (la arteria tiroidea superior (ATS) y la arteria occipital (AO)). B) Seguidamente, se aísla la arteria carótida interna (ACI) ligando la ramificación donde surge la arteria pterigopalatina (APP) y se lleva a cabo una incisión en la ACE, habiendo colocado previamente unos clips microvasculares para bloquear el flujo sanguíneo. C) Para la oclusión de la arteria cerebral media (ACM) se introduce un filamento de nylon a través de la ACE colocando una ligadura para impedir el sangrado del animal. Una vez retirados los clips para restaurar la circulación sanguínea normal se hace avanzar el filamento hasta que bloquea el flujo sanguíneo de la ACM en la base del polígono de Willis (PW).

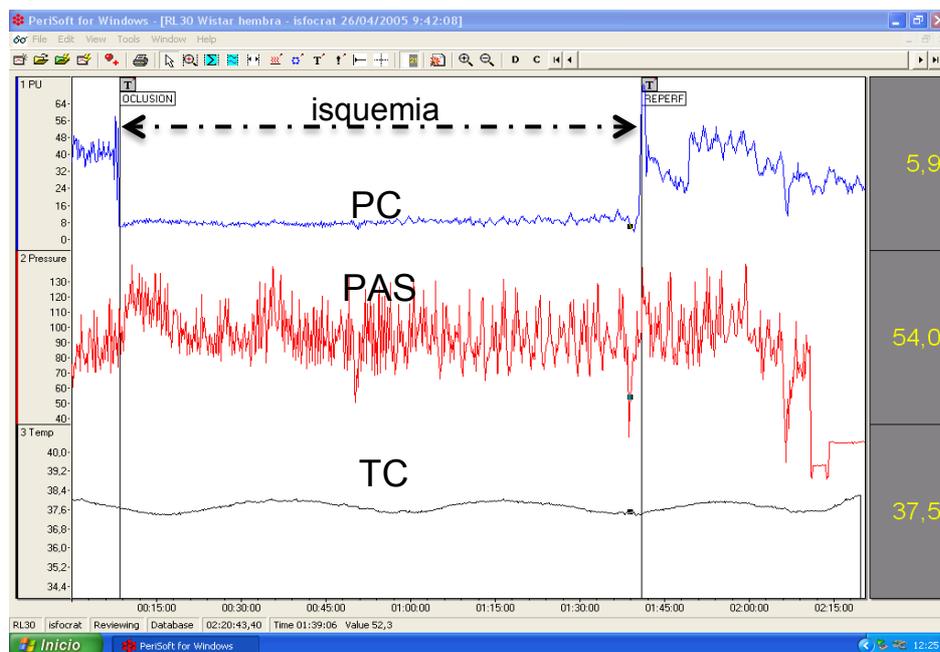


Figura 18. Monitorización de parámetros fisiológicos intraoperatorios y confirmación de la isquemia-reperusión durante el modelo animal de infarto cerebral. Durante el procedimiento quirúrgico se monitorizan parámetros como la temperatura corporal (TC) y la presión arterial sistémica (PAS), así como la perfusión cerebral (PC) para la confirmación del descenso de la perfusión cerebral durante la isquemia.

3.5.5. Infusión intravenosa de rASCs-SPIOs durante la aplicación del campo magnético

La administración endovenosa de las MSCs-SPIOs se llevó a cabo 30 minutos después de la reperusión cerebral, una vez retirado el filamento de nylon. Para ello, se procedió al desprendimiento de las MSCs-SPIO de la placa de cultivos con tripsina/EDTA y se realizaron varios lavados con tampón fosfato para la eliminación del exceso de SPIOs. Una vez obtenido el *pellet*, resuspendimos un total de $2,5 \times 10^6$ células en 1 ml de PBS estéril. Éstas se inyectaron a través de una cánula de calibre 24G situada en una de las dos venas laterales de la cola del animal, a una velocidad de 250 μ l/min. En el grupo experimental correspondiente, se llevó a cabo la exposición al campo magnético durante 30 minutos contando desde el momento inicial de la infusión celular. A continuación, se estableció a los animales con acceso libre a la comida y a la bebida hasta el día siguiente.

3.5.6. Registro de imagen mediante resonancia magnética (RM)

Un día después, se llevó a cabo el registro de imagen mediante RM en las instalaciones de la Plataforma de Imagen Experimental del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Politécnico y Universitario de La Fe (Valencia). Para ello, se procedió a la anestesia del animal mediante una inyección i.p. con una dosis mínima de ketamina / xilacina, buscando no comprometer la supervivencia del animal durante la toma de imágenes.

El registro de imagen incluyó las secuencias T1, T2 y la modalidad ponderada en T2-R2* susceptible a variaciones en la concentración del hierro presente en el volumen cerebral. Con secuencias anatómicas (T1) y ponderadas en T2 para el estudio de la sustancia blanca pudimos detectar el volumen del infarto cerebral y su localización, conocer el volumen cerebral total y, gracias a ello, calcular el porcentaje dentro del volumen cerebral total que suponía la zona lesionada. La modalidad R2 * nos permitió obtener información sobre la distribución del hierro dentro del volumen cerebral.

3.6. Inyección intracerebral de MSCs-SPIOs.

Para la administración intracerebral de las rASCs-SPIOs los animales fueron anestesiados mediante una inyección i.p. de 5 mg/kg diazepam (*Valium*®, Roche Pharma) y 100 mg/kg ketamina (*Ketolar*®, Parke-Davis), y además se le proporcionó analgesia mediante inyección s.c. de 0.1 mg/kg buprenorfina (*Buprex*, Schering-Plough). A continuación, se colocó al animal en decúbito prono en un aparato estereotáxico (Kopf

Instruments, mod. 900) y se realizó una incisión longitudinal en la línea media de la cabeza. Se separaron la piel y el periostio exponiendo así la superficie del cráneo. Con la ayuda de un microscopio quirúrgico se realizó un trépano de 1 mm de diámetro a 1,2 mm de Bregma en dirección caudal y 2,6 mm a la derecha de la sutura sagital. Una vez realizado el orificio, se acopló una microjeringa de 10 μ m modelo 701 N (Hamilton) al brazo del estereotáctico y, con la ayuda de una bomba de infusión modelo Micro 4 (World Precision Instruments) se inyectaron 1×10^5 MSCs-SPIOs en el estriado del animal (AP: 1,2 ; L: 2,6; DV: -4,5), a una velocidad de infusión de 0,5 μ m/min. Posteriormente se retiró la jeringuilla y se cerró la incisión de la cabeza del animal mediante varios puntos de sutura. Transcurridas 72 horas desde el momento de la inyección, los animales fueron perfundidos con una mezcla de PFA al 2% y GA al 2,5% en PB 0,1M y se se llevó a cabo el procesado de las muestras para su análisis morfológico mediante MO y MET, siguiendo el protocolo especificado a continuación.

3.7. Procesado de muestras.

Todos lo animales utilizados en el estudio se perfundieron una vez anestesiados con solución salina 0.9% seguida de PFA al 4% y GA al 0.5%, a excepción de los animales a los que se les realizó la inyección intracerebral de rASCs, en los que se utilizó una mezcla de PFA 2% y GA 2.5%. Una vez extraídos los cerebros, se post-fijaron con el mismo fijador durante 24 horas. Posteriormente, se lavaron en PB 0.1M y se realizaron cortes coronales seriados (obteniendo 4 series completas del cerebro) de 50 μ m de grosor con un vibratomo modelo VT 1000M (Leica). Las muestras se conservaron en PB 0.1M con azida al 0,05% a 4°C hasta su utilización.

3.7.1. Recuento de MSCs-SPIOs alojadas en el parénquima cerebral.

Para la detección de las MSCs-SPIOs dentro del parénquima cerebral se llevó a cabo la tinción de una serie completa de cada cerebro analizado mediante la tinción de Perls, la cual tiñe de un color azul intenso el hierro férrico (ión Fe^{3+}) presente en las SPIOs. Para ello, se lavaron los cortes con agua destilada y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación con una solución acuosa compuesta a partes iguales por ácido clorhídrico (Sigma) al 20% y hexoferrocianida potásica trihidrato (Sigma) al 10%. A continuación, se llevó a cabo la neutralización de la reacción con tampón borato $\text{pH} \approx 8$ durante 15 minutos, y después de varios lavados con PB 0.1M se procedió a la detección de células Perls+ en un microscopio Eclipse E200 (Nikon), localizándolas con el objetivo de 10x y confirmando que se trataba de células conteniendo hierro en su citoplasma y no

artefactos de la tinción con el objetivo de 40x. Los cortes que contenían grupos con mayor número de células se reservaron para su posterior análisis morfológico e inmunohistoquímico.

Paralelamente, con una cámara acoplada a una lupa, se fueron tomando fotografías de los cortes sobre los que se llevaron a cabo los recuentos para, posteriormente, poder calcular el área de los mismos con un programa de análisis de imagen (*Image J*). Con los valores obtenidos, se calculó el volumen total recontado así como la densidad de células Perls+ en cada uno de los casos.

3.7.2. Microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.

Para el estudio morfológico los cortes seleccionados durante los recuentos y de las muestras obtenidas después de la inyección intracerebral de rASCs, éstos se post-fijaron con tetraóxido de osmio 2% en PB 0.1M durante hora y media. Se llevo a cabo la deshidratación de las muestras con alcoholes de concentraciones crecientes y se contrastaron con acetato de uranilo 2% durante 2 horas para ser incluidos en resina epoxi Durcupan (Fluka, Sigma). Una vez polimerizada la resina después de dos días, se realizaron secciones semifinas de 1.5 µm de grosor con una cuchilla de diamante (Diatome). Las secciones obtenidas se tiñeron con azul de toluidina y se analizaron con el microscopio óptico ECLIPSE E800 (NIKON). Para el estudio ultraestructural, se seleccionaron los cortes semifinos que contenían células Perls+ y fueron desprendidos del portaobjetos con nitrógeno líquido para su posterior retallado y obtención de secciones ultrafinas de 60-70 nm de grosor. Las muestras fueron estudiadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión Tecnai Spirit G2 (Fei) y se obtuvieron imágenes de las mismas con una cámara digital "Morada" (Soft Imaging System, Olympus).

3.7.3. Inmunohistoquímica.

Para el estudio inmunohistoquímico de los cortes seleccionados con células Perls+, se llevó a cabo el desenmascaramiento antigénico con inmunosaver (EMS) (1:200) a 60°C durante 20 minutos y posteriormente a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los cortes fueron lavados con PB 0.1M y se bloquearon las peroxidasas endógenas con H₂O₂ al 3% y metanol al 10%. A continuación, se llevó a cabo el bloqueo de las muestras con caseína 1% y suero normal de cabra al 5%. Las incubaciones de los anticuerpos primarios (*Tabla 2*) fueron de 12-24 horas a 4°C. Previo lavado con PB 0.1M, se pasó a la incubación con los anticuerpos secundarios (*Tabla 3*) correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, para la detección de los núcleos celulares se llevó a cabo la

Material y métodos

incubación de las muestras con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI)(Thermo Fischer) y se procedió a su montaje con *FluorSave* (Millipore).

Las muestras fueron examinadas bajo un microscopio ECLIPSE 80i (Nikon) acoplado a una cámara modelo DS-Qi1Mc (Nikon). Con la finalidad de co-localizar las células Perls+ con los resultados de la tinción inmunohistoquímica, en primer lugar se tomaron las fotografías de campo claro y a continuación, respetando el mismo enfoque, se tomaron las fotografías de los marcadores fluorescentes.

Anticuerpo	Especie, tipo y dilución	Inmunógeno	Ref., casa comercial	Especificidad
Iba 1	Conejo, policlonal IgG (1:500)	Proteína de Unión al calcio Iba 1	019-19741, Wako	Microglía y macrófagos activos
GFAP	Ratón, monoclonal IgG (1:500)	GFAP purificada de médula espinal de vaca	MABB360, Millipore	Astroцитos

Tabla 3. Listado de anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Especie	Marcaje	Dilución	Ref., casa comercial
Anti-Conejo IgG	cabra	Alexa 647	1:500	A27040, Invitrogen
Anti-Ratón IgG	cabra	Alexa 555	1:500	BA-9200, Vector Labs

Tabla 4. Listado de anticuerpos secundarios.

3.8. Análisis estadístico.

Los datos cuantitativos de este trabajo fueron expresados como media±error estándar de la muestra (EEM). No pudiendo asumir la normalidad de la distribución de los datos por el pequeño tamaño muestral se utilizó el test estadístico de Kruskal Wallis para k muestras independientes. La significación estadística fue considerada si $p < 0,05$. En cuanto a la magnificación del efecto del imán, se calculó la correlación entre la densidad de células Perls+ y volumen de infarto mediante regresión lineal, hallando la correspondiente ecuación de la recta (especificada en el apartado de resultados correspondiente).

Resultados

4. Resultados

BLOQUE A: DIRECCIONAMIENTO MAGNÉTICO *IN VITRO* DE CÉLULAS MARCADAS CON HIERRO.

4.1. Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales adultas de diferentes tejidos.

Las células madre mesenquimales adultas (MSCs) fueron aisladas mediante el cultivo primario a partir de distintas fuentes. En el caso de las MSCs de ratón (mBMSCs) se obtuvieron a partir de la médula ósea, mientras que las de rata (rASCs) y las de humano (hASCs) se extrajeron de tejido adiposo. Desde la siembra inicial, se llevó a cabo un seguimiento de las distintas poblaciones durante el proceso de purificación y una vez alcanzado el pase celular 4, se realizaron los experimentos por tratarse del estadio óptimo para la terapia celular (Choi et al. 2010).

En el cultivo primario de mBMSCs, 1 día después de sembrar la interfase de células mononucleares obtenidas mediante su separación por el gradiente de densidad con Ficoll, apreciamos una heterogeneidad en la población inicial ya que encontramos tanto células de linaje hematopoyético como células estromales de origen mesenquimal (Pierini et al. 2012). Así, en la placa de cultivos observamos, por una parte células redondeadas en su mayoría flotantes y por otra, células adherentes que ya habían comenzado a adoptar la morfología fibroblastoide típica de las MSCs (*Figura 19A*). Cuando sustituimos el medio de cultivo por medio fresco, se eliminó gran parte de esta subpoblación de células flotantes y después de 5 días de cultivo ya distinguimos con claridad una población de células con morfología fusiforme, apreciándose finas y largas expansiones de su citoplasma (*Figura 19B*). A través de los sucesivos pases celulares, continuamos purificando la población de mBMSCs por su adherencia al plástico y, una vez obtenida una población mayoritaria de células adherentes (*Figura 19C*), llevamos a cabo su caracterización inmunofenotípica mediante citometría de flujo (*Figura 19D-K*).

Estudiando la expresión de distintos marcadores de superficie, confirmamos que las células cultivadas constituían una población prácticamente pura de mBMSCs. Mediante la incubación con anticuerpos fluorescentes, detectamos que las mBMSCs obtenidas resultaban positivas para los marcadores de superficie CD105, CD29 y Sca-

Resultados

1 (Figura 19H, I, K), perfil característico de las mBMSCs (Sung et al. 2008) y, por el contrario, su marcaje era negativo para la proteína CD45 no presente en la superficie de las MSCs.

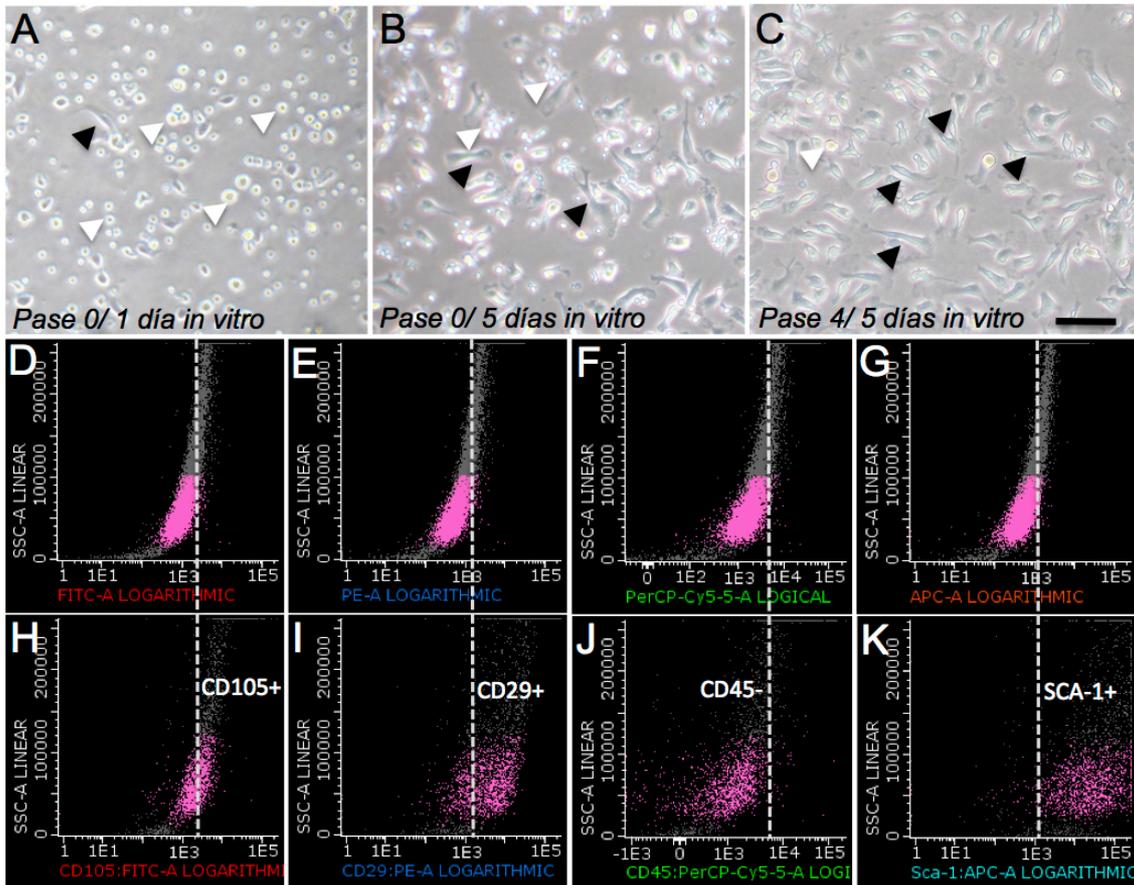


Figura 19. (A-C) Imágenes con el microscopio invertido mostrando células obtenidas del cultivo primario de médula ósea de ratón (mBMSCs). A) Después de 1 día de cultivo *in vitro* (pase celular 0) se observa una subpoblación no adherente de aspecto redondeado (puntas de flecha blancas) y células adherentes que han comenzado a adoptar morfología fibroblástica (puntas de flecha negras). B) Después de 5 días de cultivo (pase celular 0), se aprecia que parte de la subpoblación de células redondeadas se ha eliminado con la renovación del medio de cultivo y las que han permanecido en la placa de cultivo siguen sin adherirse (puntas de flecha blancas). La subpoblación de células adherentes ha adquirido un aspecto más fusiforme con expansiones finas y alargadas de su citoplasma (puntas de flecha negras). C) Después de 4 pases celulares se observa una población mayoritaria de células fusiformes (puntas de flecha negras), habiendo eliminado prácticamente por completo con los lavados la población no adherente (punta de flecha blanca) (Barra de escala 50 μ m). **(D-K) Gráficas de puntos de citometría de flujo de las mMSCs en pase celular 4.** Las células sin marcar (D-G; control negativo) establecen el cero de la fluorescencia (líneas blancas discontinuas) para cada marcador. Tras el marcaje con los anticuerpos (H-K) se observa el cambio de la señal de fluorescencia desplazada hacia la derecha en los marcadores positivos CD105 (H), CD29 (I) y Sca-1 (K). En el caso de CD45 la señal no varía al tratarse de un antígeno no presente en las MSCs (J).

Una vez caracterizadas molecularmente las mBMSCs obtenidas, llevamos a cabo su estudio morfológico mediante microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de transmisión (MET). Al observar secciones semifinas teñidas con azul de toluidina,

encontramos cierta heterogeneidad en el tamaño y morfología de la población. Por una parte, diferenciamos células con forma poligonal, y por otra, células con morfología fusiforme cuyo citoplasma abarcaba un área menor que las primeras, presentando éste largas y finas expansiones. Independientemente de la morfología celular, apreciamos que las mBMSCs contenían en distinto grado cuerpos oscuros en su citoplasma, los cuales estudiamos con más detalle en el análisis ultraestructural. La forma del núcleo de las células dependía del tipo de subpoblación, siendo de forma redondeada en las células poligonales y adoptando una morfología elíptica en el caso de las células fusiformes (*Figura 20A*).

A nivel ultraestructural pudimos comprobar que los núcleos de las mBMSCs eran eucromáticos, con más de dos nucléolos prominentes y que en ocasiones, su envoltura nuclear presentaba profundas invaginaciones (*Figura 20B y C*). Como ya habíamos constatado mediante MO, se trataba de células con abundantes orgánulos en su citoplasma (*Figura 20D*), compuestos principalmente por cortas y abundantes cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RER) muy dilatado, numerosas mitocondrias de morfología variada y varios complejos de Golgi de gran tamaño distribuidos alrededor del núcleo (*Figura 20G*), observándose también de forma puntual pequeñas gotas de grasa (*Figura 20F*). En lo que respecta a las porciones de citoplasma más cercanas a la membrana celular, observamos numerosas vesículas de exocitosis/endocitosis (*Figura 20H*), lo que reflejaba que existía un elevado tráfico de sustancias a través de la misma. Además, también apreciamos la presencia de microvellosidades/filopodios (*Figura 20I*) y fibras de estrés en las regiones de adhesión a la placa (*Figura 20H*). Durante el análisis ultraestructural, encontramos una amplia gama de células en lo referente al contenido de cuerpos oscuros, distinguiendo desde células de aspecto claro (*Figura 20D*) hasta células con abundantes cuerpos distribuidos por toda la superficie citoplasmática adoptando un color oscuro (*Figura 20E*). En el estudio detallado de los mismos, observamos que contenían material electrodenso en su interior y su estructura era multi-membranosa (*Figura 20F*). Sin embargo, analizando las características de dichas subpoblaciones, no encontramos un patrón específico ni en cuanto su morfología ni en lo relativo al contenido de su citoplasma.

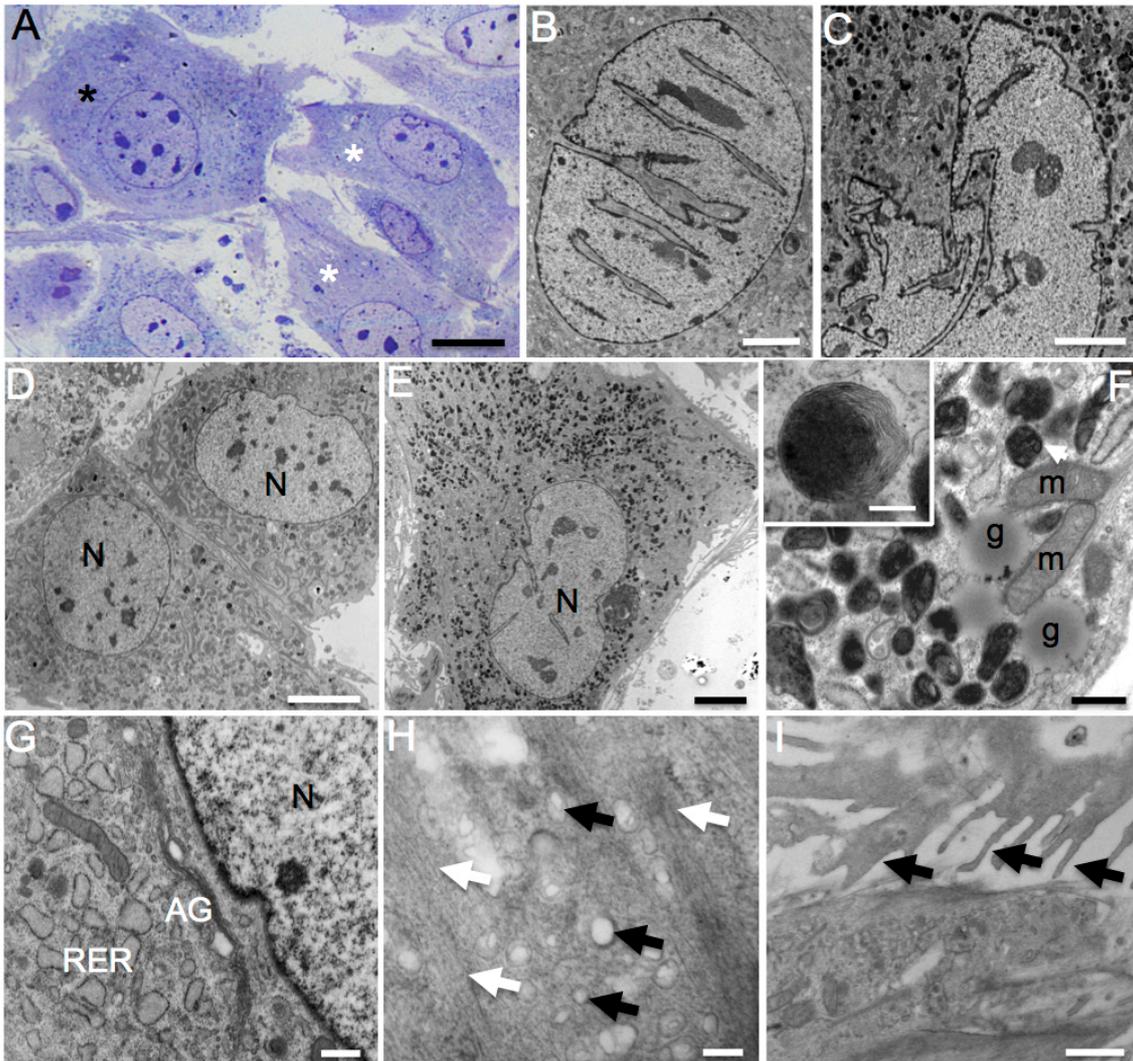


Figura 20. Estudio morfológico de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón (mBMSCs). A) Imagen de una sección semifina (1,5 μm) teñida con azul de toluidina mostrando las mBMSCs después de 48 horas de cultivo. Detectamos unas células de aspecto fusiforme (asteriscos blancos) y otras de mayor tamaño con morfología poligonal (asterisco negro). (B-I) Imágenes de secciones ultrafinas (70nm) con el microscopio electrónico de transmisión. B y C) Núcleos de forma irregular donde se observan profundas invaginaciones de la envoltura nuclear. D) Imagen panorámica mostrando mBMSCs con escasos cuerpos oscuros en su citoplasma. Dichas células contienen grandes núcleos (N) con varios nucléolos y abundantes orgánulos en su citoplasma. E) mBMSCs con abundantes cuerpos de inclusión en su citoplasma. F) Citoplasma a grandes aumentos mostrando los cuerpos de inclusión con material electrodensito, mitocondrias (m) y pequeñas gotas de grasa (g). A grandes aumentos se aprecia la estructura multimembranosa de dichos cuerpos de inclusión (esquina superior izquierda). G) Citoplasma de una mBMSCs mostrando abundantes cisternas de retículo endoplásmico rugoso dilatadas (RER) y cisternas de aparato de Golgi (AG) organizadas en torno al núcleo eucromático (N). H) Zona adyacente a la membrana celular con numerosas vesículas de endocitosis/exocitosis (flechas negras) y filamentos de actina (flechas blancas). I) Filopodios de adhesión a la placa de cultivo (flechas). Barras de escala A: 10 μm , B y C: 2,5 μm , D y E: 5 μm , Detalle en E: 200nm, F y G: 0,5 μm , H: 200 nm, I: 1 μm .

Paralelamente al estudio con mBMSCs, llevamos a cabo la obtención de células madre mesenquimales de rata (rASCs) a partir de tejido adiposo. En este caso, el rendimiento del cultivo primario fue mucho mayor en comparación con el cultivo de

médula ósea de ratón. Así, se llegaron a obtener aproximadamente 30×10^6 de rASCs en un pase celular 2, frente a los $1,5 \times 10^6$ de mBMSCs reunidas después del mismo número de pases celulares. Al sembrar la fracción celular obtenida después de la digestión con colagenasa, encontramos células flotantes y células que en cuestión de horas se adherieron a la placa de cultivos comenzando a adoptar una morfología fibroblastoide. Las células flotantes se eliminaron prácticamente por completo con el primer cambio de medio de cultivo, obteniendo así una población considerable de células fusiformes después de 5 días de cultivo (*Figura 21A*). El crecimiento de las rASCs fue mucho más rápido que el de las mBMSCs y, después de amplificar la población durante varios pases celulares, procedimos a su caracterización con el citómetro de flujo en células en pase 4 (*Figura 21B*).

En este caso, para el estudio inmunofenotípico elegimos como marcadores de superficie característicos de las MSCs CD90 y CD29 y volvimos a utilizar como control negativo el marcador CD45. Así, confirmamos la presencia de los antígenos CD90 y CD29 (*Figura 21D y E*) en la superficie de las células cultivadas y, por el contrario, la señal de fluorescencia resultó negativa para el marcador CD45 (*Figura 21F*), confirmándose de esta manera que la población cultivada se constituía de MSCs.

Al estudiar la morfología de las rASCs mediante MO, observamos una población de células prácticamente idénticas a las mBMSCs tanto a nivel morfológico como en lo referente al contenido de su citoplasma. De la misma forma, en secciones semifinas encontramos tanto células con morfología fusiforme con largas expansiones de su citoplasma como células con una forma estrellada de aspecto poligonal (*Figura 22A*). Estas células contenían grandes núcleos con varios nucléolos, adaptando su forma a la morfología celular. En el análisis ultraestructural, observamos que la envoltura nuclear es generalmente de aspecto regular, aunque en ocasiones encontramos núcleos donde se encuentra profundamente invaginada (como ocurría en el caso de las mBMSCs). En este tipo celular a menudo encontramos células con dos o más núcleos (*Figura 22B*). De forma puntual encontramos células con cuerpos de inclusión multi-membranosos con material electrodensos en su interior (*Figura 22D*). Un rasgo que caracterizó a las rASCs fue el hecho de contener gotas de grasa en su citoplasma de forma más frecuente y en mayor cantidad que las mMSCs, al tratarse de MSCs obtenidas de tejido adiposo (*Figura 22D*). En cuanto a los orgánulos, encontramos abundantes cisternas de RER dilatadas, varios aparatos de Golgi en torno al núcleo y mitocondrias finas y alargadas (*Figura 22E*). Además, en relación a la membrana celular, encontramos de la misma forma que en las mBMSCs pequeñas vesículas de

Resultados

endocitosis/exocitosis (Figura 22F) y abundantes filamentos de actina en las zonas de adhesión a la placa de cultivos (Figura 22G).

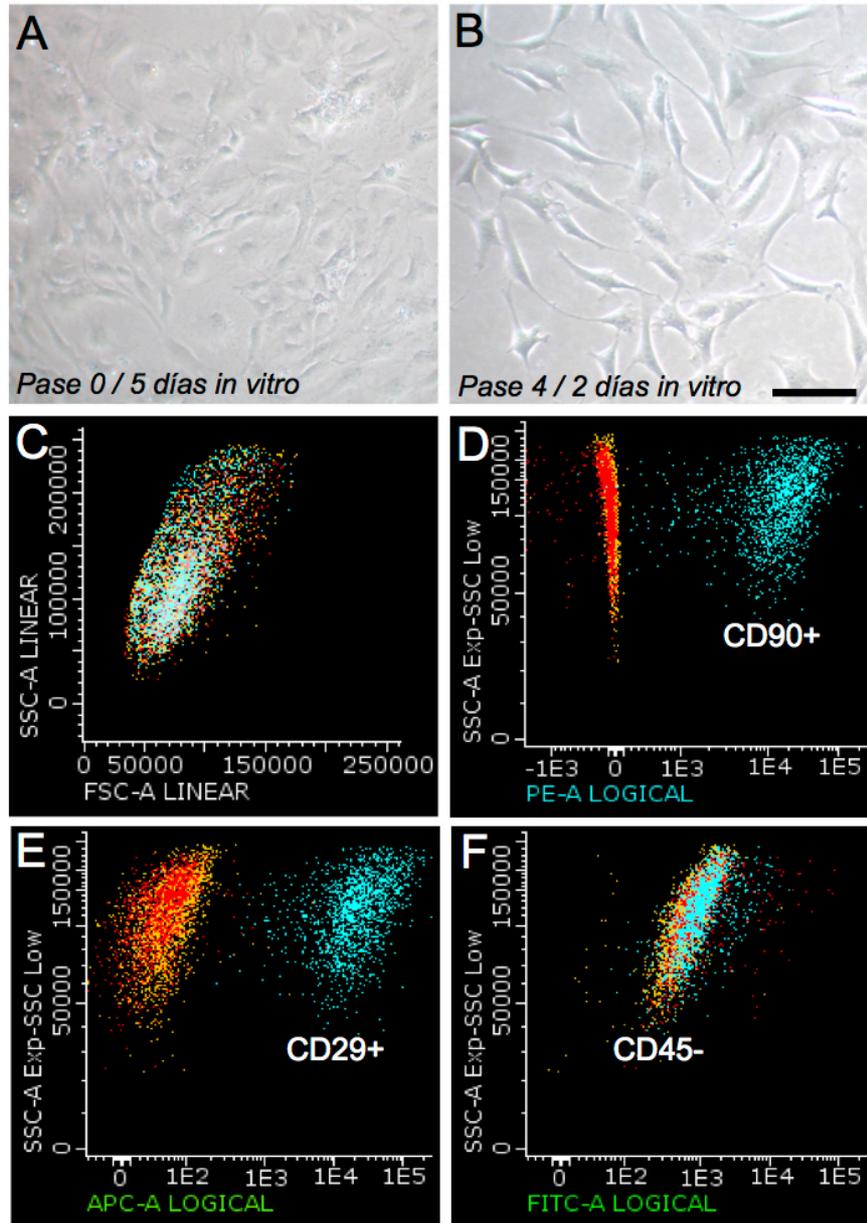


Figura 21. (A-B) Imágenes con el microscopio invertido mostrando células obtenidas en el cultivo primario de tejido adiposo de rata (rASCs). A) Células de morfología fusiforme confluentes al 90% después de 5 días de cultivo (sin pases celulares). B) Población homogénea de células de aspecto fibroblastoide en pase celular 4 después de 2 días de cultivo (confluencia 70%)(Barra de escala 50 µm). (C-F) Gráficas de puntos para la caracterización de las rASCs mediante citometría de flujo. Se aprecia un aumento de la señal de fluorescencia en las células marcadas con los anticuerpos CD90 (D) y CD29 (E) en comparación con las células sin marcar (C), resultando positiva la población para dichos marcadores. Por el contrario, la señal para CD45 (antígeno no presente en las MSCs) resulta negativa (F), sin apreciarse cambios en la gráfica de puntos con respecto a la gráfica control (C).

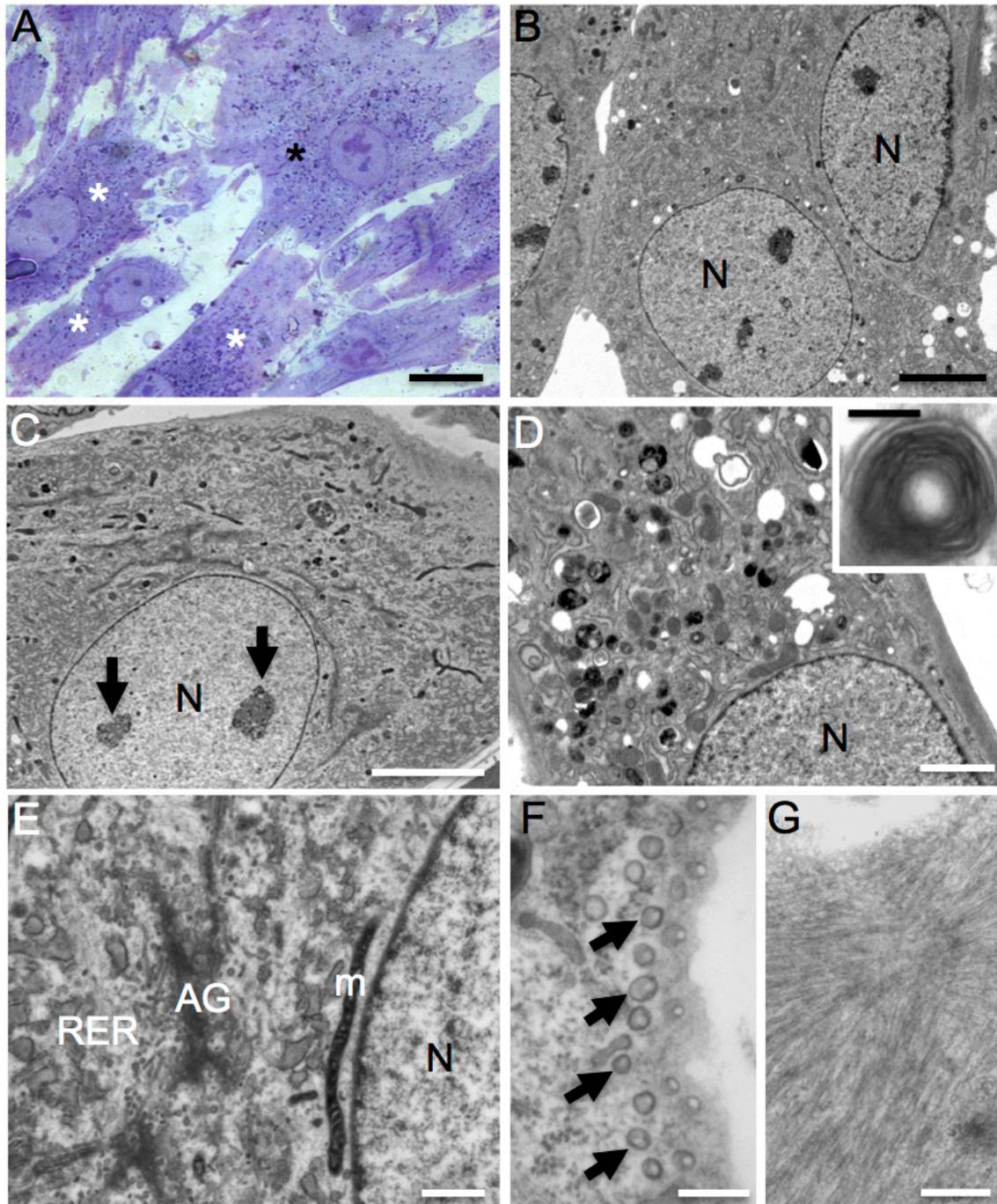


Figura 22. Estudio morfológico de células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata (rASCs). A) Sección semifina teñida con azul de toluidina donde se observan tanto células fusiformes (asteriscos blancos) como otras con forma poligonal (asterisco negro). (B-G) Imágenes de secciones ultrafinas mediante MET. B) rASC binucleada. C) Imagen panorámica de una rASC con el núcleo eucromático redondeado en posición central (N) con varios nucléolos (flechas negras) y citoplasma rico en orgánulos. D) Célula con numerosos cuerpos de inclusión electrodensos y numerosas gotas de grasa en su citoplasma. A grandes aumentos se observa la estructura multi-membrana de los cuerpos de inclusión (esquina superior derecha). E) Citoplasma de una rASCs donde se aprecian abundantes cisternas de retículo endoplásmico rugoso dilatadas (RER), varios aparatos de Golgi (AG) entorno al núcleo (N) y una larga mitocondria (m). F) Numerosas vesículas (flechas negras) de endocitosis/exocitosis asociadas a la membrana celular. G) Abundantes filamentos de actina en las zonas de adhesión a la placa de cultivos. Barras de escala A: 10 μ m, B y C: 5 μ m, D: 2 μ m detalle: 250 nm, E: 1 μ m, F: 250 nm, G: 500 nm.

Resultados

Por último, cultivamos células madre mesenquimales obtenidas de tejido adiposo humano (hASCs). Una vez obtenida la fracción vascular estromal después de la digestión química y mecánica del tejido adiposo, procedimos a su purificación de la misma forma que en los casos anteriores, renovando el medio cada 2-3 días y desechando la subpoblación de células flotantes, expandiendo así la población adherente al plástico de células fusiformes (*Figura 23 A-C*).

Alcanzado el pase celular 4, procedimos al análisis mediante citometría de flujo para la caracterización de la población cultivada. En este caso se eligieron como marcadores de superficie característicos de las hASCs CD90, CD73 y CD105 y, por otro lado, para descartar que no se tratase de otro tipo celular del linaje hematopoyético se eligieron los antígenos CD45, CD19, CD14, CD34 y HLA-DR. Así, después de marcar las células con los anticuerpos correspondientes y realizar la lectura en el citómetro de flujo, pudimos confirmar que existía señal fluorescente para los marcadores CD90, CD73 y CD105 (*Figura 23 H,I,K*) y por el contrario, no existía marcaje para los antígenos CD45, CD19, CD14, CD34 y HLA-DR (*Figura 23 J, L-O*). De esta forma, pudimos confirmar a nivel molecular que las células obtenidas tras el cultivo primario de tejido adiposo humano constituían una población pura de MSCs.

En el estudio morfológico de la población cultivada de hASCs, encontramos que compartían casi la totalidad de los rasgos descritos en las células madre mesenquimales de ratón y de rata estudiadas previamente. En secciones semifinas encontramos una subpoblación mayoritaria de células fusiformes con largas y finas extensiones de su citoplasma y, por otra parte, células con forma poligonal cuyo citoplasma abarcaba un área mayor, aunque también se observaron células con características intermedias. En las células poligonales apreciamos expansiones en distintas direcciones con un contenido de tipo fibroso, a diferencia de las células fusiformes que sólo contenían 2 expansiones contrapuestas. Todas ellas contenían abundante material citoplasmático presentando un núcleo en posición central, el cual adquiría una forma más o menos ovalada en función de la morfología celular (*Figura 24A*). En algunos casos encontramos células binucleadas e incluso multinucleadas. Al analizar la disposición de las células con respecto a la superficie de cultivo, observamos que en los cortes semifinos más próximos a la placa predominaban las células poligonales, mientras que las células fusiformes las encontrábamos también en niveles (o cortes) superiores.

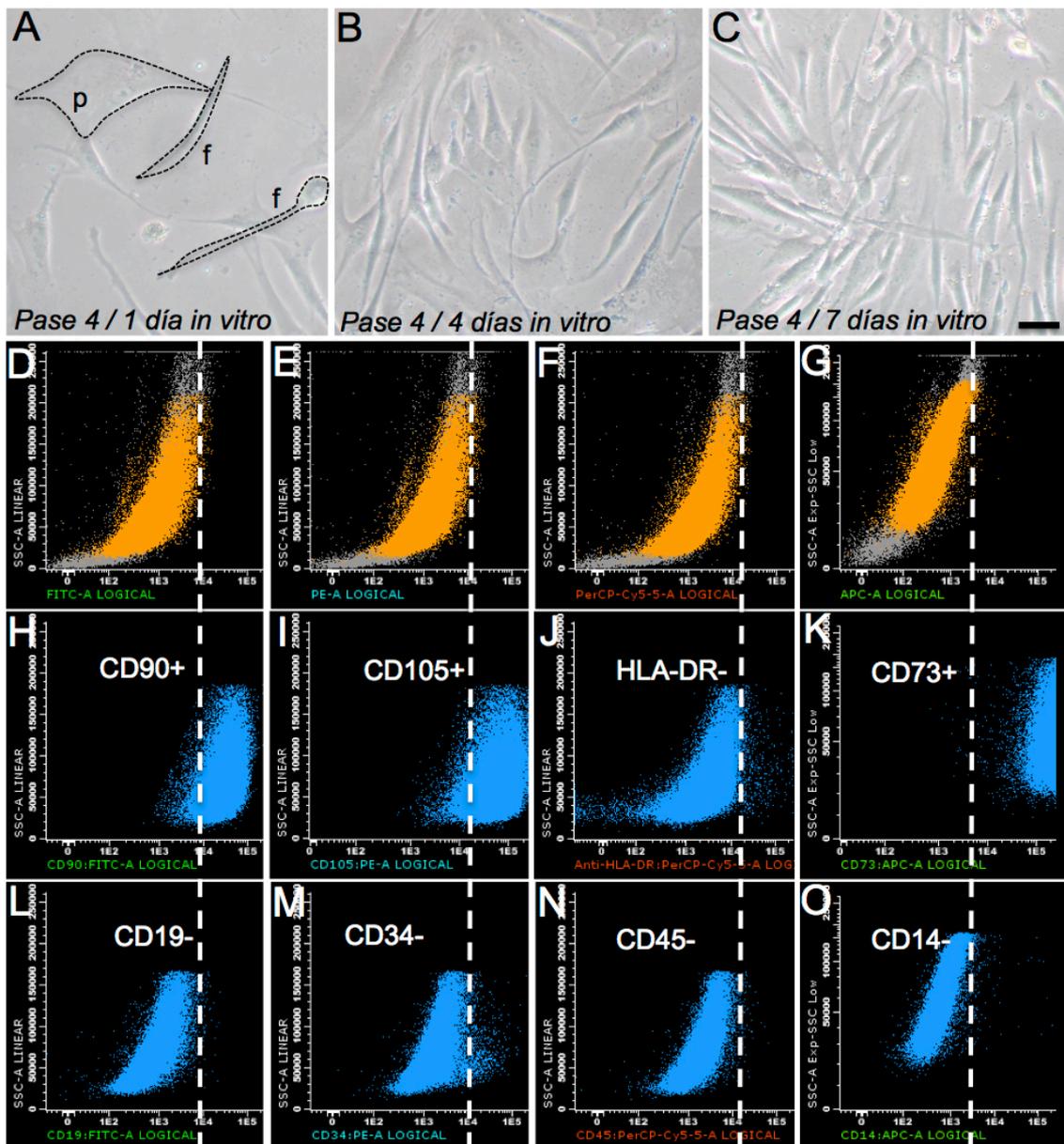


Figura 23. (A-C) Imágenes con el microscopio invertido mostrando células madre mesenquimales en fase 4 obtenidas de tejido adiposo humano (hASCs). A) Después de 24h de cultivo las células se han adherido a la placa y ya apreciamos unas con morfología poligonal (p) y otras finas y alargadas de aspecto fusiforme (f). B) Pasados 4 días de cultivo *in vitro*, se aprecia un mayor número de células expandiendo sus extensiones citoplásmicas en direcciones contrapuestas. Las células se disponen en diferentes capas situándose unas por encima de otras. C) Después de 7 días de cultivo *in vitro* las células continúan proliferando y han alcanzado alrededor de un 80% de confluencia en la placa de cultivo (Barra de escala A,B y C: 50 μ m) (D-O) Gráficas de puntos para la caracterización molecular de las hASCs mediante citometría de flujo. (D-G) Con la lectura de células sin marcar se establece el control negativo de fluorescencia para cada longitud de onda. En los marcadores CD90 (H), CD105 (I) y CD73 (K) se observa un desplazamiento de la señal de fluorescencia hacia la derecha, indicativo del marcaje positivo de las hASCs para dichos antígenos. En cambio, la señal no varía en el caso de HLA-DR (J), CD19 (L), CD34 (M), CD45 (N) y CD14 (O), lo que demuestra la ausencia de dichas proteínas en la superficie de las células cultivadas.

Resultados

A nivel ultraestructural, observamos que las características de las dos subpoblaciones diferenciadas (poligonales y fusiformes) eran prácticamente similares, como ocurría en el caso de las mBMSCs y las rASCs. Se trataba de células con abundantes orgánulos en su citoplasma, concentrados preferentemente en las proximidades al núcleo (*Figura 24C*). El núcleo presentaba en ocasiones invaginaciones y su cisterna perinuclear se encontraba escasamente dilatada (*Figura 24B*). Asociada a la membrana interna, se observaba en general una delgada franja de cromatina y el resto del núcleo presentaba una cromatina muy laxa. El nucléolo se encontraba ocupando posiciones centrales adoptando contornos irregulares, apreciándose claramente porciones granulares y fibrosas (*Figura 24B*). La matriz citoplásmica era electrodensa y contenía abundantes gotas de grasa, de la misma forma que ocurría en el caso de las MSCs de rata al tratarse de células obtenidas de tejido adiposo. Encontramos numerosas cisternas de RER, generalmente cortas y ligeramente dilatadas, con un contenido homogéneo y poco electrodenso (*Figura 24D*) y, por otra parte, las cisternas de retículo endoplásmico liso (REL) también eran muy abundantes. En zonas próximas al RER, solían encontrarse los dictiosomas del aparato de Golgi (*Figura 24E*), que aparecían formados por agrupaciones de 3-5 largos sáculos. Alrededor de estos sáculos se concentraba una heterogénea población de vesículas, tanto de contenido denso como claro, incluso vesículas de clatrina (*Figura 24E*). Estas vesículas se encontraban dispersas por todo el citoplasma y en gran parte, asociadas a la membrana celular, apreciándose procesos tanto de endocitosis como de exocitosis a lo largo de toda su superficie (*Figura 24F*).

Al estudiar las mitocondrias distinguimos una clara heterogeneidad, observándose desde formas redondeadas hasta mitocondrias muy alargadas (*Figura 25A*), e incluso algunas con ramificaciones. Todas ellas poseían matriz electrodensa y crestas laminares. A menudo, encontramos cuerpos multimembranosos a modo de figuras mielínicas (similares a los observados en mBMSCs y rASCs, mostrados en las *Figuras 20F y 22D*), situados preferentemente en las zonas más próximas al núcleo y variando notablemente su número de una célula a otra. Las estructuras filamentosas eran muy abundantes, especialmente en las células de tipo poligonal, situándose preferentemente asociadas a la superficie de la membrana celular para su anclaje (*Figura 24F*). En cuanto a los contactos célula-célula, encontramos uniones adherentes caracterizadas por una banda densa (*Figura 25C*) no detectadas en el caso de las mBMSCs ni las rASCs. Además, vimos acentuados los procesos de endocitosis/exocitosis en las zonas inmediatas a dichos contactos.

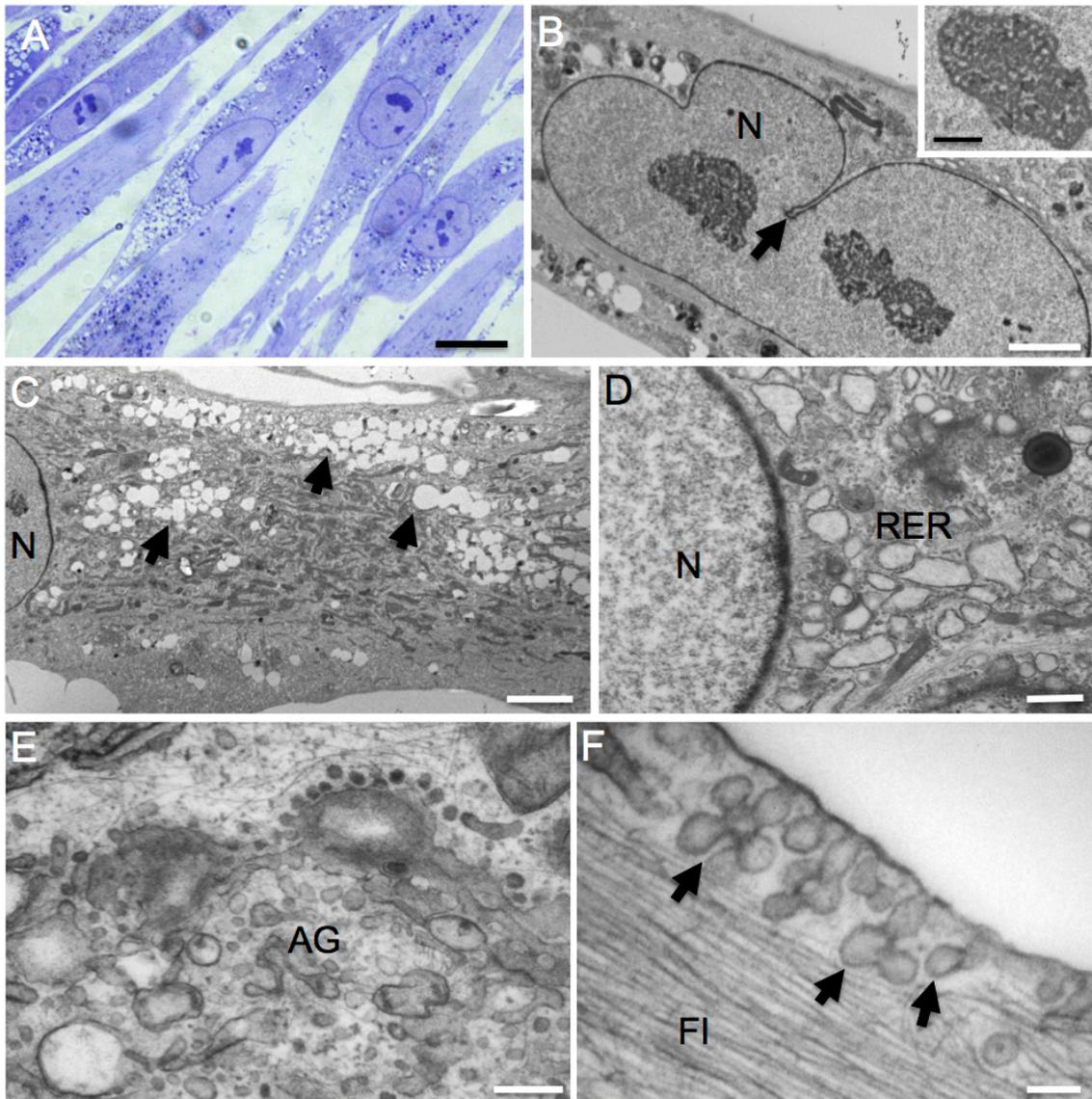


Figura 24. Estudio morfológico de células madres mesenquimales obtenidas de tejido adiposo humano (hASCs). A) Sección semifina (1,5 μm) teñida con azul de toluidina donde se observa una población mayoritaria de células fusiformes con núcleos grandes y abundantes orgánulos en su citoplasma. (B-F) Imágenes de secciones ultrafinas (70 nm) tomadas con el microscopio electrónico de transmisión. B) Núcleo euromático de una hASCs profundamente invaginado donde se aprecian 2 prominentes nucléolos (detalle esquina superior derecha). C) Citoplasma de una hASCs fusiforme conteniendo abundantes orgánulos citoplasmáticos y numerosas gotas de grasa (flechas). D) Imagen mostrando el núcleo (N) con cromatina laxa y en torno a él cortas cisternas de retículo endoplásmico rugoso dilatadas (RER). E) Detalle de los dictiosomas del AG. F) Imagen a grandes aumentos mostrando regiones adyacentes a la membrana celular con abundantes filamentos de actina (FA) y numerosas vesículas de endocitosis/exocitosis (flechas negras). Barras de escala A: 10 μm . B: 2,5 μm detalle: 1 μm , C: 5 μm , D: 1 μm , E: 250 nm, F: 100 nm.

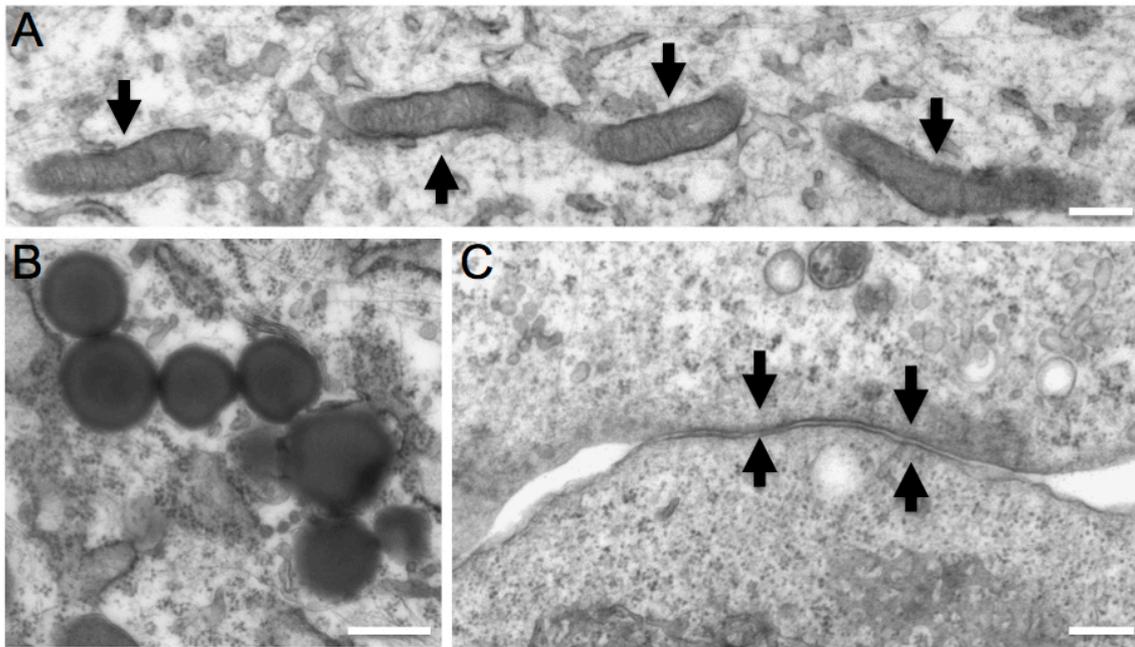


Figura 7. Detalles de la ultraestructura de las hASCs. (A-C) Imágenes de MET de secciones ultrafinas (70 nm). A) Larga mitocondria. B) Detalle de una agrupación de gotas de grasa. C) Uniones densas de adhesión (flechas) entre dos células . Barras de escala A, B y C: 200 nm.

Una vez realizada la caracterización molecular de las mBMSCs, rASCs y hASCs mediante citometría de flujo y llevado a cabo el estudio morfológico de las mismas, quisimos valorar si las células cultivadas tenían la capacidad para diferenciarse *in vitro* a distintos linajes celulares de origen mesodérmico (adipogénico, osteogénico y condrogénico). Así podríamos caracterizar las poblaciones obtenidas, confirmando uno de los criterios definitorios de las MSCs, su multipotencialidad (Pittenger 1999). Este estudio únicamente se llevaría a cabo en las rASCs y las hASCs.

Para la diferenciación *in vitro* de las células a los distintos linajes, procedimos a su cultivo bajo las condiciones especificadas en el apartado *Diferenciación in vitro a distintos linajes celulares* de la metodología. Concluido el proceso de diferenciación (después de 21 días), realizamos tinciones específicas para cada uno de los linajes.

La tinción con Aceite Rojo O para la confirmación del linaje adipogénico, mostró que después de 21 días, tanto las rASCs como las hASCs contenían gotas lipídicas en su interior que adoptaron un color rojo intenso. Además, observamos cierta heterogeneidad en el grado de diferenciación, encontrando desde células más alargadas con pequeñas gotas lipídicas hasta células con morfología más redondeada conteniendo grandes gotas de grasa que ocupaban prácticamente la totalidad del citoplasma de las mismas (*Figura 26A y D*). Por otra parte, después de la tinción de las rASCs y las hASCs con Rojo Alizarin, específica para el linaje osteogénico,

apreciamos una evidente coloración roja tanto de la matriz extracelular como de las células (*Figura 26B y E*). Dicha coloración indicaba la presencia de precipitados de calcio contenidos en los osteocitos y su secreción al espacio extracelular. Por último, mediante la tinción con Azul Alcían, comprobamos en ambos casos (*rASCs* y *hASCs*, *Figura 26C y F*) la presencia de proteoglicanos sulfatados presentes en la matriz extracelular donde se encontraban los condrocitos, apreciándose una clara coloración azul de las esferas formadas durante la diferenciación.

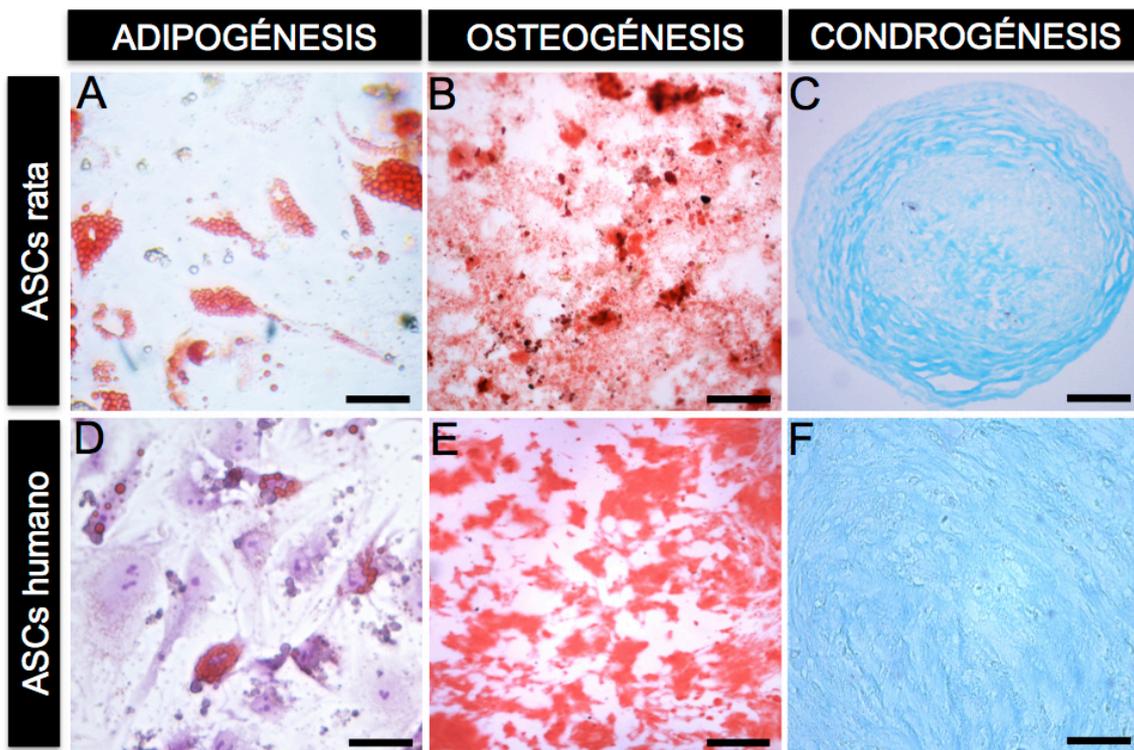


Figura 26. Diferenciación de MSCs a distintos linajes de origen mesodérmico. (A-F) Imágenes de las tinciones específicas para cada linaje celular tomadas con el MO después de 21 días de diferenciación *in vitro* de *rASCs* (A-C) y *hASCs* (D-F). A y D) La tinción con Aceite Rojo O marcó de un color rojo intenso los numerosos depósitos de grasa en el interior las células. En el caso de las *hASCs* (D) se contratiñó con azul de toluidina para apreciar la morfología celular. (B y E) Tinción con Rojo Alizarín coloreando de rojo los depósitos de calcio presentes en los osteocitos y el material secretado al espacio extracelular. (C y F) Confirmación de la presencia de proteoglicanos sulfatados (color azul) presentes en la matriz extracelular cartilaginosa del linaje condrogénico. Barras de escala A y D: 25 μm , B: 50 μm , E: 150 μm , C: 200 μm y F: 50 μm .

En el caso de las *hASCs*, además de realizar las tinciones específicas para los distintos linajes, quisimos llevar a cabo un estudio morfológico tanto a día 7 (*Figura 27*) como a día 21 (*Figura 28*) de su cultivo *in vitro*, sometiendo a las células a las mismas condiciones para inducir su diferenciación.

Al analizar secciones semifinas después de 7 días de incubación con los medios específicos para cada uno de los linajes de origen mesodérmico (adipogénico,

Resultados

osteogénico y condrogénico), dentro de cada linaje observamos como la mayoría de células habían comenzado a adoptar características propias del mismo (*Figura 27*).

Durante la adipogénesis (*Figura 27A, D y G*), las hASCs originalmente de forma fusiforme habían perdido sus expansiones, adoptando una forma más redondeada (*Figura 27A*). En el citoplasma de estas células encontramos numerosas gotas lipídicas de pequeño tamaño (alrededor de 2 μm de diámetro) ocupando gran parte del citoplasma, reduciéndose así notablemente los orgánulos contenidos en él (*Figura 27A y D*). Así, en secciones ultrafinas apreciamos un contenido homogéneo de los orgánulos contenidos en el citoplasma, conservando una morfología similar a los encontrados en las hASCs pero habiéndose reducido drásticamente su número, ocupando su lugar pequeñas gotas de grasa (*Figura 27D y G*).

Al estudiar las hASCs diferenciándose al linaje osteogénico (*Figura 27 B,E,H*), en secciones semifinas apreciamos que después de 7 días de cultivo *in vitro* las células también habían perdido en cierto grado su forma fibroblastoide, asemejándose a la subpoblación de hASCs poligonales descritas previamente. Además de poseer abundantes orgánulos citoplasmáticos, apreciamos grandes vesículas con material refringente acumulado en el interior de su citoplasma (*Figura 27B*). Observamos material del mismo tipo en el espacio extracelular, lo que nos indicó que las células secretaban dichos agregados al exterior. En el análisis ultraestructural, apreciamos que los núcleos habían adoptado formas muy irregulares y frecuentemente se encontraban profundamente invaginados (*Figura 27E*). Muchas de las células, las que ya habían perdido parte de los rasgos característicos de las hASCs estudiadas previamente, poseían abundantes cuerpos de inclusión muy similares a los ya observados y descritos en las MSCs a través de las diferentes especies (ratón, rata y humano). De la misma forma, contenían material electrodensito en su interior, pero su estructura multimembrana era ligeramente distinta, distinguiéndose varios compartimentos dentro de un mismo cuerpo de inclusión (*Figura 27E*). En cuanto a los depósitos refringentes detectados en las secciones semifinas, mediante MET observamos también grandes vesículas con gránulos electrodensos en su interior (*Figura 27H*).

En el caso de la diferenciación hacia el linaje condrogénico (*Figura 27C, F, I*), se trataba de hASCs que se comenzaban a diferenciar a partir de un "pellet". Así pues, después de 7 días de cultivo *in vitro* ya pudimos apreciar claramente una esfera de aproximadamente 0,5 mm de diámetro que contenía células dispuestas en torno a un núcleo central (*Figura 27C*). Lo más llamativo al estudiar las secciones semifinas de este linaje celular fue la matriz extracelular que ocupaba todos los espacios

intercelulares a lo largo de toda la esfera, excepto en las capas más externas, teñida de un color azul intenso con el azul de toluidina (*Figura 27C*). Se trataba de una población muy heterogénea donde podíamos distinguir agrupaciones de células con forma alargada, generalmente en las capas más externas de la esfera y, otras zonas con células de forma redondeada situadas en su mayoría en la zona central. Analizando a nivel ultraestructural el contenido del citoplasma, destacó la abundancia de largas cisternas ligeramente dilatadas de RER (*Figura 27F*) y la existencia de abundantes vesículas con material claro asociadas al Aparato de Golgi. Además, al analizar la matriz extracelular encontramos abundantes fibras de colágeno, elemento muy característico dentro de este linaje celular (*Figura 27I*).

Al llevar a cabo el estudio morfológico pero en este caso una vez concluido el periodo establecido para la diferenciación *in vitro* (21 días), comprobamos que las características mostradas por las células de cada linaje diferían por completo de la población inicial de hASCs (*Figura 28*). Además, los rasgos apreciados a día 7 que comenzaban a distinguir cada uno de los linajes, después de 21 días de diferenciación se habían acentuado y resultaban totalmente evidentes y característicos para cada población.

En el caso del linaje adipogénico (*Figura 28 A, D y G*), en secciones semifinas apreciamos que las células habían perdido por completo su morfología fusiforme y las pequeñas gotas lipídicas se habían fusionado formando grandes gotas de grasa (de hasta 8 μm de diámetro), determinando así una morfología nuclear cuboidal. A nivel ultraestructural, encontramos que las células habían perdido casi por completo los orgánulos presentes en el citoplasma y éste se encontraba ocupado por enormes gotas lipídicas que modificaban dependiendo de su disposición la forma del núcleo, el cual había pasado a contener un único y prominente nucléolo de mayor tamaño (*Figura 28D*). En algunas de las enormes gotas lipídicas, apreciamos una especie de envoltura compuesta por material electrodensito y en ocasiones, se observaban mitocondrias con sus crestas bien definidas organizadas en torno a ellas (*Figura 28G*).

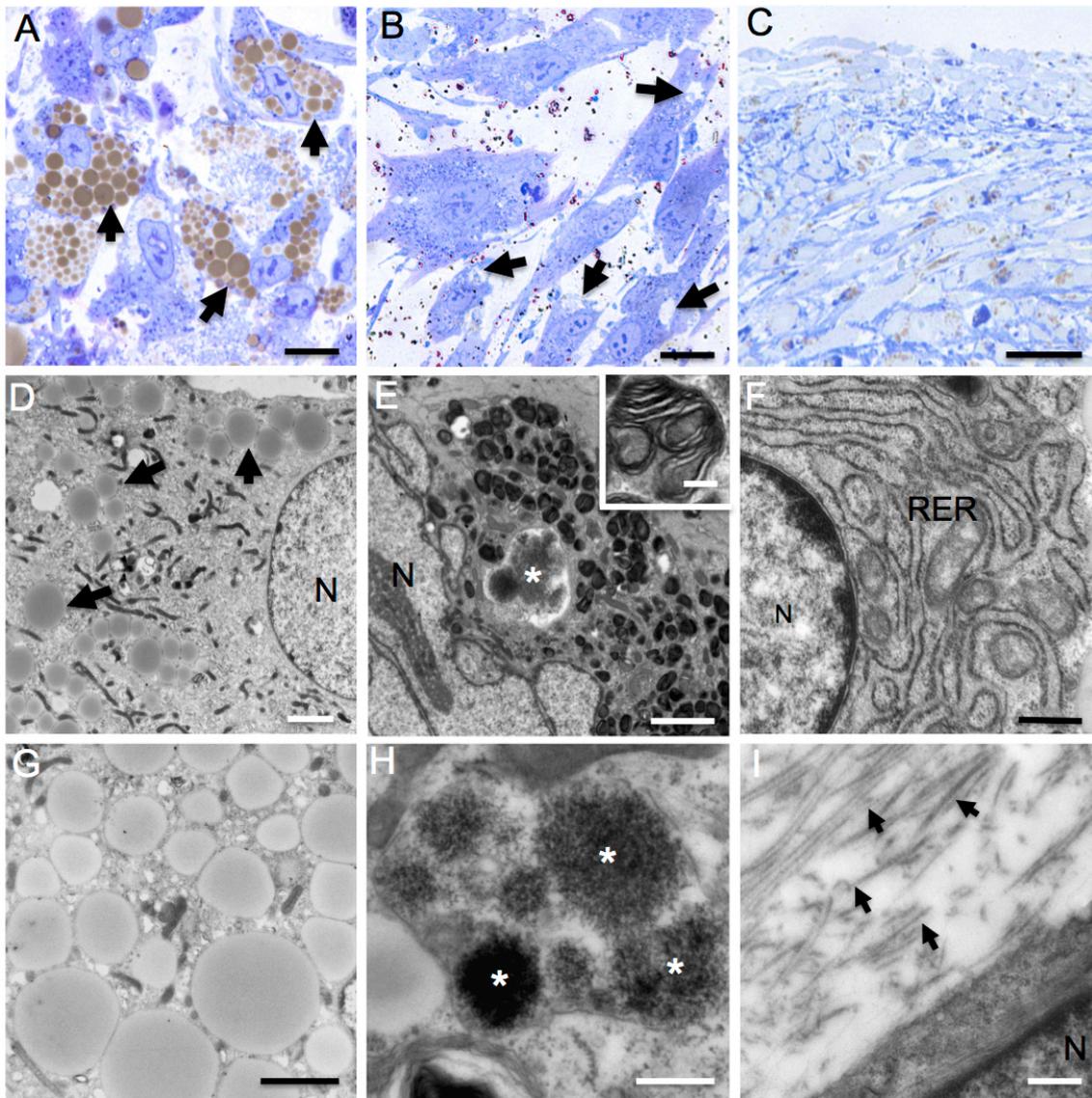


Figura 27. Estudio morfológico de hASCs después de 7 días de cultivo *in vitro* para su diferenciación a distintos linajes de origen mesodérmico. (A-C) Secciones semifinas (1,5 μm) teñidas con azul de toluidina. A) En el linaje adipogénico las hASCs han perdido su forma fusiforme adquiriendo un aspecto más redondeado y su citoplasma ha perdido parte de sus orgánulos para llenarse de pequeñas gotas de grasa (flechas). B) Durante la osteogénesis, las células han adquirido un aspecto más poligonal y se aprecian vesículas de material refringente (flechas) tanto en el citoplasma como en el espacio extracelular. C) Para la diferenciación condrogénica las hASCs se han dispuesto en forma esférica y destaca la presencia de abundante matriz extracelular (teñida de un color azul intenso). (D-I) Análisis ultraestructural en secciones ultrafinas (70 nm). D y G) Linaje adipogénico. D) Citoplasma mostrando la pérdida de orgánulos y la presencia de numerosas gotas de grasa en su lugar. G) Detalle de numerosas gotas de grasa. E y H) Linaje osteogénico. E) Imagen mostrando el citoplasma de una célula con vesículas con material de secreción en su interior (asterisco blanco) y numerosos cuerpos densos (detalle esquina superior derecha). El núcleo tiene profundas invaginaciones de su envoltura. H) Imagen a grandes aumentos mostrando las partículas que forman el material electrodensó contenido en las vesículas de secreción (asteriscos blancos). F e I) Linaje condrogénico. F) Núcleo eucromático y citoplasma mostrando abundante retículo endoplasmático rugoso (RER) ligeramente dilatado. I) Detalle de las fibras de colágeno que forman la matriz extracelular. Barras de escala A y B: 10 μm , C: 50 μm , D y E: 2 μm , F: 2 μm detalle: 200 nm, G: 2 μm , H: 400 nm y I: 500 nm.

En cuanto al linaje osteogénico (*Figura 28 B, E y H*), la morfología del citoplasma de las células había adoptado una forma cuboidal y las vesículas de material refringente ocupaban gran parte de su citoplasma, además de ser abundantes en el espacio extracelular de los cortes semifinos. Apreciamos que la cromatina de los nucléolos se había condensado notablemente y, de forma habitual, existía un único nucléolo en posición central (*Figura 28 B*). En el análisis mediante MET, encontramos que las células contenían un elevado número de los cuerpos de inclusión ya descritos después de 7 días de diferenciación. En este caso también poseían una estructura multimembrana y contenían material electrodensito en su interior. Además, el número de vesículas de secreción con material electrodensito en su interior había aumentado notoriamente a la par que el material secretado presente en el espacio extracelular (*Figura 28H*).

Por último, analizando los cambios sufridos tras la diferenciación hacia el linaje condrogénico (*Figura 28C, F e I*), encontramos que la esfera resultante había aumentado considerablemente su tamaño, alcanzando entorno a 1 mm de diámetro. En secciones semifinas la disposición de las células era muy parecida a la observada a 7 días de cultivo así como la matriz extracelular presente entre ellas (*Figura 28C*). En el análisis ultraestructural del citoplasma de las células, encontramos que las vesículas claras organizadas en torno al aparato de Golgi habían aumentado tanto en número como en tamaño, conteniendo en ocasiones material fibrilar en su interior. Además, continuamos apreciando abundantes cisternas de RER ligeramente dilatado y un número de gránulos de glucógeno mucho mayor que en las muestras estudiadas a 7 días de diferenciación (*Figura 28F*). De la misma forma, encontramos en el espacio extracelular una matriz rica en fibras de colágeno (*Figura 28I*).

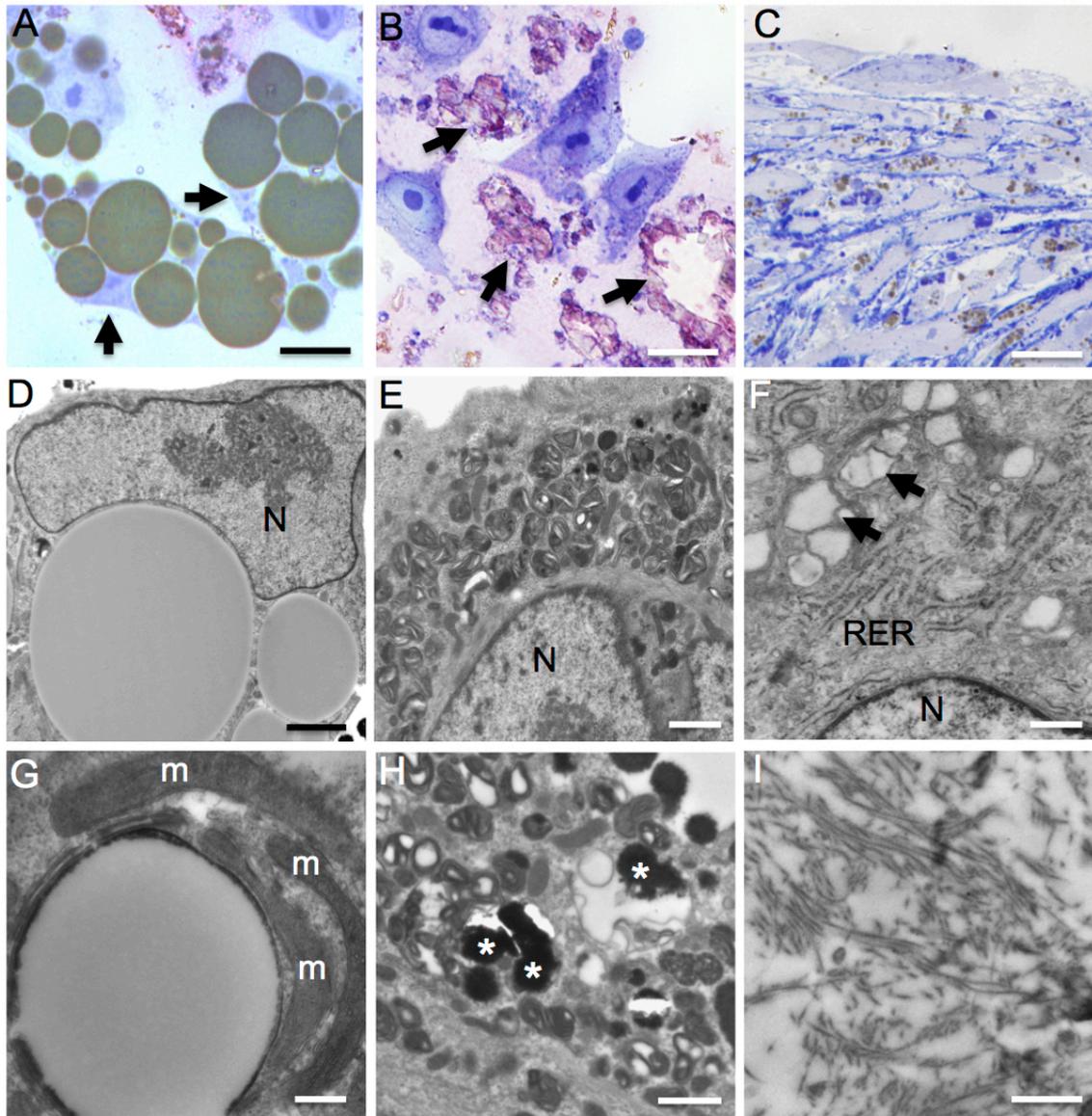


Figura 28. Estudio morfológico de hASCs después de 21 días de cultivo *in vitro* para su diferenciación a distintos linajes de origen mesodérmico. (A-C) Secciones semifinas (1,5 μm). A) En el linaje adipogénico las células han adoptado una forma redondeada conteniendo enormes gotas lipídicas en su interior que determinan la morfología nuclear (flechas). B) En el linaje osteogénico, las células han adquirido un aspecto cuboidal. Tanto las vesículas de secreción de material refringente como los depósitos extracelulares (flechas) de este material han aumentado notablemente. C) En la esfera resultante de la diferenciación condrogénica, la capa externa de células fibroblastoides ha aumentado su grosor, de la misma forma que la cantidad de matriz extracelular presente entre las mismas (color azul intenso). (D-I) Análisis ultraestructural en secciones ultrafinas (70 nm). (D y G) Linaje adipogénico. D) Las enormes gotas de grasa ocupando prácticamente la totalidad del citoplasma determinan la morfología nuclear. G) Gota de grasa rodeada por un fina capa de material electrodenso y mitocondrias (m) dispuestas en torno a la misma. (E y H) Linaje osteogénico. E) Citoplasma con abundantes cuerpos de inclusión electrodenso. H) Detalle de las vesículas de secreción con material electrodenso (asteriscos blancos). (F e I) Linaje condrogénico. F) Citoplasma conteniendo numerosas vesículas claras (flechas) asociadas al aparato de Golgi y largas y abundantes cisternas de RER. I) Fibras de colágeno presentes en la matriz extracelular a grandes aumentos. Barras de escala: A, B y C: 10 μm , D: 2 μm , E: 600 nm, F: 200 nm, G: 250 nm, H e I: 1 μm .

4.2. Magnetización de células madre mesenquimales adultas.

Una vez llevado a cabo el aislamiento de MSCs a partir de diferentes fuentes, haberlas caracterizado tanto molecularmente como a nivel morfológico y, haber comprobado su capacidad de diferenciación a distintos linajes de origen mesodérmico, procedimos a su marcaje con nanopartículas paramagnéticas de óxido de hierro (SPIOs) con la finalidad de conferirles propiedades magnéticas y, poder así, moverlas aplicando un campo magnético. En todos los casos, se utilizaron células comprendidas entre los pases celulares 4-6.

4.2.1. Marcaje de MSCs con nanopartículas de óxido de hierro

Puesto que en un primer momento las células no consiguieron internalizar las SPIOs, tuvimos que recurrir la literatura para determinar qué agente de transfección en co-cultivo permitiría que penetrasen en el citoplasma celular. Así pues, comprobamos que uno de los más utilizados era la poli-L-lisina (PLL) (H. Zhang 2004; Babič et al. 2008; Magnitsky et al. 2017) y a continuación, determinamos mediante la incubación conjunta con las SPIOs P-904 (Guerbet) las concentraciones idóneas de ambos para cada uno de los tipos celulares cultivados (mBMSCs, rASCs y hASCs).

En el caso de las células de ratón (mBMSCs), decidimos que el marcaje óptimo se conseguía utilizando 1,25 $\mu\text{g/ml}$ de PLL y 50 $\mu\text{g/ml}$ de Fe (contenido en las SPIOs), todo ello disuelto en el medio de cultivo habitual. Después de 24h de incubación, visualizamos las SPIOs presentes en la placa de cultivo mediante la tinción de Perls, la cual confiere un color azul intenso al hierro (Fe^{3+}) presente en las mismas. Así, pudimos comprobar que las células en la placa de cultivo adoptaban una coloración azul pero su disposición y su morfología no habían variado en comparación con las mBMSCs sin marcar estudiadas previamente (*Figura 29A*). Además, quisimos llevar a cabo el estudio morfológico de las células después del marcaje mediante MO y MET. En secciones semifinas observamos que las células mostraban un aspecto similar al de las mBMSCs sin marcar con hierro. Encontramos de la misma forma células poligonales y fusiformes y la morfología nuclear no se había visto alterada. No se observaron fenómenos apoptóticos ni necróticos. Además, apreciamos inclusiones refringentes de un color amarillento tanto en el interior del citoplasma de las células como en el espacio extracelular (*Figura 29B*). Durante el análisis ultraestructural (*Figura 29C-F*), advertimos que las mBMSCs marcadas con hierro no mostraban

Resultados

alteraciones en su morfología (*figura 29C*). No apreciamos cambios en la composición de orgánulos celulares del citoplasma y, tanto el núcleo como las membranas mantenían su integridad. En lo que respecta a la membrana celular, encontramos asociadas a su cara externa abundantes partículas electrodensas del orden de pocos nanómetros que identificamos como SPIOs. Dichas partículas se encontraban involucradas de manera frecuente en fenómenos de endocitosis/exocitosis (*Figura 29D*) a través de la membrana. Estudiando en detalle las muestras, encontramos que la mayor parte de las SPIOs se acumulaban en lisosomas que contenían un número elevado de las mismas (*Figuras 29E y F*). En menor grado, también encontramos SPIOs distribuidas libremente por la matriz citoplasmática, sólo visibles a grandes aumentos.

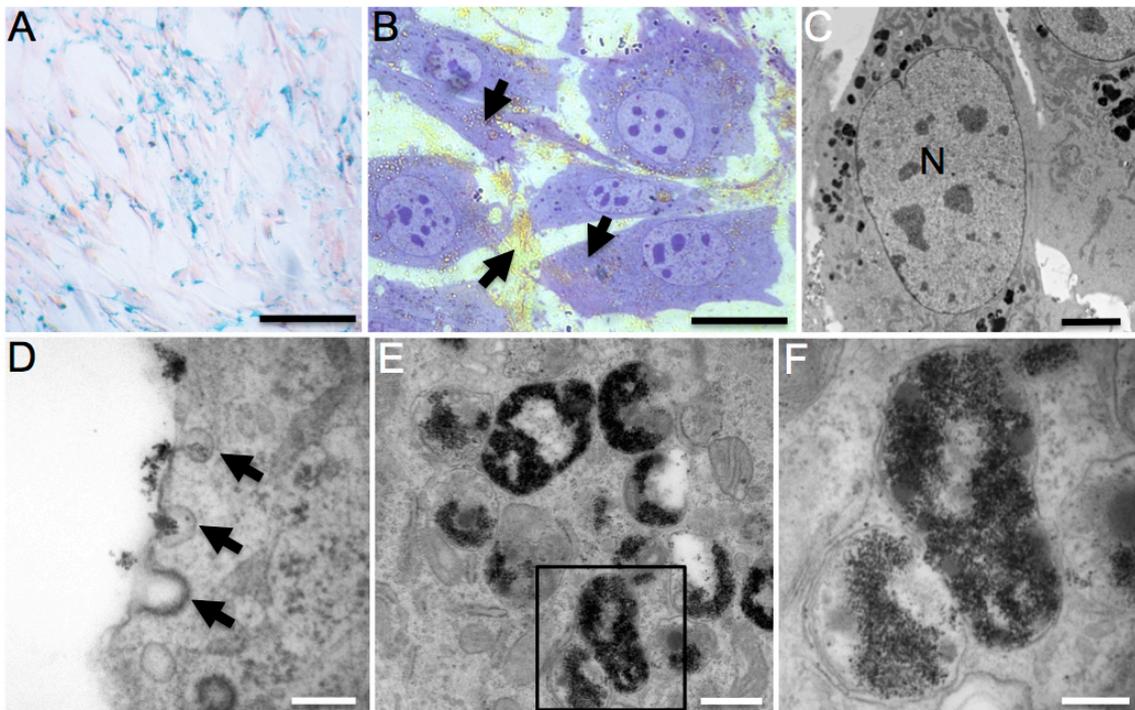


Figura 29. Estudio morfológico de las mBMSCs después de su marcaje con SPIOs. A) La tinción de Perls muestra de un color azul intenso el hierro presente en el citoplasma de las células después de 24h de incubación. B) Sección semifinas (1,5 μm) teñida con azul de toluidina. Después del marcaje con hierro las mBMSCs conservan sus características originales. Se aprecian inclusiones de material refringente tanto en el citoplasma de las células como en el espacio extracelular (flechas). (C-F) Secciones ultrafinas observadas mediante MET (70nm) C) Núcleo (N) con aspecto normal (eucromático con nucleolos) en una célula con hierro. D) SPIOs involucradas en fenómenos de endocitosis/exocitosis (flechas) en la membrana celular. E) Lisosomas conteniendo un elevado número de SPIOs en su interior. F) Detalle a grandes aumentos de la zona encuadrada en (E) donde se aprecian la acumulación de SPIOs electrodensas en el interior de los lisosomas. Barras de escala A: 100 μm , B: 10 μm , C: 5 μm , D: 200 nm, E: 500 nm, F: 200 nm.

En el caso de las MSCs obtenidas a partir de tejido adiposo de rata (rASCs) y de humano (hASCs), hubo que modificar la concentración del agente de transfección, puesto que el marcaje de las células utilizando el mismo protocolo resultó negativo.

Así, finalmente decidimos que el marcaje óptimo en ambos casos se conseguía aumentando la concentración de PLL (1,75 $\mu\text{g/ml}$) sin necesidad de variar la cantidad de SPIOs (50 μg de Fe/ml).

Una vez incubadas las rASCs con SPIOs (teniendo en cuenta la variación del protocolo mencionada), comprobamos mediante la tinción de Perls que las células habían internalizado una cantidad de hierro considerable sin verse alterada su típica morfología fusiforme (*Figura 30A*). En secciones semifinas, observamos que las células conservaban invariables todas las características detalladas previamente en el estudio morfológico de las rASCs, además de apreciarse en este caso inclusiones refringentes de un tono amarillento en el interior de las mismas (*Figura 30B*). Durante el análisis a nivel ultraestructural, tampoco encontramos alteraciones evidentes y de la misma forma que en el caso de las mBMSCs, encontramos numerosos lisosomas dentro de los cuales se acumulaban innumerables SPIOs (*Figura 30D-F*), además de apreciarse partículas de hierro libres en el citoplasma.

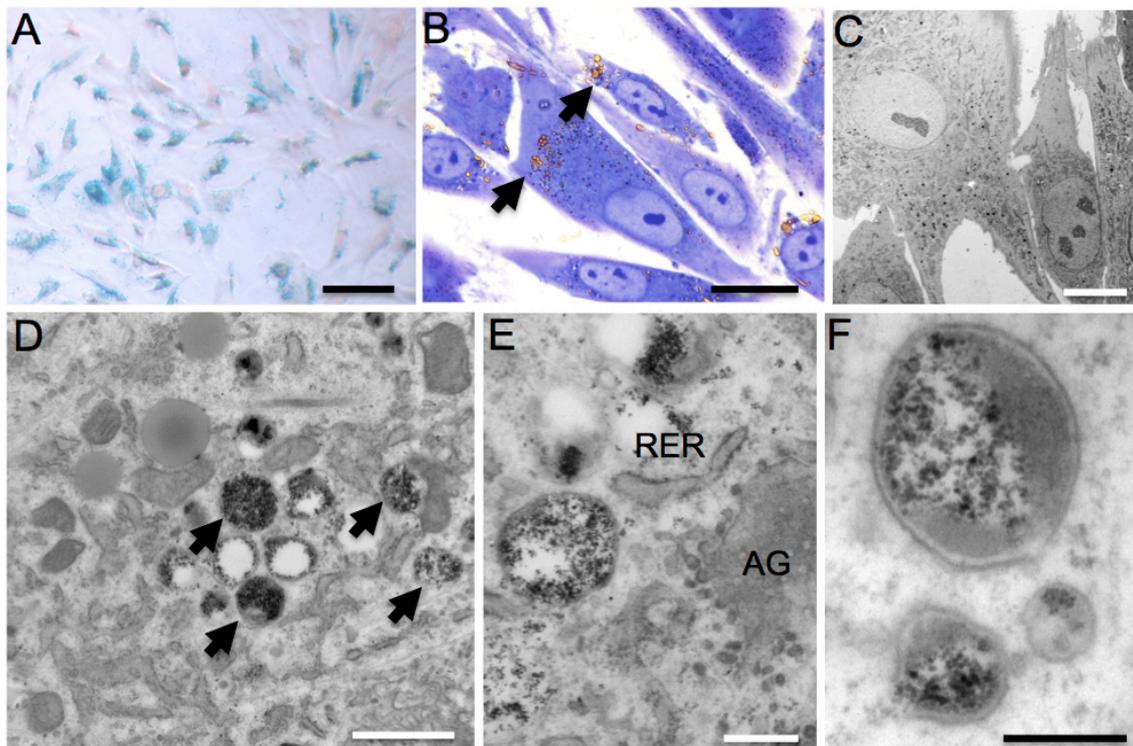


Figura 30. Estudio morfológico de las rASCs después de su marcaje con SPIOs. A) Imagen con el microscopio invertido mostrando la coloración azul del hierro presente en el citoplasma de las células después de 24h de incubación (tinción de Perls). B) Sección semifina (1,5 μm) mostrando la morfología de las rASCs no se ha visto alterada, apreciándose inclusiones refringentes (flechas) en el citoplasma de las células. (C-F) Secciones ultrafinas (70 nm) C) Vista panorámica observándose la preservación de la morfología típica de las rASCs después del marcaje. D) Las células conservan intactos sus orgánulos citoplasmáticos, apreciándose lisosomas (flechas) con SPIOs en su interior. E) Vesícula conteniendo SPIOs organizada en torno a RER y aparato de Golgi. E) F) Detalle de lisosomas, con sus membranas perfectamente delimitadas, conteniendo gran cantidad de SPIOs electrodensas en su interior. Barras de escala A: 50 μm , B: 10 μm , C: 5 μm , D: 1 μm , E: 250 nm, F: 200 nm.

Resultados

En cuanto a las hASCs, después de la incubación para el marcaje con SPIOs, visualizamos de forma evidente la coloración azul que indicaba la presencia de hierro en las células después de llevar a cabo la tinción de Perls (*Figura 31A*). En secciones semifinas, comprobamos la presencia de inclusiones amarillentas de material refringente de la misma forma que en las mBMSCs y las rASCs (*Figura 31B*). Las células conservaban su forma fibroblastoide original, e incluso se detectaron células marcadas con hierro en fase de mitosis (*Figura 31C*), indicativo de la conservación de la capacidad proliferativa después del marcaje. Durante el análisis mediante MET, no observamos cambios apreciables ni en los núcleos de las células ni en el material contenido en su citoplasma (*Figura 31D*).

Una vez llevado a cabo el análisis ultraestructural de las células después del marcaje y no haber detectado cambios ni en su morfología ni en el contenido de su citoplasma (a excepción de los relacionados con la presencia de SPIOs), quisimos comprobar durante su cultivo *in vitro* si se había comprometido en cierta manera su viabilidad celular. Para ello llevamos a cabo un ensayo colorimétrico (XTT) que determinaría el estado del metabolismo de las MSCs después de su marcaje con SPIOs, en comparación con el de MSCs de la misma especie en las que no se había llevado a cabo la incubación con hierro. Al analizar los resultados, encontramos una ligera disminución de la viabilidad celular después de la incubación con SPIOs (mBMSSCs: $95,18\% \pm 0,39\%$; rASCs: $96,28\% \pm 0,06\%$; hASCs: $96,9 \pm 0,02\%$ con respecto al 100% del valor de referencia de las células control). Sin embargo, la diferencia encontrada no llega a ser significativa en ninguno de los casos ($p > 0,05$; mBMSSCs $p = 0,06$; rASCs $p = 0,69$; hASCs $p = 0,06$) (*Figura 32*). Así, analizando los datos, encontramos que después del marcaje de las MSCs con SPIOs podían variar en cierto modo los procesos metabólicos en las células, pero sin llegar a verse comprometida prácticamente su viabilidad celular.

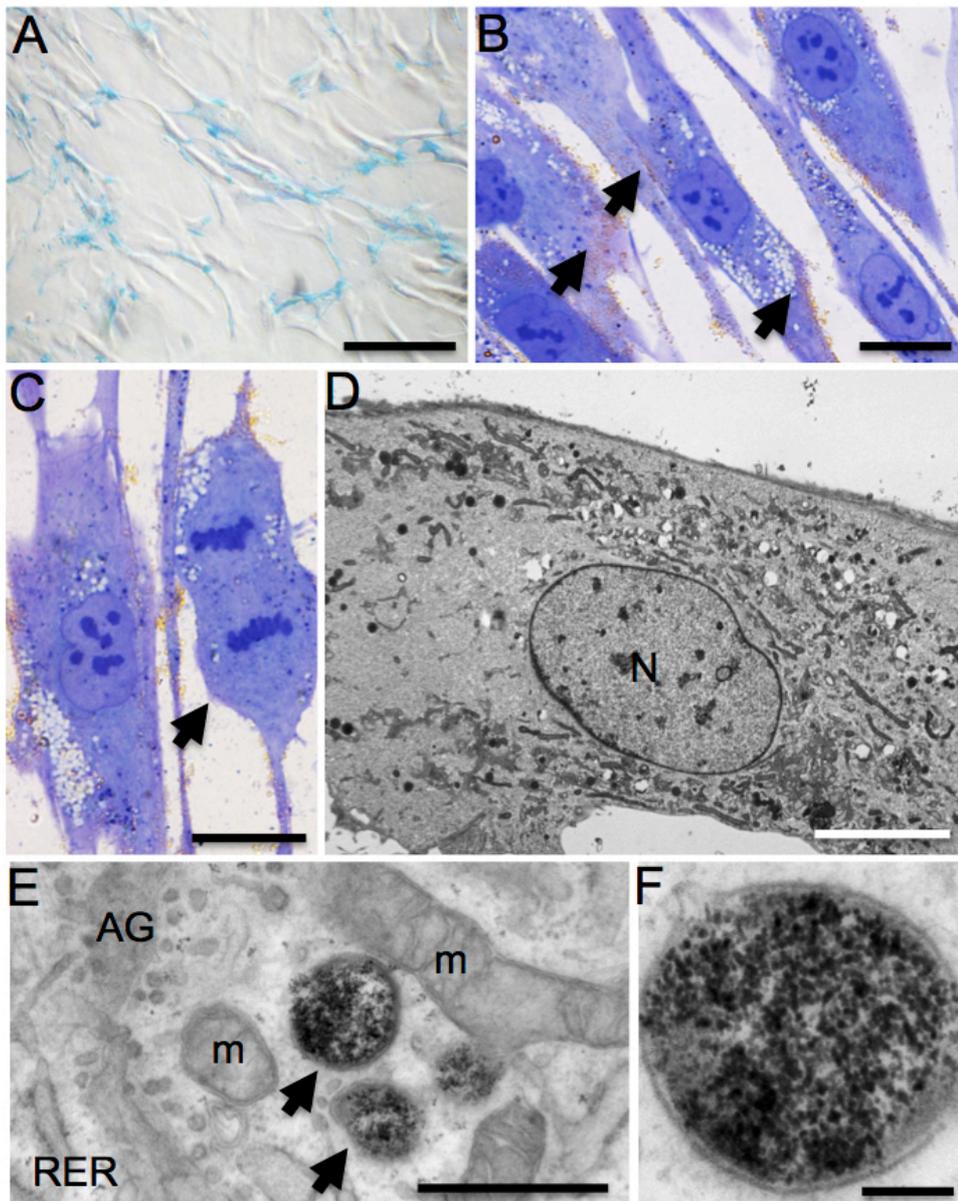


Figura 31. Estudio morfológico de las hASCs después de su marcaje con SPIOs. A) Imagen con el microscopio invertido mostrando como las células marcadas con hierro (coloración azul, tinción de Perls) conservan su típica morfología fusiforme. B y C) Secciones semifinas (1,5 μm) teñidas con azul de toluidina. B) Se observan invariables las características típicas de las hASCs después su incubación con SPIOs (núcleos redondeados con varios nucléolos y abundantes orgánulos citoplasmáticos), apreciándose inclusiones de material refringente tanto en el citoplasma de las células como en el espacio extracelular. C) Célula marcada con hierro en anafase (flecha). D-F) Secciones ultrafinas (70nm) observadas mediante MET. D) hASCs marcada con hierro conservando morfología fibroblastoide, núcleo eucromático con varios nucléolos y abundantes orgánulos citoplasmáticos. F) Citoplasma de una hASCs con abundantes SPIOs concentradas en el interior de lisosomas. También se observan los orgánulos citoplasmáticos perfectamente conservados: mitocondrias (m) con prominentes crestas, retículo endoplasmático (RER) ligeramente dilatado y aparato de Golgi con sus dictiosomas (AG). F) Detalle a grandes aumentos de una vesícula con abundantes SPIOs. Barras de calibración A: 100 μm , B y C: 10 μm , D: 5 μm , E: 500 nm, F: 200 nm.

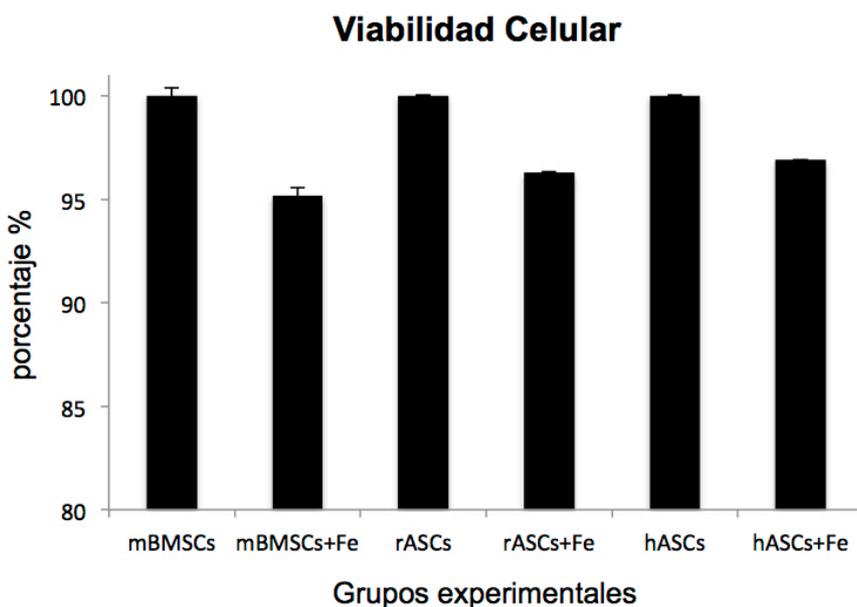


Figura 32. Ensayo de viabilidad celular después del marcaje con SPIOs mediante XTT. Gráfica de barras mostrando el porcentaje de viabilidad de las MSCs de las distintas especies después del marcaje tomando como referencia el valor de la lectura colorimétrica de las células sin marcar de la misma especie (100%). Se aprecia una leve tendencia a la disminución de la viabilidad (mBMSSCs: 95,18%±0,39%; rASCs: 96,28%±0,06%; hASCs: 96,9±0,02%) pero sin llegar a ser en ningún caso significativa ($p > 0,05$; mBMSCs $p = 0,06$; rASCs $p = 0,69$; hASCs $p = 0,06$).

Por último, quisimos comprobar que las MSCs marcadas con SPIOs mantenían la capacidad de diferenciación a los distintos linajes de origen mesodérmico. De la misma manera que los estudios previos de diferenciación *in vitro*, este experimento únicamente se realizaría con las rASCs y las hASCs. Para ello, llevamos a cabo la incubación de las células con el protocolo de marcaje establecido, y posteriormente, procedimos a su diferenciación *in vitro* bajo las condiciones especificadas con anterioridad en la metodología. Después de 21 días de diferenciación *in vitro*, llevamos a cabo las tinciones específicas para cada uno de los linajes celulares estudiados (Figura 33). Los resultados mostraron que tanto las rASCs (Figura 33 A-C) como las hASCs (Figura 33 D-F) habían mantenido su capacidad para diferenciarse a los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico, después de haber sido incubadas durante 24 horas con las SPIOs antes de su diferenciación. Así, después de la tinción con Aceite Rojo O para el linaje adipogénico, observamos que tanto en el caso de las rASCs (Figura 33A) como en el de las hASCs (Figura 33D) las células habían perdido su morfología fusiforme y su citoplasma se encontraba repleto de grandes gotas de grasa coloreadas de rojo un intenso. En el caso del linaje osteogénico, pudimos confirmar la diferenciación mediante la tinción con Rojo Alizarín, puesto que en ambos casos (rASCs Figura 33B y hASCs Figura 33E) toda la superficie de la placa se había teñido de rojo, indicativo de la presencia de depósitos de Ca^{2+} tanto en el citoplasma

de las células como en el espacio extracelular. En cuanto al linaje condrogénico, tanto las células de rata como las de humano formaron una esfera de material cartilaginoso después de 21 días de diferenciación *in vitro*. Mediante la tinción específica con Azul Alcian, comprobamos la presencia de proteoglicanos sulfatados presentes en la matriz extracelular, los cuales adquirieron una coloración azul (Figura 33 C y F). En el caso de los linajes adipogénico (Figura 33A y D) y osteogénico (Figura 33B y E), por norma general no encontramos depósitos de SPIOs detectables en la placa de cultivo, puesto que éste se había ido eliminando con los cambios de medio cada 2-3 días. En cambio, en el linaje condrogénico (Figura 33C y F) observamos unos agregados de color marrón a lo largo de toda la esfera, aunque en mayor concentración en las capas más superficiales, probablemente por elevado contenido en matriz extracelular donde quedan retenidas las SPIOs.

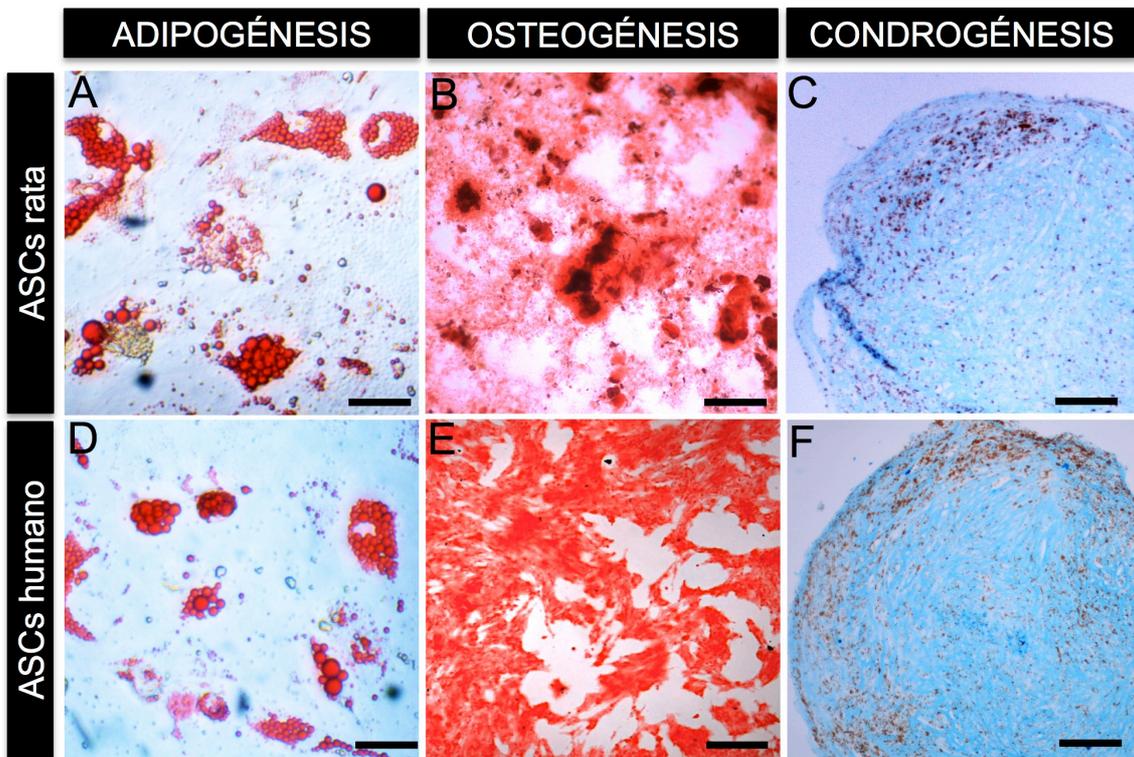


Figura 33. Diferenciación de MSCs a distintos linajes de origen mesodérmico después de su marcaje con SPIOs. (A-F) Imágenes de las tinciones específicas para cada linaje celular tomadas con el MO después de 21 días de diferenciación *in vitro* de rASCs (A-C) y hASCs (D-F). A y D) La tinción con Aceite Rojo O marcó de un color rojo intenso los numerosos depósitos de grasa en el interior las células. (B y E) Tinción con Rojo Alizarín coloreando de rojo los depósitos de calcio presentes en los osteocitos y dicho material secretado al espacio extracelular. (C y F) Confirmación de la presencia de proteoglicanos sulfatados (color azul) presentes en la matriz extracelular cartilaginosa del linaje condrogénico. En este linaje se aprecian las SPIOs (color marrón) retenidas en la matriz extracelular. Barras de escala A y D: 25 μm , B: 50 μm , E: 100 μm , C y F: 250 μm .

4.2.2. Caracterización morfológica y magnética de las SPIOs

Una vez comprobada la inocuidad y biocompatibilidad del marcaje de las MSCs con las SPIOs P-904 (Guerbet), quisimos estudiar sus propiedades tanto morfológicas como magnéticas fuera de la placa de cultivo. A pesar de disponer de la información proporcionada por la casa comercial, preferimos llevar a cabo un estudio más detallado de las características de las SPIOs que utilizaríamos en nuestro estudio y así, confirmar los datos referentes a sus propiedades.

Al tratarse de un reactivo comercial, no hizo falta realizar un ultrafiltrado de la muestra para lograr una disolución de partículas de tamaño homogéneo, puesto que se distribuyen en una disolución líquida. La utilización de la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) permitió cuantificar el tamaño de las nanopartículas, de forma global, y el grado de homogeneidad de la muestra. De esta forma comprobamos que se trataba de partículas de óxido de hierro ultrapequeñas (con un diámetro medio de 24.36 nm) y la muestra se podía considerar homogénea. Para la caracterización morfológica de las SPIOs, llevamos a cabo su análisis en el microscopio electrónico de transmisión. Así, confirmamos que las nanopartículas presentaban un diámetro hidrodinámico dentro del rango registrado con DLS, observándose en ocasiones pequeños agregados de las mismas (*Figura 34 A*).

Para corroborar empíricamente tanto el comportamiento magnético como las principales propiedades magnéticas de las SPIOs P-904, procedimos a su análisis mediante un magnetómetro (SQUID), siguiendo el protocolo detallado en la metodología. Los resultados mostraron que la magnetización (M_{FC}) aumentaba siempre cuando la temperatura disminuía, siguiendo un comportamiento típico de “Super Spin Glass” (SSG). La temperatura de bloqueo era de $T_B = 69$ K (-204,15°C) y, por encima de ésta, la magnetización disminuía a medida que la temperatura aumentaba (*Figura 34B*). En nuestro caso, necesitábamos unas nanopartículas que sólo fueran magnéticas cuando aplicáramos un campo magnético externo, propiedad a la que se denomina superparamagnetismo. Así pues, el análisis con el SQUID confirmó que por encima de la temperatura de bloqueo (69 K), la mayoría de las SPIOs P904 eran superparamagnéticas y, por debajo de ésta, eran ferromagnéticas (lo que quiere decir que poseían magnetización incluso cuando no existía campo magnético externo aplicado), propiedad que no nos interesaba (*Figura 34C*). Durante todo nuestro estudio, al tratarse de experimentos tanto *in vitro* con células como en un modelo animal *in vivo*, trabajaríamos a una temperatura fisiológica en torno a los 37 °C (310,15 K), por lo que las SPIOs resultaban idóneas para su utilización.

Por otra parte, se determinó que el campo magnético necesario para saturar las SPIOs era de 100 mT. Este dato indicaba que, una vez saturadas las SPIOs mediante la aplicación de un campo magnético externo superior a 100mT, empezarían a moverse en la dirección del campo magnético aplicado.

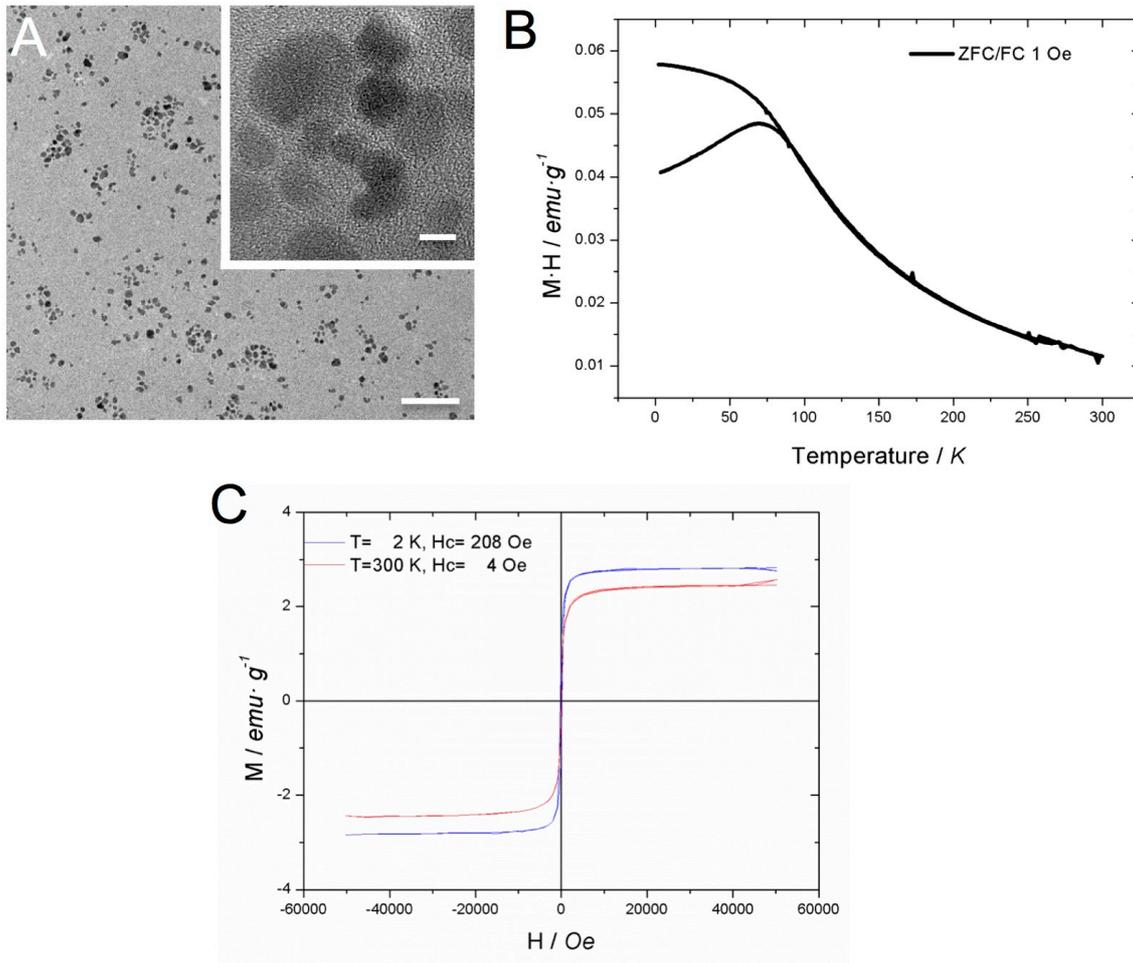


Figura 34. Caracterización morfológica y magnética de las SPIOs P-904. A) Imágenes obtenidas mediante un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución mostrando las SPIOs en una vista panorámica y en detalle (esquina superior derecha). Barra de escala 100 nm, detalle 5 nm. (B y C) Caracterización magnética mediante un magnetómetro (SQUID) B) Gráfica mostrando la medida de la magnetización de las SPIOs en función de la temperatura aplicando un campo magnético de 1 Oe. Observamos una temperatura de bloqueo de 69K. C) Ciclos de histéresis de las SPIOs a dos temperaturas (2K y 300K). A una temperatura de 2K, el comportamiento de las SPIOs resulta ferromagnético, en cambio, a 300k (temperatura ambiente) adquieren un comportamiento superparamagnético.

4.2.3. Caracterización magnética de las MSCs después de su marcaje con SPIOs

De la misma forma que comprobamos el comportamiento magnético de las SPIOs en el SQUID, quisimos confirmar mediante la misma técnica que las MSCs eran superparamagnéticas después de haber internalizado las nanopartículas de hierro.

Resultados

Para ello, se llevó a cabo la incubación de mBMSCs, rASCs y hASCs con SPIOs y, posteriormente, se analizaron las muestras en el magnetómetro.

Los datos obtenidos mostraron que la temperatura de bloqueo para las MSCs-SPIOs de las tres especies, era la misma que en el caso de las SPIOs analizadas de forma independiente ($T_B=69$ K) (*Figura 35A, C y E*). Esto quería decir que una vez superada dicha temperatura, la magnetización disminuía conforme aumentaba la temperatura. Además, analizando los ciclos de histéresis de las MSCs-SPIOs a distintas temperaturas, comprobamos que su comportamiento magnético era idéntico al de las SPIOs (*Figura 35B, D y F*). Estos datos nos indicaban que a temperatura fisiológica y durante la aplicación de un campo magnético externo, las MSCs marcadas con SPIOs adquirirían el comportamiento superparamagnético deseado. Además, aplicando un campo magnético con una intensidad mayor a 100mT, las células se moverían en la dirección determinada por la resultante de dicho campo magnético. Por el contrario, una vez eliminásemos el campo magnético aplicado, las células dejarían de presentar dichas propiedades magnéticas.

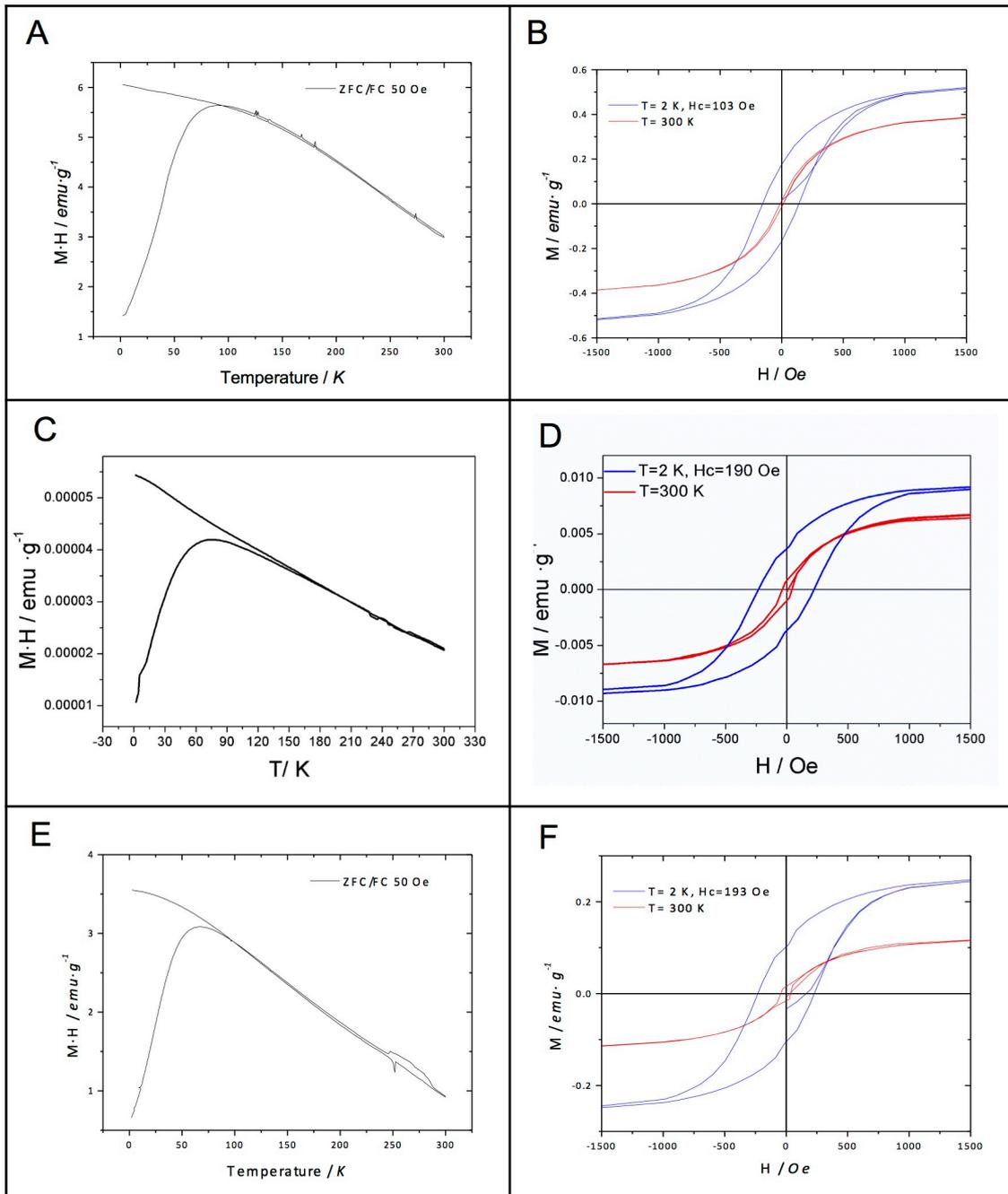


Figura 35. Caracterización magnética de las MSCs marcadas con SPIOs mediante un magnetómetro (SQUID). A, C y E) Gráficas mostrando la medida de la magnetización de las mBMSCs (A), rASCs (C) y hASCs (E) en función de la temperatura. La temperatura de bloqueo en todos los casos fue de 69 K. B,D,F) Ciclos de histéresis de las mBMSCs (B), rASCs (D) y hASCs (F) a dos temperaturas (2K y 300K). A una temperatura de 2K, todas las células presentan un comportamiento ferromagnético mientras que a 300K (temperatura ambiente) su comportamiento es superparamagnético.

4.3. Direccionamiento *in vitro* de MSCs aplicando un campo magnético.

Una vez aisladas las MSCs, determinada la biocompatibilidad de su marcaje con SPIOs y confirmada su capacidad para ser magnetizadas, quisimos comprobar su comportamiento *in vitro* durante la aplicación de un campo magnético.

Así pues, procedimos al marcaje de mBMSs, rASCs y hASCs con SPIOs y, a continuación, levantamos las células de la placa de cultivo original para sembrarlas de nuevo sobre una placa a través de la cual se estaba aplicando un campo magnético (diseño y protocolo detallados en el apartado 3.4. *Direccionamiento in vitro de células marcadas con SPIOs* de la metodología). Una vez retiramos el campo magnético aplicado, observamos que las zonas de mayor densidad celular en la placa eran precisamente los puntos que correspondían con la localización de los imanes durante la aplicación del campo magnético, por lo que las células marcadas con USPIOs habían migrado empujadas por el campo magnético hacia las zonas en las que se estaba aplicando el mismo (*Figura 36 A-C*).

A continuación, para visualizar el movimiento de las células en tiempo real, llevamos a cabo el mismo experimento pero en este caso con células fluorescentes y realizando una grabación de vídeo en el momento de la aplicación del imán. De esta forma, pudimos comprobar como conforme se acercaba el imán a la placa de cultivos con las MSCs resuspendidas en el medio, éstas iban siendo atraídas a la zona de aplicación del campo magnético quedando retenidas sobre ella (*Figura 36 D-F*). Así, en cuestión de 35 segundos ya existía un número de células considerable flotando sobre la zona “imantada” de la placa y, si retirábamos el campo aplicado, volvían a flotar libremente por el medio de cultivo.

Para poder comprobar el estado de las células después de la migración observada, llevamos a cabo el procesado de las células para su estudio morfológico mediante MO y MET. En secciones semifinas (*Figura 36 G-I*) observamos una mayor afluencia en las zonas donde se había aplicado el campo magnético, perdiendo las células en cierta forma su forma típica fusiforme y adaptando una morfología que les permitiese convivir con las células vecinas retenidas sobre la zona “imantada” (*Figura 36G*). A pesar de ello, las células mantenían sus características habituales definidas previamente y se apreciaban inclusiones refringentes de SPIOs dentro del citoplasma celular. Por otra parte, tanto en secciones semifinas (*Figura 37A*) y ultrafinas (*Figura 37B*) pero en una vista transversal de la placa de cultivos, comprobamos como las

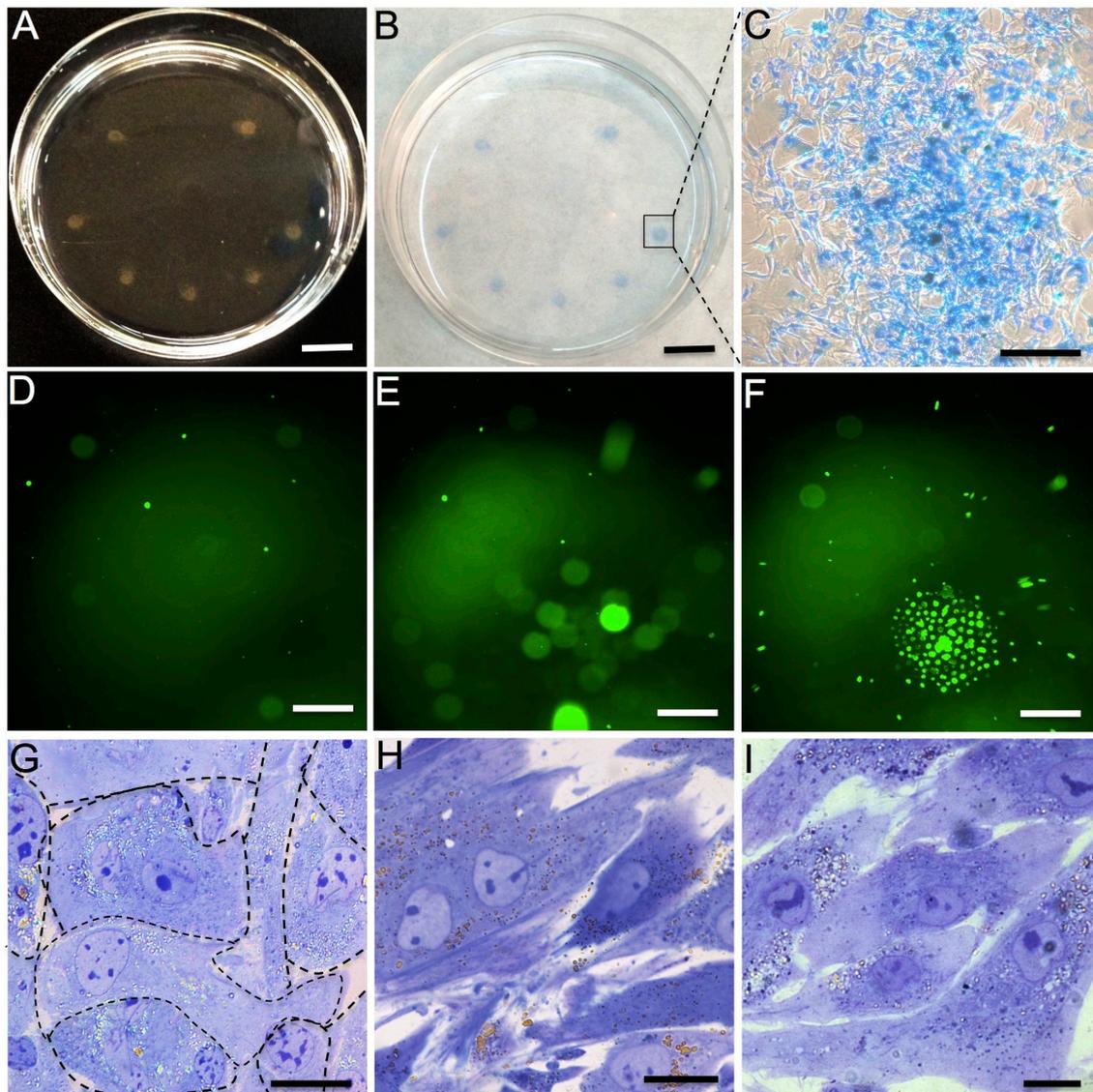


Figura 36. Migración *in vitro* de MSCs marcadas con SPIOs mediante la aplicación de un campo magnético. (A y B) Localización de las mBMSCs-SPIOs en la placa de cultivo coincidiendo con las zonas de aplicación del campo magnético durante 6 horas (flechas). A) células en fresco. B) Coloración azul de las células (tinción de Perls) indicando la presencia de hierro. C) Detalle de la zona encuadrada en (B), mostrando la elevada confluencia de células marcadas con SPIOs en la zona de aplicación del imán. (D-F) Time-lapse de la migración de rASCs-SPIOs fluorescentes donde se aprecia el movimiento de las células conforme se acerca el imán a la placa de cultivo (D: t=0s; E: t=14s y F: t=35s). (G-I) Secciones semifinas (1,5 μm ; vista longitudinal) teñidas con azul de toluidina mostrando la distribución de las mBMSCs (G), rASCs (H) y hASCs (I) después de la aplicación del campo magnético. Las células muestran sus características típicas pero han variado su morfología (línea discontinua en G) para adaptarse a las células vecinas dentro de zona "imantada". Barras de escala A y B: 6 mm, C: 50 μm , D, E y F: 1 mm, G, H e I: 10 μm .

células se habían dispuesto en varias capas y las inclusiones de hierro se distribuían libremente a través de todas ellas dentro de su citoplasma, sin que el campo magnético hubiera forzado su salida al espacio extracelular. Además, apreciamos acumulaciones de SPIOs sobre las capas celulares superiores que probablemente correspondían con el hierro libre que había quedado en el medio de cultivo después

Resultados

de resuspender las células para su re-siembra sobre la placa con imanes (*Figura 37A*). A nivel ultraestructural, comprobamos que tanto los orgánulos celulares como las membranas celulares se encontraban totalmente íntegras (*Figura 37 B y C*). Las células presentaban un aspecto totalmente acorde con el de las MSCs en condiciones control y, en su citoplasma, encontrábamos las partículas de hierro concentradas en lisosomas (*Figura 37 D*), de la misma forma que en células marcadas con SPIOs sin haber sido sometidas al campo magnético. Además, después de mantener durante 7 días MSCs-SPIOs que habían sido sometidas al campo magnético, comprobamos que éstas mantenían su viabilidad celular y su capacidad de proliferación después de la migración y habían eliminado parte de las SPIOs contenidas en su citoplasma después del marcaje, haciéndose notable una reducción considerable del número de lisosomas conteniendo nanopartículas presentes en el mismo.

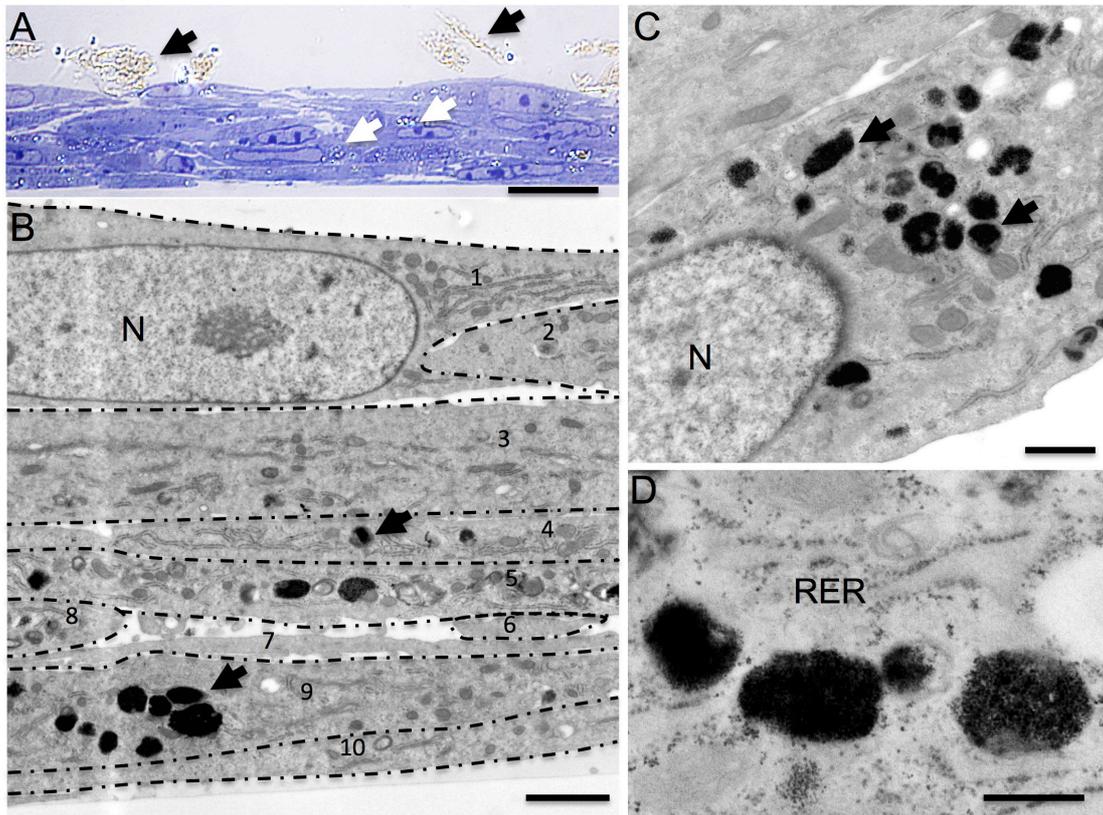


Figura 37. Análisis ultraestructural de las mBMSCs-SPIOs después de su migración *in vitro*. A) Sección semifina (1,5 μm) transversal a la placa de cultivos mostrando mBMSCs-SPIOs distribuidas en diferentes capas retenidas sobre la zona de aplicación del campo magnético. A través de todas las capas las células contienen inclusiones de material refringente (flechas blancas) dentro de su citoplasma. Además se aprecian agregados de SPIOs libres en el espacio extracelular en las capas superiores (flechas negras). (B-D) Secciones ultrafinas (70 nm). B) Apreciamos las células distribuidas en diferentes capas encontrando las SPIOs contenidas en vesículas electrodensas (flechas). C) Después de la migración las mBMSCs conservan sus características habituales (núcleos eucromáticos con prominentes nucléolos y abundantes orgánulos citoplasmáticos) y todas las membranas conservan su integridad. D) Las vesículas con SPIOs en su interior se mantienen intactas y continúan inmersas en el citoplasma, en la imagen asociadas al retículo endoplasmático rugoso (RER). Barras de escala A: 10 μm , B: 1 μm , C: 500 nm, D: 250 nm.

BLOQUE B: TERAPIA CELULAR DIRIGIDA MEDIANTE CAMPOS MAGNÉTICOS EN UN MODELO ANIMAL DE INFARTO CEREBRAL

El segundo bloque de resultados abarca todos los experimentos llevados a cabo para el direccionamiento magnético de las MSCs marcadas con hierro (MSCs-SPIOs) en un modelo animal de infarto cerebral y su posterior análisis. De ahora en adelante las células que utilizamos en todos los casos serían las rASCs.

4.4. Sistema de aplicación del campo magnético.

En primer lugar, con la información de la que ya disponíamos relativa al comportamiento magnético de las rASCs-SPIOs y la intensidad del campo magnético necesaria para conseguir su movimiento, llevamos a cabo el diseño del sistema que utilizaríamos para la retención de las rASCs-SPIOs en el tejido cerebral de los animales de estudio después de haber sido administradas vía intravenosa (IV).

Para ello, diseñamos un sistema formado por un electroimán, para poder modular la fuerza magnética aplicada sobre la cabeza del animal y, por otra parte, un imán permanente acoplado a un casco diseñado especialmente para la rata (ilustraciones mostradas en el apartado 3.5.1. *Sistema de aplicación del campo magnético* de la metodología). Así, la utilización del imán permanente buscaría mejorar la focalización del campo magnético generado por el electroimán dentro una zona concreta del volumen cerebral.

Para llevar a cabo un estudio del campo magnético generado por el sistema propuesto, tomamos medidas de la intensidad de campo generada en diferentes coordenadas del espacio, y además, comparamos el gradiente del campo magnético aplicado sin y con la utilización del imán permanente situado en el casco. Al analizar los resultados, observamos que se producía un ligero aumento de la intensidad del campo magnético generado en presencia del imán permanente (*Figura 38D-F*). Por otra parte, estudiando la intensidad del campo magnético en la dirección ZX (vista dorsal, *Figura 39*), apreciamos claramente el efecto de la presencia del imán estacionario, el cual aumentaba localmente el flujo del campo magnético generado dentro del volumen cerebral del animal, concretamente en el hemisferio correspondiente a la localización del imán permanente en el casco (*Figura 39*). Además, la intensidad generada era suficiente para alcanzar la saturación de las

rASCs-SPIOs (por encima de los 100 mT) y, por tanto, debido a sus propiedades superparamagnéticas se moverían en la dirección de la resultante del campo.

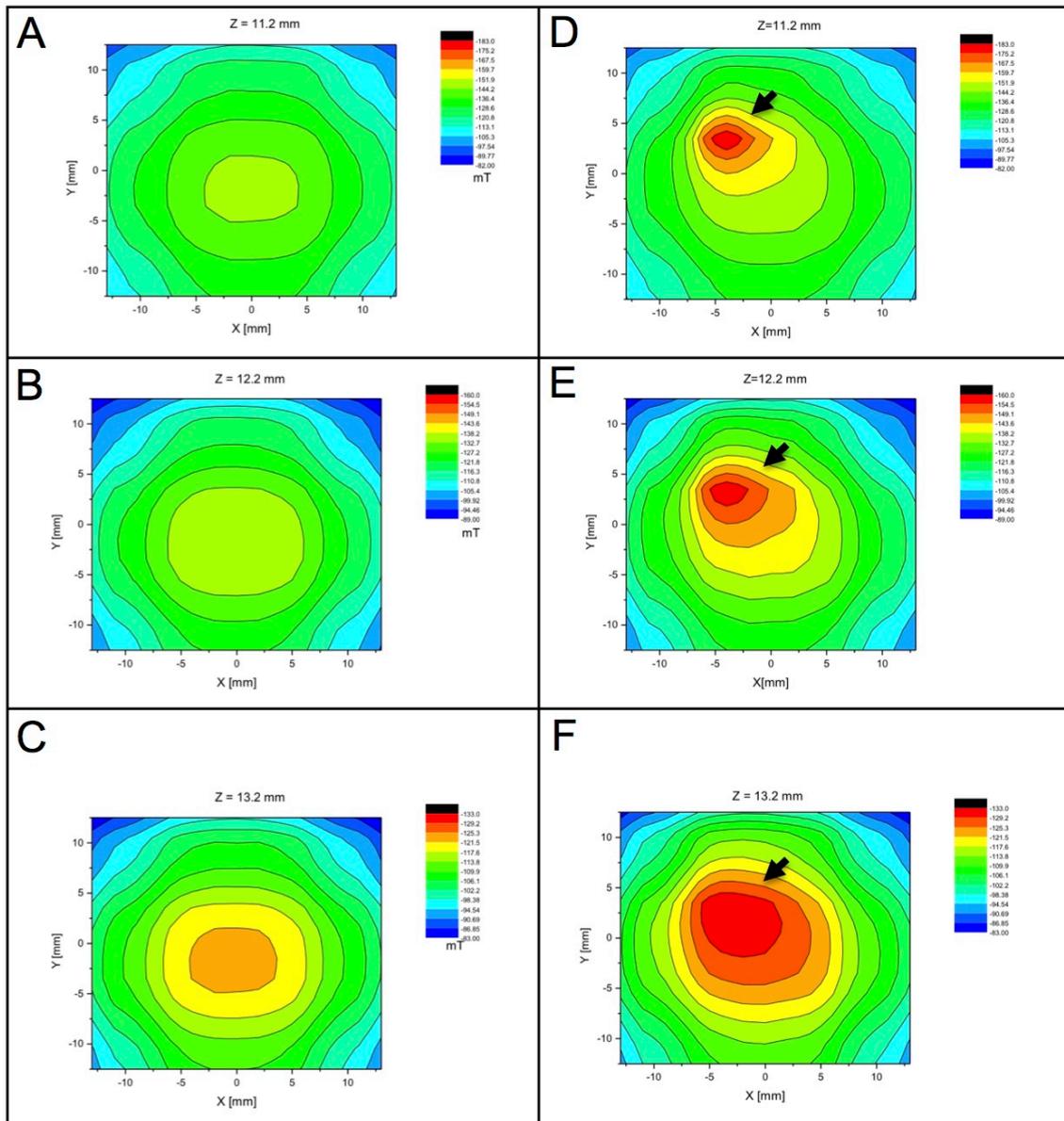


Figura 38. Estudio del campo magnético generado combinando electroimán e imán permanente. (A-F) Mapas de color mostrando los valores de la intensidad del campo magnético generado en las tres coordenadas del espacio (X, Y, Z) aplicando una corriente de -7A en un único polo del electroimán. En los mapas de colores de las medidas tomadas combinando el electroimán y el imán permanente, observamos un claro aumento de intensidad del campo generado (flechas en D, E y F). Por el contrario, utilizando únicamente el electroimán (A, B y C) observamos como el campo resulta más homogéneo y la fuerza magnética generada es menor.

Resultados

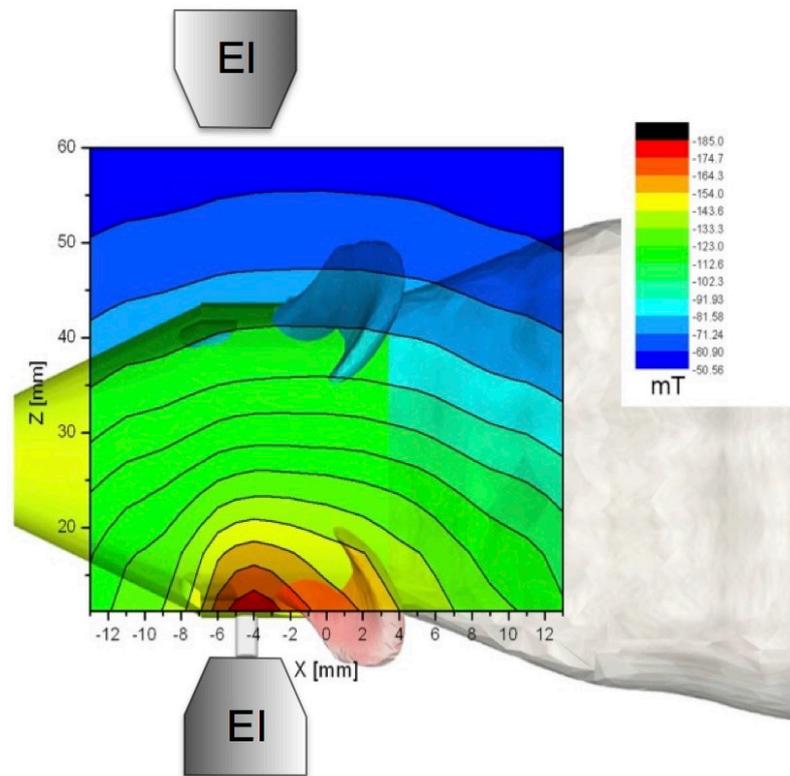


Figura 39. Gradiente del flujo magnético generado por las bobinas electromagnéticas en combinación con el imán permanente situado en el casco. Vista dorsal (ejes X y Z) del gradiente magnético generado (mapa de colores) mostrando como el imán permanente del casco aumenta la fuerza magnética generada por las bobinas del electro imán (EI) dentro del hemisferio cerebral donde se localiza el mismo (zona coloreada en tonos cálidos). La intensidad de campo generada en la base del imán permanente se encuentra alrededor de 180 mT.

El estudio del campo magnético llevado a cabo sobre este sistema nos permitió confirmar el efecto de focalización del campo generado gracias a la sinergia del electroimán y del imán permanente, aunque finalmente, por limitaciones en las instalaciones donde se llevaría a cabo la parte del estudio *in vivo*, hubo que rediseñar el sistema de aplicación del campo magnético. Para ello, se sustituyó el electroimán por dos imanes estacionarios de gran potencia, que acoplamos al imán estacionario del casco (ilustración presente en la metodología). Llevamos a cabo el estudio del campo magnético generado por el nuevo sistema y así confirmamos que, mediante la utilización de los imanes estacionarios de gran potencia en conjunto con el imán estacionario del casco, se conseguía un campo suficiente para poder mover las células superada su saturación magnética y, a la vez, focalizar la fuerza magnética ejercida (Figura 40).

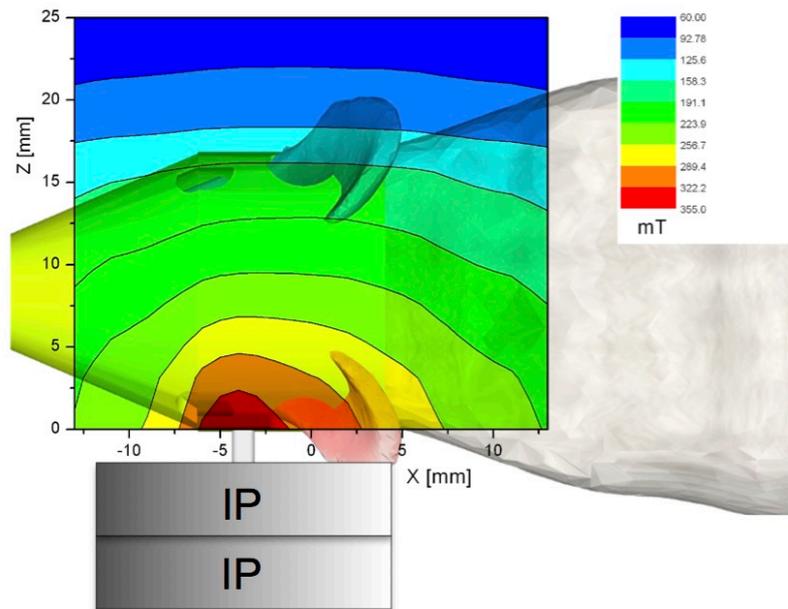


Figura 40. Gradiente del flujo magnético generado por dos imanes permanentes en combinación con el imán permanente situado en el casco. Vista dorsal (ejes X y Z) del gradiente magnético generado (mapa de colores) mostrando la focalización del campo magnético (zona coloreada en tonos cálidos) generado por los imanes permanentes (IP) dentro del hemisferio cerebral donde se localiza el imán permanente cilíndrico situado en el casco. La intensidad del campo magnético aproximada es de 350 mT en la base del imán del casco.

4.5. Direccionamiento magnético de MSCs después del infarto cerebral.

La información obtenida de los experimentos realizados *in vitro*, confirmaba la magnetización de las rASCs mediante su marcaje con SPIOs. Así pues, una vez diseñado el sistema que permitiera ejercer el campo magnético necesario para retener las rASCs-SPIOs dentro del tejido cerebral, procedimos al direccionamiento magnético *in vivo* después de su administración IV en un modelo de infarto cerebral en rata .

A continuación, concretamente 24 horas después de la administración de las células, se llevó a cabo el registro de imagen mediante resonancia magnética (RM) en varias modalidades. Por una parte, el análisis de imagen nos permitió confirmar la zona infartada (*Figura 41A*) y a la vez, calcular el volumen del infarto con respecto al volumen total cerebral (*Figura 41B*). Además, mediante el registro con la modalidad R2* susceptible al hierro (*Figura 41C*), obtuvimos datos relativos a las variaciones de la concentración de hierro presentes dentro del volumen cerebral. En la actualidad nos encontramos llevando a cabo el post-procesado de imagen con la finalidad de detectar

Resultados

las rASCs-SPIOs dentro del volumen cerebral, pero por el momento no disponemos de resultados concluyentes.

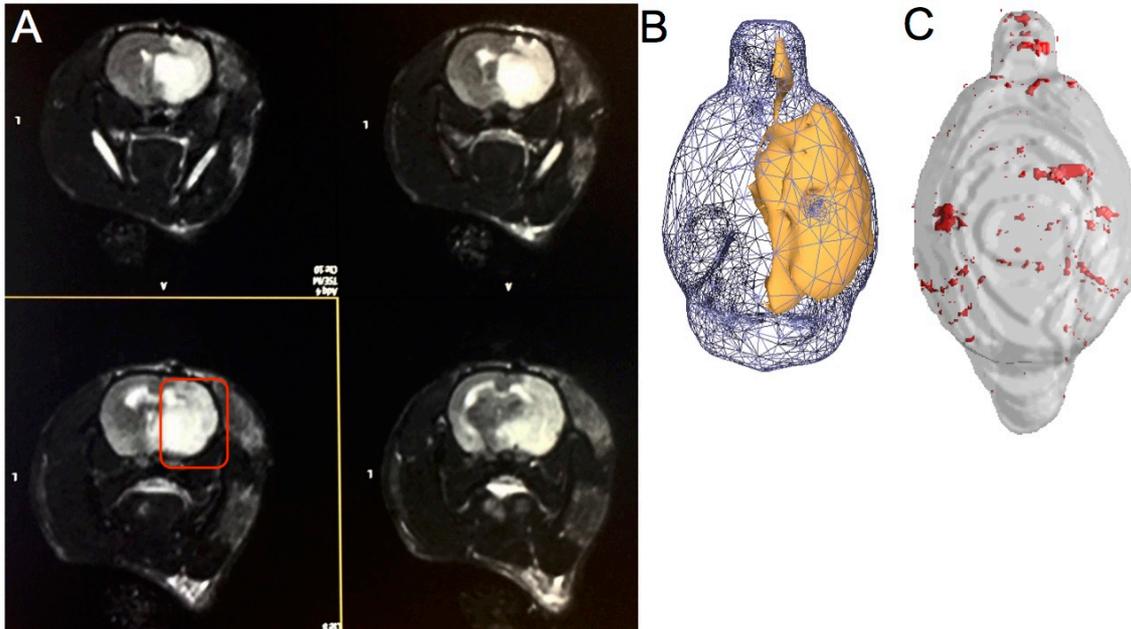


Figura 41. Registro de imagen mediante resonancia magnética (RM). A) Cortes coronales de una secuencia en la modalidad T1 HR mostrando la zona de infarto en un tono blanquecino dentro del volumen cerebral (recuadro rojo). B) Post-procesado de imagen que permitió la visualización 3D tanto del volumen cerebral (rejilla azul) como del volumen de infarto (coloreado en amarillo). C) Imagen obtenida en el procesado inicial de la modalidad R2* para la posterior detección de hierro en el volumen cerebral.

Realizado el registro de imagen procedimos a la eutanasia de los animales y al procesado histológico de las muestras. Para poder estudiar cómo había influido la aplicación del campo magnético durante la administración de rASC-SPIOs, llevamos a cabo la tinción de Perls, para poder detectar mediante su coloración azul las células que habían logrado alojarse en el tejido cerebral después de su infusión IV (*Figura 42*). Durante los recuentos, no encontramos una norma en la localización de las rASCs-SPIOs dentro de los distintos niveles del volumen cerebral, ni apreciamos una relación clara de la distribución de las mismas en relación con la zona de isquemia. De forma frecuente, apreciamos agrupaciones celulares en torno a zonas altamente vascularizadas como el camino migratorio rostral (RMS) y la corteza cerebral. Así, en estos casos las células se organizaban en torno a grandes vasos sanguíneos, tanto en los animales en los que se había aplicado el campo magnético como en los animales control en los que simplemente se llevó a cabo la infusión IV después del infarto cerebral (*Figura 42B*).

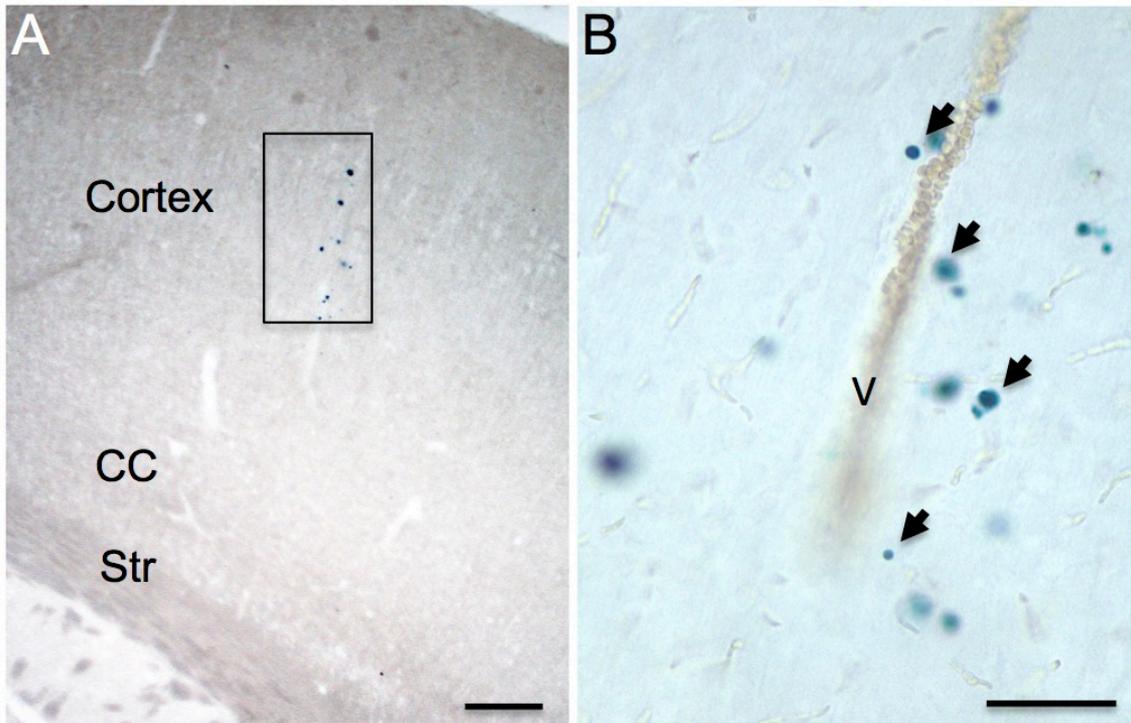


Figura 42. Tinción de Perls para el recuento de rASCs-SPIOs en el tejido cerebral. A) Imagen de microscopía óptica de un corte de 50 μm mostrando células coloreadas de azul con la tinción de Perls entorno a un vaso de la corteza cerebral. (CC: cuerpo calloso, Str: estriado). B) Detalle a grandes aumentos donde vemos las células Perls+ alrededor de un vaso sanguíneo en la corteza cerebral. Barras de escala A: 100 μm , B: 50 μm .

Durante el análisis de los datos derivados del conteo (*Tabla 5*), observamos cierta tendencia al aumento de la densidad de células Perls+ en los cerebros sobre los cuales se había aplicado el campo magnético durante la administración de rASCs-SPIOs ($209,54 \pm 72,12$ células/ mm^3 frente a las $118,95 \pm 55,12$ células/ mm^3 del grupo sin la aplicación del imán), pero sin llegar a resultar ésta significativa ($p=0,157$) (*Figura 43A*). Sin embargo, analizando las densidades celulares por hemisferios, no encontramos una relación directa entre el efecto del imán y la densidad de células Perls+. Por otra parte, para estudiar como podía afectar el volumen de infarto al número de células alojadas en el parénquima cerebral, analizamos la densidad de rASCs-SPIOs en relación al porcentaje del volumen del infarto. Para ello, comparamos la densidad de células Perls+ de los cerebros con volúmenes de infartos similares, encontrando que el efecto del imán aumentaba de manera exponencial en relación al volumen de infarto (*Figura 45B*). Así, en los cerebros con infartos dentro de un intervalo del 4-5%, la densidad de células Perls+ se multiplicó por 1,27 veces con la aplicación del imán. Cuando el infarto quedó comprendido entre un 10-12% del volumen cerebral total, el efecto del imán consiguió multiplicar por 1,77 veces la densidad de rASCs-SPIOs. Por otra parte, cuando el volumen del infarto supuso un

Resultados

Animal	Área (mm ²)	Células Perls+ (N)	Volumen (mm ³)	Densidad (N/mm ³)
PI-158	36,26	128	1,80	70,23
PI-162	35,80	320	1,79	178,78
PI-167	33,24	179	1,66	107,84
PI-105	33,69	240	1,69	142,60
PI-125	29,91	459	1,50	306,13
PI-139	32,51	274	1,63	168,68
PI-168	33,58	371	1,68	220,76

Tabla 5. Relación de datos obtenidos en el conteo de células Perls+ en el tejido cerebral. Grupos de animales en los que no se aplicó campo magnético durante las infusión IV de rASCs-SPIOs (sombreado naranja) frente al grupo en el que sí fueron sometidos a un campo magnético durante la administración de células (sombreado rojo).

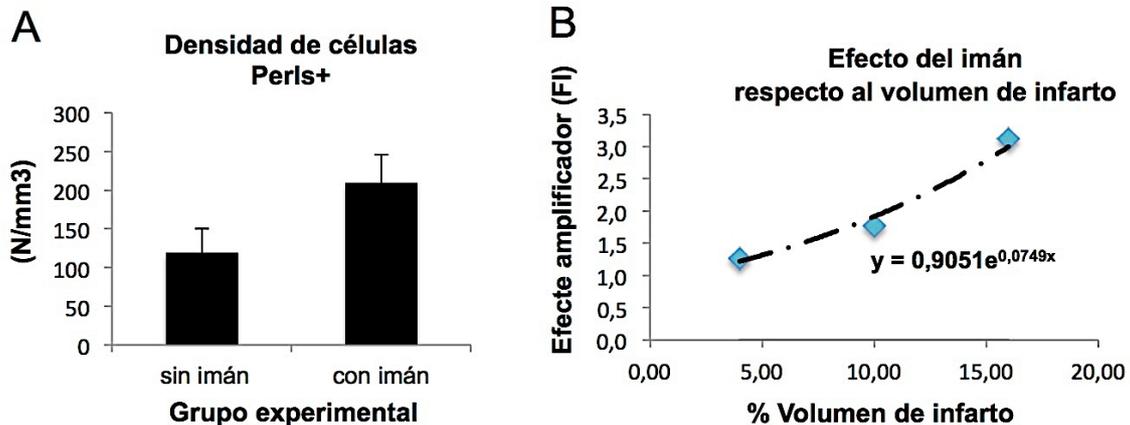


Figura 43. Análisis del recuento de rASCs-SPIOs en el tejido cerebral después de su administración IV. A) Gráficas de barras mostrando una tendencia en el aumento de la densidad de rASCs-SPIOs en el cerebro de los animales en los que se aplicó un campo magnético durante la administración (209,54±72,12 células/mm³ frente a las 118,95±55,12 células/mm³ del grupo sin la aplicación del imán) sin llegar a resultar significativa (p=0,157). B) Gráfica mostrando el incremento exponencial del efecto del imán (FI) en función del porcentaje del volumen (VI) de infarto con su correspondiente ecuación (VI: 4-5% FI=1,27; VI: 10-12% FI=1,77; VI:17-19% FI=3,12).

17-19% del volumen cerebral, el efecto del imán consiguió multiplicar la densidad de células marcadas con hierro unas 3,12 veces. Así, cuanto mayor era el volumen del infarto, mayor era el efecto que tenía el imán reteniendo las rASCs-SPIOs en el parénquima cerebral, por lo que la eficiencia del direccionamiento magnético podía venir en cierta manera determinada por la afectación del cerebro infartado en cuestión.

4.6. Análisis morfológico de las rASCs-SPIOs después del direccionamiento magnético.

Para estudiar el estado de las células después de su infusión IV y valorar si después de la aplicación de un campo magnético *in vivo* su viabilidad se había comprometido de alguna manera, llevamos a cabo el análisis ultraestructural de las células Perls+ detectadas en el parénquima cerebral. Mediante MET pudimos comprobar que el estado de las células sin aplicación del campo magnético (*Figura 44*) y con aplicación (*Figura 45*) del sistema magnético diseñado era similar, por lo que la aplicación del campo magnético no había determinado los cambios apreciados. Encontramos células que conservaban su membrana plasmática conteniendo numerosas partículas hierro en su citoplasma, pero sin distinguirse orgánulos contenidos en él que nos recordasen a las MSCs descritas previamente. No era posible diferenciar el núcleo puesto que éste había perdido su envoltura y no distinguimos la cromatina, indicando un grado de degradación irreversible. En muchos de los casos, como ya habíamos apreciado durante los recuentos, las células se encontraban cercanas a vasos sanguíneos de gran tamaño en zonas altamente vascularizadas (camino migratorio rostral (RMS) y cortex). Entorno al 95% de los casos, apreciamos que las rASCs-SPIOs se encontraban envueltas por expansiones microgliales en las que se apreciaba con claridad el RER que las caracteriza (*Figura 44 C y F y Figura 45 C y F*), detectando en numerosas ocasiones el núcleo de estas células (*Figura 44 G-I; Figura 45 D, E, G-I*) e incluso encontrando en alguna ocasión la asociación MSCs-microglía-astrocito (*Figura 45D-F*). Además, pudimos confirmar el proceso de fagocitosis por parte de las células de microglía, puesto que en determinadas ocasiones éstas contenían hierro en su citoplasma que adoptó una coloración azul con la tinción de Perls y, posteriormente, gracias al análisis ultraestructural verificamos que se trataba del citoplasma de éstas células (*Figura 45 D y E*). En algunos casos, encontramos rASCs-SPIOs con su aspecto algo más conservado (*Figura 45 A-C y C-I*), en las que se apreciaba en mayor grado el

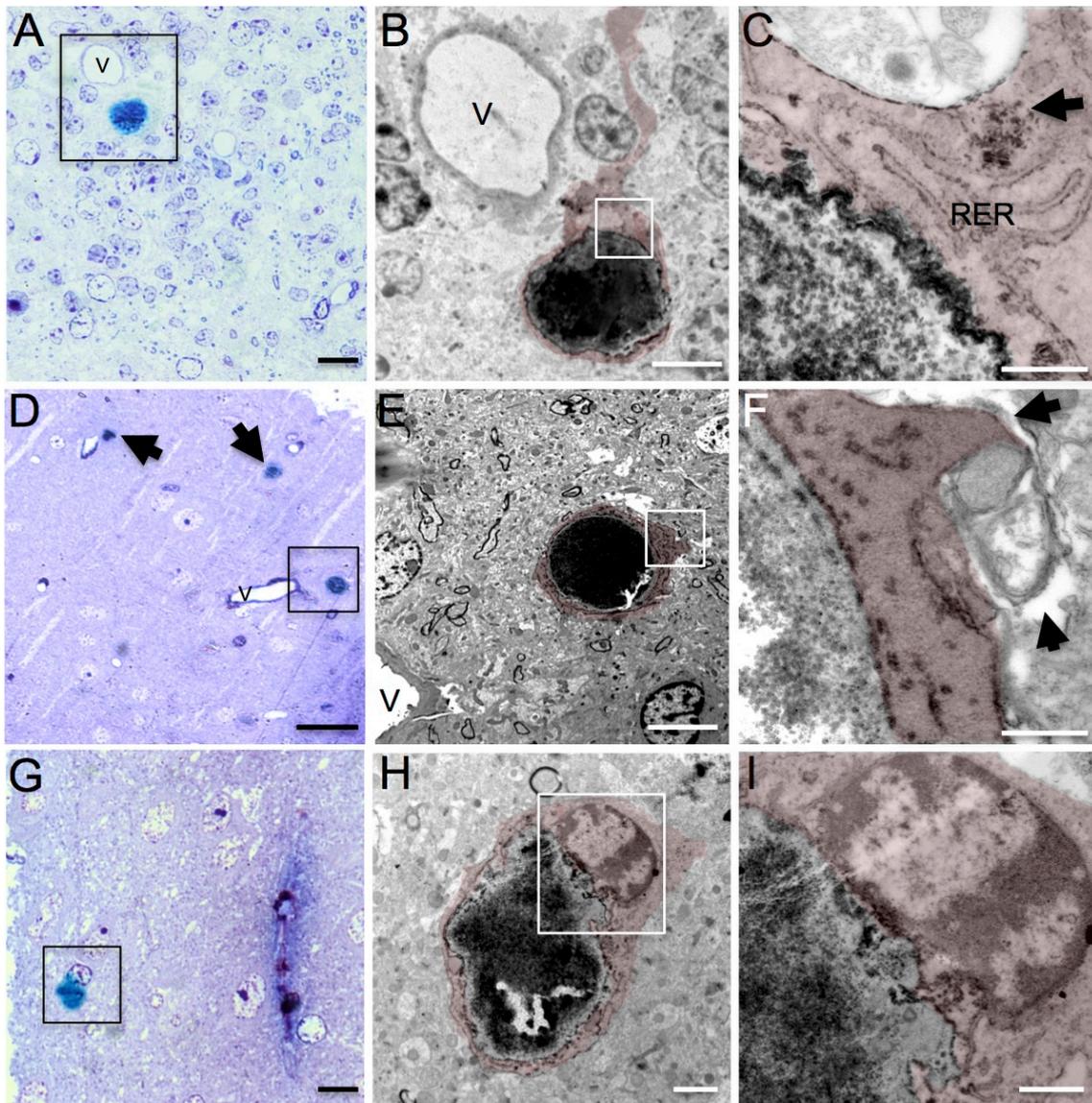


Figura 44. Análisis ultraestructural de las rASCs-SPIOs en el tejido cerebral después de su infusión intravenosa sin la aplicación de un campo magnético. Secciones semifinas (1,5 μ m) (A,D,G) teñidas con azul de toluidina mostrando células Perls+ (coloración azul intenso) y secciones ultrafinas (70 nm) (B,C,E,F,H,I) de las mismas células con células microgliales sombreadas en rojo. A) Célula Perls+ (recuadro) cercana a un vaso sanguíneo (v) dentro del camino migratorio rostral (RMS). B) A grandes aumentos no distinguimos ni orgánulos ni el núcleo dentro del citoplasma de la rASCs-SPIOs, apreciándose una expansión microglial rodeando la rASCs-SPIOs. C) Detalle del recuadro en (B) mostrando el RER de la célula de microglía y SPIOs (flecha) contenidas en su citoplasma. D) Células Perls+ en la corteza cerebral (recuadro y flechas) cercanas a grandes vasos sanguíneos. E) Expansiones de una célula de microglía envolviendo la célula enmarcada en (D), detectándose abundante material electrodenso en el interior de la rASCs correspondiendo con las SPIOs. Detalle del recuadro en (E), donde se aprecian los espacios intercelulares (flechas) que indica que se trata de una célula que se encuentra migrando por el parénquima. G) Célula Perls+ en la que se observa un núcleo. H) El análisis ultraestructural demuestra que se trata del núcleo de la célula de microglía. I) Detalle del núcleo de la microglía. Barras de escala: A y G: 10 μ m; B: 5 μ m; C y F: 500 nm; D: 25 μ m; H: 2 μ m; I: 250 nm.

contenido de su citoplasma, distinguiéndose pequeñas gotas de grasa y un menor contenido de partículas de hierro formando agregados. En estas células tampoco detectamos el núcleo aunque algunas porciones del citoplasma nos podían recordar a grumos de cromatina. Sin embargo, también se trataba de células en las que se había visto comprometida de forma irreversible su viabilidad, comenzando su proceso de degradación y en todos los casos se encontraban envueltas por células de microglía implicadas en procesos de fagocitosis.

Para descartar que la tinción de Perls pudiera estar interfiriendo en el análisis ultraestructural, llevamos a cabo el estudio de algunas rASCs-SPIOs sin que éstas hubieran sido teñidas previamente (*Figura 45 G-I*). Para ello, basándonos en la localización de grandes grupos de células Perls+, buscamos células refringentes al MO en niveles adyacentes sin teñir. Así, al observar estas células con el MET, comprobamos que su ultraestructura era similar a la encontrada en los casos anteriores, por lo que descartamos que la tinción previa para la detección de las rASCs-SPIOs pudiera estar comprometiendo su posterior análisis morfológico.

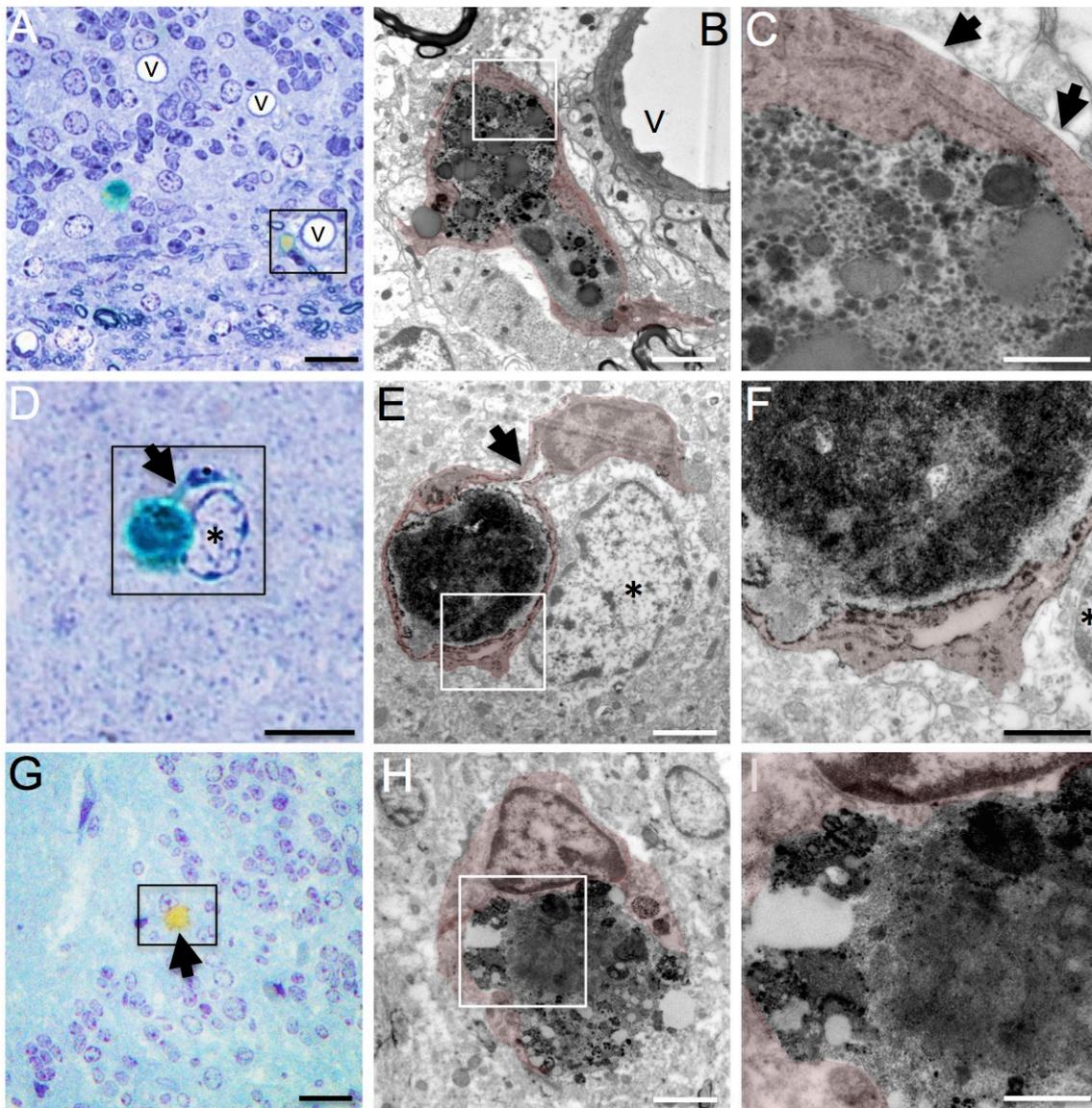


Figura 45. Estudio morfológico de las rASCs-SPIOs en el tejido cerebral después de su infusión intravenosa durante la aplicación de un campo magnético. A) Sección semifina del camino migratorio rostral (RMS) altamente vascularizado (vasos: v) conteniendo dos rASCs-SPIOs marcadas con la tinción de Perls (recuadro y flecha). B) Recuadro en (A) apreciándose una expansión microglial envolviendo a la rASC con su viabilidad claramente comprometida. C) Detalle mostrando el citoplasma de la rASCs-SPIOs donde se distinguen pequeñas gotas de grasa y agregados de SPIOs electrodensas. También se aprecia una expansión de una célula de microglía (rojo) y espacios intercelulares (flechas) que indican el movimiento de ésta a través del parénquima. D) Imagen de MO mostrando una célula Perls+ (flecha negra) rodeada por otra célula también coloreada de azul (flecha blanca), indicando fagocitosis de las SPIOs por parte de la segunda, además del núcleo de un astrocito acompañándolas (asterisco). E) Imagen a grandes aumentos mostrando el citoplasma de la célula de microglía (rojo) abrazando la rASCs. F) Detalle mostrando el citoplasma de la célula de microglía (rojo) conteniendo SPIOs en su interior (flecha), la rASC (asterisco blanco) conteniendo abundantes SPIOs y el citoplasma claro del astrocito (asterisco negro). G) rASC sin la tinción de Perls mostrando su citoplasma amarillento con un núcleo adyacente. H) A nivel ultraestructural confirmamos que el núcleo pertenecía a una célula de microglía envolviendo el citoplasma de la célula con hierro. I) Detalle del citoplasma degradado de la rASC. Barras de escala: A, B y C: 10 μ m; B, E y H: 5 μ m; C e I: 250 nm; F: 500 nm.

4.7. Estudio inmunohistoquímico de las rASCs-SPIOs alojadas en el parénquima cerebral.

Para confirmar molecularmente que las células que envolvían a las rASCs-SPIOs en el parénquima cerebral correspondían a células microgliales, llevamos a cabo un marcaje inmunohistoquímico con el marcador Iba-1, específico para este tipo celular en su forma activa. Además, puesto que habíamos observado cierta relación con las células astrogliales llevamos a cabo el marcaje de las mismas con GFAP, una proteína fibrilar ácida presente en su citoplasma. Esto nos permitiría estudiar el microambiente de las rASCs-SPIOs alojadas en el parénquima cerebral después de su administración intravenosa, puesto que mediante el análisis ultraestructural habíamos comprobado que tanto sin como con aplicación de un campo magnético durante la infusión, la viabilidad de las células marcadas con hierro se encontraba claramente comprometida.

El marcaje con Iba-1 confirmó que las células que envolvían a las rASCs-SPIOs correspondían a células de microglía (*Figura 46*). La co-localización de las células Perls+ mediante su visualización con microscopía de campo claro (*Figura 46 A-D*) y las imágenes de fluorescencia en el mismo plano (*Figura 46 E-H*), permitieron apreciar cómo las células microgliales envolvían con sus expansiones a las rASCs-SPIOs. Analizamos una totalidad de 20 células Perls+ localizadas en la corteza cerebral de cada grupo experimental (sin y con la aplicación del campo magnético) y, en ambos casos encontramos resultados similares: en los animales sin la aplicación del campo magnético, apreciamos que un 85 % de las rASC-SPIOs presentaban expansiones de microglía envolviéndolas y, en el grupo con aplicación de un campo magnético durante la administración, se encontró microglía asociada en el 75% de las células analizadas. Por otra parte, el marcaje con GFAP permitió apreciar que en la mayor parte de los casos, los astrocitos se asociaban al conjunto formado por la rASCs-microglía, probablemente de forma reactiva. Además, la tinción con DAPI, que permitía la visualización de los núcleos celulares marcando fragmentos de su DNA, no mostró señal fluorescente en el caso de las rASCs-SPIOs (*Figura 46 E-H*).

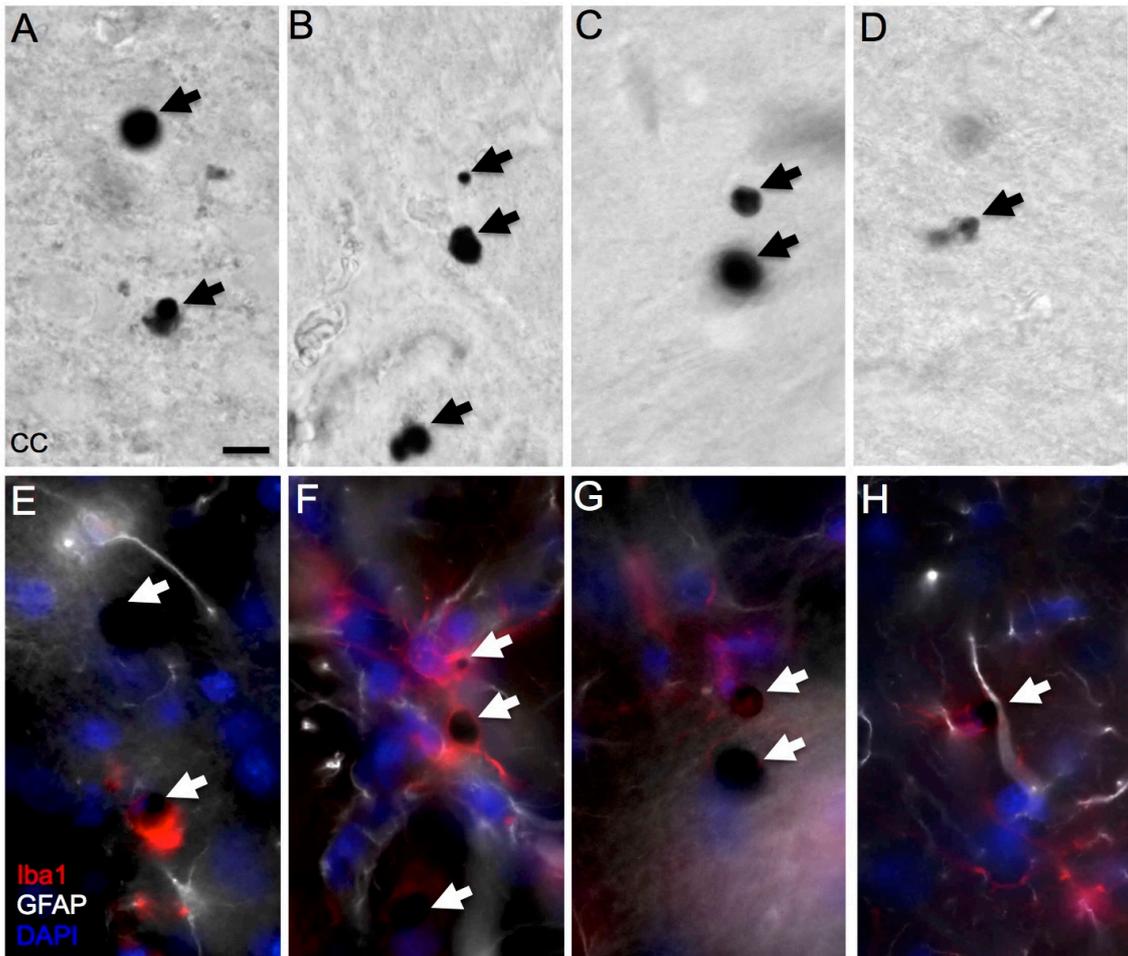


Figura 46. Inmunofluorescencia del microambiente de las rASCs-SPIOs alojadas en el tejido cerebral. Detección inmunohistoquímica (E-H) de las células de microglía Iba-1+ (rojo) y células astrogliales GFAP+ (blanco) en co-localización con las células Perl+ en campo claro (CC) (A-D). Los núcleos celulares se marcan con DAPI (azul). Tanto en el grupo de animales sin aplicación del campo magnético (A,B,E,F) como en el grupo sometido a un campo magnético durante la administración de las rASCs (C,D,G,H) encontramos células microgliales (Iba1+) y astrogliales (GFAP+) en contacto con las células Perl+ detectadas en CC. Las células Perl+ no presentan núcleos marcados con DAPI en inmunofluorescencia. Barra de escala 10 μ m.

4.8. Administración de intracerebral de rASCs

Dado que observamos que las células eran reconocidas por el sistema inmunitario endógeno cerebral, quisimos saber si este fenómeno se relacionaba con la un posible deterioro migración de las células a través del torrente sanguíneo y los filtros tisulares, o si por el contrario era una reacción secundaria al reconocimiento inmunitario por parte de la microglía. Para ello, quisimos comprobar la morfología de las rASCs-SPIOs utilizando un método de administración diferente, para lo que utilizamos el trasplante mediante una inyección intracerebral. En este caso,

esperamos 72 horas (frente a las 24 horas de la administración IV) para la eutanasia de los animales, para poder valorar tras un periodo más prolongado el estado de las MSCs-SPIOs y su microambiente. Puesto que solo queríamos valorar cómo podía haber afectado la administración IV a las rASCs-SPIOs, este experimento se realizó únicamente en animales sanos. Así, podríamos valorar la viabilidad de las células transcurrido un periodo de tiempo más largo y comprobar su estado sin haber viajado a través del torrente sanguíneo. Con esta finalidad llevamos a cabo la inyección unilateral de 5×10^5 rASCs-SPIOs en el estriado dorsolateral adyacente a la corteza cerebral (basándonos en el protocolo utilizado por (Tan et al. 2014)) (Figura 47A).

En una vista panorámica de las secciones semifinas, encontramos una masa claramente diferenciable correspondiendo con la zona de la inyección (Figura 47A). A mayores aumentos, apreciamos que la mayoría de estas células contenían partículas refringentes en su interior (Figura 47B). A nivel ultraestructural, encontramos un acúmulo de células de morfología heterogénea conservada en distinto grado, encontrando desde células que preservaban intactos sus núcleos y el contenido de orgánulos en el citoplasma hasta células altamente vacuolizadas con núcleos en desintegración y escaso o nulo contenido citoplasmático (Figura 47C).

Las células que forman la subpoblación que habían sobrevivido al trasplante, se encontraban perfectamente interdigitadas y mostraban similitudes con las rASCs-SPIOs cultivadas *in vitro* (Figura 47D). Los núcleos conservaban su envoltura nuclear, diferenciándose en mayor o menor grado la heterocromatina con grumos asociada a la membrana nuclear. Encontramos que el contenido de orgánulos en el citoplasma de las células ha disminuido considerablemente, pero conservaban vesículas conteniendo SPIOs (Figura 47E) con un aspecto algo diferente a las observadas *in vitro* y pequeñas gotas de grasa (Figura 47D), además de apreciarse un elevado contenido en filamentos intermedios.

Por otra parte encontramos una subpoblación de células degradadas con su viabilidad claramente comprometida (Figura 47F). Estas células se encontraban altamente vacuolizadas, sin orgánulos en su citoplasma y se apreciaban partículas de hierro libres inmersas en él. Además, contenían núcleos picnóticos que habían perdido su envoltura y se encontraban formados por una masa de cromatina densa, distinguiéndose partículas electrodensas de hierro inmersas en ellos. En dichas células también observamos un elevado contenido en material fibroso (Figura 47F).

En ocasiones, encontramos células de microglía conteniendo material que proviene de la fagocitosis de rASCs-SPIOs con aspecto picnótico (Figura 47G). Sin

Resultados

embargo, en los casos en los que las células rASCs-SPIOs mantienen su viabilidad, no apreciamos células microgliales asociadas a ellas, a diferencia de lo observado en el caso de la administración endovenosa.

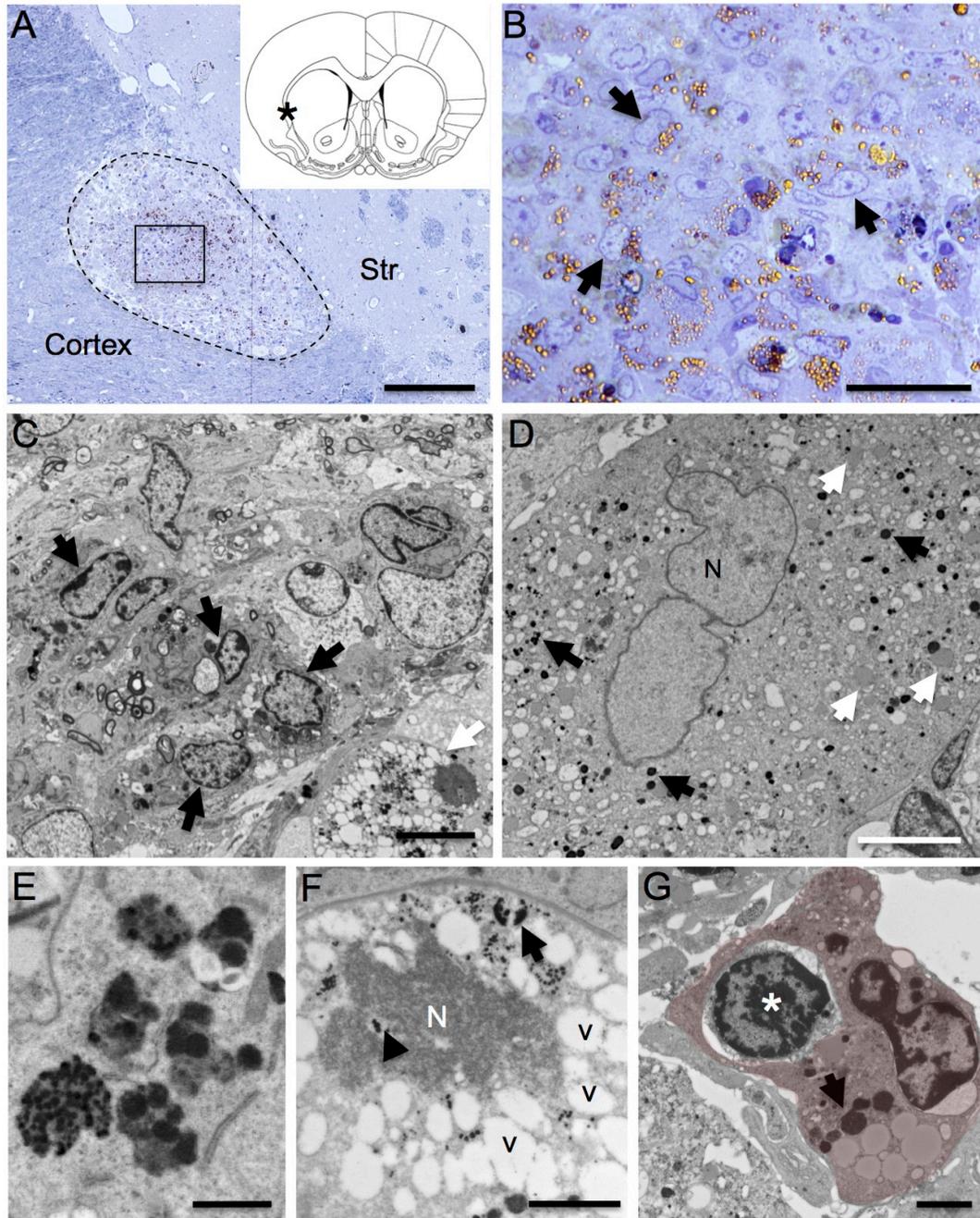


Figura 47. Estudio morfológico de rASCs-SPIOs después de 72 horas de su inyección intracerebral. A) Sección semifina (1,5 μ m) teñida con azul de toluidina mostrando la zona de la inyección (zona bordeada con la línea de puntos), situada entre el estriado (Str) y la corteza cerebral (Cortex). Detalle en la esquina superior derecha del nivel exacto de la inyección (asterisco) (coordenadas AP: 1,2 mm; L: 2,6 mm y DV: -4,5 mm con respecto a bregma). B) Detalle de la zona encuadrada en (A) mostrando el acúmulo de células con inclusiones refringentes en su citoplasma (Flechas). (C-G) Imágenes de secciones ultrafinas (70 nm) mostrando la ultraestructura de las células de la zona de la inyección. C) Encontramos dos subpoblaciones: una que conserva su viabilidad y contiene cuerpos

oscuros en su citoplasma (flechas negras) y otra con células altamente vacuolizadas de aspecto picnótico (flecha blanca). B) Detalle de una rASCs-SPIOs que preserva su viabilidad después de la inyección. Se observa su núcleo eucromático íntegro (N) profundamente invaginado con vesículas conteniendo las SPIOs (flechas negras) y pequeñas gotas de grasa (flechas blancas). E) Detalle de las vesículas electrodensas presentes en el citoplasma de las rASCs inyectadas. F) rASCs con núcleo picnótico habiendo perdido su envoltura y conteniendo SPIOs dispersas en él (punta de flecha). Su citoplasma contiene numerosas vacuolas (v) y agregados de SPIOs libres dispersas (flechas negras). G) Encontramos células microgliales (sombreado rojo) conteniendo vesículas con SPIOs en su interior (flecha negra) y gotas de grasa (flecha blanca) que provienen del material citoplasmático de la célula picnótica fagocitada (asterisco blanco). Barras de escala A: 250 μm , B y C: 10 μm , D: 5 μm , E: 1 μm , F y G: 2 μm .

Discusión

5. Discusión

El infarto cerebral supone una de las principales causas de mortalidad y discapacidad en la edad adulta en los países desarrollados. Uno de los puntos clave para el abordaje de la enfermedad después del evento isquémico es el factor tiempo, puesto que los eventos fisiopatológicos que tienen lugar en las células en la zona de la lesión comienzan a desencadenarse minutos después de la deprivación del flujo sanguíneo (Gutiérrez et al. 2009). Por este motivo, la ventana para la intervención con la finalidad de reducir el número de células afectadas por la isquemia en el tejido cerebral es estrecha (Dobkin & Carmichael 2015). Puesto que el tejido afectado sufre un daño diferencial dependiendo de su relación con el vaso sanguíneo obstruido, podemos distinguir dos regiones dentro del área de isquemia: (i) el *core* del infarto, en el cual se produce un daño irreversible con la consecuente muerte de las células afectadas y (ii) la zona de penumbra, zona “rescatable” donde los procesos que desencadenarán la muerte celular tienen lugar de una forma más dilatada en el tiempo. A día de hoy, el único tratamiento que se ha demostrado eficaz en el ámbito clínico es la eliminación del trombo que ha originado la isquemia cerebral por trombólisis o trombectomía, hasta 6 horas tras el inicio de los síntomas consiguiendo reperfundir la zona de penumbra. Así, todas las actuaciones dentro de dicha ventana temporal con potencial efecto neuroprotector, podrían mejorar el pronóstico de la enfermedad (Mergenthaler et al. 2016).

El creciente conocimiento acerca de la patogenia de la enfermedad, ha permitido el desarrollo de tratamientos farmacológicos focalizados en eventos concretos dentro de la denominada *cascada isquémica*. Sin embargo, a pesar de existir innumerables investigaciones centradas en el desarrollo de agentes farmacológicos neuroprotectores con resultados favorables en modelos de experimentación animal, no se han encontrado datos consistentes en los ensayos clínicos posteriores que confirmen su eficacia (Ogawa et al. 1999; Ricci et al. 2006; Lyden et al. 2002).

La terapia celular ha resultado una de las opciones con mayor potencial en las últimas décadas, ya que además de haber demostrado de forma reiterada su eficacia en modelos animales (Nomura et al. 2005; Horita et al. 2006; Liu et al. 2013), existen datos en ensayos clínicos que apoyan los resultados obtenidos en la investigación básica (Kondziolka et al. 2005; Nelson et al. 2002; Pollock et al. 2006). Puesto que lo que se busca principalmente en el tratamiento del ictus es “rescatar” a las células que han sufrido un daño reversible en la zona de penumbra perilesional, las células madre

Discusión

mesenquimales (MSCs) han resultado unas excelentes candidatas gracias a su tropismo por las zonas lesionadas (en inglés *homing*) y a su capacidad inmunomoduladora (Bernardo & Fibbe 2013) que interferiría en la cascada inflamatoria activada tras la isquemia. Además de estas propiedades, una importante ventaja de estas células frente a otros tipos de células madre como las células madre neurales (NSCs) es su fácil obtención de una forma mínimamente invasiva a partir de distintos tejidos, como pueden ser la punción de médula ósea o la lipoaspiración del tejido adiposo (Bao et al. 2011; Manea et al. 2014). Este aspecto resulta de especial importancia en la práctica clínica en el caso de considerarse un trasplante autólogo de las células obtenidas después de su expansión y caracterización *in vitro*.

Una de las principales limitaciones de la terapia celular y en especial en el caso del ictus, es el acceso limitado a las zonas lesionadas, sobre todo si se pretende utilizar vías de administración poco agresivas (para no acentuar procesos como la inflamación o la gliosis o empeorar los síntomas). La inyección intracerebral a este respecto podríamos considerarla invasiva, resultando la infusión endovascular la vía de administración más indicada para su traslación al ámbito clínico. Tras la administración intraarterial (IA) de células existe un riesgo secundario de microembolismos y un alto riesgo de mortalidad (Argibay et al. 2017), mientras que la vía intravenosa (IV) implica un mejor perfil de seguridad. Sin embargo, los estudios existentes en modelos animales utilizando la administración intravenosa de las células, encuentran una tasa de injerto muy baja en la zona de la lesión (Gutiérrez-Fernández et al. 2015; Argibay et al. 2017; J. Chen et al. 2003; J. Chen et al. 2001; Acosta et al. 2015) al tener que superar filtros tisulares, tales como el hepático o el pulmonar. No obstante, pese a la reducida tasa de células en la región isquémica, estos estudios describen un efecto beneficioso de la administración de las MSCs.

De acuerdo con todo lo mencionado anteriormente, el presente trabajo se ha centrado en el desarrollo de un sistema magnético que permita retener las MSCs administradas vía IV dentro del tejido cerebral, con la finalidad de aumentar la tasa de injerto en el tejido diana en un modelo animal de infarto cerebral. Para ello, se ha llevado a cabo el marcaje de las MSCs con nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIOs), las cuales les han conferido sus propiedades magnéticas y además, han permitido su detección dentro del órgano diana. Paralelamente, hemos estudiado la ultraestructura e integración de las células una vez alojadas en el parénquima cerebral después de su infusión IV, puesto que no existía información al respecto en la literatura.

5.1. Aislamiento de MSCs de distintos tejidos y cultivo *in vitro*.

En nuestro estudio conseguimos obtener MSCs a partir de distintos tejidos de diferentes especies: por una parte MSCs de la médula ósea de ratón (mBMSCs), y por otra MSCs de tejido adiposo de rata (rASCs) y de humano (hASCs).

Desde el momento de la siembra inicial ya observamos un crecimiento mucho más rápido y, por tanto, un rendimiento mucho mayor del cultivo primario en las células obtenidas del tejido adiposo con respecto a las de la médula ósea. Además, otro aspecto que dificultó la obtención de un *pool* considerable de mMSCs de médula ósea, fue el hecho de que éstas presentaran una adherencia mucho mayor a la placa de cultivos en los primeros pases celulares y, dada la necesidad de llevar a cabo un arrastre mecánico de las células (adicional a la incubación habitual con EDTA/tripsina para su desprendimiento proteolítico) de forma reiterada, perdimos gran parte de la población inicial. En este sentido, existen estudios que encuentran un bajo rendimiento durante el cultivo primario de MSCs a partir de la médula ósea de ratón en comparación con la especie humana entre otras, por lo que se han intentado establecer protocolos para optimizar el rendimiento y purificación de las mBMSCs. En nuestro caso, utilizando una amplia gama de protocolos existentes en la literatura (S. Xu et al. 2010; Phinney et al. 1999; Baddoo et al. 2003; Sreejit et al. 2012; Y. Li et al. 2008), finalmente conseguimos mBMSCs suficientes para llevar a cabo parte de los experimentos *in vitro*, pero no las suficientes para poder llevar a cabo la terapia celular en el modelo animal de infarto cerebral. De acuerdo con nuestras observaciones, existen estudios que confirman un rendimiento de la expansión de hasta 500 veces mayor en el caso del tejido adiposo en comparación con el de la médula ósea (Fraser et al. 2008; Lotfy et al. 2014; Kuhbier et al. 2010).

A pesar de la limitación mencionada, después de llevar a cabo varios pases celulares pudimos comprobar que las tres poblaciones cultivadas (mMSCs, rASCs y hASCs) cumplían los criterios definidos por la Sociedad Internacional de la Terapia Celular (ISCT) para las MSCs: forma fusiforme de su citoplasma, adherencia al plástico y expresión de determinados marcadores de superficie (Dominici et al. 2006). Además, en las células de origen adiposo confirmamos también su multipotencialidad hacia distintos linajes de origen mesodérmico, otra característica definitoria de las MSCs según la ISCT. Así, tanto las rASCs como las hASCs cultivadas, poseían la capacidad de diferenciarse a los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico,

confirmado con las correspondientes tinciones específicas de la misma forma que estudios previos (Teti et al. 2011; Pittenger 1999; Bunnell et al. 2008).

Finalmente, dado que se ha demostrado que la secreción de factores y citoquinas por parte de las MSCs y su efecto inmunomodulador en animales de experimentación es independiente del tejido de obtención de las mismas (Ock et al. 2016; Xie et al. 2017; Ou et al. 2016), a la hora de realizar los experimentos *in vivo* decidimos utilizar las rASCs. Al tratarse de células obtenidas a partir de tejido adiposo tienen la clara ventaja para la traslación al ámbito clínico y, además, al utilizar un modelo animal de infarto cerebral en rata, eligiendo MSCs procedentes de esta especie pretendimos reducir la posibilidad del rechazo interespecífico. Pese a tomar esta precaución, numerosas publicaciones han descrito que las MSCs tienen una baja expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo 1 y carecen de las moléculas del MHC tipo 2 (Javazon et al. 2004), y que incluso los trasplantes xenogénicos no inducen rechazo inmunitario contra las células (Gutiérrez-Fernández et al. 2015). En el último apartado de la discusión profundizaremos más este aspecto sobre la inmunogenicidad de las MSCs.

5.2. Ultraestructura de las MSCs durante su cultivo y su diferenciación *in vitro*.

En el presente estudio llevamos a cabo un análisis ultraestructural detallado de las MSCs cultivadas, datos que nos sirvieron posteriormente para poder valorar los cambios producidos después del marcaje con SPIOs. Tanto las mBMSCs como las rASCs y las hASCs, mostraron una morfología similar. Estudiando las poblaciones en secciones semifinas diferenciamos unas células con morfología poligonal y otra población mayoritaria de células fusiformes. En este sentido, existen trabajos que distinguen los mismos tipos de subpoblaciones, atribuyendo la morfología poligonal a un estado que van adquiriendo las células a través de los pases celulares, siendo este tipo más abundante en pases avanzados en relación con la senescencia (Pascucci et al. 2010; Miko et al. 2015; Karaoz et al. 2009).

En cuanto a la ultraestructura celular, nuestros datos concuerdan con los análisis que encontramos en estudios previos, independientemente de la especie y el tejido de origen (médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical, placenta o pulpa dental) (Pasquinelli et al. 2007; Ozen et al. 2013; Roman et al. 2013; Maia et al. 2013; Ryu et al. 2013; Mantovani et al. 2012). Un elemento muy característico que encontramos en

el citoplasma de las células de las diferentes especies fueron los cuerpos de inclusión con estructura multi-membrana y material electrodensito en su interior. Estos cuerpos ya habían sido descritos por varios estudios con una terminología muy variada (autofagosomas, cuerpos residuales, cuerpos electrodensos a modo de figuras mielínicas, vesículas multilamelares, etc.) pero siempre coincidiendo en su descripción con lo observado en nuestro trabajo (Lanotte et al. 1981; Roman et al. 2013; Struys 2012; Pasquinelli et al. 2007; Miko et al. 2015; Pascucci et al. 2010; Manea et al. 2014).

En nuestro trabajo, también llevamos a cabo un análisis ultraestructural detallado de las hASCs durante su proceso de diferenciación a distintos linajes de origen mesodérmico: adipogénico, osteogénico y condrogénico. Así, después de 21 días de diferenciación, las células mostraron características típicas de cada linaje: gotas de grasa que ocupaban la mayor parte del citoplasma en el linaje adipogénico, vesículas de secreción con depósitos de calcio en el linaje osteogénico y formación de una esfera con abundante matriz extracelular compuesta por fibras de colágeno en el caso de la condrogénesis; todo ello concordando con las características ultraestructurales descritas en estudios previos de diferenciación de MSCs humanas (Teti et al. 2011; Pittenger 1999; Struys et al. 2011; Roman et al. 2013). Un dato que nos pareció interesante relacionado con la ultraestructura después de la diferenciación *in vitro*, fue el hecho de que la mayor parte del citoplasma de las células del linaje osteogénico se encontrara ocupado por cuerpos densos prácticamente idénticos a los descritos en las MSCs, pero en una proporción mucho mayor. Este dato nos invita a pensar que ciertas condiciones variables dentro de la placa de cultivo, como podrían ser la confluencia celular, la localización de las células (capas superiores o inferiores), el tiempo de cultivo o la liberación de factores de las células vecinas, pueden pre-condicionar a las MSCs a su diferenciación hacia un determinado linaje celular. Por tanto, las MSCs que contienen un número elevado de cuerpos densos multi-membrana en su interior, podrían ser células que en cierto grado han comenzado su diferenciación hacia el linaje osteogénico. En lo referente a dicha observación, en el caso de los linajes adipogénico y osteogénico después de 7 días de diferenciación *in vitro*, encontramos células que exhibían características intermedias entre ambos. Incluso después de 21 días, encontramos células con las características típicas del linaje osteogénico en la placa de cultivos del linaje adipogénico y viceversa, aunque en una proporción mucho menor. Esto podría deberse a la predisposición de las células comentada o bien al hecho de que los dos linajes celulares compartan muchos de los componentes del medio de cultivo. De igual manera, la dilatación de cisternas del RER o las

mitocondrias elongadas en los cultivos de expansión, podrían ser indicativas de que las células MSC tienen una tendencia inicial a diferenciarse hacia linaje condrogénico o adipogénico respectivamente pero, curiosamente, aún preservan su capacidad de derivar hacia otros linajes en las condiciones adecuadas de cultivo. Puesto que son pocos los estudios que contienen un análisis ultraestructural detallado de la diferenciación de las MSCs, no encontramos información relacionada al respecto en la literatura.

5.3. Biocompatibilidad de las SPIOs para la magnetización de las MSCs.

A la hora de llevar a cabo el marcaje de las MSCs con nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIOs), fue necesaria la incubación junto con un agente de transfección que facilitase la internalización de las mismas en el citoplasma de las células, puesto que sin su utilización no conseguimos encontrar hierro dentro de las células (valorado mediante la tinción de Perls). Para ello decidimos utilizar la poli-L-lisina (PLL), un polícatión utilizado habitualmente como una sustancia para facilitar la adhesión celular en las placas de cultivo. De esta forma, conseguimos conferirles a la superficie de las nanopartículas una carga positiva más afín con la carga negativa de la membrana celular de las MSCs (Verma & Stellacci 2010).

A través de las diferentes especies tuvimos que variar la concentración de PLL, puesto que con el protocolo utilizado para el marcaje de las mMSCs (50 $\mu\text{g/ml}$ de $\text{Fe}^{+1,25}$ μg de PLL) ni en las rASCs ni en las hASCs se consiguió una internalización de las SPIOs detectable mediante la tinción de Perls. Así pues, en el caso de las células de rata y de humano (ambas de origen adiposo), tuvimos que aumentar la concentración de PLL hasta 1,75 $\mu\text{g/ml}$ en el medio de cultivo, manteniendo invariable la cantidad de Fe durante la incubación. En concordancia con este hecho, existen estudios que mencionan la variabilidad a la hora del marcaje dependiendo de la especie (Babič et al. 2008) incluso del tipo celular dentro de la misma especie (Bulte et al. 2004), posiblemente debido a la variabilidad de las propiedades de la membrana celular en cada caso.

En el análisis ultraestructural de las MSCs marcadas con SPIOs (MSCs-SPIOs) en las tres especies analizadas (ratón, rata, humano), observamos que las SPIOs se encontraban en su mayoría concentradas en lisosomas dentro del citoplasma celular,

de la misma forma que en varios estudios que también utilizan las SPIOs para el marcaje celular (Huang et al. 2010; Skopalik et al. 2014; C. Xu et al. 2012; Verma & Stellacci 2010). Además, en nuestro trabajo apreciamos gracias al análisis mediante TEM los procesos de endocitosis/exocitosis que estaban teniendo lugar en la membrana celular, confirmando así la forma en la que las células internalizaban o expulsaban las partículas. Valorando la viabilidad de las células después del marcaje mediante la incubación con XTT, comprobamos que las tres especies la mantenían prácticamente invariable, en torno a un 95% frente al 100% de las células sin marcar. De la misma forma, varios estudios que utilizan el marcaje celular con SPIOs, obtuvieron resultados similares sin verse alterada de forma significativa la viabilidad celular después de la internalización de las nanopartículas de hierro (Riegler et al. 2013; Landázuri et al. 2013; H.-H. Wang et al. 2009). Incluso en uno de ellos que utilizaba la misma concentración de hierro para el marcaje (50 μm Fe/ml), la actividad metabólica de las células se había visto incrementada (Cianciaruso et al. 2014).

De la misma forma que habíamos comprobado la multipotencialidad de las MSCs durante su cultivo *in vitro*, confirmamos que tanto las rASCs como las hASCs habían mantenido su capacidad para diferenciarse hacia los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico conteniendo hierro en su citoplasma. En lo referente a este aspecto, hemos encontrado trabajos que de la misma forma logran la diferenciación de MSCs hacia los tres linajes sin y con el marcaje con hierro. Sin embargo, también encontramos algunos trabajos que encuentran cierta dificultad para que las MSCs marcadas con SPIOs se diferencien hacia el linaje condrogénico (Riegler et al. 2013; Kostura et al. 2004). En uno de ellos podríamos atribuir la imposibilidad de la diferenciación condrogénica al hecho de que utilicen una concentración de hierro casi 12 veces mayor que en nuestro trabajo (Riegler et al. 2013) y que además, se traten de MSCs de conejo. Sin embargo, en el otro estudio (Kostura et al. 2004) utilizan tanto una concentración de hierro como de PLL menor que en nuestro caso y el mismo tiempo de incubación (24 horas), por lo que la única variable que encontramos para explicar la imposibilidad de la diferenciación es el hecho de que en lugar de MSCs de tejido adiposo se trate de células obtenidas de la médula ósea, aspecto que podría variar la capacidad de diferenciación después del marcaje.

En cuanto a las propiedades magnéticas de las MSCs, confirmamos de la misma forma que estudios previos (C. Xu et al. 2012; Carezza et al. 2013; Riegler et al. 2013) que gracias a la internalización de las SPIOs las células habían adoptado un comportamiento magnético a temperatura fisiológica.

5.4. Migración *in vitro* de las MSCs-SPIOs mediante la aplicación de campos magnéticos.

Previamente a la administración *in vivo* de MSCs-SPIOs para su direccionamiento magnético comprobamos que las células podían moverse en la placa de cultivo mediante la aplicación de un imán permanente. Así, al ser resembradas después de la internalización de las SPIOs, comprobamos que en cuestión de 6h las células ya se encontraban adheridas a la placa de cultivos y se apreciaba una clara concentración de las células coincidiendo con la zona de aplicación del campo magnético. Además, visualizamos gracias al marcaje fluorescente de MSCs-SPIOs que conforme acercábamos el imán a la placa de cultivos, las células iban acudiendo atraídas por el campo magnético y en cuestión de 35 segundos, ya se encontraba prácticamente toda la superficie ocupada por el imán cubierta de células. De la misma forma, estudios que llevan a cabo el marcaje de las células con SPIOs y una posterior resiembra aplicando un campo magnético durante distintos intervalos de tiempo (uno de ellos 120 minutos y otro 48 horas), encuentran las células concentradas coincidiendo con la zona “imantada” (Vanecek, Zablotskii, Forostyak, Růžička, Herynek, Babic, Jendelova, Kubinová, Dejneka & Sykova 2012b; Riegler et al. 2013).

Suponiendo que la fuerza magnética que guiaba a las células podría producir un daño en las membranas y por tanto ser deletérea para las mismas, quisimos comprobar la morfología de las MSCs-SPIOs después de su migración magnética. Así, confirmamos que las células continuaban conteniendo las SPIOs en vesículas que permanecían intactas dentro de su citoplasma. No observamos indicios de muerte celular y las células conservaban íntegras tanto sus membranas como sus núcleos y orgánulos citoplásmicos. Tampoco apreciamos la deformación de las estructuras celulares ni la concentración de las vesículas con SPIOs en el polo de las MSCs más cercano a la zona de aplicación del imán, lo que invita a pensar que dentro de la células existe un importante citoesqueleto que encierra las SPIOs dentro de su citoplasma, y por tanto, las MSC y partículas se mueven como un “todo” dentro de la placa de cultivo bajo la acción de la fuerza magnética. En este sentido, existe un estudio que, aplicando un campo magnético durante varios días cerca de las células marcadas con SPIOs ya adheridas al frasco de cultivo, demuestra que las SPIOs intracelulares actúan como guías dirigiendo el sentido del crecimiento de la célula en el caso de los queratinocitos y, en el caso de los fibroblastos, aumentan la velocidad de migración en un medio tridimensional, sin verse afectada su viabilidad (Bradshaw et al. 2015). Todo ello corrobora las observaciones de nuestro trabajo, demostrando que

el movimiento de las SPIOs intracelulares dirigido con campos magnéticos respeta la ultraestructura celular.

5.5. Direccionamiento magnético de MSCs-SPIOs después del infarto cerebral.

En el presente estudio, trabajamos en un modelo animal de infarto cerebral para probar la influencia del campo magnético a la hora de llevar a cabo el direccionamiento de las MSCs-SPIOs. Así pues, encontramos un aumento de la densidad de las células alojadas en el tejido cerebral donde se había aplicado el campo magnético tras la administración IV de MSC-SPIOs, indicando que éste podía ayudar a la retención de las mismas dentro del parénquima cerebral. Sin embargo, al comparar los datos obtenidos entre los hemisferios donde se localizaban los infartos (sobre los que se aplicaba el campo magnético) y los hemisferios contralaterales, no encontramos una focalización del campo magnético de forma unilateral, sino un efecto global de dicha retención magnética en la totalidad del volumen cerebral. A pesar de haber utilizado un modelo animal de infarto cerebral sólidamente establecido en experimentación animal desde hace varias décadas (Longa et al. 1989), encontramos una variabilidad considerable entre los porcentajes del volumen de infarto con respecto al volumen cerebral total de los distintos animales, hecho que pensamos podría estar dificultando la interpretación de los resultados al haberse alterado la barrera hematoencefálica (BHE) de forma diferencial influyendo en la salida de las MSCs-SPIOs del torrente sanguíneo. En este sentido, observamos que al analizar los datos obtenidos sin y con la aplicación del campo magnético entre animales con volúmenes de infartos similares, el efecto del imán crecía exponencialmente conforme el volumen del infarto aumentaba, lo que sugería que la capacidad de retención del campo magnético podría estar directamente relacionada con el grado de afectación de la BHE. Sin embargo, somos conscientes de la gran limitación que supone el reducido número experimental de los individuos en nuestro estudio, por lo que para poder obtener conclusiones sólidas sería necesario aumentar el tamaño muestral y demostrar así la reproducibilidad de los datos obtenidos.

Existen varios estudios en animales de experimentación centrados en el direccionamiento magnético de MSCs marcadas con SPIOs, mostrando un mayor injerto de las células en las zonas de aplicación del campo magnético, como por ejemplo en articulaciones (Kobayashi et al. n.d.; Mahmoud et al. 2016) u otras partes del sistema musculoesquelético como el fibrocartilago (Qi et al. 2016), el músculo

Discusión

(Oshima et al. 2014) o el hueso (Kodama et al. 2012). Dichos estudios se limitan a la administración local de las células y a su retención en la región de interés para evitar su migración a órganos principales. También ha sido probada la eficacia del direccionamiento magnético en modelos animales de lesión en el SNC, como por ejemplo en el caso de la médula espinal mediante la administración intratecal de las células (Vanecek 2012; Tukmachev et al. 2015).

Sin embargo, el principal objetivo de nuestro estudio y punto clave en el que radica su dificultad, es el hecho de que las células administradas por vía IV puedan llegar al tejido cerebral atravesando diferentes órganos y, una vez en la circulación arterial, quedar retenidas en el tejido cerebral ayudadas por el campo magnético. Solo encontramos tres estudios precursores al nuestro que utilizan el direccionamiento de células marcadas con SPIOs aplicando un imán permanente en el tejido cerebral (W.-B. Shen et al. 2016; Carenza et al. 2013; Q. Li et al. 2013). El primero de ellos (Carenza et al. 2013), lleva a cabo el marcaje de células progenitoras endoteliales (EPCs) con SPIOs y, después de la implantación de dos imanes permanentes que ejercen 600mT sobre el cráneo de uno de los hemisferios cerebrales del animal, se administra las EPCs-SPIOs vía IV en animales sanos. Al analizar el tejido cerebral, encuentran parte de las células concentradas en la capa más superficial de la corteza cerebral, en la zona adyacente al cráneo sobre la que se sitúa el imán implantado. La principal diferencia que encontramos con nuestro estudio consiste en el sistema magnético utilizado: en su caso llevan a cabo la implantación del imán permanente pegando el mismo sobre la cabeza del animal y el campo magnético ejercido resulta el doble de potente (600 mT frente a los 350 mT aplicados en el nuestro), además de utilizar un tiempo de aplicación mucho más prolongado (24 horas en su caso frente a los 30 minutos de aplicación en el nuestro). Si bien consiguen la focalización de las células en el hemisferio cerebral sobre el cual tiene lugar la aplicación del campo magnético, pensamos que la fuerza magnética ejercida sobre las células podría resultar demasiado potente o el tiempo de exposición demasiado largo, puesto que las células encontradas se sitúan en capas muy superficiales de la corteza cerebral prácticamente en contacto con el cráneo. En nuestro estudio no encontramos una focalización unilateral de las células, pero sí un efecto global del campo magnético con una tendencia al aumento de la densidad de MSCs-SPIOs distribuidas libremente por el parénquima, incluyendo regiones profundas del cerebro y ocupando todo el espesor del córtex, sin limitarse a las capas más superficiales.

En el segundo de los estudios (W.-B. Shen et al. 2016), utilizan la aplicación de un imán permanente para el direccionamiento de células madre neurales (NSCs)

marcadas con SPIOs en un modelo de daño cerebral traumático (TBI), aunque utilizando en este caso la vía IA. En su caso, también encuentran gran parte de las células concentradas en la zona de aplicación del campo magnético, coincidiendo con la zona de la lesión, sin embargo existen tres factores importantes que difieren de nuestro estudio que pensamos pueden resultar problemáticos a la hora de su traslación al ámbito clínico. En primer lugar, el tipo de células madre utilizado. El principal problema de utilizar NSCs reside en la invasividad para su obtención, ya que para ello es necesario acceder a las paredes de los ventrículos laterales del cerebro y por tanto la necesidad de una delicada cirugía en caso de pretenderse el trasplante autólogo. En segundo lugar el hecho de llevar a cabo la administración mediante una inyección intra-carotídea. En lo que respecta a la vía intraarterial, a pesar de que con ésta se evite la circulación pulmonar y así pueda resultar más fácil que lleguen las células de forma directa al tejido cerebral, como hemos comentado previamente, esta vía de administración presenta un elevado riesgo de que se produzca tromboembolismo y que puedan generarse microinfartos a nivel cerebral (Argibay et al. 2017). Es además una vía que requiere de cirugía cervical abierta (en el modelo de rata), lo que supone un mayor riesgo peri- y postoperatorio para el animal. En humanos la administración intracarotídea podría ser mediante el cateterismo intraarterial. En este caso, la vía IA también supondría un riesgo aumentado de isquemia y a su vez, un aumento del coste de la intervención en caso de evitar la cirugía carotídea y realizar una cateterización endovascular. Por último, la aplicación del campo magnético se consigue mediante la implantación quirúrgica de un imán permanente que ejerce 660 mT sobre la zona del cráneo del animal adyacente a la lesión provocada durante 5 días de forma continuada. En este caso, coincide que la zona de la lesión se sitúa en la zona más superficial de la corteza cerebral y, aplicando un campo magnético similar al del estudio de Carenza et al. (Carenza et al. 2013), las células se sitúan en torno a la región más cercana a la aplicación del campo magnético, prácticamente en las meninges cerebrales. Sin embargo, en el caso del ictus, suelen verse afectadas zonas más profundas de la corteza cerebral y regiones situadas en la base del encéfalo, por lo que la intensidad del campo magnético utilizada en ambos casos resultaría demasiado potente para el direccionamiento de las células dentro de la región cerebral isquemizada.

El estudio llevado a cabo por Li y colaboradores (Q. Li et al. 2013) sería el que más se asimila al nuestro, puesto que estudia el direccionamiento magnético de células progenitoras endoteliales (EPCs) marcadas con SPIOs consiguiendo aumentar el número de éstas en el hemisferio de la lesión, utilizando el mismo modelo animal de

Discusión

infarto cerebral que en nuestro caso: el modelo de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAo). En su estudio utilizan un imán permanente de aproximadamente 2,5 cm de diámetro generando un campo magnético de 300 mT justo en la superficie del cráneo sobre el hemisferio infartado. Sin embargo, el tiempo de exposición al campo magnético es 4 veces mayor al nuestro (120 minutos), factor que puede haber condicionado positivamente en su estudio el destino final de las células. En nuestro caso, generamos un campo magnético considerable (alrededor de 350 mT) con unos imanes permanentes de mayor tamaño (aproximadamente 8 cm²), pero al pretender focalizar dicha fuerza en un volumen reducido del tejido cerebral lo combinamos con un imán cilíndrico de menos de 1cm de diámetro, siendo éste el que se encuentra en contacto con la cabeza del animal. Los mapas de colores obtenidos en nuestro estudio mostraron cierta focalización dentro del volumen cerebral gracias a dicha combinación, no obstante, es un hecho que la fuerza magnética de los imanes permanentes disminuye exponencialmente con la distancia (Tukmachev et al. 2015) y, pequeñas variaciones en la posición del animal o la colocación del casco pueden haber provocado que se pierda gran parte del efecto de retención. Además, independientemente de que exista una focalización del campo magnético en la base del imán cilíndrico del casco, puede que la fuerza magnética generada por toda la superficie de las placas de imán voluminosas esté generando un campo magnético mayor, provocando así el efecto en la totalidad del tejido cerebral e influyendo negativamente sobre el propósito de focalización. En este último estudio, la infusión intravenosa se lleva a cabo 90 minutos después de la reperusión, frente a los 30 minutos esperados en nuestro caso. Para el tMCSO se ha establecido una ventana de oportunidad comprendida en las primeras 3 horas desde el momento inicial de la isquemia. Así pues, tanto el en el estudio de Li y cols. como en el nuestro, se lleva a cabo la administración de las células dentro de este intervalo de tiempo. Sin embargo puede que en su caso, el hecho de esperar un intervalo de tiempo más dilatado contribuya a una mayor afectación de la BHE, facilitando así en cierto modo la extravasación pasiva de las células administradas en el tejido cerebral que a su vez, ayudadas por el campo magnético aplicado influya en el resultado final obtenido. Por un lado, el tejido recuperable resulta menor cuanto más tarde tenga lugar la intervención, pero una ventaja en la traslación al ámbito clínico es el hecho de que resulte más fácil que un paciente llegue al hospital 90 minutos después de inicio de la isquemia en comparación al transcurso de únicamente 30 minutos. Una limitación que consideramos importante en este estudio, es el hecho de que lleven a cabo la detección de las células únicamente mediante la visualización fluorescente de la proteína GFP con la que las células han sido transfectadas previamente y, además,

realicen el recuento de células GFP+ en imágenes panorámicas (10X), sin contrastar este marcaje fluorescente con ninguna otra técnica como podrían ser la tinción de Perls o el análisis ultraestructural mediante MET, ambas utilizadas en nuestro estudio.

Analizando dichos estudios en conjunto con el nuestro, podemos llegar a la conclusión de que sí es posible la retención de células marcadas con SPIOs en el tejido cerebral mediante la aplicación de un campo magnético, quedando el rango óptimo de la potencia magnética aplicada entre 300-600 mT. Sin embargo, todavía son necesarios estudios adicionales para poder determinar el sistema óptimo para la aplicación del campo magnético (tamaño de los imanes, forma de los mismos, zona de aplicación, distancia con respecto a la cabeza del animal) dependiendo de la región final dentro del tejido cerebral que se pretenda alcanzar, y poder valorar así, si un aumento de las células que lleguen a la zona de lesión después de su administración intravenosa, puede potenciar los efectos beneficiosos encontrados en estudios previos.

5.6. Viabilidad e injerto de las MSCs-SPIOs en el tejido cerebral después de su infusión intravenosa.

Puesto que existe cierta controversia acerca de la situación inmunológica privilegiada de las MSCs y su supervivencia en el organismo receptor (revisado por (Ankrum et al. 2014)), en nuestro estudio quisimos estudiar la ultraestructura de las MSCs-SPIOs alojadas en el tejido cerebral un día después de su infusión intravenosa.

A pesar de existir trabajos en modelos animales que utilizan la administración intravenosa de las MSCs con el tejido cerebral como órgano diana, la mayoría de ellos se limitan a su detección mediante técnicas inmunohistoquímicas de fluorescencia (Gutiérrez-Fernández et al. 2015; J. Chen et al. 2003; Q. Li et al. 2013) o mediante la tinción de Perls en el caso de haber sido marcadas previamente con SPIOs (Carenza et al. 2013; W.-B. Shen et al. 2016; Byun et al. 2013; Jendelova et al. 2004). Así pues, solo encontramos uno de ellos que lleva a cabo el estudio morfológico de las células en el tejido cerebral mediante MET (Argibay et al. 2017).

En nuestro caso, tras el análisis ultraestructural de las MSCs-SPIOs alojadas en el tejido cerebral 24 horas después de su administración, pudimos observar que la viabilidad celular había quedado comprometida de una forma evidente. Las MSCs-SPIOs de los animales correspondientes a los dos grupos experimentales del estudio (sin y con aplicación del imán durante la infusión), compartían las mismas

Discusión

características y por tanto el estado de afectación. Prácticamente la totalidad de las células analizadas se encontraban envueltas por el citoplasma de células de microglía conteniendo SPIOs en su interior, hecho que confirmaba procesos de fagocitosis por parte de las mismas. Además, también fue frecuente encontrar células astrogliales asociadas a los complejos MSCs-microglía, lo que indicaba una activación de los mecanismos de limpieza y eliminación en el microambiente donde se encontraban las células. Consideramos que el daño producido en las células podía deberse al paso de éstas a través de los distintos órganos hasta llegar al cerebro, puesto que el análisis ultraestructural de las MSCs-SPIOs inyectadas en el estriado de los animales no mostraba dicho estado de afectación, incluso siendo analizadas 72 horas después del trasplante.

En el estudio realizado por Argibay y colaboradores (Argibay et al. 2017), llevan a cabo la administración tanto IA como IV de MSCs-SPIOs en animales sanos, sin embargo, después de la infusión endovenosa no detectan células que hayan conseguido llegar al parénquima cerebral, por lo que el análisis finalmente lo llevan a cabo en células inyectadas vía intracarotídea. En su caso, 4 horas después de la infusión, las MSCs-SPIOs mostraban un aspecto algo más conservado que en nuestro estudio, apreciándose algunos orgánulos celulares y la envoltura nuclear en alguna de las células. No obstante, su ultraestructura difería considerablemente de la de una célula que fuera a mantener su viabilidad. Al tratarse de células que han viajado directamente al tejido cerebral sin tener que atravesar otros órganos, se entiende que estas células mantuvieran en mayor grado su morfología original. Además, una diferencia importante del estudio de Argibay et al. (Argibay et al. 2017) resulta el hecho de que las células se analicen solo 4 horas después de su infusión, frente a las 24 horas que esperamos en nuestro estudio, por lo que el mejor grado de conservación puede deberse al hecho de que no se hayan hecho evidentes aún los fenómenos de necrosis o apoptosis iniciados después de su tránsito por el torrente sanguíneo.

Por otra parte, mediante la detección de las MSCs-SPIOs con la tinción de Perls en el MO, y su co-localización inmunohistoquímica de fluorescencia con Iba-1, confirmamos que las células que envolvían a las MSCs-SPIOs eran macrófagos o células de microglía activadas y además, con la expresión de la GFAP confirmamos que los astrocitos las acompañaban de forma frecuente. Un dato interesante fue el hecho de no detectar en ningún caso el núcleo de las MSCs-SPIOs, marcado con un marcaje nuclear fluorescente (DAPI). Un estudio con administración de MSCs por vía endovascular encuentra co-localización de las MSCs con marcadores del sistema inmune como CD11b (Gutiérrez-Fernández et al. 2011), concordando con los

hallazgos de nuestro estudio. Está bien documentado que 24 horas después del infarto cerebral, en la zona isquémica ya se han activado tanto las células de microglía como las células que forman parte de los mecanismos de gliosis y degradación como los astrocitos (Campanella et al. 2002; Barreto et al. 2011). Además, en el caso de la microglía se ha demostrado que la población aumenta en el hemisferio ipsilateral al infarto, pero se mantiene en un nivel basal en el hemisferio contralateral (Morrison & Filosa 2013). Sin embargo, en nuestro caso hemos observado el acompañamiento de las MSCs-SPIOs por parte de células microgliales y astrogiales en ambos hemisferios cerebrales, sin restringirse este hecho a la zona afectada por la isquemia. Esto podría indicar por una parte, que las células podrían ser reconocidas por el sistema inmune y estar dándose algún tipo de rechazo de las células trasplantadas por parte del organismo receptor; o bien, que la administración IV y el paso de las células marcadas con SPIOs a través de los diferentes órganos comprometería la estructura celular de tal forma que su deterioro una vez en el tejido cerebral, active tanto la microglía como los astrocitos para su degradación y limpieza.

Aunque existen estudios que afirman el estado “inmunoprivilegiado” de las MSCs que les conferiría una protección frente al rechazo tras la administración alogénica de las MSCs (Javazon et al. 2004; Gutiérrez-Fernández et al. 2015), teniendo en cuenta los resultados de nuestro estudio es una posibilidad que no podemos descartar. La mayoría de los estudios *in vitro* han puesto de manifiesto las propiedades inmunosupresoras de las MSCs incluso existen estudios que han proporcionado evidencias de que las MSCs de individuos no compatibles son inmunógenas. Por ejemplo, mientras que las MSCs expandidas en cultivo expresan niveles bajos del MHC tipo I y son negativas para el MHC de tipo II, las MSC expuestas a IFN- γ o diferenciadas pueden expresar en un grado significativamente mayor MHC de tipo I y sí presentar MHC de tipo II (Le Blanc et al. 2003). Sin embargo, uno de los primeros informes relacionados con el rechazo de las MSCs alogénicas Eliopoulos y cols. (Eliopoulos 2005), en el que examinan la persistencia de MSCs en huéspedes alogénicos no compatibles, reflejando la desaparición de las células un tiempo después y una infiltración significativa de linfocitos T CD8+ y de células *natural killer* en la zona del trasplante. De la misma forma, estudios previos al nuestro llevados a cabo en modelos animales de ictus, encuentran que después del trasplante intracerebral de las MSCs, se produce un aumento del número de las mismas en la zona de la lesión (aproximadamente dos semanas después de su administración) seguido de un descenso progresivo, hasta no detectar células en el tejido lesionado (Jendelova et al. 2004; Mora-Lee et al. 2012). En estos estudios no se utiliza la

Discusión

administración intravenosa de las células, por lo que en su caso podríamos descartar que se trate de una muerte celular provocada por el tránsito a través de los órganos. Por otra parte, puesto que en ambos casos llevan a cabo el trasplante heterólogo de las células, y a pesar de que en el caso de Mora-Lee y cols. (Mora-Lee et al. 2012) utilicen la inmunosupresión de los animales, sus resultados en consonancia con los nuestros y los estudios relacionados con la inmunogenicidad de las MSCs, cabe la posibilidad de plantear el hecho de que sí exista un reconocimiento de las MSCs infundidas por parte del sistema inmune, acompañado de procesos de fagocitosis y degradación celular.

No obstante, revisando la literatura podemos afirmar que la capacidad inmunomoduladora de las MSCs en terapia celular ha sido demostrada de forma sólida por numerosos estudios, independientemente del posible compromiso derivado de su vía de administración o del tipo de huésped receptor. Así pues, en lo que respecta a los efectos observados después de la infusión intravenosa de las células para el tratamiento del infarto cerebral, existen numerosos estudios en modelos animales demuestran el incremento de procesos implicados en la reparación cerebral, como la angiogénesis o la sinaptogénesis entre otros, después de la infusión IV de MSCs (Otero-Ortega et al. 2015; Gutiérrez-Fernández et al. 2013; Q. Li et al. 2013). Además, en estos estudios se ha apreciado de forma reiterada una mejoría en lo que respecta a la rehabilitación funcional, a pesar de no encontrarse células injertadas en la zona de la lesión (J. Chen et al. 2001; Iihoshi et al. 2004; Rempe & Kent 2002). De forma acorde a estos estudios, dicha mejoría en la neurorehabilitación también ha sido detectada en la práctica clínica después de la administración IV de MSCs en pacientes después de haber sufrido un evento isquémico (J. S. Lee et al. 2010; Bhasin et al. 2012; Honmou et al. 2011; Bang, J. S. Lee, P. H. Lee & Lee 2005b). Numerosos estudios atribuyen el efecto terapéutico de las MSCs al llamado mecanismo “hit-and-run” mediado por la producción de exosomas o la secreción de factores tróficos e inmunomoduladores (Prockop 2013; Caplan & Correa 2011). Otros estudios consideran que el beneficio obtenido se debe a la reprogramación del sistema inmune por los cuerpos apoptóticos derivados de las MSCs en proceso de muerte (Voll et al. 1997).

Dicho esto y basándonos en la información obtenida en nuestro estudio, podemos sugerir que la función reparadora de las MSCs en el caso de la administración IV, es una consecuencia de la muerte de las mismas acompañada de la liberación de factores y citoquinas al espacio extracelular. Por este motivo, no supone una limitación en el éxito de la terapia con MSCs el hecho de que la vía

intravenosa comprometa seriamente la viabilidad de las células, o que exista la posibilidad de su reconocimiento por parte del huésped en el caso de trasplante alogénico. Así pues, consideramos que la optimización del sistema de direccionamiento magnético para conseguir un mayor número de células en la zona lesionada y, por consiguiente, un aumento de la liberación de mediadores bioquímicos contenidos en ellas, podría ser una estrategia con amplias posibilidades en el ámbito clínico.

Conclusiones

6. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. Las células madre mesenquimales (MSCs) de distintos orígenes marcadas con nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIOs) conservan sus propiedades biológicas originales durante su cultivo *in vitro*, incluyendo su morfología, su viabilidad, su capacidad de proliferación y su potencial de diferenciación hacia distintos linajes de origen mesodérmico.
2. Las SPIOs penetran en las MSCs a través de la membrana plasmática, localizándose dentro de lisosomas sin afectar a la integridad de los orgánulos citoplásmáticos, pudiéndose encontrar también partículas libres distribuidas por el citosol pero nunca en el núcleo celular.
3. Las MSCs son capaces de eliminar gran parte de las SPIOs contenidas en lisosomas después de su internalización, apreciándose una disminución considerable de los mismos después de 7 días de cultivo *in vitro* sin encontrarse cambios en la organización celular.
4. Las MSCs marcadas con SPIOs (MSCs-SPIOs) sometidas a una intensidad de 100 mT son atraídas por el campo magnético preservando su morfología, su viabilidad y su capacidad proliferativa después de la migración magnética *in vitro*.
5. Las MSCs-SPIOs inyectadas por vía intravenosa en un modelo animal de ictus alcanzan el parénquima cerebral, existiendo una tendencia al aumento de la retención de éstas en el órgano diana mediante la aplicación de un campo magnético de entre 300-350 mT. Además, este efecto resulta proporcional al volumen de lesión isquémica establecida.
6. Las MSCs-SPIOs inyectadas por vía intravenosa en un modelo animal de ictus se sitúan en su mayoría asociadas a grandes vasos sanguíneos de la corteza cerebral, independientemente del hemisferio isquemizado o de la aplicación de un campo magnético.
7. La tinción de Perls permite la localización mediante microscopía óptica de las MSCs-SPIOs en el tejido cerebral después de su infusión intravenosa y, a su vez, facilita el estudio correlativo de las mismas células mediante microscopía electrónica de transmisión y técnicas inmunohistoquímicas.

Conclusiones

8. La morfología de las MSCs-SPIOs que alcanzan el parénquima cerebral se encuentra gravemente comprometida 24 horas después de su administración intravenosa, asociándose a ellas actividad inflamatoria endógena consistente en células de microglía que han iniciado procesos de fagocitosis.

9. Las MSCs-SPIOs inyectadas vía intracerebral, conservan en mayor grado y durante un periodo más prolongado su morfología y su viabilidad celular en comparación con las células administradas por vía intravenosa.

Bibliografía

7. Bibliografía

- Abe, K. et al., 2012. Stem cell therapy for cerebral ischemia: from basic science to clinical applications. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(7), pp.1317–1331.
- Acosta, S.A. et al., 2015. Intravenous Bone Marrow Stem Cell Grafts Preferentially Migrate to Spleen and Abrogate Chronic Inflammation in Stroke. *Stroke*, 46(9), pp.2616–2627.
- Alonso de Leciñana, M. et al., 2001. Cerebral ischemia: from animal studies to clinical practice. Should the methods be reviewed? *Cerebrovascular Diseases*, 11 Suppl 1, pp.20–30.
- Alonso de Leciñana, M. et al., 2006. Effect of combined therapy with thrombolysis and citicoline in a rat model of embolic stroke. *Journal of the Neurological Sciences*, 247(2), pp.121–129.
- Altman, J., 1962. Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals? *Science*, 135(3509), pp.1127–1128.
- Alvarez-Buylla, A., 1990. Mechanism of neurogenesis in adult avian brain. *Experientia*, 46(9), pp.948–955.
- Alvarez-Buylla, A. et al., 2008. The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 73, pp.357–365.
- Andersen, M. et al., 1999. Effects of Citicoline Combined With Thrombolytic Therapy in a Rat Embolic Stroke Model Editorial Comment. *Stroke*, 30(7), pp.1464–1471.
- Andres, R.H. et al., 2011. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. *Brain : a journal of neurology*, 134(Pt 6), pp.1777–1789.
- Ankrum, J.A., Ong, J.F. & Karp, J.M., 2014. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature biotechnology*, 32(3), pp.252–260.
- Arboix, A. et al., 2002. Ictus. Tipos etiológicos y criterios diagnósticos. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 17((suppl 3)), pp.3–12.
- Argibay, B. et al., 2017. Intraarterial route increases the risk of cerebral lesions after mesenchymal cell administration in animal model of ischemia. *Scientific Reports*, pp.1–17.
- Arthur, A. et al., 2008. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(7), pp.1787–1795.
- Arvidsson, A. et al., 2002. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature medicine*, 8(9), pp.963–970.
- Astrup, J., Siesjö, B.K. & Symon, L., 1981. Thresholds in Cerebral Ischemia- The ischemic Penumbra. *Stroke*, (12), pp.723–725.

Bibliografía

- Babič, M. et al., 2008. Poly(L-lysine)-Modified Iron Oxide Nanoparticles for Stem Cell Labeling. *Bioconjugate Chemistry*, 19(3), pp.740–750.
- Baddoo, M. et al., 2003. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *Journal of Cellular Biochemistry*, 89(6), pp.1235–1249.
- Bandera, E. et al., 2006. Cerebral blood flow threshold of ischemic penumbra and infarct core in acute ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*, 37(5), pp.1334–1339.
- Bang, O.Y., Lee, J.S., Lee, P.H. & Lee, G., 2005a. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Annals of Neurology*, 57(6), pp.874–882.
- Bang, O.Y., Lee, J.S., Lee, P.H. & Lee, G., 2005b. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Annals of Neurology*, 57(6), pp.874–882.
- Bao, X. et al., 2011. Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Brain research*, 1367, pp.103–113.
- Barahuie, F. et al., 2017. Sustained release of anticancer agent phytic acid from its chitosan-coated magnetic nanoparticles for drug-delivery system. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, pp.2361–2372.
- Barile, L. et al., 2007. Cardiac stem cells: isolation, expansion and experimental use for myocardial regeneration. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine*, 4 Suppl 1, pp.S9–S14.
- Baron, J.C., 1999. Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment. *Cerebrovascular Diseases*, 9(4), pp.193–201.
- Barreto, G. et al., 2011. Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*, 11(2), pp.164–173.
- Barrow, M. et al., 2015. Chem Soc Rev. *Chemical Society reviews*, 44, pp.6733–6748.
- Bernardo, M.E. & Fibbe, W.E., 2013. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Stem Cell*, 13(4), pp.392–402.
- Bernesev, A., 2016. Cell Trials- Current trends in cell therapy. *celltrials.info*. Available at: <http://celltrials.info/2016/10/14/presentation-cell-therapy-definitions-classifications/> [Accessed October 14, 2016].
- Bhasin, A. et al., 2013. Stem cell therapy: a clinical trial of stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 115(7), pp.1003–1008.
- Bhasin, A. et al., 2012. Stem cell therapy: A clinical trial of stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, pp.1–6.
- Bibel, M. & Barde, Y.A., 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & development*, 14(23), pp.2919–2937.
- Blum, B. & Benvenisty, N., 2008. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Advances in cancer research*, 100, pp.133–158.

- Bradshaw, M. et al., 2015. Manipulating directional cell motility using intracellular superparamagnetic nanoparticles. *Nanoscale*, 7(11), pp.4884–4889.
- Brea, A. et al., 2013. Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en España. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 25(5), pp.211–217.
- Brines, M.L. et al., 2000. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *PNAS*, 97(19), pp.10526–10531.
- Bulte, J.W.M. et al., 2004. Preparation of magnetically labeled cells for cell tracking by magnetic resonance imaging. *Methods in enzymology*, 386, pp.275–299.
- Bunnell, B.A. et al., 2008. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation ☆. *Methods*, 45(2), pp.115–120.
- Byun, J.S. et al., 2013. Engraftment of Human Mesenchymal Stem Cells in a Rat Photothrombotic Cerebral Infarction Model : Comparison of Intra-Arterial and Intravenous Infusion Using MRI and Histological Analysis. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 54(6), p.467.
- Campagnoli, C. et al., 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98(8), pp.2396–2402.
- Campanella, M. et al., 2002. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke*, 33(2), pp.586–592.
- Caplan, A.I. & Correa, D., 2011. The MSC: an injury drugstore. *Cell stem cell*, 9(1), pp.11–15.
- Carenza, E. et al., 2013. In vitro angiogenic performance and in vivo brain targeting of magnetized endothelial progenitor cells for neurorepair therapies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, pp.1–11.
- Chan, S.J. et al., 2017. “Endogenous regeneration: Engineering growth factors for stroke.” *Neurochemistry International*, pp.1–10.
- Chapel, A. et al., 2003. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *The journal of gene medicine*, 5(12), pp.1028–1038.
- Chen, J. et al., 1998. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience*, 18(13), pp.4914–4928.
- Chen, J. et al., 2003. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *Journal of neuroscience research*, 73(6), pp.778–786.
- Chen, J. et al., 2001. Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke*, 32(4), pp.1005–1011.
- Chen, J. et al., 2006. Vascular endothelial growth factor mediates atorvastatin-induced mammalian achaete-scute homologue-1 gene expression and neuronal

Bibliografía

- differentiation after stroke in retired breeder rats. *NSC*, 141(2), pp.737–744.
- Chen, S.-J. et al., 2010. Functional improvement of focal cerebral ischemia injury by subdural transplantation of induced pluripotent stem cells with fibrin glue. *Stem Cells and Development*, 19(11), pp.1757–1767.
- Choi, M.R. et al., 2010. Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters*, 472(2), pp.94–98.
- Christophe, B.R. et al., 2017. Current and future perspectives on the treatment of cerebral ischemia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(6), pp.573–580.
- Cianciaruso, C. et al., 2014. Cellular magnetic resonance with iron oxide nanoparticles: long-term persistence of SPIO signal in the CNS after transplanted cell death. *Nanomedicine*, 9(10), pp.1457–1474.
- Clark, A.D. et al., 2003. Isolation and therapeutic potential of human haemopoietic stem cells. *Cytotechnology*, 41(2-3), pp.111–131.
- Craig, C.G. et al., 1996. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *Journal of Neuroscience*, 16(8), pp.2649–2658.
- del Zoppo, G.J., 2009. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *NSC*, 158(3), pp.972–982.
- Diez-Tejedor, E. et al., 2001. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. *Rev Neurol*, 5, pp.455–464.
- Dirnagl, U., Becker, K. & Meisel, A., 2009. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *The Lancet. Neurology*, 8(4), pp.398–412.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 22(9), pp.391–397.
- Dirnagl, U., Simon, R.P. & Hallenbeck, J.M., 2003. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends in Neurosciences*, 26(5), pp.248–254.
- Díez-Tejedor, E. et al., 2014. Reparative therapy for acute ischemic stroke with allogeneic mesenchymal stem cells from adipose tissue: a safety assessment: a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, pilot clinical trial. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 23(10), pp.2694–2700.
- Dobkin, B.H. & Carmichael, S.T., 2015. The Specific Requirements of Neural Repair Trials for Stroke. *Neurorehabilitation and Neural Repair*.
- Doetsch, F. et al., 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), pp.703–716.
- Dominici, M. et al., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), pp.315–317.

- Duijvestein, M. et al., 2011. Pretreatment with interferon-gamma enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 29(10), pp.1549–1558.
- Eckert, M.A. et al., 2013. Evidence for high translational potential of mesenchymal stromal cell therapy to improve recovery from ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(9), pp.1322–1334.
- Edlund, T. & Jessell, T.M., 1999. Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell*, 96(2), pp.211–224.
- Eliopoulos, N., 2005. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood*, 106(13), pp.4057–4065.
- Emberson, J. et al., 2015. Thrombolysis in acute stroke--authors' reply. *Lancet (London, England)*, 385(9976), p.1396.
- Endres, M. et al., 1999. Neuroprotective effects of gelsolin during murine stroke. *Journal of Clinical Investigation*, 103(3), pp.347–354.
- Evans, M.J. & Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), pp.154–156.
- Figeac, N. et al., 2007. Muscle stem cells and model systems for their investigation. *Developmental Dynamics*, 236(12), pp.3332–3342.
- Figueroa, F.E. et al., 2012. Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biological research*, 45(3), pp.269–277.
- Firulli, A.B. & Olson, E.N., 1997. Modular regulation of muscle gene transcription: a mechanism for muscle cell diversity. *Trends in Genetics*, 13(9), pp.364–369.
- Fisher, M. et al., 2009. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke*, 40(6), pp.2244–2250.
- Fraser, J.K. et al., 2008. Adipose-derived stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 449, pp.59–67.
- Friedenstein, A.J. et al., 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental Hematology*, 2(2), pp.83–92.
- Fuchs, E. & Segre, J.A., 2000. Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 100(1), pp.143–155.
- Fuentes, B. et al., 2012. NEUROLOGÍA. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, pp.1–15.
- Furukawa, K. et al., 1997. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 17(21), pp.8178–8186.
- Galluzzi, L., Blomgren, K. & Kroemer, G., 2009. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(7), pp.481–494.
- Gandolfo, C., Sandercock, P.A. & Conti, M., 2002. Lubeluzole for acute ischaemic

Bibliografía

- stroke. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1).
- Gao, Z. et al., 2012. Mesenchymal stem cells: a potential targeted-delivery vehicle for anti-cancer drug, loaded nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, pp.1–11.
- Garcia, J.H., Liu, K.F. & Ho, K.L., 1995. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke*, 26(4), pp.636–42– discussion 643.
- Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A., 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(3), pp.629–634.
- Gimble, J.M., Katz, A.J. & Bunnell, B.A., 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research*, 100(9), pp.1249–1260.
- Giuliani, M. et al., 2014. TLR ligands stimulation protects MSC from NK killing. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 32(1), pp.290–300.
- Grieve, S.M. et al., 2010. Microvascular obstruction by intracoronary delivery of mesenchymal stem cells and quantification of resulting myocardial infarction by cardiac magnetic resonance. *Circulation. Heart failure*, 3(3), pp.e5–6.
- Grotta, J., 2001. Combination Therapy Stroke Trial: recombinant tissue-type plasminogen activator with/without lubeluzole. *Cerebrovascular Diseases*, 12(3), pp.258–263.
- Grotta, J.C., 1999. Acute Stroke Therapy at the Millennium: Consummating the Marriage Between the Laboratory and Bedside : The Feinberg Lecture. *Stroke*, 30(8), pp.1722–1728.
- Gutiérrez, M. et al., 2009. Cerebral Protection, Brain Repair, Plasticity and Cell Therapy in Ischemic Stroke. *Cerebrovascular Diseases*, 27(1), pp.177–186.
- Gutiérrez-Fernández, M. et al., 2015. Comparison between xenogeneic and allogeneic adipose mesenchymal stem cells in the treatment of acute cerebral infarct: proof of concept in rats. *Journal of Translational Medicine*, 13(1), p.11.
- Gutiérrez-Fernández, M. et al., 2013. Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(1), p.11.
- Gutiérrez-Fernández, M. et al., 2011. FUNCTIONAL RECOVERY AFTER HEMATIC ADMINISTRATION OF ALLOGENIC MESENCHYMAL STEM CELLS IN ACUTE ISCHEMIC STROKE IN RATS. *Neuroscience*, 175(C), pp.394–405.
- Hacke, W. et al., 2004. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet (London, England)*, 363(9411), pp.768–774.
- Hacke, W. et al., 1998. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). *The Lancet*, 352(9136), pp.1245–1251.

- Hacke, W. et al., 1999. Thrombolysis in acute ischemic stroke: controlled trials and clinical experience. *Neurology*, 53(7 Suppl 4), pp.S3–14.
- Hilfiker, A. et al., 2011. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation? *Langenbeck's archives of surgery*, 396(4), pp.489–497.
- Hofmann, A. et al., 2009. Combined targeting of lentiviral vectors and positioning of transduced cells by magnetic nanoparticles. *PNAS*, 106(1), pp.44–49.
- Honmou, O. et al., 2011. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain : a journal of neurology*, 134(Pt 6), pp.1790–1807.
- Horita, Y. et al., 2006. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat. *Journal of neuroscience research*, 84(7), pp.1495–1504.
- Horn, J. et al., 2001. Very Early Nimodipine Use in Stroke (VENUS). pp.1–6.
- Huang, Z. et al., 2010. Biomaterials. *Biomaterials*, 31(8), pp.2130–2140.
- Iadecola, C. & Alexander, M., 2001. Cerebral ischemia and inflammation. *Current Opinion in Neurology*, 14(1), pp.89–94.
- Iihoshi, S. et al., 2004. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain research*, 1007(1-2), pp.1–9.
- Im, G.-I., Shin, Y.-W. & Lee, K.-B., 2005. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis and cartilage*, 13(10), pp.845–853.
- Jauch, E.C. et al., 2013. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 44(3), pp.870–947.
- Javazon, E.H., Beggs, K.J. & Flake, A.W., 2004. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Experimental Hematology*, 32(5), pp.414–425.
- Jendelova, P. et al., 2004. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *Journal of neuroscience research*, 76(2), pp.232–243.
- Jiang, Y. et al., 2013. Feasibility of delivering mesenchymal stem cells via catheter to the proximal end of the lesion artery in patients with stroke in the territory of the middle cerebral artery. *Cell Transplantation*, 22(12), pp.2291–2298.
- Ju, S. et al., 2006. In vitro labeling and MRI of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Magnetic Resonance Imaging*, 24(5), pp.611–617.
- Jung, S. et al., 2013. Factors that determine penumbral tissue loss in acute ischaemic stroke. *Brain : a journal of neurology*, 136(Pt 12), pp.3554–3560.
- Karaoz, E. et al., 2009. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone

Bibliografía

- marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and Cell Biology*, 132(5), pp.533–546.
- Kaslin, J., Ganz, J. & Brand, M., 2008. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363(1489), pp.101–122.
- Kawai, H. et al., 2010. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30(8), pp.1487–1493.
- Kawashima, N., 2012. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Archives of oral biology*, 57(11), pp.1439–1458.
- Kempermann, G., 2002. Neuronal stem cells and adult neurogenesis. *Ernst Schering Research Foundation workshop*, (35), pp.17–28.
- Khoshnam, S.E. et al., 2017. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. pp.1–20.
- Kidd, P.M., 2009. Integrated brain restoration after ischemic stroke--medical management, risk factors, nutrients, and other interventions for managing inflammation and enhancing brain plasticity. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*, 14(1), pp.14–35.
- Kim, S.J. et al., 2013. Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells preconditioned with early phase stroke serum: current evidence and study protocol for a randomized trial. *Trials*, 14, p.317.
- Kirino, T., Tsujita, Y. & Tamura, A., 1991. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 11(2), pp.299–307.
- Klassen, H. et al., 2004. Isolation of retinal progenitor cells from post-mortem human tissue and comparison with autologous brain progenitors. *Journal of neuroscience research*, 77(3), pp.334–343.
- Kleinschnitz, C., Fluri, F. & Schuhmann, M., 2015. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Design, Development and Therapy*, p.3445.
- Kobayashi, T. et al., A Novel Cell Delivery System Using Magnetically Labeled Mesenchymal Stem Cells and an External Magnetic Device for Clinical Cartilage Repair. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 24(1), pp.69–76.
- Kodama, A. et al., 2012. In vivo bioluminescence imaging of transplanted bone marrow mesenchymal stromal cells using a magnetic delivery system in a rat fracture model. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 94(7), pp.998–1006.
- Kondziolka, D. et al., 2005. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *Journal of Neurosurgery*, 103(1), pp.38–45.
- Kostura, L. et al., 2004. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR in Biomedicine*, 17(7), pp.513–517.

- Krabbe, C., Zimmer, J. & Meyer, M., 2005. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 113(11-12), pp.831–844.
- Kuhbier, J.W. et al., 2010. Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 123, pp.55–105.
- Kuhn, H.G. et al., 1997. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *Journal of Neuroscience*, 17(15), pp.5820–5829.
- Kunz, A., Dirnagl, U. & Mergenthaler, P., 2010. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 24(4), pp.495–509.
- Kyrtatos, P.G. et al., 2009. Magnetic tagging increases delivery of circulating progenitors in vascular injury. *JACC. Cardiovascular interventions*, 2(8), pp.794–802.
- Landázuri, N. et al., 2013. Magnetic Targeting of Human Mesenchymal Stem Cells with Internalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Small*, 9(23), pp.4017–4026.
- Lanotte, M., Allen, T.D. & Dexter, T.M., 1981. Histochemical and ultrastructural characteristics of a cell line from human bone-marrow stroma. *Journal of cell science*, 50, pp.281–297.
- Le Blanc, K. et al., 2003. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, 31(10), pp.890–896.
- Le Blanc, K. et al., 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet (London, England)*, 371(9624), pp.1579–1586.
- Lee, J.S. et al., 2010. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 28(6), pp.1099–1106.
- Leventhal, C. et al., 1999. Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Molecular and cellular neurosciences*, 13(6), pp.450–464.
- Li, Q. et al., 2013. Biomaterials. *Biomaterials*, 34(21), pp.4982–4992.
- Li, Y. et al., 2008. Comparative study of mesenchymal stem cells from C57BL/10 and mdx mice. *BMC Cell Biology*, 9(1), p.24.
- Liang, J. et al., 2017. Lipid-coated iron oxide nanoparticles for dual-modal imaging of hepatocellular carcinoma. *International Journal of Nanomedicine*, 12, pp.2033–2044.
- Liao, J.K., 2005. Clinical implications for statin pleiotropy. *Current opinion in lipidology*, 16(6), pp.624–629.

Bibliografía

- Lindvall, O. & Kokaia, Z., 2011. Stem cell research in stroke: how far from the clinic? *Stroke*, 42(8), pp.2369–2375.
- Liu, L. et al., 2013. From blood to the brain: can systemically transplanted mesenchymal stem cells cross the blood-brain barrier? *Stem Cells International*, 2013, p.435093.
- Llorens-Bobadilla, E. & Martin-Villalba, A., 2017. Adult NSC diversity and plasticity: the role of the niche. *Current opinion in neurobiology*, 42 IS -, pp.68–74.
- Lo, E.H., Dalkara, T. & Moskowitz, M.A., 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(5), pp.399–415.
- Lo, E.H., Moskowitz, M.A. & Jacobs, T.P., 2005. Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. *Stroke*, 36(2), pp.189–192.
- Locatelli, F. et al., 2009. Stem cell therapy in stroke. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(5), pp.757–772.
- Longa, E.Z. et al., 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20(1), pp.84–91.
- Lotfy, A. et al., 2014. Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from Rat Bone Marrow and Adipose Tissue: A Comparative Study. *International Journal of Stem Cells*, 7(2), pp.135–142.
- Louissaint, A.J. et al., 2002. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron*, 34(6), pp.945–960.
- Lowrance, S.A. et al., 2015. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate cognitive deficits in an endothelin-1 rat model of stroke. *Restorative neurology and neuroscience*, 33(4), pp.579–588.
- López-Castro, J.D. et al., 2011. From synthetic to natural nanoparticles: monitoring the biodegradation of SPIO (P904) into ferritin by electron microscopy. *Nanoscale*, 3(11), p.4597.
- Lutolf, M.P., Gilbert, P.M. & Blau, H.M., 2009. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature*, 462(7272), pp.433–441.
- Lyden, P. et al., 2002. Clomethiazole Acute Stroke Study in ischemic stroke (CLASS-I): final results. *Stroke*, 33(1), pp.122–128.
- Lyden, P. et al., 2001. The Clomethiazole Acute Stroke Study in tissue-type plasminogen activator-treated stroke (CLASS-T): final results. *Neurology*, 57(7), pp.1199–1205.
- Magnitsky, S. et al., 2017. Positive contrast from cells labeled with iron oxide nanoparticles: Quantitation of imaging data. *Magnetic Resonance in Medicine*.
- Mahmoud, E.E. et al., 2016. Cell Magnetic Targeting System for Repair of Severe Chronic Osteochondral Defect in a Rabbit Model. *Cell Transplantation*, 25(6), pp.1073–1083.
- Maia, L. et al., 2013. Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow.

- Microscopy Research and Technique*, 76(6), pp.618–624.
- Majno, G. & Joris, I., 1995. Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *American Journal of Pathology*, 146(1), pp.13–15.
- Makino, S. et al., 1999. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 103(5), pp.697–705.
- Manea, C.M. et al., 2014. Ultrastructural features of human adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, 55(4), pp.1363–1369.
- Mantovani, C. et al., 2012. Morphological, molecular and functional differences of adult bone marrow- and adipose-derived stem cells isolated from rats of different ages. *Experimental cell research*, 318(16), pp.2034–2048.
- Marler, J.R. et al., 2000. Early stroke treatment associated with better outcome: the NINDS rt-PA stroke study. *Neurology*, 55(11), pp.1649–1655.
- Marshall, V.S., Waknitz, M.A. & Thomson, J.A., 2001. Isolation and maintenance of primate embryonic stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 158, pp.11–18.
- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS*, 78(12), pp.7634–7638.
- Matias-Guiu, J. et al., 2009. Estrategia en Ictus del Sistema Nacional de Salud. *Ministerio de Sanidad y Política Social*, pp.1–163.
- Matsushima, K. & Hakim, A.M., 1995. Transient forebrain ischemia protects against subsequent focal cerebral ischemia without changing cerebral perfusion. *Stroke*, 26(6), pp.1047–1052.
- Meden, P. et al., 1993. Enhancing the efficacy of thrombolysis by AMPA receptor blockade with NBQX in a rat embolic stroke model. *Journal of the Neurological Sciences*, 119(2), pp.209–216.
- Meirelles, L.D.S. et al., 2009. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(5-6), pp.419–427.
- Mergenthaler, P. & Dirnagl, U., 2011. Protective conditioning of the brain: expressway or roadblock? *The Journal of Physiology*, 589(17), pp.4147–4155.
- Mergenthaler, P., Dirnagl, U. & Kunz, A., 2016. Ischemic Stroke: Basic Pathophysiology and Clinical Implication. In New York, NY: Springer New York, pp. 3385–3405.
- Metcalfe, A.D. & Ferguson, M.W.J., 2008. Skin stem and progenitor cells: using regeneration as a tissue-engineering strategy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(1), pp.24–32.
- Miko, M. et al., 2015. Ultrastructural analysis of different human mesenchymal stem cells after in vitro expansion: a technical review. *European Journal of*

Bibliografía

Histochemistry, 59(4).

- Miller, R.H. et al., 2010. The potential of mesenchymal stem cells for neural repair. *Discovery medicine*, 9(46), pp.236–242.
- Mohr, J.P. et al., 1994. Meta-Analysis of Oral Nimodipine Trials in Acute Ischemic Stroke. *Cerebrovascular Diseases*, 4(3), pp.197–203.
- Moisan, A. et al., 2012. Intracerebral injection of human mesenchymal stem cells impacts cerebral microvasculature after experimental stroke: MRI study. *NMR in Biomedicine*, 25(12), pp.1340–1348.
- Mora-Lee, S. et al., 2011. Histological and ultrastructural comparison of cauterization and thrombosis stroke models in immune-deficient mice. *Journal of Inflammation*, 8(1), p.28.
- Mora-Lee, S. et al., 2012. Therapeutic Effects of hMAPC and hMSC Transplantation after Stroke in Mice. B. Nait-Oumesmar, ed. *PLoS ONE*, 7(8), p.e43683.
- Morrison, H.W. & Filosa, J.A., 2013. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *Journal of Neuroinflammation*, 10, p.4.
- Muir, K.W. & Lees, K.R., 2003. Excitatory amino acid antagonists for acute stroke. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3).
- Muir, K.W. et al., 2004. Magnesium for acute stroke (Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke trial): randomised controlled trial. *The Lancet*, 363(9407), pp.439–445.
- Murphy, T.H. et al., 2008. Two-Photon Imaging of Stroke Onset In Vivo Reveals That NMDA-Receptor Independent Ischemic Depolarization Is the Major Cause of Rapid Reversible Damage to Dendrites and Spines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(7), pp.1756–1772.
- Nakagawa, M. et al., 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*, 26(1), pp.101–106.
- Nedergaard, M. & Hansen, A.J., 1993. Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 13(4), pp.568–574.
- Nelson, P.T. et al., 2002. Clonal human (hNT) neuron grafts for stroke therapy: neuropathology in a patient 27 months after implantation. *The American journal of pathology*, 160(4), pp.1201–1206.
- Neri, M. et al., 2008. Efficient In Vitro Labeling of Human Neural Precursor Cells with Superparamagnetic Iron Oxide Particles: Relevance for In Vivo Cell Tracking. *Stem Cells*, 26(2), pp.505–516.
- Nombela-Arrieta, C., Ritz, J. & Silberstein, L.E., 2011. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(2), pp.126–131.
- Nomura, T. et al., 2005. I.V. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience*, 136(1), pp.161–169.

- Nudo, R.J., 2003. Functional and structural plasticity in motor cortex: implications for stroke recovery. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America*, 14(1 Suppl), pp.S57–76.
- Nudo, R.J., Plautz, E.J. & Frost, S.B., 2001. Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex. *Muscle & nerve*, 24(8), pp.1000–1019.
- Ock, S.-A. et al., 2016. Comparison of Immunomodulation Properties of Porcine Mesenchymal Stromal/Stem Cells Derived from the Bone Marrow, Adipose Tissue, and Dermal Skin Tissue. *Stem Cells International*, 2016(4), pp.1–15.
- Ogawa, A. et al., 1999. Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Cerebrovascular Diseases*, 9(2), pp.112–118.
- Ohab, J.J. et al., 2006. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(50), pp.13007–13016.
- Orkin, S.H., 1998. Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *The International journal of developmental biology*, 42(7), pp.927–934.
- Ortiz, L.A. et al., 2003. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *PNAS*, 100(14), pp.8407–8411.
- Oshima, S. et al., 2014. Enhancement of muscle repair using human mesenchymal stem cells with a magnetic targeting system in a subchronic muscle injury model. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association*, 19(3), pp.478–488.
- Oswald, J. et al., 2004. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 22(3), pp.377–384.
- Otero-Ortega, L. et al., 2015. White matter injury restoration after stem cell administration in subcortical ischemic stroke. *Stem Cell Research & Therapy*, 6, p.121.
- Ou, H. et al., 2016. Comparison of bone marrow tissue- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in the treatment of sepsis in a murine model of lipopolysaccharide-induced sepsis. *Molecular Medicine Reports*, 14(4), pp.3862–3870.
- Ozen, A. et al., 2013. Ultrastructural Characteristics of Sheep and Horse Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Microscopy Research*, 01(03), pp.17–23.
- Pan, Y. et al., 2012. Magnetic nanoparticles for the manipulation of proteins and cells. *Chemical Society reviews*, 41(7), pp.2912–2942.
- Paolucci, S. et al., 2000. Early versus delayed inpatient stroke rehabilitation: a matched comparison conducted in Italy. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 81(6), pp.695–700.
- Parent, J.M. et al., 2002. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Annals of Neurology*, 52(6), pp.802–813.

Bibliografía

- Pascucci, L. et al., 2010. Ultrastructural morphology of equine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Histology and histopathology*, 25(10), pp.1277–1285.
- Pasquinelli, G. et al., 2007. Ultrastructural Characteristics of Human Mesenchymal Stromal (Stem) Cells Derived from Bone Marrow and Term Placenta. *Ultrastructural Pathology*, 31(1), pp.23–31.
- Perez-Pinzon, M.A. et al., 1997. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 17(2), pp.175–182.
- Phinney, D.G. & Prockop, D.J., 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(11), pp.2896–2902.
- Phinney, D.G. et al., 1999. Plastic Adherent Stromal Cells From the Bone Marrow of Commonly Used Strains of Inbred Mice: Variations in Yield, Growth, and Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 72, pp.570–585.
- Pierini, M. et al., 2012. Efficient isolation and enrichment of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Cytotherapy*, pp.1–8.
- Pittenger, M.F., 1999. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411), pp.143–147.
- Plate, K.H., 1999. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 58(4), pp.313–320.
- Pollock, K. et al., 2006. A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Experimental neurology*, 199(1), pp.143–155.
- Ponten, U. et al., 1973. Optimal freezing conditions for cerebral metabolites in rats. *Journal of Neurochemistry*, 21(5), pp.1127–1138.
- Prass, K. et al., 2003. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke*, 34(8), pp.1981–1986.
- Prockop, D.J., 2013. Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 31(10), pp.2042–2046.
- Pulsinelli, W., 1992. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *The Lancet*, 339(8792), pp.533–536.
- Pulsinelli, W. et al., 1997. Ischemic Brain Injury and the Therapeutic Window. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 835(1), pp.187–193.
- Qi, Y. et al., 2016. Targeted transplantation of iron oxide-labeled, adipose-derived mesenchymal stem cells in promoting meniscus regeneration following a rabbit massive meniscal defect. *Experimental and therapeutic medicine*, 11(2), pp.458–466.
- Qiao, L.-Y. et al., 2014. A two-year follow-up study of cotransplantation with neural stem/progenitor cells and mesenchymal stromal cells in ischemic stroke patients. *Cell Transplantation*, 23 Suppl 1, pp.S65–72.

- Rasmusson, I. et al., 2003. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*, 76(8), pp.1208–1213.
- Rempe, D.A. & Kent, T.A., 2002. Using bone marrow stromal cells for treatment of stroke. *Neurology*, 59(4), pp.486–487.
- Reynolds, B.A. & Weiss, S., 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, 255(5052), pp.1707–1710.
- Ricci, S. et al., 2006. Piracetam for acute ischaemic stroke. *The Cochrane database of systematic reviews*, (2), p.CD000419.
- Ricci, S. et al., 2012. Piracetam for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9).
- Riegler, J. et al., 2013. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle targeting of MSCs in vascular injury. *Biomaterials*, 34(8), pp.1987–1994.
- Roman, A. et al., 2013. In Vitro Characterization of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Palatal Subepithelial Tissue Grafts. *Microscopy and Microanalysis*, 19(02), pp.370–380.
- Ryu, Y.-J. et al., 2013. Comparison of the Ultrastructural and Immunophenotypic Characteristics of Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stromal Cells and in Situ Cells in Wharton's Jelly. *Ultrastructural Pathology*, 37(3), pp.196–203.
- Schabitz, W.-R. et al., 2004. Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. *Stroke*, 35(4), pp.992–997.
- Schabitz, W.-R. et al., 2003. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 34(3), pp.745–751.
- Schneider, A. et al., 2005. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 115(8), pp.2083–2098.
- Selmani, Z. et al., 2008. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(1), pp.212–222.
- Sereghy, T., Overgaard, K. & Boysen, G., 1993. Neuroprotection by excitatory amino acid antagonist augments the benefit of thrombolysis in embolic stroke in rats. *Stroke*, 24(11), pp.1702–1708.
- Seri, B. et al., 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 21(18), pp.7153–7160.
- Shapiro, B., Dormer, K. & Rutel, I.B., 2010. A Two-Magnet System to Push Therapeutic Nanoparticles. *AIP conference proceedings*, 1311(1), pp.77–88.
- Shen, L.H., Li, Y. & Chopp, M., 2010. Astrocytic endogenous glial cell derived neurotrophic factor production is enhanced by bone marrow stromal cell

Bibliografía

- transplantation in the ischemic boundary zone after stroke in adult rats. *Glia*, 58(9), pp.1074–1081.
- Shen, W.-B. et al., 2016. Cell-Based Therapy in TBI: Magnetic Retention of Neural Stem Cells In Vivo. *Cell Transplantation*, 25(6), pp.1085–1099.
- Shin, D.H. et al., 2016. Comparison of MSC-Neurogenin1 administration modality in MCAO rat model. *Translational neuroscience*, 7(1), pp.164–172.
- Siesjo, B.K., 1992. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. *Journal of Neurosurgery*, 77(3), pp.337–354.
- Silva, L.H.A. et al., 2017. Magnetic targeting as a strategy to enhance therapeutic effects of mesenchymal stromal cells. pp.1–8.
- Skopalik, J. et al., 2014. Mesenchymal stromal cell labeling by new uncoated superparamagnetic maghemite nanoparticles in comparison with commercial Resovist – an initial in vitro study. *International Journal of Nanomedicine*, p.5355.
- Smith, A.G., 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual review of cell and developmental biology*, 17, pp.435–462.
- Snykers, S. et al., 2009. In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 27(3), pp.577–605.
- Soleimani, M. & Nadri, S., 2009. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nature Protocols*, 4(1), pp.102–106.
- Sreejit, P., Dilip, K.B. & Verma, R.S., 2012. Generation of mesenchymal stem cell lines from murine bone marrow. *Cell and tissue research*, 350(1), pp.55–68.
- Stagliano, N.E. et al., 1999. Focal ischemic preconditioning induces rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 19(7), pp.757–761.
- Stroemer, P. et al., 2009. The neural stem cell line CTX0E03 promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after experimental stroke in a dose-dependent fashion. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 23(9), pp.895–909.
- Strom, J.O. et al., 2013. Method parameters' impact on mortality and variability in rat stroke experiments: a meta-analysis. *BMC neuroscience*, 14, p.41.
- Struys, 2012. Magnetic resonance imaging of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *Cell Transplantation*.
- Struys, T. et al., 2011. Ultrastructural and Immunocytochemical Analysis of Multilineage Differentiated Human Dental Pulp- and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells Tissues Organs*, 193(6), pp.366–378.
- Sun, Y. et al., 2003. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Journal of Clinical Investigation*, 111(12), pp.1843–1851.
- Sung, J.H. et al., 2008. Isolation and Characterization of Mouse Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation Proceedings*, 40(8), pp.2649–2654.

- Taheri, S. et al., 2009. Spatiotemporal Correlations between Blood-Brain Barrier Permeability and Apparent Diffusion Coefficient in a Rat Model of Ischemic Stroke C. Kleinschnitz, ed. *PLoS ONE*, 4(8), p.e6597.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), pp.663–676.
- Takahashi, K. et al., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), pp.861–872.
- Tan, C. et al., 2014. Short-, middle- and long-term safety of superparamagnetic iron oxide-labeled allogeneic bone marrow stromal cell transplantation in rat model of lacunar infarction. *Neuropathology*, 35(3), pp.197–208.
- Teti, G. et al., 2011. Ultrastructural analysis of human bone marrow mesenchymal stem cells during in vitro osteogenesis and chondrogenesis. *Microscopy Research and Technique*, 75(5), pp.596–604.
- Tovar-y-Romo, L.B., Penagos-Puig, A. & Ramírez-Jarquín, J.O., 2015. Endogenous recovery after brain damage: molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate. *Journal of Neurochemistry*, 136(1), pp.13–27.
- Tsvigoulis, G. et al., 2017. Intravenous thrombolysis for ischemic stroke in the golden hour: propensity-matched analysis from the SITS-EAST registry. *Journal of neurology*, 264(5), pp.912–920.
- Tukmachev, D. et al., 2015. An effective strategy of magnetic stem cell delivery for spinal cord injury therapy. *Nanoscale*, 7(9), pp.3954–3958.
- Vanecek, V., Zablotskii, Forostyak, Růžička, Herynek, Babic, Jendelova, P., Kubinová, Dejneká & Sykova, E., 2012a. Highly efficient magnetic targeting of mesenchymal stem cells in spinal cord injury. *International Journal of Nanomedicine*, p.3719.
- Vanecek, V., Zablotskii, Forostyak, Růžička, Herynek, Babic, Jendelova, P., Kubinová, Dejneká & Sykova, E., 2012b. Highly efficient magnetic targeting of mesenchymal stem cells in spinal cord injury. *International Journal of Nanomedicine*, p.3719.
- Verma, A. & Stellacci, F., 2010. Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small*, 6(1), pp.12–21.
- Voll, R.E. et al., 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 390(6658), pp.350–351.
- Wahlgren, N.G. et al., 2000. The clomethiazole acute stroke study (CLASS): Safety results in 1,356 patients with acute hemispheric stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 9(4), pp.158–165.
- Wang, H.-H. et al., 2009. Durable Mesenchymal Stem Cell Labelling by Using Polyhedral Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chemistry - A European Journal*, 15(45), pp.12417–12425.
- Wang, L. et al., 2004. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*, 35(7), pp.1732–1737.

Bibliografía

- Wang, Q., Tang, X.N. & Yenari, M.A., 2007. The inflammatory response in stroke. *Journal of Neuroimmunology*, 184(1-2), pp.53–68.
- Wei, L. et al., 2001. Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke. *Stroke*, 32(9), pp.2179–2184.
- Weiss, J.H. et al., 1993. AMPA receptor activation potentiates zinc neurotoxicity. *Neuron*, 10(1), pp.43–49.
- Wieloch, T. & Nikolich, K., 2006. Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Current opinion in neurobiology*, 16(3), pp.258–264.
- World Health Organization, 2012. Global Health Estimates. Available at: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/
- Xie, M. et al., 2017. Comparison of Adipose-Derived and Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in a Murine Model of Crohn's Disease. *Digestive diseases and sciences*, 62(1), pp.115–123.
- Xiong, Y., Mahmood, A. & Chopp, M., 2010. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, 11(3), pp.298–308.
- Xu, C. et al., 2012. Tracking Mesenchymal Stem Cells with Iron Oxide Nanoparticle Loaded Poly(lactide-co-glycolide) Microparticles. *Nano Letters*, 12(8), pp.4131–4139.
- Xu, S. et al., 2010. An Improved Harvest and in Vitro Expansion Protocol for Murine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010(22), pp.1–10.
- Yagi, H. et al., 2010. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing. *Cell Transplantation*, 19(6), pp.667–679.
- Yamashita, T. et al., 2006. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(24), pp.6627–6636.
- Yamori, Y. et al., 1976. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke*, 7(1), pp.46–53.
- Yang, Y.-R., Wang, R.-Y. & Wang, P.S.-G., 2003. Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats. *Neuroscience letters*, 339(2), pp.91–94.
- Yi, J.-H. et al., 2007. Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. *Neurochemistry International*, 50(7-8), pp.1014–1027.
- Zhang, H., 2004. Iron oxide nanoparticles-poly-L-lysine complex. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*.
- Zhang, P. et al., 2009. Human neural stem cell transplantation attenuates apoptosis and improves neurological functions after cerebral ischemia in rats. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, 53(9), pp.1184–1191.

- Zhang, Z.G. et al., 2000. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *Journal of Clinical Investigation*, 106(7), pp.829–838.
- Zheng, W., Nowakowski, R.S. & Vaccarino, F.M., 2004. Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Dev Neurosci*, 26(2-4), pp.181–196.
- Zuk, P.A. et al., 2002. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells M. Raff, ed. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), pp.4279–4295.
- Zupanc, G.K., 2001. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain, behavior and evolution*, 58(5), pp.250–275.