

TERAPIA INTRALESIONAL CON CÉLULAS  
MADRE MESENQUIMALES ALÓGENICAS  
PARA LA PREVENCIÓN DE LAS SECUELAS  
MOTORAS Y SENSORIALES EN UN  
MODELO ANIMAL PEDIÁTRICO DE  
TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO  
GRAVE

Tesis Doctoral

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Ignacio Mastro Martínez



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**TERAPIA INTRALESIONAL CON CÉLULAS  
MADRE MESENQUIMALES ALÓGENICAS  
PARA LA PREVENCIÓN DE LAS SECUELAS  
MOTORAS Y SENSORIALES EN UN  
MODELO ANIMAL PEDIÁTRICO DE  
TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO  
GRAVE**

---

**Tesis Doctoral**

**01/09/2014**

**Ignacio Mastro Martínez**





Facultad de Medicina.  
Departamento de Pediatría.

**DRA. ANA SERRANO GONZÁLEZ, PROFESORA ASOCIADA DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA DE LA UAM, MÉDICO ADJUNTO DE CUIDADOS INTENSIVOS PEDIÁTRICOS DEL HOSPITAL INFANTIL UNIVERSITARIO NIÑO JESÚS DE MADRID**

**CERTIFICA:** Que Don Ignacio Mastro Martínez, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección un trabajo de investigación titulado "TERAPIA INTRALESIONAL CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ALÓGENICAS PARA LA PREVENCIÓN DE LAS SECUELAS MOTORAS Y SENSORIALES EN UN MODELO ANIMAL PEDIÁTRICO DE TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO GRAVE", para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Dicho trabajo reúne las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para ser sometido a lectura y discusión ante el Tribunal.

En Madrid, a 1 de Septiembre de 2014

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Serrano', enclosed within a simple oval-shaped line.

Fdo. Dra. Ana Serrano González





Facultad de Medicina.  
Departamento de Pediatría.

**DR. JUAN CASADO FLORES, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA DE LA UAM, JEFE DEL SERVICIO DE CUIDADOS INTENSIVOS PEDIÁTRICOS DEL HOSPITAL INFANTIL UNIVERSITARIO NIÑO JESÚS DE MADRID**

**C E R T I F I C A:** Que Don Ignacio Mastro Martínez, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección un trabajo de investigación titulado "TERAPIA INTRALESIONAL CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ALÓGENICAS PARA LA PREVENCIÓN DE LAS SECUELAS MOTORAS Y SENSORIALES EN UN MODELO ANIMAL PEDIÁTRICO DE TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO GRAVE", para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Dicho trabajo reúne las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para ser sometido a lectura y discusión ante el Tribunal.

En Madrid, a 1 de Septiembre de 2014

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Juan Casado Flores', written over a horizontal line.

Fdo. Dr. Juan Casado Flores



Este trabajo ha sido financiado con subvenciones concedidas por la Fundación Mutua Madrileña (VIII Convocatoria de Ayudas a la investigación, 2011) y la Fundación ACS.



## **Agradecimientos**

La realización de esta tesis doctoral, aunque presentada a título individual, es el resultado del trabajo desinteresado de mucha gente durante un plazo de aproximadamente tres años. A ellos va dedicada, por el enorme esfuerzo y paciencia. Su calidad humana solo viene superada por su rigor científico y la capacidad de enseñarnos tantas técnicas y conceptos desconocidos para nosotros al iniciar esta investigación.

En primer lugar a nuestros dos tutores, Juan Casado y Ana Serrano, por ofrecerme participar en este proyecto, junto con su entusiasmo y apoyo para completarlo.

A Esther Pérez, porque lo empezó ella a solas y me involucró cuando la parte más difícil (el comienzo) ya estaba hecha. Son incontables el número de veces que nos hemos reído, frustrado y animado el uno al otro mientras completábamos el proyecto, aunque sin duda ella es el auténtico espíritu que lo ha mantenido vivo.

A Manuel Ramírez Orellana, África González y en especial a Gustavo Melen, además del resto de personas del Laboratorio de Oncohematología y Terapia Celular del Hospital Niño Jesús. Han sabido explicarnos, corregirnos, volver a corregirnos y ayudarnos con todo lo relacionado con la manipulación de las células madre mesenquimales, demostrando grandes dosis de desinteresada paciencia.

A Fernando Casco y Nieves Lozano Carbonero, que nos han ayudado más allá de lo razonable con la anatomía patológica e inmunohistoquímica del trabajo. Ellos saben que gran parte del mérito se lo debemos a su esfuerzo y dedicación, incluso cuando ya no trabajaban en nuestro centro.

A María Gutiérrez Fernández y a todo el grupo del departamento de Neurología e Infarto cerebral, del Laboratorio de Investigación en Neurociencias y Enfermedades Cerebrovasculares, del área de neurociencia de IdiPAZ (Hospital La Paz, Madrid). Durante este tiempo nos han servido como referencia de calidad y nos han ayudado con el modelo experimental, animándonos a continuar y abriéndonos nuevos caminos.

A Carlota Largo Aramburu, veterinaria de IdiPAZ, Pedro, Pablo y todas las personas que trabajan en el Laboratorio de Microcirugía, por su ayuda con los animales de experimentación y por encontrarnos siempre un hueco para la realización de los experimentos.

Y por último a mi familia y en especial a Manuela. Gracias por saber sacarme siempre una sonrisa.



Resumen.....	1
1.- Introducción .....	7
1.1.- Importancia del TCE en pediatría.....	7
1.2.- Mecanismos de lesión en TCE.....	8
1.2.1.- Factores genéticos.....	9
1.2.2.- Factores sistémicos .....	9
1.2.3.- Factores locales .....	9
1.3.- Tratamiento del TCE en pediatría .....	14
1.3.1- Monitorización de PIC .....	17
1.3.2.- Tratamiento de la HTIC.....	18
1.4.- Nuevos tratamientos farmacológicos en el TCE .....	22
1.4.1.- Fármacos que actúan sobre un mecanismo patogénico .....	22
1.4.2.- Fármacos que actúan a varios niveles .....	25
1.5.- Terapia celular en patología cerebral.....	29
1.5.1.- Neurogénesis endógena .....	29
1.5.2.- Estrategias derivadas: aumento de la neurogénesis endógena.....	32
1.5.3.- Estrategias derivadas: trasplante celular.....	32
2.- Hipótesis y objetivos .....	47
2.1.- Hipótesis.....	47
2.2.- Objetivos.....	47
3.- Material y métodos.....	49
3.1.- Modelo animal de TCE.....	49
3.2.- Aislamiento de células madre mesenquimales de rata.....	51
3.3.- Identificación de células mesenquimales.....	52
3.4.- Injerto de células mesenquimales .....	54
3.5.- Evaluación neurológica.....	57
3.6.- Citometría de flujo .....	59
3.7.- Estudio anatomopatológico.....	59
a.- Hematosilina eosina .....	60
b.- Inmunohistoquímica GFP .....	61
c.- Inmunohistoquímica vimentina .....	61

d.- Inmunohistoquímica nestina .....	62
3.8.- Estimación del tamaño muestral .....	62
3.9.- Análisis estadístico .....	63
3.10.- Captura y procesamiento de imágenes .....	63
4.- Resultados .....	65
4.1.- Aislamiento de células madre mesenquimales.....	65
4.1.1.- Identificación mediante citometría de flujo .....	65
4.1.2.- Diferenciación morfológica.....	65
4.2.- Test funcionales .....	67
4.3.- Supervivencia y diferenciación de trasplante celular.....	70
4.3.1.- Citometría de flujo.....	70
4.3.2.- Evaluación histológica .....	74
5.- Discusión .....	83
5.1.- Elección de tipo celular.....	93
5.2.- Elección de ruta de administración.....	95
5.3.- Elección del modelo animal de TCE.....	101
5.4.- Tiempo y dosis de la infusión de MSC.....	103
5.5.- Influencia del protocolo de obtención y procesamiento celular .....	104
5.6.- Posibilidad de terapia celular en humanos.....	106
5.7.- Efectos secundarios de la terapia celular con MSC.....	110
5.8.- Consideraciones en el tratamiento de TCE en niños.....	112
6.- Conclusiones.....	115
7.- Índice de figuras y tablas.....	117
Ilustraciones.....	117
Tablas .....	118
8.- Bibliografía.....	119





## Glosario de términos

**Aa:** Aminoácidos

**AAP:** Academia Americana de Pediatría (*American Academy of Pediatrics*)

**Acp-4:** Acuoporina tipo 4

**APC:** Alofocianina

**APO-E4:** Isoforma 4 de la apoproteína E

**ATP:** Adenosín trifofato

**BBZ:** Bis benzamida

**BDNF:** factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain-derived neurotrophic factor*)

**bFGF:** Factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos (*Basic fibroblast growth factor*)

**BHE:** Barrera hematoencefálica

**BrDU:** 5-bromo-2-deoxyuridina

**Ca<sup>2+</sup>:** Calcio

**CaO<sub>2</sub>:** Contenido de oxígeno en la sangre

**CMDMO:** Células mononucleares derivadas de la médula ósea

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**CPN:** Células progenitoras/madre neuronales

**CPNa:** CPN derivadas del adulto

**CPNh:** CPN humanas

**CUH:** Canal de unión de hendidura

**CXCR4:** receptor 4 de citocina CXC (*CXC-chemokine receptor-4*)

**DCT:** Daño cerebral traumático

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSA:** dimetil-sulfóxido

**EGF:** Factor de crecimiento derivado del endotelio

**eNOS:** Sintetasa de óxido nítrico de origen endotelial

**EPO:** eritropoyetina

**EPOr:** receptor de EPO

**ES:** Células madre embrionarias

**Fas-L:** Ligando de proteína Fas (=Apoproteína 1)

**FBS:** Suero fetal bovino

**FDA:** Agencia americana del medicamento (*Food and Drug administration*)

**FGF:** Factor de crecimiento derivado de fibroblastos

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**GD:** Giro dentado del hipocampo

**GFAP:** Proteína gliofibrilar ácida (*Glial fibrillary acidic protein*)

**GMP:** Prácticas de buena producción (*Good Manufacturing Practice*)

**GMPC:** GMP cíclico

**GOS:** Escala pronóstica de Glasgow (*Glasgow outcome score*)

**hEGF:** Factor de crecimiento epidérmico humano (*Human epidermal growth factor*)

**HTIC:** Hipertensión intracraneal

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma

**IL-1:** Interleucina 1

**IL-10:** Interleucina 10

**IL-17:** Interleucina 17

**IL-1ra:** Receptor antagonista de IL-1

**IL1 $\beta$ :** Interleucina 1 beta

**IL-6:** Interleucina 6

**IL-8:** Interleucina 8

**IMDM:** Medio Dulbecco modificado por Iscove (*Iscove's modified Dulbecco's medium*)

**IP<sub>3</sub>:** Inositol trifosfato

**iPS:** Células madre pluripotenciales inducidas

**ISCT:** Sociedad internacional para la terapia celular

**K<sup>+</sup>:** Potasio

**LCR:** Líquido cefalorraquídeo

**Mg<sup>2+</sup>:** Magnesio

**MHC II:** Antígeno de compatibilidad humano tipo II

**mL:** Mililitro

**mNSS:** Puntuación modificada de gravedad neurológica (*modified neurologic severity scores*)

**MSC:** Células madre mesenquimales

**MSC-a:** Célula madre mesenquimal procedente de tejido adiposo

**MSC-c:** Célula madre mesenquimal procedente de tejido conectivo

**MSC-mo:** Célula madre mesenquimal procedente de médula ósea

**MSC-pb:** Célula madre mesenquimal procedente de sangre periférica

**MSC-uc:** Célula madre mesenquimal procedente de cordón umbilical

**MST:** Test de la cinta adhesiva modificado (*Modified Sticky tape Test*)

**Na<sup>+</sup>:** Sodio

**NF  $\kappa$ B:** Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B

**NGF:** Factor de crecimiento neuronal (*Neural grow factor*)

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**NO:** Óxido nítrico

**NSS:** Puntuación de gravedad neurológica (*neurologic severity scores*)

**PAM:** Presión arterial media

**paO<sub>2</sub>:** Presión parcial de oxígeno arterial

**PBS:** Tampon fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)

**pCO<sub>2</sub>:** Presión parcial de dióxido de carbono

**PE:** Ficoeriterina

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>

**PIC:** Presión intracraneal

**PICS:** Sociedad Pediátrica de Cuidados Intensivos (*Pediatric Intensive Care Society*)

**PPC:** Presión de perfusión cerebral

**RC<sub>2</sub>:** Marcador de glía radial

**Rpm:** Revoluciones por minuto

**SjO<sub>2</sub>:** Saturación de oxígeno en el bulbo de la yugular

**SNC:** Sistema nervioso central

**SPNIC:** Sociedad Europea de Cuidados Intensivos Pediátricos y Neonatal (*Society of Pediatric and Neonatal Intensive Care*)

**TCE:** Traumatismo craneoencefálico

**TGF  $\beta$ 1:** Factor de crecimiento tisular  $\beta$ 1

**T<sub>h</sub>:** Linfocitos T facilitadores (helper)

**TNF:** Factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factors*)

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**T<sub>r</sub>:** Linfocitos T reguladores

**TSG-6:** Gen/proteína 6 estimulada por TNF- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$  stimulated gene/protein 6*)

**UCF-F:** Unidades formadoras de colonias de fibroblastos

**UCIP:** Unidad de cuidados intensivos pediátricos

**VEGF:** Factor de crecimiento vascular endotelial (*Vascular endothelial growth factor*)

**WFPICCS:** Federación Mundial de Sociedades de Cuidados Intensivos Pediátricos (*World Federation of Pediatric Intensive Critical Care Societies*)

**ZSG:** Zona subgranular del giro dentado del hipocampo

**ZSV:** Zona subventricular





## Resumen

### Introducción

El traumatismo craneoencefálico (TCE) en pediatría supone una de las primeras causas de mortalidad y morbilidad. Además de las medidas de sostén, no existe en la actualidad un tratamiento farmacológico eficaz para disminuir sus efectos. Por ello, es necesario investigar nuevas dianas terapéuticas que puedan limitar sus efectos, disminuyendo el daño cerebral traumático secundario, y permitiendo la regeneración funcional y estructural de las áreas dañadas. La plasticidad neuronal se ha descubierto como una diana terapéutica en esta patología y puede ser activada por diferentes estímulos, entre los que se incluyen la rehabilitación intensiva, la administración de factores tróficos y la terapia celular. Esta última se podría convertir en una alternativa cada vez más real para el tratamiento del TCE, aunque es necesario la realización de ensayos clínicos con modelos de experimentación animal que permitan validar su eficacia y determinar cuáles son sus mecanismos de actuación.

Aunque inicialmente se pensaba que la célula ideal procedía del propio sujeto, se ha comprobado en modelos animales de terapia celular que el tratamiento con células alogénicas es igual de eficaz y seguro que la terapia autóloga. De esta manera es posible disponer de una gran cantidad de células mesenquimales para su administración en fase aguda sin tener el retraso que conlleva la extracción, purificación y ampliación de células autólogas en cultivos celulares.

Otros grupos celulares, como son las originarias de estirpe embrionaria, neuronal o hematopoyéticas, siendo también eficaces, plantean problemas éticos y prácticos en el momento de su obtención, procesamiento o cultivo. Las células madre mesenquimales (MSC) de origen en tejido adiposo sortean y limitan muchos de los conflictos referidos, sin que exista evidencia de pérdida de eficacia.

Se han utilizado varias fuentes de administración, siendo la vía intraparenquimatosa (ip) la que ha demostrado una mayor cantidad final de células trasplantadas en la zona de la lesión. Se discute si su mecanismo principal de actuación es la sustitución de los tejidos dañados o, lo que parece más probable, si es una inmunomodulación local la responsable de los buenos resultados funcionales en esta patología.

## Hipótesis

En modelos de experimentación animal de TCE la administración intra y perilesional de MSC procedentes de médula ósea ha demostrado mejorar la evolución funcional. Sin embargo, la administración ip de células procedentes de tejido adiposo podría tener también un efecto beneficioso a través de la integración funcional y disminución de la inflamación secundaria a un TCE producido mediante un modelo animal de trauma craneal controlado.

## Objetivos

1.- Investigar en un modelo experimental en ratas jóvenes sometidas a un TCE controlado el efecto de la administración de MSC en el lugar de la lesión sobre la función motora y sensitiva.

2.- Analizar la supervivencia y diferenciación de las células madre mesenquimales trasplantadas en el tejido cerebral lesional y perilesional.

3.- Conocer los mecanismo de protección y regeneración funcional por los que las MSC administradas ip podrían producir una mejoría funcional.

## Material y métodos

Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley de 7 días de vida y peso aproximado de 150-200 gramos, distribuidas en tres grupos (10 ratas por grupo): 1.- Control simple; 2.- Control ip; 3.- MSC ip. Los animales control simple fueron sometidos al TCE mediante un modelo de trauma controlado por caída de peso (distancia 20 cm, Peso 35 gr). Los animales control ip se sometieron al mismo trauma, y a las 24 horas de este se les administró 40 mL de suero salino fisiológico ip en el área ipsilateral al trauma y perilesional. Los animales MSC-ip recibieron el mismo trauma que los anteriores grupos, y a las 24 horas se les administró una única dosis de MSC derivadas de tejido adiposo ( $2 \times 10^5$  MSC) en la zona perilesional mediante inyecciones de 5 mL. Todos los animales se sacrificaron a los 21 días del traumatismo craneal.

Las MSC se obtuvieron de otras ratas Sprague-Dawley adultas, mediante extracción del tejido adiposo retroperitoneal. Se cultivaron e identificaron sus características mediante citometría de flujo. Para facilitar su reconocimiento posterior, se marcaron mediante infección con

lentivirus para que pudieran expresar la proteína verde fluorescente (GFP). Se realizaron estudios de diferenciación hacia estirpe adipogénica y osteogénica que mantienen su capacidad funcional y mantienen al mismo tiempo la expresión de GFP.

En las ratas objeto de estudio se analizaron la función motora y sensitiva mediante los test de Rogers, test de Rotarod y test de la cinta de Sticky modificado (MST) a las 48 horas, y a los 7, 14 y 21 días tras el TCE. Mediante citometría de flujo, tanto en las ratas control como las MSC ip, se analizó la presencia de una población que reuniera las características de MSC en el tejido cerebral, tanto a las 48 horas tras el TCE (24 tras el trasplante celular) como a los 21 días. Se examinaron además el tamaño de la lesión cerebral, las características histológicas de la lesión mediante hematoxilina y eosina, la población de células granulares y piramidales en el hipocampo, la presencia de MSC mediante tinción de vimentina e inmunohistoquímica frente a la GFP y la presencia de progenitores neuronales mediante tinción con nestina.

## Resultados

Se extrajeron de manera efectiva células mesenquimales del tejido graso retroperitoneal. El análisis mediante citometría de flujo demostró doble positividad para los marcadores de superficie mesenquimales CD29 y CD90, siendo negativo para marcadores hematopoyéticos CD45. Las células obtenidas mostraban morfología de células mesenquimales, y mediante cultivo en medios de diferenciación se consiguió que expresaran marcadores de adipocito y condrocito. La infección mediante un lentivirus permitía la expresión de GFP, sin alterar la expresión de marcadores de superficie, morfología ni capacidad de diferenciación.

La administración ip de MSC en ratas tras un TCE controlado mejoró la puntuación en el test de Rotarod a los 7 días, 14 días y 21 días. En el test de Rogers, mejoró la puntuación en el grupo de tratamiento ip a los 7 y 14 días, desapareciendo la diferencia al finalizar el periodo de observación. No se encontró diferencia en la puntuación en el MST.

Mediante citometría de flujo se evidenció una población celular con características de mesenquimal a las 48 horas del TCE, en la zona de la lesión y trasplante, pero no a los 21 días. Dicha población no tenía refringencia propia verde. Sin embargo, mediante histología se encontró una población de células vimentina positiva y GFP positiva en la zona de la lesión a las 48 horas, que disminuyó de número a las tres semanas del TCE.

La administración de MSC no disminuyó el área de la lesión. Produjo un incremento de células piramidales, células granulares y células nestina positiva en la región CA3 y en el giro dentado del hipocampo, respectivamente, a las 48 horas del TCE. Sin embargo, dicha respuesta a las tres semanas se mantuvo solo en las células granulares del giro dentado, desapareciendo las diferencias en el resto. No hubo diferencias en ningún momento en el número de células piramidales en la región CA1 del hipocampo o en las células nestina positivo de la zona subventricular.

### **Conclusiones**

Este modelo de traumatismo craneoencefálico en ratas mediante una caída de un peso observamos:

- 1.- La administración intraparenquimatosa de células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo en la zona de la lesión es eficaz en la recuperación funcional motora.
- 2.- Dicha recuperación se mantiene a pesar de que el número de células mesenquimales disminuye con el tiempo y no se han encontrado evidencias de su diferenciación a células gliales o neuronales maduras.
- 3.- La recuperación funcional se asocia en los animales a los que se administró células mesenquimales con un incremento precoz de la neurogénesis endógena demostrado por un incremento de células granulares en el giro dentado, en la región CA3 del hipocampo y células nestina positiva en la región subgranular del giro dentado.
- 4.- Sin embargo, esta respuesta es transitoria, puesto que a las tres semanas del trauma craneal solo en el giro dentado del hipocampo se observa un incremento de células granulares, desapareciendo las diferencias en el resto de zonas estudiadas.





## 1.- Introducción

### 1.1.- Importancia del TCE en pediatría

El traumatismo craneoencefálico (TCE) es, en los países desarrollados, un importante problema de salud, ya sea en forma de TCE aislado o asociado a otras lesiones. Se calcula que es la primera causa de mortalidad y morbilidad en edad pediátrica transcurrido el primer año de vida<sup>1-3</sup>. Aunque las mejoras en prevención, sobre todo en seguridad vial, han disminuido su incidencia<sup>4,5</sup>, aún producen un enorme impacto social y económico.

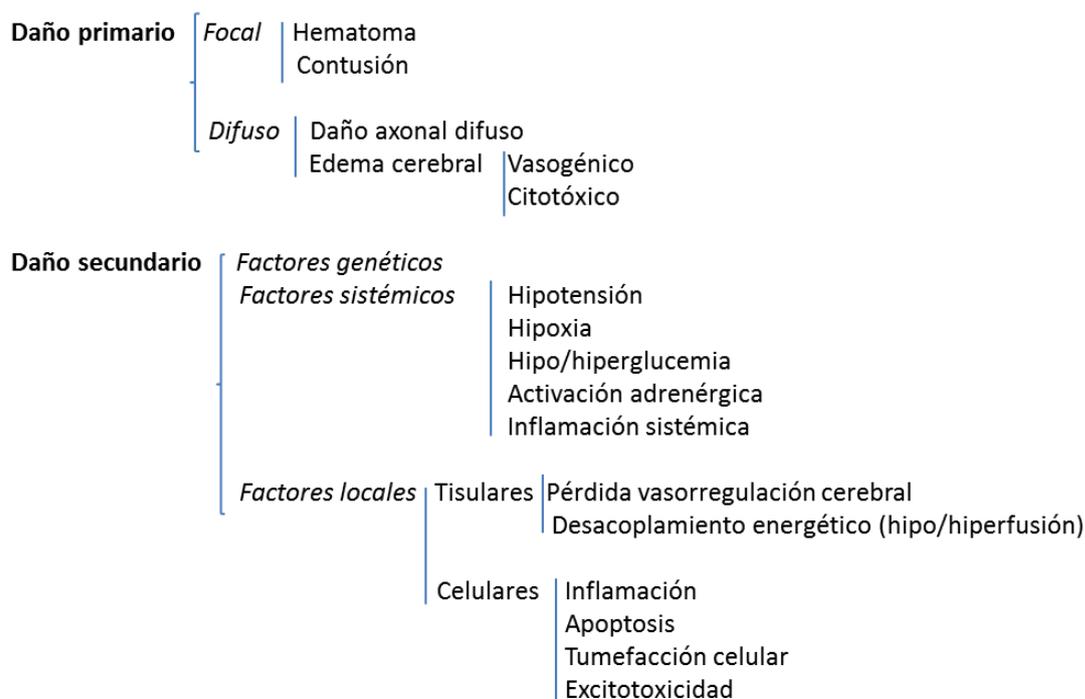
Los mecanismos de producción suelen ser caídas accidentales, accidentes de tráfico, accidentes deportivos y malos tratos. La distribución del mismo sigue un patrón bimodal, afectando en una primera fase a niños por debajo de los cuatro años de vida, y posteriormente vuelve a ascender durante la adolescencia<sup>5,6</sup>. En los niños pequeños predominan las caídas accidentales y los malos tratos, mientras que en adolescentes son más frecuentes tras accidentes deportivos y de tráfico<sup>5,7</sup>. Independientemente de la edad, es más frecuente en el sexo masculino.

El TCE es una causa frecuente de consulta en los servicios de emergencia. La inmensa mayoría (por encima del 90%) son leves, definido como una puntuación en la escala de coma de Glasgow de 14-15<sup>3,4,8</sup>. Sin embargo, la presencia de un trauma moderado o grave es más frecuente cuando el paciente sufre otras lesiones (en los pacientes con un politraumatismo, hasta el 75% incluye un TCE). De otra manera, en la mayoría de los pacientes que fallecen tras un politraumatismo, el 80% tenían asociado un TCE grave<sup>9,10</sup>.

La mortalidad global tras un TCE grave en niños en los países desarrollados oscila entre el 17-33% de los pacientes, según series retrospectivas, sin producirse cambios significativos en la última década<sup>11-14</sup>. Se calcula que en EEUU aproximadamente 3000 niños fallecen al año por esta causa<sup>15</sup>. Existen factores que se asocian con dicha mortalidad, como son la presencia de coagulopatía, bajas puntuaciones en la escala de coma de Glasgow, hiperglucemia e hipotensión<sup>2,11,16-19</sup>. No obstante, la morbilidad en estos pacientes suele ser mayor, teniendo algún tipo de secuela hasta el 70% de los pacientes que habían sufrido un trauma craneal grave. Dicha discapacidad afectaba a diferentes ámbitos como es la movilidad, independencia de un cuidador, necesidad de educación especial y el acceso a un puesto de trabajo remunerado<sup>20</sup>. Además, el costo social de estas lesiones es superior al que ocurre en adultos, dado la esperanza de vida más prolongada.

## 1.2.- Mecanismos de lesión en TCE

Durante los últimos años ha aumentado el conocimiento sobre la fisiopatología del TCE. En la patogenia del daño cerebral traumático (DCT) se puede diferenciar en dos partes: el DCT primario y el secundario (Ver ilustración 1).



**Ilustración 1.- Mecanismos de lesión en TCE. De entre ellos, los más importantes son los relacionados con los factores locales, y especialmente con los tisulares. Ver texto para explicación detallada. Modificado a partir de referencias<sup>21,22</sup>.**

En el DCT primario, el mecanismo lesional produce de manera directa la ruptura de las estructuras cerebrales. Se puede dividir en dos grupos: 1) El daño focal, que incluye la formación de un hematoma (epicraneal, subdural y parenquimatoso) y la contusión; 2) El daño difuso, que incluye el daño axonal difuso<sup>23,24</sup> y el edema cerebral<sup>21,22</sup>.

El DCT secundario se produce por una combinación de factores genéticos, factores locales y factores sistémicos.

### 1.2.1.- Factores genéticos

Se han demostrado que determinan parte de la sensibilidad y tolerancia del paciente al TCE. Se ha observado en un modelo en rata de TCE leve que el estímulo traumático es un inductor potente de la respuesta génica, y que dicha respuesta es variable a lo largo del tiempo<sup>25</sup>. En las primeras 24 horas predomina una mayor expresión de genes que afectan al metabolismo, desarrollo, transporte, defensa, así como al crecimiento, morfogénesis, diferenciación y regulación del ciclo celular. Al cuarto día, predominan los genes de diferenciación celular y de respuesta a un estímulo, principalmente mediado por una respuesta inmune<sup>25</sup>.

Existen estudios de asociación genética en adultos que han demostrado que ciertos genes presentan polimorfismos que se correlacionan con el resultado clínico post-TCE, ya sea empeorándolo (Isoforma ApoE4 de la apoproteína E, relacionado con la formación y reparación de membranas celulares: polimorfismo funcional del gen de supresión tumoral p53, implicado en la apoptosis tras TCE), como mejorándolo (repetición de dos alelos del gen del receptor antagonista de la interleucina 1 [IL-1ra])<sup>26</sup>. En niños, la asociación más estudiada entre un gen y su evolución clínica ha sido la Isoforma ApoE4, incrementando 2,4 veces la probabilidad de un peor pronóstico neurológico en los pacientes portadores de dicho alelo, principalmente en aquellos que han sufrido un TCE grave<sup>27</sup>.

### 1.2.2.- Factores sistémicos

Incluyen hipotensión, hipoxia, alteraciones en la homeostasis de la glucosa, interleucinas y citocinas de inflamación y la hiperestimulación adrenérgica. De todos ellos, los más importantes son la presencia de hipotensión e hipoxia que puede aparecer en los primeros minutos tras el trauma craneal<sup>12,13,18,19,28</sup>; una combinación de ambos se observa hasta en el 30% de los pacientes<sup>21</sup>. Ambos factores originan una deficiente perfusión cerebral que aboca a la isquemia cerebral. De hecho, un estudio realizado con muestras cerebrales de pacientes fallecidos tras un TCE grave hallaba datos histológicos de isquemia cerebral en el 90% del total<sup>29</sup>.

### 1.2.3.- Factores locales

Se diferencian dos tipos: tisulares y celulares. Los primeros se relacionan con la presión de perfusión cerebral y el flujo sanguíneo cerebral. La respuesta anormal que se objetiva viene dada por la pérdida de la autorregulación del flujo sanguíneo cerebral. Esta respuesta fisiológica, que determina un flujo constante de sangre al cerebro en un rango amplio de tensión arte-

rial, se pierde de manera variable tras un TCE. La respuesta siguiente puede ser vasodilatadora, vasoconstrictora o mixta, y puede aparecer inmediatamente tras el trauma o en los días sucesivos<sup>30</sup>. Comparado con la pérdida de la regulación cerebral, la pérdida de la respuesta a los cambios a la  $p\text{CO}_2$  (vasodilatación o vasoconstricción cerebral en respuesta a la hiper o hipocapnia, respectivamente) aparece como un fenómeno más estable. Aunque puede aparecer alterada en las primeras fases del TCE, supone una medida importante de control frente a un incremento de la presión intracraneal por hiperaflujo<sup>31</sup>.

En adultos, se calcula que un descenso en el flujo sanguíneo cerebral inferior a  $15 \text{ mL} \cdot 100 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  se asocia de manera irreversible a daño tisular<sup>32</sup>. Los mecanismos que explican este descenso son la compresión secundaria a lesiones extraaxiales (hematomas, herniación del parénquima cerebral, ruptura de vasos cerebrales)<sup>22</sup>, así como la pérdida de la autorregulación cerebral<sup>33</sup>, producción inadecuada de óxido nítrico y neurotransmisores colinérgicos<sup>34,35</sup>, y potenciación de la vasoconstricción inducida por prostaglandinas<sup>36</sup>. En este modelo de isquemia cerebral, la activación del metabolismo anaerobio es incapaz de suplir las demandas energéticas del tejido cerebral, lo que genera desacoplamiento energético y muerte celular<sup>22</sup>.

Los pacientes con un TCE pueden desarrollar también hiperperfusión cerebral, debido a la pérdida de la regulación cerebral. Esta hiperemia condiciona un incremento en el volumen vascular cerebral que, a su vez, produce un incremento en la presión intracraneal. Es importante referir los términos hipoperfusión e hiperperfusión de manera relativa, es decir, de acuerdo a la demanda metabólica cerebral.

Los factores celulares incluyen la presencia de inflamación, apoptosis, tumefacción celular y excitotoxicidad. De manera general, las diferentes vías patogénicas producen edema cerebral, lo que contribuye a la elevación de la presión intracraneal y la formación de un daño cerebral secundario.

La inflamación está producida por dos tipos de células: los leucocitos reclutados desde la circulación general y la microglía residente, incluidos los astrocitos. Si un TCE ha sido lo suficientemente agresivo como para romper la barrera hematoencefálica, se producirá una estimulación endotelial que a su vez, mediante señales bioquímicas, permitirá la infiltración de los tejidos dañados por células blancas de la circulación general, la activación de la microglía residente no dañada por el daño primario y la interacción entre ambos grupos celulares (generales y residentes). Estas interacciones celulares generan diversas sustancias reactivas (óxido nítrico,

productos reactivos de oxígeno y citoquinas), que estimulan la inflamación tisular (ver ilustración 2). Las principales moléculas de señalización parecen ser la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Otras moléculas como la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 8 (IL-8), y el grupo de la proteína Fas y su ligando (Fas-L), también se han relacionado con la aparición de la respuesta inflamatoria<sup>37</sup>. Los astrocitos, estimulados por el TNF alfa (TNF- $\alpha$ ) y por la IL1 $\beta$ , desencadena una respuesta autocrina en la que se produce hipertrofia, hiperplasia y producción de sustancias como la proteína gliafibrilar ácida (GFAP)<sup>38</sup>. Este mecanismo, tras un TCE

- **Interleucina 1 (IL1)**
  - Incrementa el daño neuronal
  - El antagonista del receptor IL1 revierte su neurotoxicidad
- **Interleucina 6 (IL6)**
  - La sobreproducción astrocitaria es beneficiosa
  - Su deficiencia es perjudicial
  - La sobreexpresión neuronal no altera el pronóstico neurológico
- **Interleucina 10 (IL10)**
  - Efectos neuroprotectores de manera general
  - En niños, se asocia con peor pronóstico
- **Factor estimulante de colonias Granulocítico (G-CSF)**
  - Antiapoptótico
  - Promueve neurogénesis
- **Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )**
  - Induce inflamación cerebral, aumenta la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE), y el reclutamiento leucocitario
  - Su inhibición farmacológica disminuye la disfunción de la BHE y el edema
  - En un ensayo clínico con humanos con un inhibidor, no se encontraron diferencias clínicas
  - Los ratones *knockout* para TNF o su receptor, muestran un daño de la BHE o del tejido cerebral aumentado, así como una recuperación neurológica disminuida
- **Ligando Fas (Fas-L)**
  - Implicado de manera general en la apoptosis
- **Interleucina 8 (IL8)**
  - Promueve la infiltración de neutrófilos
  - Incrementa la disfunción de la BHE
  - Estimula los factores neurotróficos en astrocitos cultivados
- **Proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1 (CCL2)**
  - Promueve la infiltración macrofágica

**Ilustración 2.- Principales citocinas implicadas en el daño cerebral traumático secundario. Entre paréntesis, su abreviatura más comúnmente aceptada, en inglés. Modificado de la referencia 37.**

moderado y focal, permite la contención del daño y la reestructuración cerebral (en forma de arborización dendrítica y remodelación neuronal)<sup>39</sup>. Sin embargo, la microglía también puede tener un factor regenerativo dado que puede producir neurotrofinas de la familia del factor de crecimiento neuronal (NGF)<sup>40</sup>. A su vez, tras un TCE grave los astrocitos pueden favorecer la aparición de una cicatriz glial que dificulte la regeneración tisular<sup>39,41</sup>. De esta manera, la respuesta neuroinflamatoria posee una categoría dual, teniendo efectos neuroprotectores o neurotóxicos, según la intensidad de dicha respuesta<sup>37,42</sup>.

La apoptosis es un mecanismo que se observa tras cualquier TCE, incluidos los leves. En un modelo con ratas, aparece sobre todo en la sustancia gris y blanca perilesional, iniciándose durante las primeras 12 horas y hasta dos días después. Disminuye de manera proporcional

desde la zona del impacto. Tardíamente, a partir de las 72 horas del TCE, también se detecta en el tálamo ipsilateral y puede estar activa durante la primera semana tras la noxa<sup>43</sup>. Similares hallazgos se han confirmado también en humanos<sup>44,45</sup>.

La explicación de por qué la lesión se propaga a zonas distales parece estar en la transmisión del estímulo apoptótico por la microglía, fundamentalmente por los astrocitos<sup>46</sup>. Estos, a través de los canales de unión de hendidura (CUH), forman redes neuronales que se comportan como un sincitio funcional<sup>47</sup>. Los CUH están formados por dos hemicanales, y se encuentran en las uniones astrocitarias y libres en el espacio extracelular. Tras un estímulo determinado, los astrocitos pueden transmitir señales específicas a través de ellas, usando el ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) como mensajero, fenómeno que se llama gliotransmisión<sup>48</sup>. Existen dos vías de propagación de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ : una intracelular, propagada a través de moléculas de Inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) que permite la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde reservorios intracelulares (retículo endoplasmático y mitocondrias); y otra extracelular, mediada por  $\text{ATP}^+$ , que se elimina a través de hemicanales libres al espacio extracelular<sup>49</sup>. El incremento de potasio ( $\text{K}^+$ ) extracelular se ha propuesto como una de las señales de apertura de los hemicanales<sup>50</sup> y, de esta manera, de los CUH. Se ha objetivado que tras un TCE, se produce un incremento en los niveles de  $\text{K}^+$ <sup>51</sup>. Este  $\text{K}^+$  extracelular, ya sea mediante apertura directa de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , o mediante la apertura de hemicanales libres, genera una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que activaría la apoptosis vía caspasas<sup>52</sup>.

Tras un TCE, se ha observado un incremento de los niveles de glutamato extracelulares<sup>53</sup>, como consecuencia de la despolarización neuronal tras el trauma y un fallo energético debido a la hipoperfusión cerebral generalizada y el consumo de ATP. El exceso de glutamato activa canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y sodio ( $\text{Na}^+$ ), lo que finalmente induce la lesión celular y la activación de la vía de las caspasas, induciendo la apoptosis celular<sup>52,54</sup>. El papel de los astrocitos inicialmente consiste en “tamponar” este incremento mediante su captura a través de canales específicos y su conversión en glutamina<sup>54</sup>. Además, los astrocitos vecinos aumentan la respuesta amortiguadora mediante la transferencia de glutamato por medio de CUH. No obstante, si el incremento de glutamato supera este sistema de defensa, el astrocito bloquea la formación de canales de glutamato<sup>55</sup> y el incremento previo en  $\text{Na}^+$  origina un desplazamiento del glutamato almacenado hacia el espacio extracelular, perpetuando la respuesta excitotóxica. Sin embargo el fracaso reiterado con diferentes antagonistas de canales de N-metil-D-aspartato (NMDA) en el tratamiento del TCE severo<sup>56-60</sup> ha hecho replantearse el papel del Glutamato en el DCT secundario<sup>61</sup>. Parece que el glutamato puede tener un efecto dual, y que mientras que en las primeras horas tras un TCE su incremento en el espacio extracelular es responsable de la toxicidad neuronal, su elevación mantenida a niveles más bajos que los iniciales durante días y semanas promueve la supervivencia, migración y diferenciación celular<sup>61</sup>.

Actualmente se aceptan dos tipos de edema cerebral según su origen: por extravasación y aumento del espacio extracelular (vasogénico) y por tumefacción celular (citotóxico)<sup>62</sup>. El edema citotóxico es el principal tras un TCE<sup>63</sup>, y aunque afecta tanto a las neuronas como a los astrocitos, debido a que estos son más numerosos, el edema cerebral está causado principalmente por estos últimos<sup>64</sup>. No se sabe exactamente cuáles son los mecanismos responsables de la tumefacción. Se plantea que tanto el daño directo como la hipoperfusión cerebral producen consumo de ATP, falla energética y alteración de los gradientes iónicos transmembrana. Como consecuencia, se produce apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ , que no es compensado por las bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  debido al déficit energético, lo que arrastra agua al interior de la célula<sup>65</sup>. Las acuaporinas y, en concreto, la acuaporina 4 (Acp-4), parece el principal responsable del transporte de agua en los astrocitos<sup>66-68</sup>.

Un resumen del daño cerebral traumático primario y secundario se puede observar en las ilustraciones 3 y 4.

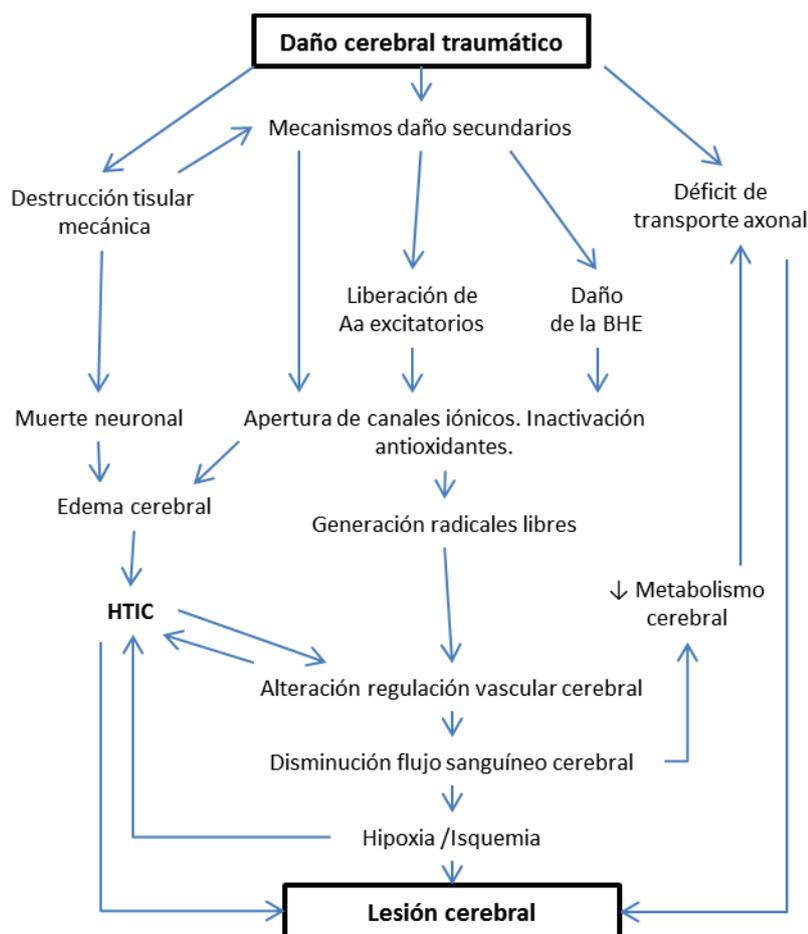


Ilustración 3.- Esquema de la fisiopatología del daño cerebral secundario. BHE: Barrera hemato-encefálica; HTIC: Hipertensión intracraneal, Aa: aminoácidos<sup>21,69</sup>.

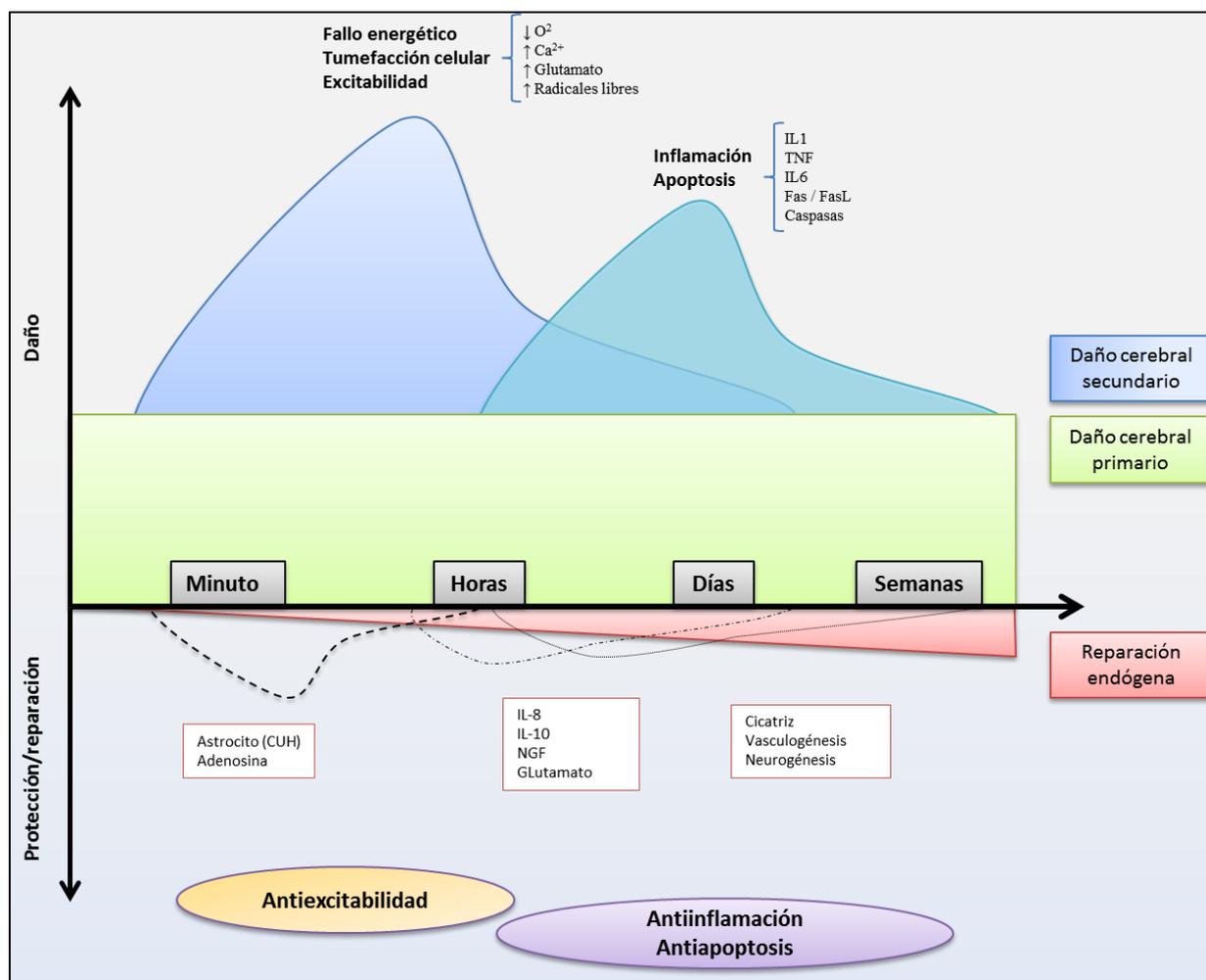


Ilustración 4.- Esquema temporal de la fisiopatología del daño cerebral traumático. Tras el daño cerebral primario (inmediato y estático a lo largo del tiempo), la liberación de diferentes mediadores y la depleción energética ponen en marcha mecanismos que generan en última instancia inflamación y apoptosis en la zona lesionada, generando de esta manera el daño cerebral secundario. Al mismo tiempo y de manera secuencial se desencadena la producción de mecanismos contrarreguladores de la reparación endógena que son los encargados de contrarrestar los mecanismos lesivos y generar una respuesta regenerativa.  $O_2$ : oxígeno,  $Ca^{2+}$ : Calcio, CUH: Canal de unión de hendidura, Fas: proteína Fas, FasL: Ligando de la proteína Fas, IL1: Interleucina 1, IL6: Interleucina 6, IL-8: Interleucina 8, IL-10: Interleucina 10, NGF: Factor de crecimiento neuronal, TNF: Factor de necrosis tumoral.

### 1.3.- Tratamiento del TCE en pediatría

El único tratamiento actual frente al DCT primario es la prevención. La mayoría de los tratamientos establecidos intentan evitar o disminuir las lesiones producidas por el DCT secundario. Existen guías de manejo clínico, pero probablemente las más usadas sean las realizadas por la *Brain Trauma Foundation*, que a su vez está formada por un panel de expertos que revisan y actualizan las recomendaciones para el manejo del TCE en pediatría de acuerdo a la mejor evidencia científica disponible. En ella están presentes diferentes sociedades científicas tanto europeas como americanas, incluyendo la Academia Americana de Pediatría (AAP), la Sociedad Pediátrica de Cuidados Intensivos (Reino Unido; PICS), la Sociedad Europea de Cuida-

dos Intensivos Pediátricos y Neonatal (SPNIC) y la Federación Mundial de Sociedades de Cuidados Intensivos Pediátricos (WFPICCS). Estas guías se actualizan periódicamente, siendo la segunda y última edición editada en el año 2012 (disponible en internet, en la página [http://www.braintrauma.org/pdf/guidelines\\_pediatic2.pdf](http://www.braintrauma.org/pdf/guidelines_pediatic2.pdf)). A cada recomendación se le asigna un nivel de evidencia: Clase I, datos obtenidos de ensayos clínicos aleatorizados; Clase II, estudios controlados, observacionales, cohortes y retrospectivos, así como ensayos clínicos aleatorizados que no cumplen con un buen diseño y una descripción clara de sus resultados y métodos; finalmente, la Clase III está formada de datos observacionales recogidos retrospectivamente, provenientes de casos clínicos, series de datos y registros epidemiológicos.

Las medidas generales de tratamiento en el TCE grave (escala de coma de Glasgow < 8) que se recomiendan son (ver ilustración 5):

- a) Cabeza en posición neutra y a 30°, lo que evita la compresión de las venas yugulares y mejora el drenaje venoso cerebral, evitando un incremento en la presión intracraneal (PIC).
- b) Mantener la TA en rango normal, para evitar el daño secundario por isquemia e hipoxemia. El tratamiento se realizará asegurando un volumen extravascular adecuado, junto con cifras normales de hemoglobina. Los fluidos isotónicos se prefieren a los sueros glucohiposalinos, dado que estos últimos pueden favorecer el paso de fluidos a través de la barrera hematoencefálica dañada desde el espacio intravascular al intersticio neuronal y al interior de la célula. De esta manera, se genera un edema cerebral generalizado que incrementa la PIC. Si a pesar de una volemia óptima persiste la hipotensión, estaría indicado el uso de inotropos, siendo de elección la noradrenalina porque incrementa en mayor medida la presión arterial diastólica, sin incrementar el consumo cerebral de oxígeno.
- c) Analgesia y sedación. El dolor y el estrés asociado al TCE, además de diferentes maniobras terapéuticas que se realizan en las unidades de cuidados intensivos pediátricos (UCIP; por ejemplo, succión a través de un tubo endotraqueal) incrementan las demandas metabólicas cerebrales, aumentando el flujo sanguíneo cerebral

#### **Medidas generales de tratamiento**

- Cabeza en posición neutra
- Normotensión
- Analgesia y sedación
- Normoventilación y normooxigenación
- Anticonvulsivos
- Control del medio interno
- Normotermia

**Ilustración 5.- Medidas generales del tratamiento tras un trauma craneal grave.**

y elevando la PIC<sup>70,71</sup>. Sin embargo, un exceso en dichos fármacos pueden tener como efecto secundario hipotensión arterial sistémica, vasodilatación cerebral refleja e incremento de la PIC. Se recomiendan fármacos analgésicos en perfusión continua, como el fentanilo, remifentanilo o cloruro mórfico. Como fármacos sedantes se prefiere una benzodiacepina de acción corta en perfusión continua, como el midazolam. No se recomienda el uso de la ketamina, debido a la creencia de que puede incrementar la PIC por efecto sobre la vasodilatación cerebral, aunque un estudio limitado ha puesto en duda esta afirmación<sup>72</sup>. El propofol está contraindicado por ficha técnica en menores de dos años; si se usa, se deben monitorizar estrechamente los niveles de lactato y la aparición de acidosis metabólica<sup>71</sup>.

- d) Normo ventilar y normo oxigenar. Se recomienda mantener niveles de  $paO_2 > 100$  mm Hg. No se conocen los niveles a partir de los cuales un exceso de oxigenación son tóxicos en el paciente con un TCE grave, pero dado que tras un TCE se ha objetivado incremento en los productos reactivos de oxígeno, parece de sentido común mantener la cifra mínima necesaria. Los niveles de  $pCO_2$  objetivo están entre 35-40 mmHg. Hay que evitar tanto la hiperventilación ( $pCO_2 < 32$  mmHg), que condiciona vasoconstricción cerebral, descenso del flujo sanguíneo cerebral y riesgo de isquemia secundaria, como la hipoventilación ( $pCO_2 > 45$  mmHg), ya que conduce a vasodilatación cerebral e incremento de la PIC.
- e) Anticonvulsivos. Las crisis comiciales deben tratarse de inmediato ya que aumentan el requerimiento metabólico de oxígeno, aumenta la PIC, favorecen la hipoxia cerebral y la liberación de neurotransmisores que amplían el DCT secundario. No obstante, se ha observado que el tratamiento profiláctico anticonvulsivo no tiene efecto preventivo en las convulsiones tardías (de aparición más allá de los primeros 7 días tras el TCE). No obstante, sí que parecen disminuir la incidencia de convulsiones precoces ( $< 7$  días tras el traumatismo)<sup>73</sup>. El tratamiento más usado es la fenitoína, monitorizando sus niveles plasmáticos. Otra opción eficaz sería el uso de ácido valproico, aunque existen dudas acerca de su seguridad<sup>74</sup>. Fuerza de recomendación: débil (calidad de evidencia III)<sup>75</sup>.
- f) Evitar alteraciones metabólicas. Hay que asegurar los aportes adecuados de glucemia en el paciente crítico, como sustrato energético principal del tejido cerebral, pero no está claro qué es un "aporte adecuado" en este grupo de pacientes<sup>76</sup>. Aunque se ha objetivado una mayor tasa de complicaciones y mortalidad en los

pacientes críticos con hiperglucemia<sup>12,16,77</sup>, un control estricto puede conllevar a mayor incidencia de hipoglucemia y DCT secundario. Evitar la hiponatremia dado que favorece la aparición de edema cerebral.

- g) Normotermia. La fiebre produce un aumento de las demandas metabólicas, produce cambios inflamatorios, oxidación de los lípidos y una mayor toxicidad neuronal. La aparición de fiebre tras un TCE se asocia con una mayor mortalidad e incidencia de lesión neurológica<sup>78</sup>.

### 1.3.1- Monitorización de PIC

Como se ha mencionado previamente, muchas de las diferentes vías patogénicas del daño cerebral secundario originan, en última instancia, edema cerebral y elevación de la PIC que limitan la supervivencia de las células cerebrales. La elevación de la PIC puede producir DCT secundario por dos vías diferentes: por una parte compresión directa del parénquima cerebral cuya última expresión serían los síndromes de herniación cerebral; y por otra parte el incremento en la presión intracraneal origina un descenso en la presión de perfusión cerebral (PPC) que determina lesión por isquemia y una disminución del aclaramiento de los metabolitos tóxicos que se acumulan tras la lesión primaria.

El diagnóstico clínico de hipertensión intracraneal puede ser difícil sobre todo en aquellos pacientes que han sufrido un traumatismo grave o aquellos en los que están intubados y bajo los efectos de fármacos sedantes. La tríada clínica de hipertensión arterial, bradicardia y anisocoria cuando ocurre suele ser de forma tardía, y puede no aparecer completa hasta que la herniación cerebral y la muerte cerebral es inminente, o con valores de PIC muy elevados. Los lactantes con fontanelas abiertas, presentan también riesgo de desarrollar una HTIC, no habiéndose estudiado la sensibilidad de la fontanela a tensión como hallazgo aislado que permita el diagnóstico<sup>79</sup>.

Las guías clínicas de manejo de trauma craneal pediátrico recomiendan la monitorización de la PIC en aquellos pacientes que han sufrido un trauma grave (escala de coma de Glasgow 3-8) basándose en las siguientes afirmaciones: una incidencia de HTIC elevada en los pacientes con trauma grave, una asociación entre HTIC y un pronóstico neurológico pobre, la concordancia entre protocolos de tratamiento basados en cifras de HTIC y la mejoría de los resultados clínicos, y una mejora en el pronóstico de los pacientes asociados a aquellos pacientes que responden a las terapias de descenso de la HTIC<sup>80</sup>.

### 1.3.2.- Tratamiento de la HTIC

#### a) Indicación del tratamiento de HTIC

Clásicamente el tratamiento de la HTIC se basaba en la cifra absoluta de la PIC. Elevaciones esporádicas por encima de 20 mmHg son normales en el paciente sano, pero incrementos mantenidos en el tiempo pueden ser perjudiciales y agravar el daño cerebral secundario<sup>81</sup>. Probablemente los límites normales estén relacionados con la edad, y sean menores en lactantes y se vayan incrementando a medida que se acerca a la edad adulta, pero faltan estudios que corroboren esta afirmación<sup>82</sup>.

La PPC parece que es un parámetro también indicado para el manejo de la HTIC. Se define como la diferencia entre la presión arterial media (PAM) y la PIC [PPC=PAM-PIC]. Es un indicador de la perfusión sanguínea cerebral, y un descenso de la misma, ya sea por un descenso por hipotensión sistémica como por una elevación de la PIC, conlleva un riesgo en un cerebro que ha perdido la autorregulación cerebral, de desacoplamiento entre las demandas regionales de oxígeno y su metabolismo. Para una correcta medición, la PAM debe ser medida mediante procedimientos invasivos, y calibrada a la altura de la aurícula derecha, mientras que la PIC debe ser a nivel del trago (equivalente al agujero de Monro). No existen estudios bien diseñados que indiquen las cifras óptimas de PPC según el rango de edad que permitan demostrar un descenso de la morbilidad y mortalidad. De manera general, las guías de tratamiento recomiendan tratar al paciente para mantener una PPC mínima de 40 mmHg, considerando que quizás sea apropiado en niños mayores cifras entre 40-50 mmHg (nivel de evidencia III, estudios de baja calidad)<sup>83</sup>.

#### b) Medidas de primer nivel

Son aquellas que se ha demostrado un efecto beneficioso bien sobre la mortalidad o sobre las secuelas neurológicas (ilustración 6). La indicación de utilizar una u otra vendrá dada por las características del paciente y las lesiones subyacentes. Estas medidas son:

- a. *Evacuación de lesiones cerebrales*, si no se ha realizado antes. Se recomienda la intervención quirúrgica en la fractura ósea craneal con hundimiento, los hematomas epidurales y subdurales que produzcan efecto masa. En ocasiones, es necesario rea-

#### **Tratamiento de HTIC**

- **Medidas de primer nivel**

- Evacuación de lesiones
- Relajación muscular
- Hiperventilación moderada
- Terapia osmolar

- **Medidas de segundo nivel**

- Craniectomía descompresiva
- Hiperventilación intensa
- Coma barbitúrico

**Ilustración 6.- Opciones de tratamiento de hipertensión intracraneal (HTIC) según la calidad científica.**

lizar una prueba de imagen en estos pacientes previo a la decisión de intervenir, lo que conlleva un traslado a la sala de neuroimagen con el riesgo que supone.

- b. *Relajación muscular*, que disminuye la PIC por dos mecanismos fundamentales: disminuye la asincronía con el respirador, disminuyendo la presión de la vía aérea e intratorácica facilitando el retorno venoso cerebral; y disminuye las demandas metabólicas al eliminar la contracción del músculo esquelético. Sin embargo, su utilización conlleva diferentes riesgos (extubación accidental, imposibilidad de valorar clínicamente convulsiones motoras, aumento en la incidencia de neumonía nosocomial, hipotensión y miopatía) que puede prolongar la estancia en UCIP y añadir un factor de morbimortalidad<sup>71</sup>.
- c. *Evacuación de Líquido cefalorraquídeo (LCR)*, mediante un catéter intraventricular insertado previamente para el control de la PIC o de forma urgente en una intervención realizada para este fin. La evacuación de una pequeña cantidad de LCR a través del mismo (aproximadamente 2-20 mL) disminuye la PIC de manera transitoria. Dicho catéter puede ser insertado en la UCIP o en quirófano, y tiene como efecto secundario la posibilidad de generar una hemorragia o su infección. En pacientes con HTIC refractaria a este método, y que no tienen en la prueba de imagen evidencia de una lesión focal, se recomienda la utilización de un drenaje espinal evacuador para el control de la PIC<sup>84</sup>.
- d. *Terapia osmolar* con suero salino hipertónico (3%) en forma de bolos intermitentes (6,5-10 mL/kg, evidencia clase II) o en perfusión continua (0,1-1 mL/kg/h, evidencia clase III) ha demostrado ser más efectivo que el suero salino isotónico (0,9%) para el tratamiento de la HTIC. Se debe utilizar la dosis mínima efectiva, y vigilar estrechamente la natremia y la osmolaridad sérica evitando incrementos de esta última por encima de 360 mOsm/L. El uso del manitol no se encuentra avalado por evidencia científica, y además posee el efecto deletéreo de inducir poliuria tiempo después de su infusión (1-2 horas), que puede ocasionar a su vez hipotensión y disminución de la PPC, por lo que no se recomienda actualmente<sup>85</sup>.
- e. *Hiperventilación moderada*, manteniendo las cifras de PaCO<sub>2</sub> 30-35 mmHg. Disminuye la PIC al producir vasoconstricción cerebral y disminución del flujo sanguíneo cerebral<sup>30</sup>. El efecto es transitorio por lo que se debe utilizar solo de forma puntual frente a ascensos de la PIC que no responden a otros tratamientos. Se recomienda que, cuando se utiliza de manera continua, monitorizar la Saturación de oxígeno en

el bulbo de la yugular (SjO<sub>2</sub>), manteniendo valores entre 55-75%. Valores de SjO<sub>2</sub> inferiores a 55% son compatibles con isquemia cerebral, contraindicando la hiperventilación. Valores de SjO<sub>2</sub> superiores a 75% indican hiperemia cerebral (excepto cuando la exploración clínica sea compatible con muerte encefálica), beneficiándose de la hiperventilación. Se debe evitar la hiperventilación profunda (PaCO<sub>2</sub> < 30 mmHg) en las primeras 48 horas tras un TCE grave, ya que reduce el flujo sanguíneo cerebral y genera pobres resultados neurológicos a largo plazo<sup>86</sup>.

### *c) Medidas de segundo nivel*

Cuando las medidas de primer nivel no consiguen alcanzar una cifra normal de PIC, estaría indicado la utilización de medidas de segundo nivel. Estas, de manera general, se apoyan en una menor evidencia científica y aunque han demostrado que disminuyen las cifras de PIC no han conseguido demostrar evidencia de un descenso en la mortalidad o en las secuelas neurológicas a largo plazo.

- *Coma barbitúrico*, indicado en pacientes con HTIC que no responde a medidas generales y de primer nivel, y están estables hemodinámicamente. Los barbitúricos tienen un efecto neuroprotector por un descenso de los radicales libres, estabiliza la membrana neuronal y disminuye los requerimientos metabólicos cerebrales. También disminuye la PIC al modificar el tono cerebrovascular (produce vasoconstricción de arterias cerebrales). Sin embargo, produce serios efectos adversos: depresión miocárdica, hipotensión y alteraciones en la inmunidad. Su uso debe realizarse bajo monitorización estrecha e invasiva de la presión arterial, y es frecuente la necesidad conjunta de fármacos inotrópicos. La utilización profiláctica no está indicada<sup>87</sup>.
- *Cranectomía descompresiva*. La evidencia parece asociar la realización de craneoplastias extensas junto con duroplastia y eliminación del hueso con un mejor pronóstico neurológico y una menor mortalidad en aquellos pacientes con HTIC intratable o signos de herniación cerebral<sup>88,89</sup>.

#### **d) Medidas actualmente no recomendadas**

**Corticoides.** Usados habitualmente en el manejo del edema citotóxico asociado a cirugía de tumores del sistema nervioso central, su base teórica de utilización está en la estabilización de la barrera hematoencefálica (BHE) y en la disminución en la producción de LCR. Sin embargo, los estudios fase dos indican que el tratamiento de la HTIC no se asocia con un descenso de la mortalidad, un resultado neurológico adverso o un mayor control de la PIC. Por el contrario, aumenta el riesgo de infección bacteriana (principalmente, neumonía) así como produce una supresión del cortisol endógeno, que podría ser perjudicial<sup>90,91</sup>.

**Hipotermia.** A pesar de las esperanzas puestas en esta terapia, la evidencia científica no parece apoyar su uso. Los mecanismos básicos a través de los cuales la hipotermia protege al cerebro incluirían los siguientes: reducción en el metabolismo cerebral, efectos sobre el flujo sanguíneo cerebral, reducción de las necesidades de oxígeno, antagonista del calcio, bloqueo de mecanismos excitotóxicos, conservación de la síntesis proteica, modulación de la respuesta inflamatoria, descenso en el edema cerebral, protección de la materia blanca y modulación de la apoptosis<sup>92</sup>.

En las últimas guías de la *Brain Trauma Foundation* se recomendaba el uso de la hipotermia moderada (Tª central 32-34°C) como tratamiento precoz de la HTIC que no responde a otras medidas<sup>78</sup>. Sin embargo, en esas mismas guías clínicas ya se advertían de que el resultado del estudio “*Cool Kids*” podía modificar e invalidar estas conclusiones. En dicho estudio, los investigadores asignaron aleatoriamente pacientes pediátricos con un TCE severo a un grupo con hipotermia moderada o con normotermia, valorando variables como la mortalidad, escala pronóstica de Glasgow a los 3 meses y la incidencia de efectos adversos serios. El estudio se interrumpió cuando se habían reclutado menos de un cuarto de los pacientes debido a que no se encontraron ninguna diferencia en las variables medidas<sup>93</sup>. Un meta análisis que recoge los cinco ensayos clínicos de hipotermia tras TCE publicados hasta la fecha no encontró que la diferencia entre la odds ratio de muerte en el grupo de hipotermia fuera mayor comparado con el grupo de normotermia, y los autores se declaran preocupados por la tendencia al incremento de riesgo en los pacientes con hipotermia, a pesar de no ser significativa. Por este motivo recomiendan el cese de los estudios en los pacientes con TCE e hipotermia<sup>94</sup>.

## 1.4.- Nuevos tratamientos farmacológicos en el TCE

En los últimos años, paralelamente al mayor conocimiento en la fisiopatología del DCT primario y secundario, se han desarrollado nuevos tratamientos que intentan bloquear o estimular diferentes dianas terapéuticas. La mayoría se encuentran en fase experimental, y muy pocos se han comenzado a utilizar en estudios preliminares en humanos<sup>95</sup>. Sin embargo, de los que se han iniciado estos estudios, la mayoría han fracasado. Existen fármacos que actúan exclusiva o principalmente sobre solo un mecanismo de DCS, mientras que otros bloquean los efectos deletéreos a múltiples niveles. Las tablas 1 y 2 resumen la mayoría de estos estudios.

### 1.4.1.- Fármacos que actúan sobre un mecanismo patogénico

Como se ha comentado previamente, la inflamación viene mediada por la liberación de diferentes citocinas, de entre las cuales destaca la IL1 $\beta$ <sup>38</sup>. Ésta regula la activación de señales intracelulares en los astrocitos que pone en marcha la astrocitosis reactiva. En un modelo con ratones la administración de un anticuerpo neutralizante de la IL1 $\beta$  en el espacio intratecal, desde los primeros 5 minutos tras el traumatismo y diariamente hasta un total de 14 días disminuyó la activación de la microglía, el infiltrado granulocitario, la pérdida de tejido cerebral y los déficits neurológicos tras un TCE<sup>96</sup>.

Un análogo del tripéptido protector Glypromate<sup>®</sup>, el NNZ-2566, tiene efectos neuroprotectores dada la capacidad de modular la expresión de múltiples mediadores inflamatorios, como la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ )<sup>97</sup>. Actualmente existen dos estudios Fase II que buscan conocer el efecto de este fármaco en pacientes con TCE (estudio INTREPID2566; NCT01366820, NCT00805818), sin que se hayan comunicado aún resultados provisionales.

También la apoptosis es una diana terapéutica. Una ruta final de activación de la muerte celular programada la conforma la vía de las caspasas<sup>45</sup>. La administración de un inhibidor de la caspasa 3 ha demostrado el descenso en la intensidad de la apoptosis y del volumen del tejido cerebral dañado tres semanas tras el TCE, pero sin encontrar diferencias en la evolución neurológica<sup>98</sup>. La ciclosporina es un inmunosupresor que también reduce la pérdida de volumen cerebral tras un TCE, actuando mediante el bloqueo de poros de permeabilidad sensibles a Ca<sup>2+</sup><sup>99,100</sup>. Existe un análogo no inmunosupresor de la ciclosporina, NIM811, equivalente a ésta en disminuir la fragmentación del citoesqueleto y que ha demostrado mejorar la respuesta motora en un modelo con ratones de TCE<sup>101</sup>. Una dosis de 10 mg/kg de este fármaco en ratas se asocia con una mejoría en el funcionamiento de la mitocondria, un descenso en el estrés

oxidativo y una mejoría cognitiva<sup>102</sup>. Este fármaco tendría la ventaja de modular la apoptosis celular sin producir la inmunosupresión sistémica de la ciclosporina.

Los CUH tienen un papel crucial en la transmisión del estímulo apoptótico. Su bloqueo ha sido estudiado mediante el uso de carbexenolona y octanol, ambos antagonistas de estos canales. Se ha demostrado *in vitro*, en cultivos tisulares neuronales monocapa, que la administración de estos productos disminuye el área de daño celular traumático a solo el punto de impacto, sin que se produzca propagación a distancia. Igualmente, la inhibición de la expresión del principal componente de la CUH disminuyó la propagación de la muerte cerebral<sup>103</sup>.

Dado que el principal responsable de la tumefacción celular de los astrocitos, y por tanto del edema cerebral, está mediado por la Acp-4, su inhibición es un interesante objetivo de investigación. Experimentalmente, se sabe que la administración de  $Zn^{2+}$  bloquea este transportador de manera reversible<sup>104</sup>.

La bradicinina, un mediador inflamatorio del sistema kinina-kallicreína, aumenta la permeabilidad de la BHE tras un TCE, produciendo edema cerebral vasogénico<sup>105</sup>. Bradikor (deltibant), un antagonista de los receptores de Bradicininina, no demostró eficacia en un estudio multicéntrico de fase II comparado con placebo<sup>106</sup>. Anatibant, un antagonista del receptor B2 de la Bradicininina, reducía el edema cerebral en animales de experimentación y fue seguro en estudios fase I<sup>105</sup>. Se ha realizado un estudio en Fase II (BRAIN TRIAL) en el que los objetivos fueron la descripción de efectos adversos secundarios y encontrar la dosis eficaz para plantear un estudio en Fase III. Los resultados no hallaron efectos adversos serios en el grupo de tratamiento, aunque tampoco encontraron ningún beneficio<sup>105</sup>. El estudio no reclutó al total de pacientes que se planificaron, debido a que se suspendió por a un litigio entre la empresa que patrocinaba el estudio y los investigadores, y existen dudas sobre la veracidad de los datos que presentan<sup>107</sup>.

El glutamato es uno de los principales mediadores de la toxicidad neuronal inmediata. Sin embargo, los estudios en pacientes que usaron antagonistas de los receptores NMDA han fracasado en demostrar un efecto beneficioso claro, replanteándonos su papel en el DCT secundario<sup>61,69,108,109</sup>. Un ensayo clínico con un antagonista de canales NMDA (Selfotel) fue suspendido debido a la preocupación por el aumento de efectos adversos y de mortalidad respecto al grupo control tras su administración en pacientes adultos con un TCE grave<sup>57</sup>. Otros antagonistas del receptor NMDA han fallado a la hora de demostrar resultados en ensayos clínicos en humanos como fueron el Licostinel<sup>56</sup>, Aptiganel<sup>58</sup> y Givestinel<sup>59</sup>. El desanabinol, un antagonista NMDA cannabinoide, añade al efecto antagonista del glutamato la protección

frente al edema cerebral citotóxico. Se realizó un estudio fase III, multicéntrico, que incluyó a 861 pacientes con un TCE grave. Se les administró una dosis única del fármaco dentro de las primeras 6 horas tras el TCE y se comparó frente al placebo. El ensayo clínico demostró que el fármaco era seguro, pero no era eficaz en el tratamiento del TCE grave (su variable principal fue una mejoría en la escala pronóstica de Glasgow a los seis meses)<sup>60</sup>.

El magnesio ( $Mg^{2+}$ ) intravenoso tiene un efecto protector potencial porque bloquea los canales NMDA, los canales de  $Ca^{2+}$  y estabiliza las membranas neuronales. Sin embargo, en un ensayo clínico doble ciego en adultos, el tratamiento mediante infusión continua con sulfato de magnesio iniciado en las primeras ocho horas tras el TCE y durante un total de cinco días tampoco tuvo efectos neuroprotectores, e incluso incrementó la mortalidad comparándolo con el placebo<sup>110</sup>.

Otro mecanismo de toxicidad neuronal son la formación de radicales libres (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno), que pueden causar daño a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y desencadenar muerte celular. Se han probado diferentes agentes antioxidantes como el polietilén glicol conjugado SOD (PEG-SOD o pegorgotein), aunque en un estudio clínico en fase III frente a placebo, no ha demostrado diferencia estadística en el pronóstico neurológico o en la mortalidad a los tres o seis meses<sup>111</sup>. Otra molécula, la superóxido dismutasa lecitinizada (PC-SOF), previene la pérdida neuronal en neuronas del hipocampo (región CA3) a los 3 y 7 días tras un TCE en un modelo de ratas<sup>112</sup>. Sin embargo, aún no se ha realizado un estudio en humanos para confirmar su efecto.

Otra molécula importante en la señalización del DCT secundario es el  $Ca^{2+}$ . El nimodipino es un bloqueante de canales de  $Ca^{2+}$  que se ha usado en un intento de revertir el vasoespasmo secundario al TCE, manteniendo el flujo sanguíneo cerebral y de esta manera evitar el DCS. En pacientes con hemorragia subaracnoidea secundaria a la ruptura espontánea de un aneurisma, disminuye la posibilidad de un mal resultado neurológico a largo plazo tras su administración oral. Sin embargo, un metaanálisis de estudios publicados que incluían más de mil pacientes con hemorragia subaracnoidea tras un TCE no demostró una mejoría ni en la mortalidad (Nimodipino 39%, Placebo 40%, no significativo) ni en cuanto a mejor pronóstico neurológico (Nimodipino 26%, Placebo 27%, no significativo)<sup>113</sup>.

### 1.4.2.- Fármacos que actúan a varios niveles

La edaravona ha demostrado efectos neuroprotectores en modelos de experimentación animal reduciendo el estrés oxidativo, la muerte celular programada, la activación glial y astrocitaria, la producción de citocinas inflamatorias, el edema cerebral, la permeabilidad de la BHE y los déficits neurológicos tras un TCE<sup>114</sup>. Este efecto es mayor cuando se administra en las primeras tres horas tras la agresión<sup>115</sup>. No se ha probado en humanos.

Actualmente está en estudio un agonista de los receptores cannabinoides 1 y 2, denominada BAY/KN 38-7271, y que en modelos experimentales en ratas de TCE produce una disminución del área dañada cuando se aplica en las primeras horas<sup>116</sup>. Un estudio aleatorizado, doble ciego, comparado con placebo, Fase IIa, no halló efectos adversos serios y la supervivencia fue mayor en los grupos de tratamiento comparado con placebo al mes de seguimiento, aunque dichas diferencias desaparecieron a los seis meses<sup>117</sup>.

La progesterona, administrada a dosis relativamente elevadas durante las primeras horas, en estudios preclínicos limita el daño cerebral, reduce la pérdida de tejido neuronal y mejora la recuperación funcional<sup>118</sup>. Los mecanismos por los que parece que actúa son restaurando la BHE, frenando el edema cerebral, disminuyendo la cascada inflamatoria y limitando la necrosis y apoptosis celular<sup>119</sup>. Un metanálisis publicado en 2012 que incluyó a tres estudios en adultos con un total de 315 pacientes concluyó que el riesgo relativo conjunto para mortalidad al final del seguimiento fue de 0,61 (Intervalo de confianza del 95% [IC95%] 0,4-0,93), y para la variable muerte o incapacidad grave en el grupo de progesterona fue de 0,77 (IC 95% 0,62-0,96). No se encontraron diferencia en incidencia de efectos adversos (tromboembolismo, hipotensión o infección) o control de PIC (solo informado en un estudio)<sup>120</sup>. Los autores del metaanálisis concluyen que, aunque parece que la progesterona puede ser eficaz en el tratamiento del TCE, son necesarios más estudios para corroborar esta afirmación.

La eritropoyetina (EPO) es una citocina producida en el cerebro humano en respuesta a múltiples estímulos dañinos<sup>121</sup>. La unión de la EPO a su receptor (EPOr) lo dimeriza, induciendo la autofosforilación de la proteína JAK-2 y la activación del receptor<sup>122</sup>. La activación de JAK-2 induce la fosforilación de vías de señalización intracelular como la PI3K y Akt, y otras vías extracelulares como ERK1/2, promoviendo la migración de progenitores neuronales en células de ratones<sup>122</sup>. Igualmente, la administración incrementa el porcentaje de nuevas células generadas que pueden diferenciarse hacia células neuronales maduras, aumenta la producción del factor de crecimiento neuronal derivado del cerebro (BDNF) y mejorar el aprendizaje espacial<sup>123,124</sup>. En humanos, ha finalizado un estudio en fase I, en el que no se ha podido de-

mostrar efectividad (neuroprotección o mejora del resultado adverso) ni tampoco efectos adversos con el tratamiento con EPO, si bien la randomización del estudio no fue la ideal<sup>125</sup>. Existen otros 3 estudios pendientes de finalizar para aclarar su efecto (NCT00987454, NCT00313716, NCT00375869).

La ketamina es un fármaco sedante y analgésico que se utiliza tanto para inducción de anestesia como en sedación continua en pacientes con ventilación mecánica. La ketamina ha demostrado efectos antiinflamatorios en diferentes modelos experimentales, disminuyendo la concentración de diferentes citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ )<sup>126</sup>. Aunque no hay estudios de calidad en pacientes con TCE, diferentes estudios retrospectivos parecen apoyar su seguridad tanto en la secuencia de intubación, su uso como anestésico intraoperatorio y en el manejo de pacientes ventilados con TCE<sup>72,127</sup>. Además, su uso junto con otros anestésicos no parece incrementar la PIC<sup>127</sup>. No obstante, no existen en la actualidad ensayos clínicos bien diseñados que demuestren este efecto, y la ketamina según ficha comercial sigue estando contraindicada como fármaco en la secuencia de intubación rápida en pacientes con sospecha de TCE o HTIC.

Las soluciones de perfluorocarbonados son moléculas biológicamente inertes con gran afinidad por el oxígeno y por el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) que pueden aumentar la oxigenación tisular cuando se usan junto con concentraciones de oxígeno inspirado altas. Un estudio en animales ha demostrado que la dilución isovolémica con uno de estos compuestos (Oxycyte®), produce un aumento en la presión parcial de oxígeno (PaO<sub>2</sub>) y en el contenido de oxígeno en la sangre (CaO<sub>2</sub>), sin influir sobre el pH, pCO<sub>2</sub>, o el flujo sanguíneo cerebral, cuando se compara con la administración con albúmina<sup>128</sup>. En un modelo en ratas de TCE cerrado, este compuesto se asoció con una mejora en la función cognitiva, menor pérdida neuronal en la región del hipocampo CA3 y en el consumo de oxígeno mitocondrial<sup>129</sup>. Se desconoce si el incremento de la concentración de oxígeno puede tener efectos perjudiciales por un aumento en la formación de radicales libres<sup>130</sup>. Existe un estudio en fase IIb que se está llevando a cabo para demostrar su seguridad y eficacia en pacientes con TCE grave (NCT00908063).

Las estatinas, inhibidores de la síntesis de colesterol, también tienen un efecto protector en base a múltiples mecanismos: mejoran la función endotelial, aumentan la disponibilidad de óxido nítrico (NO), son antioxidantes, inhiben la respuesta inflamatoria, tienen propiedad inmunomoduladora, aumentan la expresión de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), disminuyen la activación plaquetaria, regulan la angiogénesis, neurogénesis y la sinaptogénesis<sup>131</sup>. En animales de experimentación, promueve la síntesis de factores de crecimiento, in-

crementa la proliferación celular y la diferenciación neuronal, e incrementa la recuperación del aprendizaje espacial<sup>132</sup>. También reduce los déficits neurológicos, la degeneración de las neuronas del hipocampo, la respuesta inflamatoria y mejora la hemodinámica cerebral<sup>133</sup>. En humanos, se han realizado dos estudios clínicos con rosuvastatina. En el primero no se encontró diferencia en el marcador incapacidad a los tres meses, aunque sí mejoraba la amnesia<sup>134</sup>. El segundo demostró una mejoría en algunos marcadores de inflamación (TNF $\alpha$ ) sin afectar a otros (IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-10), pero sí que se encontró una mejora en las puntuaciones de invalidez y sin encontrar efectos secundarios adversos<sup>135</sup>.

Además estudios de experimentación animal demostraron que la administración de atorvastatina junto con células madre mesenquimales (MSC) incrementa el acceso y la supervivencia de las células trasplantadas en el tejido cerebral, potenciando la recuperación funcional comparada con monoterapia, y amplifica la proliferación celular endógena<sup>136,137</sup>.

La citicolina es un intermediario en la generación de fosfatidil-colina desde la colina. El cerebro usa la colina para sintetizar el neurotransmisor acetil colina y otros componentes de la membrana celular. La citicolina aumenta la disponibilidad de la colina para la síntesis de neurotransmisores y membranas celulares incrementando así la reparación<sup>138</sup>. El estudio COBRIT fue un estudio en Fase III, randomizado y doble ciego, que se diseñó para determinar si la citicolina (2 mg vía oral diariamente durante 90 días) mejoraba el resultado funcional o cognitivo en pacientes adultos con TCE<sup>139</sup>. Los resultados demostraron que en ningún subgrupo de TCE mejoró en las escalas de evaluación<sup>139</sup>.

El óxido nítrico activa la guanilato ciclasa soluble, llevando a la formación de GMP cíclico (GMPc). Como segundo mensajero, el incremento en los niveles aumenta la proliferación de células endoteliales y neuronas motoras. Los niveles de de cGMP se pueden incrementar por aumento del NO, o por inhibición de la hidrólisis de GMPc por inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (Sildenafil)<sup>131</sup>.

En resumen, se puede afirmar que, aunque se han testado varias moléculas en diferentes estudios, no se ha conseguido encontrar aún un fármaco que actúe como una “bala mágica” que mejore la supervivencia o la disfunción neurológica tras un TCE. Las tablas 1 y 2 muestran un resumen de los diferentes ensayos clínicos para el tratamiento farmacológico del TCE.

**Tabla 1.- Ensayos clínicos finalizados o recientemente iniciados para el tratamiento farmacológico del TCE.**  
 NICHD: National Institute of Child Health and Human Development; NINDS: National Institute of Neurological Disorders and Stroke, USA; EPO: eritropoyetina; EPOrH: EPO recombinante humana; IGF-1: Factor de crecimiento insulínico 1.

Fármaco/Empresa	Mecanismo de acción	Estado actual
Anatibant (XY2405) / Xytis	Antagonista receptor de bradiquinina B2	Fase II (BRAIN TRIAL) <sup>105</sup>
Darbopoietina alfa (Amgen's Aranesp®) / Universidad Alberta	Activación de receptores de EPO previniendo la exocitosis del glutamato al espacio extracelular cerebral	Fase II
EPOrH / Colegio médico Wisconsin	Múltiple: antiapoptótico y disminuye el edema cerebral	Fase II/III <sup>125</sup>
KN 38-7271 / KeyNeurotek AG	Agonista de receptor cannabinoide CN1/CN2	Fase II <sup>117</sup>
NNZ-2566 / Neuren Pharmaceuticals	Análogo de Glypromato® (Glicil-Prolin-Glutamato, derivado de IGF-1)	Completada la fase I, Fase II iniciada en 2008
Ketamina / Universidad Arkansas	Posible efecto neuroprotector	Fase I
Oxycyte / Syntetic Blood International SA	Aumenta los niveles de oxígeno en el cerebro	Fase IIb
Progesterona iv / NINDS	Reducción del edema y daño cerebral	Fase III <sup>120</sup>

**Tabla 2.- Estudios actualmente interrumpidos para el tratamiento farmacológico del TCE.** NIH: National Institute of Health; NICHD: National Institute of Child Health and Human Development; NINDS: National Institute of Neurological Disorders and Stroke; NMDA: N-metil-D-Aspartato; SNC: Sistema nervioso central; TCE: traumatismo craneoencefálico

Fármaco/Empresa	Mecanismo de acción	Estado actual
ACEA 1021 (licostinel)/ NIH	Antagonista del glutamato (región Glicina)	Interrumpido en Fase I <sup>56</sup>
BAY X 3702 / Bayer	Agonista serotoninérgico, bloqueante de canales iónicos	Finalizado después de Fase II
Bradycor / Cortech	Antagonista de receptores de Bradicinina	Sin beneficio en estudios Fase II <sup>106</sup>
Cerestat (Aptiganel) / Cambridge Neuroscience	Antagonista no competitivo del glutamato (Región NMDA)	Finalizado en Fase III <sup>58</sup>
Corticoides	Neuroprotector y antioxidante	Estudio Fase III (CRASH) no demostró eficacia <sup>90</sup>
Citolina / NICHD, USA	Componente endógeno, aumento de colina cerebral	Fase III (COBRIT) <sup>139</sup>
Desanabinol / Pharmos	Cannabinoide que inhibe la reacción inflamatoria en el SNC	Completada Fase III pero no demostró eficacia <sup>60</sup>
Gavestinel	Antagonista NMDA (sitio Glicina)	Fase III, sin efectividad <sup>59</sup>
Sulfato de Magnesio / NINDS	Antagonista no competitivo NMDA	Fase III no demostró eficacia <sup>110</sup>
Nimodipino / Bayer	Calcio antagonista	Sin efecto significativo en TCE <sup>113</sup>
PEG-SOD	Antioxidante	Estudio en Fase III no demostró eficacia <sup>111</sup>
Prednisona / Genérico	Neuroesteroide / Neuroprotector	Fase II muestra algún beneficio
Selfotel / Novartis	Antagonista competitivo glutamato (sitio NMDA)	Terminado en Fase III <sup>57</sup>
Mesilato Tirilazado / Pfizer	Inhibidor de peroxidación lipídica	Fase III sin beneficio
Traxoprodilo (CP101.606) / Pfizer	Antagonista de la subunidad N2B del receptor NMDA	Fase IIa sin beneficio <sup>140</sup>
Ziconotide (SNX-111)	Antagonista no-NMDA	Fase II finalizado por una mayor mortalidad en el grupo de tratamiento

## 1.5.- Terapia celular en patología cerebral

En los últimos años se ha producido un cambio de perspectiva respecto a la capacidad del cerebro de regenerarse tras una lesión aguda. Se ha acumulado cada vez más evidencia experimental que el cerebro es capaz de inducir su regeneración mediante la renovación tanto del tejido de soporte como neuronal. Este conocimiento ha sido el fundamento teórico para un nuevo campo de investigación clínica en diferentes patologías cerebrales en las que la pérdida celular supone parte de su mecanismo patogénico, incluyendo el TCE.

### 1.5.1.- Neurogénesis endógena

Existen dos zonas principales donde reside la mayor capacidad neurogénica en el cerebro humano: la zona subventricular de los ventrículos laterales (ZSV) y el hipocampo (zona subgranular del giro dentado [ZSG])<sup>141</sup>. La zona más estudiada es la ZSV, donde existe un cúmulo de astrocitos que son capaces de proliferar in vivo y que se comportan como células progenitoras multipotenciales in vitro<sup>142</sup>. En el cerebro adulto normal, menos del uno por ciento de estos astrocitos se encuentran en división activa, y aunque se ha conseguido su expansión en cultivos, no se ha estudiado su comportamiento tras un TCE<sup>143</sup>. Las células progenitoras neuronales (CPN) del hipocampo han sido menos estudiadas, aunque también han demostrado in vitro ser capaces de comportarse como progenitores multipotenciales<sup>144</sup>. En los últimos años existe cada vez mayor evidencia de que otras regiones del sistema nervioso central (SNC), como el neocórtex, cerebelo, cuerpo estriado, amígdala, sustancia negra y la cadena ganglionar paraespinal poseen algún grado de neurogénesis<sup>145</sup>.

En ambas localizaciones las CPN se agrupan formando nichos funcionales altamente especializados. Estos nichos contienen células que son inmunorreactivas para la GFAP, nestina y eventualmente el marcador de glia radial (RC2)<sup>141</sup>. Muestran características específicas de células madre como son la capacidad ilimitada para la autorenovación, la habilidad indefinida para proliferar en respuesta a mitógenos y de poder diferenciarse en diferentes líneas de células del neuroectodermo. En el cerebro humano adulto también se encuentran células multipotentes, que también muestran la capacidad de proliferar, pero con una capacidad limitada de autorrenovación y se pueden diferenciar en al menos dos diferentes líneas celulares. Los progenitores específicos son células que están restringidas a una estirpe celular concreta (como neuronas, astrogliá u oligodendrogliá). Estos tres tipos de células juntas forman, hablando ampliamente, las CPN<sup>141</sup>.

El nicho germinal es el microambiente altamente especializado donde las diferentes CPN interactúan entre ellas y con el resto del organismo (ilustración 7). Estos nichos germinales localizados tanto en la ZSV como en la ZSG del hipocampo alojan en su interior las diferentes células que permiten el mantenimiento y diferenciación de las diferentes CPN<sup>146</sup>. Las células madre neuronales propiamente dichas son las que muestran características estructurales y moleculares de astrocito (células tipo B). Estas células están en contacto íntimo con el resto de células del nicho, incluyendo las células tipo C (progenitor multipotencial) y las células tipo A (neuroblastos migratorios). La línea de diferenciación celular iría desde el tipo B, hasta el tipo C y luego el tipo A. El mantenimiento y diferenciación de las células madre parece que está relacionada con el contacto físico con la lámina basal, que actúa como andamiaje y modulador de las citocinas y los factores de crecimiento derivado de células locales (fibroblastos, macrófagos y pericitos)<sup>141</sup>.

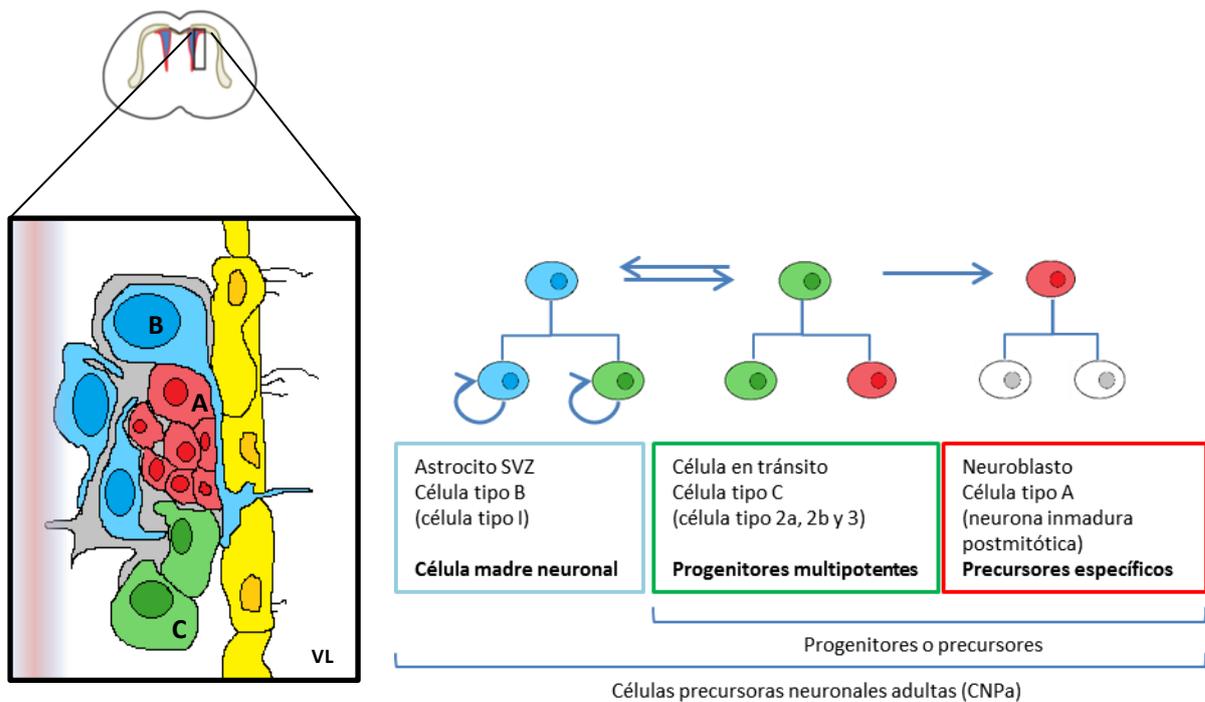


Ilustración 7.- El nicho germinal y las células precursoras. A) Esquema de un nicho germinal en la zona subventricular de un cerebro de rata, mostrando la estrecha relación entre los diferentes tipos celulares, el epidídimo (amarillo) y los vasos sanguíneos (gris). B) Esquema de diferenciación de los diferentes tipos celulares que conforman el nicho germinal, mostrando la capacidad de autorenovación (células tipo B, azules) como de diferenciación hacia estirpes más comprometidas con líneas celulares (neuroblasto: célula tipo A, rojas). VL: Ventrículo lateral; SVZ: zona subventricular.

En los modelos animales murinos usados para investigar la neurogénesis tras un TCE han mostrado que el número de CPN tanto en la ZSV como en el hipocampo se incrementan tras un TCE. Este proceso es más potente en animales jóvenes. Las CPN que surgen de la ZSV

tienen capacidad de migrar a zonas de daño cortical focal, mientras que las originadas en el hipocampo proliferan tras un daño cerebral difuso. No obstante, el número de células que surgen mediante estos procesos es pequeño en comparación con la formación simultánea de astrocitos y oligodendrocitos, y sobrepasa la destrucción celular tras la lesión<sup>143</sup>.

En modelos animales de daño focal, se ha demostrado un incremento en los progenitores derivados de la ZSV entre dos y cuatro veces mayor que en situación basal<sup>143</sup>. Estas células aparecen desde el segundo día hasta dos semanas tras el TCE, y proceden tanto de la zona ipsilateral como la contralateral. Estos CPN exhiben marcadores de células neuronales maduras (NeuN, calcibindina,  $\beta$ -tubulina) y se ha demostrado que se integran dentro de la arquitectura cerebral básica<sup>143</sup>.

En estudios en pacientes adultos que fallecieron tras un cáncer, se ha demostrado que el hipocampo es otra fuente de CPN. Tras un TCE grave, una de las secuelas son los déficits en el aprendizaje y en la memoria. Estos déficits se han asociado con cambios histológicos y pérdida neuronal tanto en el giro dentado (GD) como en la región CA1 del hipocampo<sup>147</sup>. En modelos animales de TCE, se ha observado un incremento entre 3 y seis veces mayor de estos precursores, iniciándose desde el día +3 hasta el día +35 tras el TCE. Este incremento se observa principalmente en el hipocampo ipsilateral, aunque cierta respuesta menor se ha observado también en el contralateral<sup>143</sup>. Estos progenitores se diferencian principalmente en células neuronales, y existe evidencia experimental de que alcanzan la integración estructural y funcional en las regiones migradas, que tienen su correlato funcional en diferentes test que evalúan el aprendizaje y la habilidad espacial tras un TCE<sup>143</sup>.

Aunque el hipocampo se daña tras un TCE, la mayor cantidad de células neuronales destruidas se encuentran en el córtex cerebral. Se está estudiando la existencia de CPN en el propio córtex cerebral, y que dichas células sean capaces de responder mediante proliferación, maduración y diferenciación a células neuronales maduras tras un TCE, de manera análoga a como lo realizan las células derivadas tanto del hipocampo como de la ZSV. Aún no está claro si estas células son células residentes primarias de dicha zona o son células que han migrado de zonas más distantes y que se detectan en tránsito<sup>148</sup>.

Se ha observado que los mecanismos descritos en los apartados previos de proliferación y diferenciación neuronal endógena son más intensos en modelos animales jóvenes, y que parte de la mayor recuperación funcional en estos animales respecto a los en adultos puede ser debido a esta respuesta potenciada. Los mecanismos por los que se producen no se conocen actualmente. Se desconoce si esta diferencia según la edad existe en humanos<sup>143</sup>.

Aunque la respuesta proliferatoria neuronal tras un TCE parece demostrada en modelos animales y existe cada vez más evidencia de una respuesta similar en humanos, la magnitud de dicha respuesta es pequeña en comparación con la pérdida neuronal. Una posible estrategia terapéutica es potenciar esta respuesta endógena para mejorar los resultados funcionales en los pacientes que sufren un TCE.

### **1.5.2.- Estrategias derivadas: aumento de la neurogénesis endógena**

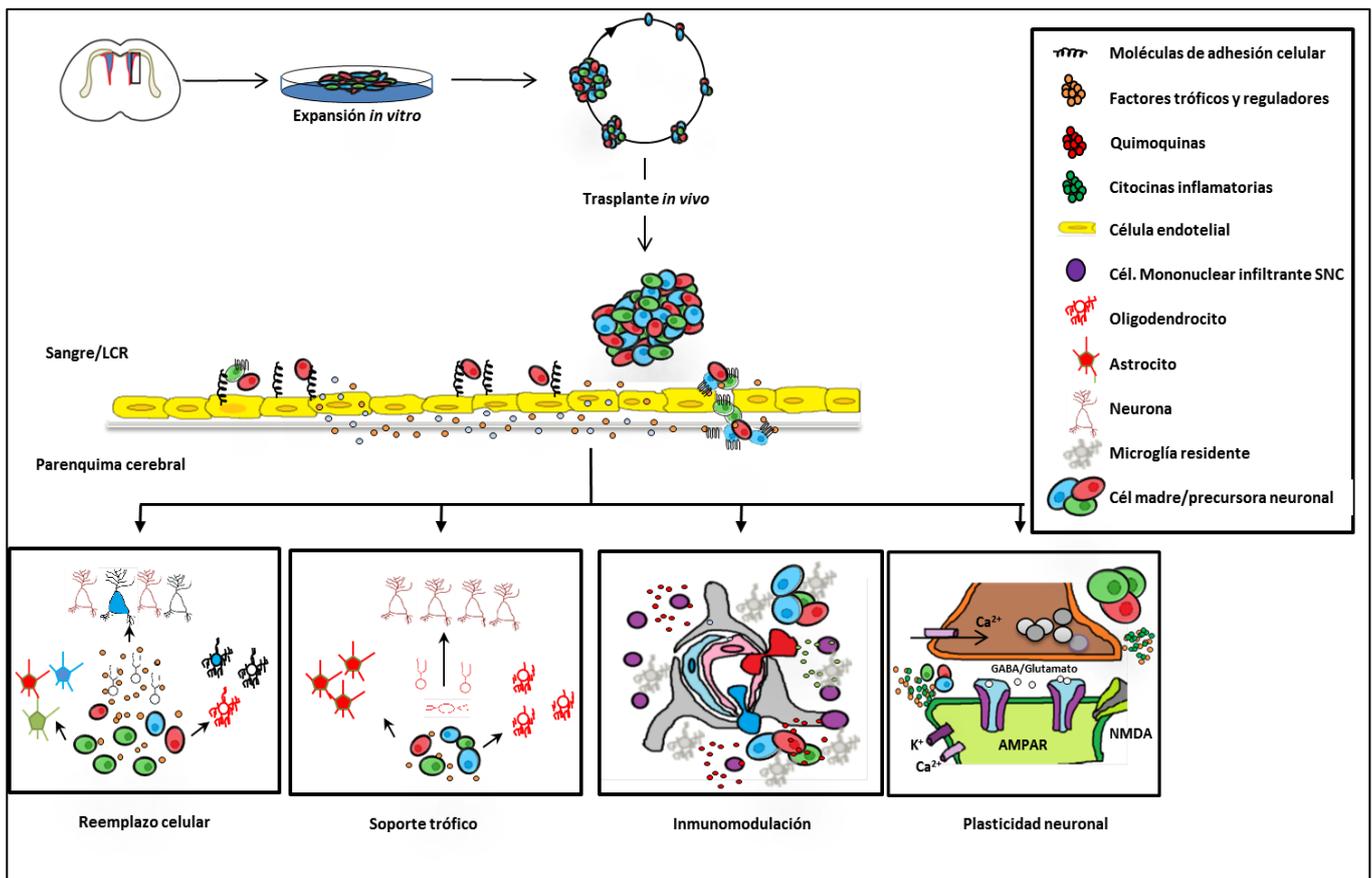
Actualmente no se sabe si la recuperación funcional tras un TCE es debido a la neurogénesis endógena o si otros procesos como la arborización dendrítica, la plasticidad funcional neuronal y la reorganización funcional tienen un papel mayor. Para diferenciarlo, en modelos animales de experimentación animal se han administrados diferentes factores que estimulan la neurogénesis endógena como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento endotelial (EGF), la proteína SB100 y la EPO. La administración aislada de estas sustancias aumentaba tanto el número de células progenitoras como sus formas maduras, y a su vez se asociaban con una mejoría en los test funcionales.

Con un mayor conocimiento del desarrollo de moléculas de señalización la movilización endógena de células neuronales progenitoras para la reparación glial o neuronal puede ser posible mediante la infusión de dichas sustancias, el aumento de su expresión o la inhibición de los factores que tengan el efecto contrario<sup>149</sup>. Para conseguir una mayor efectividad, esta estrategia debería ir acompañada de otras que aumenten su integración funcional, evitando la formación de cicatrices gliales, así como potenciar la sinaptogénesis. Se puede conseguir mediante la terapia física y ocupacional intensiva, con técnicas como el enriquecimiento ambiental, el ejercicio físico y el entrenamiento formal, que en modelos murinos han demostrado mejorarlos<sup>150</sup>.

### **1.5.3.- Estrategias derivadas: trasplante celular**

Como se ha comentado previamente, la aplicación de una noxa al tejido cerebral tanto de humanos como de roedores genera una respuesta en las células residentes de la ZSV y del hipocampo. Desgraciadamente, la respuesta regenerativa que ofrecen estas células es pequeña comparada con la pérdida neuronal y se ve limitada además por los cambios patológicos que suceden a la inflamación y cicatrización.

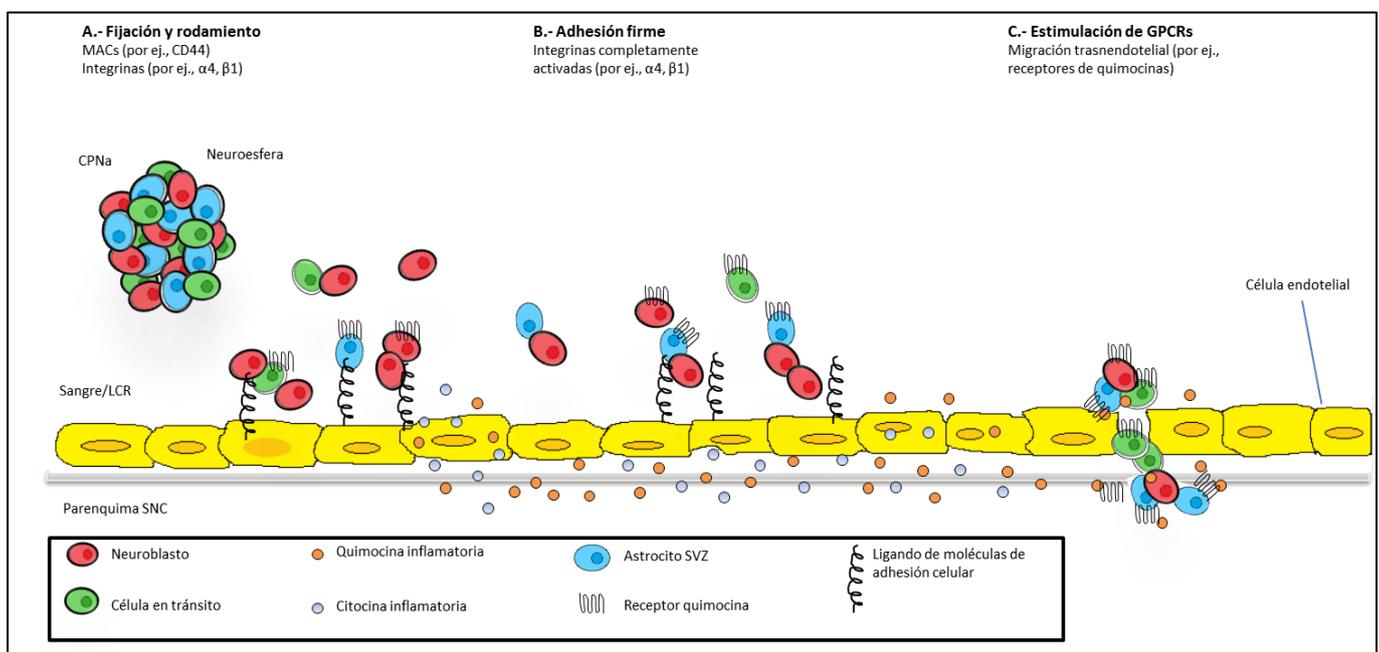
Una estrategia para tratar estas patologías es incrementar el número de células regenerativas mediante su infusión exógena (ilustración 8). Aunque al principio se creía que el mecanismo de acción de estas células era la sustitución del tejido cerebral dañado, los estudios experimentales apoyan cada vez que más fuerza que además las células madre neuronales tienen un efecto modulador de la respuesta inmune, favoreciendo el soporte de las endógenas que se hallan en riesgo de muerte cerebral y favoreciendo y dirigiendo la plasticidad neuronal<sup>151</sup>.



**Ilustración 8.- Mecanismos de acción de células madre neuronales.** Los resultados obtenidos de trasplantar células madre/progenitoras neuronales (CPNs) en modelos experimentales de enfermedades neurológicas (caracterizadas tanto por inflamación primaria seguida de neurodegeneración irreversible como por neurodegeneración primaria seguida de inflamación reactiva) apoyan el concepto de que las células madre somáticas favorecen la reparación del sistema nervioso central (SNC) mediante diferentes vías relacionadas entre sí. De esta manera, el concepto de la plasticidad terapéutica de la célula madre está apareciendo como resultado de diferentes condiciones patológicas. Las CPNs favorecen la neuroprotección no solo promoviendo el reemplazamiento celular, sino también mediante el soporte rescatando células neuronales endógenas (Efecto espectador = bystander effect). Este efecto es posible porque las CPNs son capaces de medir el ambiente inflamatorio (patotropismo) y, dentro de este ambiente, promueven la homeostasis y reparación tisular mediante la secreción, en el sitio del daño tisular (nicho perivascular atípico), de un conjunto de moléculas constitutivamente expresadas capaces de inmunomodular y ejercer un soporte trófico. El efecto final neto es neuroprotector porque las CPNs no solo rescatan células dañadas sino también promueven la plasticidad celular y molecular.

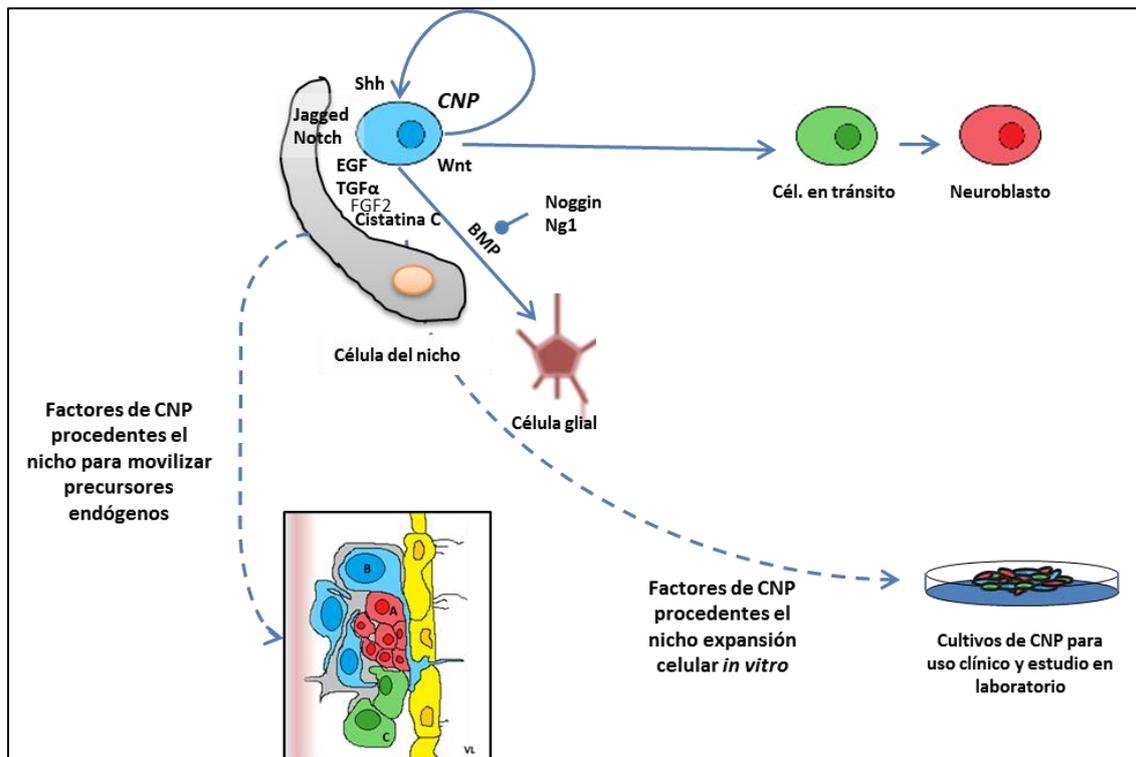
### Mecanismos de actuación de las células neuronales progenitoras (CPN)

Las CPN tienen capacidad de migrar e infiltrar los tejidos dañados (patotropismo)<sup>152</sup>. Se debe a que expresan receptores de citocinas (CCR1, CCR5, CXCR3 y CXCR4), moléculas de adhesión celular (CD44) e integrinas (VLA4) entre otras que permiten seguir los gradientes de citocinas e interleucinas que segregan el tejido del sistema nervioso central dañado (ver ilustración 9)<sup>151</sup>. Una vez que han alcanzado estas áreas, las CPN se alojan en la proximidad de los vasos sanguíneos donde interactúan con las células del sistema inmune que atraviesan la BHE, las células del sistema endotelial y con las células residentes del SNC (astrocitos y microglía)<sup>153</sup>.



**Ilustración 9.- Mecanismo por el cual las células neuronales/precursoras neuronales adultas son capaces de mimetizar las rutas de activación linfocitaria para alcanzar las zonas del SNC inflamadas después de su inyección intravenosa.** Este es un modelo simplificado de interacción entre la inyección sistémica de células madre/precursoras neuronales (CPNa) y el endotelio del SNC. A) Las CPNa expresan, para su adhesión y migración, moléculas de adhesión celular (CAMs, como el CD44) e integrinas (como la  $\alpha 4$ ), que interactúan con ligandos específicos (ácido hialurónico y la molécula de adhesión celular vascular tipo 1 [VCAM1], respectivamente) que son expresadas por células endoteliales inflamadas. B) Para adherirse firmemente y migrar a través del endotelio inflamado, las quimocinas activan sus receptores específicos (como CCR1, CCR2, CCR5, CXCR3 y CXCR4), que son expresados en la membrana plasmática de las CPNa, lo que promueve la activación completa de las integrinas  $\alpha 4$ . C) Las citocinas y quimocinas inflamatorias producidas por las células residentes del SNC, células sanguíneas y CPNa trasplantadas coordinan estos eventos secuenciales, lo que conlleva la activación de los receptores acoplados a las proteínas G (GPCRs) y su migración a través del endotelio. Las rutas moleculares usadas por las CPNa trasplantadas son similares a las que usan los linfocitos encefalitogénicos que se acumulan en los lugares inflamados en los modelos humanos y experimentales de esclerosis múltiple. LCR: líquido cefalorraquídeo; SNC: sistema nervioso central.

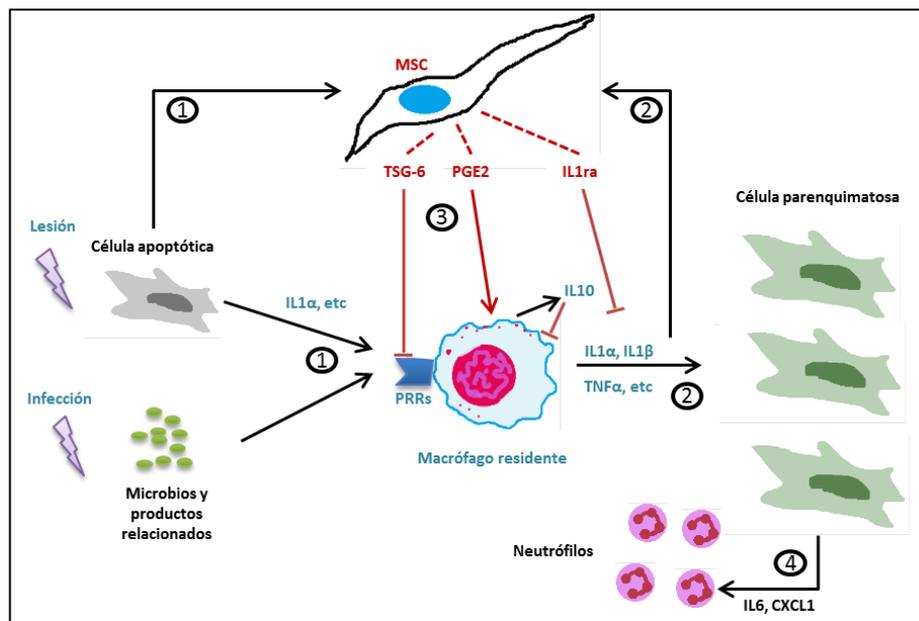
En el área perivascular, estas poblaciones celulares segregan una serie de moléculas (BMP4, noggin, Notch, Jagged y Sonic Hedgehog) que son capaces, por un lado, de simular el microambiente de los nichos germinales de la ZSV, y por otro, inhibir el ciclo celular de las CPN mediante la expresión de kinasas dependientes del ciclo celular (ilustración 10)<sup>141</sup>. Como consecuencia, las CPN trasplantadas mantienen un fenotipo indiferenciado y forman nichos ectópicos perivasculares, diferentes de los nichos de la ZSV y ZSG. En ellos son capaces de secretar una diversa cantidad de moléculas transmembrana y extracelulares capaces de inducir la reparación tisular a través de la inmunomodulación y la estimulación del mecanismo de reparación intrínseco (soporte trófico y plasticidad celular)<sup>141</sup>.



**Ilustración 10.-** Esquema de interacción de las diferentes señales estimuladoras del nicho celular de la ZSV y ZSG del hipocampo. La señalización vía Jagged-Notch y Shh puede ayudar al mantenimiento de la célula madre (Astrocito SVZ). Los factores FGF2 junto con Cistatina C, así como el grupo EGF/TGFα promueven la autorrenovación y la proliferación. Wnt promueve la proliferación celular y la Neurogénesis. Los antagonistas de BMP (Noggin, Ng1) inhiben la diferenciación glial mediada por BMP, así como promueven la Neurogénesis y mantienen la CPN en su estado indiferenciado. Todas estas señales extracelulares han probado tener diferentes y múltiples papeles en el nicho, dependiendo de la integración junto con diferentes factores celulares intrínsecos. Los factores del nicho identificados en la ZSV y en la ZSG pueden ser usados para expandir poblaciones de CPN *in vitro* obtenidos de tejidos cerebrales de adultos o diferenciados desde células embrionarias. La infusión cerebral de factores del nicho pueden también movilizar precursores endógenos para generar nuevas neuronas para la reparación cerebral. BMP: metaloproteasa cerebral; CPN: célula progenitora neuronal; EGF: Factor de crecimiento epitelial; FGF: Factor de crecimiento derivado de fibroblastos 2; Shh: Sonic hedgehog; TGFα: Factor de crecimiento tisular α. Tomado de referencia 149.

Estas áreas contienen CPN trasplantadas, linfocitos de la sangre, microglía activada, astrocitos reactivos y células endoteliales activadas. Son histológicamente diferentes de los ni-

chos germinales primarios, aunque mantienen su alta especialización. Existe una regulación simultánea entre estos grupos celulares que modula la supervivencia a largo plazo y su viabilidad. Dependiendo de los estímulos ambientales, las CPN pueden permanecer en el nicho atípico en su estado indiferenciado, y de ese modo promover la apoptosis de las células inflamatorias linfocitarias que han infiltrado el SNC, o salir del nicho y adquirir un fenotipo diferenciado a una estirpe celular, sustituyendo a las células dañadas<sup>154</sup>.

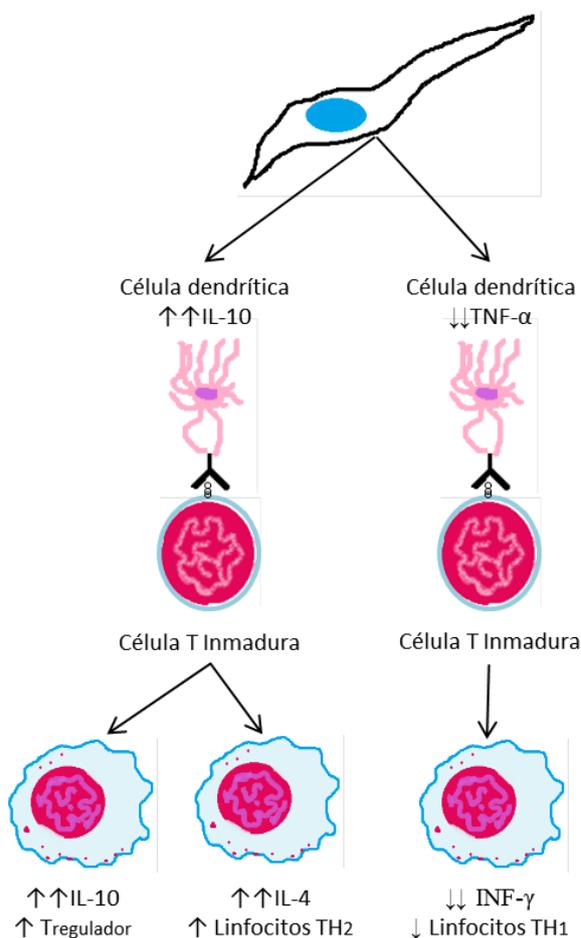


**Ilustración 11.-** Resumen de algunas de las propiedades antiinflamatoria de las células madre mesenquimales. 1) Los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) y la IL1 $\alpha$  secretados por lesiones estériles o los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) liberados por una lesión infecciosa a los tejidos activan los macrófagos residentes a través de receptores que en conjunto suponen los receptores de patrones de patógenos (PRRs). 2) Los macrófagos activados producen citocinas inflamatorias como la IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  para iniciar la cascada inflamatoria. 3) Al mismo tiempo, las citocinas proinflamatorias y seguramente otras señales de las células dañadas activan las MSCs para secretar factores antiinflamatorios que incluyen el gen/proteína 6 estimulado por TNF $\alpha$  (TSG-6), PGE $_2$ , e IL1ra, que modulan la activación de los macrófagos residentes o disminuyen los efectos de las citocinas proinflamatorias. 4) El efecto total es un descenso en las señales proinflamatorias producidas por las células parenquimatosas a través de la secreción de IL6, CXCL1 u factores relacionadas que como resultado disminuye el reclutamiento global de neutrófilos. Tomado de referencia 155.

La *inmunomodulación* está resultando uno de los mecanismos que explican los efectos beneficiosos de las células madre (ilustración 11). Los diferentes modos de actuación son múltiples y no se sabe aún cuales predominan en una situación determinada. Estos mecanismos se han visto que muchas veces son comunes en otros grupos celulares multipotentes, como las MSC. En modelos arquetípicos de inflamación (daño pulmonar, daño corneal, infarto de miocardio, peritorinitis y sepsis), se ha demostrado que, en general, las MSC tienen un efecto neuromodulador y antiinflamatorio mediante diferentes mecanismos<sup>155,156</sup>. Uno de ellos es la expresión del IL1ra. Un segundo modo de actuación es la creación de un mecanismo de regulación a la baja, en el que los macrófagos residentes del SNC segregan TNF- $\alpha$  y otras citocinas

proinflamatorias que estimulan a las CPN para producir la proteína antiinflamatoria TSG-6 (gen/proteína 6 estimulada por  $TNF-\alpha$  = *TNF- $\alpha$  stimulated gene/protein 6*). La TSG-6 reduce la señalización intracelular del factor nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$  $\beta$ ), disminuyendo la cascada de citocinas inflamatorias. Un tercer mecanismo es la estimulación de las CPN por parte de los lipopolisacáridos,  $TNF-\alpha$ , óxido nítrico y otras moléculas de daño celular del tejido dañado y los macrófagos circulantes, lo que permite a las CPN secretar prostaglandina E2 (PGE-2). La PGE-2 convierte a los macrófagos a un fenotipo que secreta IL10, con un efecto antiinflamatorio<sup>155</sup>.

En concreto usando un modelo de TCE en ratas a los que se infundió MSC iv a las dos horas del traumatismo y se comparó con un grupo placebo, se objetivó que en el grupo de tratamiento había una menor densidad de macrófagos/microglía y leucocitos periféricos infiltrando la zona de la lesión, menor apoptosis, unos menores niveles de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17,  $TNF-\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) y mayores niveles de citocinas antiinflamatorias (IL-10 y factor de crecimiento tisular  $\beta$ 1 [TGF- $\beta$ 1]) a la 48 y 72 horas tras la infusión. Posiblemente este patrón secretor estuvo mediado por un aumento en la expresión de TSG-6, lo que puede suprimir la activación de la ruta de señalización de factor nuclear  $\kappa$  $\beta$  (NF- $\kappa$  $\beta$ )<sup>157</sup>.



**Ilustración 12.-** Efecto de la terapia celular sistémica en el sistema inmune periférico. El tratamiento con células madre genera una respuesta inmune en la que hay un incremento de células reguladoras que moderan la respuesta inflamatoria y a un perfil de secreción de citocinas que disminuye los linfocitos T citotóxicos. Tomado de referencia 159.

IL-4: Interleucina 4; IL-10: Interleucina 10; INF- $\gamma$ : interferón gamma; Linfocitos TH1: Linfocitos colaboradores tipo 1, Linfocitos TH2: Linfocitos colaboradores tipo 2;  $TNF-\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa.

trando la zona de la lesión, menor apoptosis, unos menores niveles de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17,  $TNF-\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) y mayores niveles de citocinas antiinflamatorias (IL-10 y factor de crecimiento tisular  $\beta$ 1 [TGF- $\beta$ 1]) a la 48 y 72 horas tras la infusión. Posiblemente este patrón secretor estuvo mediado por un aumento en la expresión de TSG-6, lo que puede suprimir la activación de la ruta de señalización de factor nuclear  $\kappa$  $\beta$  (NF- $\kappa$  $\beta$ )<sup>157</sup>.

Sorprendentemente, tanto las MSCs como las CPN no solo tienen una acción inmunomoduladora local, sino que también tienen un efecto en otros órganos linfoides periféricos (ilustración 12)<sup>158</sup>. Prácticamente todos los grupos celulares se ven afectados por esta modulación, siendo su efecto global una disminución en su activación<sup>156</sup>. El cultivo de MSC con células inmunes purificadas produce un incremento en las interleucinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10, mientras que desciende la cantidad

de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . El incremento en IL-4 junto con el descenso de INF- $\gamma$ , genera un cambio en los subtipos de linfocitos T colaboradores (Th), desde los Th<sub>1</sub> (citotóxicos) a los Th<sub>2</sub> (facilitadores)<sup>159</sup>. Igualmente, el descenso en TNF- $\alpha$  junto con el incremento de IL-10 reducen la maduración de células dendríticas, y el incremento en el número de linfocitos T reguladores (T<sub>r</sub>) promueve una respuesta antiinflamatoria o tolerante<sup>159</sup>. Otros estudios han mostrado que las MSC suprimen la proliferación de células T<sup>156,160</sup>, así como la respuesta inmune mediada por células T, células B y células Natural Killers (NK), por medio de impedir la activación, adquisición de características linfoblásticas y cambio en el perfil de expresión de proteínas relacionadas con la función inmune (ilustración 13)<sup>156,161</sup>. Un descenso en la inflamación y la respuesta inmune puede relacionarse con el descenso en el daño celular asociado a la terapia con MSC<sup>156,160</sup>.

Por ejemplo, en modelos experimentales de encefalitis autoinmune (el modelo animal de la esclerosis múltiple), la administración periférica de CPN inhibe la activación de células T y de las células dendríticas de los ganglios linfáticos. Esta capacidad inhibitoria también se ha encontrado en las CPN humanas (CPNh), frenando la diferenciación de células precursoras

- **Linfocitos T:** Inhibe proliferación, inmunosupresión (mediado por IDO, PGE2, TGF- $\beta$ , HGFm HLA-G5)
- **Linfocitos B:** efectos contradictorios en la secreción de Ig
- **Células NK:** ↓ proliferación, secreción citokina y citotoxicidad
- **Monocitos:** ↓ diferenciación a célula dendrítica, estimula células dendríticas a un fenotipo antiinflamatorio
- **Neutrófilos:** ↓ los reactivos oxidativos

**Ilustración 13.- Efectos de las MSC sobre diferentes tipos de células del sistema inmune. Tomado de referencia 156.**

mieloides a células dendríticas inmaduras, y de éstas a células dendríticas maduras (capaces de presentar antígenos). Esta respuesta sistémica conseguía inducir mejoría en estos modelos animales, a pesar de que no hubiera infiltración evidente de estas células progenitoras en el SNC. El tratamiento experi-

mental con MSC también ha demostrado disminuir la desmielinización mediada por linfocitos T, aunque los ensayos clínicos con humanos arrojan unos resultados más modestos<sup>156</sup>.

No se sabe aún si el principal efecto neuromodulador de las CPN se debe a su acción local en el SNC, periférica, o si probablemente es una combinación de ambos. Tampoco se conoce si estos datos obtenidos de un modelo experimental de patología cerebral (la encefalitis autoinmune) es completamente aplicable a otras patologías, como el TCE.

### *Tipos de células usadas en trasplante celular*

Las células candidatas a ser trasplantadas han de tener, genéricamente, plasticidad (o la capacidad para adaptarse a un ambiente tisular concreto y diferenciarse en consecuencia), autorrenovación y diferenciación. Los diferentes tipos celulares estudiados son:

- **Células madre embrionarias (ES).** Presentan dos características principales: son pluripotentes, porque pueden diferenciarse en todas las células del cuerpo, y son muy estables pudiendo diferenciarse hasta 140 veces sin sufrir ninguna alteración<sup>141,162</sup>. Además de los problemas éticos y legislativos que plantean su obtención, existen dudas sobre la seguridad y capacidad de teratogénesis de estas células en los tejidos trasplantados<sup>163,164</sup>, tanto en injertos puros de ES como de células diferenciadas derivadas de ellas. Esta capacidad de inducir tumores puede ser debida a la dificultad de eliminar células indiferenciadas tumorigénicas, así como que los cultivos prolongados pueden producir inestabilidad genética<sup>162</sup>.
- **Células madre/precursoras neuronales derivadas de adulto (CPNa).** Pueden ser extraídas del tejido nervioso fetal mediante disección y digestión de la ZSV y GD. La suplementación de factores de crecimiento como el EFG y el FGF-2 permite su proliferación, expansión y mantenimiento durante más de un año. Las CPNa generan oligodendrocitos, neuronas y astrocitos en un ratio de 1:5:25, aproximadamente, cuando se les permite su proliferación espontánea. Estas células presentan positividad para la nestina (un filamento intermedio del citoesqueleto neuronal)<sup>162</sup>, así como para musashi-1 (proteína de unión al RNA) y los factores de transcripción SOX-1 y SOX-2<sup>160</sup>. Tanto la nestina como el musashi-1 son específicas de las células neuronales en desarrollo y no se expresan cuando alcanzan la madurez completa<sup>160</sup>.

Su trasplante en el córtex de ratas lesionadas mostró que pueden diferenciarse a neuronas y producir diferentes factores tróficos y mejorar la función cognitiva. Tras su trasplante directo después de un TCE objetivó que entre el 1-3% permanecen en la zona en las dos semanas tras el tratamiento, lo que se asoció a la mejoría en la función motora, pero no en la función cognitiva<sup>165</sup>. En un modelo murino de hemorragia cerebral, su administración a las 2 y 24 horas tras el inicio de la lesión disminuyó la afectación neurológica, disminuyó el edema cerebral, la infiltración inflamatoria y la apoptosis. Estos resultados se acompañaron de una disminución de los marcadores de inflamación de TNF- $\alpha$ , IL-6 y NF- $\kappa$ B, lo que sugiere que parte de su mecanismo de acción se encuentra una inmunomodulación<sup>160</sup>.

Existen actualmente dos estudios clínicos con pacientes humanos que utilizan este tipo de células. Los estudios preclínicos demostraron que el trasplante de CPNa en un modelo animal de lipofuscinosis ceroide neuronal (Enfermedad de Batten) permitía su integración dentro de la arquitectura cerebral, liberaba la enzima deficiente, y protegía a las neuronas dañadas<sup>166</sup>. Se ha realizado un estudio Fase I en EEUU en pacientes en estadíos graves con retraso psicomotor. Los CPNa se administraron en dos dosis: 3 pacientes recibieron 500 millones de células y otros tres 1.000 millones de CPN intraparenquimatosamente (ventrículos laterales). Ambos grupos se les administró inmunosupresores durante los siguientes doce meses. No se encontró ningún efecto adverso relacionado con la infusión de CPNa o con la inmunosupresión<sup>167</sup>.

Un segundo estudio también fase I en pacientes con enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher ha finalizado y está pendiente de publicarse (NCT01005004). Todos los pacientes (un total de cuatro) han sido trasplantados e inmunodeprimidos durante un periodo de 9 meses, y se encuentra en el periodo de seguimiento para valorar su seguridad a largo plazo.

Aunque las CPNa se consideran seguras, el riesgo de malignización se desconoce en humanos. Se ha comunicado el caso de un paciente con un síndrome de ataxia teleangiectasia que desarrolló un neuroblastoma mientras estaba siendo tratado repetidamente mediante trasplante celular<sup>168</sup>.

Otros investigadores han modificado genéticamente las CPNa para aumentar su potencial proliferativo mediante la expresión del oncogén *c-myc*. Estas células se han demostrado ser seguras y se espera su utilización en breve en pacientes con infarto cerebral<sup>162</sup>.

- **Células madre inducidas pluripotenciales (iPS).** El descubrimiento de la capacidad de células somáticas adultas de ser reprogramadas de manera que adquieran características de las ES ha supuesto una revolución en la medicina regenerativa<sup>169</sup>. Esta técnica se basa en la transferencia de factores de transcripción a través de retrovirus, adenovirus, plásmidos o proteínas<sup>162</sup>. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se conseguía transformar células somáticas adultas (fibroblastos) en neuronas adultas sin el paso previo de convertirlas en iPs<sup>170</sup>, incluyendo neuronas dopaminérgicas adultas<sup>171</sup>, lo que ofrece la ventaja teórica de evitar el riesgo tumoral. Estas células tienen la peculiaridad de que pueden ser inducidas a transformarse en neuronas adultas. Sin embargo, la posibilidad de formación tumoral, la mayor dificultad para su transformación en neuronas adultas y la necesidad de

regular no solo protocolos seguros para terapia celular, sino también para las células modificadas genéticamente hacen que su aplicación a la práctica clínica se encuentre todavía lejano en el tiempo.

Además de su aplicación terapéutica directa, estas células sirven para la identificación de dianas terapéuticas en pacientes con enfermedades neurodegenerativas, y para la formación de modelos bioquímicos y celulares de enfermedades neuronales.

- **Células madre mesenquimales (MSC).**

Descritas por primera vez por Friedenstein<sup>172</sup>, el comité de células madre mesenquimales y tisulares de la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT), ha propuesto las siguientes características que permitirían diferenciar las MSC humanas (ilustración 14):

- Adherencia a superficie de plástico de medios de cultivos.
- Expresión de antígenos de superficie específicos.
- Capacidad de diferenciación multipotente<sup>173</sup>.

Se recomienda por parte de dicho comité que las células han de ser caracterizadas antes de realizar un experimento, con el fin de confirmar dichas células y homogeneizar los resultados.

1.- Adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar		
2.- Fenotipo	Positivo (≥95%)	Negativo (≤2%)
	CD 105	CD 45
	CD 73	CD 34
	CD 90	CD 14 o CD 11b
		CD 79a o CD 19
		HLA-DR
3.- Diferenciación in vitro: osteoblasto, adipocito, condroblasto (demostrado por tinciones de cultivos celulares in vitro)		

Ilustración 14.- Características de las células madre mesenquimales. Tomado de referencia 173.

Las células madre hematopoyéticas obtenidas de la médula ósea han sido aplicadas a pacientes con tumores sólidos y hematológicos desde hace muchos años. Dentro de ellas, existe un subgrupo que no expresa marcadores hematológicos (CD45 -), no son capaces de generar derivados sanguíneos y que son las que se consideran actualmente MSC dado que son capaces de cumplir los criterios anteriormente descritos. En la actualidad, se han aislado y cultivado MSC procedentes de médula ósea, adipocitos, tejido conectivo, cordón umbilical, sangre periférica, espacio perivascular, periostio, pulpa dentaria, dermis, hueso trabecular, músculo, páncreas, liga-

mentos periodontales, sangre menstrual, leche y del tracto urinario (ilustración 15)<sup>174,175</sup>.

Los beneficios terapéuticos no se atribuyen a las pocas MSC que se diferencian a células neuronales<sup>176</sup>, sino que su acción es similar a un generador de factores de crecimiento (tanto globales como específicos neuronales) y de esta manera promoviendo la recu-

**Tipos de células madre mesenquimales (MSC), según procedencia:**

- Médula ósea (*MSC-mo*)
- Tejido adiposo (*MSC-a*)
- Tejido conectivo (*MSC-c*)
- Perivascular (*MSC-v*)
- Sangre periférica (*MSC-pb*)
- Cordón umbilical (*MSC-uc*)

Ilustración 15.- Tipos de células mesenquimales.

peración funcional cerebral vía angiogénesis, neurogénesis, sinaptogénesis y la remodelación neuronal<sup>177,178</sup>, así como inhibición de la apoptosis<sup>179</sup>.

Algunas de las MSC implantadas expresan marcadores de neuronas (NeuN y proteína asociada a microtúbulos) y astrocitos (GFAP)<sup>180</sup>. También la expresión de la citocina factor 1 derivada de célula estromal se encontró aumentada en la zona perilesional después de un daño cerebral por isquemia. El receptor del factor 1 derivado de célula estromal (receptor 4 de citocina CXC, CXCR4; *CXC-chemokine receptor-4*) se expresó tanto in vitro como in vivo en las MSC<sup>181</sup>. La interacción entre esta citocina y su receptor puede contribuir a la migración de las MSC trasplantadas al cerebro dañado<sup>181</sup>, y también actúa como señal para atraer células mieloides procedentes de sangre periférica<sup>182</sup>. El implante directo (6 horas tras la lesión) potencia la neuroprotección activando la actividad del NF-κB de las CPN residentes, lo que origina un aumento en la IL-6 y un descenso en la apoptosis<sup>179,183</sup>.

Las MSC aumentan los niveles de diferentes factores de crecimiento en el cerebro, incluido el BDNF, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos (bFGF), NGF y neurotrofina 3, bien por expresión directa de las propias MSC o por aumento en la producción de células parenquimatosas residentes<sup>177,179,184</sup>. Uno de las rutas moleculares mejor caracterizadas es la del inhibidor tisular de la matriz metaloproteinasa 3 (TIMP3). TIMP3 se incrementa tras un TCE controlado tras la administración de MSC iv. La inhibición de la expresión de la TIMP3 disminuye el efecto de las MSC en la BHE, mediado por VEGF<sup>185</sup>. Después del trasplante de MSC, estos factores de crecimiento y neurotróficos promueven la angiogénesis y la estabilización vascular de la zona

perilesional donde la mayoría de las MSC sobreviven y se localizan<sup>186</sup>. También promueven la neurogénesis in vivo e in vitro<sup>181</sup>. En modelos en ratas con TCE, las MSC no solo aumentan la densidad vascular en la región perilesional y en el hipocampo, sino que también lo incrementan en la ZSV y en el giro dentado<sup>187</sup>. Se observó que las MSC locales aumentaban las células progenitoras tanto en la ZSV como en la zona limítrofe pericontusional, mientras que las administradas por vía intravenosa aumentaban en estas dos áreas, y además también en el hipocampo. En ambos grupos (iv e ip), se encontraron marcadores de células neuronales, y estos hallazgos iban acompañados de una mejoría funcional<sup>184</sup>.

Las MSC autólogas tienen la ventaja de que minimizan las reacciones inmunes, y que pueden ser aisladas y cultivadas de una manera relativamente sencilla de varios tejidos<sup>162,177</sup>. Cuando se implantan en el ventrículo lateral de cerebros de ratón neonatales, las MSC migran y se diferencian en células granulares del bulbo olfatorio y astrocitos periventriculares<sup>181</sup>. Las MSC infundidas sistémicamente (intravenosa o intraarterialmente) migran a la zona cerebral dañada y son capaces de sobrevivir<sup>188</sup>. Tras administrarlas por esta ruta, muchas de las MSC se encontraron en otros órganos diferentes del cerebro (principalmente hígado y pulmón), y solo en una mínima proporción alcanzaron la zona cerebral dañada<sup>189</sup>. La administración tardía (24 horas – 1 semana) de MSC mejora significativamente el pronóstico funcional de ratas tras un TCE<sup>177,181,184,188,190</sup>.

La administración tardía (4 días postTCE) de MSC solas no reduce el volumen de la lesión, pero su administración junto con entramados de colágeno sí, y además potencia la migración de MSC dentro de la zona perilesional, mejora el aprendizaje espacial y las funciones sensitivas y motoras<sup>191</sup>. Incluso la administración más tardía (7 días post TCE) de MSC o MSC junto con entramado de colágeno, mejora el aprendizaje espacial y la función sensitiva y motora, potencia la neurogénesis en el córtex e hipocampo ipsilaterales e incrementa las fibras neuronales transcallosas al córtex<sup>181</sup>.

Recientemente se ha aislado un subgrupo de MSC humanas derivadas de sangre periférica (*MSC-pb*)<sup>192</sup>. Estas células expresaban marcadores compatibles con MSC, así como factores de adherencia celular relacionados con la migración a la superficie cerebral. Tras su estimulación, fueron capaces de expresar marcadores de diferenciación neuronal. Además, su infusión en el ventrículo lateral de ratas con un

TCE produjo su migración a la zona lesionada y diferenciación a características neuronales. En los animales tratados, mejoró la función motora pero no se consiguió demostrar diferencia en la mejoría temporoespacial. Tampoco se identificó reacción inflamatoria ni de rechazo<sup>192</sup>.

El cordón umbilical también parece una fuente prometedora de MSC (*MSC-cu*). La sangre del cordón umbilical es una fuente rica de células madre hematopoyéticas; sin embargo, al igual que ocurre con las obtenidas de la médula ósea, un subgrupo de esas células no muestra el marcador hematopoyético CD45 y tampoco son capaces de formar precursores sanguíneos. Esta fracción mononuclear puede ser aislada, expandida *in vitro* y, tras ser estimulada por los factores de crecimiento bFGF y hEGF, diferenciarse a células con marcadores neuronales (betatubulina III y GFAP)<sup>160</sup>. Sin embargo la tasa de rendimiento es bastante baja (aproximadamente un 10% de supervivencia). No obstante, cuando se obtienen del estroma celular del cordón (gelatina de Wharton) o de la placenta, esta puede aumentar exponencialmente<sup>193</sup>. La elección del método de purificación celular parece que también puede tener influencia, siendo mayor la tasa de recolección con la técnica de purificación mediante gradiente de difusión (aproximadamente 90% de aislamiento)<sup>194</sup>. La infusión de *MSC-cu* ha demostrado en modelos animales capacidad neurogénica, antiinflamatoria, con mejoría la función motora y cognitiva tras lesiones cerebrales<sup>160</sup>. Comparadas con las MSC obtenidas de médula ósea y tejido adiposo, parece que las procedentes de *MSC-cu* poseen una mayor capacidad de proliferación celular y clonación, y expresan menores cantidades de marcadores de senescencia, manteniendo los mismos perfiles de inmunosupresión y diferenciación<sup>194</sup>.

Los estudios en humanos son escasos, aún se encuentran en fase inicial y, aunque sus resultados son prometedores, exigen cautela en su interpretación. La seguridad y prueba de concepto del tratamiento con MSC autólogas fue valorado en siete pacientes (6 adultos, 1 niño de 6 años) con TCE en fase crónica<sup>195</sup>. Las MSC fueron aisladas mediante obtención de médula ósea, aislamiento de la fracción compatible con marcadores de MSC, y posterior crecimiento durante un plazo de dos semanas. Se administraron MSC en dos ocasiones: la primera intraparenquimatosa en la zona de la lesión y en la semana siguiente una “dosis” intravenosa. En este ensayo clínico, no se encontró toxicidad relacionada a la terapia celular en los seis me-

ses que duró el periodo de seguimiento, y se encontró una mejoría funcional en los pacientes a los seis meses respecto al inicio del tratamiento (sin grupo control)<sup>195</sup>.

Otro estudio valoró la respuesta funcional en pacientes adultos con un TCE pasada la fase aguda tras la administración de MSC-cu alogénicas<sup>196</sup>. Se administró en el espacio subaracnoideo mediante punción lumbar diez millones de MSC obtenidas mediante purificación y aislamiento de MSC procedentes de cordones umbilicales de diferentes donantes (no emparentados con los pacientes tratados), una vez a la semana durante un total de cuatro sesiones. No se administró tratamiento inmunosupresor. Se analizó la mejoría funcional mediante dos escalas al inicio del tratamiento y seis meses después de terminado. No se objetivaron efectos adversos graves en el grupo de tratamiento. Se objetivó una mejoría en los diferentes subgrupos de estas escalas que se refieren a la mejoría funcional y al autocuidado<sup>196</sup>.

En niños con TCE grave (escala de coma de Glasgow 5-8), se ha publicado un estudio para determinar la seguridad del tratamiento con células mononucleares derivadas de médula ósea (CMDMO). Diez niños de entre 5 y 14 años, sin enfermedades previas y con un TCE grave se reclutaron para iniciar un tratamiento con  $6 \cdot 10^6$  CMDMO / kg peso intravenoso dentro de las primeras 48 horas después de un TCE. Se excluyeron aquellos en los que la prueba de imagen era compatible con lesiones hipoxico-isquémicas extensas o aquellos en los que la PIC era superior a 40 cmH<sub>2</sub>O. Para determinar la seguridad del procedimiento se evaluó la hemodinámica cerebral y sistémica durante la recolección de la médula ósea, así como la función renal, hepática, pulmonar (puntuación Murray de daño pulmonar) y la disfunción orgánica (PELOD). También se obtuvo una resonancia magnética cerebral al mes y a los seis meses tras el TCE, junto con valores de evaluación funcional y neuropsicológicas. Todos los pacientes sobrevivieron, sin hallarse episodios de disfunción hemodinámica ni cerebral durante el procedimiento de recogida de médula ósea. No se detectó toxicidad relacionada con la infusión de células madre. Durante el seguimiento, no se evidenció disminución de la sustancia gris, blanca, o volumen de LCR. A los seis meses, la escala pronóstica de Glasgow (GOS) mostró que 7 niños tuvieron buen pronóstico, y 3 algún nivel de incapacidad (moderada y grave). Los autores del estudio concluyen que la administración de células madres autólogas derivadas de médula ósea es un procedimiento logísticamente posible y seguro para el tratamiento del TCE en pediatría<sup>197</sup>.

El mismo grupo que ha publicado el trabajo anterior tiene en marcha un ensayo clínico, fase II, en pacientes pediátricos, para confirmar estos resultados, utilizando un procedimiento similar al descrito. Tiene previsto reclutar a 50 pacientes, y dividirlo aleatoriamente en dos grupos (tratamiento frente a placebo) para valorar la eficacia y seguridad de dicho tratamiento. Ha comenzado su reclutamiento en agosto de 2013 y espera finalizar en 2018 (NCT01851083).

## **2.- Hipótesis y objetivos**

### **2.1.- Hipótesis**

En modelos de experimentación animal de traumatismo craneoencefálico la administración intra y perilesional de células madre mesenquimales procedentes de médula ósea ha demostrado mejorar la evolución funcional. Sin embargo, la administración de células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo podría tener también un efecto beneficioso a través de la integración funcional y disminución de la inflamación secundaria a un TCE producido mediante un modelo de trauma craneal controlado.

### **2.2.- Objetivos**

1.- Investigar en un modelo experimental en ratas jóvenes sometidas a un TCE controlado el efecto de la administración de MSC en el lugar de la lesión sobre la función motora y sensitiva.

2.- Analizar la supervivencia y diferenciación de las células madre mesenquimales trasplantadas en el tejido cerebral lesional y perilesional.

3.- Conocer los mecanismo de protección y regeneración funcional por los que las MSC administradas ip podrían producir una mejoría funcional.



### 3.- Material y métodos

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microcirugía del Hospital Universitario La Paz, Fundación IdiPAZ (Madrid, España) y en el Laboratorio de Terapia Celular del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Instituto Investigación Sanitaria Hospital La Princesa (Madrid, España).

Los procedimientos de experimentación fueron aprobados por el Comité de ética en Experimentación animal del Hospital Universitario La Paz (Madrid, España; CEBA 08/2011). Se siguieron sus recomendaciones según la normativa establecida por el Real Decreto 1201/2005 y la directiva europea 2010/63/UE.

#### 3.1.- Modelo animal de TCE

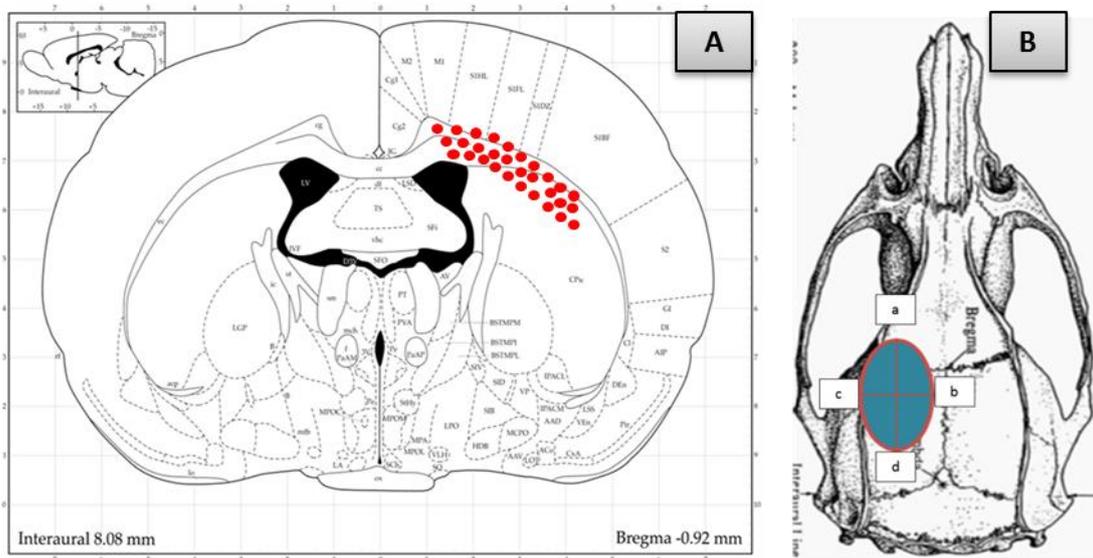
Se utilizan ratas modelo Sprague Dawley, de peso estimado entre 150-200 gramos, equivalente a niños de 7 años de edad (Janvier Labs<sup>TM</sup>, Le Genest-Saint-Isle, Francia). Los animales son alojados en jaulas (6 animales como máximo) donde la temperatura ambiental fue de 21°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), la humedad relativa del 55% ( $\pm 10\%$ ) y los ciclos de luz y oscuridad se alternan cada 12 horas. La dieta que reciben es completa, consistiendo en un granulado especial para rata y agua "ad libitum".

Durante el procedimiento los animales se anestesian mediante la administración intraperitoneal de ketamina (25 mg/Kg), diazepam (2 mg/Kg) y atropina (0,1 mg/Kg). Si fuera necesario, se administra un 25% de la dosis inicial de manera repetida hasta alcanzar el nivel de analgesia deseado. El animal se fija a un marco esterotáxico (David Kopf Instruments<sup>TM</sup>, California, USA). Para evitar la hipotermia durante el procedimiento, se mantiene bajo una lámpara de calor radiante y sobre una manta de calor y se monitoriza la temperatura corporal mediante una sonda rectal y la saturación de oxígeno mediante pulsioximetría continua. Aquellos animales que presentaron valores de saturación de oxígeno inferiores al 80% durante cinco minutos, o cuya temperatura corporal fuera inferior a 33 °C, se retiraron del experimento.

Tras la inducción anestésica, se realiza en condiciones asépticas una craneotomía izquierda de 4 mm de ancho por 6 mm de largo, conservando la meninge aracnoides (ilustración 16 y 17)<sup>198,199</sup>. En un sistema de coordenadas, tomando la sutura bregma como punto inicial (0, 0), las coordenadas de la craneotomía estarían situadas entre anterior (+2,+3),

medial (-1, 1), lateral (-1, 5) y posterior (-4, 3) (figura 16B). Se exponen de esta manera los lóbulos parietal y frontal izquierdos, que comprende las regiones M<sub>1</sub> (corteza motora primaria), M<sub>2</sub> (corteza motora secundaria), S<sub>1</sub>F<sub>L</sub> (Cx somatosensorial primaria pata anterior), S<sub>1</sub>H<sub>L</sub> (Cx somatosensorial primaria pata posterior), S<sub>1</sub>DZ (Cx primaria somatosensorial, región disgranular), S<sub>1</sub>BF (Cx somatosensorial primaria tronco), S<sub>1</sub>TR (corteza primaria somatosensorial), PtA (corteza parietal de asociación)<sup>200</sup>. De manera global, la lesión se focaliza en el área motora primaria y secundaria junto con áreas de asociación primarias y secundarias que se encargan del movimiento del hemicuerpo contralateral a la lesión (figura 16A).

Se realiza un traumatismo controlado dejando caer un cilindro de metal macizo de 35 g de peso, y 6 mm de diámetro, desde una altura de 20 cm a través de un cilindro hueco para lograr una velocidad de 2 m/s, produciendo de esta manera un TCE moderado, reproduciendo una lesión local y difusa cerebral simultáneamente (ver figura 14g-i)<sup>201</sup>. Tras el impacto, se realiza el cierre quirúrgico mediante aposición del músculo temporal y la piel y se sutura con material reabsorbible. Se administra una dosis de tramadol subcutánea (2 mg/kg) para control de la analgesia durante la cirugía, pudiendo repetirse si aparecen síntomas de dolor durante el postoperatorio en las siguientes 48 horas.



**Ilustración 16.- Características del modelo de traumatismo craneoencefálico. A) Esquema de corte cerebral coronal por el centro de la craneotomía (Bregma -0.92 mm) donde se muestra la localización de las principales áreas afectadas por el TCE<sup>200</sup>, así como la zona en la que se administran las células mesenquimales (puntos rojos). B) Esquema de la estructura ósea craneal de una rata con la imagen superpuesta de la zona de la craneotomía. Se han marcado los puntos anterior [a (+2, +3)], medial [b (-1, -1)], lateral [c (-1, -5)] y posterior [d (-4, -3)] que marcan la elipse que constituye la craneotomía, según un sistema de coordenadas esterotáxicas cuya referencia es la sutura anterior bregma.**

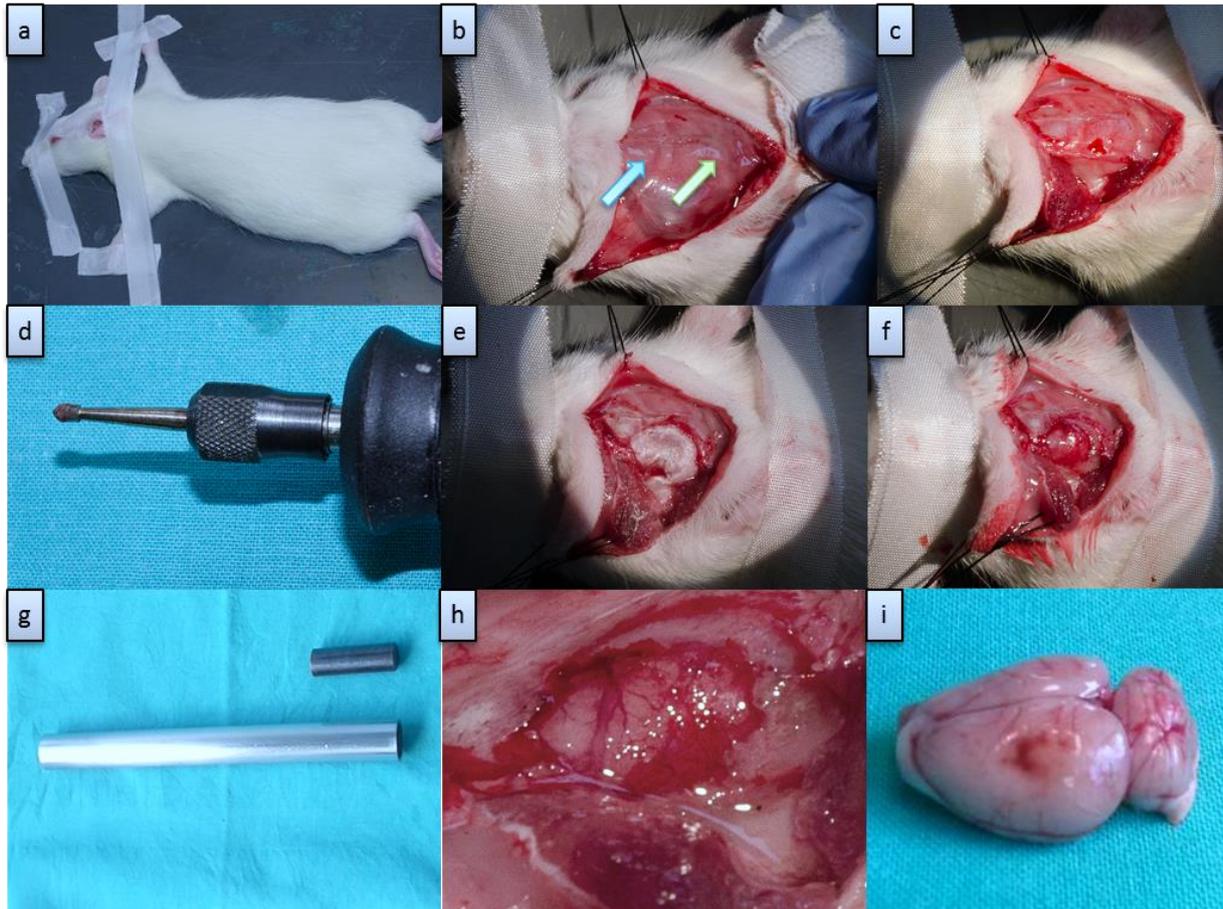


Ilustración 17.- Técnica de trauma craneal controlado en el experimento. a) Posición inicial de la rata previo al inicio de la intervención. b) Tras realizarse una incisión en la piel en la línea media, y tras retirar el tejido celular subcutáneo quedan expuestas la sutura bregma (flecha azul, anterior) y lambda (flecha verde, posterior). c) El músculo temporal se disecciona y se rebate, dejando al descubierto el hueso parietal izquierdo; la sutura bregma se usa como punto de referencia para las coordenadas de la craneotomía. d) Detalle de la punta utilizada para la realización de la craneotomía. e) Resección de las capas superficiales del hueso parietal izquierdo, hasta alcanzar la lámina propia. f) Tras la realización de la craneotomía, queda al descubierto el lóbulo parietofrontal izquierdo. g) Cilindro hueco de veinte centímetros de longitud y cilindro macizo de 35 gramos, con el que se realiza el modelo de traumatismo craneal. h) Detalle de la figura f tras el trauma craneal controlado; se observa un inicio de hinchazón cerebral y herniación a través del agujero de la craneotomía. Posteriormente, se sutura el músculo temporal al tejido celular subcutáneo y a continuación se sutura la piel mediante puntos sueltos no reabsorbibles. i) 21 días después del traumatismo craneal, tras la resección cerebral en fresco se aprecia en la zona de la lesión un área deprimida con restos hemorrágicos e isquémicos en su interior. El resto de lóbulos cerebrales así como el cerebelo muestran macroscópicamente un color y aspecto normal.

### 3.2.- Aislamiento de células madre mesenquimales de rata

Las células madre mesenquimales se obtienen de cinco ratas Sprague Dawley adultas (peso aproximado 300 gramos). Tras la inducción anestésica con oxígeno 2% e isoflurano 4% (Forane, laboratorios Inibsa, Nicholas Piramal Ltd, Londres, Reino Unido), y mediante técnica aséptica, se realiza una laparotomía ventral y se extrae el tejido graso inguinal bilateral.

Posteriormente, en condiciones de esterilidad, se homogeneiza la muestra mediante métodos mecánicos. Se incuba con una solución de colagenasa I al 0,75% (Gibco Ltd, Paisley, Gran Bretaña) durante 45 minutos a una temperatura de 37°C. El contenido se filtra por una membrana Cell strainer 70µm (BD). El material obtenido se centrifuga en una solución de Ficol-Paque Plus® (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), durante 35 minutos a 1500 rpm. Se extrae la fracción celular y se resuspende con medio completo. Se centrifugan durante 5 minutos a 1400 rpm y se extraen las células, que se siembran en un flask para cultivo celular con medio compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), glucosa, Glutamax™, suero fetal bobino (FBS) al 10% y P/S al 1%.

Las células se incuban en CO<sub>2</sub> 5% recambiando el medio cada semana. Las células no adherentes fueron desechadas. Tras el crecimiento y confluencia del cultivo primario, se eliminó el medio y se resuspendieron con una solución de Tripsina 1x y PBS al mismo volumen. Tras la inactivación de la tripsina se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm, resuspendiéndose con suero fetal bovino. Después de 72 horas las MSC se cultivaron con lentivirus que portaban la proteína fluorescente verde (GFP; concentración de cultivo: 34 lentivirus/MSC).

### 3.3.- Identificación de células mesenquimales

El desarrollo de marcadores de superficie fue evaluado mediante citometría de flujo. Las MSC se incuban con anticuerpos monoclonales primarios conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeriterina (PE) y alofocianina (APC) según las instrucciones de la compañía suministradora. Las células obtenidas fueron testadas frente a anticuerpos anti CD 45-PE (marcador pan leucocitario), anti CD 90-APC (Thy-1) y anti CD 29-FITC (integrina β1, ITGB1, molécula de adherencia celular, marcador de célula madre) [Santa Cruz Biotechnology, Inc, California, USA].

También se realizan cultivos de diferenciación celular:

**a) Diferenciación osteogénica:** Las MSC sin diferenciar no muestran depósitos de Ca<sup>2+</sup> en su matriz extracelular, mientras que los osteoclastos y osteoblastos poseen áreas extensas de matriz extracelular cálcica tanto in vitro como in vivo. Se siembran células en pasaje 4 en una densidad de 35.000 cel/cm<sup>2</sup> en placas de 4. Se incuban en la estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% toda la noche. A las 24 horas, se observa la morfología celular y la confluencia al microscopio óptico. Al alcanzar el 100% de confluencia se agrega 500 µl de medio de diferenciación (Stem-

pro Osteogenesis Differentiation kit [Gibco BRL]: DMEM, SFB 10%, Penicilina y Estreptomina al 1%), dexametasona (0,1  $\mu$ M),  $\beta$ -glicerofosfato (10 Mm) y ascorbato-2 fosfato (50  $\mu$ g/ml). Se mantienen en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% durante todo el proceso, y se realiza el cambio de medio cada 4 días.

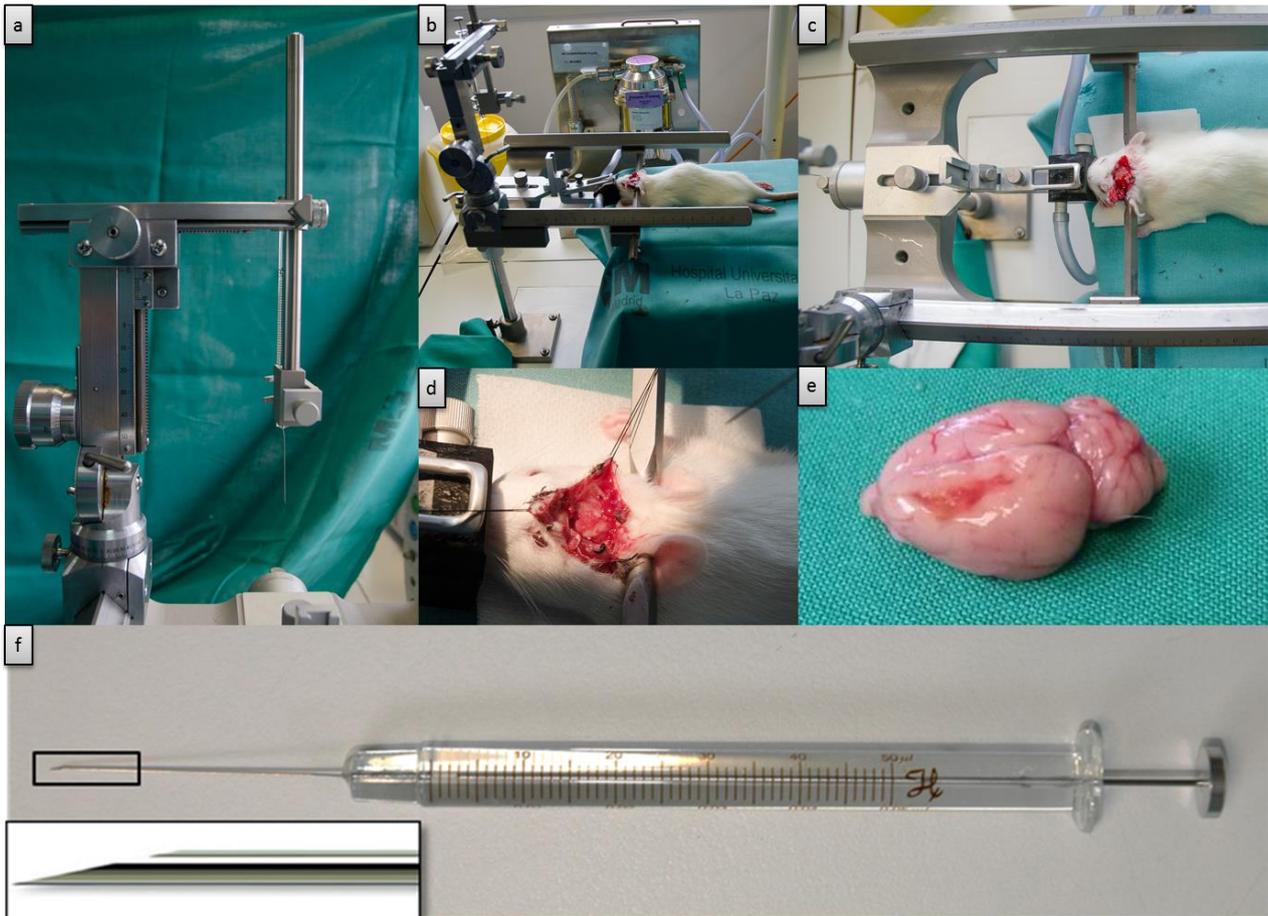
Cuando se observan cúmulos de minerales y cristales birrefringentes al microscopio (al cabo de 21 días), se lleva a cabo la tinción Alizarin Red. Para ello, se prepara una solución de Alizarin Red 40 mM en fosfato monosódico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 4,3). Las células en las placas se lavan 2 veces con 0,25 mL/cm<sup>2</sup> de PBS y se fijan con 0,25 mL/cm<sup>2</sup> de etanol 70% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después las células se lavan 2 veces con PBS, agregando 0,25 mL/cm<sup>2</sup> de Alizarin Red 40 mM que se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células en las placas fueron nuevamente lavadas 2 veces con PBS y finalmente se lavaron 5 veces con agua bidestilada. Se observan al microscopio óptico, y se toman fotografías de registro. Dicho procedimiento se realiza tanto en las células mesenquimales transducidas con la proteína GFP como en las que no se le transdujo.

**b) Diferenciación adipogénica:** Se siembran células en una densidad de 25.000 cel/cm<sup>2</sup> por pocillo en placas de 4 pocillos. Se incuban en la estufa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante un día. A las 24 horas, se observan las células al microscopio óptico. Al alcanzar el 100% de confluencia (aproximadamente el segundo día), se agrega 500  $\mu$ l de medio de diferenciación [DMEM, SFB 10%, Penicilina y Estreptomina al 1%], junto con dexametasona (0,1  $\mu$ M), insulina (10  $\mu$ g/ml) e indometacina (0,02 mg/ml). Se realizan dos pruebas de diferenciación con sus respectivos controles negativos, los cuales solo contenían 25.000 cél/cm<sup>2</sup> más 500  $\mu$ l de medio completo (DMEM, SFB 10%, Penicilina y Estreptomina al 1%), que se cambió cada 4 días. Se mantienen en incubación en estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante todo el proceso, y se realiza cambio de medio de diferenciación cada 4 días.

Pasadas 2 semanas se marcan con Oil Red para comprobar la diferenciación hacia adipocito. Se prepara una solución de isopropanol 60% a la que se agrega Oil Red hasta generar una solución saturada. Luego se entibia por 20 minutos a 37°C y se filtra por un filtro de poros de 0,2  $\mu$ m para eliminar el exceso de cristales de Oil Red. Las células en las placas se lavan 2 veces con PBS. Luego se agrega Oil Red O y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se lava 2 veces con PBS y se observan y fotografían las células que presentaban gotas de grasa teñidas de color rojo en su interior.

### 3.4.- Injerto de células mesenquimales

A las 24 horas del TCE, se selecciona aleatoriamente a los animales que van a recibir el trasplante celular (ilustración 18). Tras inducir la anestesia y mediante técnica estéril se reabre la incisión de la línea media y se expone la región contusionada del cerebro. Usando una guía esterotáxica y una aguja de microinyección de 26 G (Hamilton Company USA, Reno, Nevada), se inyectan las células en el área del impacto y en el área colindante, por debajo de la superficie cortical. Se utiliza una aguja de punta biselada, con una angulación de 12° y una longitud total de 40 mm, reduciendo de esta manera el daño traumático al infundir las MSC. Se realizan 8 inyecciones de 5 µL de PBS, conteniendo cada una 25.000 MSC, insertándolas durante 10 segundos a 2-3 mm por debajo del córtex, administrando de esta manera aproximadamente 200.000 MSC por animal (volumen total infundido, 40 µL). Al grupo control intraparenquimatoso se le realiza el mismo procedimiento, excepto que las inyecciones solo contienen SSF<sup>165</sup>. Existe un tercer grupo llamado control simple, al que solo se le realiza el trauma craneal pero sin manipulación posterior (ilustraciones 19 y 20).



**Ilustración 18.-** Técnica de infusión intraparenquimatosa de células mesenquimales con estereotaxia. a) Torre de estereotaxia con aguja intraparenquimatosa montada en brazo acoplable. b) Posición del animal de experimentación en la torre de estereotaxia; la sedación se realiza mediante sevoflurano. c) Visión cenital de la cabeza del animal fija mediante soportes que se introducen en su pabellón auricular; la mandíbula se fija mediante un soporte específico que permite la administración simultánea de un flujo continuo de sevoflurano para la inducción y mantenimiento anestésico. d) Se realizan los mismos pasos que para la realización del traumatismo craneal controlado mostrados en la figura anterior: reapertura de la piel, disección y aposición del músculo temporal, exposición de la superficie cortical e identificación de la lesión realizada 24 horas antes; la infusión de células mesenquimales se realiza introduciendo estas a través de la aguja biselada, mediante 8 inyecciones en la zona marginal de la lesión (volumen total 40  $\mu$ L, volumen de cada inyección 5 mcl). e) Detalle del cerebro del animal extraído en bloque, mostrando el área con la lesión focal en el hemisferio izquierdo tras 21 días de la misma. Macroscópicamente, la lesión es similar a la del grupo control: un área central deprimida con tejido necrótico y hemorragias intraparenquimatosas en su interior. f) Aguja Hamilton® utilizada para la infusión de células madre mesenquimales: 26 Gy de diámetro externo, punta biselada con una angulación de 12° y volumen total 50 mcl (detalle de la punta en el recuadro inferior izquierdo).

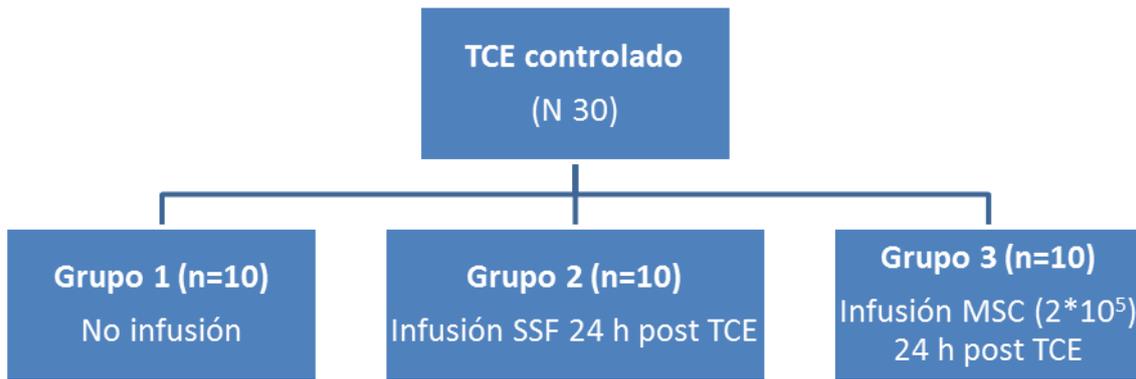


Ilustración 19.- Grupos de experimentación. MSC: Célula madre mesenquimal; SSF: Suero salino fisiológico; TCE: traumatismo craneoencefálico.

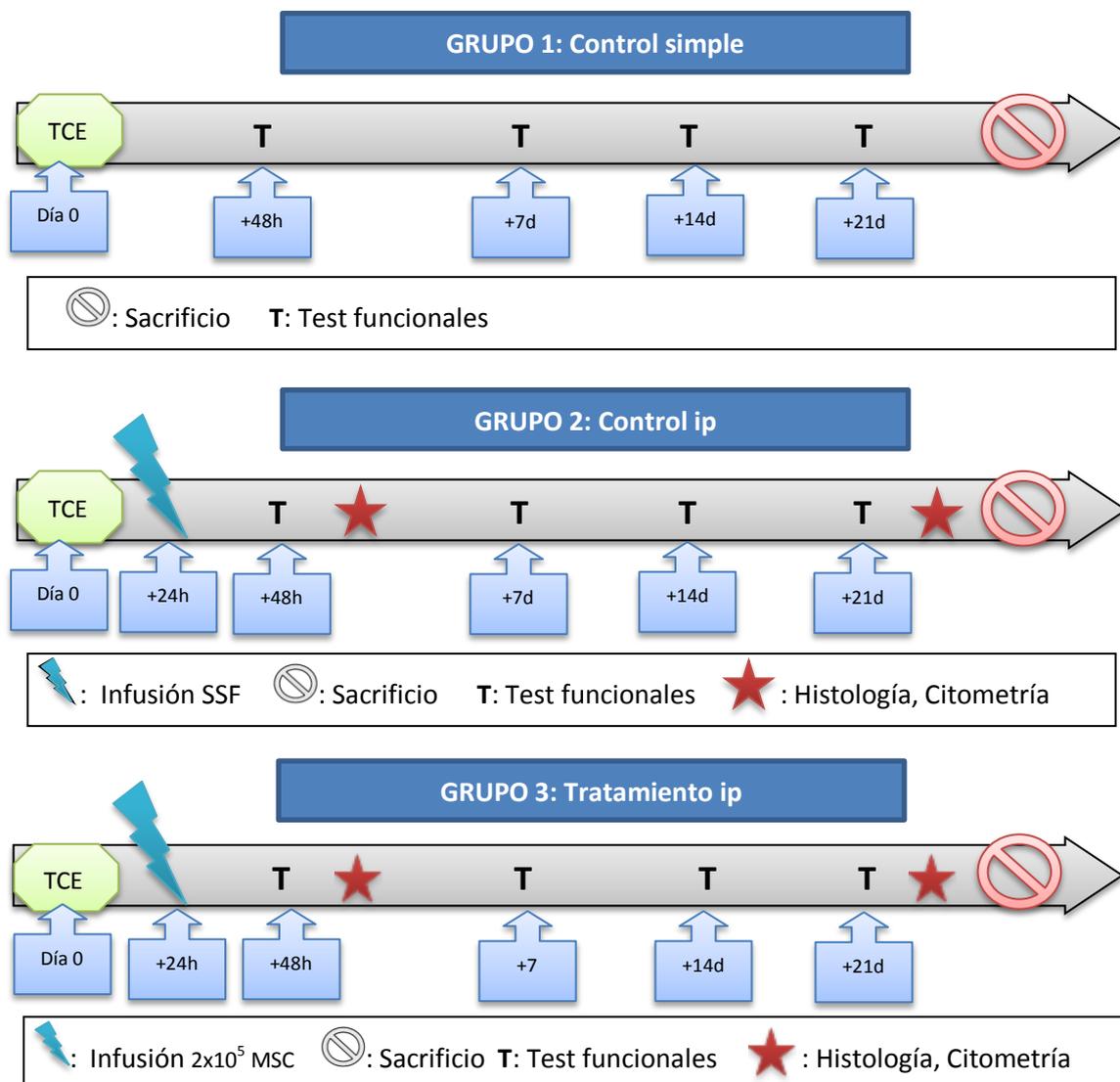


Ilustración 20.- Cronograma de los grupos de experimentación, mostrando la relación entre la realización del trauma craneal, la intervención realizada (infusión de células madre por vía intravenosa o intraparenquimatosa), los test de evaluación neurológica y el momento del sacrificio.

### 3.5.- Evaluación neurológica

Todas las ratas se evaluaron antes del inicio del experimento. Los test neurológicos usados fueron tres: Rotarod, test de Rogers modificado y el Test de la cinta adhesiva modificado (Modified Sticky tape Test, MST). Se llevaron a cabo por un experimentador que había sido instruido en la realización de los mismos y que era ciego para el tratamiento empleado. Se practicaron basalmente y en los días +2, +7, +14 y +21 tras el traumatismo craneal. Los sujetos cuyos valores basales no fueron normales, o que presentaron algún déficit motor o sensitivo, no se consideraron aptos para continuar el experimento.

El **test de Rotarod** (Ugo Vasile Srl, Italia)<sup>202-204</sup>, se realiza colocando al animal de experimentación en un rodillo con un movimiento rotatorio (ilustración 21A). El experimentador es capaz de seleccionar una velocidad fija o bien la velocidad inicial, la velocidad final, así como el tiempo en el que alcanza la velocidad final. Inicialmente se mantiene a la rata durante un máximo de dos minutos a una velocidad constante de 2 rpm para conseguir de esta manera su habituación. Posteriormente, se inicia el test propiamente dicho, que consiste en incrementar la velocidad desde la inicial de 2 rpm hasta un máximo de 40 rpm, en un tiempo de cuatro minutos. Se registra el tiempo y la velocidad máxima hasta que el animal pierde el equilibrio o cae. Si tras cuatro minutos y haber alcanzado la velocidad máxima el animal no ha perdido el equilibrio, se adjudica la máxima velocidad. Mediante este test se evalúa de manera objetiva la capacidad motora y sensitiva del animal tras un TCE controlado. Cuanto mayor es la lesión tras un traumatismo cerebral controlado, menor es el tiempo y el número de revoluciones que alcanza el animal de experimentación.

El **test de Rogers modificado**<sup>203-206</sup> permite graduar la afectación motora tras un TCE (Ilustración 21B). Se realiza en un ambiente neutro, sin otros estímulos externos, observando su movilidad espontánea y alzando al animal de experimentación por la cola. Se asigna diferentes puntuaciones según la movilidad mostrada: 0 puntos, sin déficit neurológico; 1 punto: fallo en la extensión de la pata delantera izquierda; 2 puntos: disminución en el agarre de la pata izquierda cuando se sujeta la cola; 3 puntos: movimiento espontáneo en todas las direcciones, si se sujeta de la cola movimiento circular contralateral; 4 puntos: movimiento circular o andar espontáneamente a la izquierda; 5 puntos: movimiento solo tras estímulo; 6 puntos: falta de respuesta a estímulo; 7 puntos: muerte. Cuando se produce un daño cerebral traumático, aumenta la puntuación obtenida en este test.

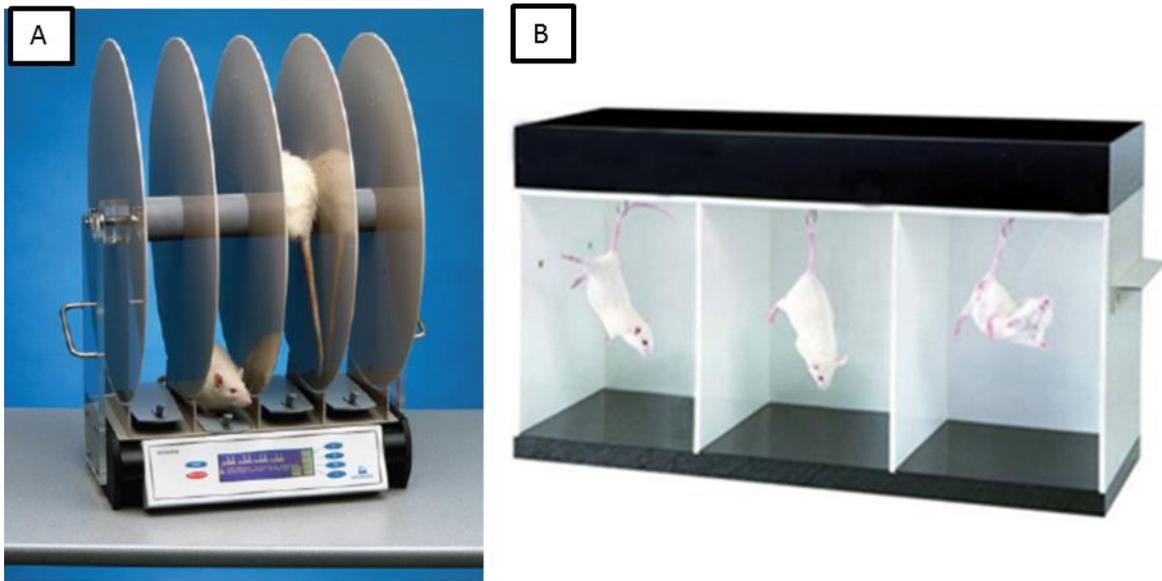


Ilustración 21.- Test funcionales: Rotarod y test de Rogers modificado. A) Rat Rotarod: los animales de experimentación se sitúan en un rodillo giratorio programado para alcanzar una velocidad determinada (en nuestro caso, 40 rpm) en un tiempo dado (4 minutos). El test finaliza cuando el animal cae o pierde el equilibrio, registrándose la velocidad del rodillo y el tiempo que ha permanecido. B) Test de Rogers modificado: se sujeta a la rata por la cola y se observa el movimiento espontáneo que realiza. También se valora el movimiento espontáneo en una superficie lisa. Se puntúa en una escala subjetiva del 0-7 en función de su respuesta (ver texto para más información).

El **Modified Sticky-tape Test (MST)**<sup>207,208</sup> es un test para valorar la integridad somatosensorial de la rata (ilustración 22). Para realizarlo, se coloca una cinta adhesiva en una de las patas delanteras. La respuesta normal consiste en intentar quitársela con la boca de manera continua. En un ambiente neutro, durante un periodo de treinta segundos, se contabiliza el tiempo total que el animal intenta retirar el estímulo. Se testan tanto el miembro ipsilateral como el contralateral, no al mismo tiempo, tres veces al día. Se recogen las dos mejores puntuaciones y se hace la media de ambas. Tras un daño cerebral cortical, disminuye el tiempo que el animal intenta retirarse la cinta adhesiva en el miembro contralateral a la lesión, mientras que no se altera el tiempo en el lado ipsilateral.

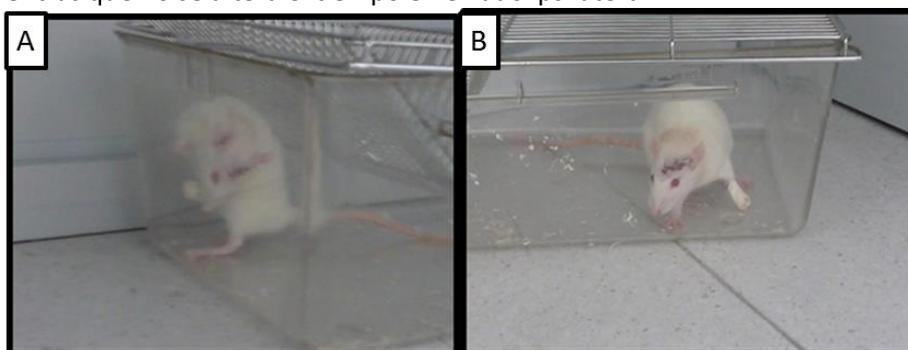


Ilustración 22.- Test de la cinta modificado (Modified Sticky tape test: MST). A) Respuesta normal observada antes del trauma craneal: durante la mayor parte del tiempo de observación, intenta retirarse la cinta adhesiva de la pata mediante la boca o la pata contralateral. B) Tras la lesión cerebral, el animal presenta una negligencia contralateral y se presta indiferente a la cinta adhesiva.

### 3.6.- Citometría de flujo

Se realiza un lisado de tejido cerebral para determinar la proporción de MSC en la muestra total, así como su supervivencia a lo largo del tiempo. En los días +2 y +21 tras el TCE, dos ratas del grupo control (TCE + infusión de SSF) y dos ratas del grupo tratamiento (MSC  $2 \times 10^5$  intraparenquimatosas) se sacrifican tras anestesia con Sevoflurano. Posteriormente, se extraen sus cerebros en bloque. Se retira el cerebelo y tronco del encéfalo, y se separa el hemisferio izquierdo (donde recibieron el trauma y la infusión) del derecho.

Cada hemisferio se disgrega mediante métodos mecánicos, y el resultado se purifica mediante un filtro para criba celular de 40 micrómetros (Falcon BD™, USA). La muestra obtenida se centrifuga durante 5 minutos a 1500 rpm, y se desecha el sobrenadante. Se resuspende con PBS y se homogeniza la muestra.

Se realizaron fracciones de los diferentes grupos celulares para conseguir un número similar de células por cada muestra. Se incuban con los anticuerpos anti CD 45-PE, anti CD 90-APC y anti CD 29-FITC [Santa Cruz Biotechnology, Inc, California, USA]. Otro grupo se incubaba sin anticuerpos, para determinar aquellas células que muestran fluorescencia intrínseca mediante la expresión de GFP. En ambas, se añade 7AAD, lo que permite diferenciar las células viables. Tanto a las 48 horas como a los 21 días, se comparan el porcentaje de células mesenquimales (CD29<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>) y células GFP positivas en cada hemisferio y respecto al control (Citómetro BD FACS Canto™ II, BD Biosciences, Nueva Jersey).

### 3.7.- Estudio anatomopatológico

Se realiza en el grupo control ip y tratamiento ip, a las 48 horas y 21 días del TCE. Se procesan tinciones de hematoxilina eosina, e inmunohistoquímica para detectar GFP, vimentina y Nestina.

El sacrificio del animal se produce, previa anestesia con Sevoflurano inhalado, mediante decapitación. Se resecan los cerebros en bloque, y se introducen en formol al 4% durante 48 horas. Se procesa el tejido mediante hidrataciones crecientes de alcohol, tras lo cual se incluyen en parafina. Se realizan secciones histológicas de 2  $\mu\text{m}$  de grosor por animal a la altura del traumatismo craneal (bregma +3mm hasta bregma -5 mm) mediante un micrótopo (separación 10  $\mu\text{m}$  en cada corte). Los cortes de parafina se introducen en una estufa durante 30 minutos a 60 °C, y posteriormente se sumergen en xilol durante 15 minutos. Se hidratan en concentraciones decrecientes de alcohol (alcohol absoluto, alcohol 96%, alcohol

70%, cada uno de ellos durante 5 minutos). Se lavan con agua destilada y se introducen en la solución de hematoxilina durante 5 minutos. Se lavan en agua durante 2 minutos transcurridos los mismos se lavan en agua destilada durante 2 minutos. Se introducen en eosina alcohólica un minuto. Posteriormente se deshidratan en soluciones de alcohol crecientes (alcohol 70%, alcohol 96%, alcohol absoluto, xilol).

Se procesan las muestras según técnicas histológicas de vimentina, nestina e inmunofluorescencia para GFP. Tras la desparafinización, se realizan baños en xilol durante cinco minutos cada uno, e hidratados en una serie de alcoholes progresivamente de mayor graduación. El antígeno de los cortes se recobró mediante un método de recuperación basado en un buffer de citrato. Las peroxidases endógenas se inhibieron mediante incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% y PBS. La tinción inespecífica se bloqueó con una mezcla de dos sueros diferentes al 1,5% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de ello, los cortes se incubaron con una mezcla del anticuerpo primario anticuerpo monoclonal de ratón anti GFP (eGFP B2, Santa Cruz Biotechnology®, California), Vimentina y Nestina (Leica Biosystems, Suiza). Las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario IgG-FITC de cabra anti-ratón (goat anti-mouse IgG-FITC, Sc-2010, Santa Cruz Biotechnology®, California, USA) en una dilución de 1:50 en buffer PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.

#### a.- Hematosilina eosina

La tinción de hematoxilina eosina se usó para identificar morfológicamente las MSC y las lesiones secundarias al DCT.

Se analizó el tamaño de la lesión y la presencia de progenitores neuronales en la zona granular del hipocampo y de la zona subventricular. El **área lesionada** se definió como la zona con presencia de hemorragia y signos de degeneración celular y despegamiento meníngeo en la zona del TCE. Se midió a los 21 días del TCE. El área lesionada se calcula mediante la diferencia entre el área sana contralateral menos la ipsilateral, y se expresa como porcentaje respecto al cerebro contralateral, lo que permite corregir el efecto del edema cerebral. Se tomaron varias mediciones a través de los cortes de hematoxilina eosina que atravesaban la zona de la lesión<sup>191,209,210</sup>.

Tras un TCE, las neuronas del hipocampo son vulnerables, disminuyendo de manera significativa en el giro dentado y regiones CA1 y CA3 (ilustración 23)<sup>211</sup>. Dicha pérdida neuronal se asocia con los déficits motores y de aprendizaje observados a largo plazo<sup>211</sup>. Las células

neuronales progenitoras se calcularon midiendo el número de células granulares en el giro dentado y de células piramidales en la región CA1 y CA3 del hipocampo por campo de 40 aumentos<sup>212</sup>. Se midió la población celular en la zona ipsilateral y contralateral a la lesión, tanto en el grupo control ip como en el de tratamiento ip. Aunque la tinción de HE no es específica de células neuronales, su morfología característica permitieron el contaje.

Las células granulares muestran un núcleo con acúmulo de gránulos en su interior, con un citoplasma redondo. Las células piramidales muestran un núcleo más denso, junto con una estructura geométrica (piramidal) de su citoplasma, sin presencia de gránulos.

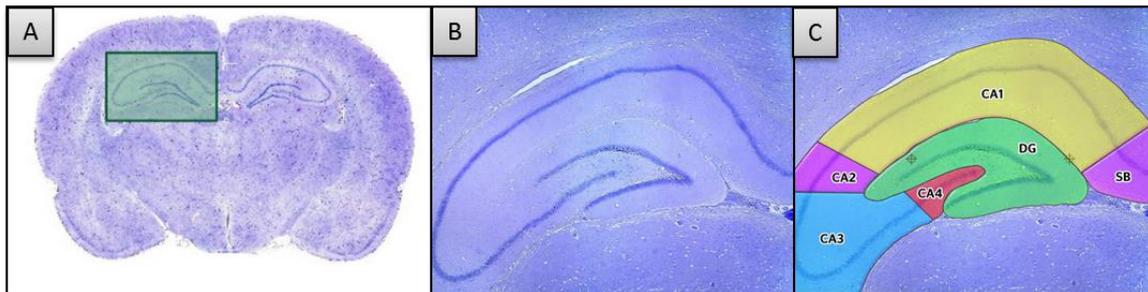


Ilustración 23.- Estructura de hipocampo de rata sobre cortes histológicos teñidos con técnica Nissl (azul de toluidina), tras inclusión con parafina. A) Visión macroscópica a la altura del hipocampo (aproximadamente -3 mm respecto a Bregma). B) Zona ampliada en A (recuadro verde) mostrando la morfología del hipocampo. C) Representación esquemática sobre la figura B, donde se muestra el Cuerno de Amón y sus divisiones (CA1-4), así como el Giro dentado (GD) y el subículo (SB). CA: Cuerno de Amón; DG: Giro dentado; SB: Subículo.

### b.- Inmunohistoquímica GFP

Mediante esta técnica se identifican a las células que expresan la proteína GFP en su citoplasma. Las células GFP positivas mostraban fluorescencia verde al examinarlas con el microscopio de campo oscuro. Se determinaron el número de células GFP positivas por campo de veinte aumentos, en la zona lesionada, en la zona contralateral y en el grupo control.

### c.- Inmunohistoquímica vimentina

La vimentina es una proteína de tipo filamento intermedio tipo III. Forma parte del citoesqueleto celular. Se expresa principalmente en el citoesqueleto de células mesenquimales, por lo que se usa como su marcador. Puede encontrarse en células que realizan la transición epitelial a mesenquimal dentro del desarrollo normal o tumoral<sup>213</sup>.

Se contabilizaron el número de células vimentina positivos por campo de cuarenta aumentos, de la zona lesionada, así como del grupo control a las 48 horas y 21 días del TCE. Las células vimentina positivas son aquellas que muestran una tinción parduzca alrededor de su núcleo. Las célula vimentina negativa muestran una tinción azulada alrededor de su núcleo.

#### d.- Inmunohistoquímica nestina

La nestina es una proteína tipo filamento intermedio, que se expresa en múltiples células durante su desarrollo, aunque no en su etapa madura. Se expresa en los precursores neuronales de la capa subgranular del hipocampo en la ZSV<sup>143,148</sup> y su expresión disminuye tras la formación de las células maduras, siendo sustituida por la GFAP, por ejemplo<sup>214</sup>.

Se determinó el número de células nestina + en microscopía óptica de veinte aumentos. Las células nestina positiva presentan una tinción granular alrededor del núcleo central. Se contabilizaron en dos regiones, en la zona subventricular y en el giro dentado del hipocampo, dado que estas zonas son las que acogen las CNP en el cerebro adulto<sup>141</sup>. Se compararon el grupo tratamiento ip frente al grupo control ip, tanto a las 48 horas como a los 21 días del TCE.

### 3.8.- Estimación del tamaño muestral

Para estimar el tamaño muestral en los estudio de contraste de hipótesis hay que conocer la magnitud de la diferencia que se pretende demostrar, la seguridad del estudio (riesgo de cometer un error tipo  $\alpha$  o tipo I), el poder estadístico del estudio (riesgo de cometer un error tipo  $\beta$  o tipo II), y si el contraste de hipótesis es uni o bilateral. En nuestro experimento, los valores arbitrarios de  $\alpha$  y  $\beta$  se fijaron en 0,05 y 0,8, respectivamente. Se eligió un contraste de hipótesis unilateral, porque estimamos que la diferencia entre el grupo control y el tratamiento supone un beneficio (mejoría de la función neurológica), por lo que la diferencia siempre va dirigida hacia un lado (también se podría estimar mediante contraste bilateral). Por último, la magnitud de la diferencia se estimó mediante un estudio piloto en el que las diferencias entre el grupo de tratamiento y placebo fueron: Tiempo hasta la caída en el Rotarod: 50%; mayor número de rpm en Rotarod: 50%; la puntuación en el MST: 16,9%; y puntuación en el test de Rogers: 58%. La media de la diferencia de las distintas escalas de valoración fue de aproximadamente el 45%.

Usando los valores anteriormente descritos, se obtiene que n=10 animales por cada grupo de experimento.

### 3.9.- Análisis estadístico

Los resultados de los test funcionales se expresan como mediana y desviación estándar, salvo que se especifique lo contrario. Dado que los datos no siguen una distribución normal y el escaso número de animales a estudio, se utilizaron de manera preferente test no paramétricos para su análisis.

Para valores independientes, el test usado fue la U de Mann-Withney (significación unilateral) para comparar dos categorías y la prueba de Kruskall-Wallis para más de dos categorías. Para variables dependientes, se determinó la distribución de normalidad de los datos mediante una prueba de Saphiro-Wilk. Si los datos no presentaban una distribución normal, se realizó un test de Wilcoxon, mientras que si lo seguían, se aplicó la t-Student para datos dependientes.

Se consideró una diferencia significativa aquella en el que el valor de p fuera igual o menor a 0,05. Se usó el paquete estadístico IBM SPSS statistics (versión 19, IBM Company®, Nueva York, Estados Unidos).

### 3.10.- Captura y procesamiento de imágenes

Las imágenes mostradas fueron tomadas mediante una cámara digital Leica DFC425-C acoplada a un microscopio óptico (Leica Microsystems, Suiza) y con el programa informático Leica Application Suite (Leica Microsystems, Suiza, versión 3.6.0). Las imágenes de las técnicas de histología e inmunohistoquímica se han procesado, realizando ajustes de saturación, contraste y brillo mediante el programa Adobe® Photoshop® Lightroom® (versión 4.4, Adobe Systems Incorporated, San José, California) para mostrar más claramente los datos obtenidos.

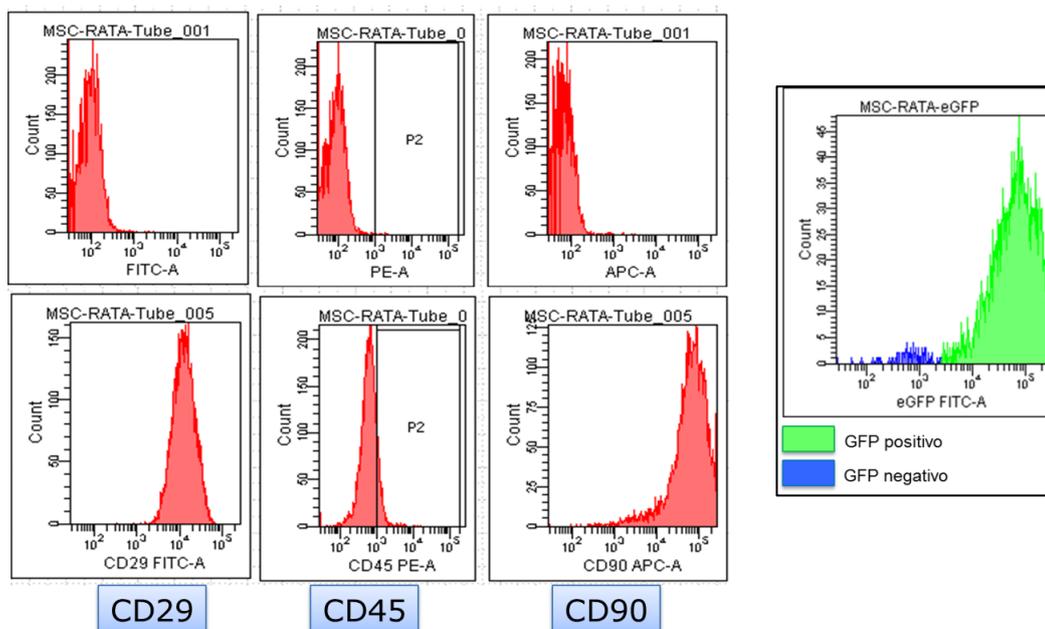


## 4.- Resultados

### 4.1.- Aislamiento de células madre mesenquimales

#### 4.1.1.- Identificación mediante citometría de flujo

Tras el aislamiento y purificación celular, se obtuvo un grupo de células positivas para los marcadores CD 90 y CD 29 (> 95%). Dichas células fueron negativas para CD45 (< 2%). Dentro de ellas, el porcentaje de células GFP positivas era superior al 85% (ilustración 24).



**Ilustración 24.-** Marcadores de células troncales mesenquimales. Se muestran los histogramas de distribución de la muestra de MSC obtenidos tras el marcaje con los anticuerpos CD29-FITC, CD45-PE y CD90-APC. En la fila superior, se muestra el marcaje de una población de células de referencia, negativa para todos los marcadores. En la fila inferior se muestra la población de MSC, positivas para CD29 y CD 90, y negativas para CD45 de nuestro estudio. En el gráfico de la derecha aparece la misma muestra de MSC, según la expresión de GFP (color verde, más del 85%) o no (color azul). GFP: Proteína verde fluorescente; MSC: célula troncal mesenquimal.

#### 4.1.2.- Diferenciación morfológica

La morfología inicial correspondía a células de aspecto fusiforme, adherentes al plástico, coincidentes con MSC (ilustración 25). Tras su cultivo en medios de diferenciación específicos, las MSC adquirieron morfología de adipocitos y osteocitos. La tinción con alizarin red demostró la presencia de depósitos cálcicos en la matriz extracelular. La tinción de oil red demostraba depósitos intracelulares en forma de vacuolas de contenido graso, desplazando el núcleo celular, típicos de los adipocitos.

Esta diferenciación se consiguió tanto en las MSC purificadas inicialmente (GFP negativas) como en aquellas en las que la se incubaron con lentivirus con GFP (GFP positivas). La expresión de GFP en las células permanecía a pesar de la diferenciación a células maduras.

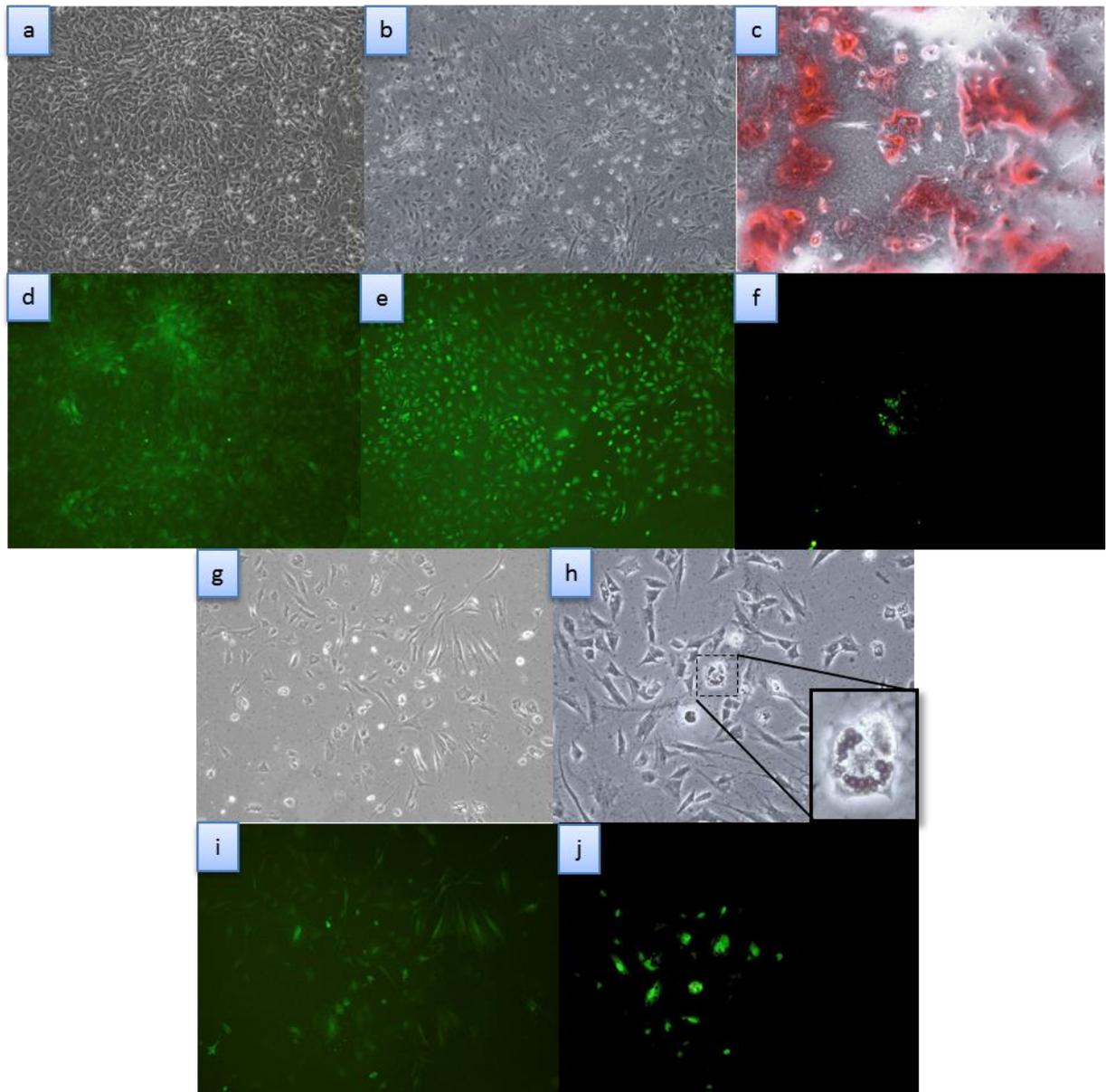


Ilustración 25.- Imágenes tomadas mediante un microscopio invertido que muestran los fenotipos celulares obtenidos mediante incubación con medio específico de diferenciación y posteriores tinciones. a) MSC cultivadas en medio estándar. Muestran morfología típica de MSC indiferenciada (células fusiformes y espiculadas) alcanzando un 100% de confluencia. b) MSC cultivadas durante un período de 21 días en medio de diferenciación de osteocitos. c) MSC cultivadas con el medio de diferenciación de osteocitos y teñidas con Alizarin red. Se observa la coloración rojizo-anaranjada que demuestra la diferenciación de MSC en osteocitos. d, e y f) Visualización mediante microscopio de campo oscuro de MSC indiferenciadas, MSC cultivadas con medio de diferenciación, y MSC cultivadas con medio de diferenciación y marcadas con alizarin red, respectivamente. Todas ellas son el mismo campo que en su microscopio de luz blanca. Se observa la intensa birrefringencia verde, característica de células que se han marcado con GFP (GFP positivas). Esta característica se mantiene a pesar de su diferenciación a osteocito. g) MSC cultivadas durante 14 días en un medio de diferenciación de adipocitos. h) MSC cultivadas con un medio de diferenciación de adipocitos y teñidas con Oil red. Se observa la tinción rojiza de vacuolas citoplasmáticas confluentes cargadas de lípidos que desplazan el núcleo a la periferia (recuadro). i y j) Visualización mediante microscopio de campo oscuro de MSC cultivadas con medio de diferenciación de adipocitos, y MSC cultivadas con medio de diferenciación de adipocitos y teñidas con Oil Red, respectivamente. Ambas son el mismo campo de visualización que las mostradas en la imagen G y H. Se observa la intensa birrefringencia verde de los núcleos celulares, características de las células en las que el lentivirus insertó el GFP. Al igual que las células diferenciadas a osteocito, esta característica se mantuvo a pesar de su diferenciación final. MSC: Célula madre mesenquimal. GFP: Proteína fluorescente verde. Las imágenes mostradas en a, b, d, e, g e i, corresponden a imágenes en 4 aumentos; el resto, están tomadas con cuarenta aumentos.

#### 4.2.- Test funcionales

En el **MST** (ilustración 26a y 27), tras un descenso inicial, se produce una mejoría progresiva en el porcentaje de tiempo en el que el animal de experimentación trata de retirarse la cinta adhesiva. No existen diferencias significativas entre los grupos de experimento.

En el **test de Rogers** (ilustración 26b y 28), tras el TCE se produce un aumento en las puntuaciones lo que refleja una mayor lesión motora. Más tarde se normaliza hasta alcanzar los niveles basales. Esta mejoría se produce en todos los grupos de estudio, y existe una diferencia significativa cuando se compara las puntuaciones a los 7 y 14 días del TCE (7 días,  $p=0.038$ ; 14 días  $p=0.035$ ). En ambas, el grupo de tratamiento tiene una puntuación menor que en el grupo control. Cuando se realizan comparaciones uno a uno, a los 7 días existe menor puntuación en el grupo de tratamiento ip frente al grupo de control simple ( $p=0,016$ ). A los 14 días existe diferencia entre el grupo de tratamiento ip frente al control ip ( $p= 0,021$ ). Sin embargo, al finalizar el experimento, los tres grupos mejoran sus puntuaciones hasta casi alcanzar las puntuaciones iniciales y sus diferencias desaparecen.

En la evaluación con el **Rotarod** (ilustración 26c-d, 29 y 30), tanto el tiempo máximo alcanzado respecto a sus puntuaciones basales como el número de revoluciones por minuto (rpm) máximas empeoran o se mantienen iguales inmediatamente tras el TCE (48 horas) para mejorar después en las evaluaciones a los 7, 14 y 21 días. Existe diferencia significativa entre los tres grupos en estos tres puntos de evaluación (7 días  $p=0,004$  ; 14 días  $p=0,015$  ; 21 días,  $p=0,03$ ). El grupo con mayor puntuación es el grupo de tratamiento ip. Sus valores son casi el doble respecto al grupo de control simple o control ip, aparecen desde el día 7 y se mantiene hasta el día 21.

Cuando se realizan comparaciones entre pares, a los 7 días los animales del grupo de tratamiento ip alcanzan de media el doble de rpm que los del grupo de control ip y control simple ( $p= 0,023$  y  $p= 0,007$ , respectivamente). A los 14 días el grupo de tratamiento ip también tienen mayores puntuaciones medias que los grupos de control ip y control simple ( $p =0,011$ ,  $p = 0,022$ ). A los 21 días, tienen una mayor puntuación media que el grupo de control ip ( $p= 0,02$ ). Aunque con diferente nivel de significación, los mismos resultados se obtienen cuando se compara, en vez del número de rpm máximo alcanzado, el tiempo máximo alcanzado durante la realización del test del Rotarod.

No se produjeron fallecimientos relacionados con la administración intraparenquimatoso. Se produjeron fallecimientos en relación con la administración de la anestesia (por de-

presión respiratoria) y el periodo postoperatorio inmediato (primeras seis horas), sin diferencias entre los grupos de experimentación.

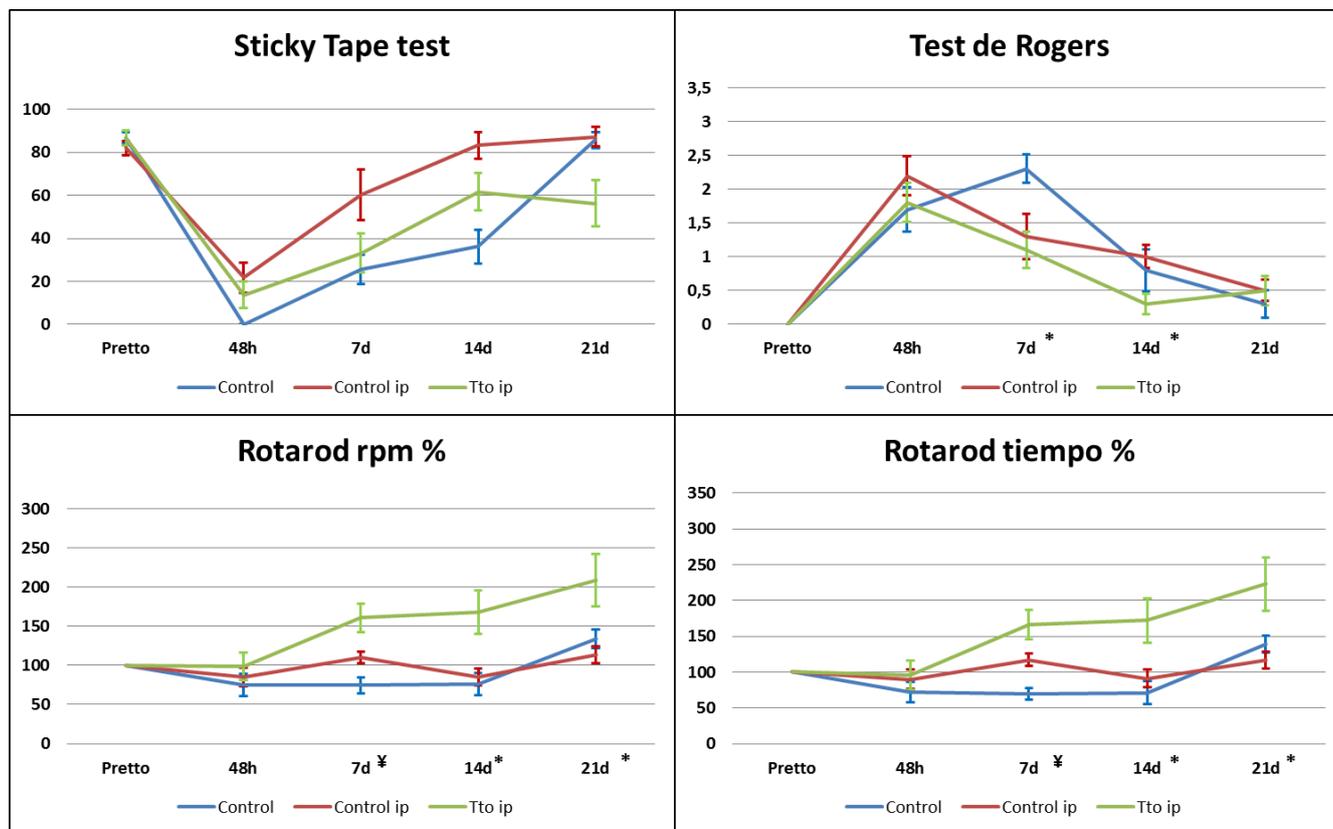


Ilustración 26.- Resultados de los test funcionales en los grupos de experimentación. Los asteriscos muestran la existencia de una diferencia significativa entre el grupo control simple, control intraparenquimatoso y tratamiento intraparenquimatoso. Escala Sticky tape test en porcentaje del tiempo total. Escala de Rotarod-rpm y Rotarod-tiempo en porcentaje sobre la media basal inicial. Se muestra el valor representado en cada muestra junto con su error estándar de la muestra \* Diferencia significativa entre los tres grupos con  $p < 0,05$ . † Diferencia significativa entre los tres grupos con  $p < 0,01$ .

% Sticky Tape	Preto	48h	7d	14d	21d
<b>Control</b>	87 (7,9)	0 (0)	26 (16,6)	36 (19,3)	86 (9,3)
<b>Control ip</b>	82 (11,3)	22 (22,6)	60 (37,6)	83 (21)	87 (15,7)
<b>Tto ip</b>	87 (6,9)	14 (20)	33 (28,6)	62 (27,1)	56 (33,8)
<b>Significación (p)</b>	ns	ns	ns	ns	ns

Ilustración 27.- Resultados del Sticky tape test en los grupos de experimentación, expresado como porcentaje del tiempo total. Los resultados vienen expresados en medias simples; el número entre paréntesis expresa la desviación estándar. Ns: no significativo. Control: Traumatismo craneal controlado sin intervención. Control ip: TC controlado e infusión intralesional de suero salino. Preto: previo al tratamiento. Tto ip: TC controlado e infusión intralesional de células mesenquimales.

Rogers	Pretto	48h	7d	14d	21d
	0	1,7	2,3	0,8	0,3
<b>Control</b>		(0,82)	(0,52)	(0,75)	(0,52)
	0	2,2	1,3	1	0,5
<b>Control ip</b>		(0,92)	(1,06)	(0,6)	(0,52)
	0	1,8	1,1	0,3	0,5
<b>Tto ip</b>		(0,92)	(0,88)	(0,48)	(0,71)
<i>Significación (p)</i>	ns	ns	<b>0,038</b>	<b>0,035</b>	ns

Ilustración 28.- Resultados del test de Rogers. Los resultados vienen expresados en medias simples; el número entre paréntesis expresa la desviación estándar. Ns: no significativo. Control: Traumatismo craneal controlado sin intervención. Control ip: TC controlado e infusión intralesional de suero salino. Pretto: previo al tratamiento. Tto ip: TC controlado e infusión intralesional de células mesenquimales.

Rotarod rpm %	Pretto	48h	7d	14d	21d
	100	74,5	74,5	75,8	133,8
<b>Control</b>		(35)	(24)	(35)	(29)
	100	85,5	110,2	85,2	113,3
<b>Control ip</b>		(38)	(24)	(37)	(36)
	100	98,3	160,9	167,8	208,7
<b>Tto ip</b>		(56)	(58)	(88)	(105)
<i>Significación (p)</i>	ns	ns	<b>0,004</b>	<b>0,017</b>	<b>0,03</b>

Ilustración 29.- Resultados del test de Rotarod, número de revoluciones por minuto máximas alcanzadas. Los resultados se expresan en % respecto a la media basal de cada grupo. Entre paréntesis, la desviación estándar. Ns: no significativo. Control: Traumatismo craneal controlado sin intervención. Control ip: TC controlado e infusión intralesional de suero salino. Pretto: previo al tratamiento. Tto ip: TC controlado e infusión intralesional de células mesenquimales.

Rotarod Tiempo %	Pretto	48h	7d	14d	21d
	100	71,8	69,8	71,2	139
<b>Control</b>		(35)	(19)	(39)	(30)
	100	89,6	116,9	91,1	116,9
<b>Control ip</b>		(44)	(27)	(42)	(39)
	100	95,2	166,2	171,8	222,8
<b>Tto ip</b>		(64)	(66)	(99)	(118)
<i>Significación (p)</i>	ns	ns	<b>0,003</b>	<b>0,039</b>	<b>0,05</b>

Ilustración 30.- Resultados del test de Rotarod, tiempo máximo alcanzado. Los resultados se expresan en % respecto a la media basal de cada grupo. Entre paréntesis, la desviación estándar. Ns: no significativo. Control: Traumatismo craneal controlado sin intervención. Control ip: TC controlado e infusión intralesional de suero salino. Pretto: previo al tratamiento. Tto ip: TC controlado e infusión intralesional de células mesenquimales.

### 4.3.- Supervivencia y diferenciación de trasplante celular

#### 4.3.1.- Citometría de flujo

Se procesaron muestras en los días +2 y + 21 tras el trauma craneal controlado (24 horas y 20 días tras el trasplante celular, respectivamente).

Para identificar el grupo de células mesenquimales, de todos los eventos adquiridos ( $10^6$  eventos/tubo citometría, color blanco en la figura 31) se seleccionó la población celular que reunía las características adecuadas de tamaño y complejidad (Población 1= $P_1$ , color rojo). Dentro de ella, se escogieron las células 7-AAD negativas, es decir, aquellas viables (Color azul,  $P_2$ ). Posteriormente, se eligieron las células  $CD29^+$  y  $CD45^-$  (Color verde,  $P_3$ ). El anticuerpo CD90 APC marcaba de manera global a todas las células de la muestra, sin permitir diferenciar grupos celulares, por lo que, aunque usado, no resultó de utilidad. Se expresan porcentaje de células respecto a las células totales ( $P_1$ ).

De manera análoga, se repitió el experimento pero sin utilizar anticuerpos de marcaje, buscando la fluorescencia intrínseca de las MSC marcadas con GFP.

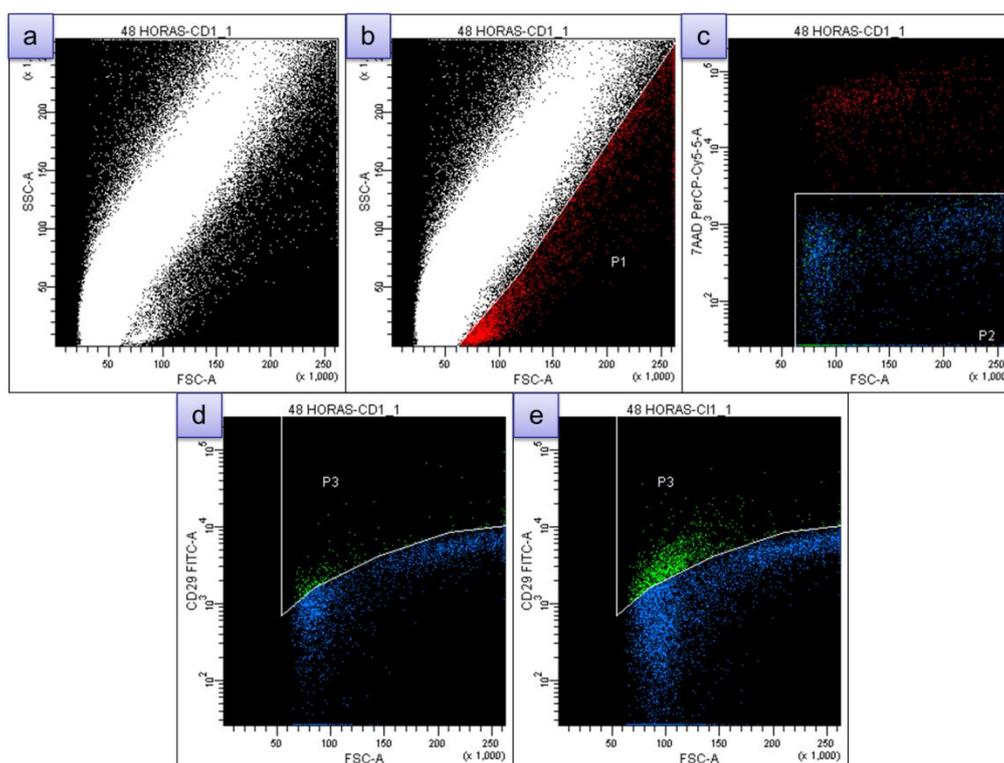
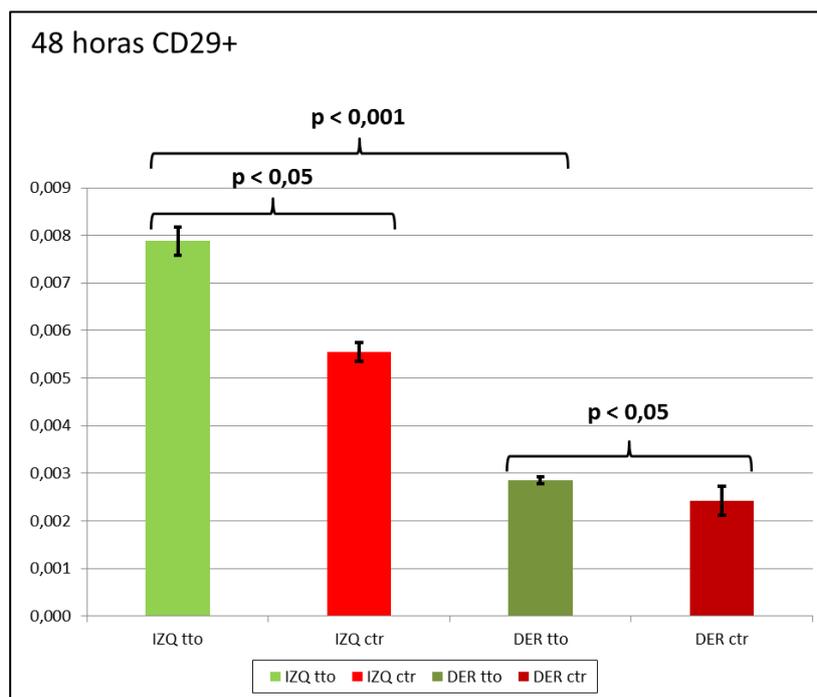


Ilustración 31.- Método utilizado para la determinación de células troncales mesenquimales (MSC) en tejido cerebral. a) Eventos adquiridos ( $1 \times 10^6$ ) distribuidos mediante su tamaño y complejidad. b) Las células rojas son las que contienen las características típicas de MSC (Población 1= $P_1$ ). c) Se seleccionan las células negativas para 7AAD, es decir, las células viables ( $P_2$ ). d y e) De ellas, se escogen las que muestran positividad para CD29 ( $P_3$ ), existiendo una diferencia notable entre el hemisferio que sufrió la lesión y se infundió SSF (Figura 27d), respecto a las que han recibido un trasplante de MSC-a (Figura 27e). La cuantificación de esta diferencia así como su nivel de significación se muestra en las siguientes secciones.

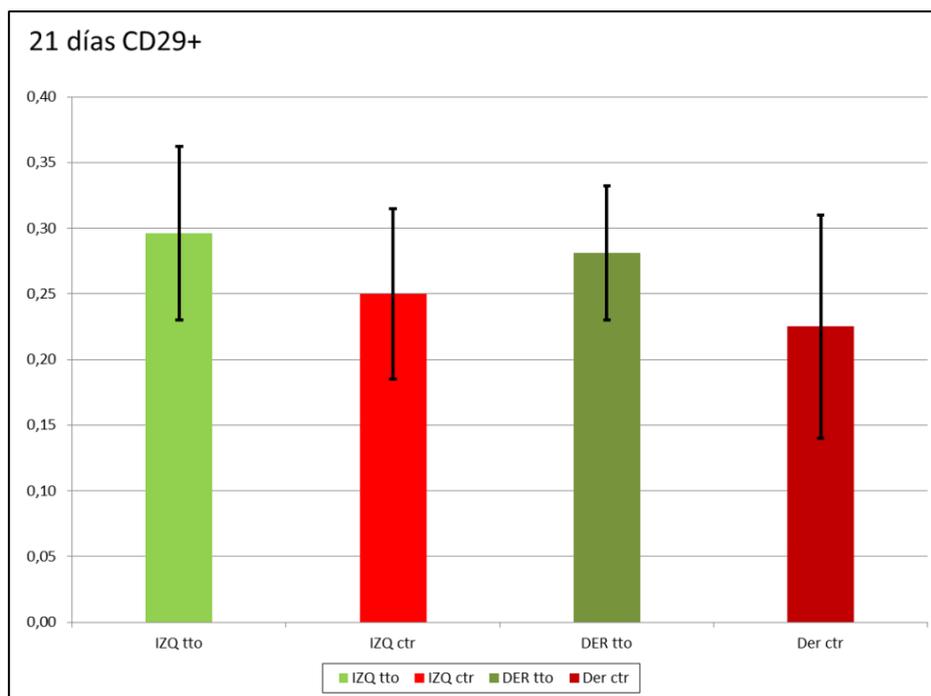
a) Identificación de células CD29<sup>+</sup> a las 48 horas del TCE

	CD29 <sup>+</sup> (%)	Error típico
IZQ tto	0,0079	0,0003
IZQ ctr	0,0055	0,0002
DER tto	0,0029	0,0001
DER ctr	0,0024	0,0003

Ilustración 32.- Gráfico de la citometría en los animales de experimentación a las 48 horas de un trauma craneal controlado (hemisferio izquierdo). La altura de la barra viene determinada por la media del porcentaje de células CD29<sup>+</sup> frente al total de eventos registrados. Las barras muestran el error estándar de la media. Ctr: animales que han sufrido un traumatismo craneal, y 24 horas después se les ha administrado suero salino fisiológico intraparenquimatosamente ipsilateral a la lesión (hemisferio izquierdo). Tto: animales que han sufrido el mismo trauma craneal que los anteriores, y 24 horas después se les ha administrado células madre mesenquimales intraparenquimatosamente ( $2 \times 10^5$  células/animal) ipsilateral a la lesión (hemisferio izquierdo)

A las 48 horas, se identifica mayor número de células CD29<sup>+</sup> (marcador de célula mesenquimal) en el hemisferio izquierdo del grupo de tratamiento (TCE + trasplante) que en el mismo hemisferio del grupo control ip (Ilustración 32, TCE+SSF;  $p = 0,028$ ). Se detectaron 1.4 veces más células CD29<sup>+</sup> en el grupo tratamiento que en el grupo control. También se encontraron mayor número cuando se compara, en el grupo tratamiento, el hemisferio izquierdo frente a su contralateral ( $p < 0,001$ ).

También se detecta un leve incremento de células CD29<sup>+</sup> en el hemisferio derecho del grupo tratamiento respecto al mismo hemisferio del grupo control ( $p = 0,03$ ).

b) Identificación de células CD29<sup>+</sup> a los 21 días del TCE

	CD29 <sup>+</sup> (%)	Error típico
IZQ tto	0,296	0,066
IZQ ctr	0,250	0,065
DER tto	0,281	0,051
DER ctr	0,225	0,085

Ilustración 33.- Gráfico de la citometría cerebral en los animales de experimentación a los 21 días de un trauma craneal controlado. La altura de la barra viene determinada por la media del porcentaje de células CD29<sup>+</sup> frente al total de eventos registrados. Las barras muestran el error estándar de la media. Izq: Hemisferio donde se ha realizado un trauma craneal controlado y 24 horas después se ha administrado células mesenquimales ( $2 \times 10^5$  MSC) perilesionalmente. Dcho: hemisferio derecho, contralateral al anterior.

A los 21 días, cuando se compara el porcentaje de células CD29<sup>+</sup> en los hemisferios que recibieron el traumatismo craneal entre el grupo de trasplante y el que no lo recibió, no se observan diferencias significativas (ilustración 33). Fue levemente mayor la proporción de estas células en los hemisferios que recibieron tratamiento con MSC, respecto a su control, pero sus intervalos de confianza eran demasiado amplios como para alcanzar significación.

### C) Identificación de células GFP + a las 48 horas del TCE

	GFP+ (%)	Error típico
IZQ	0,0004	0,0002
DCHA	0,0003	0,0003
CONTROL	0,0003	0,0001

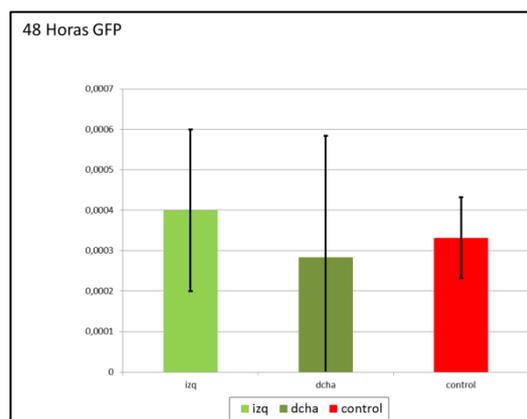


Ilustración 34.- Gráfico de la citometría cerebral en los animales de experimentación a las 48 horas de un trauma craneal controlado. La altura de la barra viene determinada por la media del porcentaje de células GFP+ frente al total de eventos registrados. Las barras muestran el error estándar de la media. Ctr: animales que han sufrido un traumatismo craneal, y 24 horas después se les ha administrado suero salino fisiológico intraparenquimatosamente. Izq: hemisferio izquierdo de animales que han sufrido el mismo trauma craneal que los anteriores, y 24 horas después se les ha administrado MSC intraparenquimatosamente ( $2 \cdot 10^5$  células/animal). Dcha: Hemisferio derecho de animales que han sufrido el mismo trauma craneal que los anteriores, y 24 horas después se les ha administrado MSC intraparenquimatosamente ( $2 \cdot 10^5$  células/animal).

A las 24 horas de un trauma craneal, no existe diferencia entre los porcentajes de células GFP positivas que se encuentran en ambos hemisferios de los animales del grupo tratamiento. Tampoco respecto al grupo control (ilustración 34).

### D) Identificación de células GFP+ a los 21 días

	GFP+	Error típico
IZQ	0,9685	0,42
DCHA	1,2177	0,55

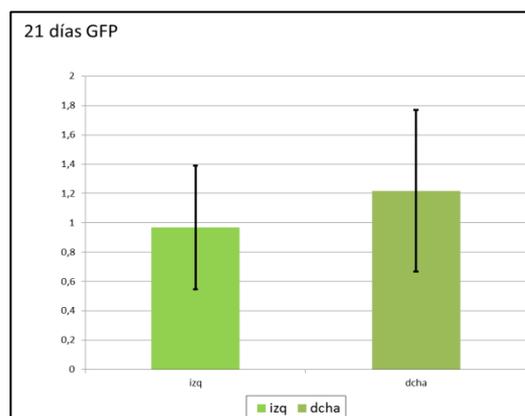


Ilustración 35.- Gráfico de la citometría cerebral en los animales de experimentación a los 21 días de un trauma craneal controlado. La altura de la barra viene determinada por la media del porcentaje de células GFP+ frente al total de eventos registrados. Las barras muestran el error estándar de la media. Izq: Hemisferio donde se ha realizado un trauma craneal controlado y 24 horas después se ha administrado células mesenquimales ( $2 \cdot 10^5$  MSC) perilesionalmente. Dcho: hemisferio derecho, contralateral al anterior.

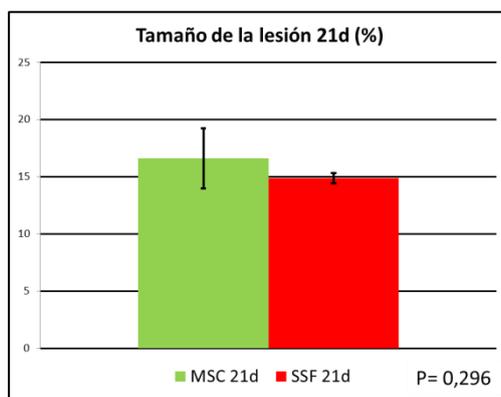
A los 21 días del TCE controlado, no existe diferencias en las células GFP + en el hemisferio del traumatismo y trasplante respecto al contralateral (ilustración 35).

### 4.3.2.- Evaluación histológica

Macroscópicamente, a los 21 días del traumatismo craneoencefálico se observa un área deprimida y de aspecto levemente más parduzco en la zona de la contusión. Mediante tinción de hematoxilina eosina, se identifica en el área del TCE un extenso hematoma con despegamiento de la meninge y edema subyacente. En la zona del parénquima por debajo de la lesión se observa áreas de edema junto con un infiltrado celular extenso, sugestivo de un patrón de inflamación.

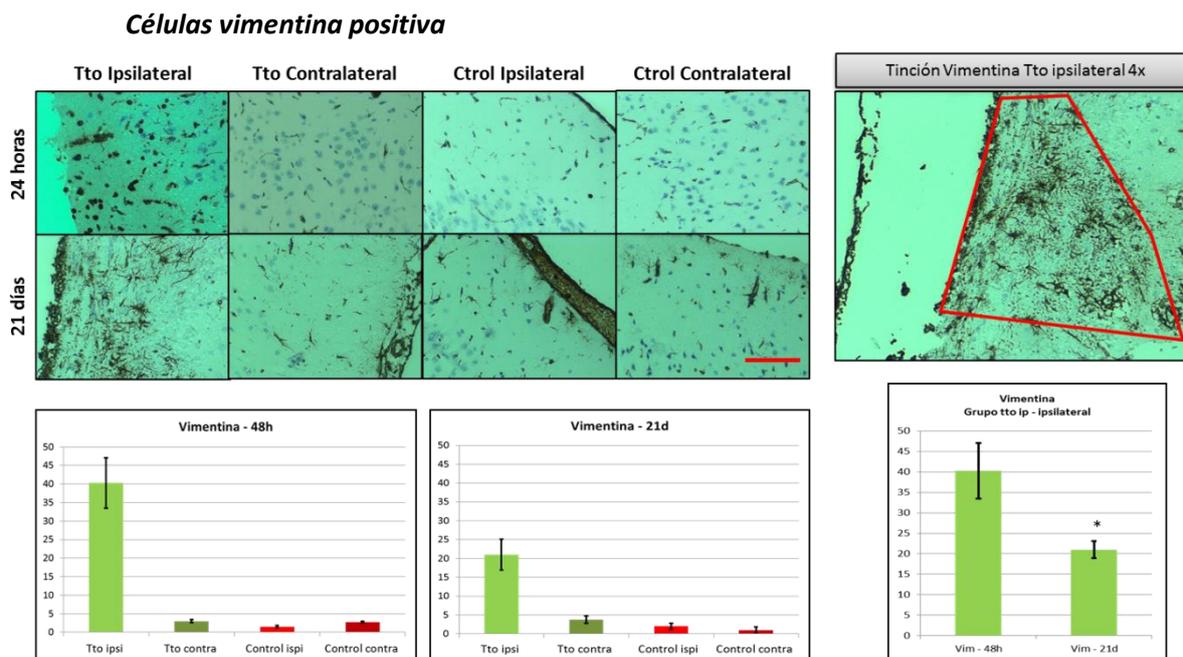
#### **Tamaño de la lesión**

A los 21 días, no hubo diferencias en el tamaño macroscópico del área de la lesión entre el grupo de tratamiento ip comparado con control ip (Ilustración 36;  $p=0,296$ ).



	% Lesión	$\sigma$
Tratamiento ip	16,6	2,63
Control ip	14,9	0,47

Ilustración 36.- Comparativa del tamaño de la lesión cerebral tras 21 días. MSC: Infusión con células madre mesenquimales; SSF: Infusión con suero salino fisiológico (control); ip: intraparenquimatoso;  $\sigma$ : desviación estándar.



**Ilustración 37.-** Población celular en GD del hipocampo. Inmunofluorescencia con vimentina bajo microscopía óptica (20 aumentos). En la fila superior se muestran un campo representativo de cada grupo a las 48 horas del trauma craneal controlado y en la fila inferior a los 21 días. A las 48 horas, el número de células vimentina se encuentra solo en el grupo tratamiento, por debajo de la lesión (Gráfico abajo a la izquierda). A los 21 días, se encuentran los mismo hallazgos (Gráfico abajo en el centro). El número de células vimentina positivas en dicha zona disminuyó de manera significativa;  $p < 0,05$  (Gráfico abajo a la derecha). La figura en la esquina superior derecha muestra un corte a menor aumento (4x) justo por debajo de la zona de la lesión y trasplante con células mesenquimales; en ella, existe una población de células vimentina positiva distribuida en una región triangular. En los gráficos, la altura muestra la media y las barras el error típico. En las fotografías, la barra roja indica una distancia de 200 micras.

\*  $p < 0,05$ . Ctrol: control; contra: contralateral; ipsi: ipsilateral; Tto: tratamiento.

A las 48 horas, se detectan abundantes células vimentina positiva en la corteza parietofrontal, corticales y subcorticales en el hemisferio ipsilateral a la lesión del grupo tratamiento, diseminadas de manera difusa por toda la zona sublesional. En los otros grupos se detectan ocasionalmente alguna célula vimentina positiva, con morfología de estructura vascular.

A los 21 días, se mantiene una zona con células vimentina positiva en la región ipsilateral del grupo de tratamiento ip que no se identifica en otras zonas del mismo cerebro ni del grupo control ip. Existe un menor número de células vimentina positiva por debajo de la lesión en el día 21 que a las 48 horas ( $p=0,035$ ).

La zona de células vimentina positiva se localiza subcortical y con morfología triangular, con la base localizada en la superficie meníngea y el vértice en el parénquima intralesional, siguiendo la distribución típica de las células tras un trasplante intraparenquimatoso<sup>215</sup>. A los 21 días, se observa en el grupo control ip un engrosamiento meníngeo más marcado que en el grupo de tratamiento ip (ilustración 37).

## Células GFP positiva

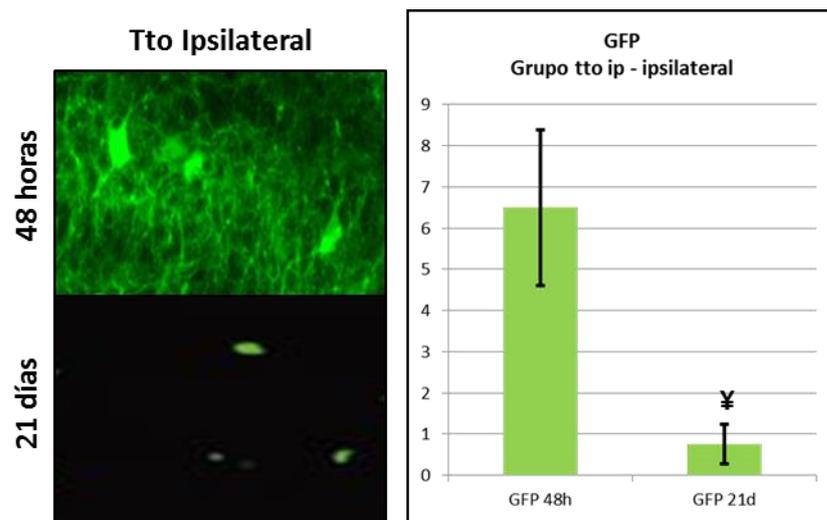


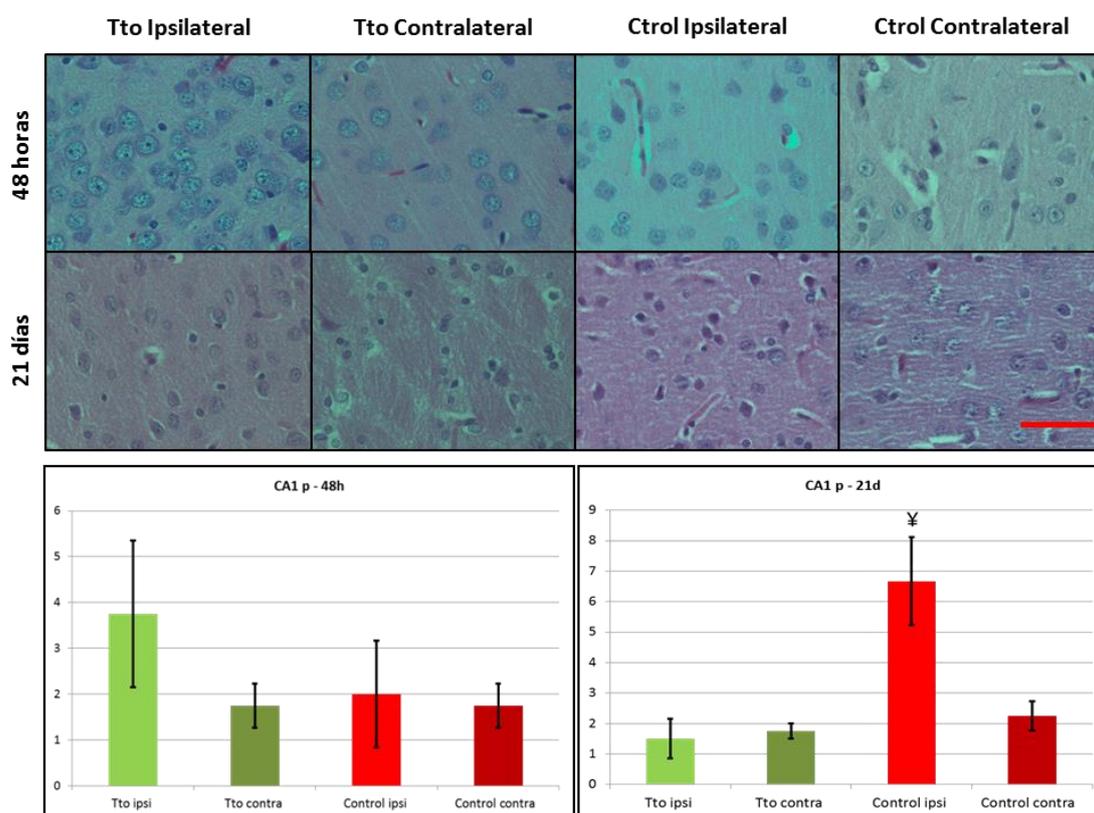
Ilustración 38.- Células GFP positivas en la zona de la lesión. Inmunofluorescencia de campo oscuro (20x). En las dos figuras de la izquierda se muestran dos campos representativos a las 48 horas (arriba) y a los 21 días del TCE. En el gráfico de la izquierda se muestra la cuantificación de células GFP positivas en la zona de la lesión y trasplante, en esos mismos puntos de corte. Se observa una mayor población celular a las 48 horas del TCE (24 horas postrasplante) que al final del experimento (21 días). La altura del gráfico muestra la media y las barras el error típico.

¥  $p < 0,05$ . GFP: Proteína verde fluorescente; IP: intraparenquimatoso; Tto: tratamiento.

A las 48 horas, se detectan algunas células GFP positiva en la corteza parietofrontal, corticales y subcorticales en el hemisferio ipsilateral a la lesión del grupo tratamiento (ilustración 38). En los otros grupos (contralateral, grupo control) no se detectan células GFP positivas. Tampoco se detectan en otras zonas del cerebro.

A los 21 días, existe una población celular menor en la misma región. La diferencia entre ambos grupos alcanza diferencia significativa (48 horas  $6,5 \pm 3,8$ ; 21 días  $0,75 \pm 0,97$ ;  $p = 0,035$ ).

### Población celular en CA1



**Ilustración 39.- Población celular en CA1 del hipocampo. Tinción hematosilina eosina bajo microscopía óptica (40 aumentos). En la fila superior se muestran un campo representativo de cada grupo a las 48 horas del trauma craneal controlado y en la fila inferior a los 21 días. A las 48 horas, el número de células piramidales en la región CA1 del hipocampo no fue significativamente diferente (gráfico abajo izquierda). A los 21 días, hubo un mayor número de células piramidales en la zona de la lesión del grupo control ip que en el resto de grupos (Control ipsi Vs Tto ipsi, Tto contra y Control contra;  $p=0,029$ ). En los gráficos, la altura representa la media y las barras el error típico. La barra roja muestra una distancia de 100 micras.**

∗  $p < 0,05$ . Ctrol: control; contra: contralateral; ipsi: ipsilateral; Tto: tratamiento.

A las 48 horas, no existe diferencia significativa entre el número de células piramidales por campo en la región CA1 del hipocampo (ilustración 39). Son más abundantes en el hemisferio ipsilateral a la lesión del grupo tratamiento ip que en su hemisferio contralateral y respecto al control ip, aunque sin alcanzar una diferencia significativa (tto ipsi  $3,8 \pm 3,3$ , tto contra  $1,8 \pm 0,96$ , control ipsi  $2 \pm 2$ ;  $p > 0,05$ ).

A los 21 días, sin embargo, la mayor proporción de células piramidales se encuentra en el grupo control ip, en la zona del TCE y trasplante, siendo la diferencia significativa comparándola con la misma región del grupo tratamiento ip (Tto ipsilateral  $1,5 \pm 0,65$ , Tto contralateral  $1,75 \pm 0,25$ , Control ipsilateral  $7,75 \pm 1,44$ , Control contralateral  $2,25 \pm 0,48$ ;  $p=0,029$ )

## Población celular en CA3

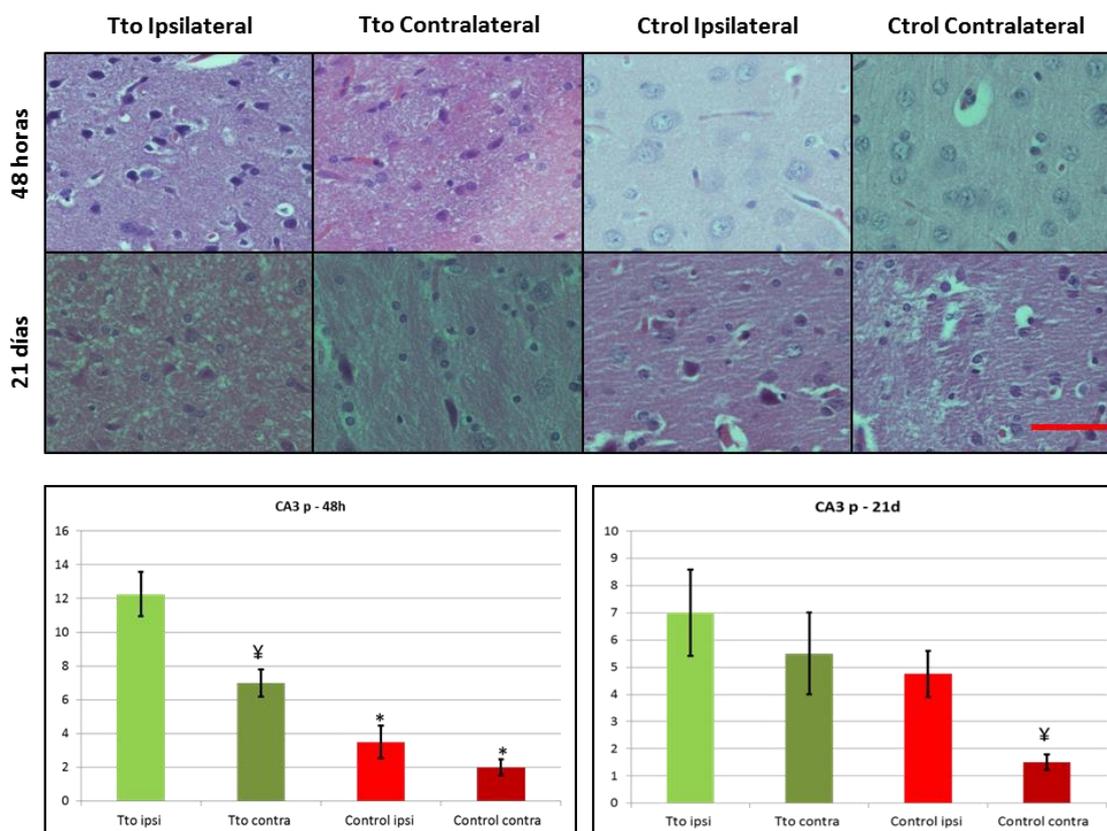


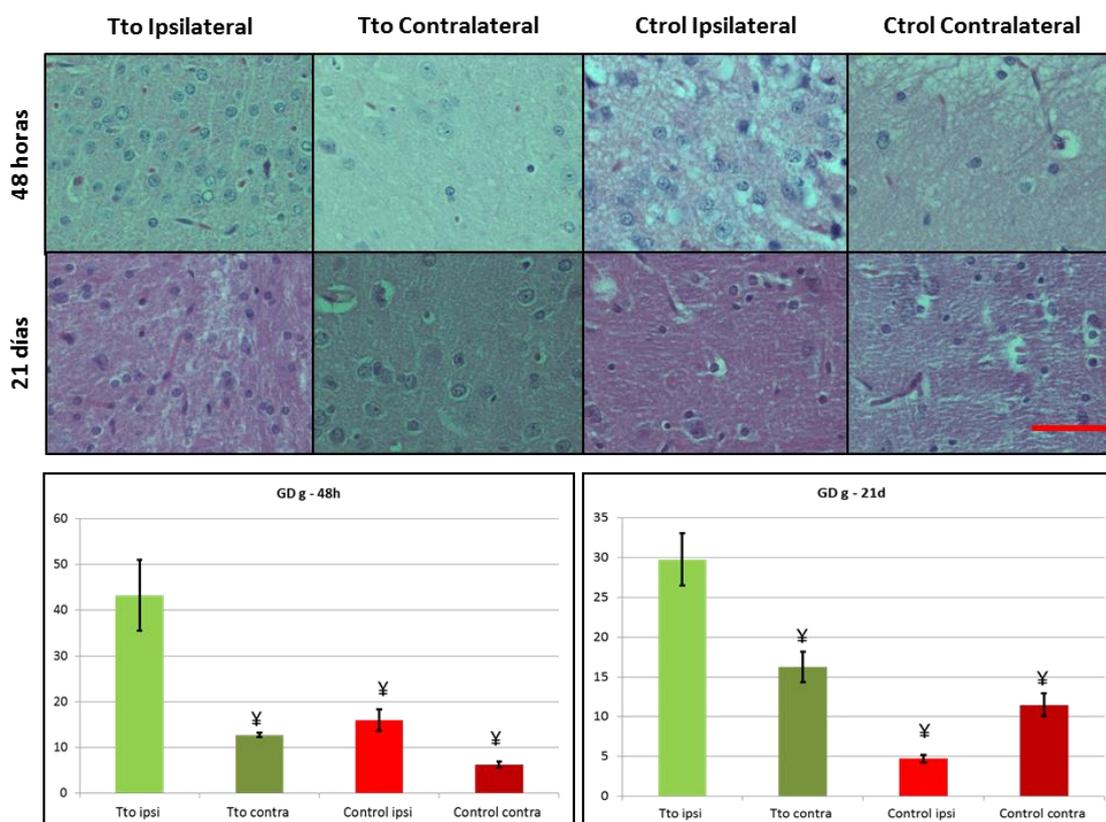
Ilustración 40.- Población celular en CA3 del hipocampo. Tinción hematosilina eosina bajo microscopía óptica (40 aumentos). En la fila superior se muestran un campo representativo de cada grupo a las 48 horas del trauma craneal controlado y en la fila inferior a los 21 días. A las 48 horas, el número de células piramidales en la región CA3 del hipocampo fue mayor en el grupo tto ip, ipsilateral a la lesión respecto al resto de grupos (gráfico abajo izquierda). A los 21 días, aunque el recuento fue mayor en el mismo grupo respecto al resto, solo hubo diferencia con el control ip, contralateral en la lesión. En los gráficos, la altura representa la media y las barras el error típico. La barra roja muestra una distancia de 100 micras.

∓ p<0.05. \* p<0.005. Ctrol: control; contra: contralateral; ipsi: ipsilateral; Tto: tratamiento.

A las 48 horas, existe una diferencia significativa entre el número de células piramidales por campo en la región CA3 del hipocampo (Ilustración 40;  $p = 0,02$ ). Son más abundantes en el hemisferio ipsilateral del grupo tratamiento que en su hemisferio contralateral (tto ipsilateral  $12,3 \pm 2,63$ , tto contralateral  $7 \pm 2,16$ ;  $p = 0,02$ ). También existe diferencia cuando se compara frente a ambos hemisferios del control ip (control ipsilateral  $3,5 \pm 1,91$ ,  $p = 0,002$ ; control contralateral  $2 \pm 0,82$ ,  $p = 0,002$ ).

A los 21 días, son más abundantes en el grupo tratamiento ip, en la zona ipsilateral que en el resto de grupos, pero sin alcanzar significación, excepto cuando se compara con la población celular del grupo control ip, contralateral a la lesión (Tto ipsilateral  $7 \pm 1,97$  frente Control contralateral  $1,5 \pm 0,58$ ;  $p=0,029$ ).

### Población celular en el Giro dentado



**Ilustración 41.- Población celular en GD del hipocampo. Tinción hematosilina eosina bajo microscopía óptica (40 aumentos). En la fila superior se muestran un campo representativo de cada grupo a las 48 horas del trauma craneal controlado y en la fila inferior a los 21 días. A las 48 horas, el número de células granulares en el GD del hipocampo fue mayor en el grupo tto ip, ipsilateral a la lesión respecto al resto de grupos (gráfico abajo izquierda). A los 21 días, esta diferencia se mantuvo. La barra roja muestra una distancia de 100 micras.**

¥  $p < 0,05$ . Ctrol: control; contra: contralateral; ipsi: ipsilateral; Tto: tratamiento.

A las 48 horas, existe una diferencia significativa entre el número de células granulosas por campo en el giro dentado del hipocampo (ilustración 41;  $p = 0,006$ ). Son más abundantes en el hemisferio ipsilateral del grupo tratamiento que en su hemisferio contralateral (tto ipsilateral  $43,3 \pm 15,52$ , tto contralateral  $12,8 \pm 0,96$ ;  $p = 0,03$ ). También existe diferencia cuando se compara frente al control ip, de ambos lados (control ipsilateral  $3,5 \pm 1,91$ ,  $p = 0,04$ ; control contraateral  $6,3 \pm 1,26$ ,  $p = 0,017$ ).

A los 21 días, persiste una diferencia entre los diferentes grupos ( $p = 0,004$ ). Son más abundantes en el hemisferio ipsilateral del grupo tratamiento ip que en el contralateral (tto ipsilateral  $29,8 \pm 6,3$ , tto contralateral  $16,3 \pm 2,8$ ;  $p = 0,03$ ). También existe diferencia cuando se compara frente a ambos hemisferios del control ip (control ipsilateral  $4,8 \pm 0,9$ ,  $p = 0,03$ ; control contralateral  $11,5 \pm 2,9$ ,  $p = 0,03$ ).

### Células nestina positiva, zona subventricular

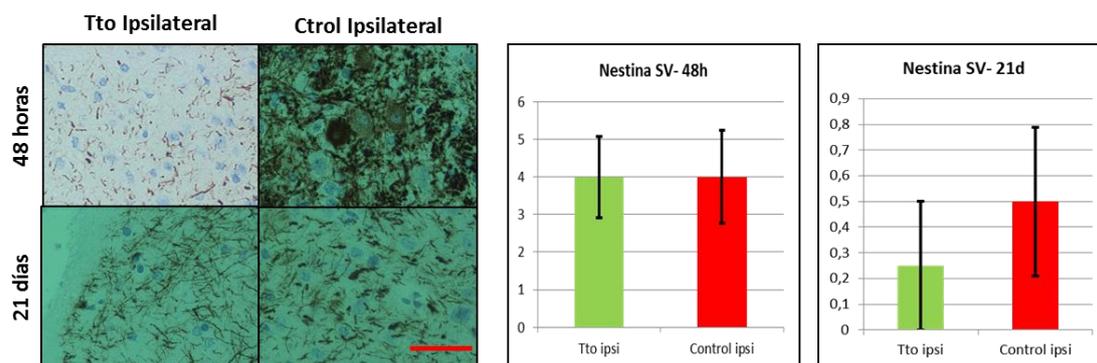


Ilustración 42.- Población celular de células nestina positiva en la zona subventricular. Tinción con Nestina bajo microscopía óptica de 40 aumentos. Se muestran cuatro cortes histológicos representativos de cada grupo, tanto a las 48 horas como a los 21 días. No se evidencia diferencia entre las células nestina positiva tanto a las 48 horas (gráfico izquierda) como a los 21 días (gráfico derecha). La altura de la barra representa la media de cada grupo, y las barras el error estándar de la muestra. La barra roja indica 100 micras.

En la zona subventricular (ilustración 42), a las 48 horas no se encontró diferencia entre el número de células nestina positiva en el grupo de tratamiento respecto al grupo control (tto  $4 \pm 2,2$ , control  $4 \pm 1,9$ ;  $p > 0,05$ ).

A los 21 días, el número de células nestina positiva fue mayor en el grupo control que en el grupo tratamiento, sin alcanzar significación. En ambos grupos, fueron menores que a las 48 horas (tto  $0,25 \pm 0,5$ , control  $0,5 \pm 0,6$ ;  $p > 0,05$ ).

### Células nestina positiva, giro dentado

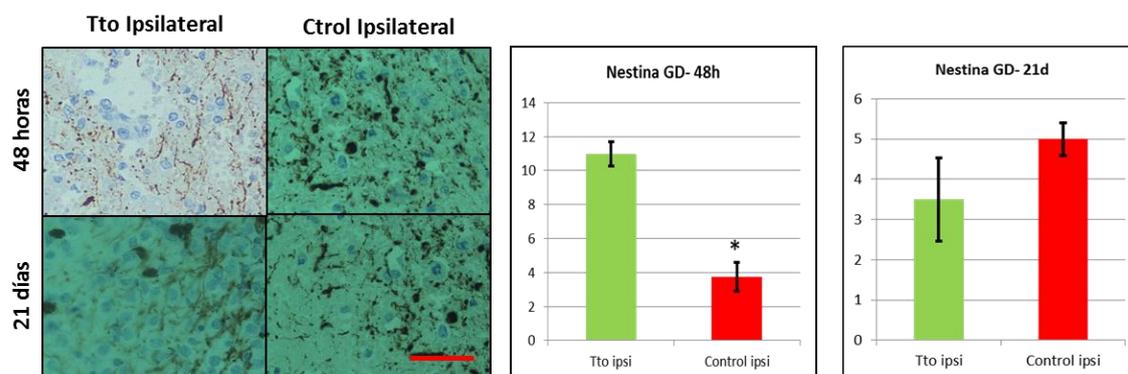


Ilustración 43.- Población celular de células nestina positiva en el giro dentado del hipocampo. Tinción con Nestina bajo microscopía óptica de 40 aumentos. Se muestran cuatro cortes histológicos representativos de cada grupo, tanto a las 48 horas como a los 21 días. A las 48 horas, existe un mayor número de células nestina + en el grupo tratamiento ( $p=0,001$ ). A los 21 días, no existen diferencias. La altura de la barra representa la media de cada grupo, y las barras el error estándar de la muestra. \*  $p=0,001$ . La barra roja indica 100 micras.

En el giro dentado del hipocampo (ilustración 43), a las 48 horas hubo un número mayor de células nestina positiva en el grupo de tratamiento respecto al control (tto  $11 \pm 1,4$ , control  $3,8 \pm 1,7$ ;  $p = 0,001$ ).

A los 21 días, no hubo diferencia. En ambos grupos, fueron menores que a las 48 horas (tto  $3,5 \pm 2,1$ , control  $5 \pm 0,81$ ;  $p > 0,05$ ).





## 5.- Discusión

El objetivo de este estudio ha sido conocer si en un modelo de traumatismo craneoencefálico en ratas la terapia con MSC intraparenquimatosas en el lugar de la lesión en la fase aguda tras un TCE suponía un cambio en la evolución neurológica, expresada mediante mejoría en la función motora y sensitiva. Igualmente, se quería investigar los mecanismo que podrían explicar esta mejoría funcional.

### *Test funcionales*

En este estudio, se ha objetivado una mejoría funcional en los test sensitivo-motores (Rotarod) a partir primera semana tras el TCE, que se mantiene hasta el final del seguimiento. Sin embargo, estas diferencias que aparecen en fases intermedias en el otro test motor (Test de Rogers modificado) desaparecen con la finalización del experimento. En los resultados del test sensitivo no hubo diferencias.

La falta de significación en el test sensitivo (**Modified sticky tape test**) puede estar determinado por el modelo de trauma craneal usado. El trauma craneal se ha producido en una zona más adelantada respecto a lo que suele ser el estándar. El área lesionada en este estudio contiene una zona que contiene la principal corteza motora y otras suplementarias. Aunque también abarca áreas sensitivas, son zonas de corteza asociativa secundarias, que se localizan en regiones más caudales<sup>200</sup>. Se eligió este modelo para intentar aumentar los daños en la corteza motora, lo que permitiría ver más claramente los efectos de la terapia con MSC. En los tres grupos la respuesta a este test ha sido similar: un descenso en la puntuación tras el TCE que desaparece con el tiempo hasta normalizarse a la línea de base en el día 21. Posiblemente esto refleja una lesión funcional en dichas regiones (edematización, lesión axonal, áreas de penumbra o de vascularización límite), pero no estructural. En los tres grupos, el tratamiento con MSC no afectó a la evolución de esa supuesta lesión funcional.

Las puntuaciones del **test de Rogers** modificado son mejores en el grupo de tratamiento respecto a los controles, pero solo en las puntuaciones intermedias (7 y 14 días), desapareciendo al final de seguimiento, debido a que los tres grupos mejoran hasta alcanzar prácticamente su línea basal. Este test evalúa la función motora mediante la respuesta a un estímulo (la tracción de la cola) y su movilidad espontánea.

Sin embargo, sí que se encontraron diferencias significativas cuando se realizó el **test del Rotarod**. Aparecieron desde la primera semana tras el TCE (día +7) y se mantuvieron hasta

el sacrificio de los animales. Las puntuaciones en el grupo de tratamiento duplicaron las de los grupos controles. Este es un test mixto, tanto sensitivo (propioceptivo) como motor.

¿Cómo explicar la diferencia entre los dos tipos de test motores? Aunque aparentemente están en contradicción, pensamos que el Rotarod es un test superior al test de Rogers modificado, dado que en este último las puntuaciones se asignan de manera subjetiva por parte de un examinador, a pesar de que sea ciego para el tratamiento. Dicha puntuación subjetiva puede producir un sesgo en los resultados. Sin embargo el test de Rotarod es más objetivo, dado que tanto el tiempo de entrenamiento como el tiempo de realización del test es siempre el mismo y es independiente del observador. Como el test evalúa dos aspectos unidos de la psicomotricidad, la parte sensitiva y la motora, y no se han encontrado diferencias en el test sensitivo, probablemente la mejoría de las puntuaciones a lo largo del tiempo se deba a una mejoría en las regiones motoras. Dichas regiones son la principal zona contusionada en nuestro modelo de TCE.

Si utilizásemos un grupo de animales a los que no realizara ninguna lesión, el test de Rotarod mostraría unas puntuaciones que mejoran a lo largo del tiempo<sup>180</sup>. Esta mejoría se produce porque, a medida que se practica más el test, las ratas aprenden a realizarlo mejor (“entrenan”) y alcanzan mayores puntuaciones. Cuando se produce un daño cerebral, ese proceso de aprendizaje se ve frenado<sup>123,191,216</sup>. En nuestro experimento, sus puntuaciones permanecen cercanas a las puntuaciones basales o algo más bajas. El grupo de tratamiento mejora desde la semana del trauma craneal, acercándose más a las curvas normales y de esa manera marcando la diferencia. Aunque indirectamente, estos resultados parecen apoyar que el tratamiento intralesional con MSC mejora el aprendizaje. Sin embargo, no hemos realizado test funcionales que evalúen directamente este aspecto, como puede ser el test de Water-Maze<sup>191</sup>.

Esta hipótesis se vería avalada por las diferencias halladas en las poblaciones celulares en el giro dentado y región CA1 y CA3 del hipocampo. En dichas regiones, el tratamiento con MSC muestra una respuesta similar (CA3) o ligeramente superior a la normal (CA1 y GD) pero con una mayor intensidad en el grupo de tratamiento respecto al control ip.

Llama la atención que la mejoría en las puntuaciones basales del test de Rotarod sean más grandes respecto a lo publicado anteriormente<sup>180,191</sup>. En general, se comunica una mejoría respecto del basal de entre 130-150%, mientras que en el grupo de tratamiento alcanza casi el 200%. Estas diferencias se pueden explicar por dos motivos: el número de test realizados previamente y la edad de los animales. Los animales de nuestro estudio se entrenaron solo en una ocasión antes del trauma craneal, mientras que en otros estudios el número de entrenamien-

tos previos fue de entre 3-5. El aumento en el número de entrenamientos previos explicaría que sus puntuaciones basales sean mayores que las de este estudio, y la mejoría respecto al basal no sea porcentualmente tan grande. Sin embargo la respuesta tras un TCE es similar, un descenso en las puntuaciones más cercanas a la lesión con mejoría progresiva, lo que sugiere que es un modelo igualmente válido. Además, los animales de experimentación de este estudio son jóvenes (7 días de vida). En general, los estudios en la literatura utilizan animales adultos, con una edad de aproximadamente 3-4 semanas y peso entre 200-300 gramos<sup>123,124,136,176,180,184,186-188,190,191,212,217-221</sup>. Es conocido que la respuesta a un TCE varía con la edad, teniendo mejor pronóstico los animales más jóvenes, debido a su capacidad espontánea de recuperación<sup>143</sup>. Posiblemente estos animales jóvenes muestren una mayor capacidad de recuperación que los animales adultos.

Resultados similares han sido descritos, aunque la comparación directa es difícil. Existen diferencias entre la fuente de MSC, el tiempo tras el TCE en el que son administrados, y la utilización de coadyuvantes. Además, los estudios utilizan diferentes métodos de evaluación funcional, de marcaje celular y técnicas histológicas para describir los procesos de inflamación, proliferación neuronal y astrogliosis.

En un experimento parecido al nuestro, aunque utilizando una fuente diferente de MSC procedentes de médula ósea, Mahmood y colaboradores comunican una mejoría funcional motora tras la administración de MSC-mo intralesionales<sup>180</sup>. En dicho experimento encontraron una mejoría motora en los días +14 y +28 tras el trasplante. Nuestro experimento replica a este, con la originalidad de usar una fuente de progenitores más accesible, las MSC-a y evaluar también la función sensitiva.

El grupo de Mori<sup>222</sup> obtiene conclusiones muy parecidas, aunque su modelo de daño celular es diferente (criolesión) y la administración de MSC-mo se produce en la fase hiperaguda de la lesión (1 hora). Si bien este grupo no realizó test motores o sensitivos, sí que midieron un descenso en el volumen de la lesión en el grupo que recibió MSC-mo, así como un incremento en la demanda metabólica de las zonas lesionadas, medida como utilización de glucosa.

Xue y colaboradores<sup>215</sup> demostraron que la administración de MSC-a supone una disminución en el volumen de la lesión y una mejoría funcional (expresada por la preferencia motora de las patas anteriores). La diferencia respecto al nuestro fue que se administraron en la fase subaguda (7 días), y al igual que en nuestro estudio las MSC procedían de tejido adiposo.

Solo un estudio no consigue demostrar el efecto beneficioso del tratamiento con MSC<sup>223</sup>. En él, el modelo experimental fueron ratones sometidos a una lesión cortical directa con frío. No hubo diferencia con el test motor (Rotarod), pero sí con el test sensitivo (*Neurological Sensitive Score*: NSS). Sin embargo, en el subgrupo de animales en los que los investigadores que realizaban los test funcionales eran ciegos para la terapia administrada, estas diferencias desaparecieron (sesgo del observador). Su técnica difería respecto a los estudios previos en el retraso en la administración de MSC (se aplicaron a las 72 horas, en lugar de las primeras 24 horas) y la alta tasa de mortalidad del procedimiento (fallecieron tras la lesión 6/28= 20% de mortalidad; 4/6 relacionadas con el procedimiento y 2/6 tras el trasplante celular). Los autores achacan la discrepancia en que la administración tardía limita la supervivencia celular debido al efecto nocivo inflamatorio.

Otros estudios han confirmado la efectividad de esta ruta en modelos animales de TCE cuando se han introducido nuevas variantes que intentan optimizar sus resultados: La administración conjunta con factores de crecimiento neuronal<sup>218</sup>, o con entramados de colágeno<sup>220</sup> produce un mayor mejoría funcional cuando se compara con la administración intraparenquimatoso aislada de las MSC-mo.

Los entramados de colágeno (*scaffold*) son el coadyuvante más utilizado por los grupos que utilizan terapia celular intralesional<sup>187,191,212,218,220</sup>. Esta matriz de hidrogel supone un andamiaje tridimensional que permite una mejoría en la supervivencia y en la colonización del tejido infundido por parte de las MSC. Su uso se asocia con una mejoría funcional superior al uso de MSC aisladas (aprendizaje y función sensitivomotora)<sup>187,191,212,220</sup>. Esta mejoría se debe a una disminución en el área de la lesión<sup>187,191,220</sup>, una mayor supervivencia celular<sup>212</sup> y un incremento en la angiogénesis local<sup>212,220</sup>. Dicho aumento de la angiogénesis puede ser debido a que la interacción entre MSC y las estructuras de colágeno que induce la expresión de VEGF por parte de los astrocitos perilesionales, así como de genes relacionados con la angiogénesis, neurogénesis y la transducción de señales<sup>224</sup>, cuando se compara con la administración aislada de MSC. Otra explicación es que los entramados de colágeno atrapan en mayor número las MSC evitando su salida del tejido infundido.

### **Supervivencia celular del trasplante de MSC**

Entre los objetivos estaba conocer la supervivencia y diferenciación de las células madre trasplantadas en el tejido cerebral lesional y perilesional. Los mecanismos por los que las

MSC producen una mejoría funcional (sensitiva, motora o del aprendizaje) tras un TCE en los modelos animales obedecen a diferentes factores, algunos de los cuales están implicados la presencia prolongada de MSC tras el trasplante.

De esta manera, queríamos conocer tanto el patrón de supervivencia de las MSC y su capacidad de diferenciación. Para ello, era necesario contar con un marcador celular que fuera barato, fácilmente reproducible, no modificase las características de estas células (tanto su regeneración como su diferenciación a células maduras) y no fuera transferido a otras células si las MSC no sobrevivían, evitando la posibilidad de tener falsos positivos.

Se decidió utilizar la proteína verde fluorescente (GFP) frente a otros marcadores debido a que permite identificar correctamente a las células trasplantadas. Se ha observado que marcadores utilizados en algunos estudios, como la BrdU y la bis benzamida (BBZ) son capaces de visualizarse a pesar de no encontrarse evidencia histológica de supervivencia de las células marcadas, dado que se fagocitan y se mantienen activos en los astrocitos y neuronas en desarrollo<sup>182</sup>. Sin embargo, la GFP parece no sufrir este problema<sup>182</sup>.

In vitro, hemos demostrado que las MSC marcadas con GFP (MSC-GFP +) son capaces de multiplicarse de manera análoga a las células no marcadas (MSC-GFP -). De igual manera, hemos demostrado que las MSC-GFP + conservan intacta su capacidad de diferenciación en adipocitos y condrocitos, sin sufrir una merma en la expresión de la GFP ni en su capacidad de supervivencia ni diferenciación, comparado con las MSC-GFP -. La capacidad de expresión de GFP se mantiene en MSC en cultivos a largo plazo, y su expresión no parece determinada por el número de ciclos de replicación que han sufrido.

Una vez que tuvimos una población celular estable, y tras su trasplante, se analizó su presencia tanto inmediatamente tras el TCE y trasplante (24 horas) como a medio plazo (21 días). Para identificar a las células mesenquimales se utilizó un doble sistema, la técnica de citometría de flujo y la inmunohistoquímica.

Mediante *citometría de flujo* se pretendía identificar a una población celular que reuniese las mismas características de las células trasplantadas, es decir, que tuvieran marcadores de superficie compatibles con MSC: CD45<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>. Por otra parte, hallar una población que tuviera fluorescencia propia derivada de la expresión del gen GFP, lo que permitiría diferenciar a esta población de las MSC endógenas, movilizadas del propio animal de experimentación.

Encontramos en el hemisferio cerebral en el que se produjo la lesión una población celular con características citométricas compatibles con MSC. Dicha respuesta se encontró tanto en el grupo control ip como en el grupo de tratamiento ip. Sin embargo, dicha población era mayor en el grupo en el que se trasplantaron MSC respecto a las que solo se infundió suero. Esta respuesta desaparece tras tres semanas de seguimiento.

Sin embargo, cuando se analizó la expresión de GFP, ni a corto ni a largo plazo encontramos una población que claramente expresara autofluorescencia verde. Pensamos que esta discrepancia en los resultados puede ser producido por dos situaciones: La población identificada mediante citometría de flujo se corresponde a una población diferente a la trasplantada o bien la población trasplantada no expresa GFP. Independientemente de cual sea la causa, impresiona de que esta respuesta de células que expresan marcadores de superficie de MSC desaparece a lo largo del tiempo, siendo mínima tres semanas tras el trasplante.

Para valorar mejor en qué situación nos encontrábamos, recurrimos a técnicas de inmunohistoquímica mediante vimentina y GFP. La vimentina es una proteína del citoesqueleto celular que se expresa principalmente en células de estirpe mesenquimal. En el cerebro de rata se pueden encontrar intrínsecamente en células mesenquimales alrededor de vasos sanguíneos siendo muy escasa la presencia de células vimentina positiva en el resto del parénquima. En el grupo de tratamiento ip encontramos numerosas células vimentina positiva, en comparación con su hemisferio contralateral y con los animales que no recibieron el trasplante. Además, la distribución de dichas células fue principalmente subcortical, entre 1 y 2 mm por debajo de la zona lesionada, y de manera difusa por toda la zona de la lesión. Este patrón de células vimentina positiva sugiere que son las células trasplantadas y no movilizadas a través de la sangre, dado que aparecerían principalmente en la zona perivascular, como cuando se infunden intravenosamente. Sin embargo, cuando se realizó la inmunohistoquímica con GFP, a pesar de que a las 24 horas existía una población GFP positiva que era mayor que en el hemisferio contralateral y respecto a los grupos controles, era menos numerosa que la población vimentina positiva (existía una proporción de células vimentina+ / GFP+ de aproximadamente 4:1).

A los 21 días, tanto las células vimentina + como GFP + decrecieron cuando se compararon con los iniciales. Tampoco se encontró esta población celular en otros lugares diferentes del infundido ni con datos morfológicos de células neuronales o gliales maduros. Estos datos sugieren que la supervivencia de las células trasplantadas es baja en el lugar de la lesión y que no existe diferenciación a células maduras de estirpe neuronal.

Creemos que tanto las células vimentina positiva como las células GFP positivas pertenecen a la misma población de MSC trasplantadas. La diferencia de número de células GFP positivas se debe probablemente a una pérdida de expresión de GFP, sin que se haya podido identificar la causa. Dado que la expresión de GFP se mantuvo prácticamente invariable en los cultivos simultáneos que se realizaron a la par que los experimentos, y dado que ambas poblaciones disminuyen tras 21 días hasta su desaparición, hipotetizamos que los mecanismos que determinan la muerte celular de las MSC disminuyen la expresión de GFP. Esta hipótesis explicaría igualmente el no haber podido detectar células GFP positivas mediante citometría de flujo a las 24 horas, pero sí cuando utilizamos marcadores de superficie de MSC. Igualmente, no encontramos evidencia de diferenciación de MSC hacia células neuronales maduras.

En la literatura existe controversia sobre si la diferenciación de MSC in vivo es posible. Como se ha dicho, el estudio de Coyne demostró que la mayoría de las MSC trasplantadas son rechazadas mediante una reacción inflamatoria, y que la coexpresión de los marcadores era debida a fenómenos de fusión celular con macrófagos y glía residente, más que a su diferenciación<sup>182</sup>. Mientras que los artículos científicos muestran consistencia en cuanto a su eficacia sobre diferentes aspectos funcionales tras un TCE (motor, sensitivo o aprendizaje), no existe una evidencia convincente de su diferenciación a estirpe neuronal. Esto sugiere de manera indirecta que su efecto beneficioso está mediado por la secreción paracrina de mediadores inflamatorios.

### **Mecanismos de neuroprotección**

Al no encontrar evidencia de que hubiera fenómenos de expansión clonal intracerebral ni diferenciación a estirpe neuronal, quisimos valorar si la mejoría funcional estaba mediada por un mecanismo de neuroprotección y proliferación de progenitores neurales. Para valorarlo, consideramos el tamaño de la lesión y también la pérdida neuronal en diferentes regiones del hipocampo.

El tamaño de la lesión se considera en la mayoría de los estudios como una variable secundaria que indica la pérdida de tejido cerebral. En nuestro estudio el tamaño de la lesión coincide con los parámetros comunicados, aproximadamente entre un 15-17% del área total del hemisferio. No obstante, no hemos hallado diferencias significativas entre el grupo de tratamiento y el control. Tanto el grupo de Mori<sup>222</sup> como el de Xue<sup>215</sup> publican una disminución del volumen de la lesión. El grupo de Xue además compara este resultado tanto en el grupo de

MSC-mo como las MSC-a, sin encontrar diferencia entre ambas poblaciones. Esta mejoría se debe a una disminución relativa de la lesión de un 30% en el caso de Mori hasta un 85% del grupo de Xue. Sin embargo, otros grupos no han encontrado diferencia respecto al basal cuando se evalúa el uso de MSC solas<sup>187,191,212,218-220,225</sup>, aunque sí cuando se utilizan los entramados de colágeno<sup>187,191,220</sup>. En estos últimos grupos, cuando se comunica el volumen de la lesión, esta oscila entre el 8-20% del volumen total del hemisferio y la disminución del tamaño está entre el 50-35%.

Se ha observado que un traumatismo craneal produce un descenso en la densidad celular en el hipocampo ipsilateral, principalmente en las zonas CA1, CA3 y giro dentado<sup>187,212</sup>. Se debe principalmente a una disminución de las células piramidales de CA1 y CA3, así como de las células granulares del GD. En nuestro estudio, a las 48 horas encontramos un mayor número de células piramidales en CA3 y GD, respecto al hemisferio contralateral y frente al grupo control ip. A los 21 días esta diferencia se mantuvo en GD, pero no en CA3. En CA1, no hubo cambios en la densidad celular.

En otros estudios este aumento de densidad celular en diferentes regiones del hipocampo también ha sido observada<sup>187,212</sup>, y ha sido aproximadamente de la misma magnitud que nuestro estudio. Se ha evidenciado tanto cuando se utilizan MSC solas como con entramados de colágeno. Las principales diferencias son que se habían administrado las MSC en la fase subaguda tras el TCE (4-7 días), que dicho incremento celular nunca se había observado tan precozmente (24 horas tras el trasplante celular) y no se había demostrado con MSC-a.

Por último, quisimos evaluar el número de células nestina positivo como marcador de progenitores neuronales en las zonas donde la neurogénesis es más activa, en la ZSV y en el GD. En la ZSV no hubo diferencias tanto a las 48 horas como a los 21 días. Sin embargo, sí que se evidenció un aumento del número de células nestina positivas precozmente en el GD, pero no se mantuvo tras tres semanas de seguimiento.

De manera general se puede decir que la administración de MSC-a ip tras un TCE controlado produjo un incremento de progenitores neuronales de manera precoz (primeras 48 horas) y principalmente en el giro dentado del hipocampo. Quizás ese incremento precoz sea el responsable de los buenos resultados obtenidos en los test funcionales.

Bonilla es el principal autor que ha demostrado la presencia de un mayor número de células nestina positiva, si bien demostró un incremento de células nestina positiva tanto en la zona de la lesión como en la zona subventricular tras administrar MSC-mo dos meses tras un

TCE controlado<sup>225</sup>. No evaluaron la presencia de células nestina positivas en el giro dentado. Esta respuesta está en contradicción con los datos que hemos obtenido nosotros, y parece que muestra que la administración tras la fase aguda de un TCE de MSC-mo incrementa la neurogénesis de manera tardía. Sin embargo, nuestros datos apuntan en otra dirección, ya que sugieren que la neurogénesis se activa de manera precoz, únicamente en el giro dentado y esta respuesta desaparece con el tiempo. No sabemos cuál de los dos hipótesis es la verdadera, aunque quizás la respuesta sea dependiente del número de MSC que sobreviven al trasplante. En el grupo de Bonilla y en otros grupos que indirectamente han demostrado un incremento de progenitores neuronales en estas zonas, el número de células trasplantadas fue muy superior.

Otros parámetros evaluados en la literatura han sido la mejoría de la función metabólica (medida a través de microelectrodos intracerebrales que determinan el consumo de glucosa en diferentes regiones del cerebro)<sup>222</sup>, incremento de la vascularización local cerebral (marcadores de angiogénesis, número de vasos sanguíneos)<sup>191,220</sup> y disminución de astrogliosis e inflamación<sup>215</sup>. Sin embargo, estas variables no han sido estudiadas en nuestro trabajo.

En la tabla 3 se resumen los artículos más relevantes sobre trauma craneal y tratamiento con terapia celular intraparenquimatosa.

Tabla 3.- Resumen de los principales estudios publicados sobre TCE y tratamiento con MSC. TCE: Traumatismo craneoencefálico. MSC: célula madre mesenquimal. MSC-mo: MSC obtenida de médula ósea. MSC-a: MSC obtenida de tejido adiposo. H: horas. D: días. M: meses. IP: MSC administradas intraparenquimatosamente (intralesionales). IV: MSC administradas intravenosamente. Colag.: Scaffold colágeno. NGF: Factor de crecimiento neuronal. CCI: Modelo de impacto cortical controlado.

Referencia	MSC	Tiempo lesión	Tiempo seguimiento	Grupos	Modelo TCE	Otros	Resultado
Mahmood 2001 <sup>180</sup>	MSC-mo	24h	28d	TCE TCE + ip	CCI	--	Grupo TCE + ip: - Mejoría funcional (14-28d)
Mahmood 2002 <sup>218</sup>	MSC-mo	24h	8d	TCE TCE + ip TCE + ip + NGF	CCI	NGF	Grupo TCE + ip + NGF: - Mejoría funcional - Mayor implantación
Mahmood 2004 <sup>187</sup>	MSC-mo	4d	5d	TCE TCE + Colág TCE + ip TCE + ip + Colág	CCI	Colágeno	Grupo TCE + Ip + Colag: - Mejoría sensitivomotora - Mejoría aprendizaje - ↓ área de lesión
Mori 2005 <sup>222</sup>	MSC-mo	1h	21d	TCE TCE + MSC	Criolesión	--	- ↓ área de lesión - ↑ función metabólica
Lu 2007 <sup>191</sup>	MSCh-mo	4d	35d	TCE TCE + Colág TCE + ip TCE + ip + Colág	CCI	Colágeno	Grupo TCE + Ip + Colag: - Mejoría sensitivomotora - Mejoría aprendizaje - ↓ área de lesión
Qu 2009 <sup>220</sup>	MSCh-mo	7d	35d	TCE TCE + salino TCE + colágeno TCE + ip TCE + iv TCE + Ip + Colág	CCI	Colágeno	Grupo TCE + ip + Colag: - Mejoría sensitivo motora - Mejoría aprendizaje - ↓ área de lesión - ↑ la densidad vascular
Xiong 2009 <sup>212</sup>	MSCh-mo	7d	43d	TCE TCE + Colág TCE + ip TCE + Ip + Colág	CCI	Colágeno	Grupo TCE + ip + Colag: - Mejoría sensitivo motora - Mejoría aprendizaje - ↑ angiogénesis - ↑ supervivencia hipocampo
Bonilla 2009 <sup>225</sup>	MSC-mo	2m	4m	TCE TCE + ip	Peso	--	Grupo TCE + ip - Mejoría sensitivo motora - ↑ neurogénesis endógena
Xue 2010 <sup>215</sup>	MSC-a	7d	28d	TCE TCE + ip	CCI	--	Grupo TCE + ip: - Mejoría sensitivo motora - ↓ área de lesión - ↓ astrogliosis e inflamación
Moorthy 2011 <sup>223</sup>	MSC-mo	3d	28d	TCE TCE + ip	Criolesión	--	Sin diferencias

### 5.1.- Elección de tipo celular

Consideramos que la mejor opción eran las células madre mesenquimales obtenidas de tejido graso retroperitoneal.

Aunque el prototipo de célula regenerativa tras un daño neurológico es la CPN, dado que ha demostrado que tiene el potencial para mejorar funcional y estructuralmente, existen algunos impedimentos que obstaculizan su traslado a la práctica clínica. El primero y quizás el más importante, es que actualmente la adquisición de CPN requiere de una biopsia cerebral. Es poco factible que la realización de una biopsia cerebral en un paciente con una lesión neuronal se convierta en la práctica clínica habitual. En segundo lugar, dado que el SNC posee nichos endógenos de CPN, no está del todo claro que su administración exógena vaya a suponer un beneficio adicional en cuanto a reemplazamiento celular<sup>226</sup>. Es posible que en el caso de las lesiones neuronales, la causa de la poca eficacia de la reparación endógena sea consecuencia de un ambiente desfavorable para su expansión y diferenciación, más que una falta en el número total de CPN<sup>227</sup>. Añadir CPN sin actuar sobre el microambiente es poco probable que consiga una mejoría funcional, aunque existe evidencia de que las propias CPN pueden actuar como moduladoras cerebrales<sup>141,145,151,154</sup>. Estos problemas, combinados con estudios en los que se demuestra una eficacia similar con otras fuentes de células madre que son más fáciles de obtener, indican que probablemente el camino futuro de la aplicación clínica no use este tipo de células<sup>226</sup>. Uno de los grupos alternativos más extensamente estudiados han sido las MSC.

Como se ha comentado anteriormente, el número de tejidos de los que se han aislado MSC es amplio y no ha parado de crecer en los últimos años. Hace más de una década se describió el procedimiento de obtención de MSC mediante digestión del tejido graso<sup>228</sup>, similar al que hemos seguido en este estudio. Aunque la mayoría de los estudios han utilizado tradicionalmente las MSC obtenidas de la médula ósea, estas suponen una serie de inconvenientes que pueden que no las hagan candidatas ideales para su uso clínico masivo.

Aunque éticamente e inmunológicamente son aceptables, las MSC-mo tienen el inconveniente de que, para su obtención, es necesario la realización una técnica de recogida agresiva, como es la realización de una punción aspiración de médula ósea, mediante punción de ambas crestas ilíacas bajo anestesia general. La cantidad de las MSC-mo obtenidas depende de la edad del paciente y del volumen de la muestra obtenida, lo que disminuye con la edad, siendo especialmente importante cuando se van a usar MSC-mo sin expandir en cultivos, me-

dian­te recolección directa<sup>175,229,230</sup>. Con una aproxima­ción algo simplifi­cada, se calcula que, en la médula ósea, solo 1/18.000 células mononucleares son MSC (0.001%-0.01% de las células nucleadas de mo<sup>231</sup>), y considerando que existen aproximadamente 65 millones de células mononucleares por cada mL de aspirado de médula, por cada mL obtenido no llegan a 4000 MSC las células recolectadas<sup>175</sup>. Esta cantidad puede disminuir si además, la cantidad de aspirado se contamina con sangre periférica, en la que la relación de MSC por cada célula mononuclear es mucho menor; por este motivo se recomienda no aspirar más de 2 mL cada vez. Además, la capacidad proliferativa de las MSC-mo disminuye con la edad<sup>229</sup>, lo que obliga a su cultivo y amplificación en salas técnicamente complejas y caras, que han de cumplir con estrictos protocolos de calidad.

Las MSC derivadas de tejido adiposo son más fáciles de recolectar mediante un procedimiento menos invasivo como es una liposucción o una abdominoplastia<sup>232</sup>. Tras una digestión con colagenasa, se pueden aislar fácilmente, cultivar y almacenar<sup>232,233</sup>. Diferentes estudios han demostrado que las MSC-a muestran una morfología similar, son capaces de formar unidades formadoras de colonias de fibroblastos (UCF-F), mantienen su capacidad de diferenciación multipotencial y expresan un conjunto estereotipado de marcadores de superficie: no expresan CD 105 y CD 106 (marcadores relacionados con la migración y la hematopoyesis, que se encuentran disminuidos en las MSC-a); y tanto CD34 y CD49d están aumentados en las MSC-a<sup>175,232,234</sup>. Aun con resultados en ocasiones conflictivos, algunos estudios sugieren que las MSC-a, comparadas con las MSC-mo, son más angiogénicas, mantienen su capacidad proliferativa y su capacidad de diferenciación adipogénica durante un periodo mayor<sup>175</sup>. Estas diferencias pueden ser debidas a una diferencia en su perfil de transcripción de proteínas<sup>175,232</sup>. Una ventaja adicional de las MSC-a es que no expresan el antígeno de compatibilidad humano tipo II (MHC II), lo que podría facilitar su administración alogénica, mediante el almacenamiento por parte de donantes humanos sanos de bancos de MSC-a, en condiciones para su aplicación en un corto espacio de tiempo<sup>232,233</sup>.

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que, aunque manteniendo su capacidad neurogénica *in vitro*, también la edad del donante de MSC-a influye en su capacidad de aislamiento, diferenciación, formación de colonias viables y supervivencia, reduciéndose a mayor edad<sup>235</sup>. Este descubrimiento es importante en aquellas terapias que se realizan mediante trasplante autólogo de MSC-a, en las que el análisis de su eficacia tendrá que tener en cuenta la edad de los pacientes incluidos. Igualmente, para la realización de trasplantes celulares alogénicos deberán ser, de manera óptima, procedentes de donantes sanos y jóvenes.

La efectividad de las MSC-a ha sido demostrada en otras patologías con daño cerebral, fundamentalmente en el daño cerebral hipóxico isquémico secundario a la ligadura de la arteria carótida interna. En estos experimentos, se ha demostrado ser tan efectivas como las MSC-mo en la obtención de la recuperación funcional<sup>210,232</sup>. Los mecanismos que explican esta mejoría han sido parcialmente descritos, y son similares a los que previamente hemos referido para el resto de células MSC: implantación en la zona del daño y diferenciación parcial a células endoteliales y neuronales (en general, este efecto es de escasa cuantía y posiblemente transitorio<sup>232</sup>); inhibición de la respuesta apoptótica y estimulación de la respuesta regenerativa mediante la secreción autocrina de diferentes factores de crecimiento e inhibición de factores proapoptóticos (producción de BDNF, IGF-1, Nestina, MAP2, GFAP, VEGF, HGF; inhibición de Bcl-2, caspasa-12)<sup>232,236</sup>; promoción de mecanismos de plasticidad neuronal y regeneración (Neurogénesis, oligodendrogénesis, remielinización, plasticidad sináptica y angiogénesis)<sup>232</sup>; e inmunomodulación local y sistémica<sup>161,232</sup>. Algunos estudios sugieren que, comparando diferentes grupos celulares, las MSC-a son también capaces de suprimir la respuesta inmune mediada por linfocitos T, linfocitos B<sup>237</sup> y células NK<sup>161</sup>.

Aún con la precaución que exige extrapolar los resultados obtenidos de un modelo de enfermedad experimental a otro con el que no comparte las mismas vías patogénicas, teóricamente muchos de los efectos podrían ser similares, lo que favorecería su elección como fuente de MSC en el TCE. Dada la aparente similitud en cuanto a sus resultados funcionales, hemos elegido esta fuente de MSC debido a su mayor aplicabilidad en el campo clínico. Aunque más utilizadas en los modelos experimentales de infarto cerebral<sup>209,210,232</sup>, se empiezan a realizar los primeros estudios en modelos de TCE como el nuestro, mostrando resultados favorables que apoyan la hipótesis de que son también efectivas en esta patología<sup>215</sup>. Nuestros resultados apoyan las pruebas a favor su uso, principalmente por su acción moduladora local, regulando la supervivencia celular en el hipocampo ipsilateral.

## 5.2.- Elección de ruta de administración

Una de las cuestiones fundamentales es cómo administrar las MSC. En los experimentos animales, las dos rutas de administración se han dividido clásicamente en dos: sistémicas o locales.

### *Administración sistémica*

Para la administración sistémica, se ha usado principalmente la **vía intravenosa**. Este tipo de técnica estaría indicada cuando tras un TCE no existe una lesión clara (daño difuso). En experimentación animal, su administración se consigue mediante la canalización de una de las venas caudales de la cola de la rata. La vía intravenosa por su sencillez de uso y facilidad de abordaje les hace un medio ideal para su administración, por lo que han sido la ruta de elección en la mayoría de los estudios preclínicos<sup>136,137,176,179,184,186,187,190,191,217,219,238</sup> y también en los primeros estudios con pacientes<sup>195,197</sup>. Las MSC, debido a la capacidad para la migración celular, se adherirían mediante la secreción de integrinas y citocinas en las zonas dañadas de manera general permitiendo su integración en la zona de la lesión<sup>176</sup>. En ella podrían actuar bien mediante reemplazamiento celular (actualmente controvertido), pero principalmente mediante la inmunomodulación local. Además, esta vía les permitiría actuar regulando la inflamación sistémica que hemos visto podría tener un papel importante en el TCE.

El principal inconveniente es el efecto del primer paso pulmonar, es decir, el atrapamiento de un porcentaje mayoritario de MSC en el pulmón. Los principales factores que determinan el primer paso pulmonar son el tamaño de la célula, su número y el modo en que éstas son administradas. De hecho, se calcula que menos del 1% de las células que se administran de manera sistémica alcanzan de manera efectiva el lecho vascular afectado, mientras que la mayoría quedan atrapadas en los pulmones<sup>238,239</sup>. Además, se ha observado que el origen de la célula madre puede tener también una relación con el paso pulmonar. De esta manera, las células madre de origen en médula ósea (MSC-mo) y las neurales tienen un mayor paso cuando se comparan con las MSC de otros orígenes. Principalmente, el problema se achacó a una imposibilidad mecánica: las MSC son células relativamente grandes (15-19  $\mu\text{m}$ ) para su paso por los capilares pulmonares, mientras que las CPN son células más pequeñas (4-5  $\mu\text{m}$ )<sup>239</sup>. Sin embargo, las MSC-mo son células de un tamaño similar a las MSC, pero su atrapamiento es menor. Para explicarlo, se propone que existen otros factores, como la adherencia al endotelio capilar, dado que el bloqueo de factores de adhesión celular como son la Selectina P o el VCAM-1/VLA-4 incrementan el paso de estas células por los pulmones<sup>239</sup>. Esto explica también por qué la administración mediante dos bolos de MSC favorece una mayor cantidad de células en la circulación sistémica. Se hipotetiza que la primera dosis satura las uniones MSC-receptores de endotelio, permitiendo que las consecutivas no se adhieran a la pared celular.

Existen estudios además que demuestran que este primer paso pulmonar es transitorio, y que la mayoría de las MSC migran en las siguientes 24 horas a otros órganos diana, principalmente del sistema reticuloendotelial<sup>238,239</sup>. Se desconoce si su interacción en dichos órga-

nos posee un efecto beneficioso o perjudicial. La principal preocupación que genera este bloqueo pulmonar es, además de la pérdida de efectividad por el escaso número de células que alcanza el órgano diana, la posible toxicidad. Se ha demostrado que en el cerebro una de las causas de la pérdida progresiva de MSC trasplantadas es la aparición de una respuesta inflamatoria contra las MSC<sup>182</sup>. Si esta respuesta inmune se replica en el pulmón, se hipotetiza que pueda originar no solo un fallo de trasplante, sino también un daño pulmonar secundario.

En nuestro estudio monitorizamos, dentro de las variables que se recogían durante la intervención, la saturación de oxígeno mientras se realizaba la infusión de MSC y posteriormente hasta la recuperación anestésica, sin encontrarse evidencia de descenso en las cifras basales ni respecto a los controles. Igualmente, en el estudio en humanos se monitorizaba de manera estrecha mediante el sistema de puntuación de Murray y el ratio P/F, sin haberse hallado diferencias significativas en los pacientes pre y postratamiento<sup>197</sup>. No obstante, en dicho estudio los autores utilizaron expresamente CMDMO, siendo una de las razones para elegir este grupo celular su pequeño tamaño comparado con las MSC<sup>197</sup>. Un estudio en humanos con cardiopatía isquémica tratados con células madre demostró que las células madre administradas iv a los 30 minutos eran retenidas principalmente en el pulmón, pero en un plazo breve de tiempo disminuían mediante su distribución a otros órganos del sistema reticuloendotelial, principalmente bazo e hígado<sup>240</sup>. Estos datos se tendrán que tener en cuenta para su aplicación clínica. Si la ruta de administración incluye el primer paso pulmonar, será obligatorio que uno de los efectos secundarios a vigilar sea el sistema respiratorio, medido mediante diferentes escalas clínicas.

La controversia sobre si esta vía de administración es eficaz, o sobre si es igual o menos eficaz que la administración local viene determinado por los mecanismos por los que estas células son capaces de mejorar el resultado neurológico. Si se piensa que la principal función es la reparación local y sustitución del tejido dañado (tanto glial como neuronal), el que lleguen un número de células tan escaso a la zona de la lesión, disminuirá la “dosis efectiva” administrada, por lo que será menor su efectividad. Sin embargo, si pensamos que es mediante la inmunomodulación (local y regional) y la secreción de factores de supervivencia neuronales que permitan la reparación vía mecanismos endógenos (lo que actualmente parece que es el principal mecanismo), consideraremos que es menos importante su llegada al sitio de la lesión, por lo que esta vía de administración puede ser tan efectiva, si no más, que su administración local. Las lesiones candidatas al tratamiento sistémico serían aquellas en las que en las pruebas de imagen no corresponden a daños focales cerebrales, como son el edema cerebral difuso y la lesión axonal difusa, dado que el DCS abarca a todo el cerebro y no hay una lesión única que

tratar. En nuestro grupo, estudios preliminares han encontrado hallazgos similares a lo publicado cuando se administran las MSC por vía intravenosa: un alto porcentaje de primer paso pulmonar, con muy escasa llegada de MSC en el cerebro. Sin embargo, su administración mediante dos dosis no consiguió demostrar ningún efecto beneficioso tanto en escalas motoras como sensitivas.

### *Administración local*

El cuerpo teórico para la administración local de MSC viene dado porque de esta forma se alcanza el órgano diana de manera directa, evitando la BHE y todo el mecanismo de adhesión y migración celular. Dentro de esta ruta de administración, se han ideado diferentes estrategias: intratecal (espacio subaracnoideo, principalmente a través de una punción lumbar), intraventricular, intraarterial e intraparenquimatoso. Cada uno de ellas tiene sus ventajas y desventajas.

La **administración intratecal** mediante punción lumbar tiene la ventaja de que es sencilla de realizar, no es necesario trasladar al paciente al quirófano (se puede realizar a pie de cama), se puede repetir y se puede administrar una cantidad importante de fármacos y dosis. No obstante, a pesar de atravesar la BHE, la distribución de las MSC no es selectiva en la zona de la lesión, debiendo estas MSC migrar a la zona dañada y adherirse para ejercer su labor. También su sencillez se vería limitada en aquellos pacientes en los que existe una lesión focal supratentorial no drenada que ejerce efecto de masa, en los que una punción lumbar incrementa el riesgo de herniación amigdalor. Uno de los estudios en humanos ha utilizado esta vía en la fase crónica del TCE, siendo bien tolerada y no comunicándose ninguna incidencia relacionada con su infusión<sup>196</sup>.

La **vía intraventricular** tiene la ventaja de que muchos de los pacientes con un TCE poseen un dispositivo de medición de la PIC, lo que evita el traslado a quirófano para su colocación. Además permite la administración de dosis repetida y un volumen adecuado para el trasplante celular. Tiene los inconvenientes que, al igual que la administración intratecal, las MSC deben migrar a la zona de la lesión, y que esta no tiene que estar en la zona periventricular ni siquiera en el mismo hemisferio (habitualmente los dispositivos intraventriculares de medición de la PIC se sitúan en el ventrículo contralateral a la lesión focal). Además, a pesar de que los volúmenes de administración son pequeños, la administración en un cerebro con una baja complianza o con elevaciones de la PIC (habitual tras un TCE) hace que resulte menos atracti-

va. Sin embargo, su administración cerca de una zona de neurogénesis endógena podría aumentar la movilización de progenitores neuronales hacia la zona lesionada.

La **administración intraarterial** tiene la ventaja de poder ser aplicada en la zona de la lesión. Se realiza mediante cateterización selectiva de los vasos perilesionales y su infusión posterior. Se evitaría la lesión secundaria que se puede realizar al colocar un dispositivo intracraneal, y además se incrementaría la “dosis efectiva” cuando se compara con la administración sistémica por vía venosa, debido a que desaparece el primer paso pulmonar. Aparte de la complejidad técnica de la cateterización selectiva de una zona vascular, precisa de mantener la habilidad de las MSC de traspasar la BHE y estaría indicado cuando la lesión corresponda con un lecho vascular determinado, lo que no siempre ocurre en un TCE. Además, una de las complicaciones descritas es la aparición de infartos y trombosis, dependiendo de la velocidad de infusión y del tamaño celular empleado<sup>241</sup>.

La **administración tópica** es una vía interesante pero aún muy precoz. Se ha demostrado que la administración tópica, junto con fibrina, de MSC en modelos de isquemia y reperfusión intestinal y renal, y en un modelo animal de TCE, permite la supervivencia celular y su migración a zonas dañadas<sup>242</sup>. En el modelo de TCE, esta migración se produce desde el hemisferio contralateral al dañado, encontrándose células a través del cuerpo caloso (se hipotetiza que sea la ruta que siguen en su migración). Esta vía de administración permitiría aumentar el número de MSC en la zona de la lesión, evitando así el primer paso pulmonar, y por otra parte aumentaría la supervivencia celular evitando el ambiente inflamatorio en la zona de la lesión. Otras ventajas serían no tener que producir un trauma secundario por la inyección intraparenquimatosa. Aunque se ha demostrado como prueba de concepto, se desconoce si esta ruta replica los buenos resultados funcionales obtenidos por otras vías de administración<sup>242</sup>.

La **administración intraparenquimatosa** se realiza mediante infusión de MSC a través de una aguja en la zona intralesional que se guía mediante coordenadas esterotáxicas. El paciente ideal para utilizar esta ruta sería aquel que tuviera una lesión focal y que precisara una intervención quirúrgica bien para drenar esa lesión o para realizar una craneotomía descompresiva. El lugar de la infusión parece ser importante, dado que el lugar más adecuado sería aquel en el que el ambiente local favorezca la supervivencia y diferenciación del trasplante celular. Se cree que la zona ideal de trasplante estaría situada en la zona adyacente a la lesión focal, en una zona mal definida similar al área de penumbra alrededor de una isquemia aguda. En dicha zona, las condiciones para la supervivencia y el ambiente inflamatorio serían propicias

para su anidamiento, pudiendo ejercer su actividad terapéutica. Además, su inyección local evita los efectos relacionados con el primer paso pulmonar y el paso de la BHE.

Esta ruta de administración tiene también sus inconvenientes. El principal, es la realización de una craneotomía para su infusión, ya sea simple o extensa, lo que supone el traslado del paciente a quirófano y la realización de una intervención quirúrgica. En pacientes con un TCE grave la movilización fuera del ambiente controlado de una UCIP es siempre un desafío, no exento de riesgos potenciales. Además, la punción del parénquima cerebral mediante una aguja aumenta el riesgo de daño secundario y hemorragia intracraneal (se calcula que ocurre en torno al 1-5% de los procedimientos<sup>243</sup>). También la infusión de grandes cantidades de volumen puede producir lesión por compresión y desplazamiento del tejido cerebral<sup>243</sup>. Por este motivo siempre se debe poner en la balanza el número de sitios de inyección (lo que incrementa el riesgo del sangrado cerebral) con el volumen administrado por infusión (que produce un incremento local en la presión intracraneal).

Técnicamente, la infusión de MSC no deja de ser un problema complejo. Actualmente, los dispositivos que se disponen para su administración no dejan de ser subóptimos. La administración de cualquier fluido en un tejido como el cerebral, que posee una escasa elasticidad origina que, al retirar la aguja, parte del fluido refluya a través del tracto de infusión, lo que puede originar que las MSC no alcancen el lugar adecuado. Se puede evitar parcialmente manteniendo la aguja de infusión un tiempo después de su administración, lo que permite cierta reabsorción del fluido en el parénquima. Cuanto mayor es el volumen infundido, mayor es la posibilidad de que parte refluya. Además, se ha de pensar que cuando se resuspenden las MSC en cualquier medio este no se comporta como un medio homogéneo, sino que las células tienden a sedimentarse, lo que origina que la primera parte de la dosis contenga mayor cantidad de células que la última. Este último problema aparece cuando se utiliza una única aguja para la administración de la dosis completa. Se evita homogeneizando la muestra entre inyección e inyección. Actualmente se están desarrollando dispositivos que permiten, mediante la realización de un solo trayecto de infusión, la administración en varias zonas, con la introducción de una aguja rígida que contiene en su interior un catéter semirrígido que es capaz de moverse en todas las direcciones del espacio<sup>243</sup>. Teóricamente este catéter permite la administración en un punto de pequeñas infusiones de volumen, sin realizar múltiples incisiones y con una menor cantidad de extravasación.

Se eligió para realizar este experimento una aguja que fuera lo suficientemente fina como para evitar el daño cerebral al insertarla. Igualmente, la punta de la misma tenía un bisel

que permitía que la lesión fuera lo más pequeña posible. Mediante visualización directa con microscopía óptica, se evitaba la infusión en la cercanía de cualquier vaso sanguíneo que pudiera haber producido una lesión grave, aunque las estructuras profundas del cerebro no estaban controladas. En los estudios postmortem, no se evidenciaron áreas extensas de daño cerebral más allá de las lesiones asociadas al TCE. Aunque se utilizó la cantidad más pequeña de líquido de resuspensión, dado el pequeño tamaño del cerebro de la rata hacía poco recomendable su infusión en una única dosis. Por este motivo se realizaron varias infusiones en la zona de la penumbra. Igualmente, aunque se administraba la dosis lentamente y se mantenía la aguja en el lugar de la infusión instantes después, parte del material refluía a través del punto de infusión, lo que ha podido ser causa de que el efecto observado haya sido menor.

Histologicamente, 24 horas tras el trauma la distribución de las células vimentina positivas corresponde al tejido cortical y subcortical perilesional, lo que indica que el modelo utilizado permitió su administración y anidamiento inicial. En el grupo control ip, se observaba un área de intenso edema cortical similar al del grupo control simple, sin áreas de necrosis o infarto, por lo que aparentemente la administración fue un procedimiento seguro.

### 5.3.- Elección del modelo animal de TCE

El propósito de un modelo de TCE es replicar ciertos componentes patológicos o fases de un TCE, de tal manera que puedan guiar a mejorar su tratamiento o a aclarar su fisiopatología<sup>199</sup>. Para que un modelo animal sea válido, debe reunir una serie de características: 1) La fuerza mecánica usada para provocar la lesión debe estar controlada, ser reproducible y cuantificable; 2) la lesión debe ser reproducible, cuantificable y simular componentes de los condicionantes existentes en humanos; 3) la medición del pronóstico de la lesión, medida por parámetros morfológicos, fisiológicos, bioquímicos o del comportamiento, debe estar relacionada con la fuerza mecánica causante de la lesión; 4) la intensidad de la fuerza mecánica debe predecir el pronóstico de la lesión<sup>199</sup>. Actualmente la mayoría de los estudios usan protocolos estándar que incluyen todo el procedimiento quirúrgico excepto el trauma. Sirven para controlar el efecto en las variables sistémicas de la inducción anestésica, la fijación al marco estereotáxico y la propia intervención.

Los modelos más cercanos a los cambios observados en humanos tras un TCE son los generados a través de experimentos con monos y cerdos. Sin embargo, la mayoría de los investigadores sobre TCE utilizan actualmente modelos con ratas y ratones debido a su relativa-

mente conservado y cercano patrón filogenético con el cerebro humano. Además, el coste de obtención y mantenimiento hace posible realizar y repetir diferentes experimentos con los que se pueden analizar alteraciones morfológicas, bioquímicas, celulares o de conducta y no presentan las consideraciones éticas del estudio con primates superiores. Sin embargo, existen diferencias en las respuestas a un TCE tanto fisiológicas como de comportamiento<sup>199,244</sup>. Igualmente, muchas de los efectos que se valoran tras la aplicación de estas células, están relacionados con funciones “superiores”, como son la cognición, el aprendizaje y la memoria, difíciles de valorar adecuadamente con modelos animales. Dichas diferencias deben generar cautela a la hora de interpretar los datos obtenidos.

Nuestro modelo de TCE se basa en la aplicación de una fuerza primaria sobre la corteza cerebral, previa eliminación de la protección ósea mediante una craneotomía. Supone una modificación del modelo cortical controlado, dado que mientras en dicho modelo un pistón mecánico actúa sobre la duramadre intacta, en el nuestro es la fuerza de aceleración por gravedad la que produce el impacto del cilindro sobre la duramadre intacta. Este modelo genera un área de necrosis focal en la corteza, rodeada de un área edematosa que se extiende progresivamente. Además, incluye pérdida celular en el hipocampo, giro dentado y tálamo ipsilateral<sup>199</sup>. Otras alteraciones son la lesión axonal en la sustancia blanca subcortical, cápsula interna, núcleos talámicos y tronco cerebral, junto con un edema cerebral de tipo celular<sup>198</sup>. Existe una fase breve y transitoria de apertura de la BHE, generalmente en las primeras 8 horas tras el trauma, y disminuye progresivamente hasta cerrarse completamente 24-48 horas después<sup>198</sup>. De esta manera, aunque el daño principal es un daño focal primario, la lesión cerebral secundaria también abarca lesiones compatibles con el daño difuso.

Esta amplia variedad de daño simula lo que ocurre en el cerebro humano tras un TCE, donde diferentes grupos de lesiones aparecen a lo largo del tiempo. Por ello se puede decir que no exista un daño cerebral único, y que este se puede comportar de una manera u otra dependiendo de la diferente contribución de los mecanismos de daño cerebral primario y secundario. Probablemente la alta heterogeneidad de los resultados de los estudios de tratamientos frente al TCE, vienen dados porque posiblemente no todos los pacientes con un TCE son iguales.

Por ejemplo, un paciente con una lesión primaria asociada a una lesión cortical hemorrágica que requiere drenaje en las primeras horas y desde el inicio presenta una monitorización invasiva de la PIC puede tener una extensa lesión en la zona cortical dañada, que le produzca una lesión permanente y duradera. Sin embargo, esa misma monitorización puede hacer

que el control de la HTIC sea más estrecho (al detectarse precozmente) y por lo tanto ver reducido su daño cerebral traumático (DCT) secundario debido a las intervenciones terapéuticas. Otro paciente, no obstante, con un TCE grave con una lesión difusa inicial que no tenga esta monitorización no invasiva puede no tener una secuela en esta área, mientras que su DCT secundario sea mayor y afecte a zonas del hipocampo y del giro dentado, lo que supone un déficit a largo plazo en cuanto a atención y memoria. Es un desafío actual de la medicina el clasificar correctamente a los pacientes no solo en cuanto a la gravedad del TCE, sino también en cuanto al tipo de lesión y las posibles secuelas esperables. Lamentablemente, en la actualidad no existen herramientas diagnósticas fiables que permitan evaluar los mecanismos patológicos subyacentes. Técnicas como los catéteres de microdiálisis pueden ayudar a su conocimiento, pero su práctica aún no es generalizada ni ha permitido de momento extraer conclusiones válidas.

En nuestros animales optamos por no cerrar la craneotomía, suturando la misma mediante la aposición del músculo temporal y la piel. De esta manera, se aumentaba la supervivencia aun sabiendo que dicha actuación podía aliviar *per se* el incremento de la PIC, reduciendo el DCT secundario y las secuelas. De esta manera, tanto el déficit funcional como las lesiones histológicas observadas a la finalización del experimento son probablemente menores que si se hubiera cerrado. Para compensarlo, se decidió aplicar el traumatismo en una zona más anterior de lo habitual, intentando que la lesión motora fuera más evidente.

#### 5.4.- Tiempo y dosis de la infusión de MSC

En nuestro modelo de tratamiento tras un TCE, hemos elegido la administración local en el área perilesional ipsilateral y en la fase aguda (24 horas). Se ha realizado de esta manera debido a que pensamos que el principal papel de las MSC era regular a la baja la inflamación local y el daño cerebral secundario.

Aunque se ha demostrado que la primera semana de vida es el tiempo óptimo para el trasplante de CPN, el tiempo en el que se administra no afecta a la diferenciación fenotípica de estas células<sup>245</sup>. La localización del trasplante afecta a la supervivencia, migración, fenotipo y eficacia funcional<sup>245</sup>.

No se han realizado estudios que evalúen la supervivencia celular de MSC-a en función con el tiempo tras el trasplante. En la metodología publicada, puede variar desde una hora tras el TCE hasta varios meses después. Actualmente se desconoce si el ambiente proinflamatorio

en las primeras horas tras un TCE supone una diferencia en cuanto al anidamiento del trasplante celular, y de las diferencias funcionales y estructurales que se puedan derivar.

Igualmente, tampoco se conoce la dosis efectiva de MSC. Nosotros hemos utilizado una dosis similar a otros estudios, en torno a  $1 \cdot 10^6$  MSC/ kg de peso, aunque la variabilidad entre los grupos es amplia y se han comunicado dosis mayores, de hasta  $3 \cdot 10^6$  MSC/ kg peso. No obstante, dicha dosis es empírica y desconocemos si una dosis diferente supondría un cambio en los resultados funcionales, supervivencia celular, efecto antiinflamatorio o seguridad a corto o largo plazo.

### 5.5.- Influencia del protocolo de obtención y procesamiento celular

Aun en constante mejoría, las técnicas utilizadas para el aislamiento y purificación de MSC obtienen un rendimiento bajo, en parte debido a la proporción de MSC en los tejidos de los que se obtienen. Así, se calcula que el porcentaje de MSC procedentes de médula ósea está comprendido entre el 0,01-0,001% del total, siendo menor cuanto mayor es la edad del sujeto<sup>246</sup>. Aunque se desconoce la dosis óptima de células que deben ser administradas, en general para los tratamientos experimentales y los ensayos clínicos con personas es necesario un método no solo para su aislamiento y purificación, sino también un método para su expansión y almacenaje. El tipo de protocolo usado, así como el pasaje celular pueden influir en su efectividad, modificando los resultados de los experimentos<sup>246</sup>.

#### Aislamiento celular

En nuestro experimento, las MSC procedentes de tejido adiposo fueron aisladas con un método de separación mediante densidad (Ficoll), obteniéndose una fracción celular que posteriormente se cultiva en medios apropiados. La ventaja de este método comparado con los métodos de adherencia celular es que permiten desde el principio una población de MSC más homogénea, dado que se evita el cultivo conjunto de MSC junto con precursores endoteliales y hematopoyéticos, lo que podría disminuir el rendimiento de las MSC, o afectar a su proliferación o diferenciación.

Nosotros utilizamos como agente separador de células mediante densidad el medio Ficoll. Este medio es un polímero de sucrosa con un peso molecular alto, y una densidad de 1077 g/mL. Este polímero tiene la ventaja de estar producido mediante prácticas de buena producción (GMP), un estándar de la FDA que marca los protocolos de excelencia en los productos que se utilizan en la terapia celular<sup>247</sup>. Ha sido usado durante años para separar células

mononucleares de linfocitos de la sangre periférica, sin encontrarse efectos secundarios del producto<sup>246</sup>.

Las células fueron cultivadas en flask con una densidad inicial de  $1 \cdot 10^6$  MSC/cm<sup>2</sup>. Se ha comunicado que densidades iniciales bajas de MSC aumenta la proliferación de las mismas. Aunque los niveles teóricamente ideales estarían del orden de 1000-100 MSC/cm<sup>2</sup>, en términos de coste efectividad la mayoría de los ensayos utilizan densidades del orden  $0.1-1 \cdot 10^6$  MSC/cm<sup>2</sup>. No está claro si la densidad de implantación inicial tiene un efecto sobre la función o la supervivencia de las MSC-a<sup>246</sup>.

### Expansión celular

Los medios de cultivo basal consisten de una mezcla de aminoácidos, glucosas e iones incluyendo Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y fosfatos. Diferentes tipos de cultivos afectan a la proliferación y diferenciación de MSC. Existen estudios preclínicos que muestran que DMEM es preferible al IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium), dado que conserva mejor su pluripotencialidad<sup>246</sup>. L-Glutamina es un nutriente esencial para la producción de energía, así como la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos en las células en cultivo, y por esto habitualmente se complementa en los medios habituales. Tiene la desventaja de que se degrada espontáneamente, produciendo amonio, que es capaz de inhibir el crecimiento celular. Para resolver este problema, usamos Glutamax<sup>TM</sup>, un sustituto más estable en soluciones acuosas y que no se degrada espontáneamente.

El suplemento de factores de crecimiento potencia la proliferación de MSC, manteniendo sus propiedades originales. Múltiples factores tróficos han demostrado su efectividad, incluyendo el FGF2, PDGF, EGF, TGF- $\beta$  e IGF. La administración de MSC cultivadas junto con factores neurotróficos específicos ha demostrado una mayor eficacia que las MSC solas<sup>218</sup>. El suero fetal bovino (FBS), al 10-20% es el suplemento más utilizado porque contiene todos estos factores para optimizar la expansión celular. Aunque nosotros hemos usado este medio, no se debe olvidar sus inconvenientes, que son principalmente que los niveles de factores pueden variar de un lote a otro de FBS, afectando su efectividad; y los problemas de seguridad incluyendo la posible transmisión de priones o infecciones víricas, reacciones anafilácticas o la formación de anticuerpos anti-FBS<sup>246</sup>. Actualmente existe una tendencia regulatoria en los ensayos clínicos con humanos a prohibir su uso, aunque existen países (Australia) que lo permite siempre que sea de fuentes libres de encefalitis espongiforme y acordes a las buenas prácticas de trabajo. Dado que nuestro experimento era un modelo animal, decidimos usar FBS como medio de enriquecimiento, de manera similar a otros experimentos comunicados.

Para evitar el riesgo relacionado con el uso de materiales animales, se han propuesto dos alternativas: el suero humano y el lisado de plaquetas. El suero humano alogénico adulto puede no ser el medio ideal, dado que es controvertido que mantenga su potencial de crecimiento celular sin alterar algunas de sus importantes propiedades celulares. El suero autólogo puede ser problemático su recolección (sobre todo de grandes cantidades) y en pacientes mayores su capacidad puede verse reducida. Como alternativas se podría utilizar suero de cordón umbilical o placenta.

El lisado de plaquetas probablemente sea el medio de elección. Puede ser obtenido fácilmente de la aféresis de productos hematológicos, o de la centrifugación de muestras de voluntarios sanos. El producto purificado contiene muchos de los factores de crecimiento anteriormente descritos, que mejora la capacidad proliferativa de las MSC. Como ventajas se pueden almacenar diferentes lisados de plaquetas de distintos voluntarios. Como desventaja existen dudas sobre la capacidad de diferenciación adipogénica y osteogénica, y alteran los marcadores de superficie celular. Además, existe el riesgo de transmisión de patógenos no detectados en el screening habitual, y la variabilidad de factores de crecimiento de unos lisados a otros.

Existen también medios “sintéticos”, libres de componentes animales o humanos (StemPro MSC SFM™, Invitrogen™, Lifetechnologies™, USA), aprobadas para su uso en humanos. Aunque mejoran la proliferación de MSC en estadios precoces (pase celular < 5), algunas de las características de las MSC pueden verse alteradas<sup>246</sup>.

### 5.6.- Posibilidad de terapia celular en humanos

Aproximadamente, en la última década el interés que ha despertado la posibilidad de terapia celular con células madre ha ido en aumento. Tomando como referencia la base de datos Pubmed, el número de publicaciones recogidas ha sufrido un crecimiento exponencial, alcanzando más de del cuarto millón de registros relacionados (Enero 2014), de los cuales más del 60% se han producido en la última década. Rápidamente, el entusiasmo generado ha sido trasladado a la investigación clínica, registrándose ensayos clínicos con algún tipo de terapia celular hasta la cifra de más de 4000 (Enero 2014), de los cuales 32 están relacionados con enfermedades traumáticas del SNC (TCE y traumatismo/sección espinal).

Este incremento súbito traduce realmente el importante esfuerzo investigador que ha centrado esta terapia, así como los diferentes tipos de células, vías de administración, fárma-

cos coadyuvantes y desarrollos de modelos de enfermedades potencialmente aplicables. Sin embargo, como cualquier medicamento, precisa de una regulación estricta y de unos controles que permitan su trasvase desde la ciencia básica a la clínica diaria con unas garantías de seguridad y eficacia.

Habitualmente, dentro del desarrollo de una nueva terapia, se pueden diferenciar tres grandes etapas. La inicial, en la que un descubrimiento científico cambia ciertos paradigmas básicos, o descubre algunos nuevos, lo que abre la posibilidad de nuevas ventanas terapéuticas. Posteriormente le sigue una fase prolongada en tiempo y recursos económicos, en la que el descubrimiento científico es puesto a prueba, desarrollado, se diseña y prueba un “prototipo” (que puede ser una nueva molécula, una nueva técnica o aparato), se estudia su viabilidad comercial y su aplicación a gran escala. Si se supera esta fase, se alcanza una última (la más costosa de todas) donde se valora su eficacia y seguridad mediante modelos animales y posteriormente en ensayos clínicos que alcanzan una mayor complejidad y número de pacientes. Estos pasos, debido a la competencia económica, no son lineales, sino que se producen simultáneamente para diferentes patologías y por diferentes empresas<sup>248</sup>. Actualmente, la terapia celular con células madre tendría un cuerpo de conocimientos básicos sólidos, aunque no completos, sobre los diferentes tipos celulares y su mecanismo de actuación. Los estudios preliminares en animales hacen que su aplicación en humanos sea esperanzadora, pero se han de observar con cautela, ya que los resultados pueden no ser reproducibles.

Para que la terapia celular sea efectiva en las patologías del SNC, se deben aclarar algunos desafíos que este tratamiento tiene: el impacto que la administración de estas células tiene en el tejido cerebral, la necesidad de mantener la conectividad celular y funcional existente mientras se promueve la integración celular, la utilización de señales endógenas que promuevan la proliferación, migración y destino de las células implantadas, la formación de cicatrices en el sitio del daño neuronal, la interdependencia funcional y metabólica de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos y su impacto en la supervivencia y función de las células donantes; la compleja reacción inmune que existe en el cerebro normal y dañado; y el desafío de simular adecuadamente enfermedades del SNC en animales de experimentación<sup>248</sup>.

España, perteneciente a la Unión Europea, inscribe su marco legal dentro de la autoridad de la Agencia Europea del Medicamento. En Marzo de 2010 publicó un documento que refleja las condiciones que deberán cumplir estos medicamentos para su autorización comercial ([http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/02/WC500101692.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/02/WC500101692.pdf)). En dicho documento se fijan unos principios que se basan en:

- **Cualidades del producto:** se deberá referenciar el origen de las células, su procesamiento exacto desde la población inicial a los estadios finales (células madre pluripotenciales, diferenciadas, reprogramadas), las técnicas de validación interna que se han seguido (para asegurar la calidad de la población, su estabilidad genética, su capacidad de producir tumores y la existencia de otras líneas celulares) y su caracterización (identificación, pureza, potencia y posibles efectos secundarios, principalmente tumorales).
- **Consideraciones no clínicas:** elección de un modelo animal adecuado, distribución del tratamiento celular aplicado, tumorigénesis, diferenciación in vivo, persistencia en los tejidos receptores y reacciones inmunes desencadenadas.
- **Consideraciones clínicas:** Farmacodinámica, farmacocinética, diseño de estudios de dosis efectiva, estudios de seguridad (Fase I), estudios de eficacia (Fase II y III) y futura farmacovigilancia.

Previamente, la agencia norteamericana del medicamento (*Food and Drug administration*, FDA) también había publicado una serie de consideraciones acerca del futuro uso de estos medicamentos<sup>247</sup>. Algunas de los apartados anteriores merecen una consideración en profundidad.

**Caracterización y procesamiento de las células madre.** Dado que las células no son moléculas que se puedan definir tan concretamente como los medicamentos convencionales, es más difícil su control. Además, las diferentes patologías del SNC se pueden beneficiar no solo de un tipo de célula madre en concreto, sino también es importante conocer en qué estadio de proliferación se encuentra, así como el número de replicaciones que ha sufrido desde su aislamiento inicial (“pases”). Por este motivo, se ha realizado un importante esfuerzo para caracterizar estos subgrupos celulares, que incluyen no solo su descripción morfológica y su capacidad de diferenciación a líneas celulares maduras, sino también su patrón de expresión de marcadores celulares y biomarcadores<sup>248</sup>. Una vez que el producto final está caracterizado, la producción de lotes celulares para su uso clínico es un proceso complejo que se inicia en el donante (de células o tejidos) y finaliza en la preparación del mismo para su administración al paciente. Cualquier actividad a lo largo del proceso puede introducir elementos que supongan riesgos potenciales de efectos adversos. Las terapias celulares requieren, por este motivo, estrictos protocolos de seguridad, especialmente en relación con agentes infecciosos, el uso de productos animales, inestabilidad genética debido a la expansión y posibilidad de producción de tumores<sup>248</sup>.

**Nicho de administración y seguimiento celular *in vivo*.** En estas terapias, la determinación del destino final de las células administradas, así como su migración en tiempo real y en la evolución de los pacientes tiene un gran interés y se relaciona con las preocupaciones sobre la dosis administrada, su eficacia, la optimización terapéutica y su seguridad. Los métodos usados en los estudios preclínicos para este motivo no son apropiados para su aplicación en ensayos con humanos. La identificación de las células del donante puede ser realizado o bien en la autopsia o bien en biopsias si existe una diferencia de género entre el donante y el receptor, o si existe un marcador celular específico. El método más prometedor es el uso de células precargadas con partículas de óxido de hierro, y su seguimiento posterior mediante resonancia magnética<sup>249</sup>. Si esta técnica se demostrase segura y reproducible en humanos, sería un gran avance para valorar su funcionalidad *in vivo*.

**Elección de las variables resultado de los estudios clínicos.** La definición de las variables primarias del estudio es una de las más importantes tareas de un ensayo clínico, ya de su medición se determina el éxito o el fracaso del mismo. En el tratamiento con terapia celular de las enfermedades del SNC, es particularmente difícil dado la característica degenerativa de muchas de ellas y la complejidad de los mismos, definida como la progresión de la enfermedad y la falta de marcadores objetivos validados<sup>11,226,227,250</sup>.

El principal objetivo de los estudios fase I es asegurar la seguridad y posibilidad de un tratamiento, siendo el objetivo principal determinar la dosis máxima tolerada y su toxicidad. En ausencia de un marcador *in vivo* de las células no invasivo, y en especial en enfermedades neurológicas en los que los pacientes sobreviven durante años después del trasplante, las mediciones histológicas de supervivencia celular, migración y diferenciación pueden no estar disponibles durante décadas. Para asegurar su toxicidad, se asignan los efectos secundarios encontrados según el conocimiento teórico para haberlos producido. El seguimiento a largo plazo es importante, especialmente en pacientes con enfermedades no mortales, que pueden sobrevivir mucho tiempo después del trasplante. Aunque se pueden encontrar alguna indicación de eficacia terapéutica en los estudios fase I, el no hallarlo no es un prerrequisito necesario para iniciar el siguiente grupo de estudio.

Los estudios Fase II se centran en variables clínicas que puedan ser medidas y resulten en un beneficio del paciente, como puede ser la medición de la evaluación motora tras un TCE, tiempo hasta la progresión de la enfermedad o supervivencia global. Un tratamiento que demuestra eficacia en fase II típicamente avanza hasta estudios fase III, randomizados, controlados y multicéntricos, que abarcan a un número de pacientes mayor y que sirven para asegurar

la eficacia final cuando se compara con el estándar de tratamiento en ese momento, o frente al placebo si no existe alternativa razonable.

### 5.7.- Efectos secundarios de la terapia celular con MSC

A pesar del entusiasmo que este tipo de tratamiento genera, existen muchas dudas sobre los posibles efectos adversos. Estos incluyen la inducción tumoral debido a la capacidad proliferativa de las MSC, un incremento en la susceptibilidad a la infección debido a sus propiedades inmunomoduladoras, tromboembolismos, zoonosis asociada con cultivos con medios animales, e inmunogenicidad aguda y crónica debido a las células por sí misma o a los medios de cultivo empleados<sup>251</sup>. Los datos que se poseen en la actualidad son pobres, derivan en muchas ocasiones de estudios de poca calidad y, en general, tienen un periodo de seguimiento corto para evaluar mucho de estos efectos adversos.

Solo existe a fecha de hoy un metaanálisis que evalúa el tratamiento con MSC administradas intravascularmente (intravenosa o intraarterial) en pacientes con diferentes patologías (neurológicas, cardiovasculares, intestinales) en diferentes poblaciones adultas y pediátricas, si bien no se analizan separadamente los datos pediátricos<sup>252</sup>. En él se incluyeron ocho ensayos clínicos aleatorizados, con un total de 359 pacientes. No se encontró asociación entre la administración sistémica de MSC con efectos adversos graves (toxicidad infusional aguda, complicaciones en órganos y sistemas, infecciones, muerte o malignidad), aunque la incidencia de fiebre (transitoria y sin asociar otros efectos graves) fue mayor en el grupo de tratamiento con MSC<sup>252</sup>. A pesar de las graves limitaciones de este estudio (principalmente, la utilización de diferentes protocolos de administración en patologías diferentes, junto con el alto riesgo de sesgo de los mismos), los autores concluyeron que la administración sistémica de este grupo celular fue segura.

Actualmente no se disponen de datos de la terapia celular con MSC tras su administración intraparenquimatosa. Algunos de los riesgos teóricos se reducirían con este tipo de administración, como es la inmunosupresión sistémica, y la formación de tromboembolismos. Otros, seguramente con la estandarización de los medios de cultivo con materiales humanos, desaparecerán. Y por último, existen riesgos inherentes a la terapia con MSC, como es la inmunogenicidad y la lesión secundaria del parénquima.

Hemos visto como la acción de las MSC regulan parte de su efecto beneficioso a través de la **modulación del sistema inmune**, generalmente a la baja<sup>155</sup>. Cuando se administra sisté-

micamente, las MSC tienen la capacidad de reducir la respuesta inflamatoria tanto en el órgano afectado como en diferentes órganos no directamente relacionados con el mecanismo lesional, como puede ser el bazo<sup>156,158</sup>. Desde un punto de vista teórico, aún no demostrado, esta disminución a la baja *per se*, aunque no se administraran fármacos inmunosupresores concomitantes, aumentaría la capacidad invasiva de patógenos y bloquearía la respuesta inmune antitumoral, incrementando el número de infecciones y la incidencia de neoplasias.

A pesar de que esta teoría podría tener algunas inconsistencias, se podría admitir que la inmunosupresión generada es dosis dependiente. Dado que la administración de MSC por vía intraparenquimatosa requiere un menor número de MSC, la inmunosupresión sistémica sería menor. Además, la recuperación de la integridad de la BHE supondría un freno a los efectos globales de las MSC.

La formación de **tromboembolismos** se ha asociado con la administración intrarterial de las MSC, relacionándose no tanto con la vía de administración, sino con el tamaño celular y la velocidad de infusión rápida<sup>241</sup>. La administración intraparenquimatosa obvia este problema, y aunque los estudios histológicos de muestras no evidencian esta complicación, la inflamación y lesión secundaria a la aguja de infusión podría producir estos fenómenos. Probablemente, el efecto sería transitorio y muy localizado.

La mayoría de los grupos de estudio utilizan el suero fetal bovino (FBS) para su cultivo. Este ha sido criticado por su capacidad de producir **zoonosis** (enfermedades por priones) y por el aumento de la inmunogenicidad de las MSC administradas<sup>246</sup>. El uso del dimetil-sulfóxido (DMSO) para el almacenamiento y la congelación de MSC también ha sido criticado por ser un tóxico químico conocido y por ser capaz de producir reacciones de hipersensibilidad<sup>246</sup>. La aparición de medios de cultivos humanos probablemente reduzca el riesgo de ambos efectos secundarios, aunque no lo disminuya del todo, debido a que no se dispone de un método eficaz para detectar y eliminar los priones de estos medios de cultivos. Quizás el futuro sea utilizar medios sintéticos que sean biológicamente inertes.

Ya sea por los factores anteriormente descritos o por la infusión de células necróticas/apoptóticas y productos de deshecho celular, existe una preocupación sobre la **inmunogenicidad** que la administración con MSC. Sin embargo, en muchos de los estudios incluidos en el metaanálisis administraron MSC alogénicas, sin que se hayan descrito efectos adversos funcionales agudos<sup>252</sup>. Si se confirmaran estos datos, apoyarían la teoría que defiende que se está ante un grupo de células inmunoprivilegiadas, debido a la expresión baja de proteínas HLA y de moléculas estimulantes de linfocitos T<sup>156</sup>. Esto abriría la puerta a la creación de bancos de MSC

análogos a los utilizados en la actualidad para el trasplante de progenitores hematopoyéticos, que en un plazo de tiempo corto permitiría la utilización de reservas celulares.

### 5.8.- Consideraciones en el tratamiento de TCE en niños

Como se ha dicho anteriormente, el TCE es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños. Como toda enfermedad suficientemente prevalente, supone una continua área de mejora y de investigación. Esta investigación es realizada por grupos de diferentes nacionalidades, que utilizan técnicas de investigación, medida y resultados que no son homogéneos entre sí.

Como consecuencia, muchos de las recomendaciones usadas en las guías de práctica clínica provienen de un nivel bajo de evidencia, procedentes de estudios clase I o clase II. Aun siendo rigurosos, los estudios publicados difieren en cuanto a la clasificación del trauma pediátrico, variables recogidas, métodos de tratamiento y protocolos de seguimiento. De esta manera, se generan estudios que no son directamente comparables entre sí, disminuyendo la calidad de las pruebas científicas que avalan o refutan sus resultados. Ya hemos visto que la terapia con MSC no es homogénea dentro de sus medios ni de sus fines, y a veces la comparación entre los experimentos se ha de hacer mediante extrapolaciones.

Por todos estos motivos, en 2009 surgió una iniciativa procedente de Estados Unidos, en la que se creó un grupo de trabajo para generar unas recomendaciones comunes para el estudio del TCE, que incluían una serie de consideraciones pediátricas (*Common Data Elements for Traumatic Brain Injury: Pediatric Considerations*<sup>227</sup>). En este grupo participaron diferentes agencias federales norteamericanas para poner en común las líneas principales de los proyectos de investigación, considerando los datos demográficos y clínicos del paciente<sup>253</sup>, la recogida de muestras biológicas<sup>254</sup>, las pruebas de imagen<sup>255</sup> y las variables de medida<sup>250</sup> de los pacientes con TCE.

En ellos se estructuran, dentro de cada categoría, una serie de parámetros centrales y secundarios que ayudarían a estandarizar los resultados obtenidos. Igualmente, se presta especial atención a los parámetros emergentes que puedan surgir como consecuencia de la investigación básica. Las recomendaciones generales son<sup>227</sup>:

- Los pacientes pediátricos deberían integrarse dentro de estudios en adultos que comprendan todos los grupos de edad.

- Deben estudiarse todas las fases del TCE, tanto aguda como crónica.
- Los datos comunes recogidos para el TCE pediátrico deberían ir junto con otras enfermedades neurológicas, incluyendo epilepsia e infarto cerebral, para facilitar comparaciones y acelerar la investigación que sea relevante para el cerebro inmaduro.
- El trabajo futuro requerirá grupos de trabajo para abordar la complejidad y el solapamiento de aproximaciones en esta enfermedad común pero heterogénea.



## 6.- Conclusiones

Este modelo de traumatismo craneoencefálico en ratas mediante una caída de un peso observamos:

- 1.- La administración intraparenquimatosa de células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo en la zona de la lesión es eficaz en la recuperación funcional motora.
- 2.- Dicha recuperación se mantiene a pesar de que el número de células mesenquimales disminuye con el tiempo y no se han encontrado evidencias de su diferenciación a células gliales o neuronales maduras.
- 3.- La recuperación funcional se asocia en los animales a los que se administró células mesenquimales con un incremento precoz de la neurogénesis endógena demostrado por un incremento de células granulares en el giro dentado, en la región CA3 del hipocampo y células nestina positiva en la región subgranular del giro dentado.
- 4.- Sin embargo, esta respuesta es transitoria, puesto que a las tres semanas del trauma craneal solo en el giro dentado del hipocampo se observa un incremento de células granulares, desapareciendo las diferencias en el resto de zonas estudiadas.



## 7.- Índice de figuras y tablas

### Ilustraciones

<b>Ilustración 1.-</b> Mecanismos de lesión en TCE. De entre ellos, los más importantes son los relacionados con los factores locales, y especialmente con los tisulares .....	8
<b>Ilustración 2.-</b> Principales citocinas implicadas en el daño cerebral traumático secundario .....	11
<b>Ilustración 3.-</b> Esquema de la fisiopatología del daño cerebral secundario .....	13
<b>Ilustración 4.-</b> Esquema temporal de la fisiopatología del daño cerebral traumático .....	14
<b>Ilustración 5.-</b> Medidas generales del tratamiento tras un trauma craneal grave .....	15
<b>Ilustración 6.-</b> Opciones de tratamiento de hipertensión intracraneal (HTIC) según la calidad científica .....	18
<b>Ilustración 7.-</b> El nicho germinal y las células precursoras .....	30
<b>Ilustración 8.-</b> Mecanismos de acción de células madre neuronales .....	33
<b>Ilustración 9.-</b> Mecanismo por el cual las células neuronales/precursoras neuronales adultas son capaces de mimetizar las rutas de activación linfocitaria para alcanzar las zonas del SNC inflamadas después de su inyección intravenosa .....	34
<b>Ilustración 10.-</b> Esquema de interacción de las diferentes señales estimuladoras del nicho celular de la ZSV y ZSG del hipocampo .....	35
<b>Ilustración 11.-</b> Resumen de algunas de las propiedades antiinflamatoria de las células madre mesenquimales .....	36
<b>Ilustración 12.-</b> Efecto de la terapia celular sistémica en el sistema inmune periférico .....	37
<b>Ilustración 13.-</b> Efectos de las MSC sobre diferentes tipos de células del sistema inmune .....	38
<b>Ilustración 14.-</b> Características de las células madre mesenquimales .....	41
<b>Ilustración 15.-</b> Tipos de células mesenquimales .....	42
<b>Ilustración 16.-</b> Características del modelo de traumatismo craneoencefálico .....	50
<b>Ilustración 17.-</b> Técnica de trauma craneal controlado en nuestro experimento .....	51
<b>Ilustración 18.-</b> Técnica de infusión intraparenquimatosa de células mesenquimales con estereotaxia .....	55
<b>Ilustración 19.-</b> Grupos de experimentación .....	56
<b>Ilustración 20.-</b> Cronograma de los grupos de experimentación .....	56
<b>Ilustración 21.-</b> Test funcionales: Rotarod y test de Rogers modificado .....	58
<b>Ilustración 22.-</b> Test de la cinta modificado (Modified Sticky tape test: MST) .....	58
<b>Ilustración 23.-</b> Estructura de hipocampo de rata sobre cortes histológicos teñidos con técnica Nissl (azul de toluidina), tras inclusión con parafina .....	61
<b>Ilustración 24.-</b> Marcadores de células troncales mesenquimales .....	65

**Ilustración 25.**- Imágenes tomadas mediante un microscopio invertido que muestran los fenotipos celulares obtenidos mediante incubación con medio de diferenciación y posteriores tinciones. ... 66

**Ilustración 26.**- Resultados de los test funcionales en los grupos de experimentación..... 68

**Ilustración 27.**- Resultados del Sticky tape test en los grupos de experimentación..... 68

**Ilustración 28.**- Resultados del test de Rogers..... 69

**Ilustración 29.**- Resultados del test de Rotarod, número de revoluciones por minuto máximas.... 69

**Ilustración 30.**- Resultados del test de Rotarod, tiempo máximo alcanzado ..... 69

**Ilustración 31.**- Método utilizado para la determinación de células troncales mesenquimales (MSC) en tejido cerebral..... 70

**Ilustración 32.**- Gráfico de la citometría cerebral en los animales de experimentación a las 48 horas de un trauma craneal controlado..... 71

**Ilustración 33.**- Gráfico de la citometría cerebral en los animales de experimentación a los 21 días de un trauma craneal controlado. .... 72

**Ilustración 34.**- Gráfico de la citometría cerebral en los animales de experimentación a las 48 horas de un trauma craneal controlado..... 73

**Ilustración 35.**- Gráfico de la citometría cerebral en los animales de experimentación a los 21 días de un trauma craneal controlado. .... 73

**Ilustración 36.**- Comparativa del tamaño de la lesión cerebral tras 21 días. .... 74

**Ilustración 37.**- Población celular en GD del hipocampo. Inmunofluorescencia con vimentina bajo microscopía óptica (20 aumentos)..... 75

**Ilustración 38.**- Células GFP positivas en la zona de la lesión..... 76

**Ilustración 39.**- Población celular en CA1 del hipocampo.. .... 77

**Ilustración 40.**- Población celular en CA3 del hipocampo ..... 78

**Ilustración 41.**- Población celular en GD del hipocampo..... 79

**Ilustración 42.**- Población celular de células Nestina positiva en la zona subventricular..... 80

**Ilustración 43.**- Población celular de células Nestina positiva en el giro dentado del hipocampo. 80

## Tablas

**Tabla 1.**- Ensayos clínicos finalizados o recientemente iniciados para el tratamiento farmacológico del TCE..... 28

**Tabla 2.**- Estudios actualmente interrumpidos para el tratamiento farmacológico del TCE..... 28

**Tabla 3.**- Resumen de los principales estudios publicados sobre TCE y tratamiento con MSC..... 92

## 8.- Bibliografía

1. Miniño AM. Death in the United States, 2009. NCHS Data Brief 2011;64:1-8.
2. Luerssen TG, Klauber MR, Marshall LF. Outcome from head injury related to patient's age. A longitudinal prospective study of adult and pediatric head injury. *J Neurosurg* 1988;68(3):409-16.
3. Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)* 2006;148(3):255-68; discussion 268.
4. Ferreros I, Peiro S, Chirivella-Garrido J, Duque P, Gagliardo P, Perez-Vicente R, Libroero J. [Incidence of hospitalization for traumatic brain injury in children and adolescents (Valencia Community, Spain, 2002-2009)]. *Rev Neurol* 2012;54(12):719-28.
5. Centers for Disease C, Prevention. CDC grand rounds: reducing severe traumatic brain injury in the United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2013;62(27):549-52.
6. Schneier AJ, Shields BJ, Hostetler SG, Xiang H, Smith GA. Incidence of pediatric traumatic brain injury and associated hospital resource utilization in the United States. *Pediatrics* 2006;118(2):483-92.
7. Parslow RC, Morris KP, Tasker RC, Forsyth RJ, Hawley CA. Epidemiology of traumatic brain injury in children receiving intensive care in the UK. *Arch Dis Child* 2005;90(11):1182-7.
8. Dunning J, Daly JP, Malhotra R, Stratford-Smith P, Lomas JP, Lecky F, Batchelor J, Mackway-Jones K. The implications of NICE guidelines on the management of children presenting with head injury. *Arch Dis Child* 2004;89(8):763-7.
9. Mayer T, Matlak ME, Johnson DG, Walker ML. The modified injury severity scale in pediatric multiple trauma patients. *J Pediatr Surg* 1980;15(6):719-26.
10. Mayer T, Walker ML, Johnson DG, Matlak ME. Causes of morbidity and mortality in severe pediatric trauma. *JAMA* 1981;245(7):719-21.
11. White JR, Farukhi Z, Bull C, Christensen J, Gordon T, Paidas C, Nichols DG. Predictors of outcome in severely head-injured children. *Crit Care Med* 2001;29(3):534-40.
12. Chiaretti A, Piastra M, Pulitano S, Pietrini D, De Rosa G, Barbaro R, Di Rocco C. Prognostic factors and outcome of children with severe head injury: an 8-year experience. *Childs Nerv Syst* 2002;18(3-4):129-36.
13. Vavilala MS, Bowen A, Lam AM, Uffman JC, Powell J, Winn HR, Rivara FP. Blood pressure and outcome after severe pediatric traumatic brain injury. *J Trauma* 2003;55(6):1039-44.
14. Michaud LJ, Rivara FP, Grady MS, Reay DT. Predictors of survival and severity of disability after severe brain injury in children. *Neurosurgery* 1992;31(2):254-64.
15. Faul M, Xu L, Wald M. Traumatic Brain Injury in the United States. Emergency Department Visits, Hospitalizations and Deaths 2002-2006. 2010.
16. Michaud LJ, Rivara FP, Longstreth WT, Jr., Grady MS. Elevated initial blood glucose levels and poor outcome following severe brain injuries in children. *J Trauma* 1991;31(10):1356-62.
17. Jennett B, Teasdale G, Braakman R, Minderhoud J, Heiden J, Kurze T. Prognosis of patients with severe head injury. *Neurosurgery* 1979;4(4):283-9.

18. Kokoska ER, Smith GS, Pittman T, Weber TR. Early hypotension worsens neurological outcome in pediatric patients with moderately severe head trauma. *J Pediatr Surg* 1998;33(2):333-8.
19. Pigula FA, Wald SL, Shackford SR, Vane DW. The effect of hypotension and hypoxia on children with severe head injuries. *J Pediatr Surg* 1993;28(3):310-4; discussion 315-6.
20. Massagli TL, Michaud LJ, Rivara FP. Association between injury indices and outcome after severe traumatic brain injury in children. *Arch Phys Med Rehabil* 1996;77(2):125-32.
21. Rovegno M, Soto PA, Saez JC, von Bernhardt R. [Biological mechanisms involved in the spread of traumatic brain damage]. *Med Intensiva* 2012;36(1):37-44.
22. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth* 2007;99(1):4-9.
23. Smith DH, Meaney DF, Shull WH. Diffuse axonal injury in head trauma. *J Head Trauma Rehabil* 2003;18(4):307-16.
24. Li XY, Feng DF. Diffuse axonal injury: novel insights into detection and treatment. *J Clin Neurosci* 2009;16(5):614-9.
25. von Gertten C, Flores Morales A, Holmin S, Mathiesen T, Nordqvist AC. Genomic responses in rat cerebral cortex after traumatic brain injury. *BMC Neurosci* 2005;6:69.
26. Dardiotis E, Fountas KN, Dardioti M, Xiromerisiou G, Kapsalaki E, Tasiou A, Hadjigeorgiou GM. Genetic association studies in patients with traumatic brain injury. *Neurosurg Focus* 2010;28(1):E9.
27. Kurowski B, Martin LJ, Wade SL. Genetics and outcomes after traumatic brain injury (TBI): what do we know about pediatric TBI? *J Pediatr Rehabil Med* 2012;5(3):217-31.
28. Stocchetti N, Conte V, Ghisoni L, Canavesi K, Zanaboni C. Traumatic brain injury in pediatric patients. *Minerva Anestesiol* 2010;76(12):1052-9.
29. Chesnut RM. Care of central nervous system injuries. *Surg Clin North Am* 2007;87(1):119-56, vii.
30. Lang EW, Czosnyka M, Mehdorn HM. Tissue oxygen reactivity and cerebral autoregulation after severe traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2003;31(1):267-71.
31. Lee JH, Kelly DF, Oertel M, McArthur DL, Glenn TC, Vespa P, Boscardin WJ, Martin NA. Carbon dioxide reactivity, pressure autoregulation, and metabolic suppression reactivity after head injury: a transcranial Doppler study. *J Neurosurg* 2001;95(2):222-32.
32. Cunningham AS, Salvador R, Coles JP, Chatfield DA, Bradley PG, Johnston AJ, Steiner LA, Fryer TD, Aigbirhio FI, Smielewski P and others. Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. *Brain* 2005;128(Pt 8):1931-42.
33. Rodriguez-Baeza A, Reina-de la Torre F, Poca A, Marti M, Garnacho A. Morphological features in human cortical brain microvessels after head injury: a three-dimensional and immunocytochemical study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003;273(1):583-93.
34. DeWitt DS, Prough DS. Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. *J Neurotrauma* 2003;20(9):795-825.
35. Scremin OU, Li MG, Jenden DJ. Cholinergic modulation of cerebral cortical blood flow changes induced by trauma. *J Neurotrauma* 1997;14(8):573-86.
36. Armstead WM. Differential activation of ERK, p38, and JNK MAPK by nociceptin/orphanin FQ in the potentiation of prostaglandin cerebrovasoconstriction after brain injury. *Eur J Pharmacol* 2006;529(1-3):129-35.

37. Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 2010;7(1):22-30.
38. Fraser DD, Close TE, Rose KL, Ward R, Mehl M, Farrell C, Lacroix J, Creery D, Kesselman M, Stanimirovic D and others. Severe traumatic brain injury in children elevates glial fibrillary acidic protein in cerebrospinal fluid and serum. *Pediatr Crit Care Med* 2011;12(3):319-24.
39. Laird MD, Vender JR, Dhandapani KM. Opposing roles for reactive astrocytes following traumatic brain injury. *Neurosignals* 2008;16(2-3):154-64.
40. Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 1996;16(8):2508-21.
41. Rostworowski M, Balasingam V, Chabot S, Owens T, Yong VW. Astrogliosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma. *J Neurosci* 1997;17(10):3664-74.
42. Morganti-Kossmann MC, Satgunaseelan L, Bye N, Kossmann T. Modulation of immune response by head injury. *Injury* 2007;38(12):1392-400.
43. Raghupathi R, Conti AC, Graham DI, Krajewski S, Reed JC, Grady MS, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Mild traumatic brain injury induces apoptotic cell death in the cortex that is preceded by decreases in cellular Bcl-2 immunoreactivity. *Neuroscience* 2002;110(4):605-16.
44. Minambres E, Ballesteros MA, Mayorga M, Marin MJ, Munoz P, Figols J, Lopez-Hoyos M. Cerebral apoptosis in severe traumatic brain injury patients: an in vitro, in vivo, and postmortem study. *J Neurotrauma* 2008;25(6):581-91.
45. Clark RS, Kochanek PM, Chen M, Watkins SC, Marion DW, Chen J, Hamilton RL, Loeffert JE, Graham SH. Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. *FASEB J* 1999;13(8):813-21.
46. Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, Liu S, Bueno E, Hansen AJ, Hansen TW, Goldman S, Nedergaard M. Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci* 1998;1(6):494-500.
47. Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A. Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ* 2007;14(7):1324-35.
48. Bezzi P, Volterra A. A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11(3):387-94.
49. Bruzzone R, Giaume C. Connexins and information transfer through glia. *Adv Exp Med Biol* 1999;468:321-37.
50. Srinivas M, Calderon DP, Kronengold J, Verselis VK. Regulation of connexin hemichannels by monovalent cations. *J Gen Physiol* 2006;127(1):67-75.
51. Nilsson P, Hillered L, Olsson Y, Sheardown MJ, Hansen AJ. Regional changes in interstitial K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> levels following cortical compression contusion trauma in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13(2):183-92.
52. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(7):552-65.
53. Bullock R, Zauner A, Woodward JJ, Myseros J, Choi SC, Ward JD, Marmarou A, Young HF. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg* 1998;89(4):507-18.
54. Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci* 2001;69(4):369-81.

55. Rao VL, Baskaya MK, Dogan A, Rothstein JD, Dempsey RJ. Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) proteins in rat brain. *J Neurochem* 1998;70(5):2020-7.
56. Albers GW, Clark WM, Atkinson RP, Madden K, Data JL, Whitehouse MJ. Dose Escalation Study of the NMDA Glycine-Site Antagonist Licostinel in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 1999;30(3):508-513.
57. Morris GF, Bullock R, Marshall SB, Marmarou A, Maas A, Marshall LF. Failure of the competitive N-methyl-D-aspartate antagonist Selfotel (CGS 19755) in the treatment of severe head injury: results of two phase III clinical trials. The Selfotel Investigators. *J Neurosurg* 1999;91(5):737-43.
58. Albers GW, Goldstein LB, Hall D, Lesko LM, Aptiganel Acute Stroke I. Aptiganel hydrochloride in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;286(21):2673-82.
59. Sacco RL, DeRosa JT, Haley EC, Jr., Levin B, Ordonneau P, Phillips SJ, Rundek T, Snipes RG, Thompson JL, Glycine Antagonist in Neuroprotection Americas I. Glycine antagonist in neuroprotection for patients with acute stroke: GAIN Americas: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;285(13):1719-28.
60. Maas AI, Murray G, Henney H, 3rd, Kassem N, Legrand V, Mangelus M, Muizelaar JP, Stocchetti N, Knoller N, Pharmos TBii. Efficacy and safety of dexanabinol in severe traumatic brain injury: results of a phase III randomised, placebo-controlled, clinical trial. *Lancet Neurol* 2006;5(1):38-45.
61. Ikonomidou C, Turski L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *The Lancet Neurology* 2002;1(6):383-386.
62. Klatzo I. Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 1967;26(1):1-14.
63. Marmarou A, Signoretti S, Fatouros PP, Portella G, Aygok GA, Bullock MR. Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. *J Neurosurg* 2006;104(5):720-30.
64. Barron KD, Dentinger MP, Kimelberg HK, Nelson LR, Bourke RS, Keegan S, Mankes R, Cragoe EJ, Jr. Ultrastructural features of a brain injury model in cat. I. Vascular and neuroglial changes and the prevention of astroglial swelling by a fluorenyl (aryloxy) alkanolic acid derivative (L-644,711). *Acta Neuropathol* 1988;75(3):295-307.
65. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience* 2004;129(4):1021-9.
66. Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(20):11981-6.
67. Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 2000;6(2):159-63.
68. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 2007;22(6):778-84.
69. Jain KK. Neuroprotection in traumatic brain injury. *Drug Discov Today* 2008;13(23-24):1082-9.
70. Kerr ME, Weber BB, Sereika SM, Darby J, Marion DW, Orndoff PA. Effect of endotracheal suctioning on cerebral oxygenation in traumatic brain-injured patients. *Crit Care Med* 1999;27(12):2776-81.
71. Kochanek PM, Adelson PD, Ashwal S, Bell MJ, Bratton S, Carson S, Chesnut RM, Ghahar J, Goldstein B, Grant GA and others. Chapter 15. Analgesics, sedatives, and neuromuscular blockade. *Pediatric Critical Care Medicine* 2012;13:S61-S63.
72. Bar-Joseph G, Guilburd Y, Tamir A, Guilburd JN. Effectiveness of ketamine in decreasing intracranial pressure in children with intracranial hypertension. *J Neurosurg Pediatr* 2009;4(1):40-6.

73. Lewis RJ, Yee L, Inkelis SH, Gilmore D. Clinical predictors of post-traumatic seizures in children with head trauma. *Ann Emerg Med* 1993;22(7):1114-8.
74. Temkin NR, Dikmen SS, Anderson GD, Wilensky AJ, Holmes MD, Cohen W, Newell DW, Nelson P, Awan A, Winn HR. Valproate therapy for prevention of posttraumatic seizures: a randomized trial. *J Neurosurg* 1999;91(4):593-600.
75. Kochanek PM, Adelson PD, Ashwal S, Bell MJ, Bratton S, Carson S, Chesnut RM, Ghahar J, Goldstein B, Grant GA and others. Chapter 17. Antiseizure prophylaxis. *Pediatric Critical Care Medicine* 2012;13:S68-S71.
76. Kochanek PM, Adelson PD, Ashwal S, Bell MJ, Bratton S, Carson S, Chesnut RM, Ghahar J, Goldstein B, Grant GA and others. Chapter 16. GLucose and nutrition. *Pediatric Critical Care Medicine* 2012;13:S64-S67.
77. Cochran A, Scaife ER, Hansen KW, Downey EC. Hyperglycemia and outcomes from pediatric traumatic brain injury. *J Trauma* 2003;55(6):1035-8.
78. Kochanek PM, Adelson PD, Ashwal S, Bell MJ, Bratton S, Carson S, Chesnut RM, Ghahar J, Goldstein B, Grant GA and others. Chapter 9. Temperature control. *Pediatric Critical Care Medicine* 2012;13:S42-S45.
79. Keenan HT, Nocera M, Bratton SL. Frequency of intracranial pressure monitoring in infants and young toddlers with traumatic brain injury. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6(5):537-41.
80. Kochanek PM, Adelson PD, Ashwal S, Bell MJ, Bratton S, Carson S, Chesnut RM, Ghahar J, Goldstein B, Grant GA and others. Chapter 3. Indications for intracranial pressure monitoring. *Pediatric Critical Care Medicine* 2012;13:S11-S17.
81. Kochanek PM, Adelson PD, Ashwal S, Bell MJ, Bratton S, Carson S, Chesnut RM, Ghahar J, Goldstein B, Grant GA and others. Chapter 4. Threshold for treatment of intracranial hypertension. *Pediatric Critical Care Medicine* 2012;13:S18-S23.
82. Adelson PD, Ragheb J, Kanev P, Brockmeyer D, Beers SR, Brown SD, Cassidy LD, Chang Y, Levin H. Phase II clinical trial of moderate hypothermia after severe traumatic brain injury in children. *Neurosurgery* 2005;56(4):740-54; discussion 740-54.
83. Kochanek PM, Adelson PD, Ashwal S, Bell MJ, Bratton S, Carson S, Chesnut RM, Ghahar J, Goldstein B, Grant GA and others. Chapter 5. Cerebral perfusion pressure thresholds. *Pediatric Critical Care Medicine* 2012;13:S24-S29.
84. Kochanek PM, Adelson PD, Ashwal S, Bell MJ, Bratton S, Carson S, Chesnut RM, Ghahar J, Goldstein B, Grant GA and others. Chapter 10. Cerebrospinal fluid drainage. *Pediatric Critical Care Medicine* 2012;13:s46-s48.
85. Kochanek PM, Adelson PD, Ashwal S, Bell MJ, Bratton S, Carson S, Chesnut RM, Ghahar J, Goldstein B, Grant GA and others. Chapter 8. Hyperosmolar therapy. *Pediatric Critical Care Medicine* 2012;13:S36-S41.
86. Kochanek PM, Adelson PD, Ashwal S, Bell MJ, Bratton S, Carson S, Chesnut RM, Ghahar J, Goldstein B, Grant GA and others. Chapter 13. Hyperventilation. *Pediatric Critical Care Medicine* 2012;13:S53-S57.
87. Kochanek PM, Adelson PD, Ashwal S, Bell MJ, Bratton S, Carson S, Chesnut RM, Ghahar J, Goldstein B, Grant GA and others. Chapter 11. Barbiturates. *Pediatric Critical Care Medicine* 2012;13:S46-S48.
88. Kochanek PM, Adelson PD, Ashwal S, Bell MJ, Bratton S, Carson S, Chesnut RM, Ghahar J, Goldstein B, Grant GA and others. Chapter 12. Decompressive craniectomy for the treatment of intracranial hypertension. *Pediatric Critical Care Medicine* 2012;13:S49-S52.

89. Perez Suarez E, Serrano Gonzalez A, Perez Diaz C, Garcia Salido A, Martinez de Azagra Garde A, Casado Flores J. Decompressive craniectomy in 14 children with severe head injury: clinical results with long-term follow-up and review of the literature. *J Trauma* 2011;71(1):133-40.
90. Edwards P, Arango M, Balica L, Cottingham R, El-Sayed H, Farrell B, Fernandes J, Gogichaisvili T, Golden N, Hartzenberg B and others. Final results of MRC CRASH, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury-outcomes at 6 months. *Lancet* 2005;365(9475):1957-9.
91. Kochanek PM, Adelson PD, Ashwal S, Bell MJ, Bratton S, Carson S, Chesnut RM, Ghahar J, Goldstein B, Grant GA and others. Chapter 14. Corticosteroids. *Pediatric Critical Care Medicine* 2012;13:S58-S60.
92. Sahuquillo J, Vilalta A. Cooling the injured brain: how does moderate hypothermia influence the pathophysiology of traumatic brain injury. *Curr Pharm Des* 2007;13(22):2310-22.
93. Adelson PD, Wisniewski SR, Beca J, Brown SD, Bell M, Muizelaar JP, Okada P, Beers SR, Balasubramani GK, Hirtz D. Comparison of hypothermia and normothermia after severe traumatic brain injury in children (Cool Kids): a phase 3, randomised controlled trial. *The Lancet Neurology* 2013;12(6):546-553.
94. Hutchison JS, Guerguerian AM. Cooling of children with severe traumatic brain injury. *Lancet Neurol* 2013;12(6):527-9.
95. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Emerging treatments for traumatic brain injury. *Expert Opin Emerg Drugs* 2009;14(1):67-84.
96. Clausen F, Hanell A, Bjork M, Hillered L, Mir AK, Gram H, Marklund N. Neutralization of interleukin-1beta modifies the inflammatory response and improves histological and cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci* 2009;30(3):385-96.
97. Wei HH, Lu XC, Shear DA, Waghray A, Yao C, Tortella FC, Dave JR. NNZ-2566 treatment inhibits neuroinflammation and pro-inflammatory cytokine expression induced by experimental penetrating ballistic-like brain injury in rats. *J Neuroinflammation* 2009;6:19.
98. Clark RS, Kochanek PM, Watkins SC, Chen M, Dixon CE, Seidberg NA, Melick J, Loeffert JE, Nathaniel PD, Jin KL and others. Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* 2000;74(2):740-53.
99. Sullivan PG, Rabchevsky AG, Hicks RR, Gibson TR, Fletcher-Turner A, Scheff SW. Dose-response curve and optimal dosing regimen of cyclosporin A after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience* 2000;101(2):289-95.
100. Hansson MJ, Persson T, Friberg H, Keep MF, Rees A, Wieloch T, Elmer E. Powerful cyclosporin inhibition of calcium-induced permeability transition in brain mitochondria. *Brain Res* 2003;960(1-2):99-111.
101. Mbye LH, Singh IN, Carrico KM, Saatman KE, Hall ED. Comparative neuroprotective effects of cyclosporin A and NIM811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog, following traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29(1):87-97.
102. Readnower RD, Pandya JD, McEwen ML, Pauly JR, Springer JE, Sullivan PG. Post-injury administration of the mitochondrial permeability transition pore inhibitor, NIM811, is neuroprotective and improves cognition after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2011;28(9):1845-53.
103. Frantseva MV, Kokarovtseva L, Naus CG, Carlen PL, MacFabe D, Perez Velazquez JL. Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury. *J Neurosci* 2002;22(3):644-53.
104. Cope EC, Morris DR, Levenson CW. Improving treatments and outcomes: an emerging role for zinc in traumatic brain injury. *Nutr Rev* 2012;70(7):410-3.

105. Shakur H, Andrews P, Asser T, Balica L, Boeriu C, Quintero JD, Dewan Y, Druwe P, Fletcher O, Frost C and others. The BRAIN TRIAL: a randomised, placebo controlled trial of a Bradykinin B2 receptor antagonist (Anatibant) in patients with traumatic brain injury. *Trials* 2009;10:109.
106. Marmarou A, Nichols J, Burgess J, Newell D, Troha J, Burnham D, Pitts L. Effects of the bradykinin antagonist Bradycor (deltibant, CP-1027) in severe traumatic brain injury: results of a multi-center, randomized, placebo-controlled trial. American Brain Injury Consortium Study Group. *J Neurotrauma* 1999;16(6):431-44.
107. Simmon VF. Response to: The BRAIN TRIAL: a randomised, placebo controlled trial of a Bradykinin B2 receptor antagonist (Anatibant) in patients with traumatic brain injury. *Trials* 2009;10:110; author reply 111.
108. Willis C, Lybrand S, Bellamy N. Excitatory amino acid inhibitors for traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2004(1):CD003986.
109. Muir KW. Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6(1):53-60.
110. Temkin NR, Anderson GD, Winn HR, Ellenbogen RG, Britz GW, Schuster J, Lucas T, Newell DW, Mansfield PN, Machamer JE and others. Magnesium sulfate for neuroprotection after traumatic brain injury: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 2007;6(1):29-38.
111. Young B, Runge JW, Waxman KS, Harrington T, Wilberger J, Muizelaar JP, Boddy A, Kupiec JW. Effects of pegorgotein on neurologic outcome of patients with severe head injury. A multicenter, randomized controlled trial. *JAMA* 1996;276(7):538-43.
112. Yunoki M, Kawauchi M, Ukita N, Sugiura T, Ohmoto T. Effects of lecithinized superoxide dismutase on neuronal cell loss in CA3 hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Surg Neurol* 2003;59(3):156-60; discussion 160-1.
113. Vergouwen MD, Vermeulen M, Roos YB. Effect of nimodipine on outcome in patients with traumatic subarachnoid haemorrhage: a systematic review. *Lancet Neurol* 2006;5(12):1029-32.
114. Wang GH, Jiang ZL, Li YC, Li X, Shi H, Gao YQ, Vosler PS, Chen J. Free-radical scavenger edaravone treatment confers neuroprotection against traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2011;28(10):2123-34.
115. Miyamoto K, Ohtaki H, Dohi K, Tsumuraya T, Song D, Kiriyaama K, Satoh K, Shimizu A, Aruga T, Shioda S. Therapeutic time window for edaravone treatment of traumatic brain injury in mice. *Biomed Res Int* 2013;2013:379206.
116. Mauler F, Mittendorf J, Horvath E, De Vry J. Characterization of the diarylether sulfonylester (-)-(R)-3-(2-hydroxymethylindanyl-4-oxy)phenyl-4,4,4-trifluoro-1-sulfonate (BAY 38-7271) as a potent cannabinoid receptor agonist with neuroprotective properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302(1):359-68.
117. Firsching R, Piek J, Skalej M, Rohde V, Schmidt U, Striggow F, Group KNS. Early survival of comatose patients after severe traumatic brain injury with the dual cannabinoid CB1/CB2 receptor agonist KN38-7271: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg* 2012;73(4):204-16.
118. Goss CW, Hoffman SW, Stein DG. Behavioral effects and anatomic correlates after brain injury: a progesterone dose-response study. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;76(2):231-42.
119. Stein DG, Wright DW, Kellermann AL. Does progesterone have neuroprotective properties? *Ann Emerg Med* 2008;51(2):164-72.
120. Ma J, Huang S, Qin S, You C. Progesterone for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;10:CD008409.

121. Grasso G, Sfacteria A, Cerami A, Brines M. Erythropoietin as a tissue-protective cytokine in brain injury: what do we know and where do we go? *Neuroscientist* 2004;10(2):93-8.
122. Bartesaghi S, Marinovich M, Corsini E, Galli CL, Viviani B. Erythropoietin: a novel neuroprotective cytokine. *Neurotoxicology* 2005;26(5):923-8.
123. Lu D, Mahmood A, Qu C, Goussev A, Schallert T, Chopp M. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2005;22(9):1011-7.
124. Xiong Y, Mahmood A, Qu C, Kazmi H, Zhang ZG, Noguchi CT, Schallert T, Chopp M. Erythropoietin improves histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice in the absence of the neural erythropoietin receptor. *J Neurotrauma* 2010;27(1):205-15.
125. Nirula R, Diaz-Arrastia R, Brasel K, Weigelt JA, Waxman K. Safety and efficacy of erythropoietin in traumatic brain injury patients: a pilot randomized trial. *Crit Care Res Pract* 2010;2010.
126. Ward JL, Harting MT, Cox CS, Jr., Mercer DW. Effects of ketamine on endotoxin and traumatic brain injury induced cytokine production in the rat. *J Trauma* 2011;70(6):1471-9.
127. Chang LC, Raty SR, Ortiz J, Bailard NS, Mathew SJ. The emerging use of ketamine for anesthesia and sedation in traumatic brain injuries. *CNS Neurosci Ther* 2013;19(6):390-5.
128. Yang ZJ, Price CD, Bosco G, Tucci M, El-Badri NS, Mangar D, Camporesi EM. The effect of isovolemic hemodilution with oxycyte, a perfluorocarbon emulsion, on cerebral blood flow in rats. *PLoS One* 2008;3(4):e2010.
129. Zhou Z, Sun D, Levasseur JE, Merenda A, Hamm RJ, Zhu J, Spiess BD, Bullock MR. Perfluorocarbon emulsions improve cognitive recovery after lateral fluid percussion brain injury in rats. *Neurosurgery* 2008;63(4):799-806; discussion 806-7.
130. Demchenko IT, Mahon RT, Allen BW, Piantadosi CA. Brain oxygenation and CNS oxygen toxicity after infusion of perfluorocarbon emulsion. *J Appl Physiol* 2012;113(2):224-31.
131. Chen J, Chopp M. Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches. *NeuroRx* 2006;3(4):466-73.
132. Wu H, Lu D, Jiang H, Xiong Y, Qu C, Li B, Mahmood A, Zhou D, Chopp M. Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2008;25(2):130-9.
133. Wang H, Lynch JR, Song P, Yang HJ, Yates RB, Mace B, Warner DS, Guyton JR, Laskowitz DT. Simvastatin and atorvastatin improve behavioral outcome, reduce hippocampal degeneration, and improve cerebral blood flow after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2007;206(1):59-69.
134. Tapia-Perez J, Sanchez-Aguilar M, Torres-Corzo JG, Gordillo-Moscoso A, Martinez-Perez P, Madeville P, de la Cruz-Mendoza E, Chalita-Williams J. Effect of rosuvastatin on amnesia and disorientation after traumatic brain injury (NCT003229758). *J Neurotrauma* 2008;25(8):1011-7.
135. Sanchez-Aguilar M, Tapia-Perez JH, Sanchez-Rodriguez JJ, Vinas-Rios JM, Martinez-Perez P, de la Cruz-Mendoza E, Sanchez-Reyna M, Torres-Corzo JG, Gordillo-Moscoso A. Effect of rosuvastatin on cytokines after traumatic head injury. *J Neurosurg* 2013;118(3):669-75.
136. Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury with a combination therapy of marrow stromal cells and atorvastatin in rats. *Neurosurgery* 2007;60(3):546-53; discussion 553-4.
137. Mahmood A, Goussev A, Lu D, Qu C, Xiong Y, Kazmi H, Chopp M. Long-lasting benefits after treatment of traumatic brain injury (TBI) in rats with combination therapy of marrow stromal cells (MSCs) and simvastatin. *J Neurotrauma* 2008;25(12):1441-7.

138. Ruff RL, Riechers RG. Effective treatment of traumatic brain injury: learning from experience. *JAMA* 2012;308(19):2032-3.
139. Zafonte RD, Bagiella E, Ansel BM, Novack TA, Friedewald WT, Hesdorffer DC, Timmons SD, Jallo J, Eisenberg H, Hart T and others. Effect of citicoline on functional and cognitive status among patients with traumatic brain injury: Citicoline Brain Injury Treatment Trial (COBRIT). *JAMA* 2012;308(19):1993-2000.
140. Yurkewicz L, Weaver J, Bullock MR, Marshall LF. The effect of the selective NMDA receptor antagonist traxoprodil in the treatment of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2005;22(12):1428-43.
141. Martino G, Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2006;7(5):395-406.
142. Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J and others. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 2004;427(6976):740-4.
143. Richardson RM, Singh A, Sun D, Fillmore HL, Dietrich DW, 3rd, Bullock MR. Stem cell biology in traumatic brain injury: effects of injury and strategies for repair. *J Neurosurg* 2010;112(5):1125-38.
144. Roy NS, Wang S, Jiang L, Kang J, Benraiss A, Harrison-Restelli C, Fraser RA, Couldwell WT, Kawaguchi A, Okano H and others. In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med* 2000;6(3):271-7.
145. Martino G, Pluchino S, Bonfanti L, Schwartz M. Brain regeneration in physiology and pathology: the immune signature driving therapeutic plasticity of neural stem cells. *Physiol Rev* 2011;91(4):1281-304.
146. Doetsch F. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13(5):543-50.
147. Leuner B, Gould E, Shors TJ. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 2006;16(3):216-24.
148. Richardson RM, Holloway KL, Bullock MR, Broaddus WC, Fillmore HL. Isolation of neuronal progenitor cells from the adult human neocortex. *Acta Neurochir (Wien)* 2006;148(7):773-7.
149. Lim DA, Huang YC, Alvarez-Buylla A. The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurg Clin N Am* 2007;18(1):81-92, ix.
150. Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Prog Neurobiol* 2004;72(3):167-82.
151. De Feo D, Merlini A, Laterza C, Martino G. Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders: from cell replacement to neuroprotection. *Curr Opin Neurol* 2012;25(3):322-33.
152. Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A, Salani G, Dina G, Galli R, Del Carro U, Amadio S, Bergami A and others. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 2003;422(6933):688-94.
153. Pluchino S, Cusimano M, Bacigaluppi M, Martino G. Remodelling the injured CNS through the establishment of atypical ectopic perivascular neural stem cell niches. *Arch Ital Biol* 2010;148(2):173-83.
154. Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, Brambilla E, Ottoboni L, Salani G, Martinello M, Cattalini A, Bergami A, Furlan R and others. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature* 2005;436(7048):266-71.
155. Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther* 2012;20(1):14-20.

156. Dorronsoro A, Fernandez-Rueda J, Fechter K, Ferrin I, Salcedo JM, Jakobsson E, Trigueros C. Human Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Immunoregulation: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *Bone Marrow Res* 2013;2013:203643.
157. Zhang R, Liu Y, Yan K, Chen L, Chen XR, Li P, Chen FF, Jiang XD. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 2013;10(1):106.
158. Cossetti C, Alfaro-Cervello C, Donega M, Tyzack G, Pluchino S. New perspectives of tissue remodelling with neural stem and progenitor cell-based therapies. *Cell Tissue Res* 2012;349(1):321-9.
159. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105(4):1815-22.
160. Walker PA, Shah SK, Harting MT, Cox CS, Jr. Progenitor cell therapies for traumatic brain injury: barriers and opportunities in translation. *Dis Model Mech* 2009;2(1-2):23-38.
161. Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, Velada I, Leite C, Andrade P, Santos F, Henriques A, Graos M, Cardoso CM and others. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Res Ther* 2013;4(5):125.
162. Schwarz SC, Schwarz J. Translation of stem cell therapy for neurological diseases. *Transl Res* 2010;156(3):155-60.
163. Vogel G. Cell biology. Ready or not? Human ES cells head toward the clinic. *Science* 2005;308(5728):1534-8.
164. Erdo F, Buhle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Focking M, Kustermann E, Kolossov E, Hescheler J and others. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(7):780-5.
165. Harting MT, Sloan LE, Jimenez F, Baumgartner J, Cox CS, Jr. Subacute neural stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Surg Res* 2009;153(2):188-94.
166. Tamaki SJ, Jacobs Y, Dohse M, Capela A, Cooper JD, Reitsma M, He D, Tushinski R, Belichenko PV, Salehi A and others. Neuroprotection of host cells by human central nervous system stem cells in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Cell Stem Cell* 2009;5(3):310-9.
167. Selden NR, Al-Uzri A, Huhn SL, Koch TK, Sikora DM, Nguyen-Driver MD, Guillaume DJ, Koh JL, Gultekin SH, Anderson JC and others. Central nervous system stem cell transplantation for children with neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurosurg Pediatr* 2013;11(6):643-52.
168. Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, Paz N, Koren-Michowitz M, Waldman D, Leider-Trejo L and others. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 2009;6(2):e1000029.
169. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663-76.
170. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010;463(7284):1035-41.
171. Pfisterer U, Kirkeby A, Torper O, Wood J, Nelander J, Dufour A, Bjorklund A, Lindvall O, Jakobsson J, Parmar M. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(25):10343-8.
172. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4(5):267-74.

173. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
174. Ozen I, Boix J, Paul G. Perivascular mesenchymal stem cells in the adult human brain: a future target for neuroregeneration? *Clin Transl Med* 2012;1(1):30.
175. de Girolamo L, Lucarelli E, Alessandri G, Avanzini MA, Bernardo ME, Biagi E, Brini AT, D'Amico G, Fagioli F, Ferrero I and others. Mesenchymal stem/stromal cells: a new "cells as drugs" paradigm. Efficacy and critical aspects in cell therapy. *Curr Pharm Des* 2013;19(13):2459-73.
176. Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 2001;12(3):559-63.
177. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 2002;1(2):92-100.
178. Chopp M, Li Y. Transplantation of bone marrow stromal cells for treatment of central nervous system diseases. *Adv Exp Med Biol* 2006;585:49-64.
179. Kim HJ, Lee JH, Kim SH. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis. *J Neurotrauma* 2010;27(1):131-8.
180. Mahmood A, Lu D, Yi L, Chen JL, Chopp M. Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats. *J Neurosurg* 2001;94(4):589-95.
181. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Neurorestorative treatments for traumatic brain injury. *Discov Med* 2010;10(54):434-42.
182. Coyne TM, Marcus AJ, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. *Stem Cells* 2006;24(11):2483-92.
183. Walker PA, Harting MT, Jimenez F, Shah SK, Pati S, Dash PK, Cox CS, Jr. Direct intrathecal implantation of mesenchymal stromal cells leads to enhanced neuroprotection via an NFkappaB-mediated increase in interleukin-6 production. *Stem Cells Dev* 2010;19(6):867-76.
184. Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2004;21(1):33-9.
185. Menge T, Zhao Y, Zhao J, Wataha K, Gerber M, Zhang J, Letourneau P, Redell J, Shen L, Wang J and others. Mesenchymal stem cells regulate blood-brain barrier integrity through TIMP3 release after traumatic brain injury. *Sci Transl Med* 2012;4(161):161ra150.
186. Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M. Long-term recovery after bone marrow stromal cell treatment of traumatic brain injury in rats. *J Neurosurg* 2006;104(2):272-7.
187. Mahmood A, Lu D, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. *Neurosurgery* 2004;55(5):1185-93.
188. Lu D, Li Y, Wang L, Chen J, Mahmood A, Chopp M. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2001;18(8):813-9.
189. Maegele M, Schaefer U. Stem cell-based cellular replacement strategies following traumatic brain injury (TBI). *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2008;17(2):119-31.
190. Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M. Human marrow stromal cell treatment provides long-lasting benefit after traumatic brain injury in rats. *Neurosurgery* 2005;57(5):1026-31; discussion 1026-31.

191. Lu D, Mahmood A, Qu C, Hong X, Kaplan D, Chopp M. Collagen scaffolds populated with human marrow stromal cells reduce lesion volume and improve functional outcome after traumatic brain injury. *Neurosurgery* 2007;61(3):596-602; discussion 602-3.
192. Nichols JE, Niles JA, Dewitt D, Prough D, Parsley M, Vega S, Cantu A, Lee E, Cortiella J. Neurogenic and neuro-protective potential of a novel subpopulation of peripheral blood-derived CD133+ ABCG2+CXCR4+ mesenchymal stem cells: development of autologous cell-based therapeutics for traumatic brain injury. *Stem Cell Res Ther* 2013;4(1):3.
193. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells* 2008;26(1):146-50.
194. Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, Kim SW, Yang YS, Oh W, Chang JW. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci* 2013;14(9):17986-8001.
195. Zhang ZX, Guan LX, Zhang K, Zhang Q, Dai LJ. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury. *Cytotherapy* 2008;10(2):134-9.
196. Wang S, Cheng H, Dai G, Wang X, Hua R, Liu X, Wang P, Chen G, Yue W, An Y. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation significantly improves neurological function in patients with sequelae of traumatic brain injury. *Brain Res* 2013;1532:76-84.
197. Cox CS, Jr., Baumgartner JE, Harting MT, Worth LL, Walker PA, Shah SK, Ewing-Cobbs L, Hasan KM, Day MC, Lee D and others. Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for severe traumatic brain injury in children. *Neurosurgery* 2011;68(3):588-600.
198. Prieto R, Gutierrez-Gonzalez R, Pascual JM, Roda JM, Cerdan S, Matias-Guiu J, Barcia JA. [Experimental models of traumatic brain injury]. *Neurocirugia (Astur)* 2009;20(3):225-44.
199. Cernak I. Animal models of head trauma. *NeuroRx* 2005;2(3):410-22.
200. G P, C W. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, California, USA: Academic Press Inc; 1998. 474 p.
201. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res* 1981;211(1):67-77.
202. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1994;11(2):187-96.
203. Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 1997;28(10):2060-5; discussion 2066.
204. Hamm RJ. Neurobehavioral assessment of outcome following traumatic brain injury in rats: an evaluation of selected measures. *J Neurotrauma* 2001;18(11):1207-16.
205. Alonso de Lecinana M, Gutierrez M, Roda JM, Carceller F, Diez-Tejedor E. Effect of combined therapy with thrombolysis and citicoline in a rat model of embolic stroke. *J Neurol Sci* 2006;247(2):121-9.
206. Mackay KB, Bailey SJ, King PD, Patel S, Hamilton TC, Campbell CA. Neuroprotective effect of recombinant neutrophil inhibitory factor in transient focal cerebral ischaemia in the rat. *Neurodegeneration* 1996;5(4):319-23.
207. Komotar RJ, Kim GH, Sughrue ME, Otten ML, Rynkowski MA, Kellner CP, Hahn DK, Merkow MB, Garrett MC, Starke RM and others. Neurologic assessment of somatosensory dysfunction following an experimental rodent model of cerebral ischemia. *Nat Protoc* 2007;2(10):2345-7.

208. Sughrue ME, Mocco J, Komotar RJ, Mehra A, D'Ambrosio AL, Grobelny BT, Penn DL, Connolly ES, Jr. An improved test of neurological dysfunction following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Neurosci Methods* 2006;151(2):83-9.
209. Gutierrez-Fernandez M, Rodriguez-Frutos B, Alvarez-Grech J, Vallejo-Cremades MT, Exposito-Alcaide M, Merino J, Roda JM, Diez-Tejedor E. Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats. *Neuroscience* 2011;175:394-405.
210. Gutierrez-Fernandez M, Rodriguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, Teresa Vallejo-Cremades M, Fuentes B, Cerdan S, Diez-Tejedor E. 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 Res Ther* 2013;4(1):11.
211. Grady MS, Charleston JS, Maris D, Witgen BM, Lifshitz J. Neuronal and glial cell number in the hippocampus after experimental traumatic brain injury: analysis by stereological estimation. *J Neurotrauma* 2003;20(10):929-41.
212. Xiong Y, Qu C, Mahmood A, Liu Z, Ning R, Li Y, Kaplan DL, Schallert T, Chopp M. Delayed transplantation of human marrow stromal cell-seeded scaffolds increases transcallosal neural fiber length, angiogenesis, and hippocampal neuronal survival and improves functional outcome after traumatic brain injury in rats. *Brain Res* 2009;1263:183-91.
213. Kochanek PM, Dixon CE, Shellington DK, Shin SS, Bayir H, Jackson EK, Kagan VE, Yan HQ, Swauger PV, Parks SA and others. Screening of biochemical and molecular mechanisms of secondary injury and repair in the brain after experimental blast-induced traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2013;30(11):920-37.
214. Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* 2005;20(2):665-71.
215. Xue S, Zhang HT, Zhang P, Luo J, Chen ZZ, Jang XD, Xu RX. Functional endothelial progenitor cells derived from adipose tissue show beneficial effect on cell therapy of traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 2010;473(3):186-91.
216. Liu W, Jiang X, Fu X, Cui S, Du M, Cai Y, Xu R. Bone marrow stromal cells can be delivered to the site of traumatic brain injury via intrathecal transplantation in rabbits. *Neurosci Lett* 2008;434(2):160-4.
217. Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of Traumatic Brain Injury in Adult Rats with Intravenous Administration of Human Bone Marrow Stromal Cells. *Neurosurgery* 2003;53(3):697-703.
218. Mahmood A, Lu D, Wang L, Chopp M. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2002;19(12):1609-17.
219. Mahmood A, Lu D, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 2001;49(5):1196-203; discussion 1203-4.
220. Qu C, Xiong Y, Mahmood A, Kaplan DL, Goussev A, Ning R, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in mice with bone marrow stromal cell-impregnated collagen scaffolds. *J Neurosurg* 2009;111(4):658-65.
221. Zhang Y, Xiong Y, Mahmood A, Meng Y, Qu C, Schallert T, Chopp M. Therapeutic effects of erythropoietin on histological and functional outcomes following traumatic brain injury in rats are independent of hematocrit. *Brain Res* 2009;1294:153-64.
222. Mori K, Iwata J, Miyazaki M, Nakao Y, Maeda M. Functional recovery of neuronal activity in rat whisker-barrel cortex sensory pathway from freezing injury after transplantation of adult bone marrow stromal cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25(7):887-98.

223. Moorthy RK, Sam GA, Kumar SV, Chacko G, Mathews V, Chacko AG, Srivastava A, Rajshekhar V. Intralesional mesenchymal stromal cell transplant in a rodent model of cortical cryoinjury. *Neurol India* 2011;59(4):573-8.
224. Qu C, Mahmood A, Liu XS, Xiong Y, Wang L, Wu H, Li B, Zhang ZG, Kaplan DL, Chopp M. The treatment of TBI with human marrow stromal cells impregnated into collagen scaffold: functional outcome and gene expression profile. *Brain Res* 2011;1371:129-39.
225. Bonilla C, Zurita M, Otero L, Aguayo C, Vaquero J. Delayed intralesional transplantation of bone marrow stromal cells increases endogenous neurogenesis and promotes functional recovery after severe traumatic brain injury. *Brain Inj* 2009;23(9):760-9.
226. Miller RH, Bai L. Translating stem cell therapies to the clinic. *Neurosci Lett* 2012;519(2):87-92.
227. Miller AC, Odenkirchen J, Duhaime AC, Hicks R. Common data elements for research on traumatic brain injury: pediatric considerations. *J Neurotrauma* 2012;29(4):634-8.
228. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211-28.
229. Han C, Zhang L, Song L, Liu Y, Zou W, Piao H, Liu J. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: a better cell source for nervous system regeneration. *Chin Med J (Engl)* 2014;127(2):329-37.
230. Di Gennaro JL, Mack CD, Malakouti A, Zimmerman JJ, Armstead W, Vavilala MS. Use and effect of vasopressors after pediatric traumatic brain injury. *Dev Neurosci* 2010;32(5-6):420-30.
231. Zheng GP, Ge MH, Shu Q, Rojas M, Xu J. Mesenchymal stem cells in the treatment of pediatric diseases. *World J Pediatr* 2013;9(3):197-211.
232. Gutierrez-Fernandez M, Rodriguez-Frutos B, Otero-Ortega L, Ramos-Cejudo J, Fuentes B, Diez-Tejedor E. Adipose tissue-derived stem cells in stroke treatment: from bench to bedside. *Discov Med* 2013;16(86):37-43.
233. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006;24(5):1294-301.
234. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP, Donnenberg AD. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry A* 2013;83(1):134-40.
235. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med* 2014;12(1):8.
236. Ertas G, Ural E, Ural D, Aksoy A, Kozdag G, Gacar G, Karaoz E. Comparative analysis of apoptotic resistance of mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow and adipose tissue. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:105698.
237. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, Kyurkchiev S. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol Int* 2008;32(4):384-93.
238. Harting MT, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, Cox CS. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2009;110(6):1189-97.
239. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, Laine GA, Cox CS, Jr. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev* 2009;18(5):683-92.

240. Kang WJ, Kang HJ, Kim HS, Chung JK, Lee MC, Lee DS. Tissue distribution of 18F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *J Nucl Med* 2006;47(8):1295-301.
241. Janowski M, Lyczek A, Engels C, Xu J, Lukomska B, Bulte JW, Walczak P. Cell size and velocity of injection are major determinants of the safety of intracarotid stem cell transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013;33(6):921-7.
242. Lam PK, Lo AW, Wang KK, Lau HC, Leung KK, Li KT, Lai PB, Poon WS. Transplantation of mesenchymal stem cells to the brain by topical application in an experimental traumatic brain injury model. *J Clin Neurosci* 2013;20(2):306-9.
243. Potts MB, Silvestrini MT, Lim DA. Devices for cell transplantation into the central nervous system: Design considerations and emerging technologies. *Surg Neurol Int* 2013;4(Suppl 1):S22-30.
244. Duhaime AC. Large animal models of traumatic injury to the immature brain. *Dev Neurosci* 2006;28(4-5):380-7.
245. Shear DA, Tate CC, Tate MC, Archer DR, LaPlaca MC, Stein DG, Dunbar GL. Stem cell survival and functional outcome after traumatic brain injury is dependent on transplant timing and location. *Restor Neurol Neurosci* 2011;29(4):215-25.
246. Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols. *Biomed Res Int* 2014;2014:951512.
247. Fink DW, Jr. FDA regulation of stem cell-based products. *Science* 2009;324(5935):1662-3.
248. Aboody K, Capela A, Niazi N, Stern JH, Temple S. Translating stem cell studies to the clinic for CNS repair: current state of the art and the need for a Rosetta stone. *Neuron* 2011;70(4):597-613.
249. Guzman R, Uchida N, Bliss TM, He D, Christopherson KK, Stellwagen D, Capela A, Greve J, Malenka RC, Moseley ME and others. Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(24):10211-6.
250. McCauley SR, Wilde EA, Anderson VA, Bedell G, Beers SR, Campbell TF, Chapman SB, Ewing-Cobbs L, Gerring JP, Gioia GA and others. Recommendations for the use of common outcome measures in pediatric traumatic brain injury research. *J Neurotrauma* 2012;29(4):678-705.
251. Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, Horwitz E, Le Blanc K, Phinney DG, Simmons PJ, Sensebe L, Keating A. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy* 2010;12(5):576-8.
252. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, Granton J, Stewart DJ, Canadian Critical Care Trials G. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One* 2012;7(10):e47559.
253. Adelson PD, Pineda J, Bell MJ, Abend NS, Berger RP, Giza CC, Hotz G, Wainwright MS, Pediatric TBID, Clinical Assessment Working G. Common data elements for pediatric traumatic brain injury: recommendations from the working group on demographics and clinical assessment. *J Neurotrauma* 2012;29(4):639-53.
254. Berger RP, Beers SR, Papa L, Bell M, Pediatric TBICDEB, Biomarkers W. Common data elements for pediatric traumatic brain injury: recommendations from the biospecimens and biomarkers workgroup. *J Neurotrauma* 2012;29(4):672-7.
255. Duhaime AC, Holshouser B, Hunter JV, Tong K. Common data elements for neuroimaging of traumatic brain injury: pediatric considerations. *J Neurotrauma* 2012;29(4):629-33.