



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

**Terapia intravenosa con células
mesenquimales en la fase aguda
del daño cerebral.**

**Estudio experimental en un modelo
animal de trauma craneal pediátrico.**

Tesis doctoral

Esther Pérez Suárez

Terapia intravenosa con células
mesenquimales en la fase aguda del
daño cerebral. Estudio experimental
en un modelo animal de trauma
craneal pediátrico.

Tesis doctoral



Esther Pérez Suárez

“Por la ciencia,
como por el arte,
se va al mismo sitio:
a la verdad”.

(Gregorio Marañón)

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todos aquellos que, durante estos cuatro años, me habéis inspirado, ayudado y acompañado, para poder llevar a cabo este proyecto.

En primer lugar a Juan y Ana, por ser un ejemplo profesional y humano incomparable, por introducirme en el mundo de la investigación, por conseguir ilusionarme con cada proyecto que hemos realizado juntos y por vuestro cariño.

A Nacho, por ser un compañero excepcional en los últimos años de este proyecto, por tu tenacidad y esfuerzo y por todas las risas compartidas. A Carlos, por acompañarme en mis primeros contactos con las “ratitas”.

A Manuel, por mostrarme que cuando existe un fin, los medios aparecen. A África, por enseñarme a mirar la ciencia de otra manera y por tu inestimable ayuda. A Gustavo, por tu paciencia infinita y tu mano siempre tendida. A todo el resto de personas que nos han ayudado con una sonrisa en el Laboratorio de Terapia Celular del Hospital Infantil Niño Jesús. A Fernando y Nieves, por vuestra ayuda desinteresada, incluso en las circunstancias más adversas. A mis compañeros de Cuidados Intensivos y Urgencias, por motivarme a mejorar siguiendo vuestro ejemplo.

A María 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, porque llegamos con una idea y nos ayudasteis a darle forma. Por ser ejemplo de la gran generosidad que existe en el mundo de la investigación. A Carlota, Pablo y todas las personas que trabajan en el Laboratorio de Microcirugía, por hacer muchísimo más grata el arduo trabajo de laboratorio.

A Irenita porque cada día me motivas para ser mejor y por tu alegría, que hace la vida muchísimo más bonita. A Irene y a Omar porque siempre estáis a mi lado. A los pailys y el resto de amigos por vuestro apoyo incondicional.

Y por último y sobre todo, dedico este trabajo con todo mi cariño, a las personas que han hecho todo en la vida para que yo pudiera alcanzar mis sueños, mis padres.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Ac: anticuerpos

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

BHE: barrera hematoencefálica

BdrU: bromodesoxiuridina

CO₂: dióxido de carbono

CMDMO: Células mononucleares derivadas de médula ósea

CMA: célula madre adulto

DCP: daño cerebral primario

DCS: daño cerebral secundario

DCT: daño cerebral traumático

DTC: doppler transcraneal

DMEM: medio de Eagle modificado

DMSO: dimetilsulfóxido

ECG: Escala de Coma de Glasgow

ECRC: ensayo clínico controlado randomizado

EGF: factor de crecimiento epitelial

EMSC: célula madre embrionaria

Fc: frecuencia cardiaca

FGF: factor de crecimiento derivado de fibroblastos

GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía

GFP: proteína G fluorescente

GH: hormona de crecimiento

GMC: célula madre germinal

hMSC: célula mesenquimal procedente de humanos

HSA: hemorragia subaracnoidea

HSC: célula madre hematopoyética

HTIC: hipertensión intracraneal

ICAM: molécula de adhesión intracelular

ICC: Impacto cortical controlado

IGF-1: factor de crecimiento semejante a insulina tipo I

IL: interleukina

¹¹¹In: ¹¹¹Indio

IPSC: células madres inducidas pluripotenciales

Ip: intraparenquimatoso

Iv: intravenoso

LAD: lesión axonal difusa

LCR: líquido cefalorraquídeo

LIC: lesión intracraneal

Lv: lentivirus

MAPC: célula madre pluripotencial adulta

MSC: células madre mesenquimales

MSC-a: células mesenquimales de tejido adiposo

MSC-cu: células mesenquimales de cordón umbilical

MSC-GFP⁺: células mesenquimales que expresan proteína G fluorescente

MSC-mo: células mesenquimales de médula ósea

MSC-pb: células mesenquimales de sangre periférica

mST: Sticky tape test modificado

mNSS: Test de severidad neurológica modificado

NGF: factor de crecimiento neural

NPCa: célula precursora neural adulta

O₂: oxígeno

OEC: células olfatorias envolventes

PBS: fosfato sódico tamponado

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PFA: formaldehído

PAM: presión arterial media

PC-SOD: superóxidodismutasa lecitinizada

POG-SOD: polietilenglicol conjugado Superóxidodismutasa

PPC: presión de perfusión cerebral

P6: placas Multiwell tratadas de 6 pocillos

rMSC: células mesenquimales de procedencia murina

Rpm: revoluciones por minuto

SFB: suero fetal bovino

SO₂: saturación de oxígeno

SjO₂: saturación de oxígeno en el bulbo de la yugular

SSH: suero salino hipertónico

SSF: suero salino fisiológico

_mST: Sticky tape-test modificado: test de la cinta modificado

T^a: temperatura

TA: tensión arterial

TCE: traumatismo craneoencefálico

^{99m}Tc- HMPAO: ^{99m}Tc- hexamethylpropyleneamina oxima

VCAM: molécula de adhesión a células vasculares

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

ZSV: zona subventricular

RESUMEN

Objetivo: Estudiar si la terapia intravenosa con células madre mesenquimales en la fase aguda del daño cerebral, es segura y consigue mejorar la recuperación motora, sensitiva y cognitiva a medio plazo, en ratas jóvenes que sufren un traumatismo craneoencefálico grave. También se realiza estudio de la distribución y supervivencia de estas células en el tejido cerebral.

Métodos: Se aíslan MSC de la grasa peritoneal de ratas sanas, se expanden en cultivo, y se marcan con proteína G fluorescente (GFP). Se realiza un traumatismo craneoencefálico con un modelo de impacto cortical controlado mediante caída de un peso a 30 ratas Sprague-Dawley hembra de 150 -200 g de peso. Los animales se dividen en dos grupos control (control simple y otro que recibe PBS) y un grupo tratamiento. A los animales del grupo tratamiento se les administran a través de la vena de la cola 4×10^6 MSC, en dos bolos de 2×10^6 , a las 24 y 48 horas del trauma. Se realizan pruebas motoras, sensitivas y cognitivas (test de Rogers, steacky tape test y Rotarod) semanalmente durante un mes para evaluar la recuperación funcional. Se realizan técnicas de inmunohistoquímica y citometría a las 24 horas y 28 días.

Resultados: No se observan efectos adversos durante o después de la administración de las MSC. A las 48 horas de la infusión IV se encuentran MSC en los cortes histológicos en la zona perilesional por técnicas de fluorescencia directa, vimentina y marcaje con anticuerpos antiGFP. Por citometría se encuentra un mayor porcentaje de MSC (CD29⁺, CD90⁺, GFP⁺) en el hemisferio lesionado que en contralateral a las 48 horas y al mes de la infusión. Al mes de la lesión los tres grupos de experimentación alcanzan el mismo estado funcional, pero la recuperación de los déficits sensitivos y motores se inicia antes y el porcentaje de recuperación es mayor en el grupo tratamiento.

Conclusiones: Las células madre mesenquimales infundidas por vía intravenosa no tienen efectos adversos a corto plazo, alcanzan la zona perilesional y permanecen en ella produciendo una mayor y más rápida recuperación sensitivomotora en ratas jóvenes con traumatismo craneoencefálico grave. Esta terapia celular podría ser considerada para los pacientes que sufren de daño cerebral traumático.

Este estudio ha sido financiado con subvenciones concedidas por Fundación Mutua Madrileña (VIII convocatoria de Ayudas a la Investigación, 2011) y Fundación ACS.

Los resultados de este trabajo de investigación han sido parcialmente presentados en los siguientes congresos internacionales.

-Intravenous mesenchymal cells therapy after traumatic brain injury improves neurological recovery. E Perez-Suarez, I Mastro-Martinez, F Casco, A Gonzalez-Murillo, G Melen, M Gutierrez-Fernandez, A Serrano, E Diez-Tejedor, J Casado-Flores, M Ramirez. The ESGCT and the SETGyC Collaborative Congress. Madrid, 25-27 Octubre 2013.

-Intravenous mesenchymal cells therapy in the acute phase after traumatic brain injury improves neurological recovery. Esther Pérez-Suárez, Ignacio Mastro-Martínez, Fernando Casco, África González-Murillo, Gustavo Melen, María Gutiérrez-Fernández, Ana Serrano, Esuperio Díez-Tejedor, Juan Casado-Flores, Manuel Ramírez. X World Congress on Brain Injury. San Francisco, 19-22 Marzo 2014.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| ÍNDICE | 3 |
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1. TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO EN LA EDAD PEDIÁTRICA..... | 5 |
| 2. PRONÓSTICO Y SECUELAS DEL DAÑO CEREBRAL TRAUMÁTICO EN NIÑOS..... | 17 |
| 3. NUEVAS OPCIONES TERAPÉUTICAS EN EL TCE EN NINOS NEUROPROTECCIÓN. | 21 |
| 4. TERAPIA CELULAR | 25 |
| 5. TERAPIA CELULAR CON MSC | 32 |
| 6. TERAPIA CELULAR CON MSC EN EL TRAUMA CRANEAL | 39 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 48 |
| HIPÓTESIS | 48 |
| OBJETIVOS | 48 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 49 |
| 1. CULTIVOS CELULARES..... | 50 |
| 2. ENSAYOS IN VIVO: MODELOS ANIMALES | 57 |
| 3. DISEÑO DEL ESTUDIO | 65 |
| 4. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO | 69 |
| 5. CITOMETRÍA | 70 |
| 6. ANALISIS ESTADÍSTICO | 70 |
| 7. CAPTURA Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES..... | 71 |
| RESULTADOS | 72 |
| 1. OBTENCIÓN DE MSC FLUORESCENTES | 72 |
| 2. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS PILOTOS | 77 |
| 3. RESULTADOS FUNCIONALES DEL EXPERIMENTO PRINCIPAL | 80 |
| 4. RESULTADOS ANATOMÍA PATOLÓGICA | 87 |
| 5. CITOMETRÍA | 91 |
| DISCUSIÓN | 95 |
| 1. RECUPERACIÓN SENSITIVO-MOTORA Y COGNITIVA | 95 |
| 2. ANIDAMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE LAS MSC EN EL CEREBRO. | 100 |

| | |
|---|------------|
| 3. SEGURIDAD DE LAS MSC | 102 |
| 4. MODELO EXPERIMENTAL..... | 105 |
| 5. TERAPIA CELULAR EN NIÑOS CON TCE | 114 |
| CONCLUSIONES | 121 |
| BIBLIOGRAFÍA | 122 |

INTRODUCCIÓN

1. TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO EN LA EDAD PEDIÁTRICA

1.1. INTRODUCCIÓN

En el traumatismo craneoencefálico (TCE), que se define como daño de estructuras craneocerebrales de origen traumático, se producen dos tipos de lesiones, las lesiones primarias causadas por el impacto directo sobre el cerebro y las secundarias por condiciones adversas durante la fase de recuperación del traumatismo.

En los países desarrollados el TCE es la principal causa de muerte y de incapacidad en niños mayores de un año¹.

La gravedad del TCE se define, según la puntuación inicial en la Escala de Coma de Glasgow (ECG) (Tabla 1) en leve: 14-15, moderado: 9-13 y grave: menor de 9. En las urgencias pediátricas, el TCE leve es uno de los motivos más frecuentes de consulta, representando más del 80% de los TCE². La mortalidad en el TCE grave oscila entre un 7% y un 38% según las series³.

El daño cerebral traumático (DCT) tiene dos componentes: el daño cerebral primario y el secundario. Los principales mecanismos relacionados con las disfunciones neurocognitivas, motoras y sensitivas secundarias al daño cerebral traumático son la muerte neuronal y de las células de la glía, la degeneración axonal y el aumento de los astrocitos.

El daño cerebral producido tanto por mecanismo primario como secundario no tiene tratamiento una vez que se ha producido. El tratamiento de los pacientes con TCE grave, en la actualidad, se fundamenta en prevenir y evitar los factores causantes de daño cerebral secundario.

| Tabla 1: ESCALA DE COMA GLASGOW MODIFICADA | | |
|--|-------------------------|-------------------------|
| Apertura Ocular | | |
| | < 1 año | >1 año |
| 4 | Espontánea | Espontánea |
| 3 | Al habla o con un grito | A la orden verbal |
| 2 | Respuesta al dolor | Respuesta al dolor |
| 1 | Ausente | Ausente |
| Respuesta Motora | | |
| | < 1 año | >1 año |
| 6 | Espontánea | Obedece órdenes |
| 5 | Retira al contacto | Localiza el dolor |
| 4 | Retirada al dolor | Retirada al dolor |
| 3 | Flexión al dolor | Flexión al dolor |
| 2 | Extensión al dolor | Extensión al dolor |
| 1 | Sin respuesta motora | Sin respuesta motora |
| Respuesta verbal | | |
| | <2 años | >5 años |
| 5 | Sonríe, balbucea | Orientado, conversa |
| 4 | Llanto consolable | Confuso, conversa |
| 3 | Llora al dolor | Palabras inadecuadas |
| 2 | Gemido al dolor | Sonidos incomprensibles |
| 1 | No responde | No responde |

Escala de Coma de Glasgow: Escala que se utiliza para evaluar el estado neurológico del paciente, se evalúan tres ítems, respuesta ocular, verbal y motora. Tiene valor pronóstico y sirve para categorizar la gravedad del TCE. Existe una escala modificada para menores de 5 años y otra para menores de 2 años, que son las reflejadas en esta tabla.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

El TCE es la principal causa de morbilidad y mortalidad en mayores de un año. En nuestro país no existe un registro de su incidencia, si bien se estima que se producen entre 80000 y 100000 TCE anualmente (incidencia de 150 a 250/100000 habitantes/año) y que un 50% acontecen en menores de 15 años¹. Se estima que uno de cada diez niños sufrirá un TCE durante la infancia. En EE.UU son la causa de 7000 muertes, 29000 casos de invalidez permanente, 95000 hospitalizaciones y más de 50000 consultas a los servicios de urgencias al año; su coste es superior al billón de dólares².

Los TCE son más frecuentes en los varones y más graves en los menores de dos años³. Los lactantes y preescolares tienen más probabilidades de sufrir un TCE y también fallecer o sufrir una incapacidad a largo plazo por dicha causa. Más del 50% de los TCE se dan en menores de 4 años^{1,4}.

1.3. ETIOLOGÍA

La etiología varía en función de la edad y se relaciona con el grado de desarrollo psicomotor del niño³. En el primer año de vida, la mayor parte de TCE se producen por descuidos en el cuidado del lactante⁵. Los malos tratos son la primera causa de hemorragia intracraneal en los menores de un año⁶⁻⁸. Durante el segundo año la mayor parte los TCE se producen por caídas desde su propia altura⁴. Los mayores de dos años adquieren la deambulación estable, a esta edad los niños presenta una gran necesidad de explorar con ausencia de sensación de peligro. Por ello los TCE se producirán por caídas desde mayores alturas y accidentes escolares. Los accidentes de tráfico suponen una etiología frecuente, siendo los atropellos los más frecuentes en este grupo de edad⁹. Por encima de los 8-10 años la mayor parte de TCE se deben a accidentes de tráfico y a las caídas desde altura.

1.4. FISIOPATOLOGÍA

- **Recuerdo anatómico (figura 1)**

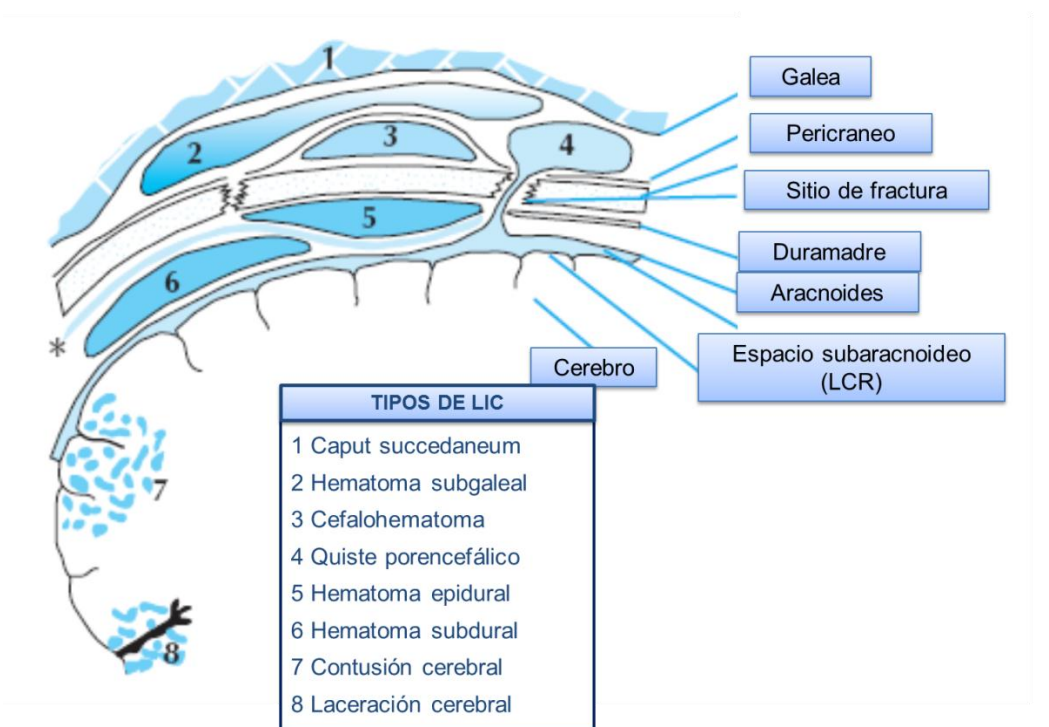


Figura 1: Tipos de Lesión intracraneal. Puede observarse las diferentes estructuras de recubrimiento del encéfalo y los tipos de lesiones que surgen como consecuencia de un TCE

En un corte sagital de la cabeza se pueden distinguir diferentes estructuras. El cuero cabelludo se localiza en la parte más externa, se encuentra muy vascularizado y limita en su parte interna con la galea aponeurótica, una vaina tendinosa que conecta los

músculos frontal y occipital. Por debajo de la galea se encuentra el compartimiento subgaleal. Inmediatamente por debajo se encuentra el cráneo, cuya porción más externa es el periostio externo. Las tablas externas e internas del cráneo están separadas por el espacio diploico, atravesado por pequeñas venas. Por debajo de la tabla interna del cráneo se localizan las meninges. La duramadre contiene pocos vasos sanguíneos en contraste con las leptomeninges, muy vascularizadas, que están en contacto íntimo con el encéfalo. Las venas que provienen de las leptomeninges atraviesan el espacio subdural para drenar en los senos duros. El encéfalo está bañado y protegido por el líquido cefalorraquídeo (LCR) ubicado en los espacios subaracnoideos, las cisternas de la base del encéfalo, las cavidades ventriculares y los canales de interconexión.

- ***Patogenia***

En el daño cerebral traumático (DCT) se han definido dos entidades desde el punto de vista patogénico: el daño cerebral primario (DCP) y el daño cerebral secundario (DCS). (Figura 2)

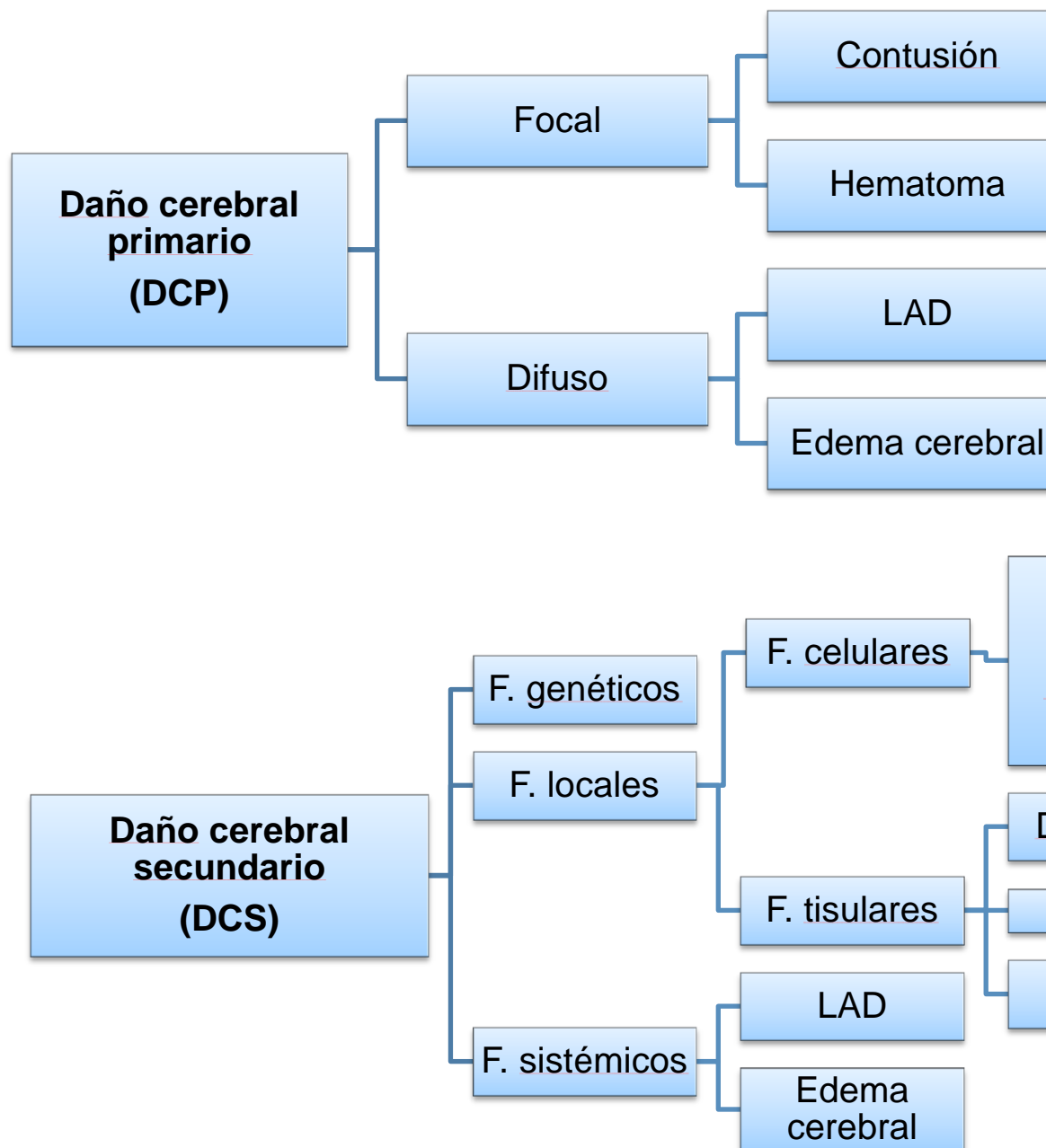


Figura 2 : Componentes del Daño cerebral traumático. El DCP se produce por la lesión. El DCS se produce por la cascada de acontecimientos que se producen condicionado por factores genéticos, locales y sistémicos. LAD: lesión axonal

El daño cerebral primario (DCP) lo constituye la lesión tisular producida como consecuencia directa del traumatismo. La agresión al tejido cerebral depende de las fuerzas de aceleración angular, rotacional y de traslación lineal, originadas por el traumatismo. El vector de estas fuerzas depende de la resistencia tisular y del lugar, la dirección y la intensidad del impacto. La probabilidad de presentar fracturas de cráneo disminuye con el aumento progresivo del grosor del hueso y el desarrollo de las suturas,

por ello los lactantes tienen mayor probabilidad de presentar lesiones ante traumatismos mínimos¹⁰.

El daño cerebral secundario (DCS) es debido a la cascada de acontecimientos puestos en marcha tras el insulto traumático (Figura 3): citotoxicidad, estrés oxidativo, liberación de sustancias inflamatorias, muerte celular programada y disregulación del flujo sanguíneo en el tejido dañado y en la zona perilesional. Existen varios mecanismos involucrados en el DCS: la lesión axonal difusa (LAD), la isquemia y el edema cerebral. La LAD traduce la suma de un concepto clínico (coma prolongado) y un concepto anatomopatológico (alteración del citoesqueleto, con degeneración del axón y desconexión del mismo o axotomía). La isquemia y edema cerebral son consecuencia de una insuficiente perfusión encefálica. También juega un papel fundamental la hipoxia que aumenta la permeabilidad celular permitiendo la salida de componentes celulares al espacio extracelular, aumentando el volumen y la presión y generando mayor isquemia y edema¹¹⁻¹³.

1.5. FACTORES PRONÓSTICOS EN EL TCE EN NIÑOS

A lo largo de los últimos años se han realizado múltiples estudios para intentar determinar los factores clínicos predictores de LIC en el TCE infantil para aplicarlos en las guías clínicas^{14,15}. No existe ninguna combinación de síntomas clínicos capaces de identificar el 100% de los niños con LIC. En los menores de dos años entre un 20 y un 50% de los que presentan LIC están asintomáticos. Los factores que han demostrado relación con la presencia de LIC son el mecanismo patogénico, la pérdida de conciencia, la presencia de cefalohematoma y el deterioro neurológico^{1,14-16}.

1.6. CLASIFICACIÓN DE LOS TCE

| TABLA 2: CLASIFICACIÓN DEL TCE EN NIÑOS | |
|---|---|
| Leve | Glasgow 14-15 Impacto de baja energía No pérdida de conciencia No focalidad neurológica No hematoma y/o depresión en el cuero cabelludo (lactantes) |
| Moderado | Glasgow 9-13 |
| Grave | Glasgow < 9 Herida penetrante Sospecha de fractura de la base del cráneo |

Clasificación del TCE en los niños: en función de la Escala de Coma de Glasgow y otras consideraciones

La puntuación de la ECG evaluada una vez estabilizado el paciente, ha demostrado ser el factor que mejor se correlaciona con la presencia de LIC^{17,18}. Sin embargo en algunos trabajos no ha demostrado buena correlación con el pronóstico a largo plazo^{19,20}. A la hora de clasificar los TCE deberán tenerse en cuenta otros factores como la energía del impacto, la alteración de la conciencia y la focalidad neurológica (Tabla 2).

- **TCE Leve**

El paciente presenta puntuaciones en la ECG de 14 o 15. Además deben cumplir las siguientes características: mecanismo del impacto de baja energía, en la anamnesis no detectarse pérdida de conciencia y en la exploración no apreciar focalidad neurológica ni, en el caso de lactantes, la presencia de hematoma y/o depresión en el cuero cabelludo. El pronóstico es bueno existiendo un bajo riesgo de lesión intracraneal y una mortalidad menor al 1%¹⁷. En un trabajo multicéntrico que incluye 1070 pacientes con TCE leve, el 25% requirió ingreso, el 1% ingresó en unidades de Cuidados Intensivos y el 0,4% requirió intervención neuroquirúrgica¹

- **TCE Moderado**

Pacientes con puntuaciones superiores a 9 en la escala de Glasgow que no están incluidos en el apartado previo (puntuación entre 9 y 13 ó 12 para algunos autores). Este grupo presenta un riesgo mayor de lesiones y desarrollo de hipertensión intracraneal. La mortalidad en este grupo de pacientes es de aproximadamente un 3%¹⁶.

- **TCE Grave**

Aquellos pacientes con Glasgow \leq 8, presencia de herida penetrante o lesiones sospechosas de fractura de la base del cráneo, independientemente de la exploración neurológica, presentan un elevado riesgo de lesiones intracraneales. En algunas series la mortalidad dentro de este grupo es entre un 7 - 38% y la incidencia de secuelas es muy elevada^{16,21}.

1.7. TRATAMIENTO DEL TCE

- **Estabilización inicial**

En una primera intervención se seguirá el esquema ABCD de la reanimación cardiopulmonar evitando la hipoxemia y la hipotensión arterial que se asocian a mayor morbimortalidad^{16,22-26}.

-A: intubación y ventilación mecánica si existe puntuación ECG menor de 9, hipoxemia, hipoventilación o incapacidad de mantener la vía aérea permeable.

-B: es muy importante evitar la hipoxemia, se administrará oxígeno al 100% y se mantendrá saturación superior al 95%.

-C: es fundamental evitar la hipotensión que supondrá una disminución de la perfusión cerebral. Monitorización frecuente de la tensión arterial (TA) y la frecuencia cardiaca (Fc). Se utilizarán cristaloides isotónicos: suero salino fisiológico (SSF) o ringer evitando los sueros glucosados.

-D: una vez estabilizado respiratoria y hemodinámicamente se valorará la puntuación ECG (Tabla 1), las pupilas y los reflejos troncoencefálicos. Es importante que esta evaluación se realice de forma repetida y frecuente valorando la aparición de cambios²². La puntuación de la ECG es un buen indicador de la gravedad del TCE¹⁴. En un paciente que no se haya monitorizado la presión intracraneal (PIC) ni la saturación de oxígeno en el bulbo de la yugular (SjO₂) y presente signos indirectos de hipertensión intracraneal (HTIC) (alteraciones pupilares, descenso brusco de la puntuación del ECG o aparición de focalidad neurológica) puede hiperventilarse de forma transitoria (frecuencia respiratoria 5 respiraciones por minuto mayor que la normal para su edad) y, si presenta estabilidad hemodinámica podría administrarse Suero salino hipertónico (SSH) 3%-7% (6-7 ml/kg iv en 5-10 min)^{16,22} o manitol (0,25-0,5 g/kg/dosis iv en 20 min), aunque las últimas guías de

atención al trauma pediátrico desaconsejan su uso por tener numerosos efectos secundarios²².

- ***Actitud terapéutica***

TCE Leve:

Los niños que hayan sufrido un TCE leve realizarán observación domiciliaria tras la explicación y entrega a los padres de las recomendaciones necesarias²⁷.

TCE Moderado:

Este grupo de pacientes tienen un mayor riesgo de LIC por lo que deben ser ingresados en el centro hospitalario especializado. En los casos en los que se objetiven lesiones intracraneales en la TC inicial, ésta deberá repetirse transcurridas 24 o 48 horas o cuando se objetive un deterioro en la situación neurológica. No está indicada la monitorización de la presión intracraneal (PIC) de manera rutinaria, aunque en algunos casos en los que existan LIC puede ser considerada¹⁷.

TCE Grave:

En el TCE grave es muy importante la estabilización inicial y el transporte del paciente a un centro especializado en politraumatismos en edad pediátrica.

El traslado al hospital debe realizarse asegurando la estabilidad de la vía aérea mediante intubación y garantizando una adecuada oxigenación y ventilación. Si precisa se realizará expansión de volemia para evitar la hipotensión y optimizar la perfusión²³. Deberá evitarse tanto la hipo como la hipertermia. Es imprescindible la monitorización adecuada de la frecuencia cardiaca y respiratoria, la tensión arterial, la saturación arterial de oxígeno mediante pulsioximetría y la presión parcial de dióxido de carbono (CO₂) espirado mediante capnografía²⁴.

Las medidas diagnósticas y terapéuticas específicas en pacientes con TCE grave irán destinadas a evitar el DCS. El DCS está causado principalmente por hipotensión arterial, hipoxia, hipercapnia, anemia e hiperglucemia, por lo tanto el objetivo será prevenir y tratar todos estos factores.

- **Tratamiento específico de la hipertensión intracraneal:**

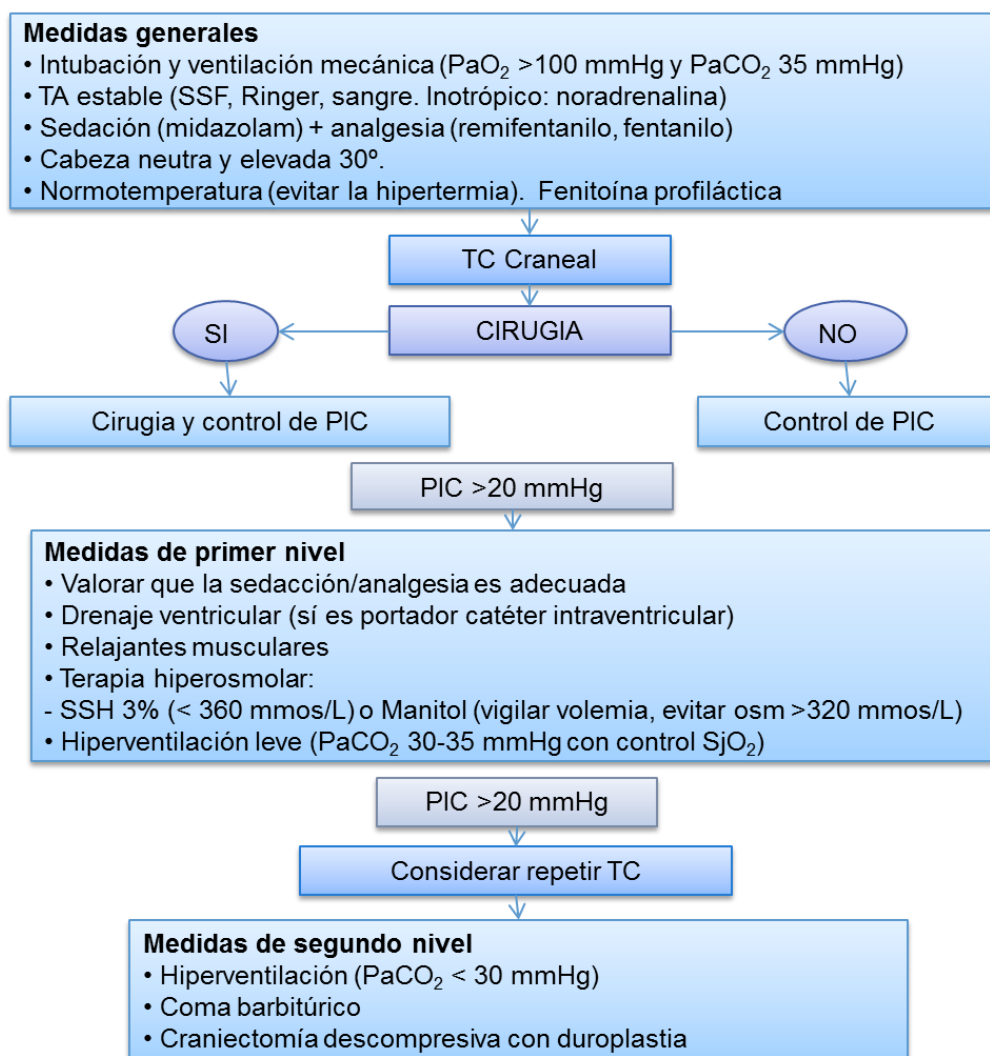


Figura 3: Tratamiento escalonado de la hipertensión intracraneal (Tomado de Urgencias y Tratamiento del Niño Grave: referencia 31). PaO_2 : presión arterial de oxígeno, PaCO_2 : presión arterial de dióxido de carbono, TC: tomografía computarizada, PIC: presión intracraneal, SSH: suero salino hipertónico. SjO_2 : Saturación de oxígeno en el bulbo de la yugular.

El tratamiento de los pacientes con HTIC (Figura 3) (Tabla 3) se basa en mantener una adecuada Presión de perfusión cerebral (PPC)^{32,33,39-41}. La PPC está determinada por la presión arterial media (PAM) y por la presión intracraneal (PIC) según la ecuación: $\text{PPC} = \text{PAM} - \text{PIC}$. Varios estudios demuestran que la mortalidad aumenta con el aumento de la PIC y el descenso de la PPC^{30,34}. Por ello en los pacientes que han sufrido un TCE es necesario mantener una PPC adecuada con el fin de evitar la aparición DCS.

| Tabla 3: MEDICACION EN EL TCE GRAVE | |
|---|--|
| Sedantes | Midazolam: bolo inicial 0,1-0,2 mg/kg/iv continuando perfusión 0,1-0,4 mg/kg/h/iv. |
| Analgésicos | Remifentanilo: 6-9 µg/kg/h/iv (0,1-0,15 µg/kg/min). |
| | Fentanilo: bolo inicial 1-2 µg/kg/iv, continuando perfusión 1-2 µg/kg/h/iv. |
| | Cloruro mórfico: bolo inicial 0,1 mg/kg/iv, continuando 10-30 µg/kg/h/iv. |
| Relajantes musculares | Rocuronio: bolo inicial 0,6-1,2 mg/kg/iv, continuando 0,3-0,6 mg/kg/h/iv. |
| | Vecuronio: bolo inicial 0,1 mg/kg/iv, continuando 0,05-0,1 mg/kg/h/iv. |
| Terapia hiperosmolar | Suero salino hipertónico 3-7%: 3-5 mL/kg/dosis en 10 min. Se puede repetir c/2-6 h No administrar si Osm suero > 360 mmOs/L. Perfusión continua: 0,1-1 mL/kg/h/iv. |
| | Manitol 20%: 0,25-1 g/kg/iv en 10 min. Se puede repetir c/2- 8 h. No administrar si Osm suero > 320 mmOs/L ¹ . |
| Coma barbitúrico ² | Pentobarbital (Nembutal®): bolo inicial 10 mg/kg en 30 min, continuando con 3 dosis de 5 mg/kg/h, seguido de infusión continua a 1-2 mg/kg/h. |
| | Tiopental (Pentotal®): bolo inicial 5-10 mg/kg y mantenimiento 3-5 mg/kg/h. |
| Anticonvulsivo profiláctico | Fenitoína: bolo inicial 20 mg/kg en 30-60 min. Mantenimiento 5 mg/kg/día c/12 h. |
| Fármacos utilizados en el tratamiento del TCE en niños. ¹ Usar con precaución en niños por sus efectos adversos: diuresis osmótica y elevación paradógica de la PIC por acumulación en áreas cerebrales. ² En España solo está comercializado el tiopental. Ninguno de los dos ha demostrado superioridad respecto al otro. | |

2. PRONÓSTICO Y SECUELAS DEL DAÑO CEREBRAL TRAUMÁTICO EN NIÑOS

2.1. PECULIARIDADES ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LOS NIÑOS QUE CONDICIONAN EL PRONÓSTICO TRAS EL TRAUMA CRANEAL

Los niños pequeños tienen una respuesta diferente al DCT por las siguientes razones⁴²:

- ***Peculiaridades anatómicas***

- Los niños pequeños tienen una cabeza desproporcionadamente grande y pesada con músculos del cuello débiles lo que aumenta la susceptibilidad a las fuerzas de rotación y cizallamiento, con el aumento consecuente del riesgo de lesiones difusas.
- Sufren más daño generalizado. Esto es debido, posiblemente, a que el cráneo más fino y flexible de los neonatos y lactantes es capaz de absorber fuerzas traumáticas reduciendo el daño focal⁴³.
- La zona frontal es inmadura con grandes áreas de desmielinización. Este área tiene mayor vulnerabilidad con mayor aparición de lesiones focales^{44,45}.

- ***Peculiaridades funcionales***

- El cerebro de los niños pequeños está en pleno desarrollo de las capacidades cognitivas básicas. Una lesión traumática ocurrida en periodos tempranos del desarrollo afectará a la adquisición de habilidades cognitivas básicas como el procesamiento de la información, la memoria, la atención y la capacidad ejecutiva⁴⁶. Sin ellas el niño tendrá problemas para adquirir nuevos conocimientos y adquirir habilidades secundaria, por lo que puede sufrir retrasos escolares y alteraciones sociales.
- En los niños existe una mayor maleabilidad de los elementos anatómicos y fisiológicos del cerebro. Cuando existe un daño focal, áreas cerebrales sanas pueden asumir las funciones del tejido dañado. No está claro que este principio pueda aplicarse cuando existe daño cerebral generalizado con poco tejido sano que pueda realizar reorganización funcional⁴⁷.

2.2. SECUELAS DEL DAÑO CEREBRAL TRAUMÁTICO EN NIÑOS

- **Alteraciones de conciencia**

Los pacientes que sufren TCE grave presentan, en la fase aguda, un deterioro del nivel de conciencia o coma. Hay pacientes que no recuperan el estado de conciencia quedando en estado vegetativo persistente (EVP)⁴⁸. Distintas series indican que de un 3% a un 14% de pacientes con trauma craneal grave tendrán una alteración de conciencia a largo plazo⁴⁸. Parece que las alteraciones del estado de conciencia de causa traumática en niños presentan mejor pronóstico que los de otra etiología, de forma que hasta el 62% de los niños en EVP traumático recuperan la conciencia al año⁴⁸.

- **Secuelas orgánicas**

Las alteraciones motoras son frecuentes en los niños que sufren TCE, apareciendo hasta en el 90% de los TCE graves en la fase aguda⁴⁹. Son frecuentes distintos grados de paresias de miembros siendo la secuela motora más frecuente la hemiplejía espástica, casi siempre con mayor compromiso de la extremidad superior. Estas secuelas suelen mejorar con rehabilitación, aunque a los tres años hasta el 35% de los niños tienen afectación motora de este tipo⁴⁹. Un 30% de los pacientes tendrán alteración de algún par craneal a los 3 años⁴⁹. La disfagia es una secuela muy incapacitante que se observa en un 12,3 - 78% de los menores de 18 años con TCE grave y LIC⁵⁰⁻⁵¹. Otras alteraciones como las parestesias y la incontinencia pueden persistir en el tiempo, en los pacientes que las presentan. Las alteraciones del equilibrio por alteración del aparato vestibular persisten hasta en un 50% de los pacientes a los tres años⁴⁹.

- **Secuelas cognitivas**

Desde hace tiempo se conoce que el DCT afecta a diferentes áreas del procesamiento y la integración cognitiva:

- Alteración de la velocidad de procesamiento y la capacidad de atención. Las alteraciones de la sustancia blanca que afectan a la sustancia reticular ascendente y al lóbulo frontal llevan a una limitación en la capacidad de atención y en la velocidad de procesar los datos⁵².
- Aprendizaje y memoria. Generalmente la alteración de la memoria consiste en problemas de adquisición y recuerdo de nueva información. En niños y adolescentes, a diferencia de lo encontrado en adultos, la memoria procedimental parece estar también afectada⁵³.

- Funciones frontales. Tras un TCE los niños presentan muy frecuentemente dificultad para analizar, planificar y solucionar problemas o tareas complejas, mientras que pueden seguir realizando correctamente actividades estructuradas⁵⁴.
- Lenguaje y comunicación. La disartria es la alteración del lenguaje más frecuente en los pacientes tras un TCE (45% al alta hospitalaria, 30% a los 2 años de un TCE grave)⁴⁹. La afasia es poco frecuente. En ocasiones se dan alteraciones del tono y la prosodia.

- **Secuelas psicológicas**

Hasta un 60% de los niños que sufren DCT tendrán trastornos psiquiátricos asociados y problemas de conducta⁵⁵⁻⁵⁷. Estos trastornos tienen su base anatómica en alteraciones del lóbulo frontal, temporal y estructuras subyacentes.

- **Escalas para la medición de las secuelas del DCT**

La escala más utilizada es la Glasgow Outcome Scale (GOS)⁵⁸ (Tabla 4)

| Tabla 4: Glasgow Outcome Scale⁵⁸ | |
|--|--|
| Valor | Descripción |
| 1 | MUERTE |
| 2 | ESTADO VEGETATIVO PERSISTENTE Incapaz de actuar recíprocamente con el ambiente |
| 3 | INCAPACIDAD GRAVE Capaz de seguir órdenes / incapaz de vivir de forma independiente |
| 4 | INCAPACIDAD MODERADA Capaz de vivir independiente; incapaz de volver a su trabajo o estudios. |
| 5 | RECUPERACIÓN BUENA Capaz de volver a trabajar o estudiar. |

La escala Kings Outcome Scale for Childhood Head Injury (KOSCHI) se divide en los mismos 5 niveles que la GOS pero emplea criterios de dependencia/independencia aplicables específicamente a niños⁵⁹. El índice de Bartel también es una buena herramienta para medir el estado funcional de los pacientes. Es una escala con 10 ítems que evalúa diferentes aspectos de la vía diaria dando entre 0 y 20 puntos por ítem. La

puntuación total es de 0 a 100, siendo las puntuaciones más bajas las que indican mayor discapacidad⁶⁰.

Para medir alteraciones neuropsicológicas se puede utilizar The Hospital Anxiety and Depression Scale. Esta escala ha sido validada en niños con DCT⁶¹.

2.3. RELACIÓN ENTRE LA EDAD EN EL MOMENTO DEL TRAUMA Y EL PRONÓSTICO DEL DCT ¿FRAGILIDAD/PLASTICIDAD?

La idea de la plasticidad neuronal defiende que el cerebro, durante los primeros años, tiene mayor capacidad para adaptarse y remodelarse tras sufrir un DCT. Áreas cerebrales sanas serían capaces de suplir las funciones que realizaban las áreas dañadas. Otros estudios hablan, sin embargo, de la mayor vulnerabilidad del cerebro de los niños pequeños. En ellos, ante el trauma, se producirá una disrupción en una red neuronal que se está desarrollando rápidamente sobre todo en áreas frontales y subcorticales. La reestructuración de esta red neuronal en desarrollo podría darse de una forma anómala y desorganizada⁶².

Estudios recientes han intentado resolver la pregunta de si en los niños prevalece la mayor capacidad de regeneración o la mayor vulnerabilidad con resultados muy contradictorios⁶³⁻⁶⁹.

3. NUEVAS OPCIONES TERAPÉUTICAS EN EL TCE EN NIÑOS. NEUROPROTECCIÓN.

Como se ha comentado previamente, todos los esfuerzos terapéuticos clásicos tras un TCE están encaminados a limitar los acontecimientos que desencadenan el DCS (la hipoxia, la isquemia y la hipoperfusión principalmente). La neuroprotección se refiere al empleo de cualquier modalidad terapéutica que previene, retarda o “revierte” la muerte celular resultado de una lesión neuronal⁷¹.

Tras un TCE en el organismo se producen varios acontecimientos moleculares: la inflamación, el estrés oxidativo, la apoptosis y la citotoxicidad, cuya consecuencia es la muerte neuronal y que son la base del DCS. Al mismo tiempo existen fenómenos de neuroprotección del propio organismo como son la producción de proteínas de choque térmico, de citokinas antiinflamatorias, de antioxidantes endógenos, o bien se activan sistemas inhibidores como el GABAérgico y el canabinérgico (Figura 4)⁷².

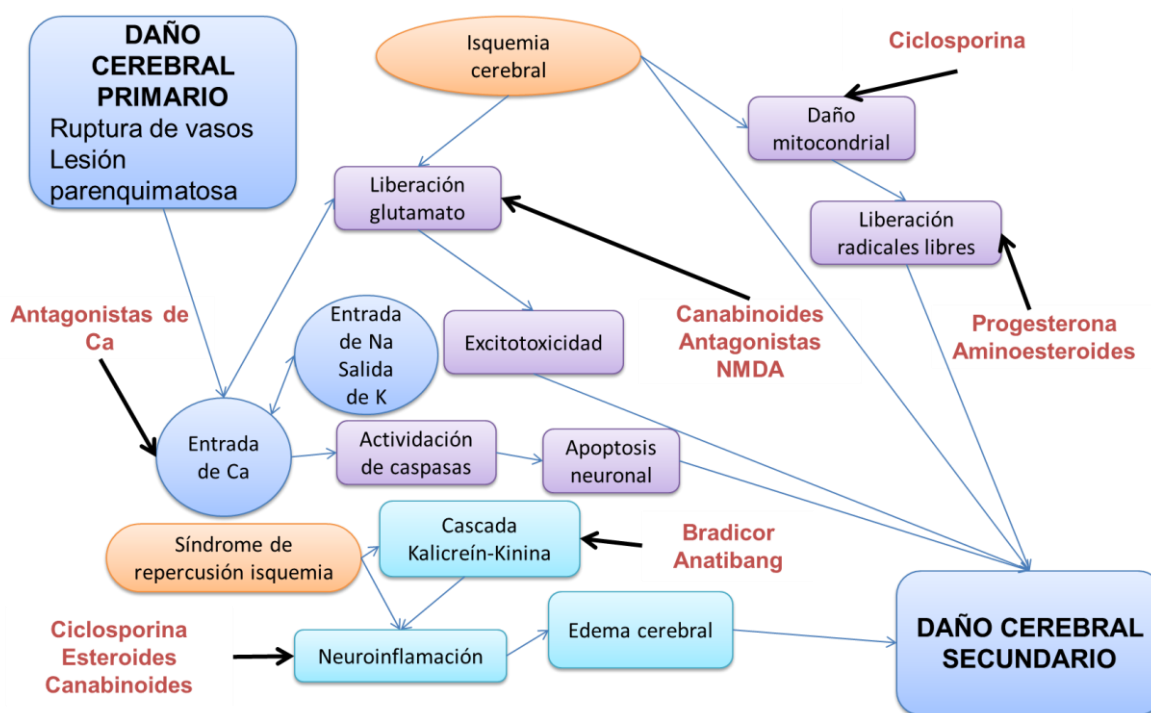


Figura 4 : Mecanismos moleculares del daño cerebral y puntos de acción de distintas moléculas terapéuticas (Tomado de referencia 72). En morado se observan los eventos consecuentes de la isquemia cerebral, en azul claro los que son consecuencia de la reperusión. En rojo se detallan las distintas moléculas terapéuticas (ver texto) y su punto de actuación.

Los fármacos neuroprotectores actúan limitando los mecanismos de muerte neuronal o potenciando los mecanismos que la previenen. Existe un último grupo de fármacos cuyo mecanismo de actuación sería el de regenerar tejido neuronal muerto. A continuación se realiza una breve descripción de estos fármacos en función de su mecanismo de actuación.

3.1. Fármacos que bloquean los sistemas de muerte cerebral

En la actualidad se están probando numerosos fármacos, de forma experimental, cuyas dianas son distintas moléculas implicadas en el proceso de daño cerebral traumático⁷². (Tabla 5)

| Tabla 5: FÁRMACOS EXPERIMENTALES EN EL TCE Y DIANAS MOLECULARES | | | | | |
|---|-----------------------------|--------------------------|--------------------------------|----------|----------------------------|
| MECANISMO | MOLÉCULA | FÁRMACO | MECANISMO | ENSAYO | RESULTADOS |
| INFLAMACIÓN | IL1 β | NNZ-256673 | Análogo tripéptido protector | FII | Sin resultados |
| | COX | Nimesulide ⁷⁴ | Inhibe la COX-2 | Ratones | Mejoría cognitiva y motora |
| APOPTOSIS | Caspasas | Inhibidor caspasa 3 | Inhibe ruta final de apoptosis | Ratones | Mejoría motora |
| | Canales de Ca ⁺⁺ | N1M811 | Análogo ciclosporina | FII | No eficacia |
| BHE | Bradicinina | Bradikor | Antagonista bradicinina | FII | No eficacia |
| EXCITOTOXICIDAD NEURONAL | Glutamato | Selfotel ⁷⁵ | AntiNMDA | FII | No eficacia |
| OXIDACIÓN | Radicales libres | POG-SOD ⁷⁶ | Antioxidantes | F III | No eficacia |
| | | PC-SOD ⁷⁶ | Antioxidante | Ratas | Menor pérdida neuronal |
| VASOESPASMO | Ca ⁺⁺ | Nimodipino | Revertir vasoespaso | FIII HSA | No eficacia |

Fármacos en fase experimental en el TCE⁷². Tipos de ensayos clínicos: FI: ensayo de toxicidad, FII: dosis y eficacia, FIII: ensayos clínicos. Abreviaturas: Interleukina (IL), COX (Ciclooxigenasa), Barrera hematoencefálica (BHE), Polietilenglicol conjugado Superóxidodismutasa (POG-SOD), Superóxidodismutasa lecitinizada (PC-SOD), hemorragia subaracnoidea (HSA), Antagonista receptor glutamatérgico Nmetil-D-aspartato (antiNMDA).

3.2. Fármacos que potencian los mecanismos neuroprotectores endógenos

- **Dexanabinol (HU-211):** es un agonista de los receptores cannabinoides 1 y 2. En modelos experimentales reduce el edema cerebral y la muerte neuronal y tienen efectos antiinflamatorios⁷⁷. Un estudio Fase IIa no encontró eficacia en humanos a los 6 meses⁷⁸.
- **Progesterona:** las dosis altas de progesterona administradas durante las primeras horas, limita el daño cerebral, reduce la pérdida de tejido neuronal y mejora la

recuperación funcional en animales⁷⁹. 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. Un metanálisis publicado en 2012 concluyó que aunque parece que la progesterona puede ser eficaz en el tratamiento del TCE, son necesarios más estudios⁸⁰.

- **Vitamina D:** Un ensayo prospectivo que compara en TCE grave, el tratamiento de progesterona combinada con vitamina D con progesterona sola y con placebo encuentra mejor GOS al año en el grupo que recibe progesterona más vitamina D⁸¹.

3.3. Fármacos con capacidad para regenerar neuronas.

- **Eritropoyetina (EPO):** la EPO es una citokina producida en el cerebro humano en respuesta a múltiples estímulos dañinos. La unión de la EPO a su receptor promueve la migración de progenitores neuronales en células de ratones, incrementa el porcentaje de nuevas células, aumenta la producción del factor de crecimiento neuronal derivado del cerebro y mejorar el aprendizaje espacial. En humanos, se ha concluido un estudio en fase I, que no ha podido demostrar efectividad. Existen otros 3 estudios pendientes de finalizar para aclarar su efecto⁸².
- **Estatinas:** Las estatinas además de inhibir la síntesis de colesterol, tienen un efecto protector. Mejoran la función endotelial, aumentan la disponibilidad de óxido nítrico (NO), son antioxidantes, inhiben la respuesta inflamatoria, tienen propiedad inmunomoduladora, disminuyen la activación plaquetaria, regulan la angiogénesis, neurogénesis y la sinaptogénesis. En animales de experimentación, promueve la síntesis de factores de crecimiento, incrementa la proliferación celular y la diferenciación neuronal, e incrementa la recuperación del aprendizaje espacial. En humanos, se han realizado dos estudios clínicos con rosuvastatina con resultados prometedores⁸³. En el primero no se encontró diferencia en el marcador incapacidad a los tres meses, aunque sí mejoraba la amnesia. El segundo demostró una mejoría en algunos marcadores de inflamación (TNF α) y encontró una mejora en las puntuaciones de invalidez⁸⁴.
- **Factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF-1):** Los factores de crecimiento tienen la capacidad de controlar la proliferación, el crecimiento, la migración, el desarrollo, la función y la supervivencia celular. La administración de IGF-1 promueve la recuperación motora y cognitiva en modelos animales. Existe un estudio en fase II con un análogo de la IGF-1 el NNZ-2566⁸⁵.

- Hormona de crecimiento GH: Un estudio en humanos con daño cerebral traumático establecido, concluye que el tratamiento con GH combinado con rehabilitación consigue mayor mejoría funcional, sobre todo a nivel cognitivo, que la terapia rehabilitadora convencional⁸⁶.

4. TERAPIA CELULAR

4.1. CÉLULAS MADRE

Las células madre, en inglés “stem cells” (SC), son células que se encuentran en todos los organismos multicelulares⁸⁷ y que son capaces de realizar división asimétrica⁸⁸. La división asimétrica consiste en producir, por mitosis, dos células una de las cuales tiene las mismas propiedades que la célula original (autorrenovación) y otra que adquiere la capacidad de poder diferenciarse a diferentes tipos celulares si las condiciones ambientales son adecuadas (diferenciación). Se añaden además dos características funcionales que son la capacidad de implantarse de forma persistente en tejidos sanos y en tejidos dañados y la capacidad de realizar repoblación funcional (Figura 5).

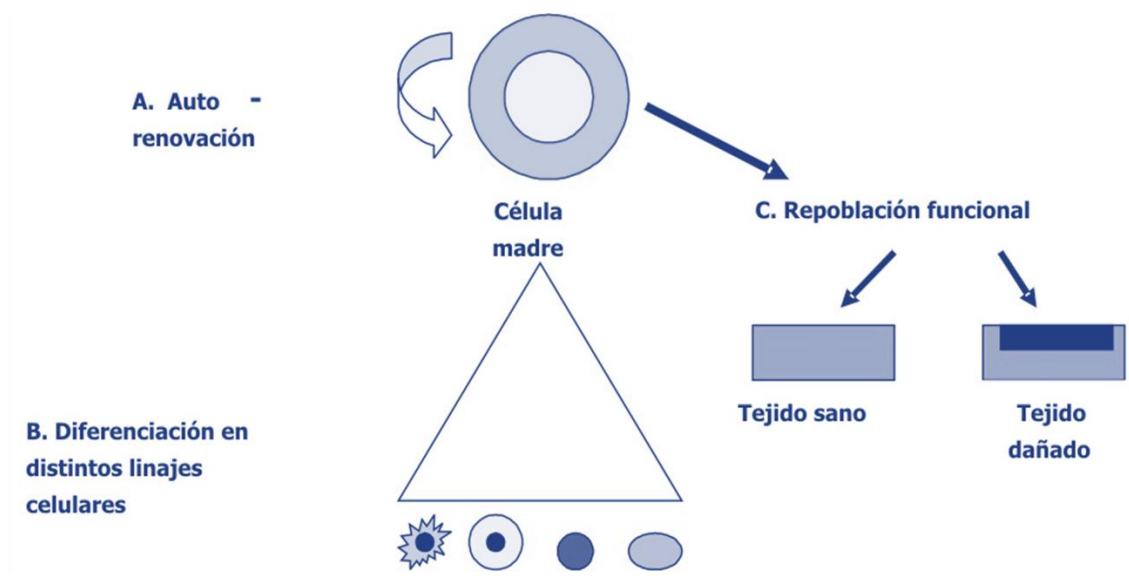


Figura 5: Características de las células madre: A: capacidad para producir una célula con sus mismas características. B: diferenciación: capacidad para producir una célula capaz de diferenciarse en distintas estirpes celulares. Características funcionales: capacidad de implantarse de forma persistente y realizar repoblación funcional tanto en tejido sano como en tejido dañado.

La mayoría de los tejidos de un organismo adulto poseen una población residente de células madre que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce algún daño tisular⁸⁹.

4.2. TIPOS DE CÉLULAS MADRE

Teniendo en cuenta su potencia, las células madre pueden dividirse en cuatro tipos⁸⁷:

- **4.2.1. Células totipotentes**

Las células madre totipotentes pueden crecer y formar un organismo completo, tanto los componentes embrionarios (las tres capas embrionarias, el linaje germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino), como los extraembrionarios (la placenta).

- **4.2.2. Células pluripotentes**

Las células madre pluripotentes no pueden formar un organismo completo, pero sí cualquier otro tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo). Dentro de este tipo celular encontramos:

- Células madre embrionarias, en inglés "Embryonic stem cells" (ESC) que se pueden aislar de la masa celular interna del blastocisto al 5º día de la fecundación (Figura 6).

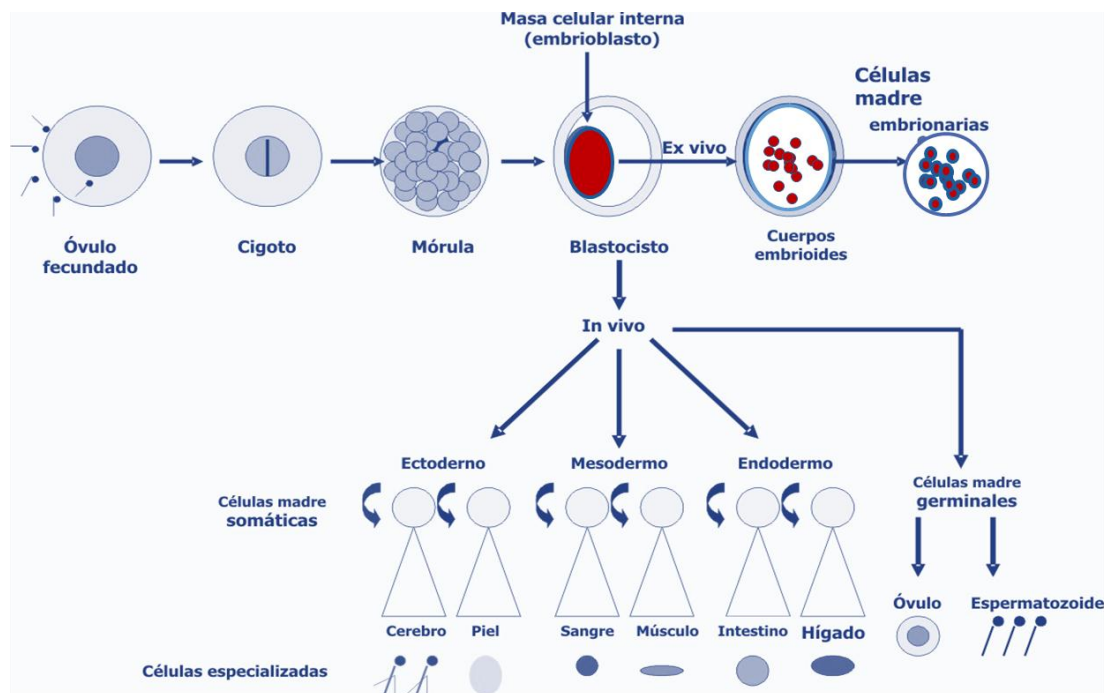


Figura 6: Obtención de Células Madre Embrionarias (ESC): El blastocisto está formado por una capa externa denominada trofoblasto, formada por unas 70 células, y una masa celular interna constituida por unas 30 células que son las células madre embrionarias que tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares que aparecen en el organismo adulto, dando lugar a los tejidos y órganos.

Las células de la masa interna no mantienen indefinidamente in vivo su capacidad de generación de cualquier tipo celular, sin embargo, cuando se extraen de su ambiente

embrionario natural y se cultivan in vitro, sí son capaces de proliferar sin sufrir alteraciones genéticas durante al menos 140 pases^{90,91}. Aplicadas in vivo generan teratomas, lo que constituye su principal limitación⁹². La aplicación terapéutica de estos tipos de células conlleva grandes conflictos éticos ya que requiere utilizar embriones vivos⁹² (Tabla 6).

- **Células madre germinales (GMC)** son células madre embrionarias pluripotentes que se derivan de los esbozos gonadales del embrión. Estos esbozos gonadales se encuentran en una zona específica del embrión denominada cresta gonadal, que dará lugar a los óvulos y espermatozoides. Tienen una capacidad de diferenciación similar a las de las células madre embrionarias, pero su aislamiento resulta más difícil. Las células madre germinales se mantienen viables solo durante 70 a 80 pases, pero tienen la ventaja que no forman teratomas cuando se inyectan en ratones, por lo que pudieran representar una fuente más segura de material trasplantable.
- **Células con pluripotencialidad inducida (iPSC)**. Hoy se pueden manipular células humanas de adulto y generar otras que poseen el mismo potencial de crecimiento y diferenciación de las ESC⁹³. Las ventajas técnicas de las iPSC son muchas: no inducen rechazo inmunológico, no requieren la utilización de óvulos humanos y son simples de obtener desde el punto de vista técnico.

- **4.2.3. Células multipotentes.**

Las células madre multipotentes son aquellas que sólo pueden generar células de su misma estirpe o linaje embrionario. Recientemente, se ha descubierto que estas células podrían, bajo ciertas condiciones generar células de distintos linajes, fenómeno que se conoce como **plasticidad**. El cambio del programa de diferenciación podría estar relacionado con variaciones en las señales internas y externas que recibirían las células en las interacciones que tendrían con todos los elementos constitutivos del nuevo microambiente, en que se situarían en el organismo^{95,96}. Entre esos elementos podrían considerarse: proteínas promotoras e inhibidoras del ciclo celular, factores secretados por las células vecinas e interacciones intercelulares y con la matriz extracelular del tejido mediante proteínas de membrana. Se han propuesto 4 hipótesis para la explicación del fenómeno de plasticidad⁹⁷ (Figura 7).

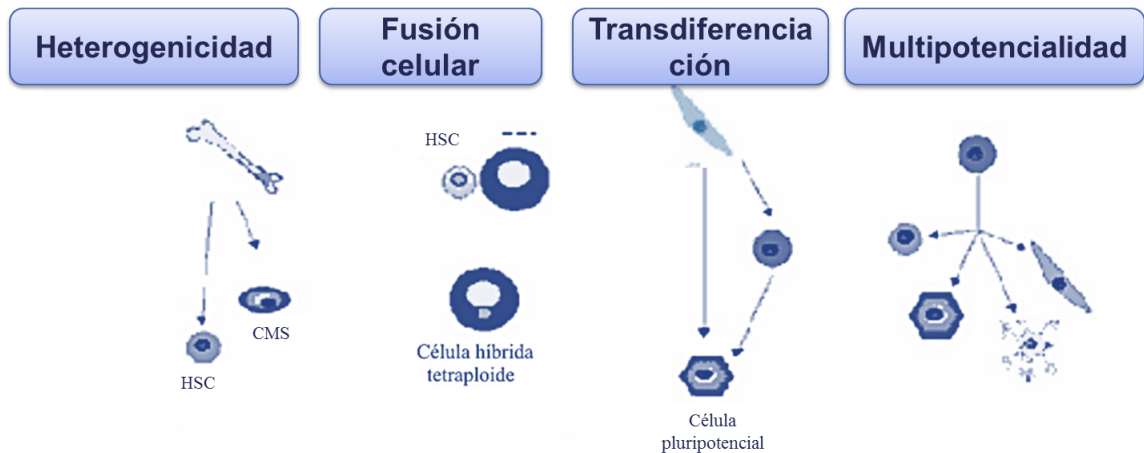


Figura 7: Fenómeno de platicidad. Hipótesis:

Heterogenicidad de las células madre adultas (CMA) presentes en una población celular: diversos estudios apoyan la coexistencia de tipos diferentes de células madre en determinados tejidos, cada una con distintas características y potencialidades⁹⁸.

Fusión de las células trasplantadas con las células propias de un tejido: este mecanismo daría lugar a células híbridas con características de ambas células fusionadas, pero con la desventaja de poseer una menor capacidad proliferativa, pues generalmente debido a la fusión adquieren doble dotación cromosómica.

Persistencia de células madre adultas con capacidad multi o pluripotencial: se ha sugerido la posibilidad de que en el organismo adulto persistan células madre con capacidad multi o pluripotencial, que en dependencia del medio en que se sitúen, pueden diferenciarse hacia células de diferentes linajes⁹⁸.

Existencia de un proceso de dediferenciación y rediferenciación celular: se ha planteado que una célula madre programada para su diferenciación en células especializadas específicas puede transdiferenciarse en determinadas situaciones ambientales. Un ejemplo de este proceso es la dediferenciación que se ha observado en células epidérmicas que se han transformado en células inmaduras con características de células madre⁹⁹.

Entre las células multipotentes se incluyen:

- La célula madre mesenquimal o estromal “mesenchymal stem cells” (MSC), al tener naturaleza mesodérmica, dará origen a células de esa estirpe como miocitos, adipocitos u osteocitos, entre otras.
- La células madre hematopoyética “hematopoyetic stem cells” (HSC) que puede diferenciarse en los múltiples tipos celulares de la sangre. Habitualmente se ha empleado el marcador de superficie CD34 para la identificación de estas células, pero estudios más amplios han mostrado que su inmunofenotipo es más complejo, ya que puede expresar un espectro de marcadores de acuerdo con su estado de diferenciación¹⁰⁰. Población lateral “side population” (SP). Se ha señalado que esta población celular, que se encuentra en muy baja proporción en sangre periférica, médula ósea y en sangre del cordón umbilical tiene características de célula madre muy primitiva¹⁰¹. Las SP pueden dar lugar a diferentes tipos de células especializadas e integrarse en distintos tejidos in vivo que incluyen tejidos no hematopoyéticos¹⁰².
- Células progenitoras multipotenciales adultas (MAPC): son células que, en determinadas condiciones de cultivo, pueden dar lugar a células de cualquiera de las

3 capas embrionarias¹⁰³. Se obtienen mediante cultivos a largo plazo de células estromales de la médula ósea mantenidas en condiciones específicas. Pueden obtenerse de médula ósea autóloga, con lo que se evita la reacción de rechazo. No se ha observado en estas el potencial teratogénico que tienen las embrionarias¹⁰³. Se ha señalado que las MAPC son capaces de proliferar in vitro con más de 120 divisiones celulares sin un aparente envejecimiento, y también que inducen rechazo del injerto. Las mayores limitantes que se plantean para el empleo son las condiciones tan especializadas que precisan para su cultivo¹⁰⁴.

- **4.2.4. Células unipotentes o progenitoras**

Las células madre unipotentes, también llamadas células progenitoras o precursoras son células madre que tienen la capacidad de diferenciarse sólo en un tipo celular. Se han descubierto hasta 20 tipos de células progenitoras en los distintos tejidos humanos, algunos ejemplos son:

- Las células madre musculares, también denominadas células satélite que sólo pueden diferenciarse en células musculares.
- Las células precursoras adultas neurales (NPCa): en cultivos libres de suero con factores de crecimiento epidérmico y de fibroblasto proliferan y forman neuroesferas (esferas multicelulares) las cuales se diferencian espontáneamente en células hijas (oligodendrocitos, neuronas y astrocitos) cuando se cultivan sin factores de crecimiento. Las NPCa humanas, al carecer de telomerasa, poseen una capacidad limitada de proliferación in vitro.
- Las células madres epiteliales

Además de por el criterio de potencialidad, las células madre también pueden clasificarse en cuanto a si se encuentran en el embrión: células madre embrionarias (ESC) o en tejidos y órganos adultos: células madre pluripotenciales adultas (CMA). En la tabla 6 se describen las diferencias entre ambos tipos celulares.

Tabla 6: DIFERENCIAS ENTRE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS Y ADULTAS

| | Células madre embrionarias | Células madre adultas |
|------------------------------------|---|---|
| Origen | Blastocito 5º día postimplantación. | Tejidos adultos. |
| Tipos celulares | ESC, GMC. | MSC, HSC, SP, NPCa, MAPC células madre epiteliales, IPSC, células madre musculares. |
| Potencialidad | Pluripotenciales. | Multipotenciales* o unipotenciales. |
| Cultivo | Fáciles de obtener y expandir manteniendo sus características genéticas intactas. | Más difíciles de obtener y cultivar, número de pases limitados. |
| Aplicabilidad | Limitaciones éticas y religiosas a sus aplicaciones clínicas ⁸ . | No existen conflictos éticos ni religiosos para sus aplicaciones clínicas. |
| Ensayos clínicos en humanos | Daño macular (tres ensayos ^{105,106} (en marcha). Un ensayo en daño medular ¹⁰⁷ (finalizado). | Un ensayo en degeneración macular con IPSC ¹⁰⁸ , un ensayo con NPCa en ELA ¹⁰⁹ , 141 ensayos con MSC y más de 3000 ensayos con HSC. |

Diferencias entre las células embrionarias y adultas: *Cada vez existe más evidencia de que algunas de estas células pueden ser pluripotentes⁹⁷⁻⁹⁹ & La principal limitación ética al uso de ESC sería que para obtenerlas se precisa destruir embriones. En la actualidad han aparecido las llamadas "ESC éticas" que serían las obtenidas de un solo blastómero (el embrión sobreviviría), se ha puesto en duda la eficacia de esta técnica y la viabilidad de los embriones de los que se toma la biopsia¹¹⁰. Otra solución es la partenogénesis, en la que el óvulo es estimulado por métodos físicos y químicos para obtener blastocitos sin fines reproductivos¹¹¹.

4.3. NEUROGÉNESIS ENDÓGENA EN EL TRAUMA CRANEAL.

Cada vez existen más pruebas de que el cerebro es capaz de inducir su regeneración mediante la renovación del tejido de soporte y del tejido neuronal. La terapia celular potenciaría esta regeneración y aparece como un nuevo recurso terapéutico capaz de recuperar el tejido cerebral dañado por mecanismo primario o secundario.

Existen dos zonas principales donde reside la mayor capacidad neurogénica en el cerebro humano: la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y el hipocampo (zona subgranular del giro dentado)¹¹².

En ambas localizaciones existen nichos funcionales altamente especializados en los que se han encontrado CNPa pluripotenciales y progenitores específicos de células de una estirpe celular concreta (como neuronas, astrogliá u oligodendroglía).

Los modelos animales murinos usados para investigar la neurogénesis tras un TCE han mostrado que el número de NPCa en estos nichos funcionales aumenta entre 2 y 4 veces tras un TCE. Las NPCa 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 difuso¹¹³.

Se ha observado que los mecanismos de proliferación y diferenciación neuronal endógena son más intensos en modelos animales jóvenes que en adultos. Una posible estrategia terapéutica es potenciar esta respuesta endógena para mejorar los resultados funcionales en los pacientes que sufren un TCE.

5. TERAPIA CELULAR CON MSC

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MSC

El tejido mesenquimal o mesénquima es el tejido conectivo que procede del mesodermo y tiene una gran variedad de tipos celulares. A partir de este tejido, por diferenciación celular y regulación diferencial, se originan patrones de desarrollo diferentes que provocan la aparición de tejidos más especializados. Las MSC son células pluripotenciales que pueden generar cualquiera de los tejidos de estirpe mesodérmica (Figura 8).

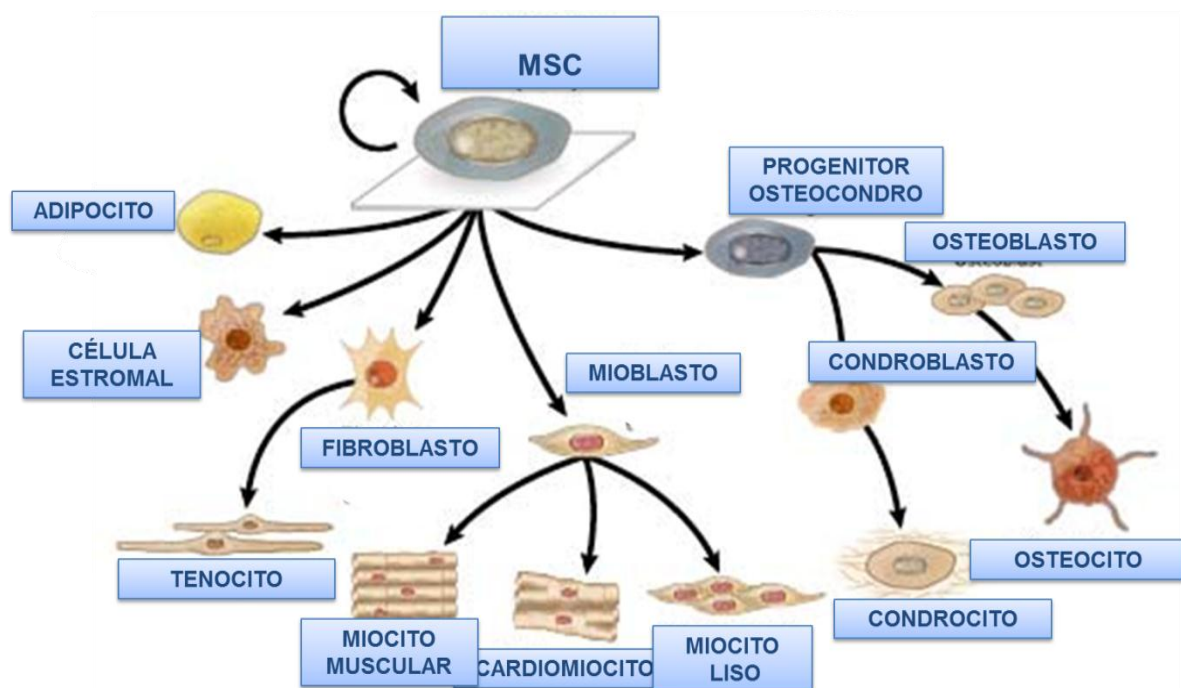


Figura 8: Diferenciación de las MSC. Las MSC pluripotenciales pueden dar lugar a todos los tejidos de estirpe mesodérmica.

Existen diferentes marcadores de superficie que pueden ser utilizados para caracterizar las MSC. Hay que tener en cuenta que, como población en sí, las MSC no suelen expresar todos los marcadores propuestos y todavía no se sabe con seguridad cuáles deben expresarse necesariamente para poder clasificar a las células de esa población como células madre mesenquimales. Por lo anteriormente mencionado, “The Mesenchymal and Tissue Stem Cells Committee of the International Society for Cellular Therapy” propuso las siguientes normas para definir las MSC¹²

1. Las MSC deben adherirse al plástico cuando se mantienen en condiciones normales de cultivo.
2. Fenotipo:

| Positivas (>95% de las MSC) | Negativas (<2% de las MSC) |
|-----------------------------|----------------------------|
| -CD105 | -CD45 |
| -CD90 | -CD34 |
| -CD73 | -CD14 |
| | -CD11b |
| | -CD190 |
| | -CD79a |

3. Las células deben ser capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo condiciones estándares de diferenciación in vitro

5.2. TIPOS DE MSC EN FUNCIÓN DE SU ORIGEN

Las primeras MSC que se cultivaron provenían del tejido mesenquimal de la médula ósea (MSC-mo). Posteriormente han podido aislarse de múltiples tejidos incluyendo tejido adiposo (MSC-a), sangre de cordón umbilical humano (MSC-cu) y sangre periférica (MSC-pb) (Tabla 7).

| Tabla 7: DIFERENCIAS DE LAS MSC EN FUNCIÓN DE SU ORIGEN | | | | |
|---|--------------|-------------|-------------|------------|
| | | MSC-mo | MSC-cu | MSC-a |
| Éxito de aislamiento | | 100% | 30-40% | 100% |
| Formación de monocapa adherente | | 4-5 días | 2-4 semanas | 4-5 días |
| Capacidad de diferenciación osteogénica | | 74,4% | 100% | 78,8% |
| Capacidad de diferenciación adipogénica | | 100% | 0 | 94% |
| Capacidad de diferenciación condrogénica | | 100% | 100% | 100% |
| Expresión de antígenos | CD44 | 97.5 ± 5.1 | 99.7 ± 0.5 | 99.8 ± 0.2 |
| | CD73 | 90.0 ± 20.0 | 99.3 ± 1.3 | 99.6 ± 0.5 |
| | CD90 | 99.1 ± 2.5 | 97.8 ± 7.1 | 99.6 ± 0.2 |
| | CD105 | 88.1 ± 7.4 | 72.4 ± 20.0 | 90.4 ± 5.9 |
| | HLA I | 95.2 ± 6.0 | 94.3 ± 6.8 | 98.8 ± 2.8 |

Características de las MSC-mo, MSC-cu y MSC-a en cuanto a sus características de cultivo, capacidad de diferenciación y fenotipaje¹²⁹.

Ejemplos de tejidos donde las MSC han sido aisladas son hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, fluido amniótico, leche materna, páncreas, periostio, membrana sinovial, músculo esquelético, dermis, pericitos, hueso trabecular, cordón umbilical humano, pulmón y pulpa dental^{117,118}

- **MSC-mo**

La médula ósea es la mejor fuente de obtención. Sólo el 0.003% de las células mononucleares de médula ósea humana son MSC. Existen algunos aspectos que dificultan su uso: limitada tasa de crecimiento, la capacidad de diferenciación de acuerdo a la edad del donante de la médula y el riesgo en la toma de muestra. Las MSC-mo expresan CD90¹¹⁹.

- **MSC-a**

El tejido adiposo se deriva del mesodermo embrionario y contiene un estroma que puede ser aislado con facilidad¹²⁰. Recientemente, se ha demostrado que su fracción estromal contiene células madre multipotentes MSC-a que pueden diferenciarse hacia linajes específicos tales como adipogénico, condrogénico, osteogénico, miogénico y neurogénico¹²¹⁻¹²³. La aspiración del tejido adiposo (liposucción) es generalmente mejor aceptado que la de la médula ósea, debido a la percepción de que el excesivo tejido adiposo es poco sano; asimismo, el tejido adiposo es uno de los más abundantes del cuerpo humano, su acceso es sencillo, el procesado es fácil de realizar y en la mayoría de las personas es posible extraer varios mililitros de grasa sin perjuicio¹²⁴⁻¹²⁵.

- **MSC-pb.**

Recientemente se ha aislado un subgrupo de MSC humanas derivadas de sangre periférica (MSC-pb). Estas células expresaban marcadores compatibles con MSC, así como factores de adherencia celular relacionados con la migración a la superficie cerebral. Tras su estimulación, son capaces de expresar marcadores de diferenciación neuronal¹²⁶.

- **MSC-cu**

El cordón umbilical posee una fracción mononuclear que no expresa CD45 que poseen características de MSC. La tasa de rendimiento es bastante baja (aproximadamente un 10% de supervivencia), pero cuando se obtienen del estroma celular del cordón (gelatina de Wharton) o de la placenta, el rendimiento puede aumentar

exponencialmente¹²⁷. Comparadas con las MSC-mo y MSC-a, parece que las 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 diferenciación¹²⁸. En la Tabla 7 se resumen las diferentes características de las MSC en función de su origen.

Las MSC también pueden clasificarse en función de la relación entre el donante y el receptor¹²⁹.

- **MSC autólogas:** se obtienen del propio paciente, principalmente de una aféresis de sangre periférica o de médula ósea, se procesan in vitro y se administran al mismo individuo. Es posible obtener MSC autólogas de un lipoaspirado del paciente.
- **MSC alogénicas:** las células se extraen de un individuo de la misma especie. La mayoría de los ensayos realizados con MSC utiliza este tipo de células.
- **Xenotransplante:** cuando las MSC utilizadas proceden de un individuo de diferente especie al receptor.

5.3. MECANISMOS DE NEURORRESTAURACIÓN DE LAS MSC

- ***Multipotencialidad***

Como se ha descrito previamente las MSC son células multipotentes es decir, pueden generar células de su mismo linaje embrionario (adipocito, osteocito, condroblasto). Mediante el fenómeno de plasticidad (Figura 7), serían capaces de diferenciarse a células de otras estirpes embrionarias como las neuronas o las células β del páncreas⁹⁵⁻⁹⁸.

- ***Secreción de factores neurotróficos. Acción paracrina***

Se han descrito más de 100 moléculas secretadas por las MSC con acción paracrina que incluyen distintos factores de crecimiento neurotrófico: como el factor neurotrófico derivado del cerebro "brain-derived neurotrophic factor" (BDNF), factor neurotrófico ciliar, el factor neurotrófico derivado de la glía "glial cell line-derived neurotrophic factor" (GDNF) y otros factores de crecimiento como el crecimiento neural "nerve growth factor" (NGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FGF), y neurotrofina 3^{130,131}. La secreción de estos factores tróficos aumenta tras un episodio de isquemia¹³²⁻¹³³. En un modelo de daño espinal en ratas, se demostró que las MSC secretaban más NGF in vivo que antes del daño¹³⁴.

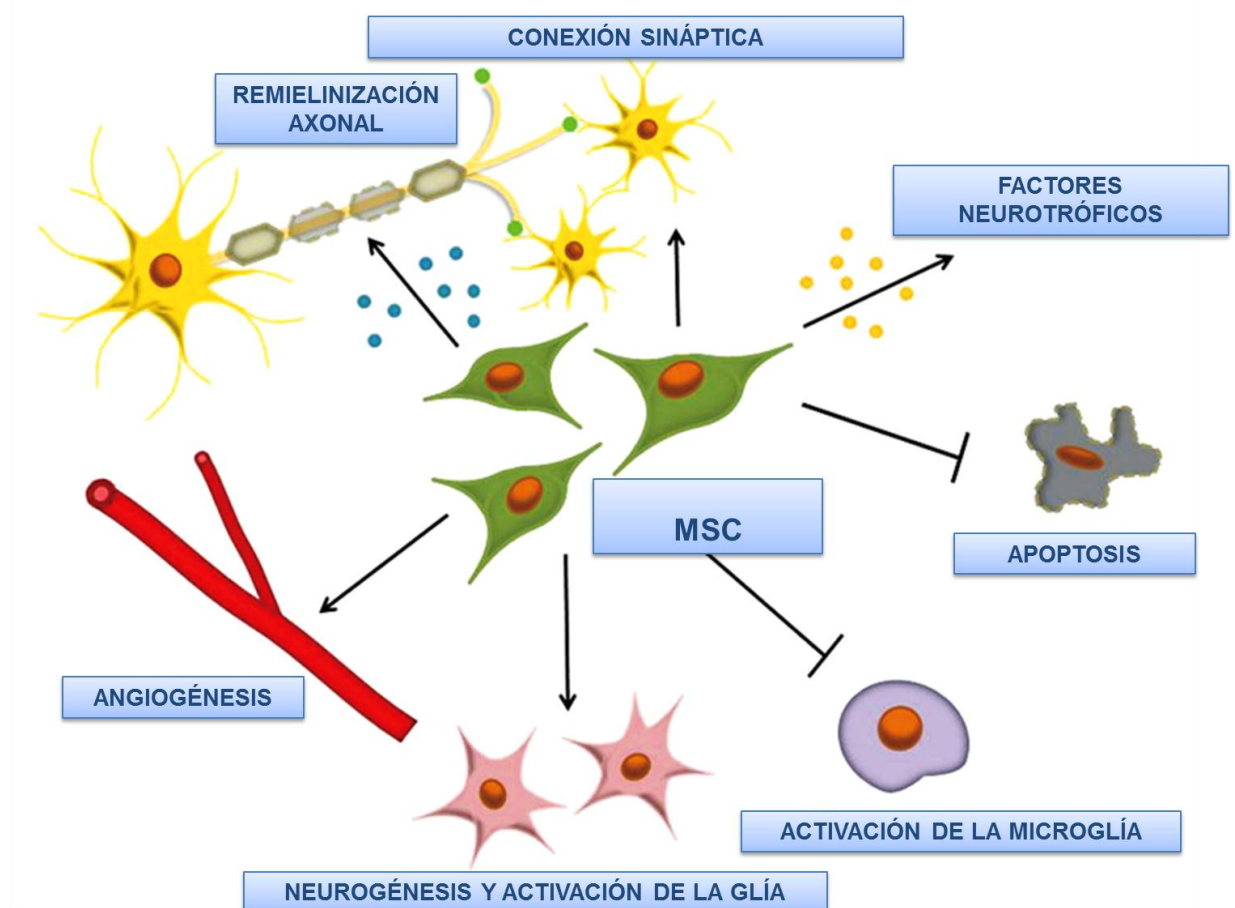


Figura 9: Acciones paracrinas de las MSC. Las MSC segregan gran variedad de citocinas y factores de crecimiento que, mediante acción paracrina, promueven el crecimiento neuronal endógeno, la neurogenesis y la angiogenesis, favorecen la reconexión sináptica y la remielinización de axones dañados, disminuyen la apoptosis y regulan la inflamación

- **Inducción de la neurogénesis y activación de la astrogliá**

Las MSC inducen la proliferación de NPCa en la ZSV y el hipocampo y son críticas para la supervivencia de las nuevas células generadas. Han demostrado estar directamente involucradas en la diferenciación neuronal tras implantarse en el tejido cerebral dañado^{135,136}. El hecho de que MSC modificadas genéticamente para que expresen Neurogenina 1 (un gen que dirige la diferenciación neural) tengan mayor efecto terapéutico en daño cerebral isquémico apoya esta teoría¹³⁷. Las MSC promueven la plasticidad de neuronas dañadas y activan células de la astrogliá para que secreten neurotrofinas como el BDNF, GDNF y el NGF¹³².

- ***Propiedades inmunomoduladoras***

Las MSC tienen un efecto neuromodulador y antiinflamatorio que puede explicarse por diferentes mecanismos¹³⁸. Numerosos estudios han demostrado que las MSC evitan el reconocimiento de antígenos interfiriendo en la función de las células dendríticas y de los linfocitos T¹³⁹. En varios modelos animales de daño cerebral y medular se ha demostrado que las MSC disminuyen la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α e) y aumenta la secreción de citoquinas antiinflamatorias (IL-10 y factor de crecimiento tisular β 1)¹⁴⁰⁻¹⁴². Este efecto se ve potenciado cuando las células son expuestas a un medio inflamatorio caracterizado por la presencia de niveles elevados de IFN- γ ¹⁴³. El descenso en TNF- α junto con el incremento de IL-10 reducen la maduración de células dendríticas, y el incremento en el número de linfocitos T reguladores promueve una respuesta antiinflamatoria o tolerante¹⁴⁴. Otros estudios han mostrado que las MSC suprimen la respuesta inmune mediada por células T, células B y células Natural Killers, al impedir la adquisición de características linfoblásticas y cambiando el perfil de expresión de proteínas relacionadas con la función inmune¹⁴². La acción inmunomoduladora de las MSCs no es solo local, sino que también tienen un efecto en otros órganos linfoides periféricos¹⁴⁵.

- ***Crecimiento axonal y sinaptogénesis***

Se ha demostrado que componentes de la matriz extracelular derivados de las MSC pueden mejorar la reparación del sistema nervioso¹⁴⁶. Por ejemplo, la fibronectina realiza un papel esencial en la supervivencia neuronal, axonal y la sinaptogénesis tras episodios de isquemia cerebral¹⁴⁷. Por otra parte, las moléculas de la matriz extracelular y moléculas de adhesión celular, tales como integrina, cadherina, y selectina pueden promover el crecimiento axonal y la regeneración¹⁴⁷.

- ***Efecto antiapoptótico***

La infusión intravenosa de MSC reduce el número de células apoptóticas teñidas con desoxinucleotidil transferasa en un modelo animal de oclusión de la arteria cerebral media¹⁴⁸.

- ***Angiogénesis***

Las MSC secretan un número de factores de crecimiento y citocinas, que normalmente apoyan la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas: factor de crecimiento de hepatocitos, VEGF, IGF-1 y FGF¹⁴⁹. Se postula que, en un medio rico en estos factores,

las MSC son capaces de promover la angiogénesis y, posiblemente, diferenciarse a células endoteliales^{150,151}.

- **Conducta migratoria de las MSC.**

Las MSC han demostrado capacidad inherente para llegar a territorios lesionados al ser administrados por vía intravenosa. En un modelo de insuficiencia de múltiples órganos con MSC marcadas con proteína verde fluorescente "green fluorescent protein" (GFP) se mostró que estas células se alojan en los diferentes tejidos, en proporción directa a la gravedad y a tamaño de la lesión¹⁵². El proceso conocido como "homing" (o anidamiento, en español) es el proceso esencial por medio del cual las células migran y se implantan en los tejidos inflamados (Figura 10)¹⁵³.

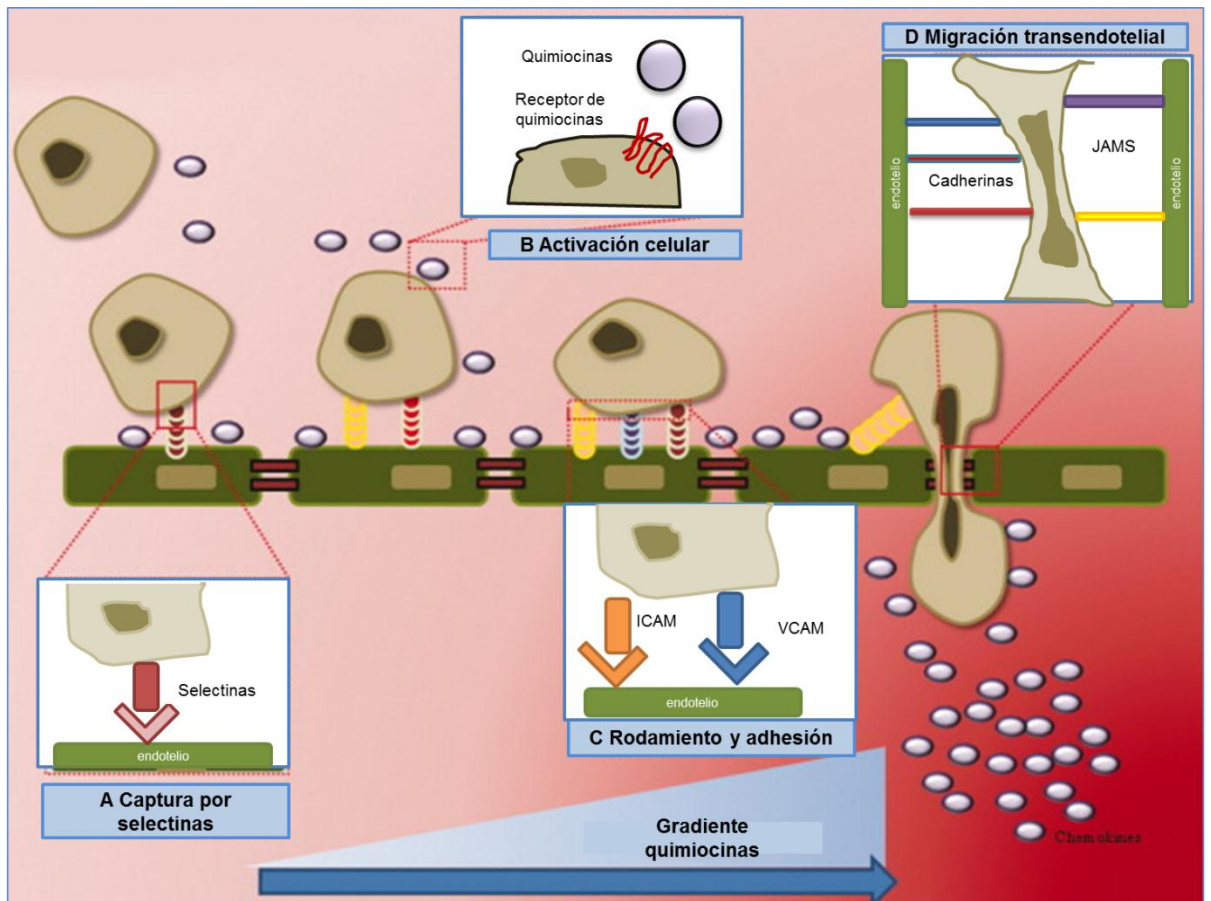


Figura 10: Mecanismo propuesto para la migración y anidamiento de las MSC. A: el reclutamiento MSC requiere una secuencia coordinada de señalización y captura mediada por selectinas, B: de forma simultánea se tiene que producir la activación celular por citoquinas y quimiocinas, C: a continuación la MSC se adhiere firmemente al endotelio a través de integrinas (VCAM: molécula de adhesión a células vasculares, ICAM: molécula de adhesión intracelular), D: por último tiene lugar la migración transendotelial, y finalmente la invasión de la matriz extra celular involucrando interacciones dependientes de integrinas y proteasas que degradan la matriz. La dirección migratoria sigue un gradiente de densidad de quimiocinas (Modificada de referencia 153).

6. TERAPIA CELULAR CON MSC EN EL TRAUMA CRANEAL

6.1. MODELOS EXPERIMENTALES DE TRAUMA CRANEAL

Las lesiones cerebrales traumáticas, como se ha explicado previamente (Figura 2) pueden ser focales (secundarias tanto a los efectos directos del impacto como a las fuerzas de inercia) o difusas (secundarias a movimientos de aceleración/deceleración de la cabeza)¹⁵⁴. Los modelos desarrollados en monos y cerdos reproducen fielmente la complejidad de las lesiones cerebrales post-traumáticas observadas en clínica por las similitudes anatómicas existentes con el cerebro humano. Sin embargo, su uso queda restringido por limitaciones éticas y económicas. Los modelos con roedores son los más usados en la investigación del neurotrauma in vivo por su pequeño tamaño y bajo coste. Los principales modelos que reproducen lesiones focales son los modelos de percusión lateral por fluido, de impacto cortical controlado y de caída de un peso sobre el cráneo (Tabla 8). Los modelos por impacto-aceleración producen daño cerebral traumático difuso.

TABLA 8: MODELOS EXPERIMENTALES DE TRAUMA CRANEAL EN ANIMALES¹⁵⁵

| | |
|---|---|
| Modelos de Daño Cerebral Traumático Focal | Modelo de daño criogénico. Klatzo, 1958 Caída de un peso sobre el cráneo. Feeney, 1981 Percusión lateral por fluido. McIntosh, 1989 Impacto cortical controlado (CCI). Nilsson, 1977 Inflado de balón, Langfitt, 1966 |
| Modelos de Daño Cerebral Traumático Difuso | Aceleración por inercia Gennarelli. Gennarelli, 1983 Impacto-aceleración por caída libre de peso o Modelo de Marmarou Foda. Marmarou, 1994 Impacto-aceleración por aire comprimido o Modelo de Cernak. Cernak, 2004 |
| Modelos de Daño Cerebral Mixto: Trauma + Daño secundario | Hipoxia. Clark, 1997 Hipotensión. Ishige, 1987 |
| Modelos de conmociones por repetición | Weber, 2007 |

Modelos experimentales de trauma craneal en animales para daño cerebral focal y daño cerebral difuso. Modificado de referencia 155

- **Modelo de Impacto Cortical controlado (CCI)**

En el modelo de CCI se reproduce una lesión cerebral post-traumática de tipo focal. El daño cerebral traumático se produce usando un impactador sólido que libera energía mecánica sobre el cerebro con la duramadre íntegra^{155,156}. Tras realizar una craneotomía (Figura 11), se utiliza un cilindro neumático conectado a un impactador de 4 a 5 cm de longitud y 1 cm de diámetro. La intensidad del trauma depende principalmente de la profundidad de la deformación y de la velocidad del impactador. Existe una modificación de este modelo que consiste en realizar una craneotomía dejando caer, sobre la superficie del cerebro, una barra de diámetro y peso conocido. Esta barra se guía a través de un cilindro hueco, adaptado al área de la craneotomía, lo que permite realizar una lesión estandarizada que se define como el producto del peso de la barra por la altura desde la cual se deja ésta caer¹⁵⁷.

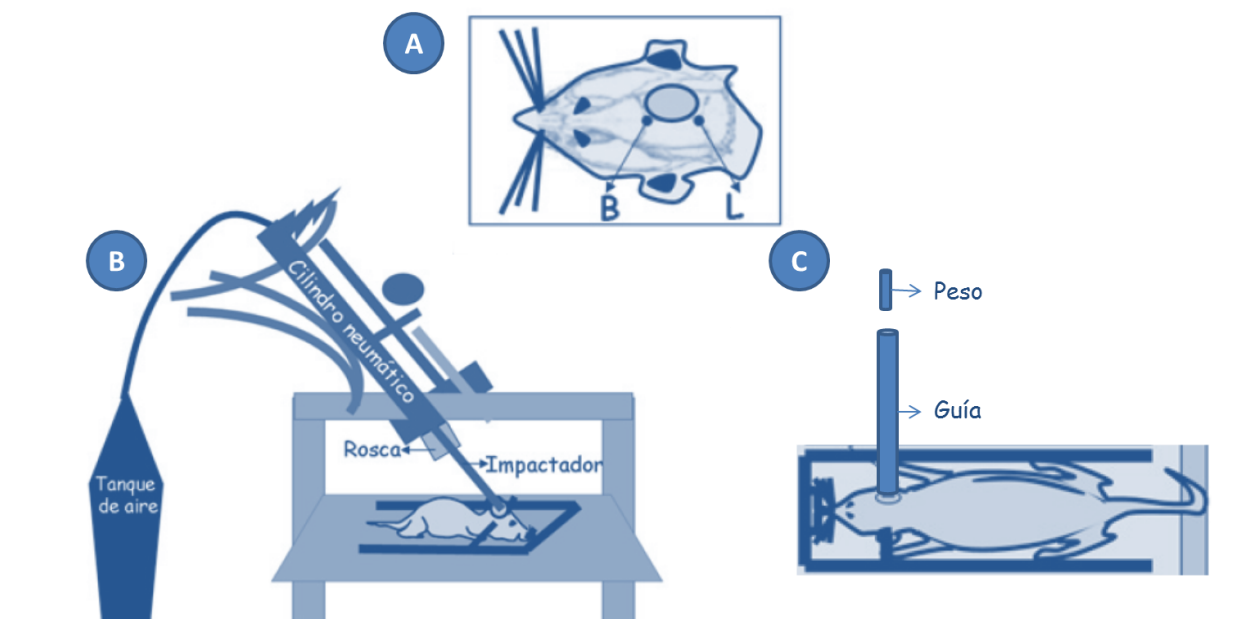


Figura 11: Modelos de CCI. A) Localización de la craneotomía entre bregma y lambda sobre el hueso temporal. **B)** Daño focal mediante cilindro neumático **C)** Daño cerebral por caída de un peso a través de guía metálica.

- **Localización de la craniectomía**

La craniectomía se realiza sobre el área parietotemporal según las coordenadas expuestas en la siguiente figura (Figura 12), de modo que tras el TCE se ven afectadas la corteza motora primaria (M_1) y de asociación (P_{TA}), el cortex visual (V_1L , V_1M y V_1B) y la corteza somatosensorial (S_1TR , S_1FL , S_1HL , S_1BF)¹⁵⁸.

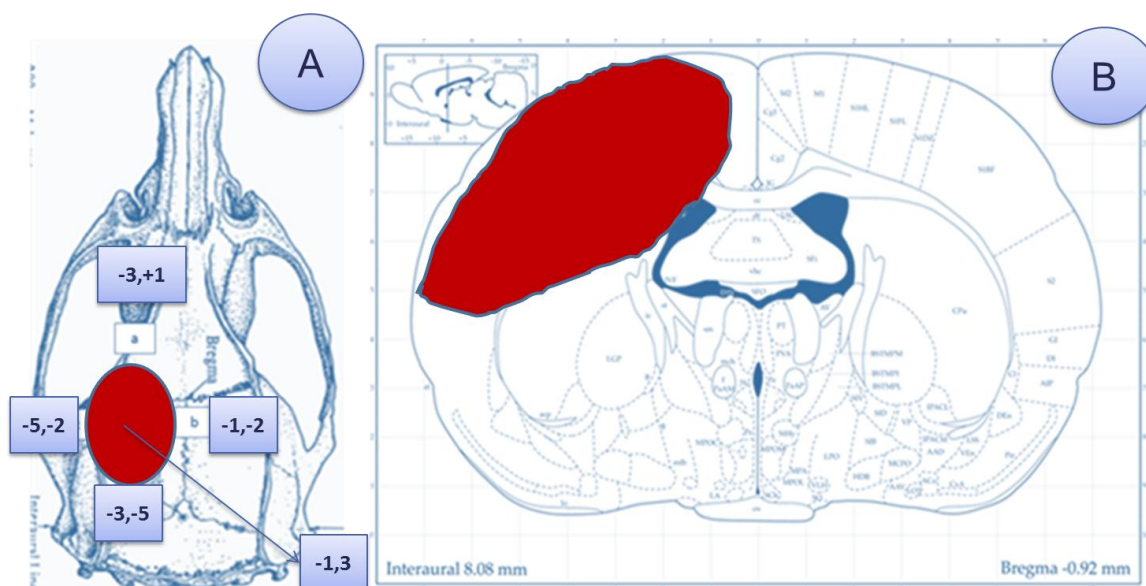


Figura 12: Localización del área de craniectomía. A) Esquema de la estructura ósea de una rata con la elipse que marca la localización de la craniectomía y las coordenadas estereotáxicas que la definen, siendo el 0 bregma. B) Esquema de corte cerebral coronal a la altura del centro de la craniectomía realizada (Bregma -0.92 mm) donde se muestra la localización de las principales áreas afectadas por el TCE: Corteza parietal de asociación (P_{TA}), Corteza visual secundario (V_2L), Corteza visual primario monocular (V_1M), Corteza visual primario binocular (V_1B), Corteza motora primaria (M_1), Corteza primaria somatosensorial primaria anterior (S_1TR), Corteza somatosensorial primaria anterior (S_1HL), Corteza somatosensorial primaria tronco (S_1BF)

6.2. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE LAS MSC

Existen dos estrategias diferentes de administración de las MSC que se han utilizado en el tratamiento del TCE. Por un lado la administración local en el sitio de la LIC (intraventricular o intraparenquimatosa) y por otro lado la administración sistémica (intraarterial e intravenosa). En la siguiente tabla se resumen las características, ventajas e inconvenientes de cada una de las diferentes vías de administración (Tabla 9).

| Tabla 9: VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE LAS MSC EN EL TRAUMA CRANEAL | | | | |
|---|---|---|--|---|
| | LOCAL | | SISTÉMICA | |
| | INTRAVENTRICULAR | INTRALESIONAL | INTRAARTERIAL | INTRAVENOSA |
| Artículos | Harting MT ¹⁵⁹ , Ohta M ¹⁶⁰ Zanier EL ¹⁶¹ | Bonilla C ¹⁵⁷ , Mahmood A ¹⁶²⁻³ , Lu D ¹⁶⁴ , Qu C ¹⁶⁵ , Mori K ¹⁶⁶ , Xue S ¹⁶⁷ , Xiong Y ¹⁶⁸ | Lundberg J ¹⁶⁹ , Lu D ¹⁷⁰ | Mahmood A ¹⁷¹⁻⁴ , Harting MT ¹⁷⁵ , Fisher UM ¹⁷⁶ , Sokolova IB ¹⁷⁷ , Parl BM ¹⁷⁸ , Bonilla C ¹⁷⁸ |
| Técnica | Se administran las MSC en el espacio subdural. | Con una aguja de 25 Gy se realizan microinyecciones en el territorio de la lesión. | Por disección se canaliza la arteria carótida interna y se infunden las MSC. | Se canaliza la vena caudal de la cola y se infunden la MSC. |
| Nº de células | 1-10 x 10 ⁶ | 0,1-1 x 10 ⁶ | 2 – 10 x 10 ⁶ | 2 – 10 x 10 ⁶ |
| Ventajas | Facilidad de administración. | Mayor cantidad de células en territorio dañado. Se pueden usar vehículos [*] . | Alto porcentaje de células alcanzan territorio cerebral. | Facilidad de administración. |
| Inconvenientes | Escaso volumen. | No sirve en daño cerebral difuso. Lesión de tejido cerebral | Dificultad técnica. Sangrado. | Efecto primer paso pulmonar. |

Diferencias entre las diferentes vías de administración de las MSC: en el tratamiento del TCE

* Como vehículo utilizan plataformas de colágeno pobladas de MSC.

- **Administración por vía intravenosa. Efecto primer paso pulmonar.**

La administración intravenosa de las MSC, por su accesibilidad y simplicidad técnica ha sido utilizada en numerosos ensayos clínicos y preclínicos¹⁷¹⁻⁹. Sin embargo, con esta vía existen dificultades para conseguir que un número adecuado de MSC alcancen el territorio arterial y los tejidos diana, debido al efecto de primer paso pulmonar. Este efecto consiste en que, tras la administración intravenosa, la mayor parte de las MSC administradas permanecen en el territorio pulmonar. Este efecto está relacionado con el tamaño celular. El diámetro mínimo de los capilares pulmonares se ha estimado en 15

μm , el diámetro en suspensión de las MSC varía entre 14 y 19 μm ¹⁷⁹ por lo que la mayoría de estas células quedarían atrapadas en la red capilar pulmonar y no alcanzarían la circulación sistémica. El gran tamaño de las MSC y este primer paso pulmonar podrían condicionar la aparición de embolismos pulmonares¹⁷⁹. En la mayoría de los estudios no se advierte este fenómeno. Existen varias estrategias para intentar minimizar el efecto paso pulmonar, entre ellas administrar las células en varios bolos separados en vez de un único bolo intravenoso y la administración de vasodilatadores¹⁷⁹.

6.3. MOMENTO DE ADMINISTRACIÓN DE LAS MSC.

La mayoría de grupos estudian el efecto de la administración de las MSC en la fase aguda del trauma, es decir en las primeras 24 horas^{162,163,169,171,172,175}, incluso algunos autores las infunden tan solo una hora después del TCE^{166,177}. Existen también numerosos trabajos sobre su utilidad en la fase subaguda del TCE, primeros 7 días tras el trauma craneal^{163-5, 167,168, 170,173,174}. Recientemente han aparecido trabajos que valoran la utilidad de la terapia celular en la fase crónica del TCE, administrando las MSC hasta 2 meses después del trauma craneal^{157, 178}.

6.4. MEDICIÓN DE RESULTADOS.

Tras la administración de las MSC a los animales existen diferentes métodos para evaluar su eficacia y su efectividad. La mayoría de los trabajos presentan resultados funcionales, realizando pruebas motoras y sensitivas a los animales. Otro resultado que se intenta medir es la capacidad de las MSC para alcanzar el territorio lesionado y su permanencia en el cerebro lesionado a lo largo del tiempo. Recientemente diferentes estudios analizan, además, la expresión de factores de crecimiento y otras moléculas implicadas en la proliferación celular y la neurogénesis como marcador de la efectividad de las MSC.

- ***Medición del área de la lesión.***

La capacidad de las MSC para regenerar tejidos conseguiría disminuir el área de lesión y necrosis. De este modo numerosos estudios utilizan el tamaño de la lesión como resultado principal^{163,164,167,178}. El tamaño de la lesión se expresa en términos de volumen y se realiza bien por pruebas de imagen, bien por anatomía patológica.

- **Valoración funcional.**

Existen cada vez más herramientas para evaluar la función sensitiva, motora y cognitiva de los roedores¹⁸⁰. Los test compuestos, como el test de gravedad neurológica modificado (mNSS), evalúan diferentes ítems motores, de equilibrio y de reflejos. Los test motores puros como el test del cilindro, de la viga, o el test de Rogers evalúan la función motora y el equilibrio. Existen test que evalúan la capacidad de los animales para realizar acciones complejas: test de alcanzar la bola, test de las escaleras¹⁸¹. Para evaluar la función sensitiva pueden utilizarse test como el sticky tipe test¹⁸². El Rotarod es un test que se usa para medir la coordinación motora y el equilibrio en roedores¹⁸³. Recientemente se han introducido los estudios de comportamiento en campo abierto (Video-tracking-box) para medir con gran sensibilidad la disfunción locomotora y el daño cognitivo en la fase subaguda o crónica del TCE¹⁸⁴.

- **Distribución y supervivencia de las MSC en los tejidos.**

Uno de los objetivos principales de la mayoría de estudios realizados con MSC en TCE es estudiar la distribución de las células en el tejido cerebral. De esta manera, se han desarrollado numerosas estrategias para marcar estas células y analizarlas in vivo o por anatomía patológica. Para diferenciarlas de las células del animal huésped algunos autores utilizan para el trasplante MSC procedentes de humanos (hMSC) y las marcan con anticuerpos anti-antígeno humano nuclear que detectan a continuación por fluorescencia^{169,171}. Otra estrategia es administrar MSC procedentes de ratas macho en ratas hembra y utilizar anticuerpos fluorescentes contra el cromosoma Y¹⁷⁴. La terapia génica de transducción con lentivirales para conseguir MSC que expresen proteína G fluorescente ensalzada (GFP) es otra estrategia prometedora¹⁸⁵ ya que consigue MSC con autofluorescencia. Esta técnica presenta algunas limitaciones como la pérdida de capacidad de las MSC de mantener la fluorescencia en el proceso de diferenciación y proliferación¹⁸⁶. La proteína verde fluorescente (GFP) es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria*, que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible¹⁸⁷.

- **TRANSFECCIÓN CON GFP**

Los métodos de transferencia génica se dividen en dos grandes grupos,

- los no virales: (transfección). Los transgenes de interés pueden estar acomplejados en liposomas o plásmidos.

- los virales (transducción)¹⁸⁸.

Los vectores virales integrativos usados más comúnmente han sido los vectores derivados de la familia *Retroviridae*. La familia *Retroviridae* comprende a un grupo de virus con envuelta lipídica, que deriva de la membrana plasmática de la célula infectada, y con un genoma compuesto por dos moléculas de ARN de cadena simple. Esta familia de virus se distingue del resto por exhibir una estrategia replicativa que incluye la transcripción inversa del genoma de ARN a ADN de doble cadena y la posterior integración de este ADN al genoma de la célula empaquetadora.

Dentro de esta familia se encuentra el género *Lentivirus* (LV) al que pertenece el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). La principal característica de los vectores derivados del HIV es que tienen un sistema de transporte activo del material genético a través del nucleoporo utilizando la maquinaria de transporte nuclear de la célula diana que permite que puedan infectar células que están quiescentes^{189,190}. Esto los hace más eficientes para transducir MSC debido a su naturaleza casi quiescente.

Existen tres genes estructurales necesarios para la replicación de los vectores de transferencia génica: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica las proteínas estructurales del virión: matriz, cápside y nucleocápside. El gen *pol* codifica las enzimas virales: proteasa, transcriptasa reversa e integrasa. El gen *env* codifica la glicoproteína viral de la envuelta, que está formada por las subunidades de superficie y transmembrana. Los LV son genéticamente más complicados porque contienen 6 proteínas adicionales: Tat, Rev, Vpr, Vpu, Nef y Vif, y por tanto, su ciclo de replicación es algo más complejo. De los genes auxiliares, cabe destacar los que codifican Tat y Rev. Solo ellos son esenciales para la expresión de los genes virales y pueden ser aportados en *trans*.

Los vectores virales son virus modificados genéticamente para perder la capacidad replicativa una vez transluen las células diana. Así, en el esqueleto de los vectores virales los genes *gag*, *pol* y *env* han sido reemplazados por los genes de interés. Estos genes son aportados en *trans* por plásmidos en transfección transitoria. La información genética requerida para la producción de sobrenadantes lentivirales es aportada a la célula empaquetadora por plásmidos (4 plásmidos en los lentivirus de tercera generación).

- **Plásmidos empaquetadores:** Aportan el gen *gag*, *pol* y *rev*, esto elimina en la práctica la posibilidad de que, por recombinación, se puedan reconstituir virus con capacidad de replicación. Se han separado los genes *gag-pol* y *rev* en dos plásmidos, lo que los hace todavía más seguros.

- Vectores de transferencia: Al ser los lentivirus incapaces de generar partículas replicativas competentes precisa la aportación de promotores internos para expresar transgenes.
- Plásmido de envuelta: La envuelta interacciona con un receptor específico de la célula diana. El uso de una envuelta diferente a la natural del virus para modificar el tropismo del vector se llama pseudotipado. La proteína de la envuelta más usada hasta el momento ha sido la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular. Se ha descrito su capacidad de empaquetar vectores que transducen eficazmente neuronas, miocitos, hepatocitos y MSC^{189,191}.

El material genético aportado por los plásmidos se transcribe a una sola cadena de RNA que se empaqueta con el resto de las proteínas y la envuelta formando un virión sin capacidad de replicación. Dentro de la célula diana el RNA por medio de la transcriptasa inversa se convierte a DNA y por medio de la integrasa se incorpora al material genético de la célula. El material genético aportado (una vez integrado se denomina provirus) pasará a la progenie de la célula al dividirse y se expresará en todas ellas (Figura 13).

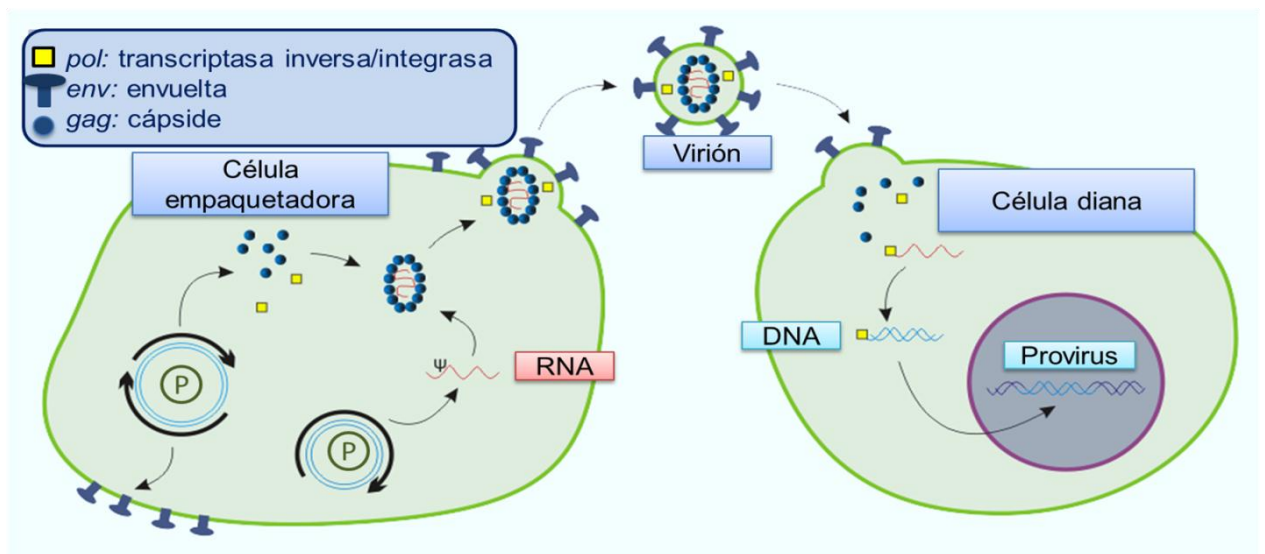


Figura 13: Transducción de una célula por lentivirales En un plásmido (P), se aporta a una célula empaquetadora el material genético que codifica la transcriptasa inversa y la integrasa por un lado y en otro plásmido la envuelta y la cápside. Al liberarse en la célula empaquetadora se forman viriones que contienen RNA y que salen al exterior. Al incubarse una célula huésped con el sobrenadante de viriones, este penetra en la célula liberando el RNA. A continuación la transcriptasa inversa lo convierte en una doble cadena de DNA y la integrasa lo integra en el material genético de la célula (provirus).

Otros sistemas de marcaje de MSC se basan en marcar con moléculas radiactivas las MSC y analizar in vivo la radiación gamma de las células al ser inyectadas en un organismo^{192,193}.

- ***Marcadores de neurogénesis y proliferación celular.***

Como se ha descrito ampliamente en apartados previos de la introducción, en la actualidad se cree que la capacidad de las MSC de regenerar tejidos y mejorar funciones no viene dado únicamente por reemplazo celular si no por su capacidad para secretar factores de crecimiento y otras moléculas paracrinas que favorecen la neuroregeneración. De este modo varios estudios se centran en la medición de diferentes factores de crecimiento: NGF, BDNF, FGF^{172,174} en la zona perilesional. Algunos estudios realizan la detección de proteínas involucradas en la neurogénesis como la nestina y la doblecortina y miden marcadores de proliferación celular como el Ki-67¹⁷⁸.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

En un modelo experimental de traumatismo craneoencefálico grave en ratas jóvenes, las células madre mesenquimales obtenidas de tejido graso e infundidas por vía venosa en la fase aguda del trauma, alcanzan el tejido cerebral y por diferentes mecanismos favorecen la regeneración de los tejidos. De esta forma consiguen mejorar la evolución funcional y disminuir las secuelas motoras, sensitivas y cognitivas, tras el traumatismo.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Estudiar si la infusión intravenosa de células mesenquimales alogénicas, obtenidas de tejido graso, en la fase aguda del daño cerebral traumático, es segura y disminuye las secuelas sensitivo-motoras y cognitivas, a medio plazo, en un modelo experimental de daño cerebral traumático en ratas jóvenes.

Objetivos secundarios

-Establecer un modelo de traumatismo craneoencefálico grave reproducible en ratas jóvenes.

-Establecer la dosis óptima de células mesenquimales a administrar por vía intravenosa.

-Establecer una estrategia eficaz para realizar la monitorización de las MSC en los distintos órganos y tejidos, una vez administradas, marcando las MSC con proteína G fluorescente.

-Estudiar la distribución en el cerebro traumatizado de las células madre mesenquimales infundidas y su supervivencia a la semana y al mes de haberse producido el traumatismo.

MATERIAL Y MÉTODOS

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

Los procedimientos de experimentación han sido aprobados por el Comité de Ética en Experimentación animal del Hospital Universitario La Paz (Madrid, España, CEBA 08/11). Se siguieron sus recomendaciones según la normativa establecida por el Real Decreto 1201/2005

El investigador principal posee el Certificado Acreditativo de Competencia de la Categoría B para personal que lleva a cabo procedimientos con animales. Dicho certificado fue expedido por el Instituto de Neurociencias Santiago Ramón y Cajal y acreditado por el Área de Protección Animal de la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid a fecha 20 de Diciembre del 2011.

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. OBTENCIÓN DE LAS MSC DE GRASA PERITONEAL DE RATA



Figura 14: Obtención de MSC de grasa peritoneal. Bajo anestesia con sevoflurano se abre el peritoneo. Se extrae la grasa que se encuentra en el peritoneo y cerca de los riñones, así como la grasa inguinal subcutánea.

Se utilizaron MSC alogénicas obtenidas de tejido graso de ratas Sprague Dawley adultas de 350 gramos (Janvier Labs™, Le Genest-Saint-Isle, Francia). Los animales se mantuvieron según las condiciones descritas a continuación.

La extracción de la grasa se realizó con el animal anestesiado mediante la inhalación de una mezcla de O₂ al 2% y sevoflurano al 5% (Forane, Inibsa, Londres, Reino Unido). Se utilizó técnica aséptica con material estéril. Se afeitó el

animal y se realizó laparotomía ventral. Se extrajo el tejido graso que se encuentra en el peritoneo inguinal y en las fosas renales (Figura 14).

A continuación, en el laboratorio, manteniendo las condiciones de esterilidad, se disgregó la grasa mecánicamente con un bisturí sobre una placa petri hasta alcanzar una suspensión homogénea. Se liberaron las MSC del tejido incubando la suspensión celular con 1 mg/ml de colagenasa I al 0,75% (Gibco LTD, Paisley, Gran Bretaña) durante 1 hora a una temperatura (T^a) de 37°C, y a una concentración de CO₂ del 5%, con 95% de humedad relativa. Posteriormente, el material obtenido se filtró por una membrana de nylon (Cell strainer) de 40 µm de poro (BD Bioscience, EEUU). Se separaron las células mononucleadas del resto, mediante la centrifugación sobre gradiente de Ficol-Plaque plus® (Healthcare Bioscience, Uppsala, Suecia) a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 25 minutos a 25°C. Se recogió la fracción celular (la parte que queda justo encima del Ficol) y se añadió Fosfato sódico tamponado pH 7,2 (PBS). Finalmente se centrifugó la suspensión a 1500 rpm durante 5 minutos y se sembró para cultivo en adherencia en medio completo.

1.2. CULTIVO EN ADHERENCIA

La suspensión celular obtenida, según lo descrito previamente, se sembró en frascos de cultivo en monocapa con suelo de poliestireno (flask) de 25 cm² a una concentración de entre 5x10³ y 6x10³ células mononucleares por cm² en medio completo para cultivo de MSC. Este medio completo está compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con 1g/ml de glucosa, Glutamax™ (Gibco), suero fetal bobino (FBS) al 10% (Serum Supreme Bio-Whittaker, USA), 0,5% penicilina 10.000 U/mL y 0,5% de estreptomycin 10.000 µg/mL (Gibco)¹⁹⁴.

Las células se cultivaron a 37°C, con atmósfera al 5% de CO₂ y humedad del 95% en estufa, realizando cambio del medio cada tres días. Cuando la expansión celular alcanzaba una confluencia del 80-90% de la superficie del frasco de cultivo, se realizó un "pase". Para ello se despegaron las células resuspendiéndolas en tripsina (Tryple™ Express, Gibco, Denmark) durante 2-5 minutos a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. A continuación se inactivó la tripsina añadiendo medio completo y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 22°C. El sedimento celular obtenido "pellet" se resuspendió en medio completo. Se extrajeron 10 µl a una alícuota y se le añadieron otros 100 µl de azul triptano. Se colocaron por capilaridad 10 µl de la preparación en una cámara de Neubauer y se visualizaron las células viables (las que no tiñe el azul tripan y se ven por birrefringencia) al microscopio óptico aplicando la fórmula

$$\text{Partículas/ } \mu\text{l} = \text{partículas contadas} / [\text{superficie contada (mm}^2)] * [\text{profundidad cámara (mm)}] * \text{dilución}$$

Las células se sembraron en placas de cultivo celular multipocillos tratadas (P6) (Falcon™), para transducción con lentivirales, a una concentración de 5x10³ células MSC /cm³.

1.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS FLUORESCENTES POR TRASDUCCIÓN

- ***Generación y titulación de sobrenadantes lentivirales***

En estos experimentos se utilizaron LV de segunda generación, autoinactivantes sin capacidad de generar virus replicativos

Los sobrenadantes lentivirales se produjeron mediante cotransfección transitoria de tres plásmidos (transferencia, empaquetadores y envuelta) sobre células 293T (Código

ATCC: CRL-11268). En esta línea celular epitelial de riñón humano (Human Embryonic Kidney), se insertó el gen sensible a la T^a que codifica el antígeno T del SV40, para que tenga mayor eficacia de transfección.

Las células 293T se sembraron a una densidad de 5×10^4 células por placa p90 (90 mm de diámetro). Las placas se incubaron al menos 24 h antes con gelatina al 0,2% para favorecer la adherencia de las células a la placa de cultivo y aumentar su resistencia al tratamiento de transfección. El medio de cultivo usado fue DMEM suplementado con SFB. Cuando las células estaban al 60-70% de confluencia, se procedió a la transfección de los 3 plásmidos mediante un agente llamado Fugene (Promega).

Se depositó la mezcla de Fugene con el ADN de los plásmidos gota a gota sobre el medio de las células 293T y se agitó suavemente para mezclarlo bien con el medio. Al día siguiente se cambió el medio a las células por medio fresco. Los sobrenadantes con las partículas virales se recogieron 24 y 48 h después del cambio de medio, se filtraron por $0,45 \mu\text{m}$ para eliminar restos celulares y se almacenaron en alícuotas a -80°C .

La titulación se realizó sobre la línea celular HT1080 (células de fibrosarcoma epiteliales humanas; Código ATCC: CCL-121). Para la titulación de los sobrenadantes LV se sembraron 5×10^4 células/pocillo de P-24 en 1 ml de DMEM suplementado. Al día siguiente se realizó la infección de las células cultivadas con los sobrenadantes preparados a diluciones crecientes. A las 24 h se cambió el medio con el sobrenadante LV por medio fresco y 48 h después las células se recogieron y analizaron mediante citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de células que expresan la GFP.

Se calculó el título del sobrenadante lentiviral según esta fórmula:

$$T \text{ (UT/mL)} = [N^{\circ} \text{ células} \times \% \text{ células GFP}+/100] \times \text{FD} \times \text{FC}$$

- T es el título del sobrenadante lentiviral.
- N^o de células es el número de células en el momento de la infección.
- % células GFP+, es el valor del porcentaje de células que expresan el transgen medido por citometría.
- FD es el factor de dilución correspondiente a la dilución que se utilice finalmente para el cálculo del título.
- FC es el factor de corrección para dar el título en UT/ml, en caso de que el volumen en el que se lleve a cabo la infección no sea un volumen final de 1 ml.

- **Transducción de MSCs con vectores lentivirales**

Se utilizó sobrenadante de lentivirus TO3 que contiene el gen que codifica GFP obtenido de la transducción de la célula empaquetadora 293T (Figura 14) con un título de $2,41 \times 10^6$ UT/ml. Para la transducción de las MSC se cultivaron las MSC en pase 1 con 1 ml de sobrenadante de lentivirus TO3 y 1 ml de medio completo, utilizando una multiplicidad de infección (MOI, Multiplicity of infection) de aproximadamente 34 virus / célula. Se cultivaron las células a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad a durante 12 horas. Este proceso se repitió dos veces para mejorar el porcentaje de transducción. Posteriormente se comprobó la fluorescencia mediante citometría de flujo.

Se consideró que el proceso de incorporación de GFP a las MSC era exitoso al obtener, al menos, un 80% de células fluorescentes en el cultivo.

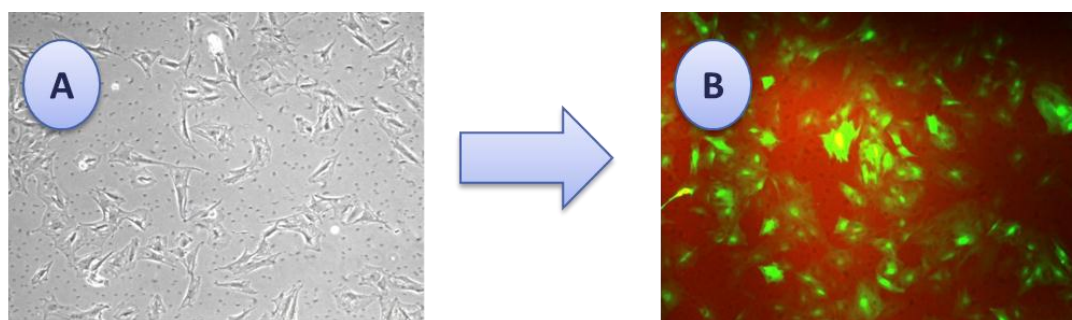


Figura 15: Visión de las MSC tras marcaje con GFP. A visión de las MSC al microscopio con luz blanca. B visión al microscopio de fluorescencia bajo luz azul. Se observa que las células, tras el marcaje con GFP presentan fluorescencia verde.

1.4. EXPANSIÓN CELULAR Y ALMACENAMIENTO DE LAS CÉLULAS

Las MSC fluorescentes se mantuvieron en expansión en estufa a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad entre 7 y 14 días realizando cambios de medio cada 2-4 días. Cuando alcanzaban una confluencia mayor al 80% en el frasco se realizaba una expansión o pase. Se realizaron un máximo de 4 pases. Una medida de seguridad empleada para evitar la aparición de células con mutaciones no deseadas, fue limitar el tiempo de cultivo de las muestras a seis semanas o, en caso de expansión rápida, a un máximo de cuatro pases. En caso de observar una mala evolución del cultivo (senescencia, células no adheridas al plástico, falta de expansión o crecimiento, muerte celular), se desechó.

Las células así obtenidas se congelaron hasta su utilización en crioviales en nitrógeno líquido a -200°C. Brevemente, tras trypsinizar y contar las células, se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en un

volumen conocido del medio de congelación: 10% Dimetilsulfóxido (DMSO), 90% SFB, para obtener una concentración determinada de células por unidad de volumen (5×10^6 células/ml). La suspensión se dividió en crioviales de 1 ml que se mantuvieron aproximadamente 12 h en un ultracongelador a -80°C . Finalmente se guardaron en un tanque con nitrógeno líquido a -200°C y se conservaron hasta su utilización.

1.5. DESCONGELACIÓN DE LAS MUESTRAS Y PREPARACIÓN PARA SU ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA.

Los crioviales extraídos del tanque se descongelaron suavemente en un baño a 37°C , en agitación. Se preparó un tubo Falcon con 10 ml con medio de cultivo y se le añadió el volumen del criovial suavemente, para así diluir el DMSO presente en el medio de congelación celular. El tubo con dicha mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm y a continuación se eliminó el sobrenadante dejando el pellet celular. Las células se resuspendieron en 1-5 ml de medio. A continuación se sembraron las células en frascos de cultivo en adherencia de 75 cm^2 . Las células se cultivaron en estufa a 37°C , 5% CO_2 y 95% de humedad y se expandieron hasta conseguir la cantidad de células necesarias para su administración intravenosa.

El día de la infusión, se levantaron las células en monocapa mediante tripsinización, según lo explicado anteriormente. Tras realizar el conteo celular mediante microscopia se resuspendieron las células en PBS a una concentración de 4×10^6 MSC / ml. Se prepararon monodosis de 0,5 ml (2×10^6 MSC) en jeringuillas estériles de 1 ml.

1.6. DEMOSTRACIÓN DE QUE LAS CÉLULAS FLUORESCENTES CONSERVAN LAS PROPIEDADES DE LAS MSC

Una vez se consiguió que las MSC expresasen la GFP y tuvieran fluorescencia verde bajo luz azul, se procedió a demostrar que tras la transducción con GFP la población celular obtenida mantenía todas las características que definen a las MSC¹¹⁹.

- **1.6.1. Cultivo en adherencia**

Una de las características que definen a las MSC es su capacidad para auto-renovarse y generar copias idénticas a sí mismas por mitosis a lo largo de un periodo muy largo de tiempo. Las MSC fluorescentes se mantuvieron en expansión en estufa a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad entre 7 y 14 días realizando cambios de medio cada 2-4 días. Cuando alcanzaron una confluencia mayor al 80% en el frasco se realizó una expansión o pase, realizando un total de 10 pases.

- **1.6.2. Diferenciación in vitro**

- Diferenciación adipogénica.

Se realizan dos pruebas de diferenciación con sus respectivos controles negativos en las MSC fluorescentes y en las no transducidas con GFP. Las células se sembraron a una densidad de 5×10^3 MSC/cm² en placas P6. Se incubaron en la estufa a 37°C con CO₂ al 5% durante 24h. Al alcanzar el 80-90% de confluencia se agregaron 500 µl de medio de diferenciación para adipocitos (Stempro Adipogenesis Differentiation kit [Gibco, California, USA]: DMEM, SFB 10%, Penicilina y Estreptomicina al 1%). Se incubó en estufa en condiciones habituales. A las 2 semanas se tiñó con Oil Red para comprobar la diferenciación hacia adipocito. Se preparó la solución de tinción Oil Red relación 3:2 con agua desionizada, se dejó reposar 15 minutos y se pasó por un filtro de 0,2 µm de poro para eliminar el exceso de cristales de Oil Red. Las células en las placas P6 se lavaron 3 veces con PBS. Se fijó con formaldehído (PFA) 4% 20 minutos a T^a ambiente. Se volvió a lavar 3 veces con PBS y una con isopropanol al 60%. Luego se tiñó con la solución de Oil Red y se visualizaron las células a los 2-3 minutos. Los adipocitos se veían como células que presentan gotas de grasa teñidas de color rojo en interior del citoplasma. Las células transducidas con GFP se observaron con microscopio de fluorescencia bajo luz azul para comprobar que mantenían la fluorescencia verde.

- **Diferenciación osteogénica:**

Se realizaron dos pruebas de diferenciación con sus respectivos controles negativos en las MSC fluorescentes y en las no transducidas con GFP. Las MSC se sembraron a una densidad de 5×10^3 MSC/cm² en placas P6. Se incubaron en la estufa a 37°C con CO₂ al 5% durante 24h. Al alcanzar el 90% de confluencia se agregaron 500 µl de medio de diferenciación para osteocitos (Stempro Osteogenesis Differentiation kit [Gibco, California, USA]: DMEM, SFB 10%, Penicilina y Estreptomicina al 1%), realizando pases cuando se alcanzaba una confluencia del 80%. A las 3 semanas se llevó a cabo la tinción Alizarin Red. Para ello, se preparó una solución de Alizarin Red al 2% en agua destilada con fosfato monosódico para alcanzar un pH de 4,3. Las células en las placas se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con PFA al 4% durante 30 minutos a T^a ambiente. Después volvieron a lavarse con PBS y se agregó la solución preparada de Alizarín Red. A los 20 minutos se lavaron varias veces con agua desionizada y se observaron al microscopio óptico. Las células diferenciadas a osteocitos presentaban inclusiones cálcicas que se veían de color rojo al microscopio con luz blanca. Las células transducidas con GFP se observaron con microscopio de fluorescencia bajo luz azul para comprobar que mantenían fluorescencia verde.

- **1.6.3. Inmunofenotipaje de las MSC**

Las MSC se despegaron con tripsina según lo explicado anteriormente y se centrifugaron a 1500 rpm. Se resuspendieron en PBS y se incubaron en alícuotas de 10×10^5 células con los anticuerpos monoclonales correspondientes CD 45-PE, CD 90-APC y CD 29-FITC (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania) a una concentración de 1 µg de anticuerpo cada 10×10^5 células durante 20 minutos a 4°C. Las células marcadas se lavaron 2 veces con PBS. El análisis de inmunofenotipo se realizó utilizando un citómetro de flujo BD FACS cantoTM (Biosciences, Nueva Jersey, USA).

2. ENSAYOS IN VIVO: MODELOS ANIMALES

2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para los estudios experimentales se utilizaron ratas hembra Sprague Dawley (elegidas por ser la especie con menor variabilidad en la circulación cerebral) de 150 a 200 gramos de peso (4 – 6 semanas de vida), procedentes del centro de cría reconocido Janvier Labs rodent research models and associated services (Francia).

Para la obtención de MSC procedentes de grasa peritoneal de rata se utilizaron ratas hembras adultas Sprague Dawley de 350 g procedentes del mismo laboratorio.

Los animales se alojaron en el animalario del HULP (Castellana 261 28046, Madrid, N° de Registro: 280790001741, en jaulas (6 animales como máximo) donde la temperatura ambiental varía entre 21+/-2°C, la humedad relativa oscila entre 55+/-10% y los ciclos de luz y oscuridad se alternan cada 12 horas (de 8 de la mañana a 8 de la tarde). La dieta que recibieron es completa, consistiendo en un granulado especial para rata y agua de bebida “ad libitum”. Se colocaron elementos de enriquecimiento del medio en las jaulas. El estado de salud de los animales se controló rutinariamente siguiendo los criterios sanitarios de FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa española y europea (European convention ETS 1 2 3 sobre el uso y la protección de animales vertebrados mamíferos utilizados en experimentación y otros propósitos científicos, y la ley española 32/2007 y RD 1201/2005 sobre la protección y el uso de animales en investigación científica). Los animales fueron correctamente sedoanalgesiados en todos los procedimientos y recibieron analgesia suplementaria cuando es necesario.

Los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del HULP, obteniendo el número de Registro 11/08, de acuerdo con la bioseguridad externa e interna y con las directrices bioéticas.

A fin del estudio, los animales se sacrificaron bajo anestesia general.

2.2. MODELO DE IMPACTO CORTICAL CONTROLADO

- **Anestesia**

Para realizar el procedimiento los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal (Figura 16) con una combinación de ketamina (25mg/Kg), diazepam (2mg/Kg) y atropina (0,1mg/Kg).



Figura 16: Anestesia intraperitoneal.

- **Impacto cortical controlado (ICC) por caída de un peso**

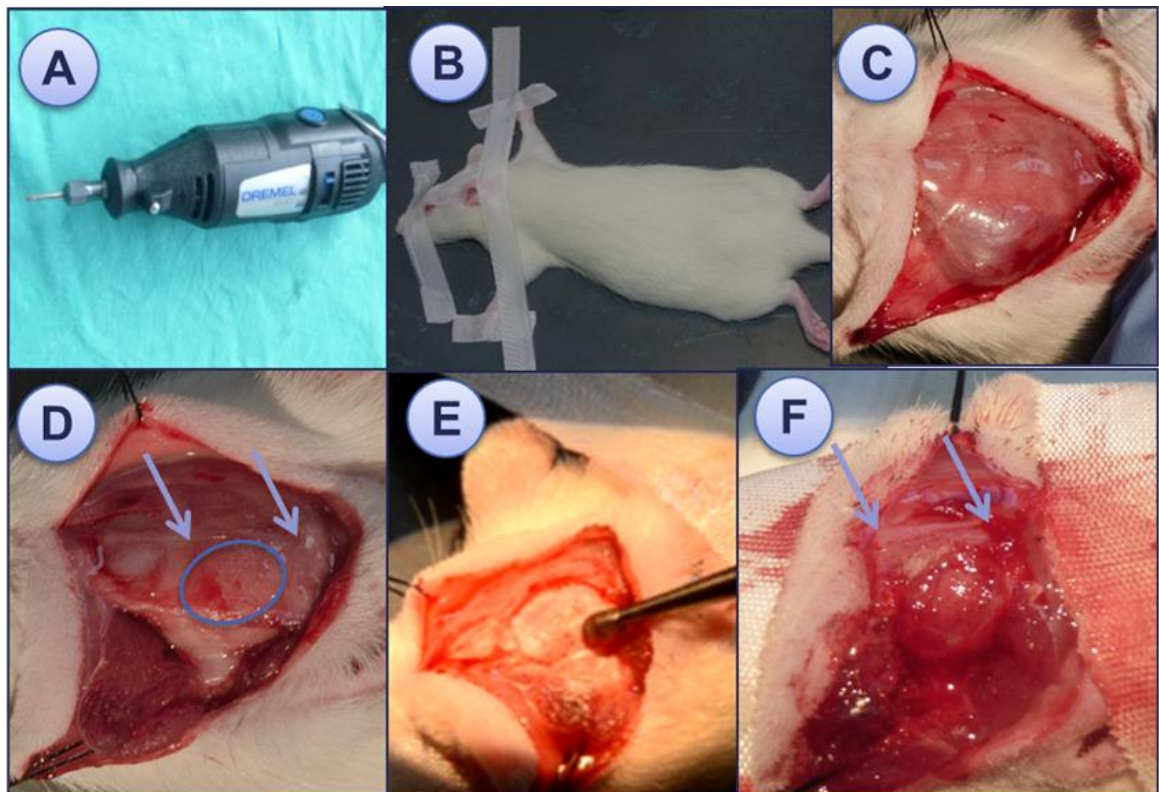


Figura 17: Apertura de una ventana ósea. A: Taladradora S-200 125W 5 P de Dremel® y fresa neuroquirúrgica cónica laminada Raze® Sao Paolo, Brasil. B: Animal inmovilizado para la cirugía. C: Exposición de cráneo y músculo temporal. D: Exposición del hueso temporal una vez retirado el músculo, las flechas indican la posición de bregma y lambda, la elipse indica el área de la craniectomía. E: Apertura del hueso mediante raspado con fresa. F: Ventana ósea abierta con exposición de la meninge en el área parietotemporal.

El animal anestesiado se colocó sobre una manta térmica para mantener una T^a durante la cirugía entre $36,5^{\circ}\text{C}$ y $37,5^{\circ}\text{C}$. Se rasuró la piel de la zona parietal y temporal izquierda. Se inmovilizó al animal con esparadrapos con la cabeza lateralizada para exponer la zona parietal y temporal del cráneo. Se realizó una ventana con bisturí en la piel: incisión sagital por la línea media de la cabeza hasta la zona preauricular y corte coronal siguiendo la línea preauricular. Se dejó a la vista el músculo temporal y el cráneo. Se realizó una incisión en la inserción del músculo temporal y se disecciona el musculo con mosquito. Se fijó con seda de 3 ceros. Tras retirar el músculo temporal, quedaron expuestos los huesos parietal y temporal izquierdos (Figura 17).

Se localizaron la sutura anterior bregma y la sutura posterior. Se dibujó una elipse de 6×4 mm con centro a $-1,-3$ (siendo 0 bregma) y coordenadas anterior ($-3,+1$); posterior ($-3,-5$); izquierda ($-5,-2$) y derecha ($-1,-2$) (Figura 18). Se retiró el hueso mediante raspado con fresa neuroquirúrgica, exponiendo la meninge y el tejido cerebral (Figura 17).

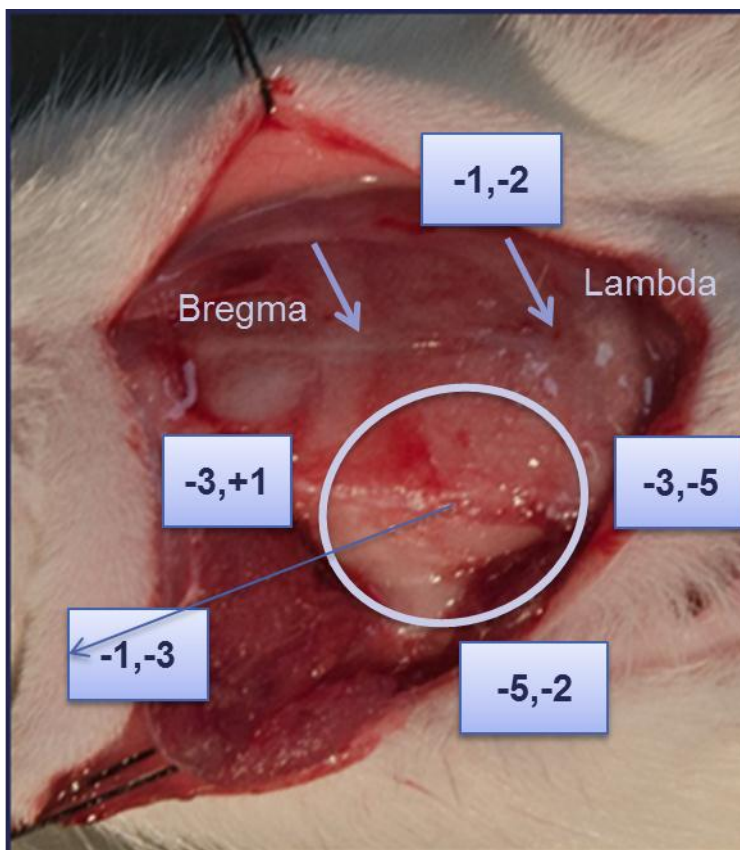


Figura 18: Localización de área de craneotomía. Bregma se considera el 0 para las coordenadas estereotácticas. El centro de la craneotomía se localiza a $-1,+3$. El resultado es una elipse de 6×4

Se realizó un Impacto Cortical Controlado (Figura 19) dejando caer un peso (barra cilíndrica de acero de 35 gramos) desde una altura de 20 cm (a través de una guía cilíndrica), a una velocidad de 2 metros por segundo sobre el tejido cerebral y el hueso. A continuación se cerró el plano muscular y el cutáneo mediante sutura con seda de tres ceros. Se analgesió al animal con dosis subcutáneas de tramadol (2 mg/kg) cada 12 horas en función de los signos de dolor durante los dos días siguientes a la cirugía. Los animales se mantuvieron con T^a controlada y ambiente rico en O₂ hasta que se despertaron completamente (Figura 20).

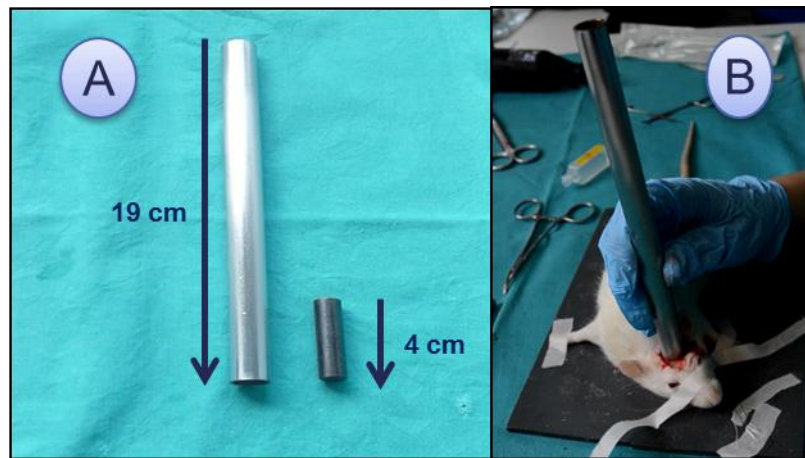


Figura 19 : Mecanismo lesional

A: barra de acero de 4 cm de longitud y 5 mm de diámetro que se deja caer a través de una guía metálica sobre la zona de la craniectomía B: Caída del peso sobre el área de la craniectomía

Durante todo el procedimiento experimental se controla la T^a corporal (37±0,5°C), la SO₂, y la frecuencia cardiaca (Fc). Los animales que presenten alteración en alguno de estos parámetros se desecharon del estudio.



Figura 20 : Postoperatorio

A: Analgesia subcutánea con tramadol. B: Observación postquirúrgica con Tª controlada y ambiente enriquecido en O₂

- **Infusión de células mesenquimales**

Los animales se anestesiaron con una mezcla de isoflurano inhalado al 2% y O₂ puro a 1-2 litros por minuto. Se les canalizó una de las 4 venas de la cola con un angiocateter abbocath ® de 24 Gy. La administración se realizó de forma manual lenta durante 10 minutos, administrando unos 50 µl cada 60 segundos. Durante la administración de las células la SO₂ y la Fc se monitorizaron mediante un sensor transcutáneo en la pata inferior (Figura 21). Cuando la SO₂ disminuía de 93% se suspendía el procedimiento.

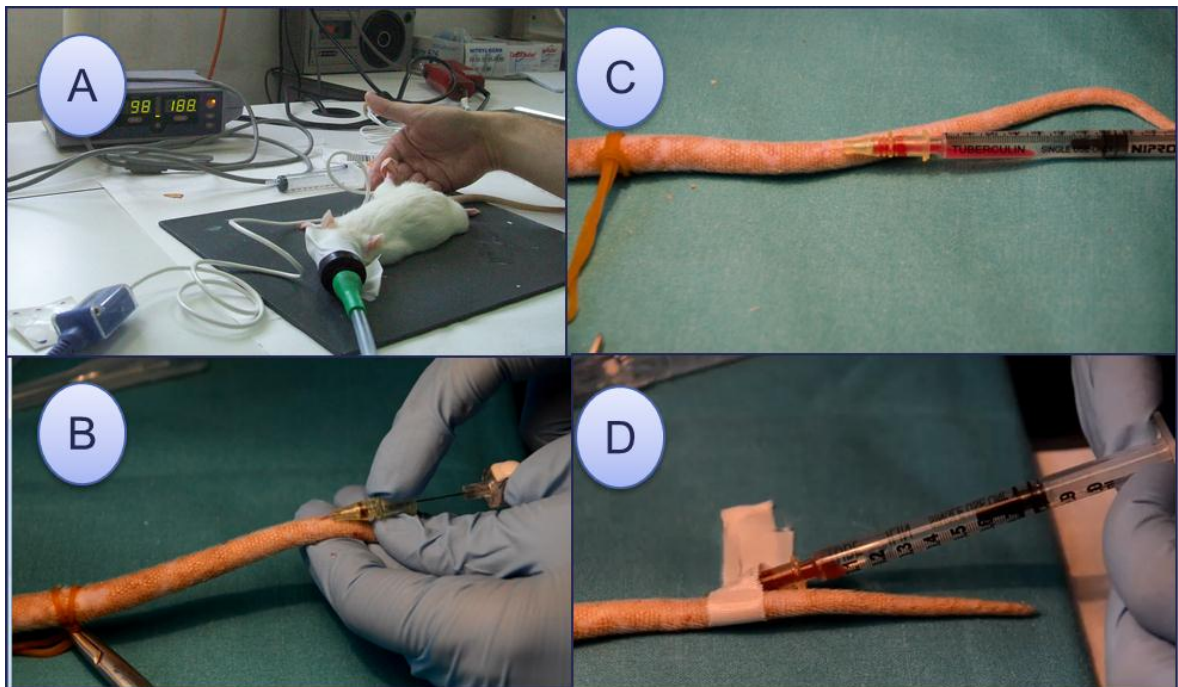


Figura 21 : Infusión de las MSC

A: Monitorización de SO₂ y Fc por sensor transcutáneo en la pata trasera derecha. B y C: Canalización de la vena de la cola con angiocatéter 24 Gy. D: Infusión lenta de las MSC, una vez fijado el angiocatéter.

2.3. MEDICIÓN DEL DAÑO MEDIANTE TESTS FUNCIONALES

Para evaluar la funcionalidad y los déficits de los animales, experimentadores instruidos y ciegos al tratamiento realizaron tres test diferentes. Basalmente (momento 0, previo a la cirugía) y en los días +3, +7, +14 y +21 se realizó un test motor puro: el test de Rogers, un test sensitivo: Sticky tape tests modificado (ST_m) y un test motor y cognitivo: test Rotarod. Los sujetos con evaluación basal alterada por déficit motor, sensitivo o cognitivo se eliminan del experimento.

- **Test de Rogers**

Este test evalúa la función motora^{180,195,196}. Se realizó en ambiente neutro, sin estímulos externos. Se valoró la motilidad espontánea de la rata al ser suspendida de la cola. A mayor puntuación peor estado funcional (Figura 20).

0. ausencia de déficit
1. disminución de la motilidad del miembro lesionado
2. desplazamiento espontáneo en círculo hacia el lado de la lesión
3. desplazamiento solo tras estímulo
4. ausencia de desplazamiento tras estímulo
5. muerte

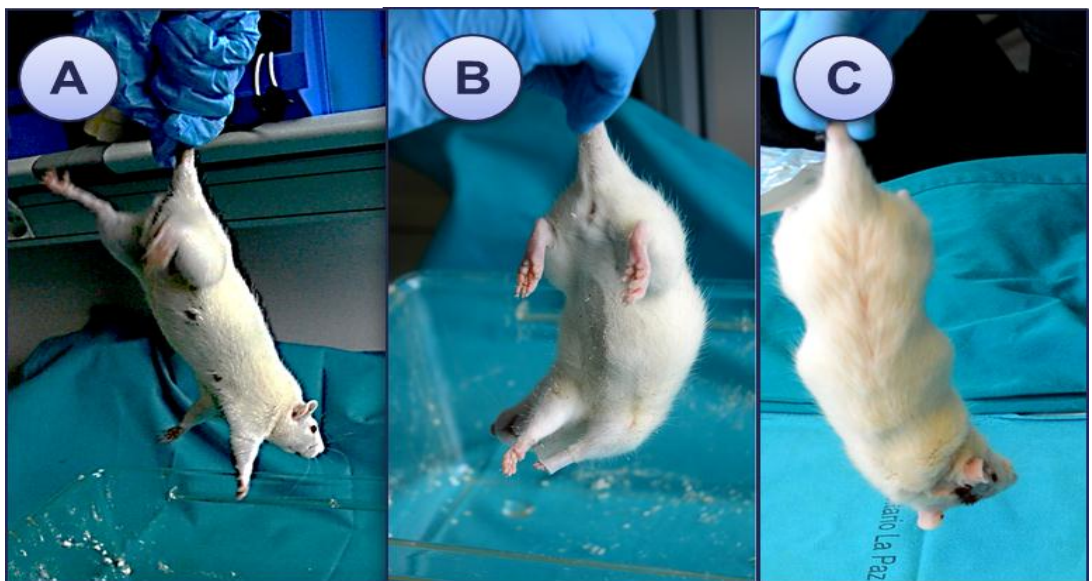


Figura 20: Test de Rogers modificado

- A: 0 puntos en condiciones basales
B: 2 puntos
C: 4 puntos

- **Modified Sticky-tape test (ST_m)**

La función sensitiva se evaluó mediante el ST_m . Esta prueba ha sido validada para valorar la función somatosensorial en ratas con daño cerebral^{182,197,198}. Consiste en colocar una cinta adhesiva en la pata delantera. La respuesta normal del animal consiste en intentar quitarse la cinta adhesiva con los dientes de manera continua. Se evaluaron tanto el miembro contralateral como el homolateral a la lesión producida. En nuestra versión modificada se realizaron tres periodos de observación de 30 sg en momentos diferentes del día y se valoró tiempo que el animal pasa intentando retirar la cinta (Figura 21). El resultado puede expresarse en tiempo total en sg o en % del tiempo total. A menor puntuación mejor estado somatosensorial.

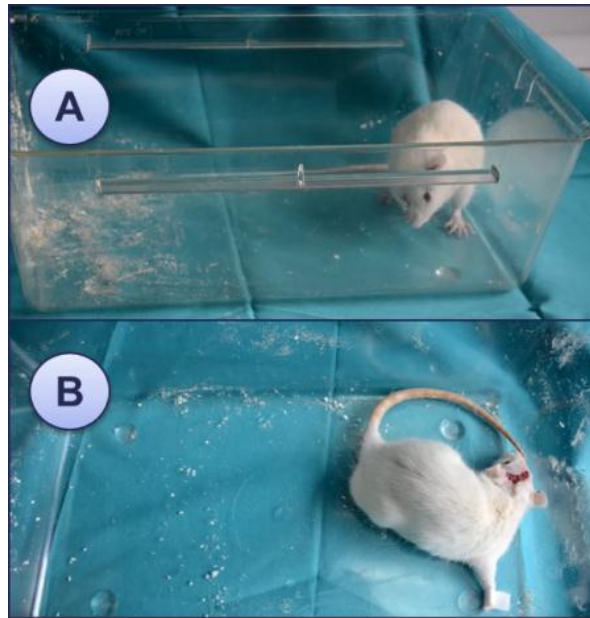


Figura 21: Steacky tipe test modificado

A: La respuesta normal del animal es intentar quitarse la cinta adhesiva con los dientes

B: Tras la lesión, el animal no presta atención a la cinta adhesiva

- **Rotarod Test**

El test Rotarod (Rotarod Test, Ugo Basile Srl, Italy) se usa para medir la coordinación motora y el equilibrio en roedores^{183,199,200}. Los animales se colocaron en un rodillo con movimiento rotatorio continuo que puede girar a una velocidad constante o acelerada. Los parámetros se fijaron fueron la velocidad de inicio, la velocidad final y el tiempo de aceleración. Para este experimento el test se inició a 2 rpm y se aceleró a lo largo de 2 minutos hasta 20 rpm. Los resultados se expresaron en segundos y en rpm alcanzadas (Figura 22). Para conocer el estado basal, se realizó un test antes de realizar el traumatismo.



Figura 22: Test de Rota-rod. El animal se coloca en un rodillo con movimiento rotatorio continuo que puede girar a una velocidad constante o acelerada. Los parámetros que deben fijarse son la velocidad de inicio, la velocidad final y el tiempo de aceleración. El test finaliza cuando el animal cae o pierde el equilibrio.

3. DISEÑO DEL ESTUDIO

3.1. 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 α o tipo I), el poder estadístico del estudio (riesgo de cometer un error tipo β o tipo II), y si el contraste de hipótesis es uni o bilateral.

En este estudio, los valores arbitrarios de α y β se fijaron en 0,05 y 0,8, respectivamente. Se eligió un contraste de hipótesis unilateral, porque se estimó 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 obtuvo que $n=10$ animales por cada grupo de experimento.

3.2. ESTUDIOS PILOTO

Antes proceder al diseño final de este experimento, se realizaron dos estudios pilotos para definir dos aspectos de este modelo que no se podían resolver basándose en los estudios previos publicados hasta el momento:

-la dosis óptima de MSC que se debía utilizar en ratas jóvenes (150-200 g) para producir un TCE grave.

-el peso de la barra para producir un trauma craneal grave en ratas de ese tamaño.

- **Cálculo de dosis óptima de MSC**

Para averiguar la dosis óptima de MSC a administrar en ratas jóvenes (150-200 g, 6 semanas de vida) se diseñó un estudio piloto con 5 animales por grupo cuyo objetivo era comparar los resultados funcionales obtenidos con diferentes dosis intravenosas de MSC 2×10^6 , 4×10^6 , 6×10^6 . Las dosis se administraron en bolos de 2×10^6 MSC que se repitieron cada 24 horas (Figura 24). El tiempo de duración del estudio fue de 2 semanas. Como variable resultado se recogieron las puntuaciones medias obtenidas en los diferentes test funcionales por los animales de cada grupo a las 48 horas, a la semana y a los 14 días.

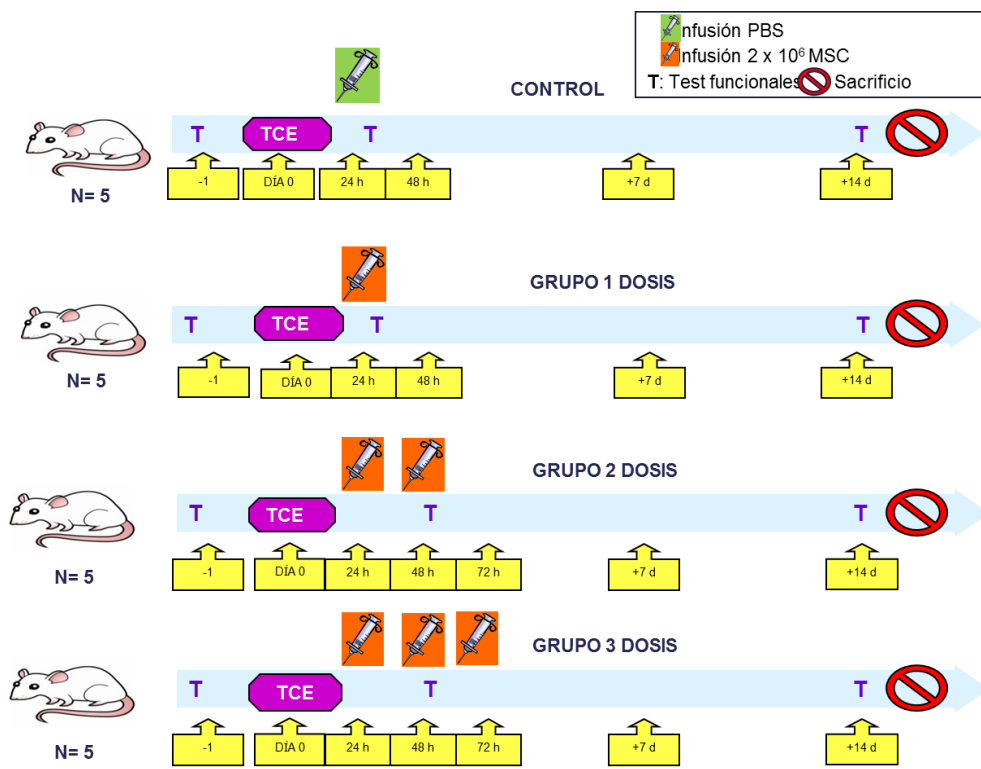


Figura 24 : Diseño experimento cálculo de dosis

Grupo control: Se administran 0,5 ml de PBS las 24 horas del TCE

Grupo 1 dosis: Se infunden 2×10^6 CMS en 0,5 ml de PBS en una sola dosis a las 24 horas del TCE.

Grupo 2 dosis: Se infunden 2 dosis de 2×10^6 CMS en 0,5 ml de PBS a las 24, 48 y 72 horas del traumatismo.

Grupo 3 dosis: Se infunden 3 dosis de 2×10^6 CMS en 0,5 ml de PBS a las 24, 48 y 72 horas del traumatismo.

- **Estudio de magnitud del trauma craneal**

El modelo de impacto cortical controlado por caída de un peso descrito previamente, utiliza una barra de 25g de peso que se deja caer a 20 cm. Según diferentes autores mediante este modelo, se produce en el animal un traumatismo grave en ratas adultas¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. El estudio piloto de dosis se realizó con un peso de 20 g.

El siguiente estudio (Figura 25) se diseñó para testar pesos crecientes de 25 g y 35 g en nuestro modelo de rata joven de 150 - 200 gramos. Como variables finales se evaluaron la media de la puntuación de cada grupo en las diferentes pruebas funcionales y la mortalidad en cada grupo.

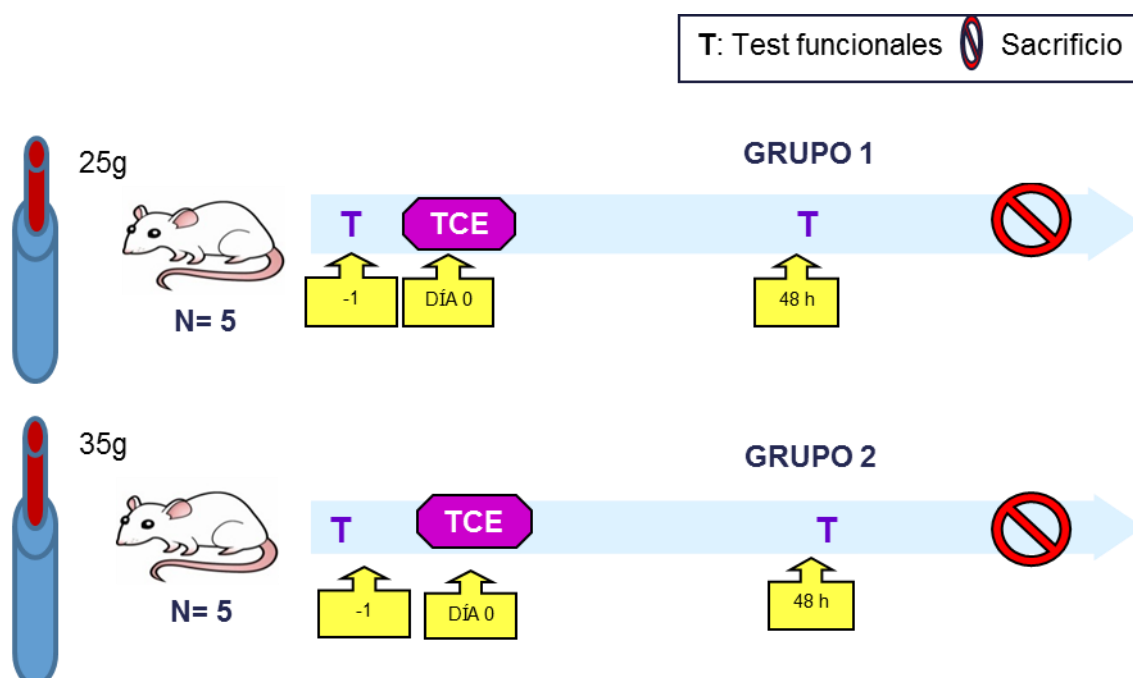


Figura 25 : Diseño experimento estimación magnitud del trauma

Grupo 1: Modelo ICC por caída de un peso de 25g desde 20 cm de altura.

Grupo 2: Modelo ICC por caída de un peso de 35g desde 20 cm de altura.

3.3. DISEÑO DEL EXPERIMENTO FINAL

Una vez definidas la dosis óptima de MSC a administrar por vía iv y el peso de la barra a utilizar en nuestro modelo de ICC por caída de un peso, se diseñó el experimento siguiente (Figura 26).

Se utilizaron 36 ratas divididas en tres grupos: 2 grupos control (control y control iv) y uno de tratamiento (tratamiento). Como se ha expuesto previamente el tamaño muestral estimado fue de 10 animales por grupo. Se decidió utilizar 12 animales en cada grupo para poder paliar posibles pérdidas. El tiempo de duración del estudio fue de 4 semanas. La infusión intravenosa de MSC se realizó a las 24h y a las 48h. Las variables resultado fueron de dos tipos:

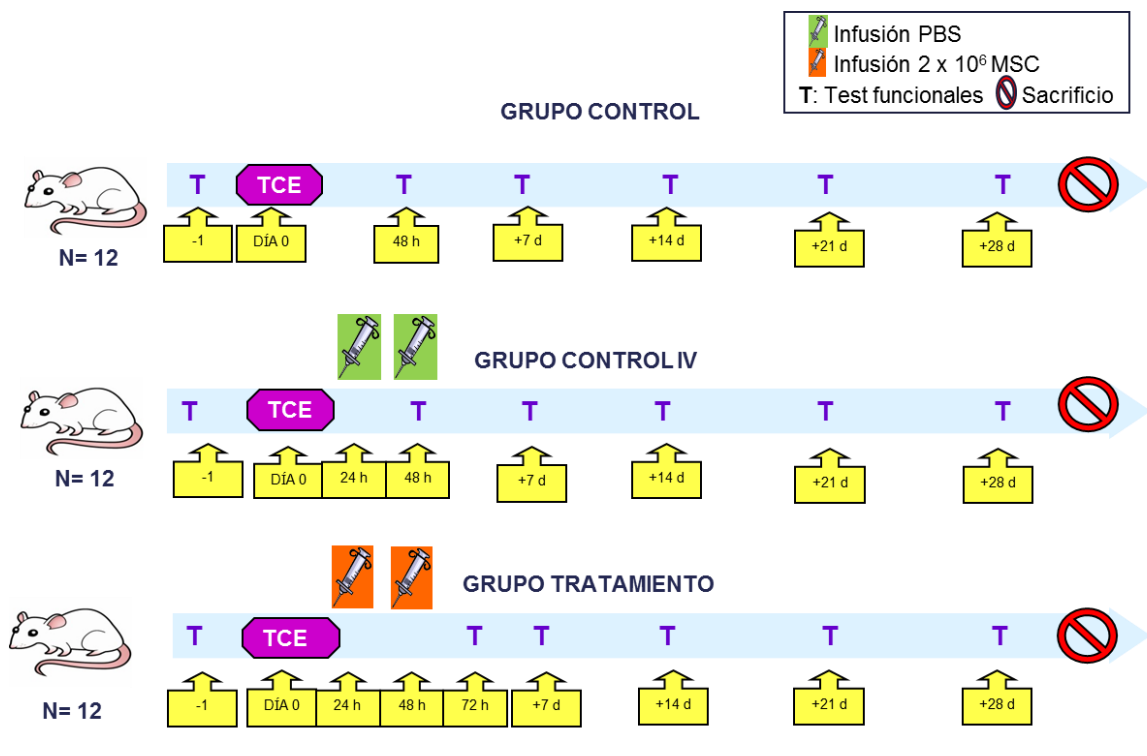


Figura 26: Diseño del estudio

Grupo CONTROL: Se administran 0,5 ml de PBS las 24 horas de producido el traumatismo.

Grupo CONTROL IV: Se infunden 2 dosis de 0,5 ml de PBS a las 24 y 48 horas del traumatismo.

Grupo TRATAMIENTO: Se infunden 2 dosis de 2×10^6 CMS suspendidas en 0,5 ml de PBS a las 24 y 48 horas del traumatismo.

- como variables resultado funcionales se utilizaron las puntuaciones medias obtenidas en cada grupo, en los diferentes test funcionales, a los 3, 7, 14 y 28 días del trauma.

- como resultados morfológicos se recogieron la presencia de MSC en los diferentes tejidos a las 48 horas y el volumen de la lesión a los 28 días. Se realizó citometría de flujo de las células obtenidas del tejido cerebral y los pulmones de animales del grupo tratamiento a las 48 horas y a 4 semanas de la infusión.

4. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Se realizó en el grupo control iv y tratamiento iv a las 48 horas. Se procesaron tinciones de hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica para detectar vimentina y GFP.

4.1. Estudio de hematoxilina-eosina

Tras el sacrificio de los animales anestesiados con Sevoflurano inhalado, mediante decapitación con guillotina, se extrajeron los órganos necesarios (hígado, cerebro y pulmón) y se fijaron en PFA al 4% durante un periodo de 24-48 horas. Posteriormente las muestras pasaron a un procesador automático de tejidos Leica ASP300 para su inclusión en parafina. Se realizaron secciones histológicas de 2µm de grosor con el microtomo Leica RM224. Los cortes de parafina se introdujeron en una estufa durante 30 minutos a 60°C y posteriormente se sumergieron en xilol durante 15 minutos. Se hidrataron a concentraciones decrecientes de alcohol. Se lavaron con agua destilada y se introdujeron en la solución de hematoxilina durante 5 minutos (teñidor automático Leica ST5020). Se lavaron en agua durante 2 minutos. Se introdujeron en eosina alcohólica un minuto y se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol. Finalmente se montaron en un portaobjetos con un bálsamo específico DePeX (BDH, Gutr, Poole, Inglaterra), para determinar por observación al microscopio óptico (Leica DML) la zona lesional y perilesional.

Para buscar células mesenquimales se realizó tinción con vimentina. La vimentina es una proteína de filamentos intermedios que forma parte del citoesqueleto de las células de estirpe mesenquimal²⁰¹. Tras la desparafinización, se realizaron baños en xilol durante 5 minutos y se rehidratroan con concentración decreciente de alcohol. El antígeno de los cortes se recobró mediante un método basado en un buffer de citrato. Las peroxidases endógenas se inhiben mediante incubación con agua oxigenada 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 T^a ambiente. Se realizó marcaje con anticuerpo antivimentina: Monoclonal Mouse Anti-Vimentin (Leica Biotestsystem[®], Suiza). Las células vimentina positivas eran aquellas que muestran una tinción parduzca alrededor de su núcleo.

Para marcaje con anticuerpos de la GFP, las muestras se procesaron de la forma descrita previamente e incubadas con anticuerpos e GFP (B2) monoclonal ratón (Sc-9996 Santa Cruz Biotechnology[®], California, USA) y doble marcaje con anticuerpo de

cabra antirratón Goat anti-mouse IgG FITC (Sc - 2000 Santa Cruz Biotechnology®, California, USA) en una dilución de 1:50 en buffer PBS durante 30 minutos a T^a ambiente.

4.2. Estudio de autofluorescencia

Tras el sacrificio de los animales anestesiados, por decapitación, se extrajeron los órganos (cerebros, pulmones e hígado), que se conservaron en una solución salina fisiológica hasta su congelación a - 80 °C. Los cortes se observaron al microscopio de fluorescencia bajo luz azul buscando células con autofluorescencia verde.

5. CITOMETRÍA

Se estudiaron por citometría las células obtenidas del procesamiento de los cerebros y pulmones de dos animales, a las 48 horas y a las 4 semanas de la infusión de las MSC vía intravenosa.

Tras el sacrificio de los animales anestesiados, por decapitación, se extraen los órganos (cerebros y pulmones), que se conservaron en una solución salina fisiológica. Se estudiaron por separado el hemisferio cerebral izquierdo y el derecho. Los tejidos se machacaron sobre una criba celular 40 µm colocado en un Falcon 50 ml con PBS. La suspensión celular obtenida se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 21°C. Tras eliminar el sobrenadante se incubaron las células obtenidas con CD45-PE, CD90-APC, CD29-FITC y GFP(B-2)-FITC a una concentración de 0,25, 0,06, 1 y 0,5 µg de anticuerpo por 10x10⁷ células respectivamente, durante media hora a T^a ambiente. Las células se analizaron en un citómetro EPIC XL (Beckman Coulter™ II, BD Biosciences, Nueva Jersey, USA) para determinar el porcentaje de células CD 29⁺, CD 90⁺ y GFP⁺ que llegaban al cerebro y en concreto al hemisferio cerebral izquierdo.

6. ANALISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron las variables fisiológicas recogidas durante los procedimientos, los datos de los tests funcionales y los datos procedentes de la citometría. Los datos cuantitativos se presentaron como media +/- desviación estándar y los cualitativos en forma de porcentaje.

Se compararon entre los distintos grupos los valores de los distintos parámetros fisiológicos, los resultados de los tests funcionales, el tamaño de la lesión y el porcentaje de células encontradas en cada tejido, usando el análisis de la varianza ANOVA para aquellos resultados que seguían una distribución normal. Si el ANOVA detectaba diferencias significativas se aplicó el test de Dunnett o el test de Fisher como test post hoc. En aquellos casos, en los que debido a la falta de homogeneidad de varianzas, no se pudo aplicar ANOVA se utilizaron test no paramétricos (Kruskal- Wallis para detectar diferencias entre grupos y test de Mann- Whitney para conocer qué grupo de tratamiento es diferente al control).

Se consideró que una diferencia alcanzaba significación estadística cuando el valor de la $p \leq 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico de IBM SPSS statistics para Windows (versión 19.0, IBM Company, New York, USA).

7. CAPTURA Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Las imágenes mostradas se captaron con 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.

RESULTADOS

1. OBTENCIÓN DE MSC FLUORESCENTES

1.1. EFICACIA DE LA TRANSDUCCIÓN CON GFP DE LAS MSC

En el estudio de citometría de las MSC tras marcaje con anticuerpos e GFP-B2 monoclonal ratón (Sc- 9996 Santa Cruz Biotechnology®, California, USA) se observó un porcentaje de células transducidas eficazmente mayor del 85% (Figura 27). Este porcentaje se mantuvo constante o incluso aumentó tras la expansión celular a lo largo de los pases sucesivos. El porcentaje de células fluorescentes se mantuvo también tras el proceso de congelado y descongelado descrito en material y métodos (Figura 27).

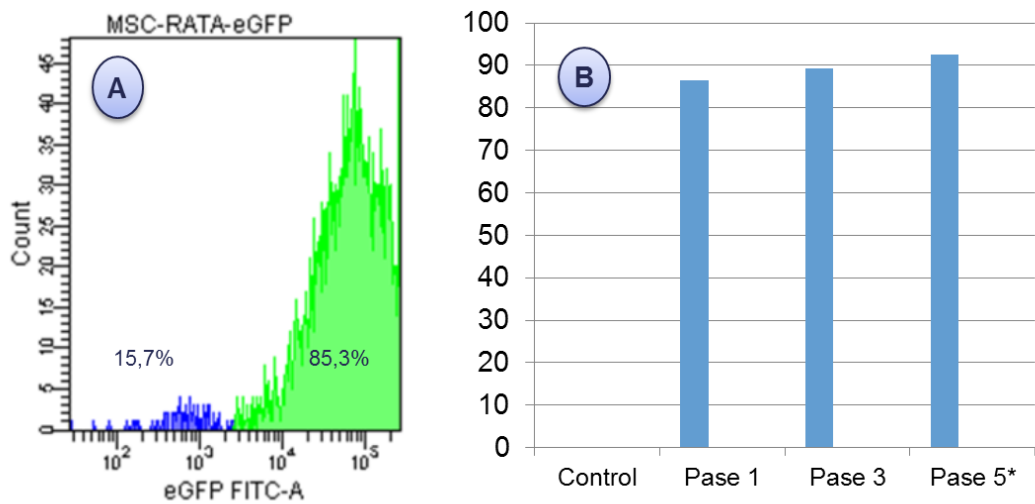


Figura 27: Eficacia de la transducción con GFP de las MSC. A: Citometría de las MSC tras la transducción (en el gráfico puede verse como pase 1) B: Porcentaje de células marcadas con anticuerpo e-GFP (B2) monoclonal ratón en los diferentes pases. Control: vial de MSC no transducidas. *Las MSC en pase 5 habían sido congeladas y descongeladas previamente.

1.2. DEMOSTRACIÓN DE QUE LAS CÉLULAS FLUORESCENTES CONSERVAN LAS PROPIEDADES DE LAS MSC

Las MSC fluorescentes (por expresión de la proteína GFP tras trasducción con lentivirales) mantuvieron las propiedades mínimas para ser catalogadas como MSC¹¹².

- **Cultivo en adherencia**

Las MSC fluorescentes se mantuvieron en expansión, según se describe en el apartado correspondiente de material y métodos, hasta alcanzar pase 10 a lo largo de varios meses. Las MSC fluorescentes así obtenidas, conservaron la morfología estrellada propia de las células de estirpe mesenquimal y mantuvieron sus capacidades de adherencia a plástico y de generación de clones celulares hijos idénticos (Figura 28).

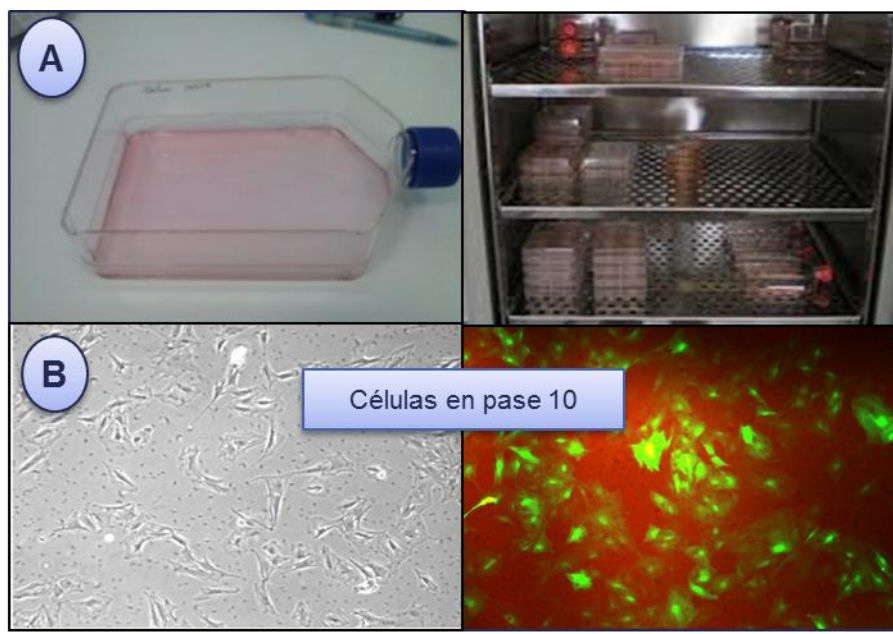


Figura 28: Cultivo en adherencia

A: Condiciones habituales de cultivo en plástico y crecimiento en estufa.

B: Visión al microscopio de 4 aumentos de las MSC fluorescentes en pase 10 que mantienen su capacidad de adherencia en plástico y de crecimiento por mitosis

- **Diferenciación in vitro**

Tras su cultivo en medios de diferenciación específicos para adipocitos y osteocitos (Stempro adipogénesis y osteogénesis differentiation kit, GIBCO, California USA), las MSC adquirieron morfología típica de células diferenciadas.

- **Diferenciación a adipocito**

Tras 14 días de cultivo en medio de diferenciación para adipocitos algunas de las células adquirieron morfología redondeada, en ellas la tinción de Oil Red demostró depósitos intracelulares en forma de vacuolas de contenido graso que desplazaban el núcleo celular (Figura 29). Dichas células observadas bajo luz azul con microscopio de fluorescencia mantienen la fluorescencia verde. Se puede concluir que las MSC transducidas con GFP no pierden la capacidad de diferenciación a adipocito.

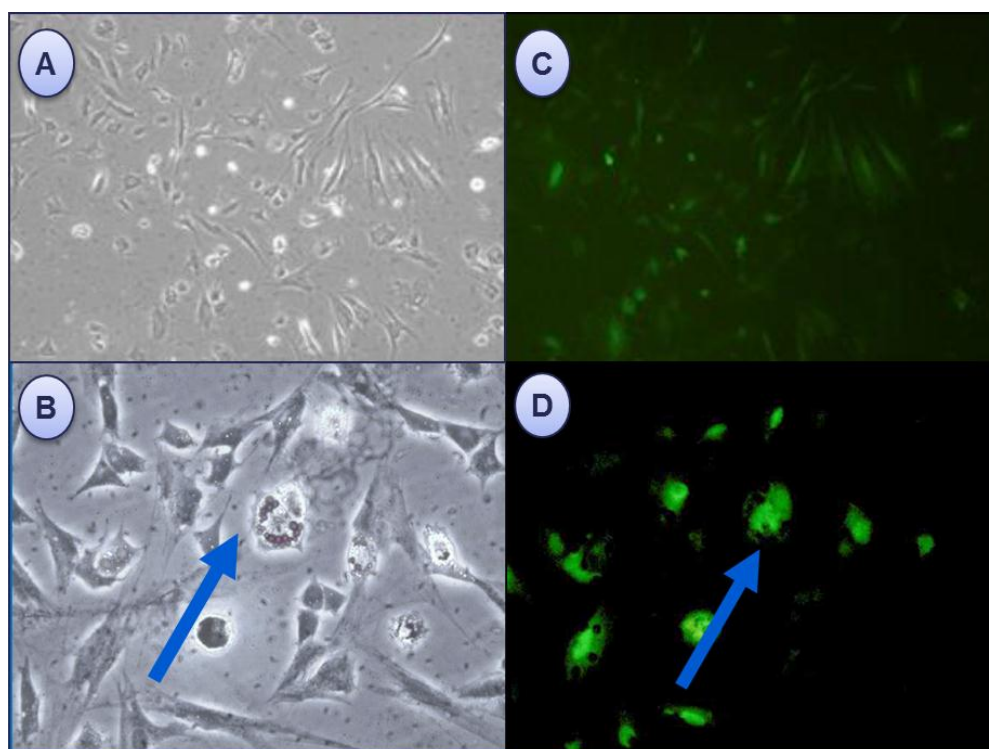


Figura 29: Diferenciación a adipocito. Visión al microscopio de las MSC tras 14 días de cultivo en medio de crecimiento de adipocitos y tñido con Oil Red.

A: visión con luz blanca a 4 aumentos, B: visión bajo luz azul y microscopio de fluorescencia a 4 aumentos, C: visión con luz blanca a 40 aumentos, D: visión con luz azul y microscopio de fluorescencia a 40 aumentos.

- **Diferenciación a osteocito**

Tras 21 días de cultivo en medio de diferenciación para osteocitos algunas de las células adquirieron morfología triangular, en ellas la tinción con Alizarin Red demostró la presencia de depósitos cálcicos en la matriz extracelular (Figura 30). Dichas células observadas bajo luz azul con microscopio de fluorescencia mantenían la fluorescencia verde. Se puede concluir que las MSC transducidas con GFP no pierden la capacidad de diferenciación a osteocito.

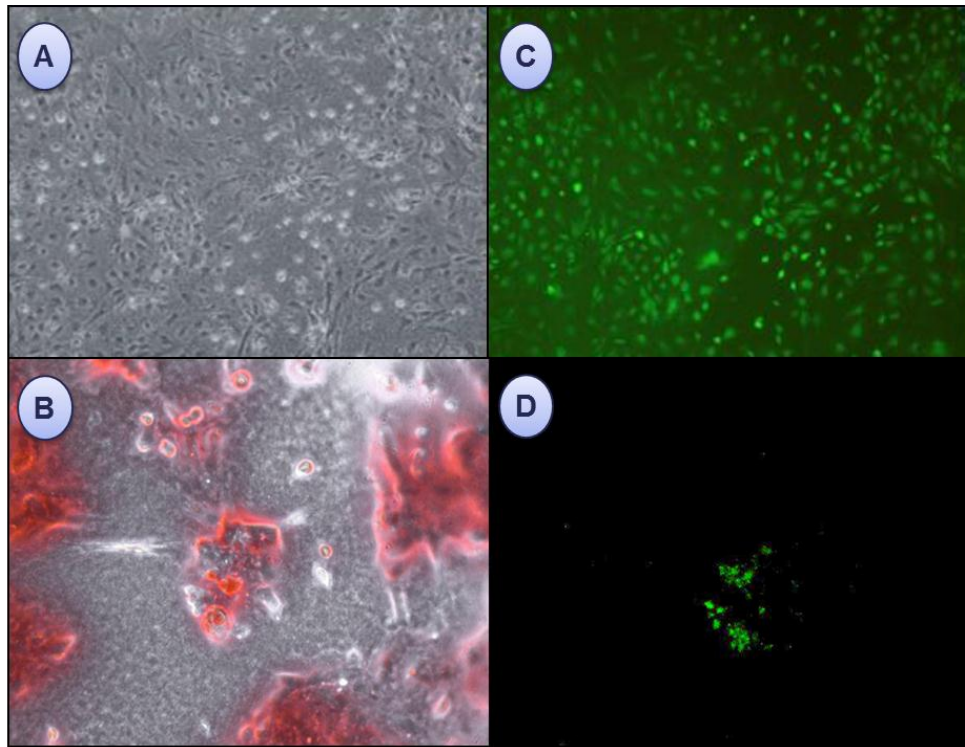


Figura 30: Diferenciación a osteocito. Visión al microscopio de las MSC tras 21 días de cultivo en medio de crecimiento de osteocitos y teñido con Alizarín Red.

A: visión con luz blanca a 4 aumentos, B: visión bajo luz azul y microscopio de fluorescencia a 4 aumentos, C: visión con luz blanca a 40 aumentos. D: visión con luz azul y microscopio de fluorescencia a 40 aumentos.

- **Inmunofenotipaje de las MSC**

Las MSC fluorescentes expresaron anticuerpos propios de las células mesenquimales (CD 29 y CD 90) y no expresaron marcador hematopoyético CD45 (Figura 31). Se demostró de esta manera que las MSC mantienen sus características inmunofenotípicas tras la transducción con GFP.

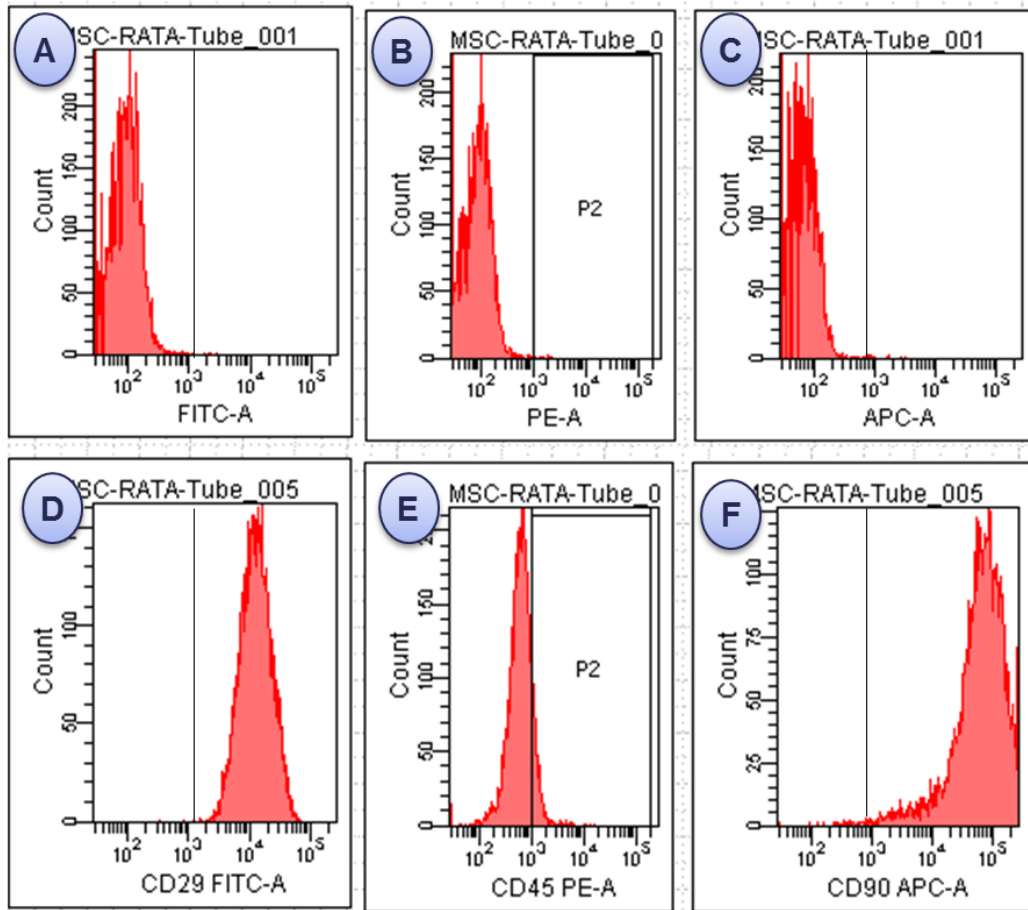


Figura 31: Inmunofenotipaje de las MSC fluorescentes

En la fila de arriba (A, B y C) pueden observarse los histogramas de las células MSC fluorescentes sin marcar. En la fila de abajo (D, E y F) se muestra el histograma de las células MSC fluorescentes tras haberse incubado con los anticuerpos CD29-FITC, CD45-PE y CD90-APC. Las células resultan positivas (umbral de fluorescencia positiva a 10^3) para CD29 (A y D) y CD90 (C y F).

2. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS PILOTOS

2.1. Cálculo de dosis óptima de MSC

Según lo expuesto en material y métodos (Figura 24) se testaron tres dosis distintas de MSC administradas por vía intravenosa (2×10^6 , 4×10^6 y 6×10^6), en uno, dos o tres bolos respectivamente, y se valoraron los resultados funcionales obtenidos en cada grupo tras su administración y a los 14 días.

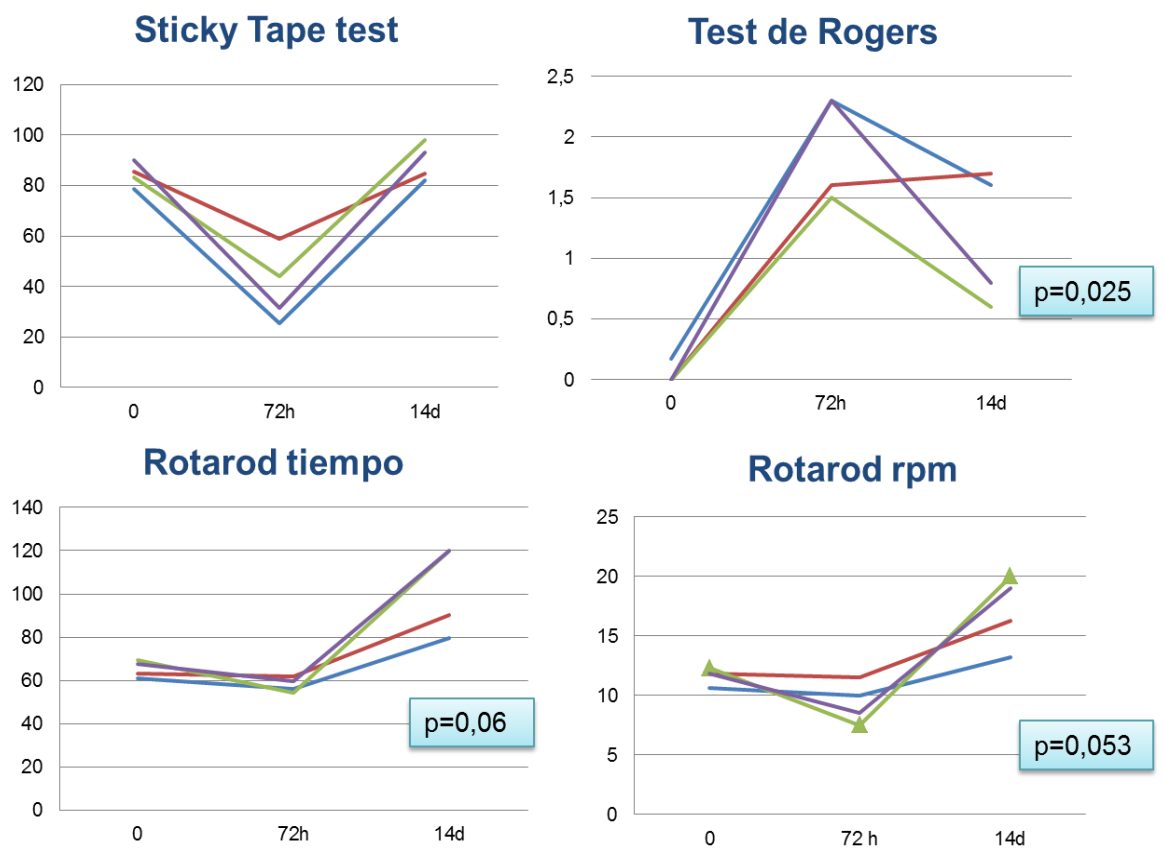


Figura 32 : Resultado experimento cálculo de dosis

En la figura pueden verse los gráficos que representan las medias de las puntuaciones obtenidas en las distintas pruebas por los distintos grupos de tratamiento. En el análisis de subgrupos sólo se encuentran diferencias significativas en el test de Rogers entre el grupo de 2 y 3 dosis respecto a los grupos control y de una dosis. En la prueba de Rotarod se encuentra una tendencia casi significativa a favor de los grupos de dos y tres dosis

— Control
— 1 dosis
— 2 dosis
— 3 dosis

Los resultados de los diferentes test antes de realizar el traumatismo son semejantes en todos los grupos. A las 72 horas tampoco se encuentran diferencias significativas en general ni en el análisis por subgrupos (Figura 32).

A los 14 días se encuentra una tendencia no significativa a mayor recuperación funcional en los grupos con dos y tres dosis que en los otros dos grupos, esta tendencia

no tiene significación estadística. En el análisis de subgrupos se encuentran las siguientes diferencias significativas:

- Test de Rogers entre los grupos de 2 y 3 dosis ($0,6 \pm 0,3$) y el grupo control y tratamiento ($1,6 \pm 0,2$) $p= 0,025$

- Test de Rotarod en rpm entre los grupos de 2 y 3 dosis ($19,5 \pm 0,2$) y el grupo control y tratamiento ($13,5 \pm 3,2$) $p= 0,025$

- Test de Rotarod en tiempo entre los grupos de 2 y 3 dosis (118 ± 4) y el grupo control y tratamiento (85 ± 9) $p= 0,025$

No existen diferencias en ninguno de los test relevantes entre los grupos de 2 y 3 dosis, por lo que finalmente se selecciona la dosis de 4×10^3 repartida en dos bolos como la dosis a utilizar en el estudio.

2.2. Estudio de la magnitud de trauma craneal

La mortalidad perilesional (asumible directamente a la lesión traumática y no relacionada con condiciones previas del animal, errores técnicos ni complicaciones de la anestesia) encontrada en los grupos de 25 y 35 gramos la mortalidad fue de 1/5 y 1/5.

Los resultados funcionales de las distintas pruebas indican que el deterioro funcional aumenta a medida que aumenta el peso con el que se realiza el ICC (Figura 33).

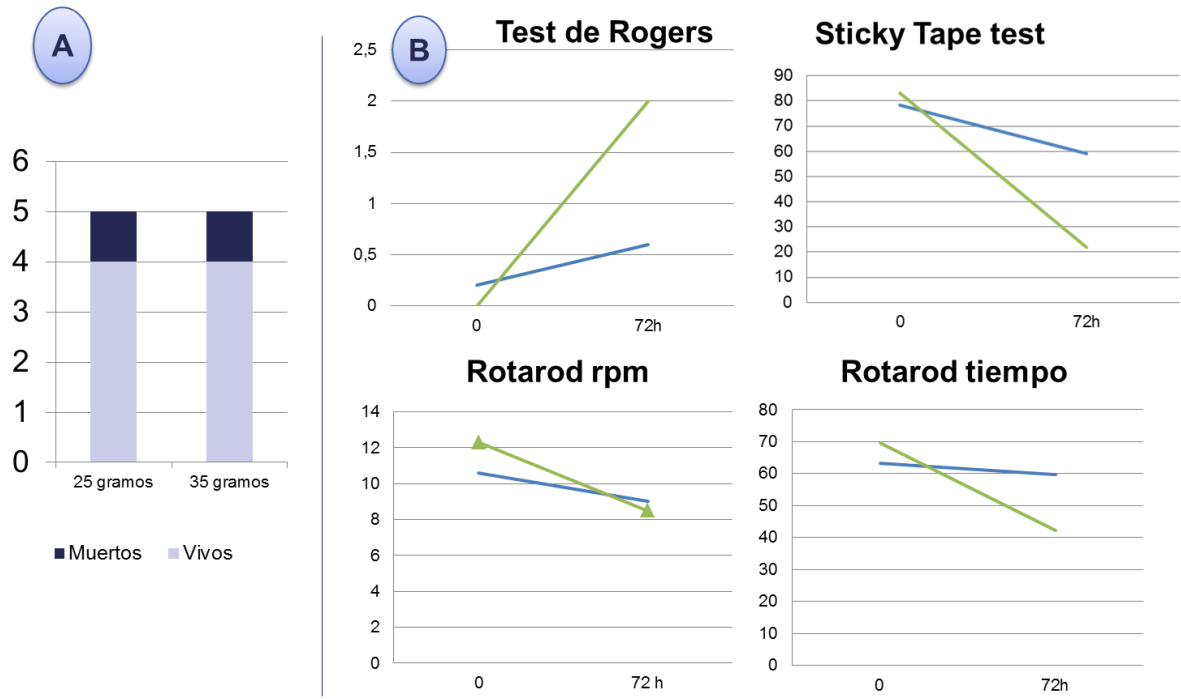


Figura 33 : Resultado estudio de la magnitud del trauma

A: Gráfico que expresa la mortalidad en cada grupo. B: Gráficos que muestran la media de los resultados funcionales en los distintos grupos.

— 25 gramos
— 35 gramos

Finalmente se selecciona el peso de 35 gramos como el idóneo (produce un TCE con una mortalidad aceptable) para realizar un ICC en ratas de 150 a 200g.

3. RESULTADOS FUNCIONALES DEL EXPERIMENTO PRINCIPAL

Tras definir, en base a los resultados de los estudios pilotos, el peso de la barra a utilizar en el modelo de ICC y la dosis de MSCs se realiza el experimento principal según lo indicado en la Figura 26.

No se encuentran diferencias significativas en el peso medio de los animales antes del trauma siendo la media de $188,17 \pm 5,8$ g en el grupo control, de $169,27 \pm 4,6$ g en el grupo control iv y de $179,33 \pm 38,46$ g en el grupo tratamiento.

No se producen muertes causadas por el TCE. Dos animales fallecieron (uno en el grupo control iv y otro en el grupo tratamiento) por depresión respiratoria en relación con la administración de la anestesia y un tercero por un error en la técnica quirúrgica en el grupo tratamiento (sección de la vena parietal al retirar el músculo temporal). Las pérdidas fueron sustituidas con otro animal para obtener un número final de 10 animales por grupo (Figura 34).

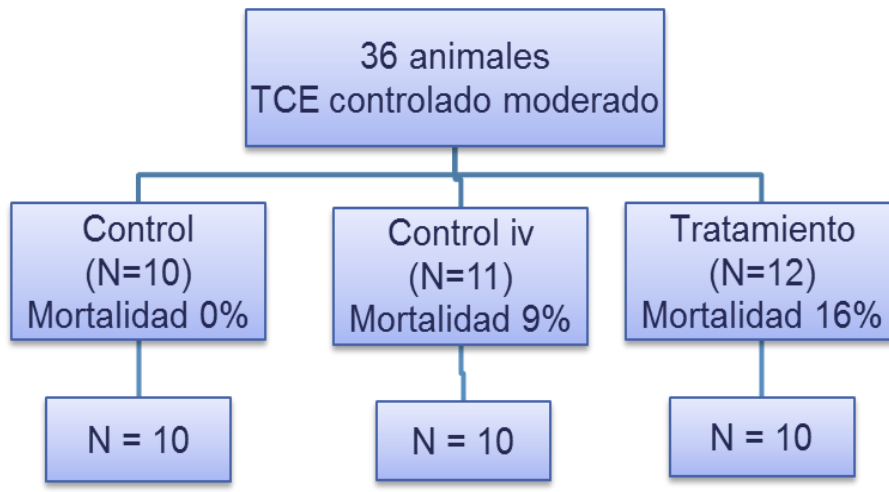


Figura 34: Mortalidad perilesional en los distintos grupos. La mortalidad en todos los grupos resulta menor del 20%. Cada pérdida es sustituida por otro animal para obtener 10 animales en cada grupo.

3.1. RESULTADOS FUNCIONALES ANTES DEL TRAUMA CRANEAL

En el momento 0 (pretratamiento) no existen diferencias entre los distintos grupos en cuanto a resultados funcionales (Figura 35).

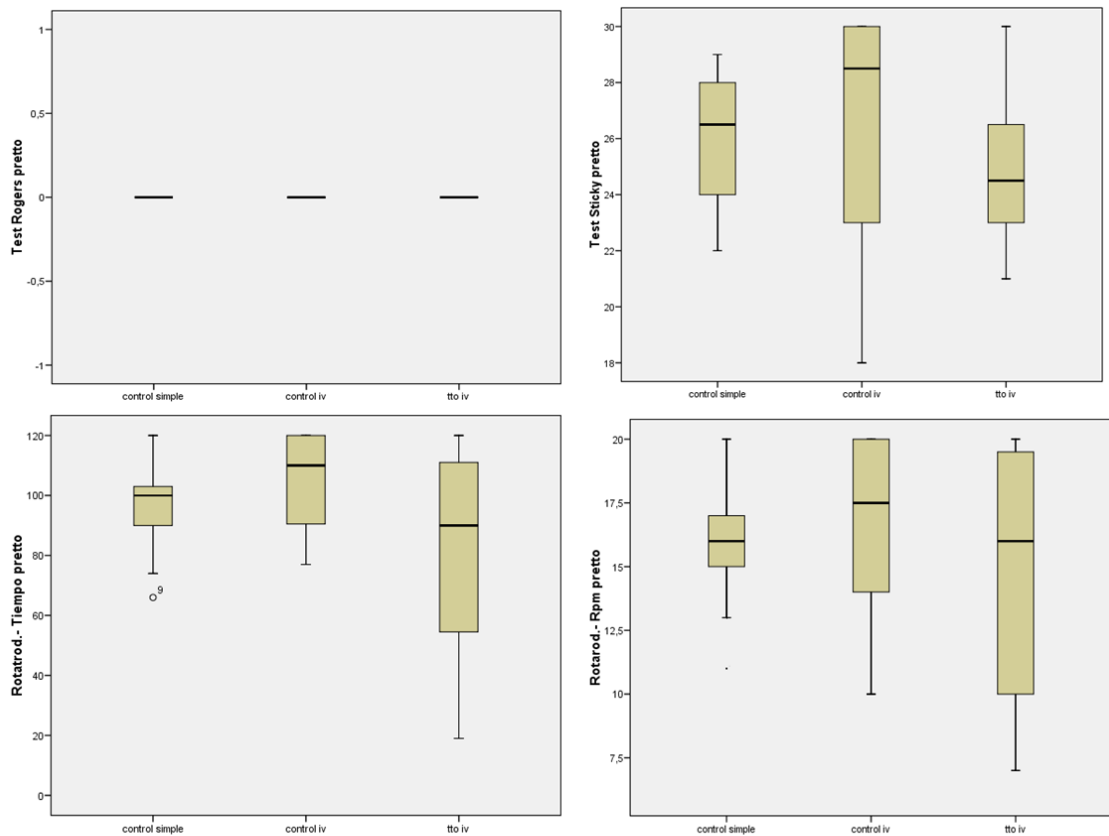


Figura 35: Evolución funcional previa al trauma. Se observan los diagramas de cajas de los distintos grupos en las pruebas funcionales antes de realizar el trauma. La línea central expresa la media y los extremos de la caja la desviación estándar.

3.2. EFECTOS ADVERSOS DURANTE LA INFUSIÓN

Durante la infusión de las MSC lenta por vía intravenosa, se detectaron episodios de desaturación en ambos grupos, por debajo del 93%, que se solventaron disminuyendo la concentración de formaldehído inspirado en la anestesia de 2% a 1%. Los episodios de taquicardia registrados fueron autolimitados y no tuvieron consecuencias adversas. En la Tabla 10, se muestra que no hubo diferencias entre los grupos respecto la aparición de efectos adversos durante la infusión.

| TABLA 10: EVENTOS ADVERSOS DURANTE LA INFUSIÓN DE LAS MSC | | |
|---|------------------------------|-----------------|
| | Alteraciones SO ₂ | Alteraciones Fc |
| GRUPO CONTROL IV | 0,5 ± 0,52 | 0,3 ± 0,51 |
| GRUPO TRATAMIENTO | 0,6 ± 0,64 | 0,4 ± 0,69 |
| <i>p valor</i> | >0,05 | >0,05 |

Efectos adversos durante la infusión de las MSC. Los resultados se expresan como media de eventos adversos presentados durante la infusión por cada animal.

3.3. RESULTADOS DE LOS TEST FUNCIONALES

- **STICKY TAPE TEST**

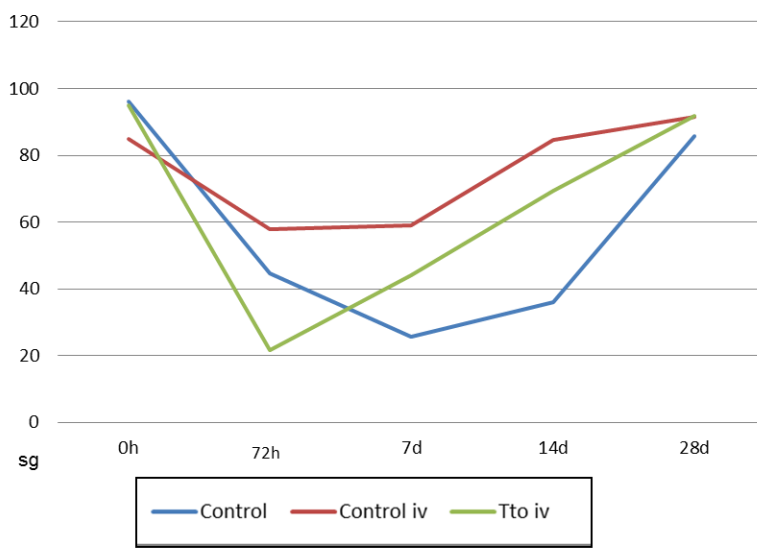


Figura 36: Resultados del Sticky tape test modificado: En la gráfica de abscisas se representa el tiempo total en sg que el animal pasa intentando retirar la cinta adhesiva de la pata siendo el tiempo máximo de observación 120 sg. En ordenadas se representa el momento de realización de la prueba. El tiempo 0 corresponde a la evaluación o retratamiento.

En la prueba del mST test se observa un marcado deterioro a las 72 h (Figura 36) en todos los grupos. Tras un descenso inicial, se produce una mejoría progresiva hasta alcanzar valores próximos a los basales. No existen diferencias significativas en la puntuación a los 28 días entre los tres grupos experimentales. Sin embargo en la gráfica también puede observarse que en el grupo tratamiento el deterioro a las 72 horas es más acusado y que a los 7 días los animales presentan ya cierta recuperación. En el resto de los grupos, la recuperación se observa a partir de los 14 días.

En la Tabla 11 puede verse que la recuperación (valorada como la diferencia entre los segundos alcanzados en el momento de mayor deterioro funcional y los segundos registrados en la evaluación final) es mayor en el grupo tratamiento que en los controles. Esta diferencia sí resulta significativa.

| TABLA 11: MEJORÍA EN LA FUNCIÓN SENSITIVA | | | |
|---|-------------------|------------------|-------------------|
| | sg a las 72 horas | sg a los 28 días | Mejoría (sg) |
| GRUPO CONTROL | 59,45 ± 29,40 | 90,2 ± 15,40 | 31 ± 22,60 |
| GRUPO CONTROL IV | 44,76 ± 24,70 | 84 ± 16,51 | 45 ± 24,70 |
| TRATAMIENTO | 24,46 ± 28,88 | 94 ± 18,69 | 76 ± 18,69 |
| P valor | | | 0,023 |

Mejoría en la función sensitiva. Los valores expresados son medias y desviación estándar en segundos. La mejoría se expresa como la diferencia entre los segundos alcanzados en el momento de mayor deterioro funcional (3 días del trauma) y los segundos alcanzados en la valoración final (4 semanas). P valor: Kruskal-Wallis)

- **TEST DE ROGERS**

En el test de Rogers (Figura 37) a las 72h se produce un aumento en la puntuación en todos los grupos, lo que refleja el deterioro funcional producido por el trauma. En el análisis de pares existe una diferencia significativa entre el grupo tratamiento intravenoso y ambos grupos control ($p=0,001$ con el control iv y $0,025$ con el control). Más tarde se normaliza hasta alcanzar los niveles basales, excepto en el grupo control iv donde se mantiene muy elevado en los días 14 y 28.

La mejoría funcional conseguida (diferencia entre el mayor valor en la fase de máximo deterioro y el menor valor alcanzado en la fase de recuperación) es mayor en el grupo de tratamiento ($p<0,05$). El resultado negativo observado en el grupo control iv ha sido achacado a un sesgo de observación. En la gráfica puede observarse que el inicio de la mejoría empieza antes en el grupo tratamiento que en el grupo control.

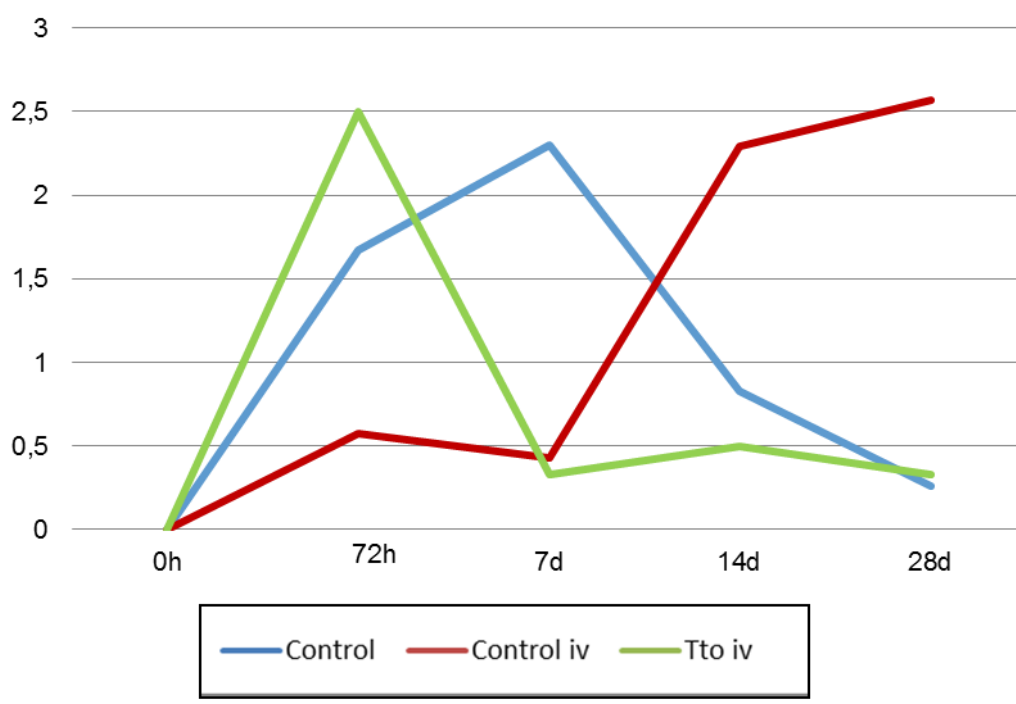


Figura 37: Resultados del test de Rogers: En la gráfica de abscisas se representa la puntuación adjudicada a cada animal del 0 (mejor puntuación) al 5 (muerte). En ordenadas se representa el momento de realización de la prueba. El tiempo 0 corresponde a la evaluación pretratamiento.

| TABLA 12: MEJORÍA EN LA FUNCIÓN MOTORA | | | |
|---|----------------------------|-----------------------------|----------------|
| | Rogers las 72 horas | Rogers a los 28 días | Mejoría |
| GRUPO CONTROL | 0,81 ± 0,816 | 0,33 ± 0,516 | 0,48 ± 1,03 |
| GRUPO CONTROL IV | 0,57 ± 0,52 | 2,57 ± 1,13 | -1,98 ± 0,695* |
| TRATAMIENTO | 2,5 ± 0,919 | 0,33 ± 0,69 | 2,19 ± 0,816 |
| P valor | | | 0,001 |

Mejoría en la función motora. Los valores expresados son medias y desviación estándar de la puntuación en el test de Rogers. La mejoría se expresa como la diferencia entre la peor puntuación observada en el momento de mayor deterioro funcional (a los 3 días del trauma) y puntuación en la valoración final (a las 4 semanas). p valor Kruskal- Wallis. El valor negativo significa que en el grupo control se encuentra empeoramiento en esta test a los 14 y 28 días.

- **TEST DE ROTAROD**



Figura 38: Resultados del test de RotaRod: A. En la gráfica de abscisas se representan las revoluciones alcanzadas en la prueba por cada animal. B: En la gráfica de abscisas se representa el tiempo en sg que pasa cada animal en el rodillo. En ordenadas se representa el momento de realización de la prueba. El tiempo 0 corresponde a la evaluación pretratamiento.

En la evaluación con el Rotarod (Figura 38) tanto en el tiempo máximo alcanzado como en el número de rpm no se observa un gran deterioro (72 horas). El grupo tratamiento consigue una puntuación ligeramente mejor a los 14 y a los 28 días, pero esta diferencia no es significativa.

4 RESULTADOS ANATOMÍA PATOLÓGICA

4.1 ANÁLISIS MACROSCÓPICO A LOS 21 DÍAS

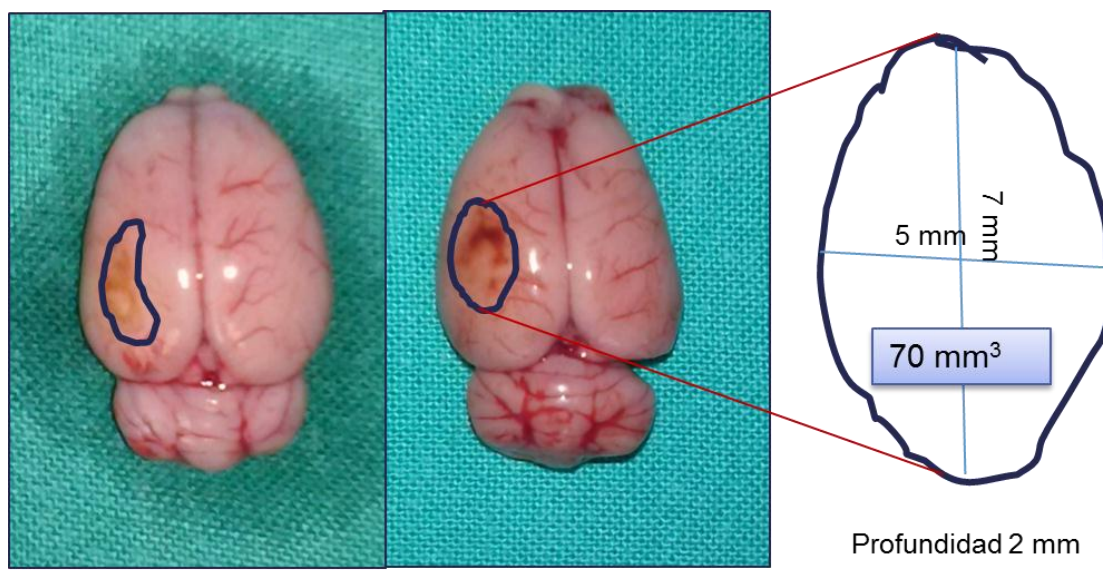


Figura 39: Visión macroscópica

Se muestra la visión macroscópica de dos cerebros extraídos a los 28 días del trauma. El volumen de la lesión se calcula midiendo los diámetros máximos horizontal y vertical y la profundidad de la lesión.

En el estudio macroscópico de los cerebros a los 28 días se calcula el volumen de la lesión midiendo los diámetros máximos horizontal y vertical y la profundidad de la lesión (Figura 39).

Al comparar el volumen medio de la lesión a los 28 días ($73,58 \pm 29,34$ en el grupo control, $64,97 \pm 45,54$ en el grupo control iv y $81 \pm 37,96$ en el grupo tratamiento) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos $p=0,8$.

4.2 TINCIÓN CON HEMATOXILINA EOSINA

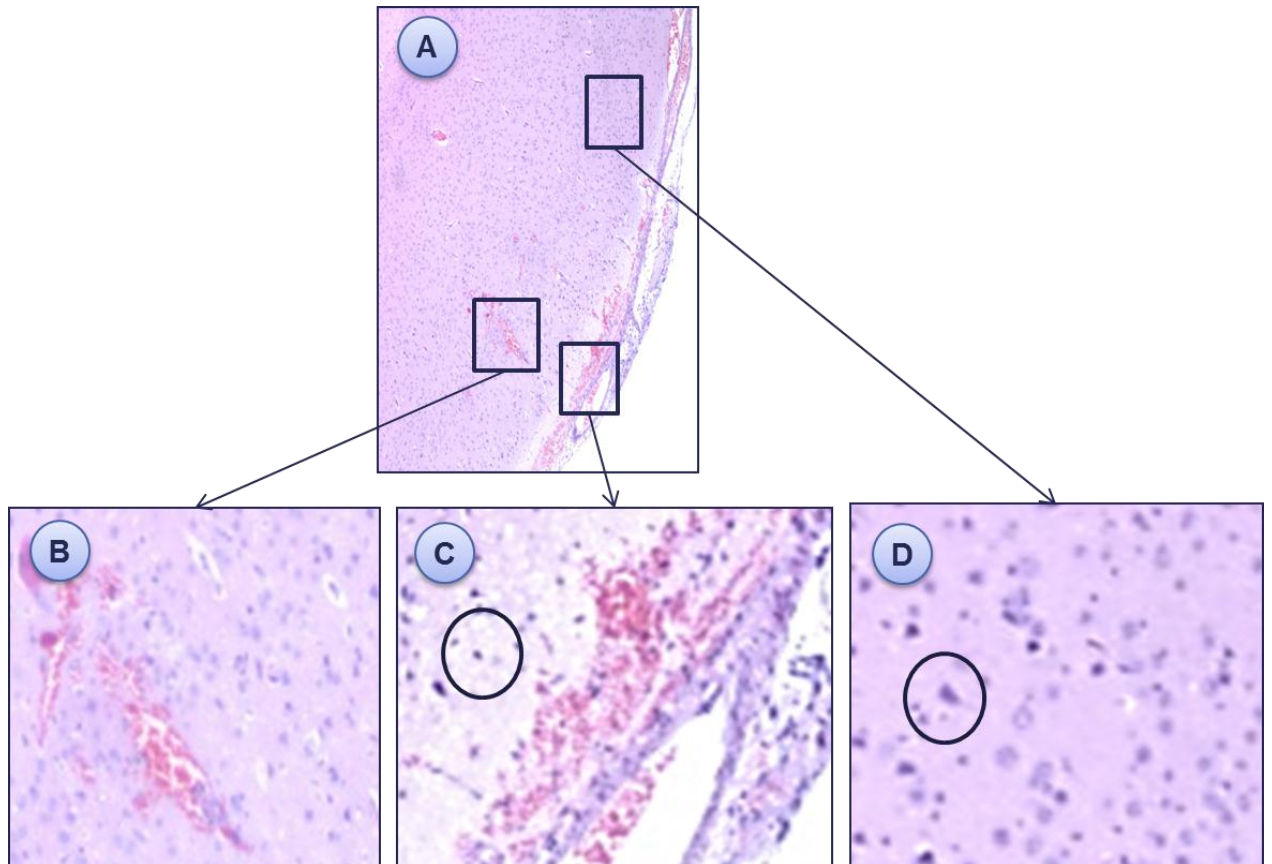


Figura 40: Tinción con hematoxilina eosina

A: Se observa la zona de la corteza correspondiente a la lesión. B: detalle de hematíes saliendo del vaso. C: detalle de zona periférica al área de necrosis en el que se observa rotura de los vasos sanguíneos, células en apoptosis con gran edema intracelular. D: células neuronales de morfología triangular .

En el análisis con hematoxilina eosina del cerebro extraído a las 48 horas de la infusión de las MSC se observa en los cortes correspondientes a la zona parietotemporal del hemisferio izquierdo una gran zona de necrosis a nivel de la corteza, con hematoma y separación de las meninges (Figura 40 A). A mayor aumento puede observarse rotura de capilares con salida de hematíes (Figura 40B). En la zona de mayor lesión las células presentan edema intracelular con morfología de células en apoptosis (Figura 40C).

4.3 TINCIÓN CON VIMENTINA

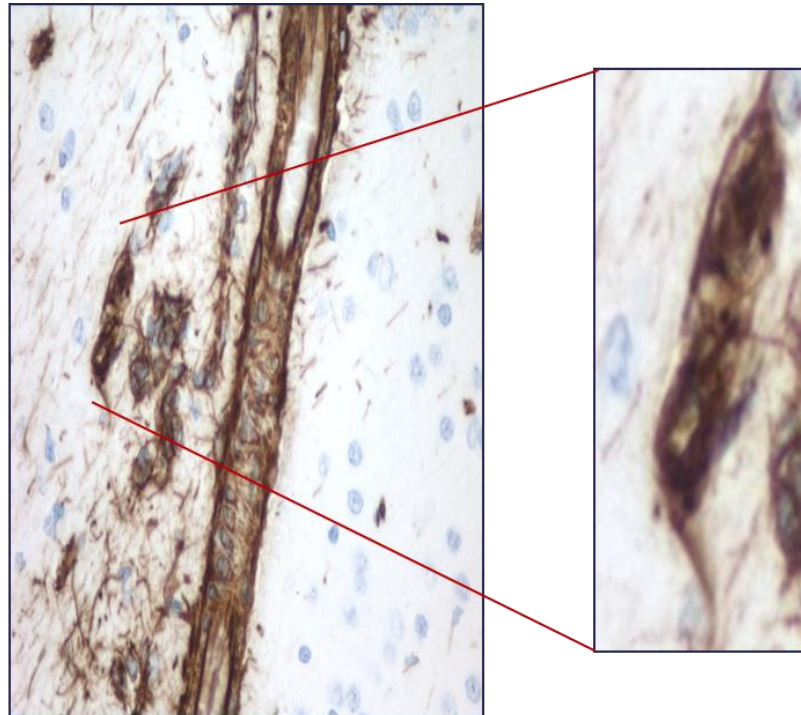


Figura 41: Tinción con vimentina. La tinción con vimentina a las 48 horas reveló células con morfología estrellada propia de las MSC

Tras realizar la tinción con vimentina (Figura 41), la visión al microscopio de los cortes correspondientes al área parietotemporal izquierda muestra células que han adquirido una coloración marronácea alrededor del núcleo y que tienen una morfología estrellada propia de las MSC en la zona periférica de la lesión.

4.4 ESTUDIO DE FLUORESCENCIA

Los cortes de los cerebros procesados a las 48 horas de la infusión se examinan al microscopio de fluorescencia bajo luz azul, sin haber realizado ningún marcaje con ac fluorescentes. Toda la fluorescencia observada es debida a la autofluorescencia de las MSC GFP⁺. Se encuentran células fluorescentes en el área parietotemporal en distintos cortes (Figura 42).

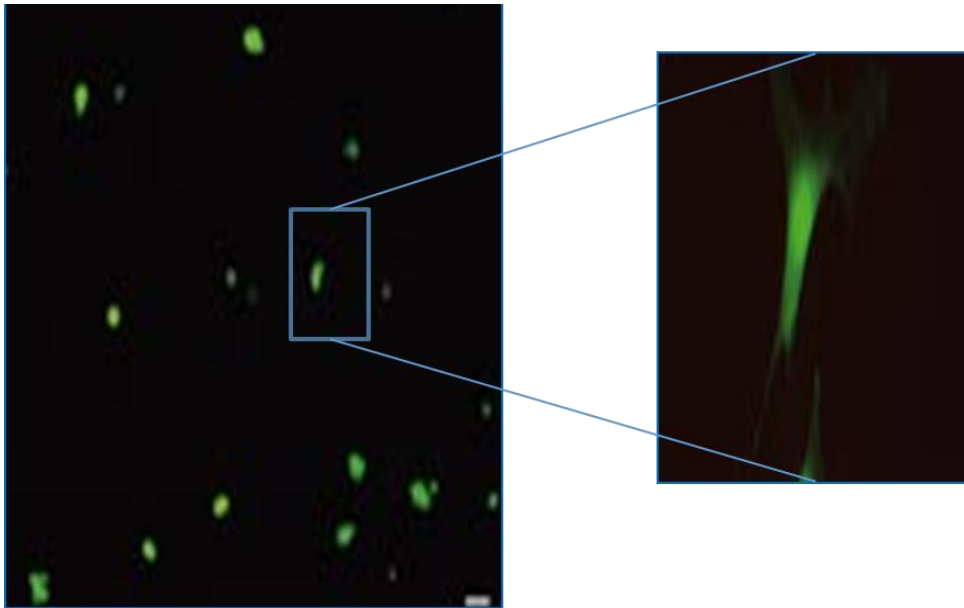


Figura 42: Estudio de fluorescencia directa. Visión al microscopio de fluorescencia bajo luz azul de los cortes de la zona perilesional.

Tras realizar doble marcaje fluorescente con anticuerpos anti GFP en los cortes de hígado, cerebro y pulmón se encuentran células que expresan dicha proteína. En el hígado y el pulmón la proporción de estas células es mucho mayor que en el cerebro (Figura 43). La diferencia de esta proporción no se ha cuantificado.

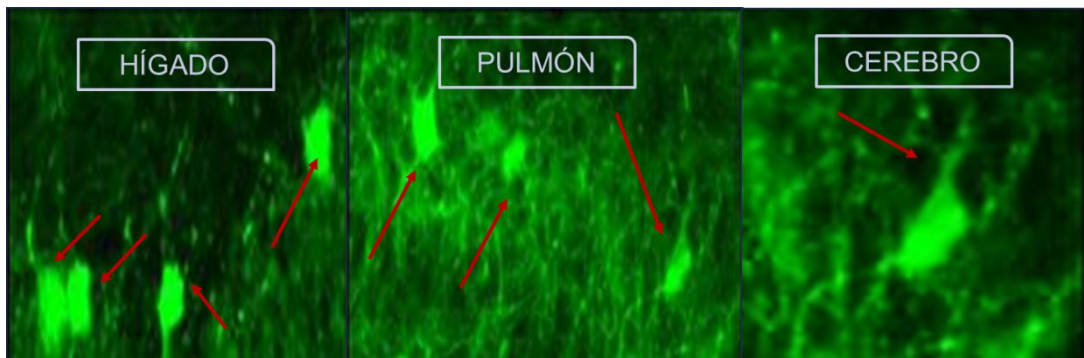


Figura 43: Estudio de fluorescencia tras marcaje con ac anti-GFP. Visión al microscopio de fluorescencia de cortes de hígado, cerebro y pulmón respectivamente a las 48 horas. En hígado y pulmón se encuentran gran cantidad de células que GFP⁺. En el tejido cerebral se encuentra alguna célula GFP⁺ aislada.

5. CITOMETRÍA.

5.1. CITOMETRÍA DE AMBOS HEMISFERIOS CEREBRALES EN EL DÍA +2

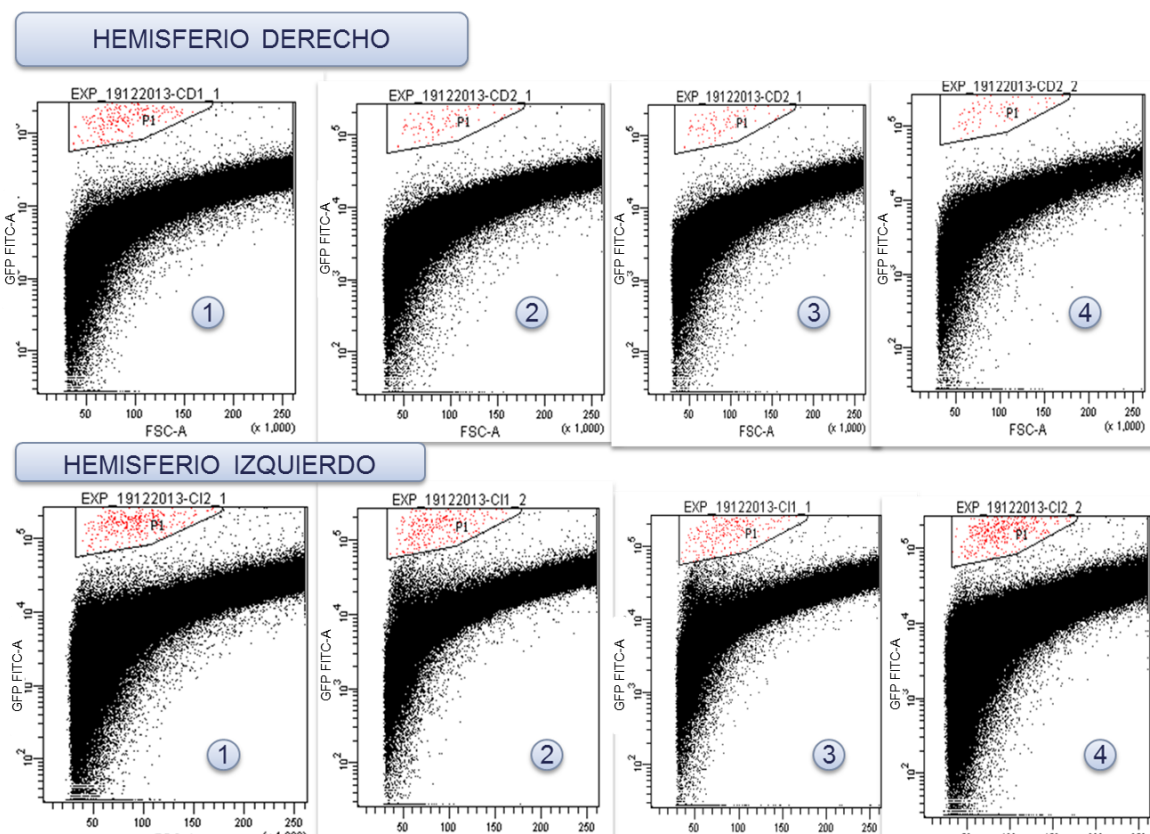


Figura 44: Citometría de ambos hemisferios cerebrales a las 48 horas de la infusión. Se representan los resultados obtenidos con la suspensión celular de hemisferio izquierdo y derecho para cuatro muestras diferentes de tejido cerebral a las 48 horas de la infusión de MSC tras marcaje con ac GFP-FITC-A. Eventos adquiridos (1×10^6) distribuidos mediante su tamaño y complejidad. Las células rojas son las que expresan GFP⁺ (Población 1=P1).

Se realiza la citometría ajustando el citómetro con parámetros específicos de MSC (tamaño y complejidad). Se estudian las células en función de su tamaño y su positividad para GFP-FITC. En la Figura 44 se observa que las células se dividen en dos poblaciones, una de las cuales (Población 1) tiene tamaño y complejidad propia de MSC y son expresan proteína G fluorescente (MSC-GFP⁺). En los siguientes gráficos se detalla la comparación de la población 1 en las diferentes muestras y distintos hemisferios.

El porcentaje de células de la población 1 (MSC-GFP⁺) encontradas en el hemisferio izquierdo es de $7,17 \times 10^{-4}$ ($\pm 0,84 \times 10^{-4}$) % y en el hemisferio derecho de $3,33 \times 10^{-4}$ ($\pm 0,42 \times 10^{-3}$) % (Figura 45). El test Kruskal Wallis encuentra una diferencia significativa entre ambos grupos con $p=0,001$

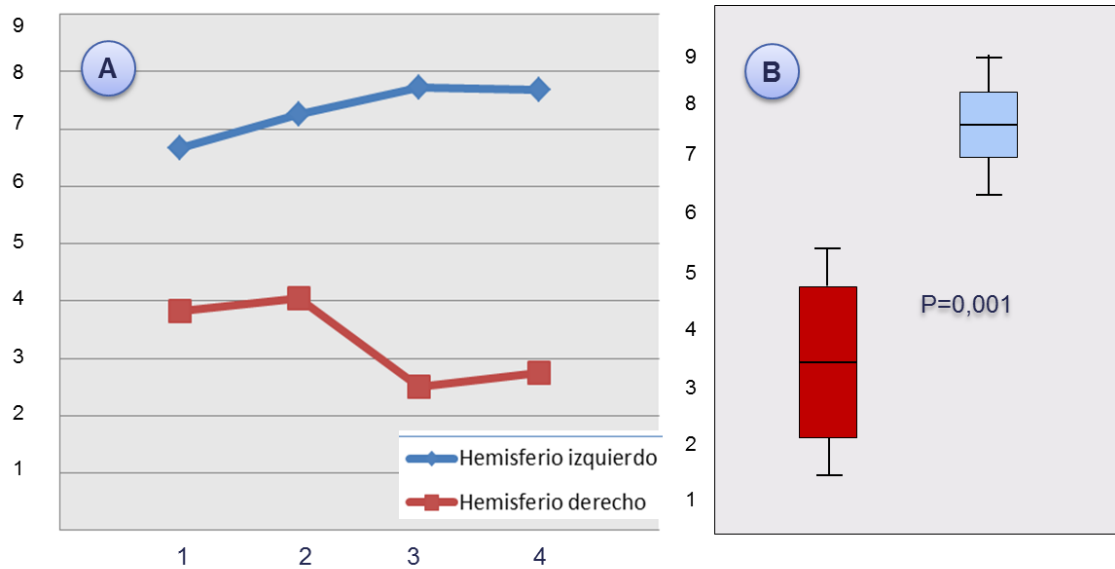


Figura 45: Porcentaje de MSC fluorescentes en cada hemisferio. A: En abscisas se representa el porcentaje de P1 encontradas en cada hemisferio expresado en 1×10^{-4} del total del número de células adquiridas. En ordenadas se expresa el número de muestra. B: Diagrama de cajas que representa la media y la desviación estandar de p1 en cada hemisferio cerebral

En el pulmón el porcentaje de MSC-GFP⁺ fue de 1,8 ($\pm 0,49$) %, es decir 2570 veces mayor que en el cerebro ($5,5 \times 10^{-4}$).

5.2. ESTUDIO POR CITOMETRÍA DE LAS CÉLULAS OBTENIDAS DE PULMÓN Y CEREBRO EN EL DÍA +28

Las células de la suspensión celular de los cerebro extraídos a los 28 días, se incuban con ac anti-GFP-FITC (Figura 46).

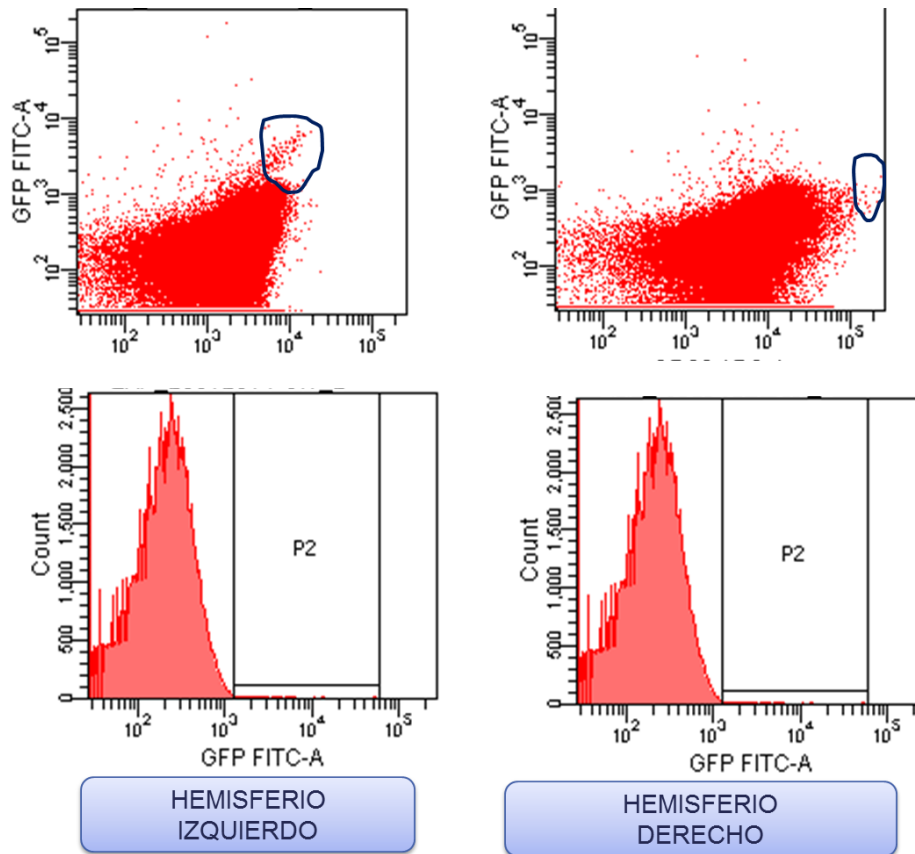


Figura 46: Citometría de ambos hemisferios a los 28 días del trauma. Se representan los resultados obtenidos para la suspensión celular de hemisferio izquierdo y derecho para 2 muestras diferentes de tejido cerebral a los 28 días de la infusión de MSC. Eventos adquiridos (1×10^6) distribuidos mediante su tamaño y complejidad. Las células rojas son las que producen captación intensa para el color verde, es decir son MSC-GFP⁺ (Población 2=P2).

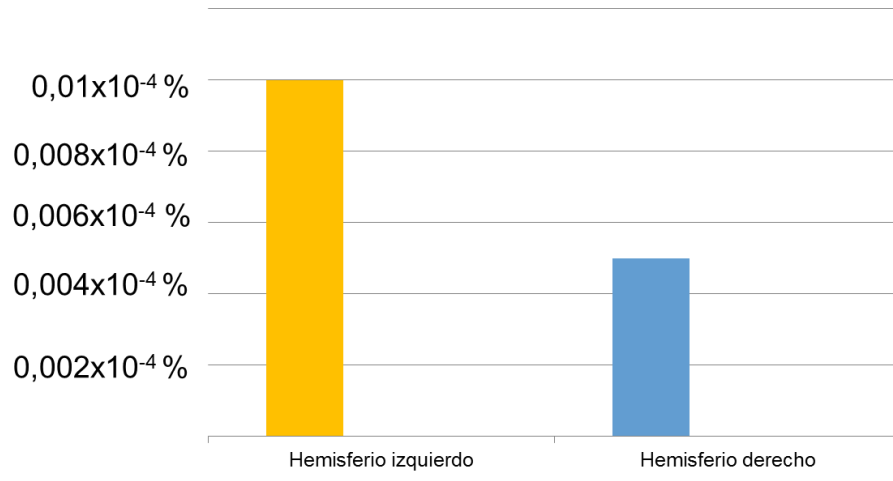


Figura 47: Porcentaje de células MSC-GFP⁺ en cada hemisferio a los 28 días.

La media de células de la población 2 encontradas en el hemisferio izquierdo es de $0,01 \times 10^{-4}$ y en el hemisferio derecho de $0,005 \times 10^{-4}$ (Figura 47). No se calcula la varianza ni se realiza estudio estadístico por disponerse sólo de dos muestras de cada tejido.

DISCUSIÓN

Este estudio pretende contrastar la hipótesis de que la infusión intravenosa de células madre mesenquimales, en la fase aguda del daño cerebral, consigue mejorar la recuperación motora y sensitiva a medio plazo, en ratas jóvenes con daño cerebral traumático. Se plantean también valorar la seguridad de la infusión de MSC alogénicas obtenidas de tejido graso. Como objetivo secundario se estudia el anidamiento y la supervivencia de las MSC en el cerebro.

Este estudio aporta novedades respecto a estudios previos. La mayoría de trabajos, sobre MSC como terapia iv en el TCE, utilizan MSC procedentes de médula ósea^{169, 171-178}. Existe muy poca experiencia con las MSC procedente de tejido graso. Los estudios experimentales con MSC en trauma craneal utilizan ratas adultas y hasta el momento no se ha publicado ningún estudio sobre terapia celular en el TCE en modelo de animales jóvenes.

1. RECUPERACIÓN SENSITIVO-MOTORA Y COGNITIVA

Los resultados muestran que, aunque la recuperación en el grupo tratamiento se inicia antes, un mes después del TCE no existen diferencias entre los tres grupos a nivel sensitivo-motor ni cognitivo. Los déficits funcionales que aparecen tras un traumatismo craneoencefálico son complicados de medir en roedores. Cuando no se observan déficits de algún tipo en un animal, es difícil saber si es porque el animal se ha recuperado totalmente o por una falta de capacidad de la prueba utilizada para detectar el déficit. La elección de uno u otro test puede influir determinadamente en los resultados encontrados.

1.1. Recuperación sensitiva

El sticky tape test modificado mST es una prueba que mide la capacidad somatosensorial. Para realizarlo adecuadamente el animal debe mantener intactas la sensibilidad en la pata donde se coloca la cinta y en la boca y la destreza motora

necesaria para morder y retirar la cinta de la pata. Ciertos autores recomiendan entrenamiento previo de los animales durante una semana para mejorar la destreza en el test¹⁸⁰. En nuestro experimento no se llevó a cabo este entrenamiento porque al realizar la prueba durante 5 días consecutivos en animales intactos no había diferencia en las puntuaciones al principio y al final del entrenamiento. Este el hecho nos lleva a pensar que el acto de retirar la cinta es algo instintivo en las ratas y no es susceptible de aprendizaje.

Al mes de la lesión la puntuación alcanzada en este test es semejante a la basal en todos los grupos lo que indicaría una completa recuperación de las áreas sensitivas afectadas por el trauma (Corteza somatosensorial primaria: S₁TR, S₁FL, S₁HL, S₁BF)¹⁵⁷ (Figura 12) o que otras áreas cerebrales suplen esta función.

La principal diferencia entre el grupo tratamiento y los controles es que, en los animales tratados, el deterioro sensitivo a las 72 horas es más profundo y por tanto, la recuperación para llegar al estado basal es mayor. Además se observa que esta mejoría empieza antes que en los otros dos grupos.

Otros estudios que evalúan la terapia con MSC iv en la fase aguda del DCT y que encuentran recuperación funcional al mes de la lesión^{171-174,177} no utilizan en sus resultados test sensitivos puros sino que utilizan el test mNSS, un test compuesto que evalúa de forma conjunta la función sensitiva, el equilibrio y los reflejos del animal¹⁸⁴. Por este motivo, no es posible determinar el nivel de recuperación de la función sensitiva al mes de la lesión en los animales de estos estudios para compararlos con nuestros resultados.

1.2. Recuperación motora

La lesión causada por nuestro modelo de ICC a nivel temporoparietal da lugar, a nivel motor, a paresia o parálisis de la extremidad superior izquierda por afectación de la corteza motora primaria y suplementaria. La función motora fue evaluada por dos pruebas: el test de Rogers y el test de Rotarod^{181,182}.

El test de Rogers es considerado un test motor puro. Existen varias versiones de este test que puntúan la motilidad de la rata en una escala de 5 o de 7 puntos, tras suspensión por la cola o desplazándose sobre una superficie¹⁸¹. En la versión original una rata intacta tendrá una puntuación de 0 y una rata muerta tendrá una puntuación de 5 (Figura 20). Los estados intermedios son evaluados por el experimentador por lo que es un test bastante subjetivo. Así la diferencia entre una puntuación de 1 (disminución de la

motilidad del miembro lesionado) y de 2 (desplazamiento en círculo hacia el lado de la lesión) puede resultar sutil.

La puntuación media del test en el grupo control y tratamiento es similar a los 28 días lo que indica una recuperación completa de la función motora en ambos grupos. Sin embargo la puntuación en el test a las 72 horas es peor en el grupo tratamiento; en los test intermedios la puntuación aumenta más en el grupo tratamiento que en los controles lo que indica una más rápida y más intensa recuperación motora en este grupo.

Nuestros resultados en esta prueba para el grupo control iv resultan contradictorios, ya que este grupo, que muestra buena recuperación funcional en las pruebas de Rotarod y mST, parece empeorar en la prueba de Rogers a medida que pasa el tiempo. Esto puede deberse a que dos experimentadores diferentes evaluaron a los animales de este grupo en las diferentes semanas (un mismo observador realizó la prueba en el resto de los grupos), de forma que ha podido existir un sesgo de observación. Una evaluación por pares podría paliar este efecto en próximos estudios.

El test de Rotarod es considerado un test motor puro en algunos trabajos, pero en realidad es un test que mide también el equilibrio, la coordinación e implica cierto grado de aprendizaje^{199,200}. En este estudio, a falta de test comportamentales en campo abierto, o test que valoren acciones complejas, se utilizan los resultados del test de Rotarod para medir la función cognitiva de los animales. Los animales, a base de repetir el ejercicio aprenden a mantenerse más tiempo en equilibrio sobre el rodillo. Algunos investigadores realizan entrenamiento de los animales una semana antes de comenzar el test para eliminar el componente de aprendizaje de la prueba. En este trabajo los animales solamente son sometidos a una prueba en la valoración inicial previa al trauma, por tanto, en los resultados obtenidos se debe considerar la variable aprendizaje. Esto explica que no exista una gran caída en las puntuaciones en la prueba en el momento de máximo deterioro funcional. Este fenómeno puede observarse también en otros estudios en los que no se realiza entrenamiento¹⁷⁵.

En nuestro estudio, los resultados obtenidos con el test de Rotarod los 28 días no muestran diferencias significativas entre los tres grupos de tratamiento. Harting et al tampoco encuentra diferencias en los resultados del test a los 14 días. Mahmood et al¹⁷¹, sin embargo, encuentra una clara superioridad en las puntuaciones del test de Rotarod alcanzadas a los 28 días de tratamiento, sus resultados vienen expresados como porcentaje de la puntuación basal, sin que en el trabajo se refleje cuál era esa puntuación basal, esto puede ser la causa de la diferencia de resultados obtenidos por su grupo.

En nuestro estudio, por otro lado, llama la atención que existe una marcada diferencia entre los resultados del test de Rogers y el test de Rotarod, ambos test motores. Esta diferencia podría explicarse por la mayor complejidad del test de Rotarod, en el que, como se ha descrito, están implicadas funciones de coordinación, propiocepción, equilibrio y aprendizaje. Nuestros resultados estarían reflejando una alteración a nivel de las áreas motoras primarias, que se refleja en un empeoramiento claro en la puntuación del test de Rogers a los 3 días, pero que no tiene un claro reflejo en la puntuación del test de Rotarod.

1.3. Recuperación cognitiva

Los resultados obtenidos en el test de Rotarod han sido utilizados para evaluar la función cognitiva en los animales por el componente de aprendizaje que conlleva, al no haber realizado los animales un entrenamiento previo y se concluye que no existe diferencia en la función cognitiva entre los controles y los animales del grupo tratamiento. La falta de capacidad de nuestro estudio para detectar diferencias en la recuperación cognitiva entre los grupos puede deberse a que dicho test es incapaz de detectar alteraciones cognitivas más sutiles. En la actualidad existen test de realización de tareas complejas (alcanzar una bola, subir una escalera) y test de comportamiento en campo abierto¹⁸¹ que miden con mayor objetividad la función cognitiva de los animales. El test de Morris Water Maze sigue siendo el patrón de referencia.

El grupo de Harting et al¹⁷⁵, que utiliza para evaluar la función cognitiva el test de Morris, tampoco encuentra diferencia en la puntuación obtenida en los test cognitivos realizados (si bien el seguimiento en este estudio es solo de 14 días). Sokolova et al¹⁷⁷ encuentra una puntuación similar a las dos semanas en el grupo tratamiento y el control en los test de campo abierto, sin embargo, a las 10 semanas, en el grupo tratamiento no se observa la progresión del déficit que aparece en el control.

1.4. Otras consideraciones sobre los resultados funcionales obtenidos.

En nuestro estudio llama la atención la total recuperación de las funciones motoras y sensitivas de los animales a las 4 semanas. Esto puede deberse a que la lesión producida por nuestro modelo de TCE produce, en las áreas afectadas, una lesión funcional (inflamación, alteraciones en la vascularización, edematización transitoria de tejidos, cambios en la interconexión neuronal) más que lesiones estructurales irreversibles que impliquen muerte celular. Algunos trabajos muestran resultados similares que concuerdan con esta hipótesis¹⁷⁵.

Sin embargo la mayoría de estudios encuentran déficits persistentes en el mismo periodo de seguimiento^{162-166,171-174,177,178}. Esta discrepancia podría explicarse por la diferencia en la edad de las ratas utilizadas en el estudio. Las ratas de 6 semanas utilizadas en nuestro estudio tendrían una mejor capacidad de neurorestauración que las ratas adultas utilizadas por el resto de los grupos.

2. ANIDAMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE LAS MSC EN EL CEREBRO.

Como objetivo secundario de este estudio se plantea valorar si las MSC infundidas por vía intravenosa son capaces de alcanzar el territorio adyacente a la lesión traumática, implantarse y sobrevivir en este territorio un mes después.

Los resultados de inmunohistoquímica y citometría obtenidos indican que estas células alcanzan el tejido cerebral, a los dos días de haber sido infundidas y que algunas de ellas sobreviven a los 28 días.

2.1. ANIDAMIENTO A LAS 48 HORAS

En los cortes de cerebro obtenidos a las 48 horas de la infusión, la tinción con vimentina revela la presencia de MSC en la zona adyacente a la lesión. Para descartar que estas células sean MSC propias del animal receptor, se examinan al microscopio de fluorescencia bajo luz azul y se comprueba que tienen fluorescencia verde, lo que indica que son MSC-GFP⁺. Estos resultados se ratifican al marcar las células con ac anti-GFP y concuerdan con lo observado en otros trabajos. Varios grupos localizan, por diferentes técnicas de inmunohistoquímica en las primeras 48 horas tras el trauma, MSC en el tejido cerebral localizadas preferentemente en la zona adyacente a la lesión^{169,171-175,179}, aunque algunas de las células aparecen en la zona del hipocampo, el estriado y el cuerpo calloso.

Los resultados del estudio de citometría de los cerebros extraídos a las 48 horas muestran que el porcentaje de MSC-GFP⁺ en el hemisferio izquierdo $7,17 \times 10^{-4}$ % es el doble que en el derecho: $3,33 \times 10^{-4}$ %. En la mayoría de los trabajos no se cuantifica el porcentaje de células encontradas. Solamente Harting et al¹⁷⁵ analiza por citometría de infrarrojos el porcentaje de MSC-mo marcadas con Qtraker encontrando un $0,5 \times 10^{-3}$ % de las células administradas. Este porcentaje no puede ser comparado con nuestros resultados, ya que en su trabajo expresa el porcentaje del total de células infundidas y en el nuestro el porcentaje de todas las células del cerebro que son MSC-GFP⁺. Las MSC han demostrado capacidad inherente para migrar e implantarse en territorios inflamados o lesionado por el mecanismo de "homing" en el que están implicadas diferentes citoquinas y quimiocinas, moléculas VCAM e ICAM, integrinas y proteasas^{152,153}. Bonilla et al¹⁷⁸ realiza la infusión de MSC en la fase crónica del daño cerebral (a los 2 meses de la lesión) y no encuentran MSC en territorio cerebral lo que podría deberse a la ausencia de moléculas inflamatorias en el cerebro en esta fase del trauma.

2.2. SUPERVIVENCIA A LAS 4 SEMANAS

En el estudio de inmunohistoquímica de los cerebros extraídos a los 28 días siguen existiendo, aunque en mejor cantidad, MSC-GFP⁺, en ambos hemisferios cerebrales. La citometría encuentra MSC-GFP⁺ en un porcentaje 700 veces menor que a los 2 días ($0,01 \times 10^{-3} \%$ en el hemisferio izquierdo y $0,005 \times 10^{-3} \%$ en el hemisferio). Esto indicaría que sólo 1 de 700 células que alcanza el tejido cerebral sobrevive a los 28 días. A diferencia de otros grupos nuestro estudio no encuentra que la infusión de MSC iv disminuya el tamaño de la lesión a los 28 días^{171,173}

Los resultados de supervivencia obtenidos en otros trabajos ofrecen resultados contradictorios. Mahmood et al, encuentra en el estudio anatomopatológico 2 semanas después de la lesión el triple de MSC en el hemisferio lesionado que en el contralateral (9627 ± 463 de células positivas para BrdU en el hemisferio lesionado, y 2626 ± 651 en el hemisferio contralateral $p < 0.05$). Un estudio analiza el porcentaje de MSC que permanecen en territorio cerebral tres meses después de su administración encuentra 3 veces más MSC (células de donante masculino que expresan cromosoma Y en ratas receptoras hembra) en el hemisferio de la lesión que en el contralateral independientemente de la cantidad de células administradas (26,2% vs 7,2% en el grupo al que se administran 2×10^6 MSC; 46,4% vs 12,5% en el grupo al que se administran 4×10^6 MSC y 53,9% vs 14,6% en el grupo al que se administran 8×10^6 MSC).¹⁷⁴ El estudio de Harting et al no encuentra supervivencia de las MSC marcadas con Qtracker a las 2 semanas¹⁷⁵.

Algunos trabajos encuentran pruebas de que las MSC anidadas se diferencian a células de estirpe neural^{171,173}. Otros muestran un aumento de factores de crecimiento BDNF y NCF^{172,174} y de factores que indican una mayor angiogénesis y proliferación celular. Todos estos mecanismos ayudarían a la recuperación funcional de los animales traumatizados. Los diferentes resultados observados en cuanto a supervivencia celular podría deberse a la heterogenicidad en los métodos elegidos para realizar el marcaje y seguimiento de las MSC. No obstante, existen bastantes indicios para afirmar que cierto número de las MSC administradas por vía intravenosa alcanzan la zona perilesional y sobreviven en el territorio a medio plazo.

3. SEGURIDAD DE LAS MSC

En nuestro estudio, no se registran efectos adversos relacionados con la administración de MSC, ni en el momento de la infusión ni durante los 28 días de seguimiento.

Las principales complicaciones que preocupan en cuanto al uso de las MSC a largo plazo son su potencial capacidad carcinógena y la alteración que pueden producir en la inmunidad del huésped. Otro tipo de complicaciones descritas (como la aparición de tromboembolismos pulmonares y las convulsiones) están en relación con la vía de administración de las MSC.

3.1. TROMBOEMBOLISMOS

La aparición de tromboembolismos se ha asociado, principalmente, con la administración intraarterial de las MSC^{169,170}. La posibilidad de que las MSC puedan producir embolismos pulmonares al ser administradas por vía iv, también ha sido planteada.

En nuestro estudio se registran las constantes respiratorias y hemodinámicas durante el tiempo de administración de las MSC. No se encuentran variaciones mayores de un 10% en la SO_2 ni en la Fc, lo que descarta la existencia de tromboembolismos pulmonares. En el estudio anatomopatológico tampoco aparecen hallazgos compatibles con tromboembolismo pulmonar.

Un estudio encuentra aparición de taquipnea, apnea y alteraciones hemodinámicas en las ratas al administrar las MSC por vía intravenosa¹⁷⁹, este efecto parece relacionarse con la gran concentración de células 10×10^6 MSC/ml y la velocidad de administración. En el presente estudio se administran las MSC a menor concentración 4×10^6 MSC/ml y se administraron de forma lenta a una velocidad de 50 μ l por minuto.

3.2. TERATOGENICIDAD

La posibilidad de que las células madre sean capaces de producir tumores, es una de las mayores limitaciones a la hora de su aplicación clínica en humanos. Su intrínseca capacidad de autorreplicación conlleva implícito su potencial carcinogénico. Tras los primeros estudios con terapia celular en los años 90⁹⁰⁻⁹¹, se demostró que las ES producían teratomas en los animales de experimentación⁹².

Respecto a las MSC algunos estudios preclínicos alertan sobre la posibilidad de que las MSC puedan producir tumores. Se ha descrito su capacidad de malignización *ex vivo*, aunque parece estar claro que esto sólo se produce bajo algunas condiciones muy concretas de cultivo²⁰². Estudios en animales alertan sobre la capacidad de estas células para inducir la aparición de tumores por alteración en la inmunidad, sobre todo con el uso de MSC alogénicas²⁰³. Zhu et al²⁰⁴ administra células de una línea tumoral (SW80) en el tejido subcutáneo de ratas, solas o en combinación con MSC. El crecimiento del tumor es mayor en los animales a los que se les administra la combinación de ambos tipos celulares que a los que se les inyectan sólo células tumorales.

Riggi et al en 2005 comunican el único tumor descrito con el uso de MSC en animales²⁰⁵. Los autores refieren el desarrollo de un tumor de Ewing en el territorio pulmonar en ratones, tras administrar MSC. Pese a que los resultados de este estudio han sido puestos en duda por errores metodológicos debería tenerse en consideración.

En humanos el único metaanálisis existente sobre terapia con MSC en humanos²⁰⁶ recoge 4 ensayos clínicos randomizados controlados (ECRC) que comparan porcentaje de malignidad en el grupo tratamiento y el grupo control. El metaanálisis no encuentra diferencia en la aparición de tumores en ambos grupos.

3.3. ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Otro efecto adverso que preocupa es el efecto que la infusión de estas células puede tener sobre el sistema inmune del huésped, a nivel sistémico y en los órganos donde se establecen. Como se ha visto previamente, se piensa que gran parte de los efectos beneficiosos obtenidos de la terapia con MSC se producen por su efecto inmunomodulador¹⁴¹. Administradas por vía sistémica las MSC disminuyen la respuesta inflamatoria del organismo receptor tanto a nivel sistémico como en los órganos donde se hospedan finalmente¹⁴². La inmunosupresión que produce a nivel sistémico podría hacer al organismo más susceptible a infecciones por organismos patógenos. Además podría inducir un mayor crecimiento de neoplasias y tumores. A parte de la inmunosupresión sistémica, preocupa también la posible reacción inflamatoria que las MSC pueden producir en el tejido receptor, a nivel local por acción injerto contra huésped. Coine et al²⁰⁷ describen el rechazo de las células implantadas en un cerebro adulto por una reacción inflamatoria. Sin embargo diferentes estudios²⁰⁸ encuentran evidencias de que existe una falta de respuesta inflamatoria a estas células por la ausencia de expresión de complejos mayores de inmunocompatibilidad (CMH I y CMH II). Los ECRC incluidos en el

metaanálisis²⁰⁵ sobre seguridad que utilizan MSC alogénicas, no muestran mayor porcentaje de aparición de efectos secundarios relacionados con rechazo del injerto.

3.4. COMPLICACIONES RELACIONADAS CON LOS MEDIOS DE CULTIVO

Existen efectos adversos potenciales relacionados con los medios de cultivo utilizados para la expansión celular. La presencia de factores de crecimiento como FGF, IGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (FGDP) y factor de crecimiento epitelial (EGF) en el medio de cultivo, potencia la proliferación de las MSC. El suero fetal bovino incorporado al medio de cultivo en una proporción del 10-20% aporta todos los factores anteriores. Las potenciales complicaciones relacionadas con la utilización de este medio animal, en el cultivo de MSC para su aplicación en humanos serían transmisión de enfermedades víricas o por priones, reacciones anafilácticas o producción de anticuerpos anti-FBS²⁰⁹.

Debido a estos riesgos relacionados con su utilización la mayoría de países prohíben el uso de FBS en cultivos de células que vayan a utilizarse en humanos. Para evitar el uso de sueros animales podrían utilizarse medios sintéticos libres de componentes biológicos aprobadas para su uso en humanos (StemPro MSC SFMTM, lifetechnologies, USA).

También puede utilizarse productos biológicos procedentes de humanos como el suero sanguíneo (difícil de obtener en grandes cantidades) o suero de cordón umbilical o placenta. El lisado de plaquetas podría ser una gran alternativa. Se obtiene fácilmente de la aféresis de productos hematológicos de voluntarios sanos. El uso de DMSA (tóxico conocido) como anticongelante en la conservación de las MSC conlleva la posibilidad de que se desarrollen reacciones de hipersesibilidad²⁰⁹.

4. MODELO EXPERIMENTAL

4.1. SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN

Las ratas, al nacer tienen un peso de 5 g que aumenta hasta 50g en el momento del destete. El destete se produce a los 25-30 días y alcanzan la pubertad entre los 40 y los 72 días de vida. Los animales elegidos para nuestro estudio son ratas de 6 semanas (150-200g) que corresponde al periodo puberal.

Hasta ahora, la mayoría de estudios preclínicos sobre TCE utilizan en sus modelos animales ratas adultas (mayores de 3 meses y que pesan más de 350-400g). Actualmente se conoce que la respuesta ante el trauma de un cerebro en desarrollo difiere de la del cerebro adulto desde un punto de vista biomecánico, metabólico y fisiopatológico⁴²⁻⁴⁷. Cernak et al²¹⁰ demuestran en un modelo de TCE grave con daño cerebral difuso en ratas lactantes (de 7, 14 y 21 días) que en ellas se produce mayor cantidad de edema cerebral, menor alteración de la barrera hematoencefálica y menos disminución del metabolismo cerebral que en ratas adultas. Respecto a los déficits motores observados tras la lesión, refieren que estos son persistentes cuando el trauma se produce a los 7 o 14 días, pero cuando el trauma se produce a los 21 días los déficits han desaparecido 3 semanas después. Al realizar test comportamentales (test de Morris) en los que está implicado el aprendizaje, encuentran que a las 2 semanas del trauma todos los grupos de animales traumatizados tienen peor resultados funcionales que los de los grupo control.

Como hemos comentado ampliamente, uno de los mecanismos por el cual se ha visto que las MSC inducen mejoría funcional, es la estimulación de la neurogénesis endógena. Trabajos que estudian la neurogénesis producida tras un TCE en modelos con roedores, observan que los mecanismos de proliferación y diferenciación neuronal endógena son más intensos en animales jóvenes que en adultos¹¹³.

4.2. MODELO ANIMAL DE TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO GRAVE

El uso de modelos animales de TCE ha permitido aumentar los conocimientos sobre la fisiopatología del DCT y el fenómeno de la neurorestauración, así como el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento basadas en la neuroprotección.

Un modelo animal de trauma craneal ideal debe cumplir los siguientes requisitos²¹¹:

1. La fuerza mecánica usada para provocar la lesión debe estar controlada, ser reproducible y cuantificable, al igual que la lesión que produce.
2. La lesión debe reproducir los componentes del DCT en humanos.
3. La intensidad de la fuerza mecánica empleada debe predecir el pronóstico de la lesión (evaluado por parámetros morfológicos, fisiológicos, bioquímicos o funcionales).
4. El modelo de TCE debe estar incluido dentro de un protocolo global de procedimientos para controlar la variabilidad de las variables externas (la inducción anestésica, la fijación al marco estereotáxico y resto de cuestiones relacionadas con la intervención).

En relación con el punto 2 los modelos que más fielmente reproducen la complejidad de componentes del DCT en humanos son los que utilizan monos y primates por la similitud anatómica entre el cerebro de estos animales y el humano. Sin embargo existen limitaciones económicas y éticas a la hora de utilizar primates superiores en modelos experimentales. Los modelos con roedores son los más utilizados en los estudios sobre trauma craneal por su pequeño tamaño, bajo coste y proximidad de en la escala filogénica con los primates. Sin embargo, a la hora de extrapolar los resultados obtenidos en modelos de rata o ratón se debe tener en cuenta que el cerebro de estos animales presentan importantes diferencias neuroanatómicas y fisiológicas con el del humano, lo que condicionará una distinta respuesta al TCE. Una de las mayores diferencias, como se discutirá más adelante, es el desarrollo de las secuelas comportamentales, cognitivas y de memoria tras un TCE. Estos déficits, que persisten a largo plazo, resultan muy incapacitantes en los humanos y son muy difíciles de valorar en roedores¹⁵⁴.

Existen diferentes modelos de TCE en roedores (Tabla 8). La mayoría son modelos que reproducen el daño cerebral primario, bien focal o difuso y algunos sirven para estudiar los componentes del daño cerebral secundario (modelo de hipoxia de Clark o de hipotensión de Ishige)¹⁵⁵.

El modelo usado en este estudio es una modificación del modelo de ICC que se considera un modelo de DCP focal. Se basa en la aplicación de una fuerza primaria sobre la corteza cerebral, previa eliminación de la protección ósea mediante una craniectomía.

La fuerza mecánica aplicada (0,07 Newton) puede calcularse por la fórmula:

$$F = m * a$$

F: fuerza; m: masa (35 g) a: aceleración (2m/sg²)

Como se ha explicado este modelo genera una lesión focal produciendo un área de necrosis en la corteza y de LAD en la zona subcortical. Pero además el modelo de ICC produce algunas alteraciones que son características del DCP difuso: LAD en cápsula interna y troco del encéfalo y pérdida celular en el hipocampo, giro dentado y tálamo ipsilateral²¹¹. Si el área de la craniectomía se cubre con una prótesis artificial o se repone el hueso, aumentará la PIC con desarrollo de HTIC y DCS. En nuestro modelo se decide dejar la craniectomía abierta para disminuir la mortalidad perilesional. Esto explicaría por qué nuestros resultados funcionales concuerdan más con las secuelas de un daño cerebral focal (alteración motora y sensitiva por afectación de la corteza primaria) que de daño cerebral difuso.

Respecto a la intensidad del trauma, en nuestro trabajo queríamos reproducir un TCE grave, ya que los niños con TCE grave son los que obtendrían mayores beneficios de la terapia celular. En el ensayo para determinar el peso a utilizar se concluye que una barra de 35 g que se deja caer desde una altura de 20cm causa una mortalidad en los animales del 20%.

En humanos la gravedad del trauma craneal se valora en función de varios condicionantes, principalmente la puntuación en la ECG (Tablas 1 y 2), aunque otros factores como la energía del impacto, la alteración de la conciencia y la focalidad neurológica se relacionan con el pronóstico. En animales, no existe una escala de valoración funcional similar al Glasgow y la gravedad del TCE viene dada por la mortalidad. Así cuando un modelo de TCE concreto (con una fuerza y una aceleración definida) produce una mortalidad de entre un 20 y un 25 % se considera que ese modelo produce un TCE grave¹⁵⁴. La mayoría de trabajos encuentran que, en roedores, para un mismo modelo de trauma craneal, el nivel deterioro funcional de los animales es similar. Recientemente, algunos trabajos apuntan a la posibilidad de que un mismo modelo de TCE produzca diferentes grado de secuelas, debido a susceptibilidad individual de los animales. Bonilla et al, describe una puntuación basada en el mNSS, para clasificar el TCE en ratas, de forma análoga a la ECG en humanos, en leve, grave y moderado²¹².

4.3. OBTENCIÓN, CULTIVO, CARACTERIZACIÓN Y MARCAJE DE LAS MSC

- ***Células mesenquimales de grasa***

En nuestro estudio elegimos el tejido graso como fuente de MSC por su disponibilidad y facilidad de recolección de donantes sanos, en futuros ensayos en humanos.

Las MSC derivadas de tejido adiposo son fáciles de recolectar mediante una liposucción o una abdominoplastia¹⁹⁹. Algunos estudios apuntan a que la edad del donante influye en su capacidad de proliferación y supervivencia²¹³. Como se ha explicado en la introducción (Tabla 7) las MSC-a muestran en comparación con las MSC-mo una morfología y un porcentaje de diferenciación similar. En cuanto a su fenotipo: expresan menor porcentaje de CD 106 (marcadores relacionados con la migración y la hematopoyesis) y tanto CD34 y CD49d están aumentados en las MSC-a²¹⁴. Una ventaja adicional de las MSC-a es que no expresan el antígeno de compatibilidad humano tipo II (MHC II), lo que facilita su utilización en terapia alogénica²¹³. Algunos estudios sugieren que las MSC-a son capaces de realizar una mayor supresión de la respuesta inmune que las MSC-mo²¹⁵.

Las MSC-a han demostrado ser tan efectivas como las MSC-mo en producir recuperación funcional en modelos animales de daño cerebral hipóxico isquémico^{199,216}. Un estudio de seguridad con MSC-a en ratas administra altas dosis de MSC-a (hasta 2×10^8 por kg de peso) y no encuentra efectos adversos ni aparición de tumores²¹⁷.

- ***Cultivo celular***

Una de las características que definen a las MSC es su capacidad para autorrenovarse y generar copias idénticas a sí mismas por mitosis a lo largo de un periodo muy largo de tiempo¹¹². Como población, las MSC han demostrado tener una alta pero variable capacidad de autorregeneración²¹⁸. Colter et al demuestra que al sembrar las MSC a baja concentración ($1,5 - 3 \times 10^3$ MSC/cm²), se consigue un aumento en la tasa de expansión de 60000 veces comparada con la tasa de expansión de 2000 que se consigue al sembrar a alta concentración (12×10^3 MSC/cm²)²¹⁹. Por este motivo, elegimos sembrar las MSC a baja concentración, consiguiendo un mayor rendimiento de los cultivos.

- ***Caracterización de las MSC***

En los estudios de caracterización, un bajo porcentaje de las MSC-GFP⁺ cultivadas en medios de diferenciación a adipocito y osteocito alcanzan características de células

diferenciadas. El porcentaje de células diferenciadas no varía entre el cultivo de MSC+GFP y el cultivo de MSC no marcadas. Diferentes estudios han demostrado que sólo entre un 30%²²⁰ y un 60% de las MSC adultas son capaces de diferenciarse a células de otra estirpe²²¹. Esta variabilidad se debe a que en los tejidos, se encuentran poblaciones de MSC en las que existen células con mayor menor grado de proliferación /diferenciación. De este modo en los cultivos de MSC habrá células con uni-, bi-, tri- o quadrapotencialidad.

- **Marcaje con GFP**

Para el seguimiento de las células se utiliza la proteína verde fluorescente (GFP). In vitro, hemos demostrado que las MSC-GFP⁺ son capaces de multiplicarse de manera análoga a las células no marcadas y conservan intacta su capacidad de diferenciación en adipocitos y osteocitos. La capacidad de expresión de GFP no disminuye en los sucesivos ciclos de replicación de las MSC in vitro. Sin embargo, estudios en ratones transgénicos que incorporan GFP en todas sus células sugieren una disminución de la expresión de la GFP in vivo¹⁸⁶.

La GFP se ha mostrado superior a otros marcadores de superficie, incorporados por vectores recombinantes, empleados para el marcaje y seguimiento celular de las células hematopoyéticas. La GFP presenta la ventaja de no necesitar cofactores para su identificación por inmunohistoquímica o citometría¹⁸⁵. Se ha observado que marcadores utilizados en algunos estudios, como la BrdU y la bis benzamida 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 desarrollo²⁰⁷. La GFP al ser una proteína de membrana constitucional de la célula, no sufriría este problema.

4.4. VÍA DE ADMINISTRACIÓN DE LAS MSC

Elegimos la vía intravenosa porque esta vía sería la más fácil de utilizar en niños con TCE. La mayoría de ensayos clínicos con MSC utilizan la vía intravenosa. En la Tabla 13 se muestra un resumen de los trabajos publicados en animales que utilizan esta vía.

| Tabla 13: RESUMEN DE LOS TRABAJOS QUE UTILIZAN LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA | | | | | | |
|---|---------|-------|-------|--|---|--|
| | MSC | T inf | Final | Grupos | Distribución MSC | Resultado funcional |
| Mahmood 2003 ¹⁷¹ | hMSC-mo | 24h | 28d | 1x10 ⁶ 9 iv 2x10 ⁶ 9 iv SSF | Se encuentran perilesionales. ¹ Se diferencian. ² | Grupo 2x10 ⁶ Mejoría funcional |
| Mahmood 2004 ¹⁷² | rMSC-mo | 24h | 14d | 9 iv SSF 9 iv 2x10 ⁶ | Se encuentran perilesionales. ³ | Mejoría funcional ↑BDNF, ↑NCF |
| Mahmood 2005 ¹⁷³ | hMSC-mo | 7d | 90d | 15 iv 2x10 ⁶ 15 iv 4x10 ⁶ 15 lv 8x10 ⁶ 15 iv PBS | Se encuentran perilesionales. ¹ No se diferencian. ² | Tres grupos de tratamiento Mejoría sensitivomotora |
| Mahmood 2006 ¹⁷⁴ | rMSC-mo | 7d | 90d | 10 iv 2x10 ⁶ 10 iv 4x10 ⁶ 10 iv 8x10 ⁶ 10 iv PBS | Se encuentran perilesionales. ⁴ Se diferencian. ² | Grupo 4x10 ⁶ y 8x10 ⁶ Mejoría motora Todos los grupos de tratamiento ↑BDNF, no ↑NGF, |
| Harting M 2009 ¹⁷⁵ | rMSC-mo | 24h | 14d | 6 iv 2x10 ⁶ 6 iv 4x10 ⁶ 6 iv PBS | Se encuentran perilesionales a las 48 horas, no permanecen 2 semanas. ⁵ | No encuentra mejoría funcional |
| Lundberg 2009 ¹⁶⁹ | hMSC-mo | 24h | 5d | 10 iv 25x10 ⁶ 10 ia 25x10 ⁶ 6 iv 5x10 ⁶ 6 ia 5x10 ⁶ | Encuentran MSC perilesionales a los 5 días, más en el grupo intraarterial. No encuentran diferencia entre hemisferios. ⁶ | No estudio funcional |
| Sokolova, 2009 ¹⁷⁷ | rMSC-mo | 1h | 70d | 40 iv PBS 40 iv 5x10 ⁶ 40 ip PBS 40 ip 2x10 ⁶ | No estudio morfológico | Grupo tratamiento iv: no progresión del déficit tras la fase aguda. Grupo tratamiento ip: menos déficit en la fase aguda |
| Bonilla, 2011 ¹⁷⁸ | MSC-mo | 60d | 120d | 10 iv PBS 10 iv 15x10 ⁶ | No se encuentran las MSC en el estudio anatomopatológico. Se encuentran más células en división y mayor angiogénesis. ⁷ | No encuentran mejoría funcional. |

Resumen de las principales características y conclusiones de los estudios con MSC en TCE que utilizan la vía de administración intravenosa. En la columna GRUPOS se indica el número de animales en cada grupo, la vía de administración y el número de MSC administradas. T inf: tiempo de infusión, h: horas, d: días, iv: intravenoso, ip: intraparenquimatoso, hMSC: células madre mesenquimales de origen humano, rMSC: células madre mesenquimales de origen murino, NGF: factor de crecimiento neural, BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro. ¹MAB128: anticuerpo monoclonal anti nucleótidos humanos, que se detecta por fluorescencia. ²Se marcan receptores neurales (NeuN) y marcadores de astrocitos (proteína ácida fibrilar). ³Se determinan células BdrU: bromodesoxiuridina positivas ⁴Marcaje por fluorescencia de cromosoma Y (se transplantaron rMSC de ratas macho en ratas hembra). ⁵Marcado con Qtracker 655. ⁶Marcaje de antígeno humano nuclear por fluorescencia. ⁷Marcador de proliferación Ki-67, marcador de neurogénesis: nestina y doblecortina.

La cola de la rata tiene dos venas laterales, una vena dorsal y otra ventral que pueden canalizarse con catéteres de 20 Gy o menores. La necrosis de la cola ha sido descrita como efecto adverso al realizar esta técnica. La canalización de las venas de la cola de la rata resulta fácil una vez que se ha realizado el pertinente entrenamiento. La disponibilidad de 4 vasos sanguíneos resulta una ventaja adicional. Uno de los problemas que se preveía era la formación de agregados celulares y de obstrucción del angiocatéter que debía ser muy fino (24 Gy) al tratarse de ratas pequeñas. Realizando una resuspensión manual vigorosa de las células en el vial justo antes de ser cargadas con la jeringuilla, no se encontraron problemas de obstrucción del angiocatéter.

Una potencial limitación del uso de la vía intravenosa, podría ser que las MSC al pasar por un angiocatéter fino pudiesen romperse o inactivarse. El angiocatéter de 24 Gy tiene un diámetro interno de $0,31 \pm 0,0007$ mm. Lundberg et al¹⁶⁹, observan una disminución de la viabilidad de las MSC menor del 10% al hacerlas pasar por un catéter de nitinol de tan solo 0.104 mm, diámetro tres veces menor que el utilizado en el presente trabajo.

- **Primer paso pulmonar**

Trabajos previos describen que solo un mínimo porcentaje de las células administradas por vía intravenosa alcanzan el territorio arterial, por el efecto primer paso pulmonar^{176,179}. Las células que consiguen pasar el filtro llegan a la arteria carótida.

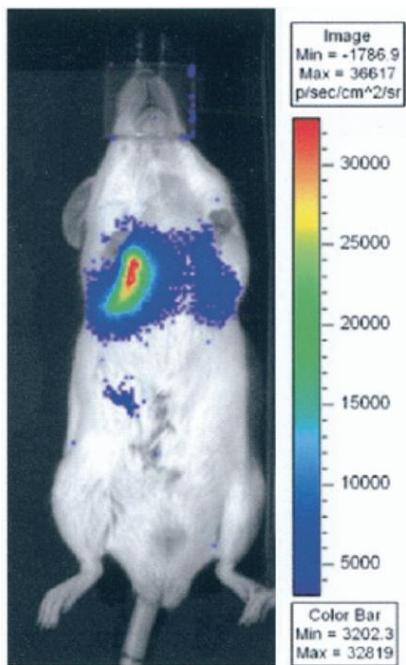


Figura 49: Distribución de MSC a los 5 minutos de su administración iv.

Las MSC han sido marcadas con luciferasa de luciérnaga, tomado de Shrepfer et al 2007¹⁸⁰.

Un estudio comparaba el porcentaje de células que quedan atrapadas en el lecho pulmonar, en función de su tamaño, dos minutos después de su administración: MSC, NPCa MAPC y células mononucleares derivadas de médula ósea (CMDMO) con volumen medio de $18 \mu\text{m}^3$, $15 \mu\text{m}^3$, $16 \mu\text{m}^3$ y $6 \mu\text{m}^3$ respectivamente. Este estudio encontró un porcentaje de paso a territorio arterial del 0,16% para las MSC, del 0,4% para las NPCa, y del 0,42% para las MAPC¹⁷⁶. El porcentaje de CMDMO que alcanzaban el territorio sistémico era de un 4,5%, unas 30 veces mayor que para las MSC. Esto se

explicaría porque las esferas de menor tamaño consiguen pasar a través de los capilares alveolares cuyo diámetro mínimo se ha estimado en 15 μm . Otro estudio detecta por bioluminiscencia la localización de MSC marcadas con luciferasa de luciérnaga a los 5 minutos de haber sido administradas¹⁸⁰ (Figura 49). Aunque el estudio no cuantifica el porcentaje de luminiscencia en cada territorio corporal, la mayoría de las MSC se encuentran en el territorio pulmonar, y un pequeño porcentaje en territorio hepático¹⁷⁹. Harting et al estimaron un paso al territorio carotídeo de MSC (Marcadas con Qtracker) de un $0,28\% \pm 0,11\%$ ¹⁷⁵

Además de depender del tamaño, la cantidad de células que quedan en el territorio pulmonar parece estar influenciado también de los mecanismos de adhesión y extravasación propios de cada tipo celular como la selectina P y las VCAM (Figura 10). Algunos estudios apuntan a que el efecto de primer paso pulmonar es algo transitorio, ya que a las 24 horas la mayoría de las MSC han migrado a otros órganos especialmente al sistema retículo endotelial^{175,176}. El bloqueo o inactivación de estas moléculas aumenta el porcentaje de células que alcanza el territorio arterial¹⁷⁶. Al administrar las células de forma separada en dos bolos el porcentaje de las mismas que alcanza la carótida aumenta. Esto apoyaría la teoría de que existe un mecanismo de receptores que participa en la captación celular en territorio pulmonar, ya que la saturación de estos receptores con la administración del primer bolo consigue un paso mucho mayor de células al administrar el segundo $0,35\%$ vs $0,16\%$ ¹⁷⁶.

Las ventajas potenciales de la administración en bolos separados serían:

1.- poder administrar una mayor cantidad de MSC a una menor concentración 4×10^6 MSC/ml (la rata no tolera la administración intravenosa de más de un 10% de su volumen circulante, por lo que en un solo bolo no pueden administrarse más de 0,5 ml de suero) disminuyendo así el riesgo de embolismo pulmonar.

2.- Conseguir la saturación de los receptores de los capilares del territorio pulmonar con el primer bolo, aumentando así, el porcentaje de MSC que llegan a las carótidas.

En el estudio de comparación de dosis se obtuvo un mejor resultado funcional con la administración de dosis múltiples (dos y tres bolos de 2×10^6 MSC) frente a una sola dosis de 2×10^6) de forma estadísticamente significativa. Esto apoya los resultados de los estudios anteriores.

- **Distribución de las MSC administradas iv en animales con TCE.**

En nuestro trabajo el porcentaje de MSC-GFP⁺ presentes a las 72 horas en territorio pulmonar y cerebral, siendo este 2570 veces mayor que el encontrado en el territorio cerebral.

Dos estudios analizan la biodistribución de las MSC en ratas con TCE (Figura 50), estudiando dos grupos de animales (con y sin TCE) por cámara de captación de ondas gamma, 4 horas después de haberseles administrado vía iv 1×10^6 MSC marcadas con ^{99m}Tc - hexamethylpropyleneamina oxima (^{99m}Tc -HMPAO)¹⁹³ y con ^{111}In ¹⁹².

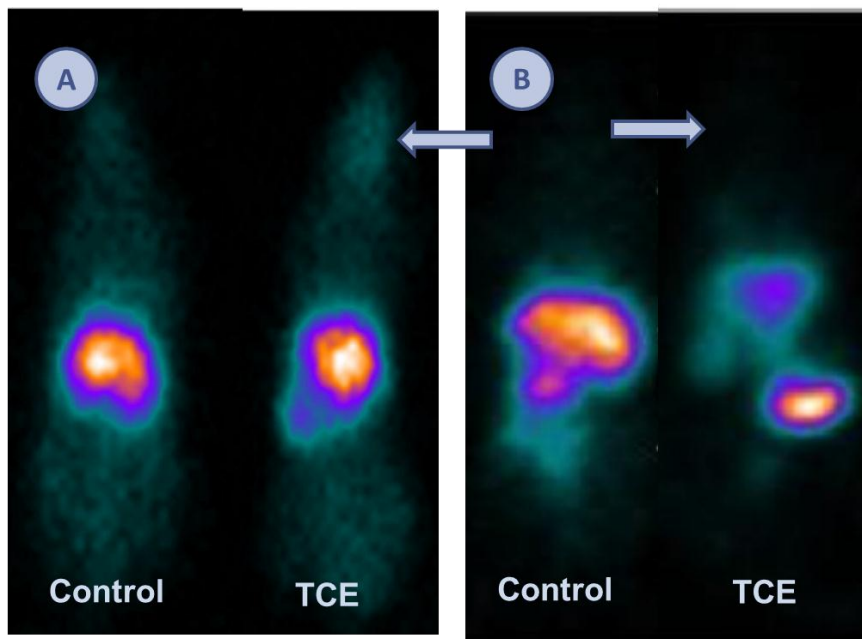


Figura 50: Biodistribución de las MSC marcadas con isótopos radiactivos a las 4 horas de su administración iv A) MSC marcadas con ^{111}In , tomado de Yoon et al 2010. B) MSC marcadas con ^{99m}Tc -HMPAO, tomado de Park et al 2011. El mayor porcentaje de captación se da a nivel pulmonar y de las vísceras abdominales. Las flechas indican la captación cerebral.

En el estudio de biodistribución de las MSC marcadas con ^{99m}Tc -HMPAO se encuentra una diferencia significativa en el porcentaje de radiación gamma emitida en el territorio cerebral entre el grupo de animales con TCE y el grupo control (0,40% vs 0,20% $p=0,002$). Así mismo encuentra mayor porcentaje de radiación en el hemisferio lesionado que en el contralateral en el grupo de animales con TCE (0,28 vs 0,12% $p=0,001$). En el estudio en el que se marcan las MSC con ^{111}In , se encuentra un porcentaje de radiación mayor en el grupo de animales con TCE que en el control, pero no se realiza análisis cuantitativo de esta diferencia. Ambos estudios encuentran en el estudio de anatomía patológica del cerebro, realizado a las 48 horas de la infusión, MSC marcadas en la periferia de la lesión.

5. TERAPIA CELULAR EN NIÑOS CON TCE

5.1. MARCO LEGAL DE LAS CÉLULAS MADRE EN ESPAÑA

Con la excepción de los trasplantes de precursores hematopoyéticos, las terapias con células madre para el tratamiento de cualquier tipo de enfermedad son consideradas medicamentos y, por tanto, su desarrollo, autorización y utilización debe realizarse de acuerdo con las normas específicas establecidas para este tipo de medicamentos en Europa y España.

A día de hoy no existe ningún medicamento basado en células madre que esté comercializado legalmente en España. Existen tres excepciones reguladas por la Agencia Europea del Medicamento, y que Sanidad reconoce en el marco de ensayos clínicos o uso compasivo (en patologías sin otra terapia disponible y siempre previa autorización).

- el implante de condrocitos autólogos (para lesiones de cartílago)
- el implante de queratinocitos para tratamiento de quemados
- el tratamiento de lesiones corneales con células troncales limbocorneales (para trasplantes de córnea).

De estos tres escenarios, sólo en el caso de la córnea se emplean células madre propiamente dichas, porque en los otros dos se usan células progenitoras. Estos tres tratamientos pueden utilizarse en centros vinculados al Sistema Nacional de Salud en el marco de 'cláusula de exclusión de hospitales' recogida en la normativa europea y nacional, a través de la cual será posible el acceso a un tratamiento individualizado con este tipo de terapias.

En Europa la comercialización de células madre está regulada por la Agencia Europea del Medicamento desde 2010. En EEUU viene regulado por la FDA desde 2009

²²² Un producto a base de células madre debe cumplir las siguientes condiciones para ser comercializado:

- Se debe referenciar el origen de las células, su procesamiento, las técnicas de validación interna que se han seguido y su caracterización.
- El producto debe tener ensayos preclínicos sobre su distribución celular, diferenciación in vivo, persistencia en tejidos receptores, reacciones inmunes y tumorigénesis.
- Como cualquier medicamento su aplicación en humanos inicial se debe realizar dentro de ensayos clínicos en fase I (farmacocinética, farmacodinamia, estudios de dosis efectiva y seguridad), posteriormente ensayos en fase II y III (eficacia) y tras su comercialización hay que mantener la red de farmacovigilancia.

En la actualidad las MSC se están usando en humanos, fuera del ámbito de los trasplantes hematopoyéticos, dentro de ensayos clínicos fase I y II.

5.2. INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL.

En los últimos años se han producido grandísimos avances en el campo de la biotecnología y la biogenética. Los nuevos descubrimientos dan lugar a nuevas formas de diagnóstico y tratamiento que su pueden suponer grandes ventajas para los pacientes. Del modelo tradicional de investigación, en el que un fármaco o molécula tardaba más de 10 años en pasar del laboratorio de investigación básica a poder ser aplicado a pacientes, se ha pasado a la investigación traslacional o traslativa.

La medicina traslacional consiste en “trasladar” los hallazgos y descubrimientos de la investigación básica para incorporarlos rápidamente a la práctica clínica (de la mesa de experimentación a la cabecera del paciente) en forma de ensayos clínicos. Los estudios traslacionales se realizan por equipos multidisciplinares de clínicos e investigadores, terminan con la dicotomía ciencia básica/ciencia aplicada. Aunque esta forma de hacer investigación permite un rapidísimo avance en el tratamiento de algunas enfermedades, sobre todo en el campo de la oncología, existen controversias respecto coste beneficio y sobre todo a la seguridad de aplicar a pacientes productos probados únicamente in vitro o en animales ²²³.

En los últimos 10 años la terapia celular con MSC ha adquirido gran relevancia, así pueden encontrarse más de 30000 referencias a estudios básicos con MSC aplicadas en distintos campos de la investigación básica en este periodo, de los cuales 283 son ensayos clínicos con MSC en humanos²²⁴. Las células madre también están siendo ampliamente estudiadas como opción de tratamiento en el traumatismo craneoencefálico. Pese a que la investigación básica no ha conseguido responder a cuestiones importantes sobre la terapia celular en esta patología (mecanismo de actuación, seguridad a largo plazo) y existe gran disparidad en los métodos de evaluación, los tipos celulares, las rutas de administración y los resultados obtenidos en los diferentes estudios, las células madre se está aplicando ya en seres humanos dentro de ensayos clínicos.

Con respecto a la terapia celular para el tratamiento del daño neurológico de origen traumático, en esta última década más de 1600 artículos recogen investigaciones básicas con células madre en daño cerebral o medular, de ellos 32 son ensayos clínicos en humanos.

5.3. ENSAYOS CON MSC EN HUMANOS CON DAÑO CEREBRAL TRAUMÁTICO.

Hasta el momento se han publicado los resultados de 6 ensayos clínicos y un estudio retrospectivo sobre terapia con células madre en pacientes con daño neurológico de origen traumático. En la Tabla 14 se explican sus principales características y resultados.

| Tabla 14: ENSAYOS CON MSC EN HUMANOS CON DAÑO NEUROLÓGICO DE ORIGEN TRAUMÁTICO | | | | | |
|---|--|--|--------------------|------------------------------|--|
| | MSC | Pacientes | Seguimiento | Grupos | Resultado funcional |
| Dai G 2013 ²²⁵ | MSC-mo autólogas perilesional | Daño espinal traumático crónico | 6meses | 20 tratamiento 20 control | Mejoría funcional |
| Wang S 2013 ²²⁶ | MSC-cu alogénicas Punción lumbar | Daño cerebral traumático crónico | 6meses | 40 tratamiento 40 control | Mejoría funcional y en el autocuidado |
| Tian C 2013 ²²⁷ | MSC-mo autólogas. Punción lumbar | Estado vegetativo persistente Alteraciones motoras | 14días | 97 tratamiento | 45,8% EVP mejoraron 37% mejoría motora |
| Cox CS 2011 ²²⁸ | CMDMO-mo autólogas. Punción lumbar Intravenosa | Niños daño cerebral traumático agudo | 6 meses | 10 tratamiento | No complicaciones |
| Mackay A 2008 ²²⁹ | OECs autólogas Perilesional | Daño espinal traumático crónico | 3 años | 6 tratamiento 6 control | No tumores ni dolor neuropático No encuentran mejoría funcional |
| Zhang ZX 2008 ²³⁰ | MSC-mo autólogas perilesional e intravenosa | Daño cerebral traumático agudo | 6 meses | 7 pacientes | No toxicidad |
| Seledtsov 2006 ²³¹ | Suspensión celular ¹ Alogénicas Punción lumbar | Daño cerebral traumático grave | 20 años | 25 tratamiento 25 control | Disminución de la mortalidad (56% grupo control, 8% tratamiento en el) Mejoría del estado funcional |
| Resumen de las principales características y conclusiones de los estudios con MSC en TCE que utilizan la vía de administración intravenosa. OECs células olfatorias envolventes. CMDMO: células madre derivadas de médula ósea. ¹ Suspensión celular obtenida del procesamiento de tejidos neurales de fetos humanos de 16 a 28 semanas procedentes de abortos. | | | | | |

Dos de los ensayos anteriores aplican terapia celular en lesionados espinales y 5 en enfermos que han sufrido daño cerebral traumático. De estos últimos 5 artículos, Wang et al y Tian et al administran a pacientes en fase crónica con secuelas de daño cerebral persistentes, MSC por punción lumbar. Uno de los trabajos no utiliza grupo control.

Ambos estudios concluyen que las MSC consiguen mejorar el estado funcional y la calidad de vida.

Tres publicaciones recogen los resultados de estudios de terapia celular en humanos con trauma craneal.

1. Seledtsov et al²³¹ publican en 2006 los resultados de un estudio retrospectivo a 20 años de un estudio con terapia celular, en 25 pacientes con traumatismo craneoencefálico grave. Administran por punción lumbar en las primeras 48 horas del trauma una suspensión celular obtenida de tejido fetal. Refieren que esta suspensión celular contiene una proporción 9/1 de células hematopoyéticas y mesenquimales respectivamente. Encuentran una menor mortalidad en el grupo tratamiento respecto al control, aunque el estudio tiene numerosas metodológicas.
2. Zhang et al²³⁰ publican un ensayo en fase I (sin grupo control) en 7 pacientes (6 adultos y 1 niño con TCE). Administran dos dosis de MSC. El primer implante se realiza intraparenquimatoso en el momento de la cirugía, en la zona de la lesión. Se infunde una segunda dosis intravenosa a los 7 días de la primera. Durante un periodo de seguimiento de 6 meses no aparece toxicidad relacionada a la terapia celular. Se encuentra una mejoría funcional en los pacientes a los seis meses respecto al inicio del tratamiento (sin grupo control).
3. Cox et al²²⁸ realizan un ensayo en fase I en niños con TCE grave (ECG 5-8), para determinar la seguridad del tratamiento con MSC autólogas obtenidas de médula ósea. A 10 niños de entre 5 y 14 años, sin enfermedades previas y con un TCE grave se le administraron por vía intravenosa 6×10^6 CMDMO/kg peso en las primeras 48 horas tras el traumatismo craneal. Para determinar la seguridad del procedimiento se evalúa la hemodinámica cerebral y sistémica durante la recolección de la médula ósea. También realiza resonancia magnética al mes y a los seis meses del TCE, y se obtienen evaluaciones funcionales y neuropsicológicas. El estudio de imagen no evidencia disminución de la sustancia gris, blanca ni del volumen de LCR. A los seis meses, 7 niños tienen una puntuación de 4-5 puntos en la GOS y el resto una puntuación entre 2-3 (Tabla 4). 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. El mismo grupo que ha publicado el trabajo anterior tiene en marcha un ensayo clínico de eficacia, fase II, en 50 pacientes pediátricos utilizando el procedimiento descrito. Ha comenzado su reclutamiento en agosto de 2013 y espera finalizar en 2018 (NCT01851083).

5.4. SEGURIDAD Y PERSPECTIVAS DE TERAPIA CON MSC EN HUMANOS

Hasta el momento solo se ha publicado un meta-análisis sobre la seguridad de la terapia con MSC en humanos²⁰⁶. Este meta-análisis incluye 36 estudios prospectivos, 8 de ellos ensayos clínicos randomizados controlados (ECRC), que administran MSC a enfermos por vía sistémica (intravenosa o intraarterial); se excluyen estudios que utilizan estadios diferenciados de MSC u otros tipos celulares. Como variables resultado analiza la aparición de diferentes efectos adversos: inmediatos (toxicidad aguda y fiebre), complicaciones orgánicas, desarrollo de infecciones y complicaciones a largo plazo (muerte y aparición de malignidad). Las MSC administradas son autólogas en 21/36 estudios y alogénicas en 15/37. En total el metaanálisis de los ERRC, recoge 359 pacientes con diferentes patologías (infarto de miocardio, enfermedad de Chron, cardiomiopatía, enfermedad de injerto contra huésped) y también voluntarios sanos.

Analizando por separado los distintos estudios no controlados, los efectos adversos comunicados más frecuentemente son la fiebre (40%), las convulsiones (19%) y la bronquiolitis obliterante (13%), estas dos últimas relacionadas con la infusión intraparenquimatosa e intravenosa respectivamente

En el metaanálisis de los ECRC encuentra que el desarrollo o crecimiento de tumores fue de 16% en el grupo control y 24% en el grupo tratamiento, esta diferencia no resulta significativa $p=0,18$. Todos los tumores aparecidos se dan en pacientes que previamente tenían tumores y no existen casos de tumores de novo. El análisis encuentra que el único efecto adverso asociado a la infusión de MSC por vía sistémica es la aparición de fiebre transitoria autolimitada, no encuentra mayor tasa de disfunción orgánica, infección, muerte o malignidad y por lo tanto concluyen que la terapia con MSC en humanos es segura. Este metaanálisis tiene como limitaciones el escaso número de pacientes incluido y la heterogenicidad en los estudios (tipos celulares y patología)

El único estudio de seguridad en humanos con MSC-a se publica en 2011²¹⁷. El estudio tiene una fase preclínica y otra clínica. En humanos con lesión medular administra una dosis de 4×10^8 MSC y realiza un seguimiento de tres meses durante el que, los pacientes, no desarrollan complicaciones.

Como explicamos previamente las MSC parecen ser células inmunológicamente privilegiadas por la escasa expresión de moléculas HLA. De este modo el uso de MSC de origen alogénico no implica aparición de efecto injerto contra huésped ni rechazo del injerto. Por otro lado existe gran variedad de fuentes de las que pueden obtenerse MSC y la facilidad de obtención de algunas de estas fuentes como el tejido graso procedente de liposucción¹²⁵. Estas dos circunstancias hacen que, en el futuro, existan bancos de MSC

como existen en la actualidad bancos de HSC para realizar transplantes hematopoyéticos.

5.5. Peculiaridades de las secuelas del trauma craneal en los niños

En los estudios de seguimiento de niños que han sufrido TCE, se puede observar que la recuperación de los déficits motores suele ser mucho mejor que la de los adultos. Sin embargo en los niños los problemas de comportamiento, cognitivos y secuelas psicológicas son mucho más relevantes. Los niños tendrán dificultad para formar conceptos de alto nivel y realizar razonamientos complejos lo que se traduce en fatiga, irritabilidad y confusión a la hora de intentar tareas mentales⁵². Presentan también dificultad para analizar, planificar y solucionar problemas o tareas complejas, mientras que pueden seguir realizando correctamente actividades estructuradas.

Hasta un 60% de los niños que sufren DCT tendrán trastornos psiquiátricos asociados y problemas de conducta⁵⁵. La ansiedad y la depresión son los trastornos emocionales más frecuentes siendo poco habituales otros trastornos psiquiátricos como el trastorno bipolar o la psicosis. Estos trastornos emocionales aparecen con mayor frecuencia en niñas. Los cambios de la personalidad aparecen muy frecuentemente en estos niños (25-50%) y suponen la mayor causa de queja por parte de los familiares⁵⁶. Pueden ir desde una exacerbación de los rasgos previos hasta un cambio radical en la personalidad premórbida. Los cambios más frecuentemente observados son la apatía, el embotamiento afectivo, la irritabilidad, los episodios de conducta explosiva, la labilidad emocional y la desinhibición. El trastorno por déficit de atención e hiperactividad es el hallazgo más frecuentemente encontrado hasta en un tercio de los pacientes con TCE grave y un 10% de los niños con TCE moderado. Es más frecuente en varones⁵⁷. Se da sobre todo en varones. Aunque clásicamente los traumatismos leves no parecían tener consecuencias a largo plazo, actualmente se está estudiando la relación entre los traumatismos leves en la infancia y las alteraciones de conducta que aparecen en la adolescencia.

Todas estas alteraciones cognitivas y psicológicas son muy incapacitantes y tienen graves repercusiones a nivel social y disminuyen enormemente la calidad de vida de los pacientes. Hasta un 40% de los niños refieren haber perdido amigos después del trauma. Estudios recientes indican que los déficits pueden durar toda la vida⁵⁴

Debe tenerse en cuenta que este tipo de secuelas, que se producen por alteración de las funciones mentales superiores, no son valorables en modelos animales en roedores.

CONCLUSIONES

- La infusión intravenosa de células madre mesenquimales alogénicas obtenidas de tejido adiposo es segura.
- Los animales a los que se les administran células mesenquimales en la fase aguda del trauma, no tienen mejor resultado funcional a medio plazo, pero sí una recuperación motora y sensitiva más rápida que los animales que no reciben esta terapia.
- Las células madre mesenquimales, administradas por vía intravenosa, alcanzan el tejido cerebral, localizándose principalmente en la zona perilesional, y sobreviven, al menos, hasta un mes después de la infusión.
- El modelo de impacto cortical controlado con caída de un peso de 35g desde 20 cm de altura, produce un traumatismo craneoencefálico grave en ratas jóvenes.
- La dosis de 4×10^6 MSC, en dos bolos de 2×10^6 MSC, es la dosis óptima para ser administrada por vía intravenosa.
- La transducción de las MSC con proteína G fluorescente no altera las características propias de las células mesenquimales y es una estrategia eficaz para monitorizar las MSC en los distintos órganos y tejidos, una vez administradas.

BIBLIOGRAFÍA

1. García García JJ, Manrique Martínez I, et al; Grupo de Trabajo de Trauma Craneal de la SEUP. Registry of mild craniocerebral trauma: multicentre study from the Spanish Association of Pediatric emergencies. *An Pediatr* 2009; 71:31-7.
2. Newacheck PW, Inkelas M, Kim SE. Health services use and health care expenditures for children with disabilities. *Pediatrics* 2004; 114:79-85.
3. Agran PH, Anderson C, Winn D, Trent R, Walton-Haynes L. Rates of Pediatric and Adolescent Injuries by Year of Age. *Pediatrics* 2001; 108:315-8.
4. Pérez Suárez E, Serrano A, Casado Flores J. Traumatismo craneoencefálico en la edad pediátrica. *Anales españoles de pediatría. Rev Esp Pediatr* 2010; 66:60-72.
5. Barlow KM, Thomson E, Johnson D, Minns RA. Late neurologic and cognitive sequelae of inflicted traumatic brain injury in infancy. *Pediatrics* 2005; 116:74-85.
6. Keenan HT, Runyan DK, Marshall SW, Nocera MA, Merten DF, Sinal SH. A population based study of inflicted traumatic brain injury in young children. *JAMA* 2003; 290:621-6.
7. King WJ, MacKay M, Sirnick A. Shaken baby syndrome in Canada: clinical characteristics and outcomes of hospital cases. *CMAJ* 2003; 168: 151-9.
8. Barlow KM, Minns RA: Annual incidence of shaken impact syndrome in young children. *Lancet* 2000; 356: 1571-2.
9. Durkin MS, Laraque D, Lubman I, Barlow B. Epidemiology and prevention of traffic injuries to urban children and adolescents. *Pediatrics* 1999; 103:74.
10. Ommaya AK, Goldsmith W, Thibault L. Biomechanics and neuropathology of adult and pediatric head injury. *Br J Neurosurg* 2002 Jun; 16: 220-42.
11. Rovegno M, Soto PA, Saez JC, von Bernhardt R. Biological mechanisms involved in the spread of traumatic brain damage. *Medicina intensiva* 2012; 36:37-44.
12. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *British journal of anaesthesia* 2007; 99:4-9.
13. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, Jane JA, Marmarou A, Foulkes MA. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma* 1993; 34:2-22.
14. Fabbri A, Servadei F, Marchesini G, Stein S C, Vandelli A. Early predictors of unfavourable outcome in subjects with moderate head injury in the emergency department *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79:567-73.
15. Haydel M J, Shembekar A D. Prediction of Intracranial Injury in Children Aged Five Years and Older With Loss of Consciousness After Minor Head Injury Due to Nontrivial Mechanisms *Ann Emerg Med.* 2003; 42:507-14.
16. Adelson PD, Bratton SL, Carney NA, Chesnut RM, Guidelines for the acute management of severe traumatic brain injury in infants, children and adolescents. *Pediatr Crit Care Med* 2003; S1-S74.
17. Keskil IS, Baykaner MD, Ceviker N, Kaymaz M. Asssment of mortality associated with mild head injury in the pediatric age group. *Childs Nerv Syst* 1995; 11:467-73
18. Chung CY, Chen CL, Cheng PT. See LC, Tang SF, May-Kuen Wong A. Critical Score of Glasgow Coma Scale for Pediatric Traumatic Brain Injury. *Pediatr Neurol* 2006; 34:379-87.
19. Lieh-Lai MW, Theodorou AAm Sarnaik AP, Meert KL, Moylan PM, Canady AI. Limitations of the Glasgow Coma Scale in predicting outcome in children with traumatic brain injury. *J Pediatr* 1992; 120:195-9.
20. Michaud LJ, Rivara FP, Gradu MS, Reay DT. Predictors of survival and severity of disability after severe brain injury in children. *Neurosurgery* 1992; 31:254-64.

21. Keenan HT, Bratton SL. Epidemiology and outcomes of pediatric traumatic brain injury. *Dev Neurosci* 2006; 28:256-63.
22. Brain Trauma Foundation; American Association of Neurological Surgeons; Congress of Neurological Surgeons; Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS, Bratton SL, Chestnut RM, et al. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007; 24:S1-95.
23. 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: 333–38.
24. Orliaguet GA, Meyer PG, Baugnon T. Management of critically ill children with traumatic brain injury. *Paediatr Anaesth* 2008; 18:455-61.
25. Mazzola CA, Adelson PD. Critical Care Management of head trauma in children. *Crit Care Med* 2002; 30:S393-S401.
26. Hu CF, Fan HC, Chang CF, Chen SJ. Current approaches to the treatment of head injury in children. *Pediatr Neonatol* 2013; 54:73-81.
27. Casas Fernández C. Traumatismo craneoencefálico. En Moraga F, editor: *Protocolos de neurología pediátrica SENP – AEP* 2008. Disponible en: <http://www.aeped.es/protocolos/neurologia/17-tce.pdf>.
28. Sabsovich I, Rehman Z, Yunen J, Coritsidis G. Propofol infusion syndrome: a case of increasing morbidity with traumatic brain injury. *Am J Crit Care* 2007; 16:82-5.
29. Bratton SL, Chesnut RM, Ghajar J, et al. Antiseizure Prophylaxis. *J Neurotrauma* 2007; 24:S83-S86.
30. Tempkin NR, et al. A randomized double blind study of phenitoin for the prevention of post-traumatic seizures. *N Engl J Med* 1990; 323:497-502.
31. Serrano A, Casado-Flores J. Traumatismo craneoencefálico grave. En Serrano A, Casado-Flores J. *Urgencias y tratamiento del Niño Grave 3ª Ed.* Madrid: Ergón; 2014.880-91.
32. Marcoux KK. Management of increased intracranial pressure in the critically ill child with an acute neurological injury. *AACN Clin Issues* 2005; 16: 212–31.
33. McFadyen JG, Ramaiah R, Bhananker SM. Initial assessment and management of pediatric trauma patients. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2012; 2:121-7.
34. Catala-Temprano A, Claret Teruel G, Cambra Lasaosa FJ, Pons Odena M et al. Intracranial pressure and cerebral perfusion pressure as risk factors in children with traumatic brain injuries. *J Neurosurg* 2007; 106: 463–66.
35. Knapp JM. Hyperosmolar Therapy in the treatment of severe head injury in children: manitol and hypertonic saline. *AACN Clin Issues* 2005 16:199-211.
36. Khanna S, Davis D, Peterson B, Fisher B et al. Use of hypertonic saline in the treatment of severe refractory posttraumatic intracranial hypertension in pediatric traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2000; 28:1144–51.
37. Simma B, Burger R, Falk M, Sacher P et al. A prospective, randomized, and controlled study of fluid management in children with severe head injury: lactated Ringer's solution versus hypertonic saline. *Crit Care Med* 1998; 26:1265–70.
38. Fisher B, Thomas D, Peterson B. Hypertonic saline lowers raised intracranial pressure in children after head trauma. *J Neurosurg Anesthesiol* 1992; 4: 4–10.
39. Shiozaki T, Hayakata T, Taneda M. A multicenter prospective randomized controlled trial of the efficacy of mild hypothermia for severely head injured patients with low intracranial pressure. *J. Neurosurg* 2001; 94:50-4.
40. Hutchison JM, Ward RE, Lacroix J, et al. Hypothermia Therapy after traumatic brain injury in children. *N Engl J Med* 2008; 358:2447-56.
41. Sahuquillo J, Arian F. Craniectomía descompresiva frente a la hipertensión intracraneal resistente al tratamiento en la lesión cerebral traumática. *Cochrane Database Syst Rev* 12007: CD0010481 Walker PA, Harting MT, Baumgartner JE, Fletcher S, Strobel N, Cox CS Jr. Modern approaches to pediatric brain injury therapy. *J Trauma* 2009; 67:120-7.

42. Anderson VA, Catroppa C, Haritou F, Morse S, Pentland L, Rosenfeld J, Stargatt R: Predictors of acute child and family outcome following traumatic brain injury in children. *Pediatr Neurosurg* 2001; 34:138–48.
43. Begali V. *Head Injury in Children and Adolescents*. Brandon, VT: Clinical Psychology Publishing Co 1992.
44. Kriel R, Krach, L, Panser L. Closed head injury: comparison of children younger and older than six years of age. *Pediatr Neurol* 1989; 5:296–300.
45. K. Hudspeth W, Pibram K. Stages of brain and cognitive maturation. *J Educ Psychol* 1990; 82:881–4.
46. Taylor H, Alden J. Age-related differences in outcomes following childhood brain insults: an introduction and overview. *J Int Neuropsychol Soc* 1997; 3:555-67.
47. Anderson V, Catroppa C, Morse S, Haritou F, Rosenfeld J: Functional plasticity or vulnerability after early brain injury? *Pediatrics* 2005; 116:1374–82.
48. Eilander HJ1, van Heugten CM, Wijnen VJ, Croon MA, de Kort PL, Bosch DA, Prevo AJ. Course of recovery and prediction of outcome in young patients in a prolonged vegetative or minimally conscious state after severe brain injury: An exploratory study. *J Pediatr Rehabil Med* 2013; 6:73-83.
49. Kapapa T, Pfister U, Konig K, Sasse M, Woischneck D, Heisser H, Rickels E. Head Trauma in Children, part 3: Clinical and psychosocial outcome after head trauma. *J Child Neurol* 2010; 25:409-12.
50. Huang CT1, Lin WC, Ho CH, Tung LC, Chu CC, Chou W, Wang CH. Incidence of Severe Dysphagia After Brain Surgery in Pediatric Traumatic Brain Injury: A Nationwide Population-Based Retrospective Study. *J Head Trauma Rehabil*. 2014[Epub ahead of print].
51. Morgan AT. Dysphagia in childhood traumatic brain injury: a reflection on the evidence and its implications for practice. *Dev Neurorehabil*. 2010; 13:192-203.
52. Brouwer W H, Ponds RW, Van Wolffelaar PC, van Zomeren AH. Divided attention 5 to 10 years after severe closed head injury. *Cortex* 1989; 25:219-30.
53. Verger K, Serra-Grabulosa JM, Junqué C, Alvarez A, Bartres-Faz D, Mercader J M. Estudio de las secuelas a largo plazo de los traumatismos craneoencefálicos: evaluación de la memoria declarativa y procedimental y de su sustrato neuroanatómico. *Revista de Neurología* 2001; 33:30-4.
54. Ariza-Gonzalez M, Pueyo R, Serra JM. Secuelas neuropsicológicas de los traumatismos craneoencefálicos. *Anales de psicol* 2004; 20:303-16.
55. Max JE. Neuropsychiatry of pediatric traumatic brain injury. *Psychiatr Clin North Am* 2014; 37:125-40.
56. Muñoz-Céspedes J M. Secuelas neuropsicológicas y psicosociales del daño cerebral traumático. Estudio prospectivo con 18 meses de seguimiento. *Mapfre Medicina* 1997 ;8:41-54.
57. Max JE1, Lansing AE, Koele SL, Castillo CS, Bokura H, Schachar R, Collings N, Williams KE. Attention deficit hyperactivity disorder in children and adolescents following traumatic brain injury. *Dev Neuropsychol* 2004; 25:159-77.
58. Jennett B, Bond M. Assessment of outcome after severe brain damage. *Lancet* 1975; 1:480-4.
59. Crouchman M, Rossiter L, Colaco T, Forsyth R. A practical outcome scale for paediatric head injury. *Arch dis Child* 2001; 84:120-4
60. Hung MC, Sung JM, Chang YT, Hwang JS, Wang JD: Estimation of physical functional disabilities and long-term care needs for patients under maintenance hemodialysis. *Med Care* 2014; 52:63–70.
61. Zigmond AS, Snaith RP: The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand* 1983; 67:361–370.
62. Ewing-Cobbs L, Miner ME, Fletcher JM, Levin H. Intellectual, language and motor sequelae following closed head injury in infants and preschoolers. *J Pediatr Psychol* 1989; 14:531–47.
63. Crowe L, Babl F, Anderson V, Catroppa C: The epidemiology of paediatric head injuries: data from a referral centre in Victoria, Australia. *J Paediatr Child Health* 2009; 45:346–50.

64. Catroppa C, Anderson VA, Morse SA, Haritou F, Rosenfeld JV: Outcome and predictors of functional recovery 5 years following pediatric traumatic brain injury (TBI). *J Pediatr Psychol* 2008; 33:707–18.
65. Anderson V, Catroppa C, Morse S, Haritou F, Rosenfeld J: Functional plasticity or vulnerability after early brain injury? *Pediatrics* 2005; 116:1374–82.
66. Andruszkow H, Deniz E, Urner E et al. Physical and psychological long-term outcome after traumatic brain injury in children and adult patients. *Health Qual Life Outcomes* 2014; 12:26-34.
67. Crowe LM, Catroppa C, Babl FE, Rosenfeld JV, Anderson V. Timing of traumatic brain injury in childhood and intellectual outcome. *J Pediatr Psycho*. 2012; 37:745-54.
68. Crowe LM, Catroppa C, Babl FE, Anderson V. Intellectual, behavioral, and social outcomes of accidental traumatic brain injury in early childhood. *Pediatrics* 2012; 129:e262-8.
69. Anderson V, Godfrey C, Rosenfeld JV, Catroppa C: Predictors of cognitive function and recovery 10 years after traumatic brain injury in young children. *Pediatrics* 2012; 129:e254–e261.
70. Brooks BM, Rose FD, Johnson DA, Andrews TK, Gulamali R. Support for children following traumatic brain injury: the views of educational psychologists. *Disabil Rehabil* 2003; 25: 51-6.
71. Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities *Brain Research Reviews* 2002; 39:55-73.
72. Beauchamp K, Haitham M, Wade RS, et al. Pharmacology of Traumatic Brain Injury: Where Is the “Golden Bullet”? *Mol Med* 2008; 14:731-40.
73. Shohami E, Cohen A, et al. Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* 2011; 21: 163:1402-10.
74. Hurley SD, Olschowka JA, O'Banion MK. Cyclooxygenase inhibition as a strategy to ameliorate brain injury. *J. Neurotrauma* 2002; 19:1-15.
75. Hardingham GE. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans* 2000; 937:1147-60.
76. XiongY, Mahmood A, Chopp M. Emerging treatments for traumatic brain injury. *NIH Public Access Neurotherapeutics* 2009; 14:67-84.
77. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology* 2009; 7:65-74.
78. Pharms Corporation. Dexanabinol did not demonstrate efficacy (2004) [online], <http://www.pharmoscorp.com/news/pr/pr122004.html>.
79. Stein DG, Wright DW. Progesterone in the clinical treatment of acute traumatic brain injury. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19:847-57.
80. Ma J, Huang S, Qin S, You C. Progesterone for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2012 Oct 17; 10:CD008409.
81. Aminmansour B, Nikbakht H, Ghorbani A, Rezvani M, Rahmani P, Torkashvand M, Nourian M, Moradi M. Comparison of the administration of progesterone versus progesterone and vitamin D in improvement of outcomes in patients with traumatic brain injury: A randomized clinical trial with placebo group. *Adv Biomed Res* 2012; 1:58.
82. Gaddam SK, Cruz J, Robertson C. Erythropoietin and cytoprotective cytokines in experimental traumatic brain injury. *Methods Mol Biol* 2013; 982:141-62.
83. Jansen JO, Lord JM, Thickett DR, Midwinter MJ, McAuley DF, Gao F. Clinical review: Statins and trauma - a systematic review. *Crit Care* 2013; 17:227.
84. Sánchez-Aguilar M, Tapia-Pérez JH, Sánchez-Rodríguez JJ, Viñas-Ríos JM, Martínez-Pérez P, de la Cruz-Mendoza E, Sánchez-Reyna M, Torres-Corzo JG, Gordillo-Moscoso A. Effect of rosuvastatin on cytokines after traumatic head injury. *J Neurosurg* 2013; 118:669-75.

85. Lu XC, Chen RW, Yao C, Wei H, Yang X, Liao Z, Dave JR, Tortella FC. NNZ-2566, a glypromate analog, improves functional recovery and attenuates apoptosis and inflammation in a rat model of penetrating ballistic-type brain injury. *J Neurotrauma* 2009; 26:141-54.
86. Deusa J, Reimunde P, Bebera M, Arce V. Growth hormone and Brain Trauma. *Horm Behav* 2013; 83:331-44
87. Sablowski R. Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct?. *Trends Cell Biol* 2004; 14:605-11.
88. Inaba M, Yamashita YM. Asymmetric Stem Cell Division: Precision for Robustness. *Stem Cell* 2012; 11:461-9.
89. Dor Y, Melton DA. How important are adult stem cells for tissue maintenance? *Cell Cycle* 2004; 3:1104-6.
90. Thomson, J. A. et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl Acad* 1995; 92:7844–48.
91. Thomson, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 1145–7
92. Vogel, G. Cell biology Ready or not? Human ES cells head toward the clinic. *Science* 2005; 308:1534–8
93. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126:663–676
94. 2 Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, Cañamero M, Rayon T, Ors I. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* 2013; 502:340-5.
95. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM, The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001; 105:829-41.
96. Malcon RA, Poulsan R, Forbes S, Wright NA, An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002; 197:419-23.
97. Quesenberry PJ, Colvin GA, Lambert JF. The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory. *Blood* 2002; 100:4266-71.
98. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-González XP, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418:41-9
99. Fu X, Sun X, Li X, Sheng Z. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells in vivo. *Lancet* 2001; 358:1067.
100. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC 133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90:5002-12.
101. Guo Y, Follo M, Geiger K, Lubbert M, Engelhardt M. Side-population cells from different precursors compartments. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12:71-82.
102. Asakura A, Rudnicki MA. Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol* 2002; 30:1339-45.
103. Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - A new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003; 49:570-82.
104. Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics *Hematology* 2003; 1:398-418.
105. Schwartz S, Regillo C, Lam B. Sub-retinal Transplantation of hESC Derived RPE(MA09-hRPE)Cells in Patients With Stargardt's Macular Dystrophy. *Retina* 2012; 1:45-6
106. Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, M ickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. 2012; 379:713-20.

107. <http://www.clinicaltrials.gov/search?term=stem+cells+geron>.
108. DKamao H, Mandai M, Okamoto S, Sakai N, Suga A, Sugita S, Kiryu J, Takahashi M. Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports* 2014; 2:205-18.
109. EGlass JD1, Boulis NM, Johe K, Rutkove SB, Federici T, Polak M, Kelly C, Feldman EL. Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase I trial in 12 patients. *Stem Cells*. 2012; 30:1144-51.
110. Marchant J. Human eggs supply “ethical” stem cells. *Nature* 2006; 441:1038.
111. Patel P. A natural stem cells therapy. How novel findings and biotechnology clarify the ethics of stem cell research. *J M Ethic* 2006; 32:235-9.
112. Martino, G. & Pluchino, S. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nature reviews* 2006; 395-406.
113. Richardson, R. M. et al. Stem cell biology in traumatic brain injury: effects of injury and strategies for repair. *Journal of neurosurgery* 2010; 112,1125-38.
114. Harting, M. T., Sloan, L. E., Jimenez, F., Baumgartner, J. & Cox, C. S., Jr. Subacute neural stem cell therapy for traumatic brain injury. *The Journal of surgical research* 2009; 153:188-94.
115. Walker, P. A., Shah, S. K., Harting, M. T. & Cox, C. S., Jr. Progenitor cell therapies for traumatic brain injury: barriers and opportunities in translation. *Disease models & mechanisms* 2009; 2:23-38.
116. Dominici M, Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2006; 8:315-7.
117. Bianco P, Kuznetsov SA, Riminucci M, Gehron Robey P. Postnatal skeletal stem cells. *Methods Enzymol* 2006; 419:117-48.
118. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol* 2005; 23:845-56.
119. Wexler S, Donaldson C, Denning P, Rice C, Bradley B, Hows J. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal «stem» cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*. 2003;121:368-374.
120. Londono C, Büscher D, Beraza A, Abad J.L, Camarillo E. Obtención de células madre inmortalizadas derivadas de lipoaspirado para su diferenciación hacia diferentes linajes. *CLAIB* 2007; 18:667–70.
121. Zuk P, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell W, Katz AJ et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001; 7:211-28,.
122. Mizuno H, Zuk P., Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2002; 109:199-209.
123. Huang JI, Zuk PA, Jones NF. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2004; 113:585-94.
124. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk P, Dragoo J et al. Comparison of multilineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells tissues organs* 2003; 174:101-109.
125. Coleman WP, Hendry SL. Principles of liposuction. *Seminars in cutaneous medicine and surgery* 2006; 25:138-44.
126. Nichols JE, Niles JA, DeWitt D, Prougf D, Parsley M, Vega S et al. 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 research & therapy* 2013; 3: 151-5.
127. Secco M, Zucconi E, Vieira N, Fagaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, Jazedje T et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem cells* 2008; 26:146-50.

128. Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, Who S et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *International journal of molecular sciences* 2013; 14:17986-8001.
129. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005; 33:1402-16.
130. Kim, H. J., Lee, J. H. & Kim, S. H. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis. *Journal of neurotrauma* 2010; 27: 131-8.
131. 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. *Journal of neurotrauma* 2004; 21:33-9.
132. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002; 59:514-23.
133. Qu R, Li Y, Gao Q, Shen L, Zhang J, Liu Z, et al. Neurotrophic and growth factor gene expression profiling of mouse bone marrow stromal cells induced by ischemic brain extracts. *Neuropathology* 2007; 27:355-63.
134. Cho SR, Yang MS, Yim SH, Park JH, Lee JE, Eom YW, et al. Neurally induced umbilical cord blood cells modestly repair injured spinal cords. *Neuroreport* 2008; 19:1259-63.
135. Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Lee HS, Kim HS, Lee YD, et al. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Exp Mol Med* 2008; 40:387-97.
136. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:10711-6.
137. Kim SS, Yoo SW, Park TS, Ahn SC, Jeong HS, Kim JW, et al. Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain. *Stem Cells* 2008 ;26:2217-28.
138. De Feo D, Merlini A, Laterza C, Martino G. Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders: from cell replacement to neuroprotection. *Current opinion in neurology* 2012; 25:322-33
139. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection; *J Inflamm* 2005; 2:8-14.
140. Seo JH, Jang IK, Kim HB, Yang MS, Lee JE, Kim HE, et al. Immunomodulation from intravenous transplantation of mesenchymal stem cells promotes functional recovery in spinal cord injured rats. *Cell Med* 2011;2:55-67.
141. Zhang R, Liu Y, Yan K, Chen L, Chen XR, Li P et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury. *Journal of neuroinflammation* 2013; 10:106.
142. Dorronsoro A, Ferrin I, Salcedo JM, Jakobsson E, Fernández-Rueda J, Lang V et al. Human Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Immunoregulation: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *Bone marrow research* 2013; 44:480-8.
143. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP . Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 2007; 149:353–63.
144. Prockop, D. J. & Oh, J. Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2012; 20:14-20.
145. Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105:1815-22
146. Maltman DJ, Hardy SA, Przyborski SA. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem Int* 2011; 59:347-56.

147. Sakai T, Johnson KJ, Murozono M, Sakai K, Magnuson MA, Wieloch T, et al. Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat Med* 2001;7:324-30.
148. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 2003;73:778-86.
149. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98:1076-84.
150. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109: 1292-8.
151. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004; 110:349-55.
152. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med* 2003; 5:1028-38.
153. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. *Stem Cells* 2010; 28:585-96.
154. Marmarou A, Foda M, Van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats: Part I. Pathophysiology and biomechanis. *J Neurosurg* 1994; 80:291-300.
155. Prieto R, Gutiérrez-González R, Pascual JM, Roda JM, Cerdán S, Matias-Guiu JA et al. Modelos experimentales de traumatismo craneoencefálico. *Neurocirugía* 2009; 20:225-44
156. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghamai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 1991; 39:253-62.
157. 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; 23:760-9.
158. Paxinos WC. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2^a ed. Madrid: Academic Press Inc; 1998.
159. Harting MT, Sloan LE, Jiménez F, Baumgartner J, Cox CS. Subacute neural stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Surg Res* 2009; 153: 188-94.
160. Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka K et al. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol* 2004; 187:266-78
161. Zanier EL, Montinaro M, Viganò M, Villa P, Fumagalli S, Pischiutta F. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells protect mice brain after trauma. *Crit Care Med* 2011; 39:2501-11
162. Mahmood A, Lu D, Yi L, Chen JL, Chopp M. Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats. *Journal of neurosurgery* 2001; 94:589-95.
163. Mahmood A, Lu D, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain 2004. *Neurosurgery*; 55:1185-93.
164. Lu D, Mahmood A, Qu C, Hong X, Kaplan A, Michael C. Collagen scaffolds populated with human marrow stromal cells reduce lesion volume and improve functional outcome after traumatic brain injury. *Neurosurgery* 2007; 61:596-602.
165. Qu C, Xiong Y, Mahmood A, Kaplan DL, Goussev A, Ning et al. Treatment of traumatic brain injury in mice with bone marrow stromal cell-impregnated collagen scaffolds. *Journal of neurosurgery* 2009; 111:658-65.
166. 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. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2005; 25:887-98.

167. Xue S, Zhang H, Zhang P, Lou J, Chen Z, Jang X, Xu R. Functional endothelial progenitor cells derived from adipose tissue show beneficial effect on cell therapy of traumatic brain injury. *Neuros Letters*. 2010; 473:186-91
168. Xiong Y, Qu C, Mahmood A, Liu Z, Ning R, Li Y et al. 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 research* 2009; 1263, 183-91.
169. Lundberg J, Le Blanc K, Söderman M, Andersson T, Holmin S. Endovascular transplantation of stem cells to the injured rat CNS. *Neuroradiology* 2009; 51:661–67
170. 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. *Journal of neurotrauma* 2001; 19:813-19.
171. 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: 697-703
172. 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. *Journal of neurotrauma* 2004; 21:33-39,
173. 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; 57:1026-31
174. 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. *Neurosurg* 2006; 104:272-7
175. 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; 110:1189-97
176. 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; 18:683-92
177. Sokolova IB, Fedotova OR, Tsikunov SG, Polyntsev DG. Mesenchymal Stem Cells Restore Orientation and Exploratory Behavior of Rats after Brain Injury. *Cell Tech in Biology and Medicine* 2011; 1:130-2
178. Bonilla C, Zurita M, Otero L, Aguayo C, Rico MA, Rodríguez A, Vaquero J. Failure of delayed intravenous administration of bone marrow stromal cells after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2012; 29:394-400.
179. Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem cells transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc* March 2007; 39:573-6
180. Schar KI, Brenneman MM, Savitz SL. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med* 2010; 19:13
181. Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Rodríguez A, Zurita M, Vaquero J. Cell therapy for treatment of traumatic brain injury: Utility of different tests for functional assessment *Trauma Fund MAPFRE* 2009; 20:234-42
182. Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28:365-78
183. 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; 11:187–96
184. Otero L, Zurita M, Bonilla C, Aguayo C, Rodríguez A, Vaquero J. Video-tracking-box: Una nueva herramienta para evaluar la actividad motora y la orientación en ratas sometidas a un daño cerebral. *Trauma Fund MAPFRE* 2011; 22:54-9
185. Persons DA, Allay JA, Riberdy JM et al. Use of the green fluorescent protein as a marker to identify and track genetically modified hematopoietic cells. *Nat Med* 1998; 4:1201-5
186. Harting MT, Jimenez F, Cox CS. Isolation of mesenchymal stem cells from GFP transgenic rodents; The grass is not always green(er). *Stem cells develop* 2009; 18:127-35

187. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 509-44
188. Zahid M, Robbins PD. Protein transduction domains: applications for molecular medicine. *Cur Gene Ther* 2012; 12:374-80.
189. Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS. High efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type-1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J virol* 1996; 70:2581-5.
190. Reiser J, Harmison G, Cluepfel-Stahl S, Brady RO, Karisson S, Schubert M. Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 24:15266-71.
191. Guenechea G, Gan OI, Inatmitsu T, Dorrel C, Pereira DS, Lelly M et al. *Mol Ther* 2000; 1:566-73.
192. Yoon JK, Park BN, Woo-Young S, Young Shin J, Lee G, Hwan Ahn Y. In vivo tracking of 111In-labeled bone marrow mesenchymal stem cells in acute brain trauma model. *Nucl Med Biol* 2010; 381-8
193. Park BN, Shim W, Lee G, Bang OY, An YS, Yoon JK, Ahn YH. Early distribution of intravenously injected mesenchymal stem cells in rats with acute brain trauma evaluated by (99m)Tc-HMPAO labeling. *Nucl Med Biol*. 2011; 38:75-8
194. Sotiropoulou P, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis C, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:462-71.
195. Rogers DC, Campbell CA, Streton JL, Mackay KB. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 1997; 28:2060-5.
196. Hamm RJ. Neurobehavioral assessment of outcome following traumatic brain injury in rats: an evaluation of selected measures. *J Neurotrauma* 2001; 18:1207-16.
197. Komotar RJ, Kim GH, Sughrie ME, Otten ML, Rynkowski MA, Kellner CP et al. Neurologic assessment of somatosensory dysfunction following an experimental rodent model of cerebral ischemia. *Nat Protoc* 2007; 2:2345-7.
198. Sughrie 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; 151:83-9.
199. 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 hematopoietic administration of allogeneic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats. *Neuroscience* 2011; 175:394-405.
200. 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 allogeneic 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; 4:11.
201. 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; 30:920-37.
202. Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, Horwitz E, Le Blank K et al. Defining the risk of mesenchymal stroma cell therapy. *Cytotherapy* 2011; 12: 576-8.
203. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102:3837-44.
204. Zhu W, Xu W, Jiang R, Quian H, Chen M, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol* 2000; 80:267-74
205. Riggi N, Cironi L, Provero P, Suva ML, Kaloulis K, Garcia-Echevarria C et al. Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res* 2005; 65:11459-68.

206. Lalu MM, Mcintyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston B, Marshall JC et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stroma cells (SafeCell): A systematic review and Meta-analysis of clinical trials. *PLoS ONE* 7:e47559.
207. Coyne T M, Marcus AL, 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; 24:2483-92
208. Pundt LL, Kondoh T, Conrad JA, Low WC. Transplantation of human fetal striatum into a rodent model of Huntington's disease ameliorates locomotor deficits. *Neurosci Res* 1996; 24: 415-20
209. Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy; Optimization of cell preparation protocols. *Biomed Res Int* 2014; 2014:951512.
210. Cernak I, Chang T, Ahmed F, Cruz MI, Vink R, Stoica B et al. Pathophysiological response to experimental diffuse brain trauma differs as a function of developmental age. *Dev Neurosci* 2010; 32:442-53.
211. Cernak I. Animals models of head trauma. *NeuroRX* 2005; 20:410-22.
212. Bonilla C, Zurita M, Otero L, Aguayo C, Rico MA, Vaquero J. The severity of brain damage determines bone marrow stromal cell therapy efficacy in a traumatic brain injury model. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012 May; 72:1203-12.
213. 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; 12:8.
214. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP, Donnenberg AD. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry A* 2013; 83:134-40.
215. 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; 4:125.
216. 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; 16:37-43.
217. Ra JC, Shin IS, Kim SH, Lang SK, Kang BC, Lee HY et al. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells Dev* 2011; 20:1297-308.
218. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy. *J cell mol med* 2004; 8:301-316.
219. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:1313-8
220. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal cells. *Science* 1999; 284:143-7
221. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000; 113:1161-6
222. Fink DW. FDA regulation of stem cell-based products. *Science* 2009; 324:166-23.
223. Woolf SH. The meaning of translational research and why it matters. *JAMA* 2008; 299:211-2.
224. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=meseenchymal+stem+cells. Búsqueda realizada el 5/09/14.
225. Dai G, Liu X, Zhang Z, yang Z, Dai Y, Xu R. Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of complete and chronic cervical spinal cord injury. *Brain Res* 2013;1533:73-9.
226. Wang S, Cheng H, Dai G, Wang X, Hua R, Liu X, Wang P et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation significantly improves neurological function in patients with sequelae of traumatic brain injury. *Brain Res* 2013; 1532:16-84.

227. Tian C, Wang X, Wang X, Wang L, Wang X, Wu S et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy in the subacute stage of traumatic brain injury by lumbar puncture. *Exp clin transplant* 2013; 11:176-81.

228. Cox CS, Baumgartner JE, Harting MT, Worth LL, Walker PA, Shah SK et al. Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for severe traumatic brain injury in children. *Neurosurgery* 2011; 68:588-600.

229. Mackay-Sim A, Féron F, Cochrane J, Bassigthwaighe L, Bayliss C, Davies W et al. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 2 years clinical trial. *Brain* 2008; 131:2376-86.

230. Zhang ZX, Guan LX, Zhang K, Zhang Q, Dai U. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stroma cells to patients with traumatic brain injury. *Cytotherapy* 2008; 10: 134-3.

231. Seledtsov VI, Rabinovich SS, Parlyuc OV, Poveshchenko OV, Astrakov SV, Samarin DM et al. Cell therapy of comatose states. *Bull Exp Biol Med* 2006; 142:129-32.